UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA

ÁDRIAN CAMARGO AMARAL JORGE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE EM RATOS COM LESÃO PERIAPICAL

PONTA GROSSA
2016

ÁDRIAN CAMARGO AMARAL JORGE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE EM RATOS COM LESÃO PERIAPICAL

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Odontologia na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Clínica Integrada – Linha de Pesquisa: Etiologia, diagnóstico e tratamento das doenças bucais.
Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.
Co-orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Márcia Thaís Pochapski.

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Araújo, Ádrian Camargo Amaral Jorge
A663 Avaliação de ansiedade em ratos com lesão periapical/ Ádrian Camargo Amaral Jorge Araújo. Ponta Grossa, 2016.
77f.

Dissertação (Mestrado em Odontologia - Área de Concentração: Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos.
Coorientadora: Profª Drª Márcia Thaís Pochapski.

1.Comportamento animal. 2.Ansiedade. 3.Lesão periapical. I.Santos, Fábio André dos. II. Pochapski, Márcia Thaís. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Odontologia. IV. T.

CDD: 617.6

TERMO DE APROVAÇÃO

ÁDRIAN CAMARGO AMARAL JORGE ARAÚJO

AVALIAÇÃO DE ANSIEDADE EM RATOS COM LESÃO PERIAPICAL

Dissertação apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada.

Ponta Grossa, 15 de fevereiro de 2016

Prof. Dr. Fábio André dos Santos - Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª. Drª. Lea Rosa Chioca
Centro de Ensino Superior dos Campos Gerais

Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à **Deus**, pelo dom da vida, por me permitir chegar até aqui me guiando, confortando e dando forças todos os dias e em todos os momentos.

À professora doutora **Márcia Thaís Pochapski** pela orientação, dedicação, carinho e paciência, pelo grande exemplo de profissional e por me ouvir e apoiar sempre.

Ao professor doutor **Fábio André dos Santos**, pela orientação, apoio e incentivo, compartilhando seus conhecimentos e experiências comigo.

Aos professores doutores **Gibson Luiz Pilatti** e **Marcelo Machado Ferro**, por suas importantes contribuições no exame de qualificação.

Ao professor doutor **Eduardo B. Campagnoli**, pela ajuda com a análise histológica.

E aos demais professores do programa de pós-graduação, que em muito contribuíram para minha formação.

Às alunas de iniciação científica, **Ana Elisa Ribeiro**, a qual tive a oportunidade de co-orientar seu TCC, **Fernanda Castro** e **Júlia Rossi**, pela grande ajuda com os experimentos e companhia constante, mesmo em período não letivo.

À Universidade Positivo e à professora doutora **Flávia Sens Fagundes Tomazinho** por nos ceder o espaço e permitir a realização das radiografias digitais.

Ao funcionário do laboratório de pós graduação **Luiz Roberto Canteri**, obrigada por me ajudar durante todo esse período, principalmente com a histologia.

À secretária do programa **Morgana das Graças** pela grande dedicação e paciência em nos auxiliar em todos os momentos.

À funcionária do Biotério **Marilene Terezinha Barbosa**, pela grande disponibilidade em auxiliar no manejo e alimentação dos animais.

Àо funcionário **José Milano Júnior** por todo o auxílio e disponibilidade com as radiografias no projeto piloto.

Aos meus colegas de turma de mestrado, em especial, **Cindy, Evelyn, Luisa e Mariane,** por todos os momentos compartilhando alegrias e tristezas, por toda ajuda e carinho, obrigada pela amizade.

À minha mãe **Selma** e minha avó **Isabel** pelo incentivo, constante apoio e tremenda dedicação, obrigada por sempre acreditar em mim.

Ao meu amado esposo **André**, pela compreensão e grande ajuda em todos os instantes, mesmo com a distância, sempre me apoiando e não me deixando desanimar.

À minha família e amigos pelo constante apoio.

À CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, onde obtive formação técnica e científica de qualidade.

E à todas as pessoas que contribuíram para o meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Muito obrigada!

“Entrega o teu caminho ao Senhor,
confia Nele, e o mais Ele fará”
Salmos 37:5.

DADOS CURRICULARES

ÁDRIAN CAMARGO AMARAL JORGE ARAÚJO

NASCIMENTO 26.06.1990	Jaguariaíva- Paraná- Brasil
FILIAÇÃO	Selma de Cássia C. Amaral Ambrósio Cursino Jorge
2009-2013	Curso de Graduação em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG
2014-2016	Mestrado em Odontologia na área de concentração em Clínica Integrada- Universidade Estadual de Ponta Grossa- UEPG

RESUMO

ARAÚJO, ACAJ. **Avaliação de ansiedade em ratos com lesão periapical.** [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

O objetivo deste trabalho foi investigar se a indução de lesão periapical em molares de ratos promove alterações comportamentais nesses animais. Foram utilizados 81 ratos Wistar machos, com aproximadamente 45 dias de idade, sendo 27 animais utilizados como controle negativo (Controle) ,27 submetidos à abertura coronária e exposição da câmara pulpar para a contaminação do canal radicular e mantidos com o dente aberto por 7, 15 e 30 dias (CCA) e 27 submetidos à abertura coronária e exposição da câmara pulpar mantidos com o dente aberto por 7, 15 e 30 dias e após estes períodos tiveram o dente fechado com resina composta por mais 7 dias (CCF). Os testes comportamentais utilizados neste estudo foram o Labirinto em Cruz Elevado (LCE) e o Campo Aberto (CA). Ambos foram aplicados no início e ao final de cada período experimental. Após os períodos experimentais os animais foram sacrificados por excesso anestésico e as mandíbulas removidas, seccionadas e fixadas para posterior análise radiográfica e histológica. Foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dois critérios para os dados do comportamento animal. No grupo CCF foi utilizado o teste t *student* pareado para as comparações antes e depois do dente fechado com resina composta. Para todos os testes o nível de significância foi de 0,05. As lesões periapicais induzidas levaram a alteração comportamental nos animais, mostrando provável aumento no nível de ansiedade, no grupo CCA, até 15 dias após a indução, e no grupo CCF, em todos os períodos, principalmente em 30 dias. O modelo animal utilizado mostrou-se satisfatório em induzir as lesões periapicais inflamatórias. Os aspectos radiográficos foram concordantes com os microscópicos. As lesões periapicais induzidas em ratos, em ambos os grupos teste (CCA e CCF), apresentaram áreas radiolúcidas significativamente maiores em comparação ao grupo controle, presença de necrose pulpar, reabsorção óssea e infiltrado inflamatório polimorfonuclear em todos os períodos (7, 15 e 30 dias). O grupo CCA apresentou microabscessos nos períodos de 7 e 30 dias e intensa reabsorção óssea em 15 dias, e o grupo CCF, formação de microabscessos nos períodos de 15 e 30 dias.

Palavras-chave: Comportamento animal, Ansiedade, Lesão Periapical.

ABSTRACT

ARAÚJO, ACAJ. **Anxiety evaluation in rats with periapical lesion.** [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2016.

The aim of this study was to investigate if induced periapical lesion in rat molars can lead to behavioral changes in these animals. Eighty-one male Wistar rats were used, with approximately 45 days of age, 27 animals were used as control (Control), 27 were submitted to a coronary opening and exposure of the pulp to root canal contamination and left open for 7,15 and 30 days (CCA), and 27 were submitted to a coronary opening and exposure of the pulp and left for 7,15 and 30 days and after the experimental period the tooth was closed with composite resin and kept closed for 7 more days (CCF). All analyzes were performed at 7, 15 and 30 days. The behavioral tests used in this study were the Elevated Plus Maze (LCE) and Open Field (CA). Both were applied at the beginning and at the end of each experimental period. After the experimental period the animals were sacrificed by anaesthetic overdosage, and the jaws were removed, sectioned and fixed for further radiographic and histologic analysis.. The analysis of variance (ANOVA) two criteria was used for animal behavior data. In the CCF group the t student paired test was used for comparisons between before and after close the tooth with composite resin. For all tests, the significance level was 0.05. Induced periapical lesions led to behavioral changes in animals, showing probable increase in the level of anxiety, in the CCA group, up to 15 days after induction, and the FCC group, in all periods, mostly at 30 days. The animal model utilized showed satisfactory in inducing inflammatory periapical lesions. The radiographic and microscopic findings were in accordance. Periapical lesions induced in rats in both test groups (CCA and CCF), had significantly higher radiolucent areas compared to the control group, presence of pulp necrosis, bone resorption and polymorphonuclear inflammatory infiltrate at all periods (7, 15 and 30 days). The CCA group exhibited microabscesses at 7 and 30 days and intense bone resorption within 15 days, and the CCF group, microabscesses formation at 15 and 30 days.

Key-Words: Animal behavior, Anxiety, Periapical Lesion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Primeiro molar inferior esquerdo fechado com resina composta..... 34
Figura 2- Aparato usado para o teste de Campo Aberto..... 36
Figura 3- Aparato usado para teste de Labirinto em Cruz Elevado..... 37
Figura 4- Obtenção da imagem radiográfica digital..... 39
Figura 5- Localização da glândula adrenal..... 40
Figura 6- Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do campo aberto..... 42
Figura 7- Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do labirinto em cruz elevado..... 43
Figura 8- Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do campo aberto com o grupo CCF, comparando antes e depois de fechar o dente com resina composta..... 44
Figura 9- Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do labirinto em cruz elevado com o grupo CCF, comparando antes e depois de fechar o dente com resina composta..... 45
Figura 10- Radiografias da hemimandíbulas direita(A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 7 dias..... 46
Figura 11- Radiografias da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 15 dias..... 46
Figura 12- Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 30 dias..... 47
Figura 13- Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA de 7 dias..... 47
Figura 14- Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA de 15 dias..... 48
Figura 15- Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA de 30 dias..... 48
Figura 16- Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF de 7 dias..... 49

Figura 17- Radiografias das hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF de15 dias 49
Figura 18- Radiografias das hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF de 30 dias..... 50
Figura 19- Média e erro padrão dos parâmetros com a análise radiográfica da região periapical radiolúcida nos diferentes grupos experimentais..... 51
Figura 20- Média e erro padrão do peso dos animais nos diferentes grupos experimentais..... 52
Figura 21- Média e erro padrão do peso da glândula adrenal dos animais nos diferentes grupos experimentai..... 53
Figura 22- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 7 dias..... 54
Figura 23- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 15 dias..... 54
Figura 24- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 30 dias..... 55
Figura 25- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 7 dias..... 56
Figura 26- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 15 dias..... 57
Figura 27- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 30 dias..... 58
Figura 28- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 7 dias 59
Figura 29- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 15 dias..... 60
Figura 30- Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 30 dias..... 61

TABELA

Tabela 1- Divisão dos grupos experimentais..... 33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADAA	abscesso dentoalveolar agudo
ADAC	abscesso dentoalveolar crônico
ANOVA	análise de variância
CA	campo aberto
CCA	canal contaminado aberto
CCF	canal contaminado fechado
CEUA	comitê de ética no uso de animais
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-ácetico
HE	hematoxilina-eosina
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
LCE	labirinto em cruz elevado
MN	mononucleares
PMN	polimorfonucleares
SNC	sistema nervoso central
TNF-α	fator de necrose tumoral α

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcento
cm	centímetro
mg	miligrama
g	grama
mL	mililitro
mm	milímetro
mm^2	milímetro quadrado
µm	micrômetro
<	menor
>	maior

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 15
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 18
2.1 CONCEITO DE ANSIEDADE..... 18
2.2 TESTES DE ANSIEDADE ANIMAL..... 20
2.2.1 CAMPO ABERTO..... 21
2.2.2. LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO..... 22
2.3 INFLUÊNCIA DO SISTEMA IMUNE SOBRE O CÉREBRO
E O COMPORTAMENTO..... 22
2.4 LESÃO PERIAPICAL
2.4.1. FISIOPATOLOGIA DA LESÃO PERIAPICAL INFLAMATÓRIA 24
2.4.2 ESTUDO DA LESÃO PERIAPICAL INFLAMATÓRIA EM
MODELOS EXPERIMENTAIS..... 28
3. PROPOSIÇÃO..... 31
3.1 OBJETIVO GERAL..... 31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 31
4. MATERIAL E MÉTODOS..... 32
4.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL..... 32
4.2 INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA LESÃO PERIAPICAL INFLAMATÓRIA. 33
4.3 TESTES COMPORTAMENTAIS..... 34
4.3.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)..... 35
4.3.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE) 36
4.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAISE MANIPULAÇÃO DA AMOSTRA 38
4.5. OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS DIGITAIS... 38
4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA..... 40
4.7 OBTENÇÃO DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL..... 40
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 41
5. RESULTADOS..... 42
5.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO
5.1.1 TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)..... 42
5.1.2 TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)..... 43

5.1.3- TESTES CAMPO ABERTO E LABIRINTO EM CRIZ ELEVADO PARA O GRUPO CCF ANTES E DEPOIS DE FECHAR O DENTE COM RESINA COMPOSTA..... 44
5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA
5.2.1 IMAGENS DAS RADIOGRAFIAS DIGITAIS..... 45
5.2.2 ÁREA E PERÍMETRO OBTIDOS PELAS RADIOGRAFIAS DIGITAIS..... 51
5.3 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS..... 52
5.4 AVALIAÇÃO DO PESO DAS GLÂNDULAS ADRENAIS..... 53
5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA..... 54
6. DISCUSSÃO..... 62
7. CONCLUSÃO..... 69
REFERÊNCIAS..... 70
ANEXO A: APROVAÇÃO DO PROJETO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA..... 77

1.INTRODUÇÃO

Devido ao estilo de vida, cultura e sociedade em que a pessoa vive, ela pode vir a desenvolver diversos transtornos mentais. Dentre eles, notam-se o transtorno do estresse, a anorexia nervosa, transtornos do sono, a depressão e a ansiedade, sendo estes dois últimos os transtornos mentais mais comuns em adultos atualmente. A ansiedade é um processo psicológico complexo, que muitas vezes surge após experiências de vida estressantes. Quando prolongada ou exagerada ao longo do tempo, pode produzir comportamentos anormais e adaptativos. Os transtornos de ansiedade são caracterizados por medo excessivo, geralmente em resposta a objetos ou situações específicas que não representam perigo, eles são prevalentes na população em geral com estimativas de 30% (Shin e Liberzon[1] 2010, Kessler et al.[2] 2005). O conhecimento atual das estruturas envolvidas na regulação da ansiedade baseia-se tanto em evidências clínicas como experimentais, obtidas em seres humanos e em animais de laboratório. Para estudar a ansiedade experimentalmente, muitos modelos animais foram desenvolvidos ao longo das décadas. Mesmo que os animais não possuam as mesmas sensações que os seres humanos em relação a ansiedade, entre as espécies parece existir uma correspondência em relação a mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a essa emoção, desde a percepção de situações sinalizadoras de um perigo em potencial até a organização das reações de defesa e em mamíferos essa relação é ainda maior (Cruz e Fernandez[3] 2012).

O estresse tem um papel fundamental no desenvolvimento de alterações psicopatológicas as quais interferem em diversos processos fisiológicos como os sistemas endócrino, imunológico e sistema nervoso central (Pacak e Palkovits[4] 2001, Wu et al.[5] 2011). A vida é dependente da manutenção da homeostase a qual é constantemente desafiada por estímulos estressores que são classificados em quatro grupos: estressores físicos ou químicos (calor, frio, radiação intensa, barulho, vibração, substâncias tóxicas e álgicas, etc.); psicológicos (modificando processos emocionais e comportamentais como ansiedade, medo, frustração, etc.); sociais (ambiente hostil, rompimento de relações, etc.); os que alteram a homeostase vegetativa (exercício, inclinação corporal, hipoglicemia, etc.) (Courvoisier[6] 1996, Choi et al.[7] 2013, Matto e Allikmets[8] 1999). Em relação à duração, esses estressores

podem ser agudos (único, intermitente, exposição em tempo limitado) ou crônicos (exposição intermitente, porém prolongada, exposição contínua) (Pacak e Palkovits[4] 2001).

Os diferentes organismos têm desenvolvido mecanismos para combater o estresse em suas vidas, uma vez que são marcantes os efeitos danosos do estresse sobre o indivíduo (Wu et al.[5] 2011, Choi et al.[7] 2013). Ao longo do tempo, foi aceito que os animais também sofrem com a carga de estresse e desenvolvem patologias similares aos seres humanos, quando expostos a situações adversas ao seu organismo, podendo culminar em doenças, atraso no crescimento, prejuízos reprodutivos, alterações no metabolismo, na resposta imunológica e no comportamento animal. Reconhecer os efeitos nocivos do estresse demonstra sua importância para o bem estar de um animal (Matto e Allikmets[8] 1999, Carvalho e Dupuy[9] 2013, Gomes et al.[10] 2013). Em termos biológicos, a ansiedade induz a uma forma particular de inibição comportamental, que ocorre em resposta aos eventos ambientais que são novos, não recompensadores (em condições em que a recompensa é esperada) ou à punição. Em animais, esta inibição comportamental pode tomar forma de imobilidade ou de supressão de uma resposta comportamental (Matto e Allikmets[8] 1999).

Evidências clínicas e laboratoriais mostram que a dor orofacial pode muitas vezes resultar em alteração de humor e ansiedade persistente, alterando a qualidade de vida do paciente (Shang et al.[11] 2015). Na Odontologia, diversas condições clínicas podem induzir a ativação do sistema imune e consequentemente possíveis quadros de sintomatologia dolorosa, como alterações pulpares e doença periodontal. As alterações pulpares, que ocorrem em função de agentes mecânicos, físicos, químicos ou bacterianos, podem levar à reações periapicais inflamatórias, cuja evolução pode estar diretamente associada à intensidade do agente agressor, condições anatômicas do ápice radicular e até mesmo às condições dos tecidos periapicais (Dammaschke[12] 2010, Scarparo et al.[13] 2011, Tobias Duarte et al.[14] 2014).

Uma infecção bacteriana da polpa dental resulta primeiramente em destruição pulpar e, finalmente, no desenvolvimento de uma lesão periapical que num primeiro momento é aguda, e pode se tornar crônica com concomitante reabsorção óssea. A literatura propõe que componentes bacterianos (lipopolissacarídeos), prostaglandinas, bradicininas, complexos antígeno-anticorpo e citocinas pró-

inflamatórias produzidos por células do hospedeiro em resposta à infecção, são estimuladores de reabsorção óssea (Stashenko et al.[15] 1994). Estes mediadores presentes nas lesões periapicais são apontados na literatura como sendo relacionados com o SNC podendo alterar o comportamento. Entretanto, pouco se relata na literatura sobre a relação das lesões periapicais com uma alteração de comportamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1- CONCEITO DE ANSIEDADE

A ansiedade pode ser definida como um estado emocional vivenciado subjetivamente como ameaçador ou desagradável, cujos sintomas podem ser alteração do humor e da cognição, acompanhados na maioria das vezes por alterações comportamentais e fisiológicas, como sudorese, palpitações e hipervigilância (Pratt et al.[16] 1992). Portanto, a ansiedade é um processo psicológico complexo, que muitas vezes surge após experiências de vida estressantes. Em alguns casos, é adaptável, uma vez que prepara o organismo para futuras situações estressantes. No entanto, se prolongada ou exagerada ao longo do tempo, a ansiedade pode produz comportamentos anormais e adaptativos. Os transtornos de ansiedade são caracterizados por medo excessivo, geralmente em resposta a objetos ou situações específicas que não representam perigo. Entretanto, muitas vezes não é fácil estabelecer um limite entre ansiedade denominada normal e a patológica. (Shin e Liberzon[1] 2010).

A ansiedade patológica caracteriza-se como uma resposta ao estímulo percebido que torna-se exagerada e irracional, interferindo na capacidade do indivíduo de desempenhar suas funções normais e na sua qualidade de vida. (Pratt et al.[16] 1992, Graeff[17] 1993). Costuma estar presente em condições estressantes variadas, como associada a doenças, na vigência do uso de medicamentos ou drogas, na abstinência de depressores do SNC ou mesmo, primariamente, nos chamados transtornos ansiosos (Graeff et al.[18] 1997, Crawley et al.[19] 1985, Overstreet et al.[20] 1995).

A ansiedade pode ser definida como uma reação ao perigo ou à ameaça. Ansiedades de curto prazo ou imediatas são designadas como reações de luta-e-fuga. Logo, o objetivo primordial da ansiedade é proteger o organismo. Quando há percepção ou antecipação de perigo, o cérebro envia mensagens ao sistema nervoso autônomo, o qual possui dois ramos: o sistema nervoso simpático e o sistema nervoso parassimpático, os quais controlam os níveis de energia do corpo e de sua preparação para a ação. Ou seja, o sistema nervoso simpático é o sistema

da reação de luta-e-fuga enquanto que o parassimpático, é o sistema que traz o corpo a seu estado de equilíbrio (Barlow et al.[21] 1994).

A atividade do sistema nervoso simpático acelera o batimento cardíaco, aumentando também sua força, o que é vital para a preparação da luta-ou-fuga, pois torna o fluxo sanguíneo mais rápido, o que melhora a distribuição de oxigênio nos tecidos e a remoção de produtos tóxicos dos mesmos. O sistema nervoso simpático também altera o fluxo sanguíneo, redirecionando-o para as partes onde é mais essencial. Ocorre também um aumento na profundidade e velocidade da respiração e um aumento na transpiração. Além desses efeitos, a ativação do sistema nervoso simpático produz vários outros, mas nenhum que seja prejudicial ao organismo. Por exemplo, há uma dilatação das pupilas para permitir a entrada de mais luminosidade, e também uma redução na produção de saliva, resultando em boca seca. Há uma redução na atividade do sistema digestivo, podendo produzir náuseas, uma sensação de peso no estômago e também constipação ou diarréia. Enfim, vários grupos de músculos se tencionam e se preparam para a reação de luta-e-fuga, o que resulta em sintomas de tensão, podendo em muitas vezes tornar-se dores reais e tremores (Barlow et al.[21] 1994).

Ou seja, primordialmente a reação de luta-e-fuga ativa o metabolismo corporal de maneira geral. Pode ocorrer também uma mudança automática e imediata na atenção para pesquisar o ambiente em busca de ameaças em potencial, pois o efeito principal da reação de luta-e-fuga é alertar o organismo para a possível existência do perigo. Por isso, a ansiedade dificulta a concentração em tarefas diárias. Pessoas ansiosas frequentemente se queixam por ficarem distraídas durante tarefas do dia-a-dia, por falta de concentração e problemas de memória (Barlow et al.[21] 1994).

Os transtornos de ansiedade são prevalentes na população em geral com as estimativas de 30%. Além disso, representam um grande ônus econômico, porque eles prejudicam o desempenho no local de trabalho. Portanto, os transtornos de ansiedade são devastadores em seus custos pessoais, sociais e financeiros (Hofmann W[22] 2008).

2.2 – TESTES DE ANSIEDADE ANIMAL

O conhecimento atual das estruturas envolvidas na regulação da ansiedade baseia-se tanto em evidências clínicas como experimentais, obtidas em seres humanos e em animais de laboratório (Graeff et al.[18] 1997). Muitos modelos animais foram desenvolvidos e padronizados ao longo dos anos para o estudo experimental da ansiedade em humanos. Não se pode afirmar ainda que animais não humanos possuam as mesmas sensações subjetivas de ansiedade que os seres humanos, mas parece haver uma correspondência significativa entre as espécies em relação aos mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a essa emoção, desde a percepção de situações potencialmente perigosas até a organização das reações de defesa. Essa correspondência é ainda maior entre os mamíferos (Cruz e Fernandez[3] 2012).

Os testes de ansiedade animal são muito utilizados na investigação pré-clínica de novas drogas ansiolíticas, na avaliação fisiológica do mecanismo de ação dessas drogas, no teste empírico de hipóteses comportamentais e fisiopatológicas relacionadas aos transtornos de ansiedade em humanos, bem como no mapeamento da circuitaria neural que regula as reações de defesa frente a situações de perigo em potencial (Cruz et al.[23] 1997). A antecipação de uma situação de perigo no ambiente se inicia com processos mediados por duas classes de estímulos. A primeira sinaliza perigo em potencial de maneira inata, independente de aprendizagem, e a segunda o faz por meio de processos de aprendizagem, mediada pelo condicionamento clássico. Essas duas classes de estímulos possuem os mesmos objetivos: sinalizar e antecipar para o organismo alguma situação de perigo potencial no ambiente e deflagrar reações de defesa compatíveis. É justamente na manipulação experimental desses estímulos e na observação consecutiva das reações comportamentais e fisiológicas decorrentes que os teste de ansiedade em animais se fundamentam (Cruz e Fernandez[3] 2012).

Esses testes buscam a reprodução de uma situação ambiental que gere aversão ou desconforto. Isso é feito expondo os animais a: ambientes potencialmente perigosos ou novos; estímulos ou contextos associados a estímulos nociceptivos moderados; situações sinalizando a presença de um predador natural; e confrontos com animais da mesma espécie. Em decorrência desses estímulos há

reações fisiológicas e padrões comportamentais que são utilizados como medidas de ansiedade, os quais possuem grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos (Treit[24] 1985).

Em um ponto de vista experimental, a variável independente é a situação ambiental aversiva, visto que essas situações são manipuladas pelo experimentador. A variável dependente são as reações comportamentais e fisiológicas, pois são analisadas e registradas de forma adequada com objetivo de investigar a existência ou não de uma relação de causa e efeito entre as duas variáveis (Cruz et al.[23] 1997). Dentre os diversos testes de ansiedade animal, foram selecionados dois tipos para este trabalho: o teste campo aberto e o labirinto em cruz elevado.

2.2.1- CAMPO ABERTO (CA)

Foi desenvolvido por Hall (Hall[25] 1934) e sugere que a atividade motora do animal no campo aberto é indicador de seu estado emocional. É um teste realizado em uma arena quadrada ou circular cercada por paredes que impedem a fuga do animal. O assoalho é marcado com pequenos quadrados, o que permite a quantificação da atividade locomotora do animal. A ansiedade é indicada pela baixa atividade locomotora do animal. Pode-se também utilizar a atividade locomotora do animal no centro do campo aberto como medida de ansiedade, enquanto a atividade locomotora na periferia do aparato como um indicador da atividade locomotora do animal. O efeito de drogas ansiolíticas tem sido amplamente demonstrado nesse modelo (Cruz e Fernandez[3] 2012).

O teste consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar seus comportamentos como: latência para o primeiro cruzamento (vezes que o animal entra com as quatro patas em outro quadrado), tempo despendido na periferia e no centro do dispositivo, número de cruzamentos, número de levantamentos, número de autolimpeza, e número de bolos fecais (Walsh e Cummins[26] 1976, Capaz et al.[27] 1981).

2.2.2- LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Desenvolvido por (Handley e Mithani[28] 1984) e posteriormente validado por (Pellow et al.[29] 1985), o teste explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão, o medo natural que ratos apresentam a altura e espaços abertos. Tem sido um dos testes de ansiedade animal mais utilizados para o estudo experimental de drogas ansiolíticas. O instrumento composto por quatro braços, dois abertos e dois fechados, dispostos em formato de cruz, perpendicularmente uns aos outros e elevados 50 cm do solo. Com este arranjo dos braços, os animais podem perceber simultaneamente o precipício e o espaço aberto. Os animais costumam explorar mais os braços fechados que os abertos. A tendência de evitar os braços abertos se deve mais ao espaço aberto do que à altura. O procedimento-padrão consiste em expor livremente os animais por 5 minutos ao labirinto onde avalia-se o número de entradas nos braços abertos e fechados e a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos, nos fechados e na interseção deles. Ansiolíticos benzodiazepínicos aumentam as porcentagens de entrada e tempo gasto nos braços abertos, enquanto drogas ansiogênicas promovem efeito oposto. (Cruz e Fernandez[3] 2012).

2.3 INFLUÊNCIA DO SISTEMA IMUNE SOBRE O CÉREBRO E O COMPORTAMENTO

A literatura relata que as alterações comportamentais como depressão, ansiedade, fadiga, retardamento psicomotor, anorexia, disfunção cognitiva e comprometimento do sono podem ser consequências de efeitos do sistema imune sobre o cérebro. Atualmente há uma grande busca pelo conhecimento das vias e dos mecanismos pelos quais o sistema imune pode influenciar o cérebro e o comportamento (Capuron e Miller[30] 2011).

Em relação a inflamação, citocinas pró-inflamatórias podem ascender ao sistema nervoso central, e interagir com uma rede de citocinas no cérebro para influenciar praticamente todos os aspectos da função do cérebro relevantes para o

comportamento, incluindo o metabolismo de neurotransmissores, a função neuroendócrina, plasticidade sináptica, e neurocircuitos que regulam humor, atividade motora, motivação, ansiedade e alerta. Uma série de fatores de vulnerabilidade, incluindo envelhecimento e obesidade, bem como o estresse crônico também aparecem para interagir com o sistema imune sinalizando ao cérebro para exacerbar contribuições imunológicas à doença neuropsiquiátrica (Capuron e Miller[30] 2011).

Portanto, interações recíprocas entre o sistema imunológico e o cérebro têm sido objeto de atenção sobre o papel do sistema imune em doenças neuropsiquiátricas. A pesquisa no campo conhecido como "Psiconeuroimunologia" tem demonstrado uma rede de relações bidirecionais entre o sistema imunológico e o cérebro. Alterações na função imunológica têm sido encontradas em pacientes deprimidos com depressão maior e incluem relatórios iniciais de imunossupressão (por exemplo, redução da atividade das células natural killer e da proliferação de linfócitos), seguido por evidência de aumento da atividade inflamatória (Kronfol et al.[31] 1983, Irwin e Gillin[32] 1987, Maes et al.[33] 1993, Anisman e Merali[34] 1999).

Muito do recente interesse no papel do sistema imunológico na depressão, por exemplo, tem-se centrado no aumento da inflamação associada com a mesma. As citocinas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina (IL) -1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), são liberadas pelas células imunes, ativadas durante a resposta do hospedeiro ao patógeno na invasão, bem como no âmbito da lesão tecidual e estresse psicossocial. Esses fatores solúveis parecem representar mediadores primários da comunicação entre o sistema imunológico e o cérebro, e não apenas ajudar a orquestrar a resposta celular a uma lesão, mas também coordenar as mudanças comportamentais que são necessárias para a recuperação (Capuron e Miller[30] 2011).

Durante o curso de uma lesão, a liberação de citocinas pró-inflamatórias é geralmente transitória e regulada por mecanismos anti-inflamatórios. Consequentemente, os efeitos comportamentais desencadeados pela ativação da resposta inflamatória desenvolvem-se como uma reação adaptativa, temporária e controlada do sistema nervoso central (SNC) aos sinais imunes. No entanto, quando a lesão torna-se crônica e / ou desregulada, os efeitos comportamentais de citocinas e a resposta inflamatória resultante podem contribuir para o desenvolvimento de

relevantes sintomas clínicos de comportamento e doenças neuropsiquiátricas, incluindo depressão maior (Capuron e Miller[30] 2011).

Portanto, existe uma relação de alterações do sistema imune, interagindo com o SNC e alterando o comportamento. Na odontologia, existem várias situações nas quais há o envolvimento da resposta do sistema imune, podendo-se citar a doença periodontal, extração de algum elemento dentário e a lesão periapical.

2.4 LESÃO PERIAPICAL

2.4.1- FISIOPATOLOGIA DA LESÃO PERIAPICAL

Como consequência da não remoção da cárie dentária ou de outros agentes químicos, biológicos ou físicos, ocorrerá a necrose e, então, a infecção pulpar. Quando ocorre a necrose da polpa, os processos metabólicos param, o que leva a perda estrutural do tecido e à invasão bacteriana no canal radicular, gerando uma resposta imune nos tecidos periapicais, os quais estão em íntimo contato com o canal radicular pelo forame apical (Leonardi[35] 2011). No início da necrose pulpar, a grande maioria dos microorganismos são aeróbios, os quais tem sua multiplicação muito rápida e desenvolvem uma intensa reação química na polpa liberando várias enzimas como a colagenase, que é importante pois é responsável pela destruição fibrilar (Krepel et al.[36] 1991). Libera também a hialurodinase, hemolisina, condroitinase, fosfatase ácida e nucleasse, que impedem as trocas metabólicas pela desorganização da substância fundamental dos tecidos. Além da microbiota aeróbia em processos iniciais, nos processos mais avançados é composta por anaeróbios, predominando os microrganismos gram-negativos (Leonardi[35] 2011).

O resultado final dessa agressão microbiana é a necrose pulpar, na qual, primeiramente os produtos necróticos ficam no canal radicular, o que não aparece radiograficamente. Os produtos vindos da desintegração da polpa, assim como as bactérias e suas toxinas, são a causa mais comum das reações periapicais, cerca de 15 a 30 espécies bacterianas estão envolvidas (Siqueira[37] 2002). Essas

alterações se mostram radiograficamente desde um espessamento do periodonto apical até grandes lesões com diâmetros de 5 ou mais de 10 milímetros. Na microscopia, se observa inflamação e reabsorção óssea atingindo a cortical, além de erosão do cemento apical (Leonardo[38] 2005). Com o desenvolvimento da lesão periapical, ocorre inflamação e a proliferação de osteoclastos, que reabsorvem o osso através da secreção de ácidos e enzimas (Hata[39] 1994, Delaisse et al.[40] 1993).

A reabsorção óssea está ligada com a infiltração nos tecidos periapicais de células inflamatórias como macrófagos, plasmócitos, leucócitos polimorfonucleares-PMNs e linfócitos T e B, os quais produzem citocinas como a interleucina 1 beta (IL-1beta), a 1 alfa (IL-1 α) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α) que induzem a destruição óssea pelos osteoclastos (Hamachi et al.[41] 1995). Os PMNs são os primeiros a chegar no local da invasão bacteriana (Yoshimura et al.[42] 1997). A reabsorção óssea sempre está presente na doença inflamatória e a produção de IL-1 pelas células inflamatórias pode ser o que induz a osteólise (Barkhordar et al.[43] 1992). Essa reabsorção óssea permite um acúmulo de células imunológicas que ajudam a localizar bactérias dentro do canal, por isso, se constitui em um mecanismo protetor do organismo. As citocinas, além de estimularem a reabsorção óssea, também inibem a formação óssea pelos osteoblastos. Apenas depois do tratamento endodôntico, com a remoção do estímulo bacteriano à produção de citocinas, é que a lesão pode se reparar pela nova formação óssea (Teixeira[44] 2007).

Essas alterações periapicais podem ser classificadas em agudas e crônicas. Agudas: Pericementite apical aguda; Abscesso dentoalveolar agudo; Abscesso dentoalveolar crônico reagudizado (abscesso fênix). Quanto às crônicas: Abscesso dentoalveolar crônico; Granuloma periapical; Cisto periapical (Leonardi[35] 2011). A pericementite apical aguda pode ser caracterizada por dor violenta, provocada, sensação de dente extruído, sensibilidade principalmente à percussão vertical, sem edema e radiograficamente pelo aumento do espaço perirradicular e rompimento da lâmina dura para dentes desvitalizados (Paiva[45] 1991, Siqueira Jr.[46] 1997). A pericementite apical pode dar origem a fenômenos agudos ou crônicos. Inicialmente aguda, pode se tornar crônica, sem sintomas dolorosos e radiograficamente com um aumento do espaço periapical. Fatores locais como a virulência das bactérias e diâmetro do forame apical, e fatores sistêmicos como a resistência orgânica podem definir se a evolução da pericementite será para um processo inflamatório de caráter

exsudativo (abscesso dentoalveolar agudo) ou proliferativo (granulomas e cistos). O processo inflamatório exsudativo acontecerá quando for maior o número e a virulência das bactérias e quanto mais baixa estiver a resistência orgânica ou a resposta imune do paciente, sendo o contrário verdadeiro para o processo proliferativo. No caso de as células de defesa não serem capazes de combater a contaminação bacteriana do canal radicular, ocorre uma exacerbação do quadro e o processo inflamatório torna-se agudo exudativo ou purulento, que é o abscesso dentoalveolar agudo (ADAA), o qual precisa de tratamento de urgência devido a dor intensa. O ADAA pode ser definido por uma dor violenta, espontânea, pulsátil, difusa, com edema, sensibilidade principalmente à percussão horizontal e aparece na radiografia como um aumento do espaço perirradicular e rompimento da lâmina dura (Paiva[45] 1991, Siqueira Jr.[46] 1997).

Quando o tratamento não é feito, pode ocorrer uma cronificação de um processo agudo, onde o pus procura uma saída (drenagem), a fístula se instala ao encontrar essa saída, por meio da qual o remanescente purulento é drenado espontaneamente. Por isso, há muitos casos de abscesso dentoalveolar crônico (ADAC) nos quais há a presença da fístula, intra ou extraoral. O ADAC também é assintomático e na radiografia nota-se uma rarefação óssea periapical difusa ou circunscrita, associada ao ápice de um dente (Paiva[45] 1991, Siqueira Jr.[46] 1997).

Devido a presença de coleção purulenta localizada é que tem-se o termo abscesso e as palavras agudo e crônico, quando colocadas juntamente ao termo abscesso, referem-se às características e à evolução clínica dessa patologia periapical, agudo rápida evolução, crônico lenta, não indicando o tipo de inflamação, pois no abscesso há um predomínio de polimorfonucleares, típico de inflamação aguda. (Leonardi[35] 2011). Quando a patologia periapical crônica, como o cisto e o granuloma, se instala após a pericementite apical, a resposta imunológica diante da presença de um agente agressor acarreta no desenvolvimento de uma lesão periapical. Nesta região acontece uma resposta de proteção ou imunológica contra os microrganismos presentes na polpa necrosada e em todo o sistema de canais radiculares, consequentemente ocorre a reabsorção óssea do osso esponjoso periapical. Um exame radiográfico logo no ínicio da lesão não a mostrará, porém quando a lesão está presente há meses, um processo de longa duração, pode-se notar radiograficamente (Leonardi[35] 2011).

O cisto é assintomático e clinicamente apresenta abaulamento da cortical óssea. Radiograficamente, apresenta rarefação óssea periapical circunscrita com aproximadamente 10mm, associada ao ápice de um dente e deslocamento dos dentes vizinhos. O granuloma, também assintomático, apresenta na radiografia uma rarefação óssea periapical circunscrita com aproximadamente 5mm, associada ao ápice de um dente (Paiva[45] 1991, Siqueira Jr.[46] 1997). Em casos de mudança na microbiota local ou uma queda de resistência orgânica o quadro crônico pode se transformar em agudo, ou seja, ocorre a reagudização de um processo crônico, o que também pode ocorrer com o ADAC, sendo denominado de abscesso dentoalveolar crônico reagudizado (abscesso fênix). O diagnóstico diferencial entre o ADAC e o ADAA é obtido pela presença de lesão periapical no ADAC. Portanto, a lesão periapical visível na radiografia consiste na resposta imune periapical que é a defesa orgânica do paciente atuando com o intuito de isolar a infecção endodôntica, confinando-a ao sistema de canais radiculares e prevenindo a sua disseminação sistêmica (Leonardi[35] 2011).

O infiltrado inflamatório presente nas lesões periapicais crônicas é um misto de linfócitos T e B, PMNs, macrófagos, plasmócitos, eosinófilos e mastócitos. A literatura apresenta vários estudos sobre estas lesões a partir de dentes extraídos e material de biópsia de cirurgias parendodônticas, as quais permitem um estudo microscópio e radiográfico da lesão, porém de maneira estática, não mostrando a evolução desta lesão (Bohne[47] 1990, Ferlini Filho[48] 1999, Ramachandran Nair et al.[49] 1996, Pereira[50] 1983). Por isso, a importância do estudo destas lesões induzidas experimentalmente em animais, nas quais pode-se acompanhar sua progressão, caracterização e a compreensão da sua patogênese e dos fatores envolvidos na ativação das células inflamatórias, considerando-se os diferentes tempos de evolução.

2.4.2 - ESTUDO DA LESÃO PERIAPICAL INFLAMATÓRIA EM MODELOS EXPERIMENTAIS

O modelo experimental de desenvolvimento da lesão periapical em ratos foi inicialmente descrito por por Kakehashi, Yu e Stashenko e Wang e Stashenko (Kakehashi et al.[51] 1965, Yu e Stashenko[52] 1987, Wang e Stashenko[53] 1991). Neste modelo, a exposição cirúrgica de molares ao ambiente bucal e a consequente infecção da polpa dentária mostra como resultados o desenvolvimento de lesões periapicais e a destruição do osso (Stashenko et al.[15] 1994). Estudos mostram que seis horas após a exposição da polpa ocorre um aumento no número de células e na vascularização apical, e necrose entre o oitavo e nono dia. Após duas semanas, encontra-se tecido de granulação apical maduro com sua gradual substituição por fibras colágenas, ocorrendo em alguns casos, presença de granuloma recoberto por epitélio (Stahl[54] 1960).

Entre os animais utilizados no estudo da lesão periapical, estão macacos e cães, porém com limitações quanto à manutenção, obtenção e alto custo. Para encontrar uma alternativa mais viável, desenvolveu-se um protocolo de estudo na área de endodontia em canais de ratos (Erausquin e Muruzabal[55] 1967). Em um estudo de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald, em 1965, foi demonstrada a etiologia microbiana das doenças periapicais. Foram feitas exposições pulpares dos primeiros molares de ratos a ambientes convencional e *germ-free*. As polpas não infectadas sobreviveram à injúria e ainda foi observada uma ponte de dentina em três a quarto semanas depois da exposição. Já o grupo com microbiota oral normal todos mostraram necrose da polpa (Kakehashi et al.[51] 1965).

A etiopatogenia das lesões periapicais consiste na participação do sistema imunológico (Torabinejad e Bakland[56] 1978), respondendo aos antígenos que entram nos tecidos periapicais por meio do sistema de canais radiculares. Logo, as lesões periapicais são uma resposta imunológica local provocada por uma infecção bacteriana na polpa dentária. Nos estudos de Stashenko e Tani-Ishii mostrou-se que as lesões periapicais expandem-se rapidamente entre o dia 7 e o dia 15 a 20 (fase ativa), com uma desaceleração da expansão depois (fase crônica). A destruição

periapical pode ser estimada por radiografia de alta-resolução e análise de imagem, ou pode ser quantificada com precisão por meio de corte e histomorfometria (Stashenko et al.[15] 1994, Tani-Ishii et al.[57] 1995).

Eurasquin e Muruzabal, em 1967, avaliaram a reação periapical referente à exposição pulpar em 40 ratos, com idade de 30 a 180 dias, sendo que estes animais foram sacrificados 24 horas e 60 dias após a exposição pulpar. Concluíram que a exposição pulpar provoca uma reação periapical no rato com a mesma evolução que no homem, cão e hamster, resultando na formação de granuloma periapical (Erausquin e Muruzabal[55] 1967). Dietz, em 1952, relacionou a imunologia com a endodontia através da injeção subcutânea de infiltrados provenientes do conteúdo de canais radiculares, causando uma reação imunológica, o que indiretamente evidenciou que, nas lesões periapicais, podem ocorrer reações de hipersensibilidade (Dietz[58] 1952). Quando não há nenhum tratamento para uma lesão experimentalmente induzida em rato, e a causa não é removida, esta persiste e aumenta (Daniel[59] 2001).

Na fase aguda, predominam os linfócitos T auxiliares ou T helper, já na fase crônica os linfócitos T supressores, o que sugere que atividade mediada por essas células poderia estar envolvida na destruição do osso em lesões periapicais induzidas em ratos (Stashenko e Yu[60] 1989). As lesões periapicais induzidas experimentalmente em ratos têm um desenvolvimento rápido entre os dias 0 e 15 (fase ativa) e mais lento na fase crônica, quando a microbiota é gram-negativa e anaeróbia semelhante à dos humanos. O infiltrado inflamatório presente nessas lesões é misto contendo linfócitos T e B, macrófagos, neutrófilos e plasmócitos. Em extratos das lesões periapicais ocorre reabsorção do osso, principalmente quando a lesão está expandindo (Stashenko et al.[15] 1994). No estudo de Tang et al, por meio de medições em três e em duas dimensões, o volume e a área de lesões periapicais aumentaram a partir do dia 7 ao dia 21 e, em seguida, expandiu-se lentamente entre os dias 21 e 35 (Tang et al.[61] 2014). De acordo com Liu et al, as lesões periapicais expandem do dia 0 a 28 e depois estabilizam e a partir do dia 7 ao dia 14, o número de osteoclastos aumenta, do dia 21 ao dia 35, menos osteoclastos podem ser observados (Liu et al.[62] 2014).

Outros estudos demonstram a presença de macrófagos em todos os períodos

experimentais e que, antes mesmo do começo da fase aguda da lesão, já ocorreu um aumento de linfócitos (Kawashima et al.[63] 1996). Recentemente, foi demonstrado que citocinas relacionadas com Th17 podem ser os principais contribuintes para o início de destruição óssea periapical, e que a expansão da lesão pode ser regulada por mediadores anti-inflamatórios (Wei et al.[64] 2013). Na radiografia, áreas radiolúcidas correspondem à lesões periapicais induzidas em ratos após 10 a 15 dias após a exposição pulpar, e se estabilizam entre 15 e 30 dias, aumentando após este período e estabilizando-se após 90 dias (Stashenko et al.[65] 1992). A fase aguda da lesão se caracteriza até os 15 dias, na qual há uma progressão rápida e alto índice de perda óssea. Após este período, considera-se a fase crônica, pois ocorre uma regressão e estabilização (Yu e Stashenko[52] 1987). Para alguns autores, após o 5° dia de exposição pulpar já observam-se áreas radiolúcidas e há um aumento significativo até o 20° dia (Lin et al.[66] 2000).

3. PROPOSIÇÃO

3.1- OBJETIVO GERAL

Investigar se as lesões periapicais induzidas em molares de ratos podem levar à alterações comportamentais de ansiedade nesses animais.

3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Induzir experimentalmente a lesão periapical em molares inferiores de ratos;
- Analisar a evolução da lesão periapical em seus aspetos radiográficos e histológicos;
- Avaliar as possíveis alterações comportamentais relacionadas a ansiedade dos ratos nos diferentes tempos de evolução da lesão periapical.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 81 ratos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre 150 e 200g (aproximadamente 45 dias de idade). Os animais foram divididos em 3 grupos e em 3 períodos (7,15 e 30 dias), portanto 9 animais por grupo: Controle negativo com 27 animais sem tratamento (Controle) por 7, 15 e 30 dias; Canal contaminado mantido aberto (CCA) com 27 animais que tiveram o primeiro molar inferior esquerdo com a câmara pulpar exposta e removida, sendo mantido aberto por 7, 15 e 30 dias; Canal contaminado mantido fechado (CCF) com 27 animais que tiveram o primeiro molar inferior esquerdo com a câmara pulpar exposta e removida, sendo mantido aberto por 7, 15 e 30 dias e então fechado com resina composta por mais 7 dias (Tabela 1). Os ratos foram mantidos em condições ambientais no Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) e alimentados com ração e água *ad libitum*. A pesquisa foi aprovada pelo comitê local de ética no uso de animais (Parecer CEUA: 0162014, Anexo A).

4.1 – DETERMINAÇÃO DO TAMANHO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado com base nos dados de análise de comportamento por meio do labirinto em cruz elevado em ratos com hipersensibilidade dentinária induzida (Bergamini et al.[67] 2014). Foi adotado um nível de significância de p=0,05, para três grupos experimentais (Controle, CCA, CCF) para os três períodos de análise (7,15 e 30 dias). Os cálculos foram realizados com base na média e desvio padrão, estabelecendo um poder do teste em 80%. Assim, o tamanho amostral foi estabelecido com base nas variáveis obtidas com o teste do labirinto em cruz elevado: tempo de permanência nos braços abertos; tempo nos braços fechados; auto limpeza e porcentagem de entradas nos braços abertos, no período de 45 dias de indução da hipersensibilidade dentinária em ratos (Bergamini et al.[67] 2014). Assim, foram obtidos para as variáveis: tempo de permanência nos braços abertos com n=9/grupo (tamanho do efeito de 1,49) o poder do teste foi 84%; tempo nos braços fechados (tamanho do efeito de 5,02) e auto limpeza (tamanho do

efeito de 5,15) com n=3/grupo o poder do teste foi de 99% e para porcentagem de entradas nos braços abertos (tamanho do efeito de 1,70) com n=7/grupo e o poder foi 83%. Desta forma, optamos por um tamanho amostral de 9 animais por grupo em cada tempo. Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa GPower 3.1 (Faul et al.[68] 2007).

Tabela 1 - Divisão dos grupos experimentais

Grupos	Períodos Experimentais			Total
	7 dias	15 dias	30 dias	
Controle	9	9	9	27
CCA	9	9	9	27
CCF	9	9	9	27
Total	27	27	27	81

CCA: Contaminação canal radicular aberto
CCF: Contaminação canal radicular fechado

4.2 - INDUÇÃO EXPERIMENTAL DA LESÃO PERIAPICAL INFLAMATÓRIA

Os animais, no tempo zero (45 dias de idade), foram anestesiados utilizando a aplicação intraperitoneal de hidrato de cloral (400mg/Kg) em temperatura ambiente, pH 7,0 – 7,8. Considerando uma solução a 4% (40mg/mL), aplicou-se 1mL a cada 100g de peso (Vachon et al.[69] 2000). Após a perda de reflexos foi realizada anestesia infiltrativa no local do procedimento cirúrgico com articaína 4% associada à epinefrina 1:100.000. A partir da instalação da sedação, os animais foram acomodados em uma mesa operatória especial que possibilita a contenção do animal, mantendo a abertura bucal. Em seguida, os animais foram submetidos à exposição pulpar do primeiro molar inferior do lado esquerdo (Kakehashi et al.[51] 1965), com broca de aço carbide multilaminada # 1⁄2 (Jota Switzerland) montada em micromotor (Kavo L-Motor 181DB intramatic e contra-ângulo Kavo 20 – Western German) em baixa rotação. A broca foi introduzida na fossa distal, situada mesialmente à cúspide distal na face oclusal do dente, na profundidade de cerca de 1mm, tendo-se o cuidado de não perfurar a furca. Depois, esta foi estendida para a

fossa mesial com o intuito de fazer a abertura para encontrar o canal mesial também. Com lima K #08 (Maillefer – Dentisply), delimitada com cursor de borracha a 3,5mm de extensão, a polpa foi extirpada, a fim de minimizar a sintomatologia dolorosa no período pós-operatório. Neste procedimento, somente as raízes distal e mesial foram instrumentadas (Dammaschke[12] 2010, Tobias Duarte et al.[14] 2014).

Para a indução da contaminação do bacteriana no canal radicular (CCA) os dentes foram deixados abertos na cavidade bucal durante os períodos de 7,15 e 30 dias. Para indução da contaminação bacteriana e indução de uma agudização da lesão periapical (CCF) os dentes foram fechados com resina composta após os períodos experimentais (Figura 1) e mantidos por 7 dias. O primeiro molar inferior do lado direito não recebeu nenhum tratamento (controle contra-lateral).



Figura 1. Primeiro molar inferior esquerdo fechado com resina composta.

4.3- TESTES COMPORTAMENTAIS:

Os testes foram realizados no período da manhã em uma sala com iluminação natural devido a presença de janelas do tipo basculante na parte superior da parede. Primeiramente o animal foi submetido ao teste do campo aberto (CA) e em seguida ao teste labirinto em cruz elevado (LCE). Os aparatos utilizados nos teste foram limpos com uma solução etanólica 5% entre cada animal testado. Para os grupos Controle e CCA, os dois testes comportamentais (CA e LCE) foram realizados em dois momentos, no tempo 0 e antes dos sacrifício dos animais nos diferentes tempos experimentais, para o grupo CCF, os dois testes comportamentais

(CA e LCE) foram realizados em três momentos, no tempo 0, antes de fechar o dente com resina composta, e 7 dias após o fechamento (no dia do sacrifício).

4.3.1 -TESTE DO CAMPO ABERTO (CA)

O teste consiste em um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para mensuração de emocionalidade, atividade exploratória, atividade geral ou locomotora, medo, ansiedade e estresse (Courvoisier[6] 1996, Matto e Allikmets[8] 1999). O aparato utilizado consiste em uma arena quadrada, feita de madeira, cercada por paredes que impedem a fuga do animal, o assoalho é marcado com 25 quadrados, o que permite a quantificação da atividade motora (Cruz e Fernandez[3] 2012) (Figura 2). Neste experimento os animais foram submetidos individualmente à análise de sua capacidade locomotora/exploratória e avaliados através de diferentes parâmetros. Cada animal foi colocado no centro do arranjo experimental imediatamente antes do teste e autorizado a explorá-lo por 5 minutos. Durante este tempo, a atividade locomotora foi gravada e elementos da atividade exploratória pontuados pela observação e contados *off-line*. Durante 5 minutos os animais exploraram livremente os quadrados, onde foram avaliados os seguintes parâmetros comportamentais:

a) Número total de quadrados percorridos ou atravessados (número de vezes em que o animal invade com as quatro patas um dos campos da arena);
b) Número de lavantamentos (animal apoiado nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao piso, tendo a cabeça dirigida para cima e tocando ou não, com as patas anteriores, as paredes do campo aberto);
c) Tempo de imobilidade (o tempo gasto imóvel);
d) Tempo de auto limpeza (tempo utilizado para a realização de movimentos com as patas anteriores e posteriores em direção à boca ou à cabeça, podendo haver continuidade destes em direção aos pavilhões auriculares e/ou movimento de lamber dirigidos principalmente às porções laterais do corpo e à região genital).

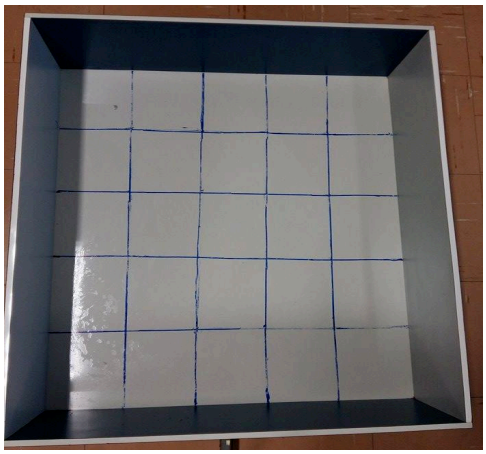


Figura 2 – Aparato usado para o teste de Campo Aberto.

4.3.2 – TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

O teste LCE, baseado no modelo proposto em ratos por Pellow et al 1985, tem sido amplamente utilizado em roedores como um protocolo de avaliação do medo e ansiedade (Choi et al.[7] 2013, Pellow et al.[29] 1985). O LCE feito de madeira, foi construído composto por dois braços abertos e opostos (50 x 10 cm cada um), e outros dois braços opostos do mesmo tamanho fechados com paredes laterais de 50 cm de altura. O aparato é elevado 50 cm do chão e formam uma cruz, com uma área central de 10 x 10 cm (Figura 3). O LCE predispõe os animais a um estado de alerta e por este motivo é usado como parte da avaliação comportamental dos mesmos, uma vez que, os ratos tendem a ter medo de altura e dos braços abertos. Os animais foram colocados no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento filmado por 5 minutos para posterior análise dos seguintes parâmetros: tempo de permanência em braço aberto e em braço fechado e frequência de entrada em braço aberto e em braço fechado. Uma alteração nos parâmetros relativos aos braços (frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço) é indicativa de parâmetros relacionados à ansiedade (Cruz e Fernandez[3] 2012).

A porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade, quanto maior, menor a ansiedade e vice-versa, já a porcentagem de tempo de exploração dos braços fechados quanto maior, maior a

ansiedade. A porcentagem de entradas nos braços abertos está relacionada tanto a atividade locomotora quanto a ansiedade. Por outro lado, o número de entradas nos braços fechados corresponde a um índice de atividade locomotora (Pellow et al.[29] 1985). Este teste é considerado excelente para avaliação da condição de ansiedade e estresse. Além disso, durante este teste é possível avaliar aspectos que envolvem emocionalidade e a tomada de decisão dos animais, que está diretamente relacionado com o status de ansiedade (Cruz e Fernandez[3] 2012).

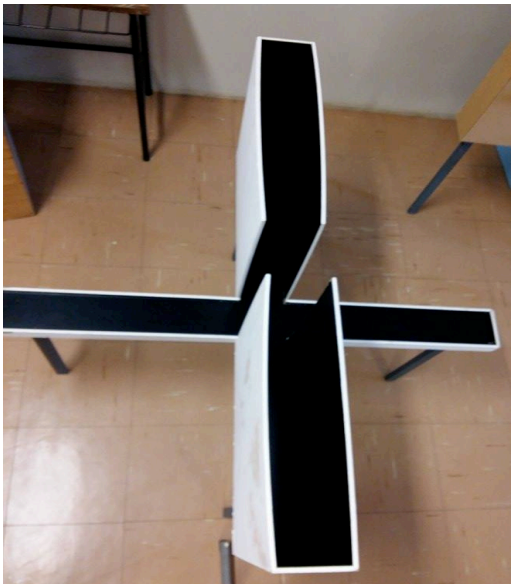


Figura 3 – Aparato usado para teste de Labirinto em Cruz Elevado.

4.4 – SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS E MANIPULAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após cada período experimental, os animais foram sacrificados com dose excessiva de solução de hidrato de cloral a 20%. Para posterior análise, as mandíbulas foram removidas e separadas em duas hemimandíbulas utilizando-se bisturi com lâmina no 15 Bard-Parker, a porção coronária do dente incisivo foi seccionada na hemimandíbula do lado direito, para facilitar a identificação e as glândulas adrenais foram removidas para pesagem (Bergamini et al.[67] 2014).

A hemimandíbulas foram colocadas em recipientes devidamente identificados e fixadas em solução de Formol a 10% tamponado com fosfato, por 48 horas. Depois de realizadas as radiografias periapicais digitais, estas foram desmineralizadas em solução de EDTA 10% por 40 dias, com trocas da solução em dias alternados. Após a desmineralização, as amostras selecionadas para análise histológica descritiva foram cortadas em blocos de aproximadamente 8x10x6mm (contendo o primeiro molar inferior) e seccionadas no sentido mesio-distal. Em seguida, de acordo com o protocolo utilizado pelo Laboratório de Histopatologia e Cultura Celular/ UEPG, as amostras foram processadas no aparelho histotécnico Leica TP 1020, incluídos em parafina (Leica EG1120), e cortadas em micrótomo (Leica RM2125RT) a 6µm de espessura. Após os cortes aderirem em lâminas de vidro comuns para microscopia foram corados com Hematoxilina-eosina (HE) e protegidos com lamínulas de vidro.

4.5 - OBTENÇÃO E ANÁLISE DAS IMAGENS RADIOGRÁFICAS DIGITAIS

Após a retirada das hemimandíbulas, conforme descrito anteriormente, as mesmas foram colocadas em recipientes com identificações para posterior realização das radiografias (Teixeira[44] 2007). Estas foram feitas utilizando-se um aparelho de raio X modelo SPECTRO 70X e programa KODAK *Dental Image Software*. Para padronização, foi colocada sobre a cadeira uma caixa preta (do

próprio sensor) e exatamente em seu centro foi colocado o sensor digital (que representa o filme radiográfico periapical) a 6 cm do tubo de raios x no cabeçote do aparelho (Figura 4). O tempo de exposição utilizado foi de 0,2 segundos. As imagens obtidas foram organizadas separadamente em arquivos relativos a cada tempo experimental para facilitar o acesso dos pesquisadores e posterior análise. Finalizada esta etapa, o programa *Image J* foi utilizado para a medição do perímetro e área da imagem radiolúcida dos três grupos (Controle, CCA e CCF), tanto da hemimandíbula esquerda (teste) quanto da direita (controle contra-lateral).

Através da ferramenta *freehand selection tool* do *Image J,* calcularam-se os parâmetros: perímetro e área da imagem radiolúcida no ápice da raiz distal do primeiro molar inferior dos lados esquerdo (experimental) e direito (controle contra-lateral). Para tanto, em cada imagem foram utilizadas primeiramente as ferramentas de calibração da imagem (*set scale)* e adequação do brilho e contraste *(brightness/contrast).* A calibração foi feita com um pedaço de 2 cm de chumbo (de filme radiográfico periapical) através de uma imagem deste obtida pelo mesmo aparelho. O Brilho e o contraste foram adequados para evidenciar a área radiolúcida.

Então, procedeu-se a medição da imagem radiolúcida apenas na parte apical da raiz distal, feita manualmente com o *mouse,* obtendo os valores de área e perímetro calculados automaticamente pelo programa. A presente análise possibilitou diferentes parâmetros de medição da imagem radiolúcida visível, nos vários períodos de indução experimental. A medição de cada parâmetro foi realizada, sempre pelo mesmo operador, por três vezes, tanto do lado direito quanto do lado esquerdo, sendo a ordem das amostras randomizada, aleatória e codificada. Após a obtenção destas medidas em centímetros, foi calculada a média de cada parâmetro para cada animal e cada grupo e o valor final transformado em milímetro.

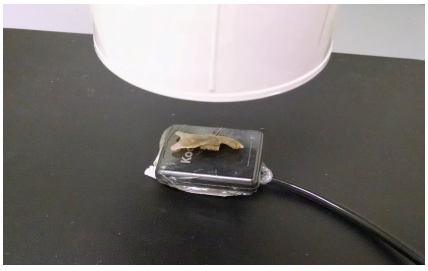


Figura 4- Obtenção da imagem radiográfica digital.

4.6 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

As lâminas de vidro contendo as diferentes amostras foram analisadas utilizando-se um microscópio óptico binocular (Olympus BX41), com relação:

- ao osso alveolar: presença/ausência de reabsorção;
- ao infiltrado inflamatório: presença/ausência de infiltrado inflamatório; tipo celular predominante: mononucleares (MN) ou polimorfonucleares (PMN);
- aos microabscessos: presença/ausência de microabscessos; bem definidos ou não.

A análise foi realizada pelo mesmo examinador calibrado e capacitado.

4.7 – OBTENÇÃO DO VALOR DO PESO DA GLÂNDULA ADRENAL

Para a sua remoção, foi utilizado um bisturi com lâmina número 15 Bard-Parker e a seguir as glândulas foram pesadas, utilizando uma balança analítica de precisão (Bergamini et al.[67] 2014). Após a obtenção destas medidas em miligramas, foi calculada a média entre o peso da glândula esquerda e direita e atribuído um único valor por animal para posterior análise estatística.

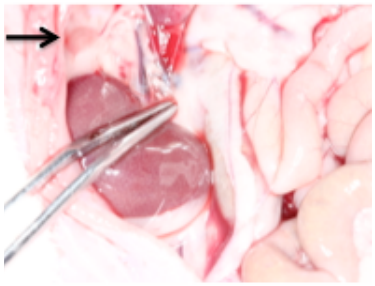


Figura 5. Localização de glândula adrenal.

4.8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados referentes ao comportamento animal e parâmetros radiográficos (variáveis quantitativas) foram realizadas com a análise de variância (ANOVA) de dois critérios, considerando os fatores grupo experimental e período de avaliação. Para o grupo CCF foi utilizado o teste t *student* pareado para as comparações antes e depois do dente fechado com resina composta. Para a análise dos resultados entre os grupos do estudo, primeiramente foi testado a normalidade dos dados obtidos através do teste de Shapiro-Wilks (amostra pequena n=9 por grupo/período) e pelos coeficientes de assimetria e curtose. Após a realização da ANOVA dois critérios, quando obtidas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram realizadas com o pós-teste de Tukey. Foi adotado um nível de significância de 0,05 ($p<0,05$) para que as diferenças fossem consideradas significativas.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO

5.1.1- TESTE CAMPO ABERTO (CA)

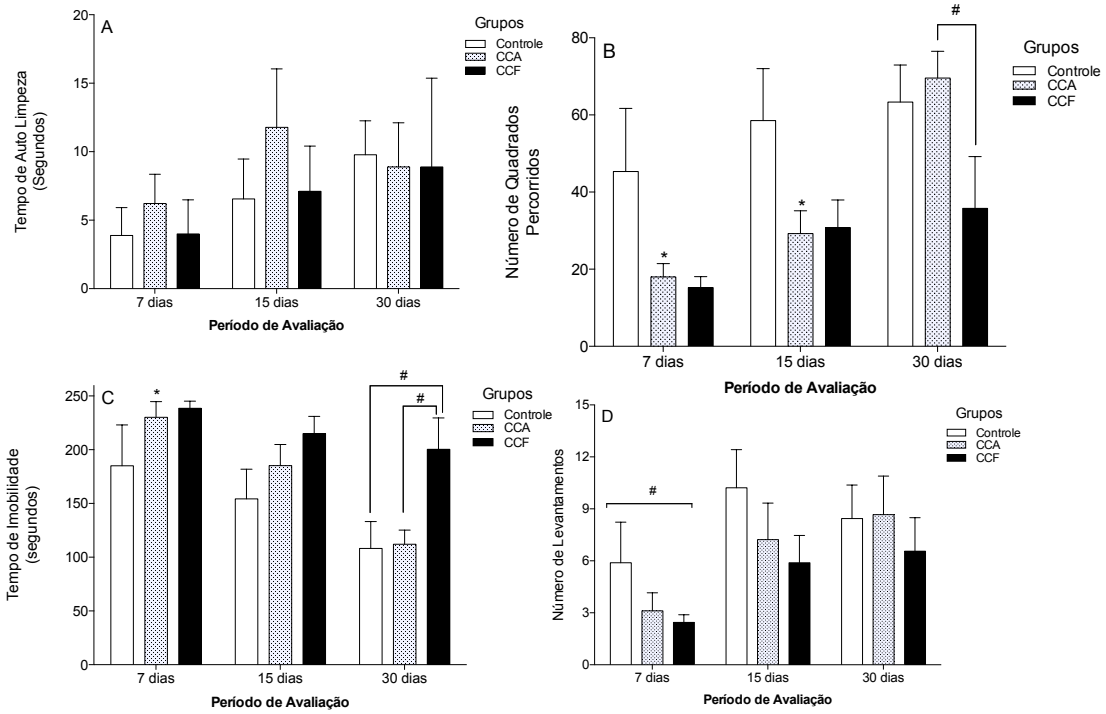


Figura 6. Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do campo aberto com os diferentes grupos experimentais (Controle: sem tratamento; CCA: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido aberto; CCF: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Quanto ao tempo de auto limpeza, não houve diferença significativa para os fatores grupo (p=0,6624), período de avaliação (p=0,2500) e interação dos fatores (p=0,9335) (A). Para o número de quadrados percorridos, observou-se diferença significativa para o fator grupo (p=0,0030) com ($^{\#}$p<0,05) CCA e CCF em 30 dias e período de avaliação (0,0017) com (*p<0,05) CCA em 7 e 15 dias com 30 dias; não houve diferença significativa para interação dos fatores (p=0,2714) (B). Quanto ao tempo de imobilidade, houve uma diferença significativa para o fator grupo (p=0,0019) com ($^{\#}$p<0,05) CCF com Controle e CCA em 30 dias e período de avaliação (p=0,0004) com (*p<0,01) no grupo CCA entre os períodos de 15 e 30 dias comparado ao de 7 dias; não apresentou diferença significativa para interação dos fatores (p=0,5249) (C). E relativo ao número de levantamentos, não foi significativa a diferença para o fator grupo (p=0,1097) e interação dos fatores (p=0,9049); diferença significativa (p=0,0121) com ($^{\#}$p<0,05) para o fator tempo em 7 dias com 15 e 30 dias (independente do grupo) (D). ANOVA dois critérios com pós-teste de Tukey.

5.1.2- TESTE LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

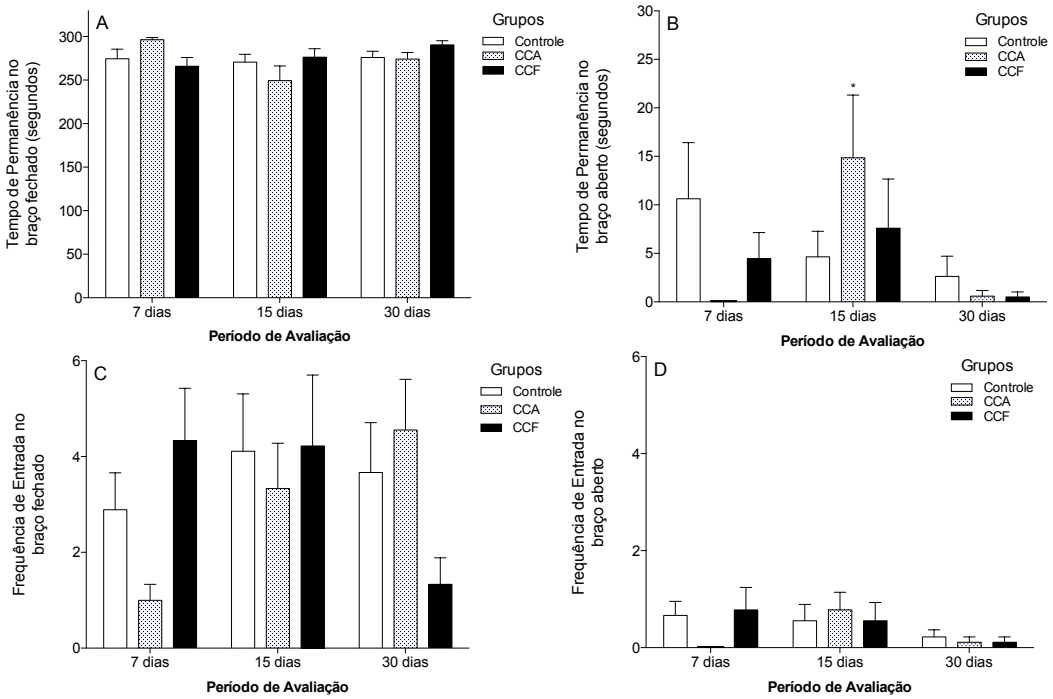


Figura 7. Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do labirinto em cruz elevado com os diferentes grupos experimentais (Controle: sem tratamento; CCA: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido aberto; CCF: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. No tempo de permanência no braço fechado, não houve uma diferença significativa para os fatores grupo (p=0,8329) e período de avaliação (p=0,1164); e diferença significativa (p=0,0315) para interação dos fatores (grupo e período de avaliação) (A). Quanto ao tempo de permanência no braço aberto, não mostrou-se diferença significativa para o fator grupo (p=0,8369) e interação dos fatores (p=0,0947); e diferença significativa (p=0,0389) para o fator período de avaliação, sendo CCA (*p<0,05) em 15 dias com 7 e 30 dias (B). A frequência de entrada no braço fechado não apresentou diferença significativa para os fatores grupo (p=0,7661) e período de avaliação (p=0,3673); e diferença significativa (p=0,0323) para interação dos fatores (C). E quanto a frequência de entrada no braço aberto não observou-se diferença significativa para os fatores grupo (p=0,6585), período de avaliação (p=0,1143) e interação dos fatores (p=0,4133) (D). ANOVA dois critérios com pós-teste de Tukey.

5.1.3- TESTES CAMPO ABERTO E LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO PARA O GRUPO CCF ANTES E DEPOIS DE FECHAR O DENTE COM RESINA COMPOSTA.

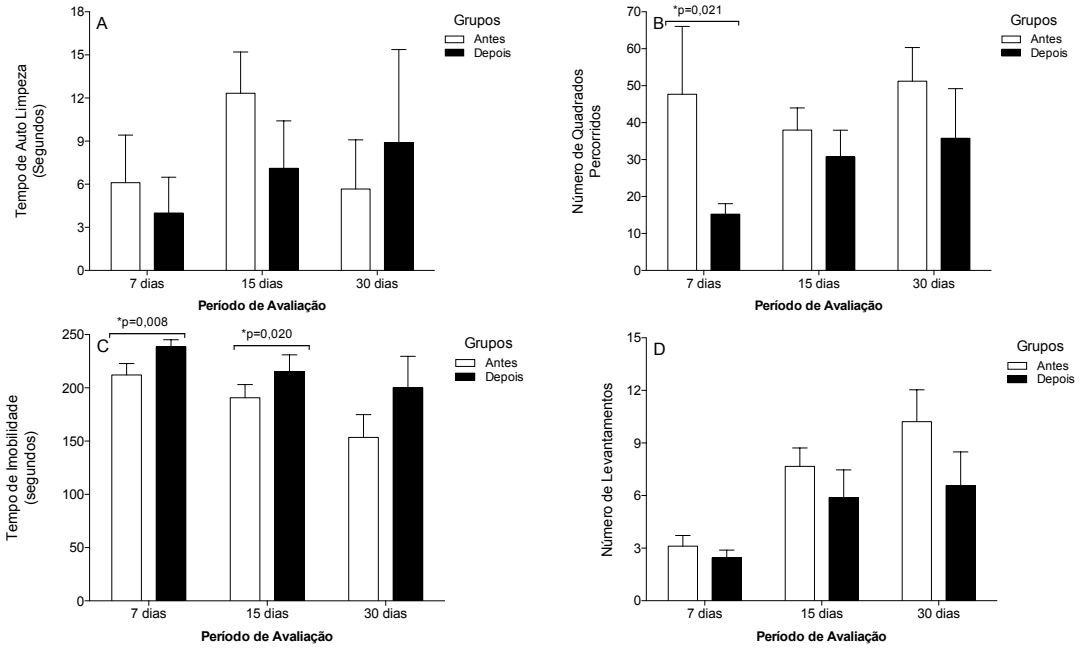


Figura 8. Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do campo aberto com o grupo CCF (canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado), sendo “Antes”: dente mantido 7, 15 e 30 dias aberto e “Depois”: dente aberto que foi fechado com resina composta por 7 dias. Comparação entre antes e depois (*p<0,05) em cada período de avaliação. Em relação ao tempo de auto limpeza não houve diferença significativa (A). Quanto ao número de quadrados percorridos, observou-se uma diferença significativa no período de 7 dias (p=0,021) (B). O tempo de imobilidade apresentou diferença significativa no período de 7 dias (p=0,008) e também no período de 15 dias (p= 0,020) (C). E não mostrou diferença significativa para o parâmetro número de levantamentos (D). Teste t de *student* pareado.

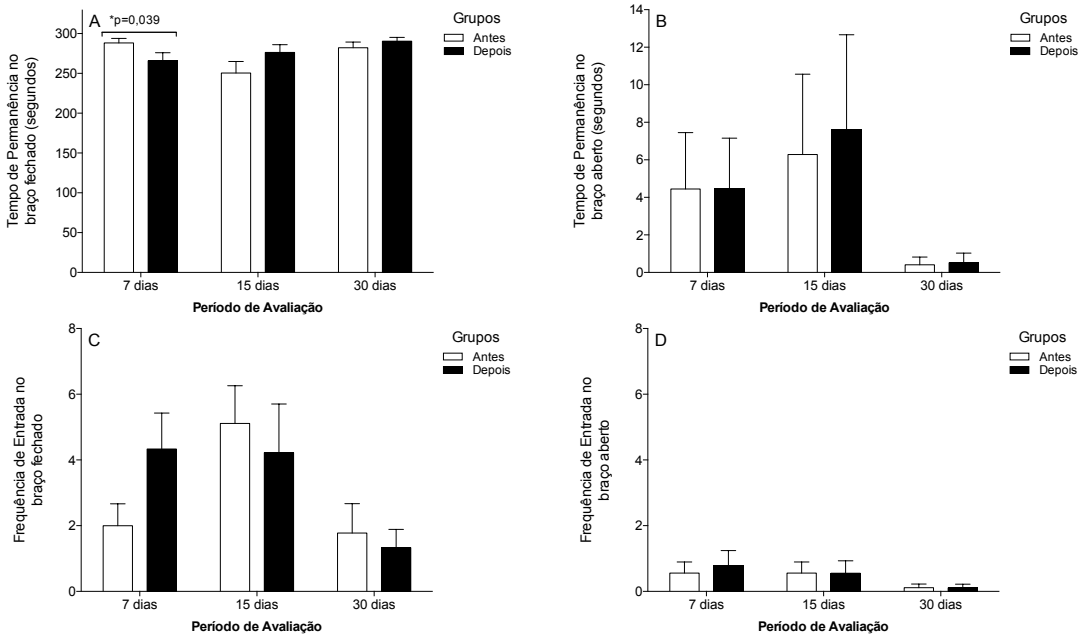


Figura 9. Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com o teste do labirinto em cruz elevado com o grupo CCF (canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado), sendo “Antes”: dente mantido 7, 15 e 30 dias aberto e “Depois”: dente aberto que foi fechado com resina composta por 7 dias. Comparação entre antes e depois (*p<0,05) em cada período de avaliação. Em relação ao tempo de permanência no braço fechado, houve uma diferença significativa no período de 7 dias (p=0,039) (A). Quanto ao tempo de permanência no braço aberto (B), a frequência de entrada no braço fechado (C) e a frequência de entrada no braço aberto (D) não foram significativamente diferentes (Figura 9). Teste t de *student* pareado.

5.2 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

5.2.1- IMAGENS DAS RADIOGRAFIAS DIGITAIS

Imagens mostram as hemimandíbulas direitas (lado contra-lateral, sem tratamento, dente incisivo cortado) e esquerdas (lado experimental, dente incisivo não cortado).

- Grupo Controle 7 dias

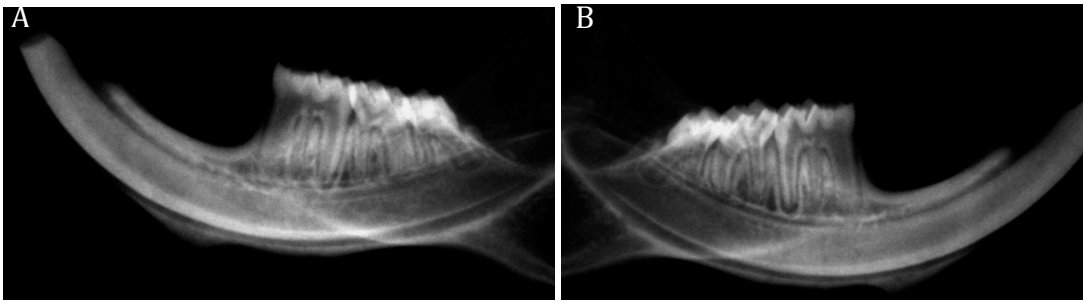


Figura 10– Radiografias da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 7 dias. Observa-se lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo Controle 15 dias

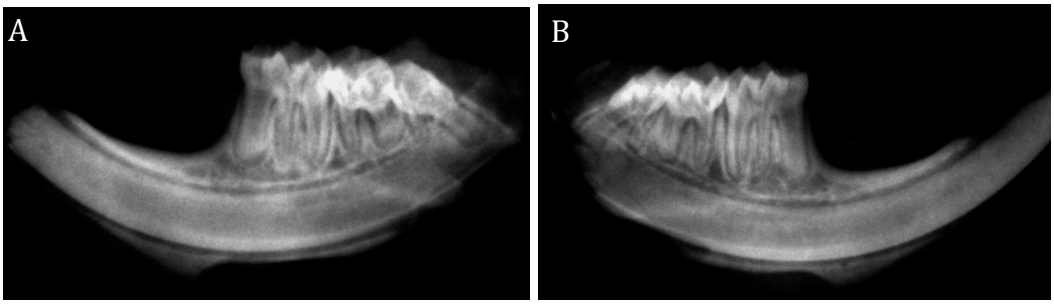


Figura 11– Radiografias da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 15 dias. Observa-se lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo Controle 30 dias

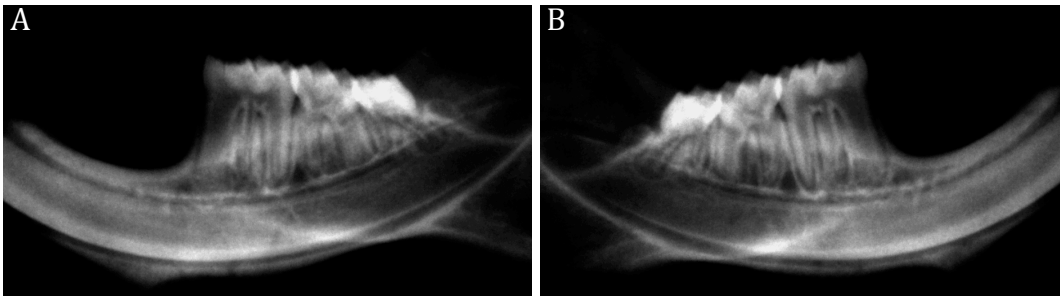


Figura 12– Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo controle após 30 dias. Observa-se lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCA 7 dias

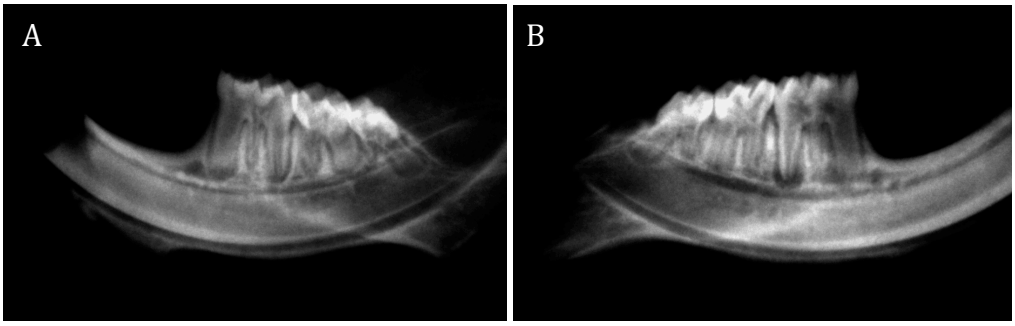


Figura 13– Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA (canal contaminado aberto) 7 dias. Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida ao redor do ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCA 15 dias

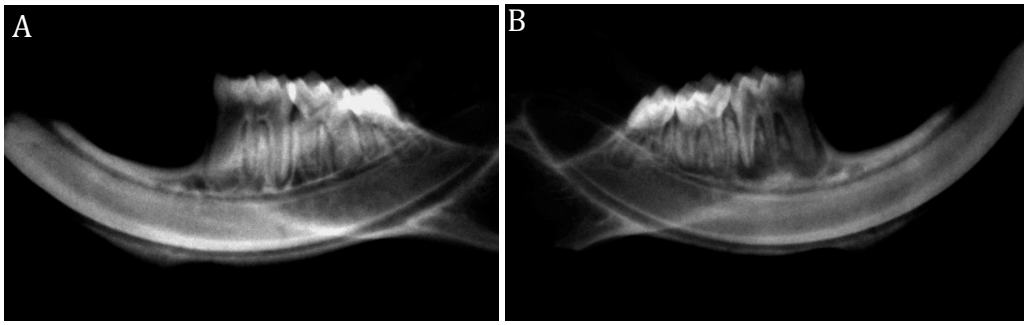


Figura 14– Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA (canal contaminado aberto) 15 dias. Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida ao redor do ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCA 30 dias

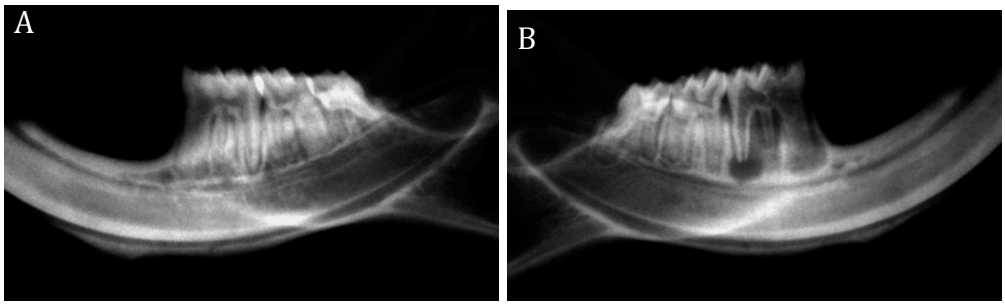


Figura 15– Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCA (canal contaminado aberto) 30 dias. Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida bem definida no ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCF 7 dias

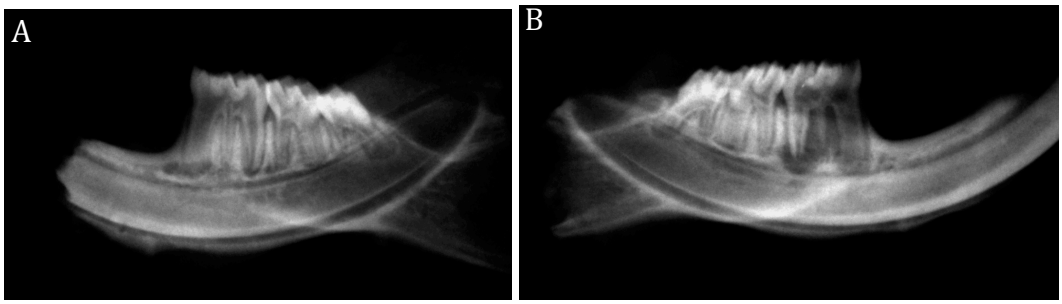


Figura 16– Radiografia da hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF (canal contaminado fechado) 7 dias (7 dias aberto e 7 dias fechado com resina composta). Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida difusa em torno do ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCF 15 dias

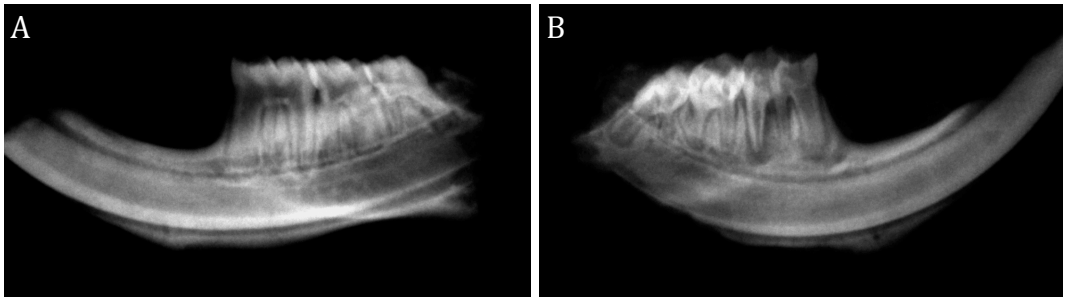


Figura 17– Radiografias das hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF (canal contaminado fechado)15 dias (15 dias dente aberto e 7 dias fechado com resina composta). Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida difusa em torno do ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

- Grupo CCF 30 dias

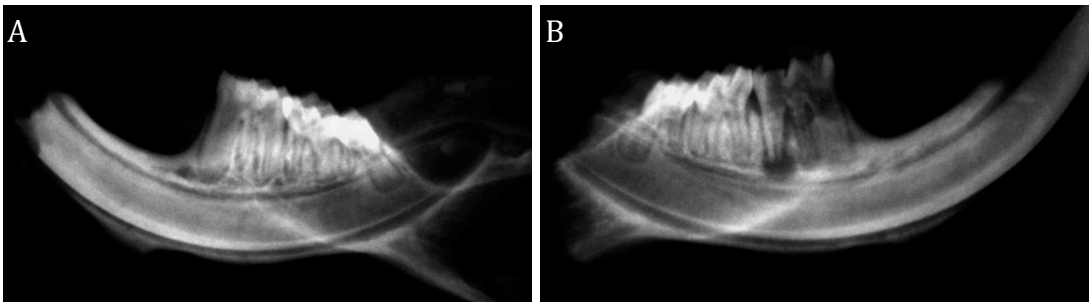


Figura 18– Radiografias das hemimandíbulas direita (A) e esquerda (B) representando o grupo CCF (canal contaminado fechado) 30 dias (30 dias dente aberto e 7 dias fechado com resina composta). Observa-se na hemimandíbula direita (A) lâmina dura íntegra, trabeculado ósseo normal e ausência de rarefação óssea na raiz distal do 1° molar inferior, já na hemimandíbula esquerda (B) área radiolúcida bem definida no ápice da raiz distal do 1° molar inferior.

5.2.2- ÁREA E PERÍMETRO OBTIDOS PELAS RADIOGRAFIAS DIGITAIS

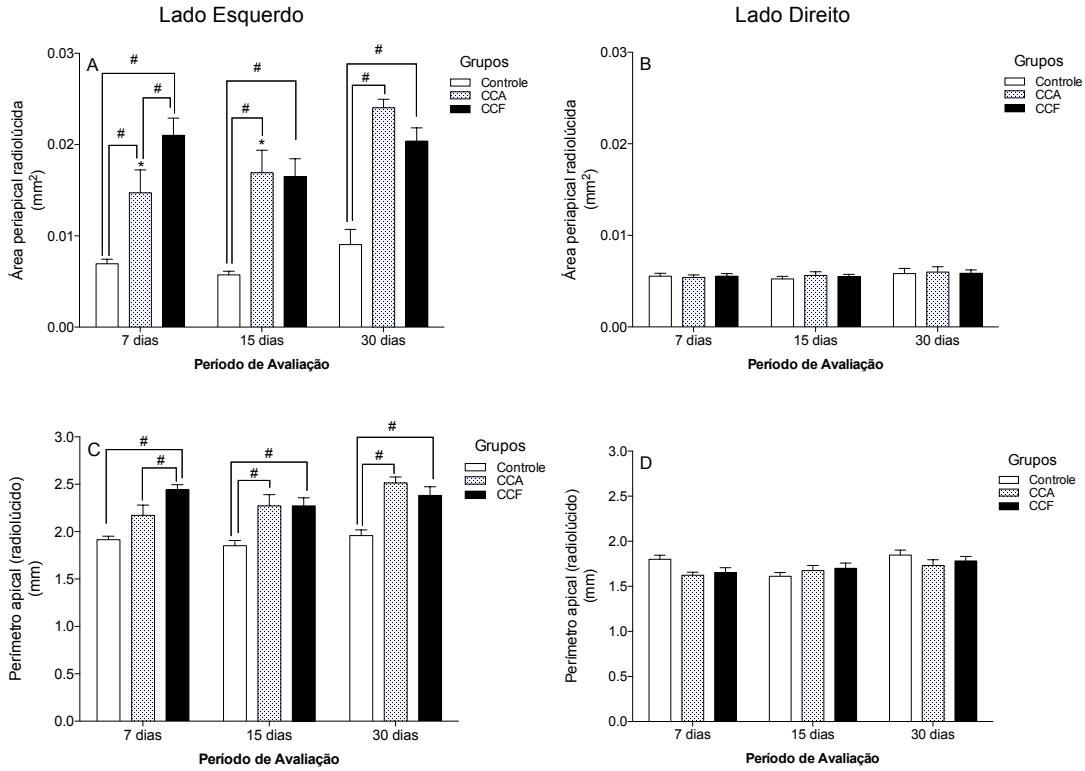


Figura 19. Média e erro padrão dos parâmetros obtidos com a análise radiográfica da região periapical radiolúcida nos diferentes grupos experimentais (Controle: sem tratamento; CCA: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido aberto; CCF: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Em relação a área periapical radiolúcida no lado esquerdo (experimental), observou-se diferença significativa para o fator grupo ($p<0,0001$) com ($^{\#}p<0,01$) 7 dias: Controle com CCA e CCA com CCF; 15 e 30 dias: Controle com CCA e CCF; fator período de avaliação ($p=0,0027$) com ($^{*}p<0,05$) no grupo CCA em 7 e 15 dias com 30 dias. CCA e CCF em 30 dias. (A). Quanto a área apical radiolúcida do lado direito (controle contra-lateral, dente sem tratamento) não houve diferença significativa para os fatores grupo ($p=0,8997$), período de avaliação ($p=0,3130$) e interação dos fatores ($p=0,9719$) (B). O perímetro periapical (radiolúcido) do lado esquerdo (experimental), mostrou diferença significativa para o fator grupo ($p<0,0001$) com ($^{\#}p<0,01$) 7 dias: Controle com CCA e CCA com CCF; 15 e 30 dias: Controle com CCA e CCF; e diferença não significativa para o fator período de avaliação ($p=0,0580$) e interação dos fatores ($p=0,1375$) (C). E o perímetro periapical (radiolúcido) direito (controle contra-lateral, dente sem tratamento) não apresentou diferença significativa para os fatores grupo ($p=0,2048$), período de avaliação ($p=0,1160$) e interações dos fatores ($p=0,1306$) (D). ANOVA dois critérios com pós-teste de Tukey.

5.3 AVALIAÇÃO DO PESO DOS ANIMAIS

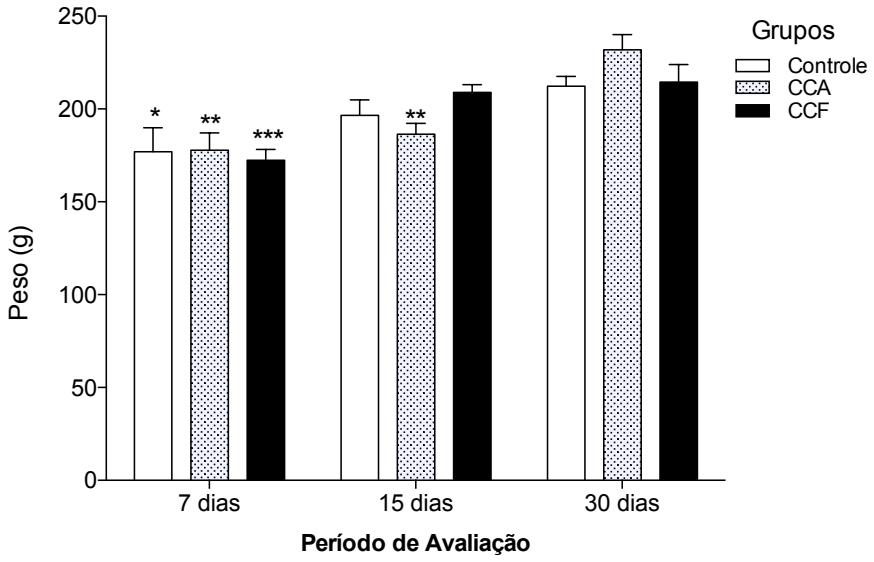


Figura 20. Média e erro padrão do peso dos animais nos diferentes grupos experimentais (Controle: sem tratamento; CCA: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido aberto; CCF: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Diferença não significativa para o fator grupo (p=0,8418) e interação dos fatores (p=0,1344) e diferença significativa para o fator período de avaliação (p<0,0001) com (*p<0,01) Controle 7 dias com 30 dias; (**p<0,001) CCA 7 e 15 dias com 30 dias e (***p<0,001) CCF 7 dias com 15 e 30 dias ANOVA dois critérios com pós-teste de Tukey.

5.4 AVALIAÇÃO DO PESO DAS GLÂNDULAS ADRENAIS

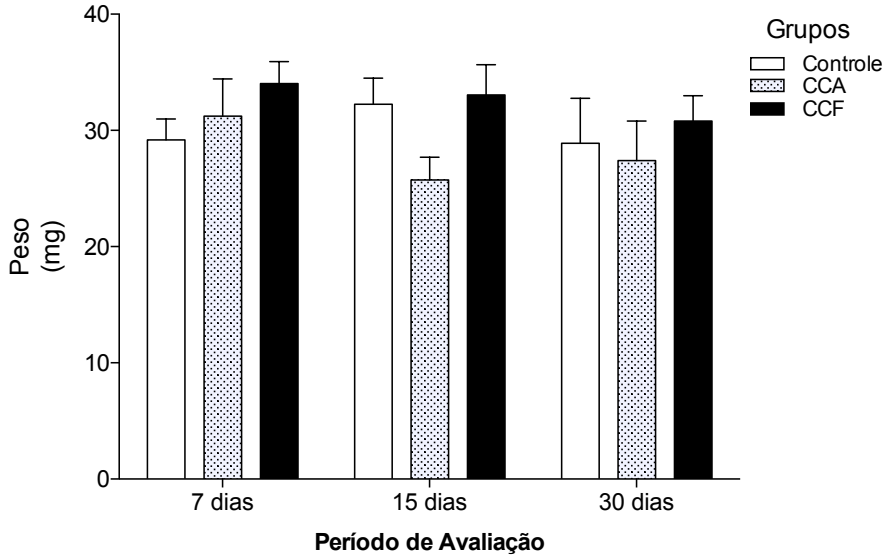


Figura 21.Média e erro padrão do peso da glândula adrenal dos animais nos diferentes grupos experimentais (Controle: sem tratamento; CCA: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido aberto; CCF: canal contaminado do primeiro molar inferior esquerdo mantido fechado) nos períodos de 7, 15 e 30 dias. Não foi observada diferença significativa para o fator grupo (p=0,1232), período de avaliação (p=0,5356) e interação dos fatores (p=0,6117). ANOVA dois critérios com pós-teste de Tukey.

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA DESCRITIVA

- Grupo Controle 7 dias

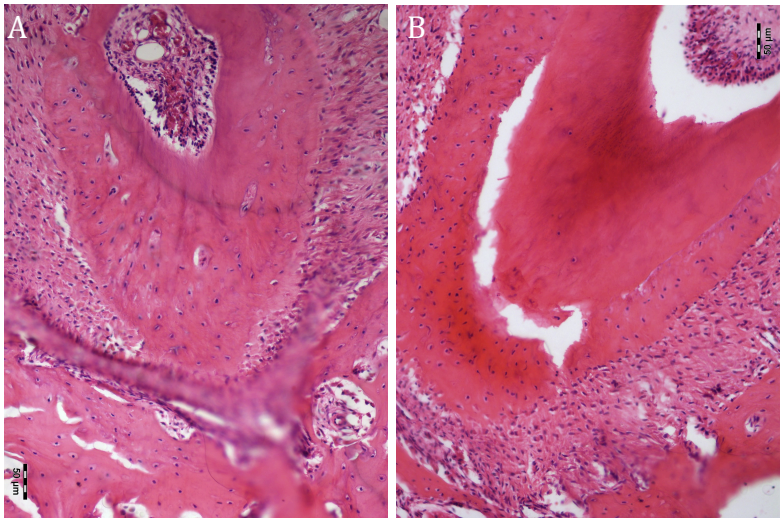


Figura 22. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 7 dias. Observa-se normalidade da região periapical, com ausência de infiltrado inflamatório e reabsorção óssea. Corte transversal (A) e longitudinal (B), aumento 20x (A), 20x (B). HE.

- Grupo Controle 15 dias

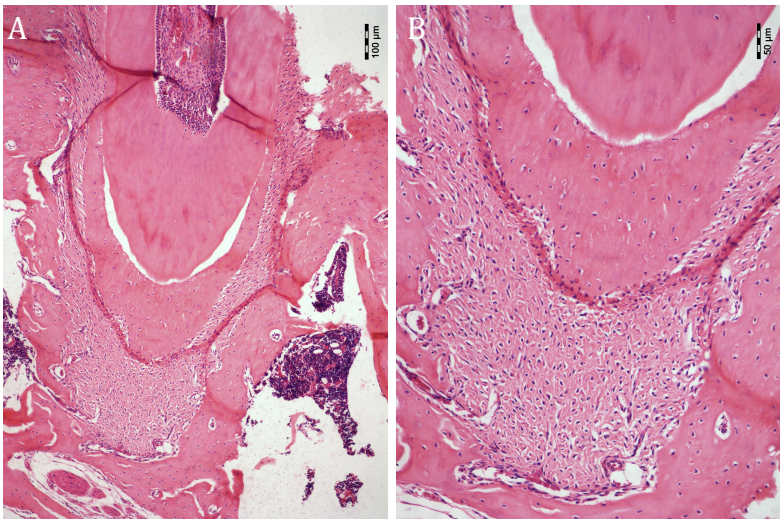


Figura 23 Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 15 dias. Observa-se normalidade da região periapical, com ausência de infiltrado inflamatório e reabsorção óssea. Corte longitudinal, aumento 10x (A) e 20x (B). HE.

- Grupo Controle 30 dias

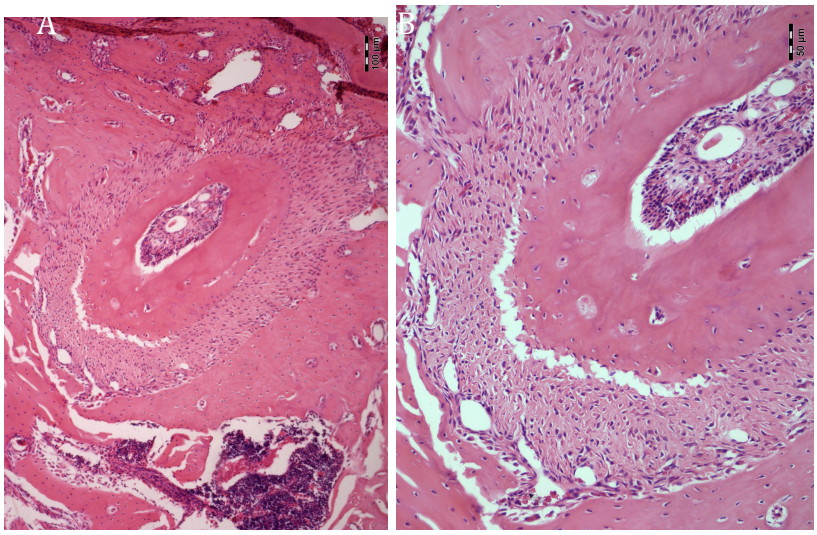


Figura 24. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo controle de 30 dias. Observa-se normalidade da região periapical, com ausência de infiltrado inflamatório e reabsorção óssea. Corte transversal, aumento 10x (A) e 20x (B). HE.

- Grupo CCA 7 dias

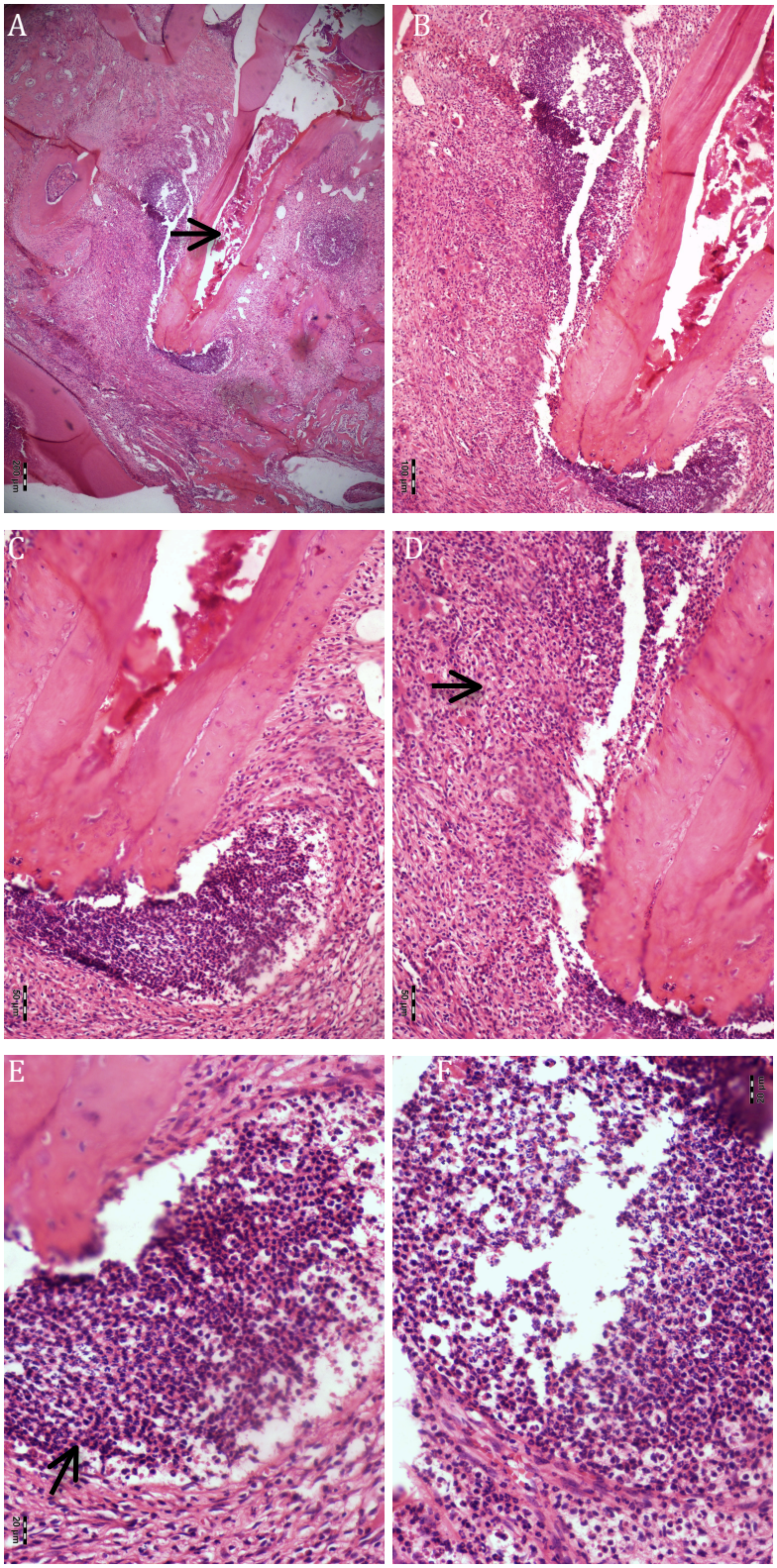


Figura 25. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 7 dias (canal contaminado aberto por 7 dias). Observa-se a polpa necrótica (A e B), presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (C e D), presença de microabscessos bem definidos (E e F). Corte longitudinal, aumento 4x (A), 10x (B), 20x (C), 20x (D), 40x (E), 40x (F). HE.

- Grupo CCA 15 dias

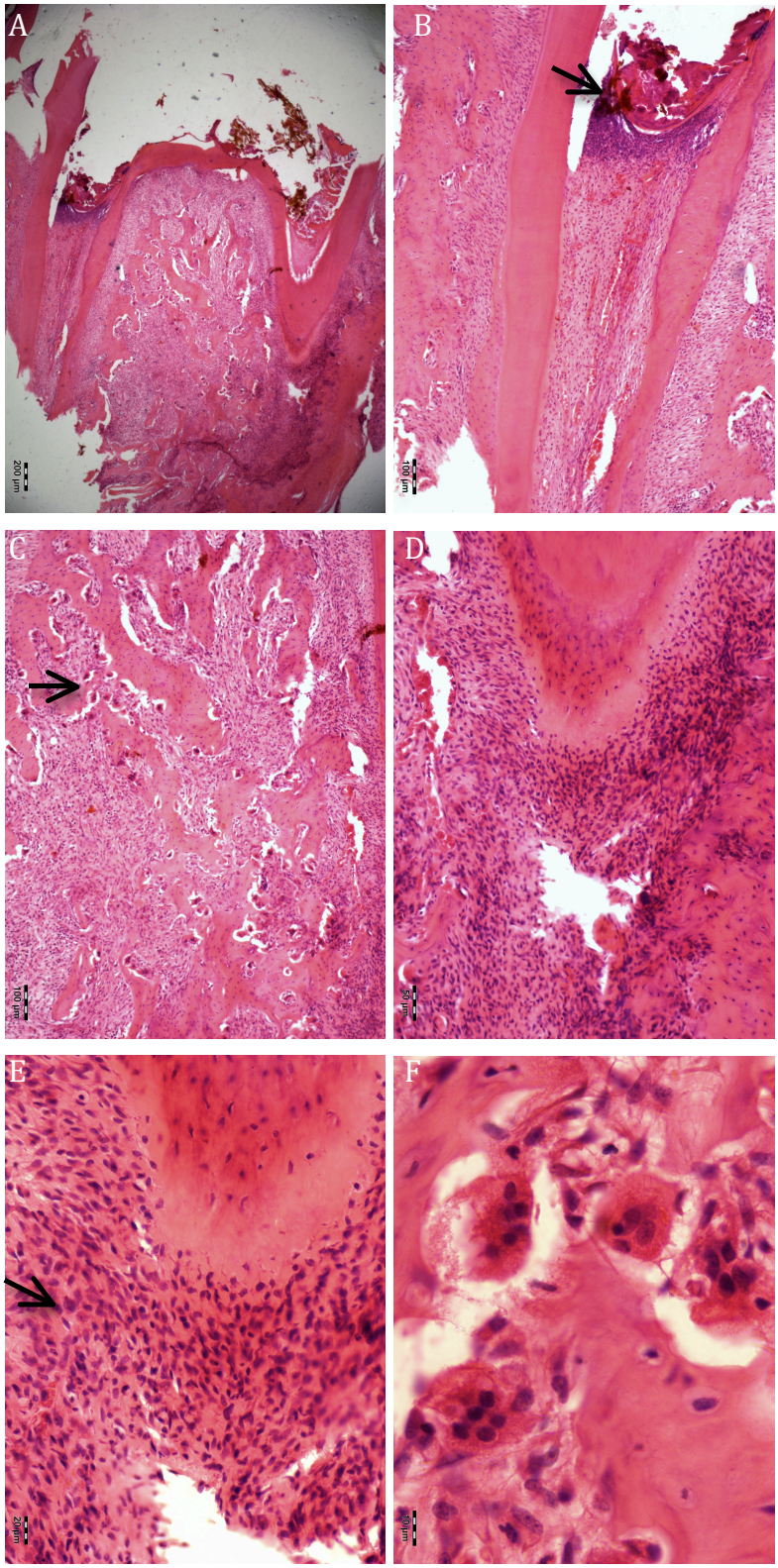


Figura 26. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 15 dias (canal contaminado aberto por 15 dias). Observa-se a polpa em processo de necrose na raiz distal (A e B),presença de reabsorção óssea entre as raízes com grande quantidade de osteoclastos (C e F), presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (D e E). Corte longitudinal, aumento 4x (A),10x (B), 10x (C), 20x (D), 40x (E), 100x (F). HE.

- Grupo CCA 30 dias

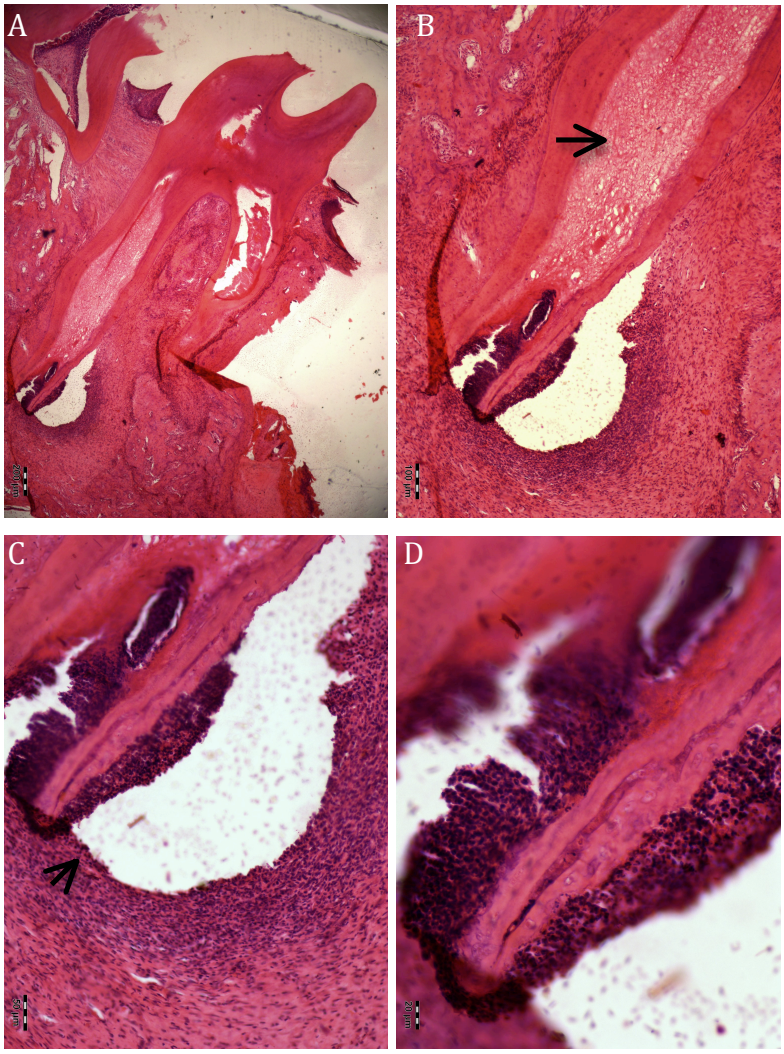


Figura 27. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCA 30 dias (canal contaminado aberto por 30 dias). Observa-se a polpa necrótica, presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (A e B), presença de microabscessos definidos (C e D). Corte longitudinal, aumento de 4x (A), 10x (B), 20x (C), 40x (D). HE.

- Grupo CCF 7 dias

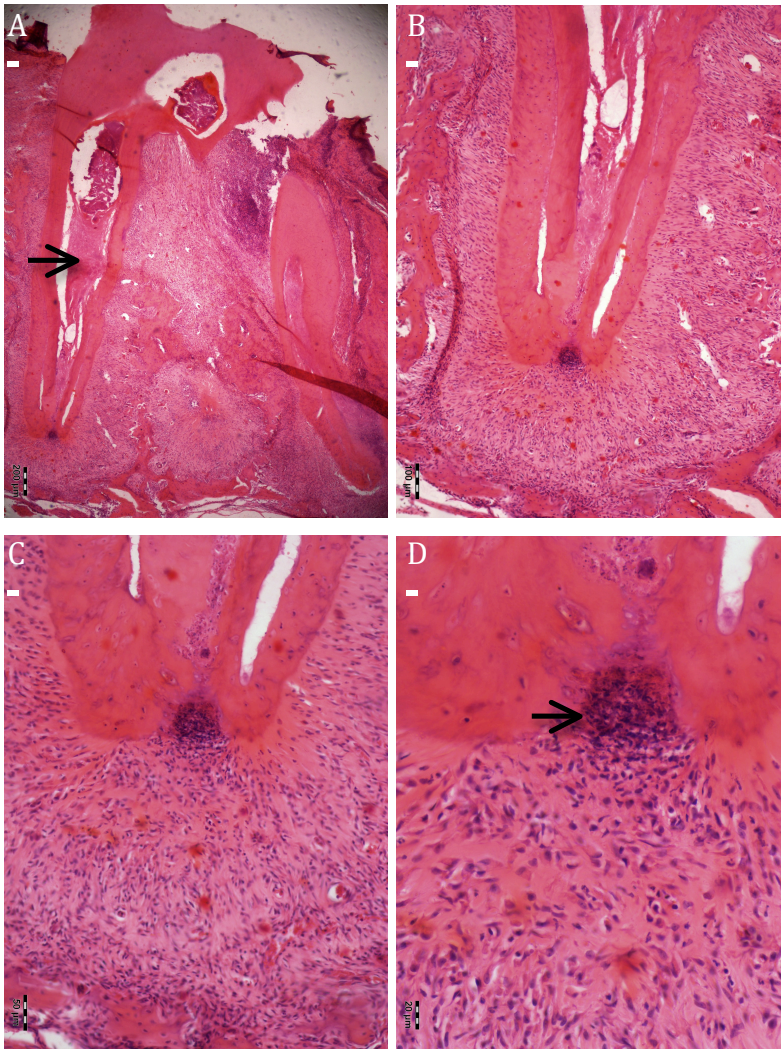


Figura 28. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 7 dias (canal contaminado fechado com resina composta, 7 dias dente aberto e 7 dias fechado). Observa-se a polpa necrótica (A e B) e presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (C e D). Corte longitudinal, aumento 4x (A), 10x (B), 20x (C) e 40x (D). HE.

- Grupo CCF 15 dias

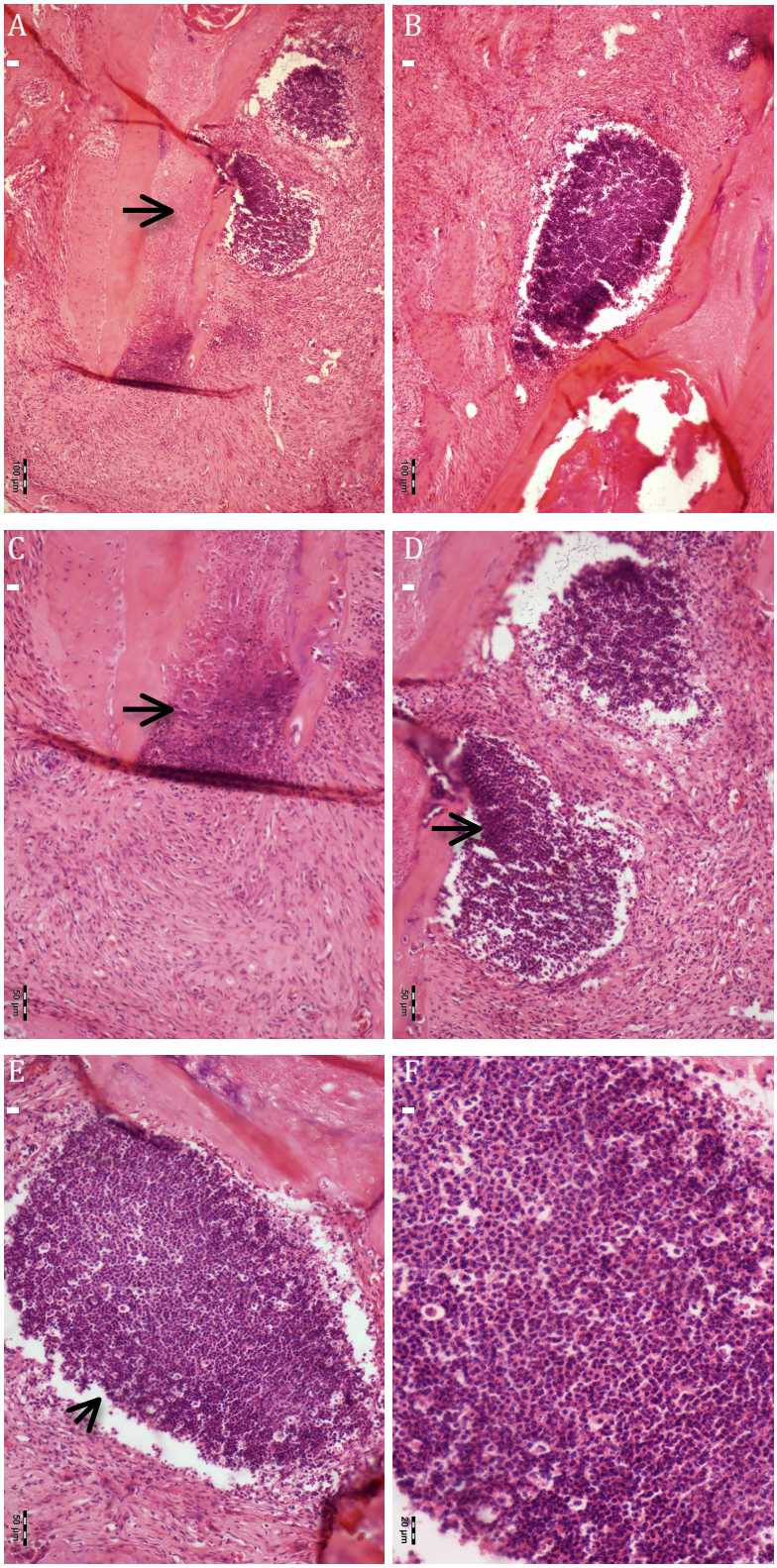


Figura 29. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 15 dias (canal contaminado fechado com resina composta – 15 dias dente aberto e 7 dias fechado). Observa-se a polpa necrótica (A e B), presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (C) e microabscessos bem definidos (D, E e F). Corte longitudinal, aumento de 10x (A), 10x (B), 20x (C), 20x (D), 20x (E), 40x (F). HE.

- Grupo CCF 30 dias

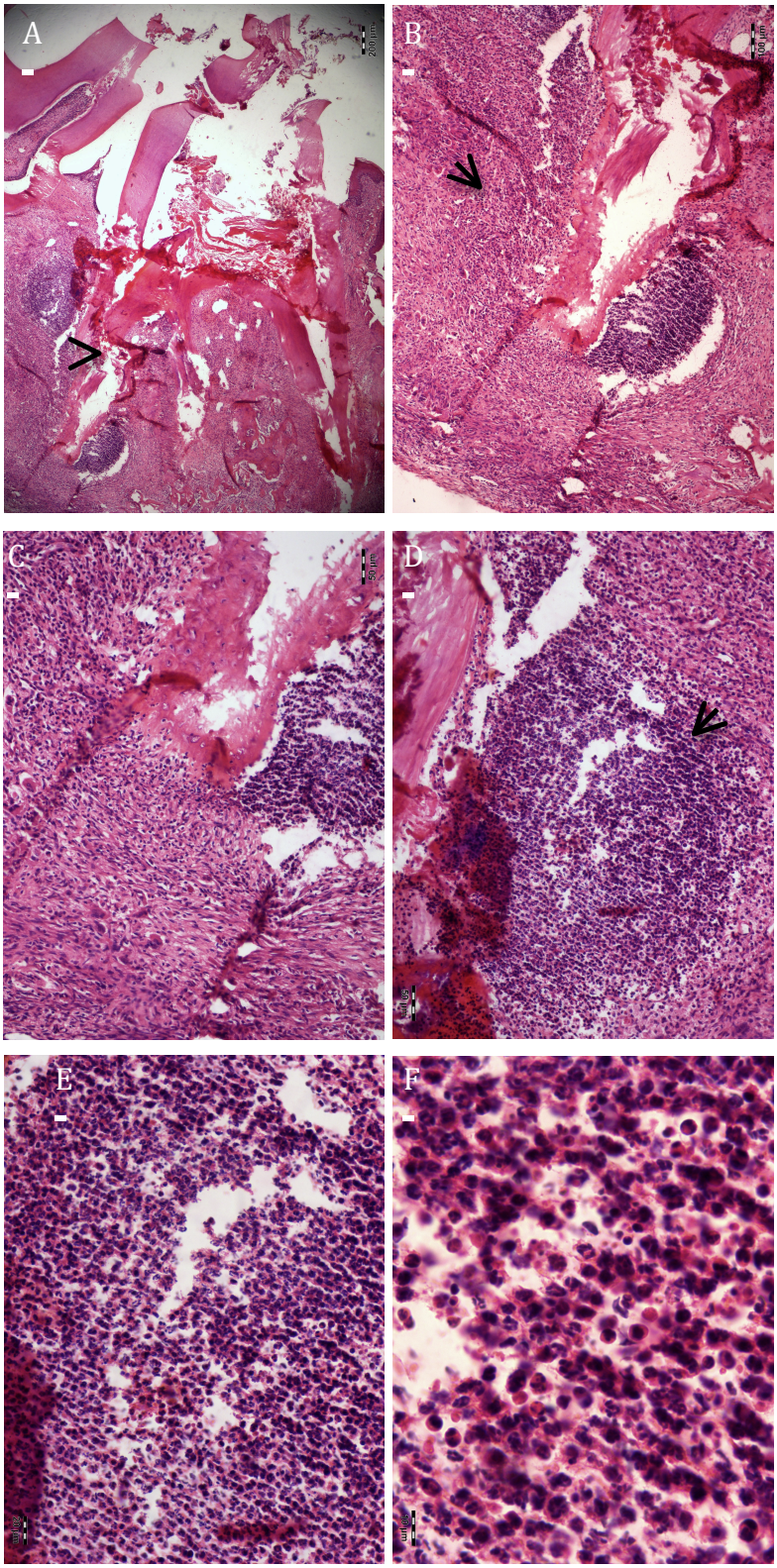


Figura 30. Representação histológica do 1° molar inferior de um animal representando o grupo CCF 30 dias (canal contaminado fechado com resina composta – 30 dias dente aberto e 7 dias fechado). Observa-se a polpa necrótica (A), presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear (B) e microabscessos bem definidos (C,D, E e F). Corte longitudinal, aumento de 4x (A), 10x (B), 20x (C), 20x (D), 40x (E) e 100x (F). HE.

6. DISCUSSÃO

A literatura apresenta vários estudos sobre as lesões periapicais a partir de dentes extraídos e material de biópsia de cirurgias parendodônticas, as quais permitem um estudo microscópio e radiográfico da lesão, porém de maneira estática, não mostrando a evolução da mesma (Bohne[47] 1990, Ferlini Filho[48] 1999, Ramachandran Nair et al.[49] 1996, Pereira[50] 1983). Por isso, a importância do estudo destas lesões induzidas experimentalmente em animais, nas quais pode-se acompanhar sua progressão, caracterização e a compreensão da sua patogênese, considerando-se os diferentes tempos de evolução. Assim, as análises microscópica e radiográfica da lesão periapical induzida permitem um estudo de seus vários períodos de desenvolvimento, o que possibilita identificar o que ocorre em cada fase, podendo colaborar para o estudo de futuras investigações utilizando o modelo experimental animal (Pinto[70] 2006).

Frequentemente o rato tem sido utilizado como modelo experimental em pesquisas científicas (Stashenko et al.[65] 1992, Hong et al.[71] 2004). No presente estudo, optou-se por utilizar ratos como modelo experimental, devido a facilidade de manutenção, obtenção e baixo custo quando comparado a outros animais como cães e macacos (Erausquin e Muruzabal[55] 1967). Foram utilizados ratos com 45 dias de idade, por representarem adultos jovens (Souza[72] 1999). Foi escolhido o primeiro molar inferior (canal radicular distal), para a indução da lesão periapical, devido a semelhança da anatomia humana e facilidade de acesso endodôntico e radiográfico (Erausquin e Muruzabal[55] 1967, Daniel[59] 2001).

O método de exposição pulpar utilizado foi preconizado por Kakehashi et al. (Kakehashi et al.[51] 1965, Yu e Stashenko[52] 1987, Wang e Stashenko[53] 1991). Neste modelo, a exposição cirúrgica de molares ao ambiente bucal e a consequente infecção da polpa dentária mostram como resultados o desenvolvimento de lesões periapicais e a destruição do osso (Stashenko et al.[15] 1994). A exposição pulpar provoca uma reação periapical no rato com a mesma evolução que no homem, cão e hamster, resultando na formação de um granuloma periapical (Erausquin e Muruzabal[55] 1967).

A análise microscópica dos tecidos patológicos tem sido amplamente utilizada

na Odontologia, inúmeras são as colorações empregadas nesta análise, dentre as quais, a hematoxilina e eosina (HE) enquadram-se como as mais utilizadas. Nas células coradas com HE os ácidos nucléicos presentes no núcleo são corados pela hematoxilina, dando ao núcleo tom azul-púrpura. A eosina é atraída pelos elementos básicos da proteína do citoplasma da célula, corando-o de róseo a vermelho sendo a associação de ambas amplamente utilizada, sendo assim, optou-se pela coloração HE neste estudo, apesar de alguns autores a criticarem como sendo inespecífica (Jardim[73] 2013).

Por meio da análise microscópica descritiva realizada no presente trabalho, foi possível identificar a presença de infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear e polpa necrótica em todos os períodos de avaliação, 7, 15, e 30 dias, nos grupos testes (CCA e CCF), presença de microabscessos no grupo CCA de 7 e 30 dias e no grupo CCF de 15 e 30 dias. Notou-se reabsorção óssea em todos os períodos em ambos os grupos e mais evidente no grupo CCA de 15 dias, o qual apresentou expressiva quantidade de osteoclastos. A partir do dia 7 ao dia 14, o número de osteoclastos aumenta, do dia 21 ao dia 35, menos osteoclastos podem ser observados (Liu et al.[62] 2014). Nos três períodos foram observadas predomínio de células polimorfonucleares, é possível que a atividade mediada por estas células possa estar envolvida na destruição óssea em lesões periapicais induzidas em ratos (Stashenko e Yu[60] 1989).

Pôde-se observar que as lesões periapicais induzidas experimentalmente em ratos desenvolveram-se de maneira acentuada entre 7 e 14 dias após a sua indução, expandindo consideravelmente e apresentando reabsorção óssea progressiva nestes períodos, já no período de 30 dias a evolução da reabsorção óssea foi mais lenta. Este estudo concordou com alguns autores (Stashenko et al.[15] 1994, Yu e Stashenko[52] 1987, Stashenko et al.[65] 1992, Corotti[74] 2005), que estabeleceram os períodos iniciais de indução, entre os dias 0 e 15, como fase ativa, quando há crescimento contínuo da lesão e grande atividade de reabsorção óssea (Stashenko et al.[15] 1994), e nos períodos subsequentes (como o período de 30 dias) há um crescimento mais lento, caracterizando a fase crônica (Stashenko et al.[65] 1992, Pinto[70] 2006).

As lesões periapicais induzidas em ratos, em ambos os grupos teste CCA e CCF, apresentaram radiograficamente, áreas e perímetros das regiões periapicais

radiolúcidas significativamente maiores em comparação ao grupo controle em todos os períodos de 7, 15 e 30 dias. Para alguns autores, após o 5° dia de exposição pulpar já observam-se áreas radiolúcidas e há um aumento significativo até o 20° dia (Lin et al.[66] 2000). O grupo CCA apresentou áreas e perímetros crescentes nos períodos experimentais, já o grupo CCF de 7 dias mostrou as maiores medidas de área e perímetro quando comparado aos períodos de 15 e 30 dias.

No presente estudo, optou-se pela utilização do método radiográfico para visualização e mensuração da lesão periapical, apesar deste método apresentar algumas limitações, visto que gera imagens bidimensionais de estruturas tridimensionais. A radiografia mostra essencialmente as relações do forame apical com as paredes mesial e distal, porém devido à pouca clareza, ou pela ausência de contrastes bem definidos, ou interferência de elementos anatômicos, podem dificultar a visualização radiográfica da parte mais apical da raiz (Scarparo[75] 2006). Contudo, o método radiográfico é acessível, conhecido, controlável e de fácil execução (Guneri e Akdeniz[76] 2004).

Neste trabalho foram utilizadas radiografias digitais. Sistemas digitais permitem imagens radiográficas sem o uso do filme radiográfico convencional, o qual, é substituído por um sensor, e elimina a possibilidade de erros resultantes do processamento, pois dispensa o uso da câmara escura (Friberg et al.[77] 1992, Sanderink[78] 1993, Vandre e Webber[79] 1995). Estes sistemas apresentam vantagens como a investigação de dados digitais, entrega rápida dos resultados e facilidade em analisá-las em computador. Porém a possibilidade de alteração dos dados é uma desvantagem. Essas imagens digitais vêm sendo utilizadas em vários estudos odontológicos, por exemplo, para verificar a eficiência na detecção de lesões de cárie e o comprimento do canal radicular. Logo, esses sistemas computadorizados possibilitam imagens intrabucais digitalizadas muito úteis no diagnóstico, planejamento e tratamento. (Sanderink[78] 1993).

Para a análise da área e perímetro da imagem radiolúcida obtidas pelas radiografias digitais, optou-se pela uso do programa *Image J*. O *ImageJ* é um programa de processamento e análise de imagens Java de domínio público inspirado pelo NIH Imagem para o Macintosh. Funciona online ou como um aplicativo para download, em qualquer computador com uma versão Java 1.5 ou

posterior. Ele pode exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8 bits, 16 bits e 32 bits. Pode ler vários formatos de imagem, incluindo TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS. É capaz de calcular a área e valor de pixel estatísticos de seleções definidas pelo usuário, medir distâncias e ângulos, criar histogramas de densidade e gráficos de perfis de linha. Suporta funções de processamento de imagem padrão, tais como manipulação de contraste, nitidez, detecção de borda e etc. A imagem pode ser ampliada até 32: 1 e até 1: 32. Todas as funções de análise e processamento estão disponíveis em qualquer fator de ampliação. Calibração espacial está disponível para fornecer medições dimensionais reais em unidades como milímetros (Ferreira e Rasband[80] 2012).

Os resultados deste estudo mostraram que o modelo experimental em que foi realizada a abertura coronária com exposição da câmara pulpar foi satisfatório para indução da lesão periapical em molares inferiores de ratos, tanto radiograficamente como microscopicamente. A abertura da câmara pulpar e exposição pulpar, pode gerar alterações que se apresentam radiograficamente como um espessamento do ligamento periodontal inicialmente e podem atingir diâmetros maiores no decorrer do tempo, sendo a reabsorção óssea um mecanismo de defesa do hospedeiro. (LEONARDI *et al*, 2011). Outros estudos também revelaram a presença de reabsorção óssea, desde os primeiros dias, como Yamasaki *et al.* em 1994, que demonstrou que no sétimo dia já havia presença de reabsorção óssea evidente. Teixeira, em 2007, também constatou extensas áreas de reabsorção óssea, tanto na região periapical da raiz instrumentada quanto na região de furca (Teixeira[44] 2007).

A glândula adrenal é essencial a vida, seus hormônios principais, cortisol, corticosterona e aldosterona, influenciam o metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídeos, eletrólitos e água. A liberação de cortisol e corticosterona é controlada pela adeno-hipófise, por meio da secreção do hormônio adrenocorticotropico (ACTH). Esse hormônio é liberado com frequência em resposta a situações de ansiedade e estresse, em hiperatividade a glândula poderia aumentar seu peso, razão pela qual as glândulas foram pesadas, porém neste estudo não houve diferença significativa entre os grupos, provavelmente para existir uma diferença estatisticamente significate precisaria-se de um tempo maior de exposição a situações de ansiedade e estresse (Nielsen[81] 1996).

Neste estudo, para a avaliação da ansiedade, optou-se pelos testes campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevado (LCE). O teste CA porque consiste em um simples protocolo, cuja avaliação dos seus componentes têm sido amplamente utilizada para mensuração de emocionalidade, atividade exploratória, atividade geral ou locomotora, medo, ansiedade e estresse (Courvoisier[6] 1996, Matto e Allikmets[8] 1999). E o teste LCE porque tem sido amplamente utilizado em roedores como um protocolo de avaliação do medo e ansiedade. O teste explora o conflito entre a tendência natural de roedores de explorar ambientes novos e a aversão, o medo natural que ratos apresentam a altura e espaços abertos. Tem sido um dos modelos animais de ansiedade mais utilizados para o estudo experimental de drogas ansiolíticas (Choi et al.[7] 2013, Pellow et al.[29] 1985).

A diminuição na ambulação do animal no teste do campo aberto (CA) pode ser considerada um indicativo de aumento do comportamento ansiogênico, porém alguns autores criticam esta proposta, uma vez que, as medidas avaliadas podem ser influenciadas por outros fatores, como por exemplo, a novidade de explorar um local novo pode gerar imobilidade e o contrário também é verdadeiro, alterando os padrões de atividade locomotora e exploração (FILE, 2001). Segundo Trombini *et al*. (2001) o aumento do tempo de auto limpeza e o de imobilidade refletem o aumento de ansiedade e medo. Neste presente estudo, o grupo CCA apresentou menor ambulação com 7 e 15 dias, mas também, maior tempo de imobilidade em 7 dias, o que pode representar um comportamento ansiogênico em 7 e 15 dias. Já o grupo CCF apresentou menor ambulação e maior imobilidade em 30 dias quando comparado aos grupos CCA e Controle, indicando um comportamento ansiogênico em 30 dias. Dentro do grupo CCF, comparando antes e depois de fechar o dente com resina composta, observou-se menor ambulação no período de 7 dias e maior tempo de imobilidade em 7 e 15 dias, o que indica um comportamento ansiogênico após o fechamento do dente, principalmente no período de 7 e 15 dias. Portanto, pode-se dizer que, a indução da lesão periapical pôde trazer mudanças comportamentais nos animais do grupo CCA, até 15 dias após a indução, com 30 dias os animais desse grupo possuem comportamentos semelhantes ao grupo controle.

A porcentagem de tempo de exploração dos braços abertos é considerada um índice de medo e ansiedade, quanto maior, menor a ansiedade e vice-versa, já a

porcentagem de tempo de exploração dos braços fechados quanto maior, maior a ansiedade (Pellow et al.[29] 1985). O menor tempo e frequência de entrada nos braços abertos parece ser motivada pela impossibilidade do animal executar o padrão comportamental de tigmotatismo, uma resposta de defesa natural do animal que os leva a permanecer próximo às superfícies verticais ou em contato com elas, evitando desta forma serem vistos pelo predador (TEIXEIRA, 2011). O cérebro recebe impulsos produzidos por vários estressores e através dos sistemas nervoso, endócrino e imune envia respostas, resultando em mudanças comportamentais que visam manter a homeostase, ou seja, a permanência nos braços fechados aumenta a chance de sobrevivência do animal, o qual tem a atenção aumentada durante momentos de estresse, além da frequência cardíaca e respiratória (SOUZA, 2010). Neste trabalho, o grupo CCA apresentou maior tempo de permanência em braço aberto em 15 dias comparado com 7 e 30 dias, indicando que houve um comportamento ansiogênico mais acentuado em 7 e 30 dias.

A exposição mecânica da polpa produz alterações inflamatórias em apenas um dia e mudanças perirradiculares já em cinco dias (Shang et al.[11] 2015). Com a instalação de um agente etiológico no interior do canal radicular, independentemente de sua natureza, a primeira região a sofrer agressão é a periapical, gerando uma reação de defesa dos tecidos e podendo resultar em dor, evoluindo para pericementite, a qual pode ser visualizada radiograficamente como um aumento do espaço periapical ao redor do dente afetado, com o passar do tempo, o quadro pode evoluir para uma alteração periapical crônica não apresentando sintomatologia dolorosa, fato que leva a entender o motivo dos animais do grupo CCA avaliados com 30 dias não apresentarem diferença significativa em relação ao aumento da ansiedade quando comparados com os animais de 7 e 15 dias, ou seja, o processo tornou-se crônico, sem presença de dor exacerbada e sem alteração comportamental, mas com presença de lesão periapical visível radiograficamente (Leonardi[35] 2011). O que não ocorreu com o grupo CCF, o qual, apresentou menor exploração e maior imobilidade em 30 dias quando comparado aos grupos CCA e Controle. Pode-se dizer que o fechamento da cavidade com resina composta deixou o animal mais ansioso principalmente no período de 30 dias, o que leva a crer que mesmo a lesão estando crônica em 30 dias, quando o dente é fechado, provavelmente a sintomatologia dolorosa volta a aparecer, o que leva ao

comportamento ansiogênico. Provavelmente porque ocorreu a reagudização de um processo crônico, que é acompanhada por dor.

Portanto, o grupo CCA apresentou menor exploração com 7 e 15 dias e maior tempo de imobilidade, indicando comportamento ansiogênico, podendo-se dizer que, a indução da lesão periapical trouxe mudanças comportamentais nos animais, até 15 dias após a indução. O grupo CCF apresentou menor exploração, maior imobilidade em 30 dias comparado ao grupo CCA e Controle, mostrando que o fechamento da cavidade com resina composta provavelmente deixa o animal mais ansioso em 30 dias, quando observa-se uma grande diferença de comportamento comparado ao grupo CCA, que neste período de 30 dias apresenta comportamento semelhante ao Controle. O grupo CCF em 7 dias teve menor exploração, e em 7 e 15 dias, maior tempo de imobilidade, demonstrando comportamento ansiogênico após a colocação da resina composta.

O presente estudo confirmou que a abertura coronária e remoção da polpa foram suficientes para induzir a um processo de necrose e consequentemente lesão periapical. Portanto, como a atividade e desenvolvimento de lesões periapicais em humanos é semelhante àquele encontrado em lesões induzidas em ratos, pode-se dizer que os modelos animais são válidos em relação ao estudo das alterações periapicais, mas os aspectos comportamentais também devem ser considerados, visto que influenciam a resposta imunológica e o reparo tecidual (TEIXEIRA, 2011).

7. CONCLUSÃO

1. As lesões periapicais induzidas levaram a alteração comportamental nos animais, mostrando um comportamento ansiogênico, no grupo CCA, até 15 dias após a indução e no grupo CCF em 30 dias;

2. O modelo animal utilizado mostrou-se satisfatório em induzir as lesões periapicais inflamatórias;

3. Os aspectos radiográficos foram concordantes com os microscópicos. As lesões periapicais induzidas em ratos, em ambos os grupos teste (CCA e CCF), apresentaram áreas radiolúcidas significativamente maiores em comparação ao grupo controle, presença de necrose pulpar, reabsorção óssea e infiltrado inflamatório com predomínio polimorfonuclear em todos os períodos de 7, 15 e 30 dias. O grupo CCA apresentou microabscessos nos períodos de 7 e 30 dias e intensa reabsorção óssea em 15 dias, e o grupo CCF, formação de microabscessos nos períodos de 15 e 30 dias.

REFERÊNCIAS

1. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology. 2010; Jan;35(1):169-91.

2. Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry. 2005; Jun;62(6):617-27.

3. Cruz APM, Fernandez JL. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotonérgicas. Métodos em psicopatologia2012. p.
.

4. Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. Endocr Rev. 2001; Aug;22(4):502-48.

5. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science. 2011; Oct 7;334(6052):105-8.

6. Courvoisier HM, M. P.; Sarrieau, A.; Hendley, E. D.; Mormede, P. Behavioral and neuroendocrine reactivity to stress in the WKHA/WKY inbred rat strains: a multifactorial and genetic analysis. Brain Res. 1996; Dec 16;743(1-2):77-85.

7. Choi YJ, Kim JY, Jin WP, Kim YT, Jahng JW, Lee JH. Disruption of oral sensory relay to brain increased anxiety- and depression-like behaviours in rats. Arch Oral Biol. 2013; Nov;58(11):1652-8.

8. Matto V, Allikmets L. Acute and chronic citalopram treatment differently modulates rat exploratory behavior in the exploration box test: no evidence for increased anxiety or changes in the [3H]raclopride binding. Pharmacology. 1999; Feb;58(2):59-69.

9. Carvalho DP, Dupuy C. Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. Eur Thyroid J. 2013; Sep;2(3):160-7.

10. Gomes RV, Moreira A, Lodo L, Nosaka K, Coutts AJ, Aoki MS. Monitoring training loads, stress, immune-endocrine responses and performance in tennis players. Biol Sport. 2013; Sep;30(3):173-80.

11. Shang L, Henderson LB, Cho MT, Petrey DS, Fong CT, Haude KM, et al. De novo missense variants in PPP2R5D are associated with intellectual disability, macrocephaly, hypotonia, and autism. Neurogenetics. 2015; Nov 17.

12. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. Lab Anim. 2010; Jan;44(1):1-6.

13. Scarparo RK, Pereira L, Moro D, Grundling G, Gomes M, Grecca FS. Morphologic variations of maxillary molars palatal root and the importance of its knowledge for endodontic practice: a case series. J Contemp Dent Pract. 2011; Mar-Apr;12(2):138-42.

14. Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marcal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. J Endod. 2014; Apr;40(4):538-42.

15. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; Oct;78(4):494-502.

16. Pratt CA, McLaughlin GW, Gaylord C. A multivariate analysis of weight-loss behavior. Psychol Rep. 1992; Dec;71(3 Pt 2):1075-84.

17. Graeff FG. Role of 5-HT in defensive behavior and anxiety. Rev Neurosci. 1993; Apr-Jun;4(2):181-211.

18. Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Dual role of 5-HT in defense and anxiety. Neurosci Biobehav Rev. 1997; Nov;21(6):791-9.

19. Crawley JN, Sutton ME, Pickar D. Animal models of self-destructive behavior and suicide. Psychiatr Clin North Am. 1985; Jun;8(2):299-310.

20. Overstreet DH, Pucilowski O, Rezvani AH, Janowsky DS. Administration of antidepressants, diazepam and psychomotor stimulants further confirms the utility of Flinders Sensitive Line rats as an animal model of depression. Psychopharmacology (Berl). 1995; Sep;121(1):27-37.

21. Barlow DH, Brown TA, Craske MG. Definitions of panic attacks and panic disorder in the DSM-IV: implications for research. J Abnorm Psychol. 1994; Aug;103(3):553-64.

22. Hofmann W ea. Impulsive versus reflective influences on health behavior: a theoretical framework and empirical review Health Psychol Rev. 2008;2(2):111-37.

23. Cruz APM, Zagrossi HJ, Graeff FG, Fernandez JL. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. Psicol Teor Pesq. 1997;13(3):269-78.

24. Treit D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. Neurosci Biobehav Rev. 1985; Summer;9(2):203-22.

25. Hall CS. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality J Comp Psychol. 1934;18:385-403.

26. Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. Psychol Bull. 1976; May;83(3):482-504.

27. Capaz FR, Vanconcellos LE, De Moraes S, Neto JP. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1981; Jun;251(2):228-36.

28. Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1984; Aug;327(1):1-5.

29. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. 1985; Aug;14(3):149-67.

30. Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. Pharmacol Ther. 2011; May;130(2):226-38.

31. Kronfol Z, Silva J, Jr., Greden J, Dembinski S, Gardner R, Carroll B. Impaired lymphocyte function in depressive illness. Life Sci. 1983; Jul 18;33(3):241-7.

32. Irwin M, Gillin JC. Impaired natural killer cell activity among depressed patients. Psychiatry Res. 1987; Feb;20(2):181-2.

33. Maes M, Scharpe S, Meltzer HY, Cosyns P. Relationships between increased haptoglobin plasma levels and activation of cell-mediated immunity in depression. Biol Psychiatry. 1993; Nov 15;34(10):690-701.

34. Anisman H, Merali Z. Understanding stress: characteristics and caveats. Alcohol Res Health. 1999;23(4):241-9.

35. Leonardi DP, Giovanini, A.F., Almeida, S., Schramm, A., Baratto-Filho, F. Alterações pulpares e periapicais RSBO. 2011;8(4):47-61.

36. Krepel CJ, Gohr CM, Edmiston CE, Jr., Farmer SG. Anaerobic pathogenesis: collagenase production by Peptostreptococcus magnus and its relationship to site of infection. J Infect Dis. 1991; May;163(5):1148-50.

37. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; Sep;94(3):281-93.

38. Leonardo MR, Silva, L.A.B. Filosofia do tratamento de canais radiculares Necropulpectomia: Conceituação. Endodontia Tratamento de canais radiculares- Princípios técnicos e Biológicos. 2005:123-66.

39. Hata K, kukita, T., Akamine, A., Kukita, A., kurisu, K., Iijima, T. A novel monoclonal antibody recognizing a unique antigen of rat osteoclasts induced by the calcified matrices Histochemistry. 1994;101(5):347-54.

40. Delaisse JM, Eeckhout Y, Neff L, Francois-Gillet C, Henriet P, Su Y, et al. (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. J Cell Sci. 1993; Dec;106 (Pt 4):1071-82.

41. Hamachi T, Anan H, Akamine A, Fujise O, Maeda K. Detection of interleukin-1 beta mRNA in rat periapical lesions. J Endod. 1995; Mar;21(3):118-21.

42. Yoshimura A, Hara Y, Kaneko T, Kato I. Secretion of IL-1 beta, TNF-alpha, IL-8 and IL-1ra by human polymorphonuclear leukocytes in response to lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria. J Periodontal Res. 1997; Apr;32(3):279-86.

43. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992; Mar;73(3):334-6.

44. Teixeira RC. Análise radiográfica e histopatológica da inflamação pulpar e reabsorção óssea periapical induzidas em ratos Wistar.: Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontologia de Bauru; 2007.

45. Paiva JGA, J. H. Endodontia: bases para a prática clínica. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas: 1991.

46. Siqueira Jr. JF. Tratamento das infecções endodônticas. 1 ed. Rio de Janeiro1997.

47. Bohne W. Light and ultrastructural studies of human chronic periapical lesions. J Oral Pathol Med. 1990; May;19(5):215-20.

48. Ferlini Filho J. Estudo radiográfico e microscópico das reabsorções radiculares na presença de periodontites apicais crônicas (microscopia óptica e eletrônica de varredura). São Paulo: Universidade de São Paulo- Faculdade de Odontoloiga de Bauru; 1999.

49. Ramachandran Nair PN, Pajarola G, Schroeder HE. Types and incidence of human periapical lesions obtained with extracted teeth. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996; Jan;81(1):93-102.

50. Pereira FA. Estudo histopatológico e radiográfico de lesões periapicais Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte. ; 1983.

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

52. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. J Endod. 1987; Nov;13(11):535-40.

53. Wang CY, Stashenko P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. J Dent Res. 1991; Oct;70(10):1362-6.

54. Stahl SS. Response of the periodontium, pulp, and salivary glands to gingival and tooth injury in young adult male rats. III. Submaxillary glands. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1960; Jul;13:870-4.

55. Erausquin J, Muruzabal M. A method for root canal treatment in the molar of the rat. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1967; Oct;24(4):540-6.

56. Torabinejad M, Bakland LK. An animal model for the study of immunopathogenesis of periapical lesions. J Endod. 1978; Sep;4(9):273-7.

57. Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. Oral Microbiol Immunol. 1995; Aug;10(4):213-9.

58. Dietz VH. Intracutaneous tests using filtrates prepared from pathologic pulps of human teeth, with special reference to rheumatoid arthritis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1952; Aug;5(8):877-83.

59. Daniel RLDP. Análises radiográfica e microscópica do processo de reparo de lesões periapicais após o emprego de medicação intracanal em dentes de ratos. . São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo, Universidade de São Paulo.; 2001.

60. Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. J Dent Res. 1989; May;68(5):830-4.

61. Tang Y, Zhou X, Gao B, Xu X, Sun J, Cheng L, et al. Modulation of Wnt/beta-catenin signaling attenuates periapical bone lesions. J Dent Res. 2014; Feb;93(2):175-82.

62. Liu L, Wang L, Wu Y, Peng B. The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions. Arch Oral Biol. 2014; May;59(5):492-9.

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

64. Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, et al. Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. Aust Endod J. 2013; Dec;39(3):164-70.

65. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. J Endod. 1992; Sep;18(9):422-6.

66. Lin SK, Hong CY, Chang HH, Chiang CP, Chen CS, Jeng JH, et al. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor-beta 1 in induced rat periapical lesions. J Endod. 2000; Jun;26(6):335-40.

67. Bergamini MR, Bernardi MM, Sufredini IB, Ciaramicoli MT, Kodama RM, Kabadayan F, et al. Dentin hypersensitivity induces anxiety and increases corticosterone serum levels in rats. Life Sci. 2014; Mar 11;98(2):96-102.

68. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behav Res Methods. 2007; May;39(2):175-91.

69. Vachon P, Faubert S, Blais D, Comtois A, Bienvenu JG. A pathophysiological study of abdominal organs following intraperitoneal injections of chloral hydrate in rats: comparison between two anaesthesia protocols. Lab Anim. 2000; Jan;34(1):84-90.

70. Pinto LdC. Estudo radiográfico e microscópico das lesões periapicais inflamatórias induzidas em ratos. Bauru, SP: Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo; 2006.

71. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004; Mar;33(3):162-9.

72. Souza MAL. A Morphometric and histological study on the development and eruption on the rat mandibular first molar tooth. Newcastle: University of Newcastle upon Tyne; 1999.

73. Jardim ECG, Manrique, G.R., Mendonça, J. C. G., Hanssessian, A., Barros, R. M. G. Uso de técnicas de análise histológica e imunohistoquímica em Odontologia. Arch Health Invest 2013;2(1).

74. Corotti MV. Avaliação imuno-histoquímica das MMPs-2 e –9 na evolução de lesões periapicais induzidas em dentes molares de ratos. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.; 2005.

75. Scarparo RK, Neuvald, L. R. . Avaliação dos métodos radiográfico e eletrônico para determinação do comprimento real de trabalho em endodontia – estudo in vivo. RFO UPF. 2006;11(2):50-5.

76. Guneri P, Akdeniz BG. Fraudulent management of digital endodontic images. Int Endod J. 2004; Mar;37(3):214-20.

77. Friberg B, Grondahl K, Lekholm U. A new self-tapping Branemark implant: clinical and radiographic evaluation. Int J Oral Maxillofac Implants. 1992; Spring;7(1):80-5.

78. Sanderink GC. Imaging: new versus traditional technological aids. Int Dent J. 1993; Aug;43(4):335-42.

79. Vandre RH, Webber RL. Future trends in dental radiology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995; Oct;80(4):471-8.

80. Ferreira T, Rasband W. Image J User Guide 2012 [cited 2015 11/11/2015];

81. Nielsen KS. Fisiologia Animal - Adaptação e Meio Ambiente. 5ª ed. São Paulo: Livraria Santos Editora: 1996.

ANEXO A- PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL



UEPG
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 016/2014

Protocolo UEPG – 7818/2014

Título – "Projeto de pesquisa Avaliação do nível de ansiedade em ratos com lesão periapical aguda e crônica". **Interessada** – *Profa. Dra. Márcia Thais Pochapski*

Data de Entrada – 14/05/2014

Resultado: Aprovado

Data/Prazo – 14/05/2014 a 14/05/2016

Considerações

Prezado Professor,

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela sua aprovação, por dois anos, do uso de 81 (oitenta e um) ratos.
- APROVADO.
Atenciosamente,

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Divisão de Pesquisa
Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Profa. Dra. Maria Marta Loddi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264