



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**EFEITO DA CORTICOTERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA NO
DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE APICAL EM RATOS**

FORTALEZA

2017

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**EFEITO DA CORTICOTERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA NO
DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE APICAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N195e Nascimento, Isabelly Vidal do.
Efeito da corticoterapia sistêmica crônica no desenvolvimento da periodontite apical em ratos / Isabelly Vidal do Nascimento. – 2017.
63 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota.

1. Periodontite Periapical. 2. Reabsorção Óssea. 3. Glicocorticoides. 4. Imunossupressão. I. Título.

CDD 617.6

ISABELLY VIDAL DO NASCIMENTO

**EFEITO DA CORTICOTERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA NO
DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE APICAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Odontologia.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. George Táccio de Miranda Candeiro

Centro Universitário UniChristus (UniChristus)

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Gerda Vidal de Lima (*in memoriam*), com todo o meu eterno amor e gratidão por tudo que fizestes por mim.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, que também teve que ser pai em tantas ocasiões, **Maria Gerda Vidal de Lima** (*in memorian*), por tudo que fizeste por mim, seu incentivo incansável em minha educação, seu amor incondicional, sua garra, superação e força demonstrada durante toda vida, em meio à tantas adversidades. Serás sempre meu melhor e maior exemplo de vida, de mulher, de mãe, de filha, tia, irmã, sobrinha, professora, profissional e amiga. O tempo e as palavras nunca serão suficientes para descreverem a mulher que você foi e tudo que fizestes por mim e meus irmãos. Muito obrigada por tudo, se hoje, eu estou aqui, foi porque você sempre esteve ao meu lado.

À minha família, meu pai, Assis, meus irmãos, Nikollas e, em especial, minha irmã **Emanuelly**, que foi sempre foi um dos meus maiores exemplos de superação educacional e profissional, aos meus sobrinhos, **Matheus e Davi**, por encherem meus dias com tanto amor e alegria, obrigado por serem, agora, minhas maiores fontes de força para vencer e seguir em frente.

Aos meus avôs, **Luiz** (*in memorian*), **Rosalba** (*in memorian*), **Gerardo** (*in memorian*) e **Alzira**, pelos exemplos de vida e amor concedido.

Aos meus tios, em especial, meu **tio Pádua, Tio Jorge, Tia Meire e Tia/madrinha Neide**, pelo o auxílio e o cuidado prestado à minha mãe, à mim e meus irmão em momentos difíceis ao longo de tantos anos.

Aos meus primos por todo o apoio, torcida e momentos partilhados.

Ao meu namorado, **Ciro Guimarães**, pela a paciência extraordinária, suporte, dedicação, carinho e companheirismo. Obrigada por acreditar em mim sempre.

Às minha amigas do coração, **Érica Nobre** e **Jacqueline Santiago**, pelas as conversas, conselhos, momentos de descontração e angustias partilhados. Obrigada por saber que posso contar com vocês quando mais preciso.

À **Faculdade de Odontologia** e ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia** da **Universidade Federal do Ceará**, seu corpo docente e coordenação pelos ensinamentos e assistência prestada.

Ao meu maravilhoso orientador, **Mário Rogério Lima Mota**, muito obrigada por tudo que tens feito, pelos inúmeros ensinamentos, pelo suporte, dedicação, disponibilidade,

carinho e acima de tudo, pela amizade. Não existem palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer com toda justiça e o devido merecimento.

Ao meu tão querido professor **Fabricio Bitu**, por tudo que fez e tens feito por mim, desde a minha graduação, lá do meu 4º semestre até o último, como também durante todo o mestrado, pelas as oportunidades, ensinamentos, confiança e carinho concedidos.

À professora **Ana Paula Negreiros**, pelos ensinamentos e exemplos demonstrados durante esses dois anos.

À professora **Karusa Alves**, pelas palavras de apoio e de carinho sempre, tão gentilmente, oferecidas.

Ao professor **George Candeiro**, pela a confiança, o suporte e incentivo constante, tanto durante minha graduação, quanto na especialização.

Ao professor **Eduardo Studart**, pelos os conselhos, ensinamentos clínicos e científicos durante esse período na clínica de Estomatologia.

À professora **Renata Cordeiro**, por toda disponibilidade, conhecimento e ajuda em algumas etapas deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Bucodental, **Clarissa, Artur, Luan, Malena, Mariana, Breno, Ealber, Thales, Filipe, Ronildo e Steffane**, em especial, **Thinali, Karine, Thâmara e Carol**, pela amizade, companheirismo e troca de experiências. Sou imensamente privilegiada por ter a oportunidade de aprender com vocês.

Aos meus amigos de laboratório e pesquisa animal, **Camila, Ernando** e, principalmente, **Paulo Goberlânio**, por toda ajuda e paciência. Contem comigo sempre.

Aos bolsistas de iniciação científica, **Lirya, Lucas, Imaculada, Mariana e**, em especial, **Elisa**. Sem o esforço e dedicação de vocês, esse trabalho não seria possível. Sou grata por todos os momentos de trabalho, desespero, agonia, como também, descontração e satisfação. Muito obrigada.

Ao técnico de laboratório **Alceu Machado** pela grande contribuição e ensinamentos nas etapas laboratoriais.

À minha querida **Soninha**, pela sua alegria constante, seu coração enorme, além da disposição e dedicação em tudo que você faz. Sua presença é sempre contagiante, deixa nosso ambiente cheio de felicidade e leveza.

Aos integrantes do **Núcleo de Estudos em Pacientes Especiais (NEPE)**, **Liga de Oncologia**, **Liga de Infectologia**, bem como os monitores e alunos das disciplinas de **Patologia Bucal e Estomatologia Clínica** pelo convívio e aprendizado.

Ao curso de Odontologia, professores, funcionários e alunos do **Centro Universitário Unichristus**, pelo suporte e ajuda oferecida na realização deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

A periodontite apical é uma das doenças orais de maior prevalência em todo o mundo. A patogênese da doença é bastante complexa, envolve diversos fatores relacionados à resposta imunológica, como recrutamento de células de defesa, liberação de mediadores inflamatórios e a reabsorção óssea periapical. O uso de corticoterapia crônica sistêmica pode estar diretamente relacionado com uma modificação na biologia do desenvolvimento da periodontite apical, podendo influenciar o seu prognóstico e tratamento. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta inflamatória e o desenvolvimento da periodontite apical em ratos tratados cronicamente com glicocorticoides. Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos divididos aleatoriamente em dois grupos: um grupo tratado com prednisona (5 mg/kg/dia) e um grupo controle que foi administrado solução salina, durante 30 dias antes da indução da periodontite apical continuando até o dia de eutanásia (0, 7, 14 e 28 dias) após a indução da lesão. As mandíbulas foram submetidas à avaliação radiográfica (tamanho da lesão) e posteriormente, foram realizadas análises histológica (tipo e intensidade da inflamação), histomorfométrica (contagem de osteoclastos, polimorfonucleares, mononucleares), histoquímica (avaliação do percentual de fibras colágenas) e imunohistoquímica (Interleucina 1 β). Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0®, considerando um nível de significância de 95%. Houve um aumento significativo no tamanho da lesão apical ao 14º dia dos animais tratados com prednisona ($p < 0,001$). Nesse mesmo dia, o grupo prednisona apresentou um perfil inflamatório do tipo agudo, significativamente diferente do apresentado pelo grupo salina ($p = 0,007$) e a intensidade do infiltrado inflamatório do grupo prednisona foi maior que do grupo salina ($p = 0,007$). A contagem de células polimorfonucleares ($p = 0,006$), osteoclastos ($p = 0,001$) e imunomarcadas para IL-1 β ($p = 0,044$) mostrou-se aumentada nos animais tratados com prednisona do 14º dia. O grupo prednisona também apresentou uma diminuição na deposição de colágeno tipo I ($p = 0,040$) e o aumento de colágeno tipo III ($p = 0,039$) no 28º dia. Conclui-se que os glicocorticoides modificaram o desenvolvimento da periodontite apical experimental induzida em ratos, causando aumento precoce da reabsorção óssea periapical e da necrose pulpar. Esses fármacos também levaram a uma exacerbação do processo inflamatório agudo, bem como com um aumento nos níveis de IL-1 β e dos osteoclastos, além de uma alteração no perfil de colágeno dos tecidos conjuntivos apicais.

Palavras-chaves: Periodontite Periapical, Reabsorção Óssea, Glicocorticoides, Imunossupressão.

ABSTRACT

The apical periodontitis is one of the most prevalent oral diseases in the world. The pathogenesis of the disease is very complex, involving many factors related to the immune response, such as immune cells recruitment, release of inflammatory mediators and the periapical bone resorption. The use of chronic systemic corticosteroids may be directly related to a change in the developmental biology of apical periodontitis, which may influence its prognosis and treatment. Therefore, the objective of this study was to evaluate the inflammatory response and the development of apical periodontitis in rats chronically treated with glucocorticoids. Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were randomly divided into two groups: a prednisone (5 mg / kg / day) treated group and a control group that was given saline solution for 30 days prior to the induction of apical periodontitis, continuing until euthanasia (0, 7, 14 or 28 days after induction of the lesion). The jaws were submitted to radiographic evaluation (lesion size), and posterior histological (type and intensity of inflammation), histomorphometric (osteoclast counts, polymorphonuclear, mononuclear counts), histochemistry (evaluation of the percentage of collagen fibers) and immunohistochemistry (Interleukin 1 β) analyses were performed. All analyzes were performed using GraphPad Prism 5.0® software, at a significance level of 95%. There was a significant increase in apical lesion size at day 14 of prednisone-treated animals ($p < 0.001$). Also on day 14, the prednisone group had an acute inflammatory profile ($p = 0.007$), significantly different from that presented on the saline group, and the intensity of the inflammatory infiltrate of the prednisone group was higher than that of the saline group ($p = 0.007$). Polymorphonuclear cells ($p = 0.006$), osteoclast ($p = 0.001$) and IL-1 β -immunolabelled cells counts ($p = 0.044$) were higher in animals treated with prednisone on the 14th day. The prednisone group also had a decrease in type I collagen ($p = 0.040$) deposition and an increase in type III collagen ($p = 0.039$) on the 28th day. Therefore, the glucocorticoids may alter the development of experimental apical periodontitis induced in rats, causing an early increase in periapical bone resorption and pulpal necrosis. These drugs may also lead to an exacerbation of the acute inflammatory process, as well as an increase in IL-1 β and osteoclast levels, as well as a change in the collagen profile of apical connective tissues.

Keywords: Periapical Periodontitis, Bone Resorption, Glucocorticoids, Immunosuppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Acesso da Camara pulpar dos primeiros molares inferiores do lado direito. Primeiro molar inferior direito (A), acesso com broda carbide ¼ em alta rotação e sem refrigeração (B), primeiro molar acessado (C) e confirmação do acesso com lima endodôntica de série especial nº 6 (D) 24
- Figura 2.** Posicionamento das heminandíbulas dissecadas e fita matriz de 5mm sob a placa digital (A). Imagem radiográfica obtida a partir do sistema digital de captura Digora® (B).. 25
- Figura 3.** Comando color Threshold, Software ImageJ®..... 29
- Figura 4.** Aspectos radiográficos das áreas da lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28 33
- Figura 5.** Aspectos histológicos quanto à presença/ausência de necrose pulpar radicular, reabsorção óssea apical e micro-abcesso das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina 25x..... 35
- Figura 6.** Aspectos histológicos quanto ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina. 400x..... 38
- Figura 7.** Contagem de polimorfonucleares neutrófilos (A), células mononucleares (B) e osteoclastos (C) em animais cronicamente tratados com prednisona ou salina e submetidos ao modelo experimental de lesão apical..... 41
- Figura 8.** Aspectos histológicos quanto à contagem de osteoclastos nas áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina. 400x 42
- Figura 9.** Fotomicrografias das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E, G, I, K, M e O) ou prednisona (B, D, F, H, J, L, N e P), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Picrossírius Red sem (imagens acima) e após polarização de luz (a baixo). 200x 45
- Figura 10.** Imunomarcagem de IL-1β das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A, C, E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. 400x 47

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Área radiolúcida apical de animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical32
- Gráfico 2.** Análise de colágeno em tecido conjuntivo nos animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de lesão apical.....43
- Gráfico 3.** Fenotipagem por luz polarizada do perfil de colágeno vermelho-amarelado em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos a modelo experimental de lesão apical.....44
- Gráfico 4.** Fenotipagem por luz polarizada do perfil de colágeno verde-esbranquiçado em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos a modelo experimental de lesão apical.....44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição da quantidade total de animais utilizados por grupos.....23
- Tabela 2.** Análise de dados dicotômicos quanto à presença/ausência de necrose pulpar e radicular, reabsorção óssea apical e micro-abcesso em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.....36
- Tabela 3.** Análise qualitativa quanto ao perfil inflamatório, intensidade do infiltrado e imunomarcção para Interleucina-1 β em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Proteína ativadora
APC	Células apresentadoras de antígenos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAB	Diamino benzidina
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GC	Glicocorticoides
G-CFS	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
IL	Interleucina
Kvp	Quilovoltagem
mA	Miliamperagem
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MIP	Proteínas inflamatórias de macrófagos
MMP	Metaloproteinases de matriz
MN	Mononucleares
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killer
OPG	Osteoprotegerina
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PMN	Polimorfonucleares
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kapa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF-α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Periodontite apical	14
1.2 Corticoterapia.....	19
2. PROPOSIÇÃO	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais, grupos e doses	23
3.2 Cálculo amostral	23
3.3 Protocolo experimental	24
3.4 Análise radiográfica	25
3.5 Confecção de lâminas e análise histológica.....	26
3.6 Análise histomorfométrica.....	27
3.7 Análise histoquímica de fibras colágenas	28
3.8 Processamento e avaliação imunohistoquímica.....	30
3.9 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Análise radiográfica digital da área periapical	32
4.2 Análise histológica.....	33
4.3 Análise histomorfométrica.....	40
4.4 Análise histoquímica para fibras colágenas	43
4.5 Análise imunohistoquímica para IL-1	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 Periodontite apical

A periodontite apical é uma das doenças orais de origem inflamatória mais comumente diagnosticada em seres humanos (XIONG et al., 2010). A doença se caracteriza por uma resposta do hospedeiro a agentes nocivos como traumas, procedimentos iatrogênicos e, principalmente, pelas bactérias patogênicas oriundas do processo da cárie (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; LIU et al., 2014). As bactérias agem, inicialmente, colonizando os canais radiculares, levando a uma destruição dos tecidos pulpare e posteriormente no desenvolvimento de uma lesão nos tecidos perradiculares, geralmente na forma de granulomas ou cistos (STASHENKO et al., 1994; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; LIU et al., 2014).

A patogênese da doença é bastante complexa, envolve diversos fatores relacionados à resposta imunológica (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). As principais vias de contaminação pulpar são através dos túbulos dentinários, por exposição pulpar direta, ou através dos forames laterais e apical (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; TAKAHASHI, 1998). A patogenicidade das bactérias pode ser de forma direta, a partir da liberação de produtos nocivos, como enzimas, exotoxinas e produtos metabólicos, ou de forma indireta, a partir da liberação de subprodutos bacterianos como endotoxinas, e componentes estruturais, assim como o ácido lipoteicóico, lipopolissacarídeos, flagelos e proteínas de membrana (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; TAKAHASHI, 1998; LIU et al., 2014).

A resposta imunológica ocorre a partir da contaminação direta da polpa dentária, onde se inicia o processo de defesa, a partir de células dendríticas semelhantes a macrófagos, presente na camada de odontoblastos, que vão atuar como células apresentadoras de antígenos (APC). Em seguida, ocorre o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos para a câmara pulpar (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Geralmente, esse mecanismo é incapaz de debelar a infecção fazendo com que a contaminação atinja os tecidos perradiculares (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

Após a liberação de toxinas e mediadores inflamatórios pulpare na região apical, é então iniciado um segundo processo de defesa do hospedeiro no local, esta, geralmente,

encontra-se limitada ao ligamento periodontal e ao tecido ósseo esponjoso circunvizinho, evoluindo para o osso adjacente com a progressão da doença (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Essa resposta se assemelha bastante com a ocorrida anteriormente, ou seja, se caracteriza pela produção e liberação de anticorpos, mediadores inflamatórios, por exemplo as citocinas, quimiocinas e metabólitos do ácido araquidônico, neuropeptídios, como também pelo recrutamento e ativação de células de defesa, como leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos, linfócitos, mastócitos, células natural killers (NK) e células gigantes (XIONG et al., 2010; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008; TAKAHASHI, 1998; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012).

Os leucócitos PMN e os macrófagos estão envolvidos no processo da imunidade inata, são considerados a primeira linha de defesa, fagocitam as bactérias opsonizadas e células mortas e também são recrutados, inicialmente, a partir da ativação do sistema complemento e seus subprodutos (TAKAHASHI, 1998; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

Os PMN são células de vida curta e sua morte massiva é responsável pelo desarranjo do tecido na fase aguda da doença (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). As citocinas, interleucina 8 (IL-8), interleucina 1 (IL-1), interleucina6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CFS) e o fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CFS) também são responsáveis pela quimiotaxia e ativação de leucócitos PMN. Dentre eles, o mais envolvido no processo inflamatório inicial/agudo é o neutrófilo, por sua vez os leucócitos PMN produzem uma gama de citocinas como a IL-1, fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-6, IL-8, proteínas inflamatórias de macrófagos (MIP-1) que vão atuar como quimioatratores recrutando mais neutrófilos e também outras células inflamatórias, como os macrófagos (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

A infiltração de macrófagos é lenta quando comparado aos PMN, mas esta célula apresenta uma boa atividade fagocítica, podendo atuar como APC nas etapas iniciais da imunidade adquirida (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). Dentre os principais agentes quimioatratores e ativadores de macrófagos estão MCP-1 (CCL2), MCP-3, INF- γ , TNF- α e o LPS, por sua vez, quando ativados, os mesmos produzem uma gama de citocinas tal como a IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, metabólitos do ácido araquidônico, metaloproteínases e GM-CSF (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

Os linfócitos T e B fazem parte da imunidade específica e são predominantes em lesões periapicais. O linfócito B quando ativado, a partir de antígenos ou corpo estranho, se

diferencia em plasmócito para produção de anticorpos (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). Os linfócitos T se apresentam de vários tipos, os T auxiliares que são subdivididos em T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), além dos linfócitos T supressores, T citotóxicos, que estão envolvidos com a cronicidade da inflamação (TAKAHASHI, 1998; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

As células Th1 têm sua ação sobre-regulada pela liberação de IL-12 e atuam produzindo IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, que por sua vez, vão aumentar a liberação de IL-1, induzindo uma exacerbação da atividade osteoclástica (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Já as células Th2 tem sua ação aumentada pela liberação de IL-10 e atuam induzindo a proliferação e diferenciação de células B, como também na liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10 e IL-13, que por sua vez inibem a liberação de IL-1, modulando a atividade osteoclástica (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; OLIVEIRA et al., 2011).

As citocinas pró-inflamatórias estimulam a reabsorção óssea a partir da proliferação, diferenciação e ativação de osteoclastos, o que leva ao desenvolvimento da lesão periapical, como exemplos temos a IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e IL-17 (XIONG et al., 2010; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2008).

A IL-6 e IL-8 são citocinas características da fase aguda da doença, ambas estimulam a quimiotaxia de neutrófilos e induzem a reabsorção óssea, a IL-6 também estimula a diferenciação de linfócitos B e a ativação de linfócitos T, como também modula as respostas contrárias aos efeitos da IL-1, desempenhando papéis pró e anti-inflamatórios (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

O TNF- α é produzido por diferentes tipos de células, como macrófagos e linfócitos Th1 e age ativando macrófagos, linfócito T e B, células NK e estimulando a reabsorção óssea (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

A interleucina 1 tem sido classificada como um mediador central no processo de inflamação periapical e apresenta duas isoformas, a IL-1 α e IL-1 β , sendo a IL-1 β a mais presente em lesões apicais em humanos e a IL-1 α em roedores (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Sua liberação ocorre a partir de macrófagos, PMN, osteoclastos e células epiteliais de cistos, sua indução é regulada através de outros mediadores como interferon gama (IFN- γ), interleucina 12 (IL-12) e TNF- α , porém a mesma é inibida pela liberação de interleucina 4 (IL-4), IL-6, interleucina 10 (IL-10) e interleucina 13 (IL-13) (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). Além de induzir a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos através da expressão da molécula de adesão celular (CAM-1), a IL-1 é um potente indutor da reabsorção óssea e induz a liberação de PGE2

e metaloproteinases de matriz (STASHENKO, et al. 1994; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; MEYER-HOFFERT, 2011).

À medida que a inflamação pulpar progride, o osso circunvizinho acaba sendo atingido, o que leva a sua destruição e à formação da lesão apical (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). A destruição do ligamento periodontal e do tecido ósseo circunvizinho ocorre a partir da liberação de enzimas de degradação de matriz extracelular e proliferação dos osteoclastos, estes por sua vez são induzidos diretamente pela produção de IL-1 e TNF- α (TEIXEIRA, 2007). As enzimas de degradação podem ser tanto metaloproteinases de matriz (MMP), como as colagenases e gelatinases, e as proteases de serina, como por exemplo elastase e catepsina G (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014).

Sob condições fisiológicas, a integridade do tecido ósseo está diretamente relacionada com o equilíbrio de funções dos osteoblastos e osteoclastos (SILVA et al., 2007; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). Os osteoclastos são células de origem hematopoiética da linha monócito-macrófago conduzidos por quimiocinas até o ambiente da lesão (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA et al., 2007). As quimiocinas capazes de atrair e diferenciar os osteoclastos são CCL-2, CCL-3, CCL-5, CCL-9, CXCL-1, CXCL-12, dentre outras (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014). No entanto, a ativação dos osteoclastos ocorre através da ligação do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANK) com o ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANKL) (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA et al., 2007).

O processo de reabsorção óssea está diretamente ligado a diferenciação, atração e ativação de osteoclastos a partir do desequilíbrio no balanço de osteoprotegerina (OPG), RANK e RANKL. Essas citocinas são classificadas como membros da família do fator de necrose tumoral (TNF). (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

A identificação do sistema RANK-L/RANK/OPG como o principal efetor da osteoclastogênese representa um dos maiores avanços no estudo da biologia do tecido ósseo (KHOSLA, 2001). Os estudos deste sistema de transdução de sinais têm liderado os avanços para uma maior compreensão sobre como a remodelação óssea é regulada (BOYCE et al., 2008)

O RANKL é uma citocina essencial para a indução da osteoclastogênese, encontrada na superfície membranar ou pode ser secretada por osteoblastos, fibroblastos e linfócitos (BOYCE et al., 2008; GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA

et al., 2007; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001). Além dessa função, o RANKL também age induzindo a formação e liberação de quimiocinas (CCL-2, CCL-3, CCL-5 e CXCL-9) que amplificam a atração e diferenciação de osteoclastos, exacerbando a reabsorção óssea (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA et al., 2007).

O RANK é o receptor que traduz as ações do RANKL, apresenta-se como uma proteína de superfície celular presente nas células precursoras de osteoclastos e quando ativado causa a maturação dos osteoclastos através do aumento da transcrição de genes específicos (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; SILVA et al., 2007; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001). A sua cascata de sinalização é complexa e não totalmente compreendida, sua função e interação com outras citocinas ainda não foram completamente definidas (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

A osteoprotegerina é um receptor transmembranar antagonístico natural da reabsorção óssea, também conhecida como fator inibidor da osteoclastogênese, a partir da sua ligação ao RANKL, impedindo a ligação do sistema RANK/RANKL (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KONDO et al., 2008). É produzida primariamente pelos osteoblastos e seus precursores, mas também pelas células B, células dendríticas e macrófagos. (SODEK et al., 2000). Sua principal função é inibir a diferenciação e reduzir a sobrevivência dos osteoclastos (HOFBAUER; HEUFELDER, 2001; KONDO et al., 2008).

A produção e liberação de RANKL e OPG são controladas por estímulos sistêmicos e locais, como hormônios esteroides, beta-estradiol, mediadores inflamatórios e produtos bacterianos (BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001). A IL-1, o TNF- α e as prostaglandinas são os mediadores mais potentes na indução de RANKL (GRAUNAITE; LODIENE; MACIULSKIENE, 2014; BELIBASAKIS; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012; HOFBAUER; HEUFELDER, 2001).

A periodontite apical, por ser uma doença infecto-inflamatória, pode estar sujeita a modificações no seu desenvolvimento, como por exemplo, em pacientes portadores de alterações sistêmicas de caráter inflamatório e/ou imunológico, os quais necessitam de tratamento imunossupressor, na maioria das vezes, com a indicação do uso de corticoterapia sistêmica por longos períodos de tempo.

1.2 Corticoterapia

Os glicocorticoides (GC) são medicamentos pertencentes à classe dos hormônios esteroides, são análogos sintéticos do cortisol endógeno, amplamente utilizados por diversas especialidades médicas (DAMIANI; SETIAN; DICHTCHEKENIAN, 1984). Esses medicamentos representam uma das classes de drogas anti-inflamatórias mais comumente utilizada e com crescente aumento nos últimos anos, porém, sua utilização é restringida pela sua grande capacidade de causar efeitos adversos (GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014).

Os GC são responsáveis pela síntese de macromoléculas, portanto, seus efeitos podem levar de algumas horas ou até dias para que se façam presentes. Por outro lado, a duração das suas ações pode prolongar-se por algum período de tempo mesmo após a queda de seus níveis (PEREIRA et al., 2007; JACOBS; BIJLSMA, 2014).

Os glicocorticoides causam alteração na transcrição de genes vinculados à inflamação e à imunidade. A resposta anti-inflamatória ocorre por ação local, tanto na fase inicial quanto na fase tardia do processo inflamatório (DAMIANI et al., 2001). Os GC podem suprimir a inflamação, principalmente, pela inibição de fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear kB (NFkB) que conduzem a uma regulação negativa na síntese de proteínas pró-inflamatórias (PEREIRA et al., 2007; GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014). Além de apresentarem um efeito inibitório na fosfolipase A, o que leva à inibição da produção de mediadores lipídicos, tais como leucotrienos, prostaglandinas e fator ativador de plaquetas (DAMIANI et al., 2001, PEREIRA et al., 2007).

Os GC também inibem a transcrição de várias citocinas que são relevantes na resposta inflamatória, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-11, TNF- α e quimiocinas, além de bloquear a liberação de várias delas, como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 e GSM-CSF, que são importantes no recrutamento e sobrevivência de células envolvidas no processo inflamatório (DAMIANI et al., 2001; PEREIRA et al., 2007).

Os efeitos imunológicos dos GC promovem uma leucocitose, a partir do aumento da sobrevivência e proliferação de neutrófilos, ao mesmo tempo que estimulam a apoptose de eosinófilos e basófilos (COUTINHO; CHAPMAN, 2011; HARRIS et al., 2015). Ocorre também a diminuição do aporte de leucócitos aos sítios inflamados, uma inibição da resposta proliferativa de monócitos e sua diferenciação em macrófagos. Esses fármacos causam uma linfopenia, atingindo principalmente os linfócitos T (CD4), a partir da inibição das respostas

Th1 e Th2, o que pode levar a uma imunodeficiência grave, a qual favorece a instalação de infecções oportunistas, como também, estimulando o processo de reagudização de inflamações crônicas devido à inibição da resposta imune específica. (DAMIANI; SETIAN; DICHTCHEKENIAN, 1984; DAMIANI et al., 2001; PEREIRA et al., 2007; FRANCHIMONT, 2004).

Os efeitos adversos do uso de GC são bastante frequentes, isso decorre devido às numerosas ações metabólicas que essas drogas produzem e estão diretamente relacionadas à duração do tratamento e à dose utilizada (DAMIANI et al., 2001; PEREIRA et al., 2007). Dentre os efeitos adversos comuns à terapia crônica dos GC, podemos citar a osteonecrose, o aumento da susceptibilidade a infecções e a osteopenia e osteoporose, a partir do aumento da atividade reabsortiva e diminuição da formação óssea (DAMIANI et al., 2001; CANALIS; DELANY, 2002; PEREIRA et al., 2007; GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014).

Os mecanismos pelos quais os GC levam ao aumento da reabsorção óssea não são completamente compreendidos, porém sabe-se que esta pode ser causada, principalmente, pela diminuição do número e da atividade dos osteoblastos e, secundariamente, pelo aumento da função dos osteoclastos, além disso os GC levam a uma diminuição da absorção intestinal do cálcio e ao aumento de sua excreção urinária (DAMIANI et al., 2001; CANALIS; DELANY, 2002; PEREIRA et al., 2007; KONDO et al., 2008; KANEKO et al., 2012; GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014). Outro mecanismo também envolvido nesse processo ocorre a partir do sistema RANKL/OPG, o qual os GC levam ao aumento da expressão de RANKL, do fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) e, concomitantemente, à inibição da síntese de OPG (CANALIS; DELANY, 2002; KONDO et al., 2008; KANEKO et al., 2012).

Outros efeitos comuns do uso de GC de forma crônica são a inibição da proliferação de fibroblastos, de capilares sanguíneos e da produção e deposição de colágeno, principalmente colágeno do tipo I, um dos principais componentes da matriz óssea extracelular (NOBUHARA et al., 1993; CANALIS; DELANY, 2002).

Devido aos efeitos inibidores do sistema imunológico, da resposta inflamatória e da indução da reabsorção óssea, os GC agem como modificadores da resposta biológica, o que pode afetar a extensão e a gravidade das respostas inflamatórias (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Portanto, seu uso crônico sistêmico pode estar diretamente relacionado com uma modificação na biologia do desenvolvimento de uma periodontite apical, podendo influenciar o prognóstico e tratamento dessa lesão.

Atualmente, não há na literatura estudos clínicos ou experimentais sobre o possível impacto do uso crônico dos GC no desenvolvimento da periodontite apical. **Os estudos atuais,**

envolvendo os GC e a periodontite apical, baseiam-se no uso destes medicamentos a curto prazo, seja de forma sistêmica, como anti-inflamatório, ou de uso local, em medicações intracanal para o controle da inflamação nesses pacientes.

Sabe-se que os GC apresentam um efeito dual na resposta inflamatória, mostrando-se efetivos no tratamento adjuvante a curto prazo da periodontite apical, entretanto, em pacientes que fazem usos crônicos dessa droga, podem talvez exibir um efeito oposto, o que pode levar ao desenvolvimento mais agressivo desta enfermidade. Portanto, faz-se necessária a realização de estudos para avaliar o impacto direto do uso crônico sistêmico dessa droga no desenvolvimento da periodontite apical.

2. PROPOSIÇÃO

2.1 Objetivo geral

Avaliar influência da resposta inflamatória e o desenvolvimento da periodontite apical em ratos tratados e não tratados cronicamente com glicocorticoides.

2.2 Objetivos específicos

- Observar e comparar o desenvolvimento da periodontite apical, através de exames imaginológicos e histológicos.
- Analisar histologicamente o tipo e intensidade do processo inflamatório.
- Investigar por histomorfometria os sítios de periodontite apical em relação ao número de osteoclastos, contagem de polimorfonucleares e mononucleares e mensuração da deposição de colágeno.
- Analisar a imuno-expressão de IL-1 β nos sítios com periodontite apical.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais, grupos e doses

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará sob o protocolo de número 38/2016.

Foram utilizados 80 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com peso médio inicial entre 150 - 180g. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*, em ciclo claro-escuro de 12 h, temperatura de 20-25°C. Os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos: um grupo no qual foi administrado prednisona 5mg/kg/dia via oral, esta dose é equivalente a doses moderadas comumente utilizadas na clínica médica e no grupo controle foi administrado 0,1 ml de solução salina (NaCl 0,9%) via oral (RAMOS-REMUS *et al*, 2002). Em ambos os grupos, a medicação foi realizada durante 30 dias antes da indução da periodontite apical continuando até o dia da eutanásia. Os grupos foram subdivididos em 4 subgrupos de 8 animais cada, de acordo com os dias de eutanásia (0, 7, 14 e 28 dias), após a indução da lesão (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição da quantidade total de animais utilizados por grupos.

	GRUPO PREDNISONA	GRUPO SALINA
DIA 0	8 ANIMAIS	8 ANIMAIS
DIA 7	8 ANIMAIS	8 ANIMAIS
DIA 14	8 ANIMAIS	8 ANIMAIS
DIA 28	8 ANIMAIS	8 ANIMAIS
TOTAL	64 ANIMAIS	

3.2 Cálculo amostral

Baseado no trabalho de CINTRA *et al.* (2014) que observou que animais com lesão apical com uma média de área $86.69 \pm 9.57 \mu\text{m}^2$ (média \pm desvio-padrão) diferem significativamente de animais com comprometimento imunológico (diabetes mellitus), os quais apresentaram lesões com uma média de área de $109.99 \pm 17.08 \mu\text{m}^2$ (média \pm desvio-padrão), portanto estimou-se necessário avaliar um total de 8 animais por grupo de estudo a fim de obter uma amostra que represente com 95% de confiança e 90% de poder uma diferença nos tamanhos das lesões periapicais entre os dois grupos.

3.3 Protocolo experimental

A indução da periodontite apical foi realizada de acordo com um método descrito por WANG e STASHENKO, 1991. Após a anestesia que foi realizada com quetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal, as polpas dos primeiros molares inferiores direitos foram expostas com uma broca do tipo carbide de ¼ de diâmetro (JET®, Ontario, Canadá) em alta rotação sem refrigeração, a broca foi ativada até que todo seu diâmetro penetrasse na câmara pulpar (Figura 1, A, B e C). Em seguida, a câmara pulpar foi explorada por uma lima endodôntica do tipo kerr série especial número 06 (Dentsply-Maillefer®, Ballaigues, Suíça) (Figura 1D). Posteriormente, os dentes foram deixados expostos ao meio bucal durante todo o experimento e o molar inferior esquerdo foi utilizado como controle (TEIXEIRA, 2007; LIU et al., 2014).

Todos os procedimentos foram realizados por um único operador previamente treinado que desconhecia os grupos experimentais.

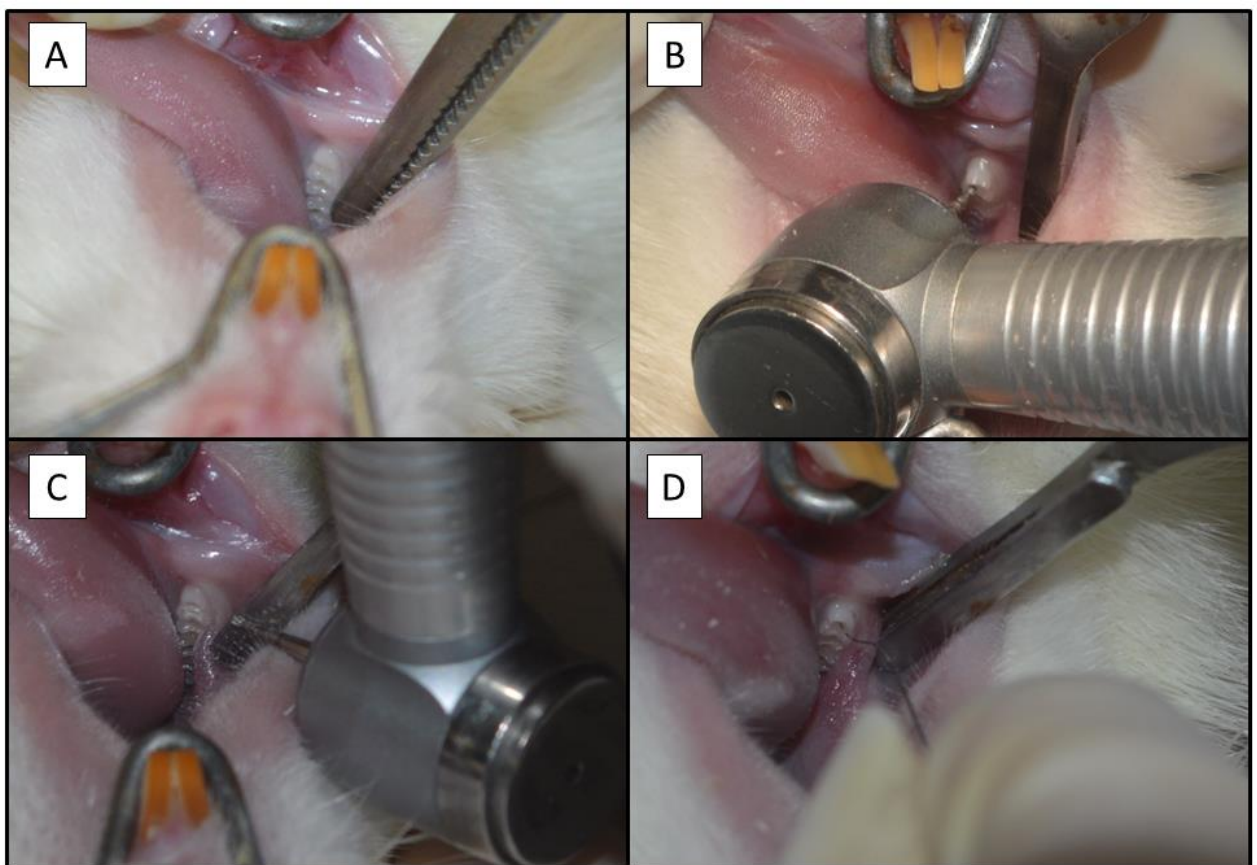


Figura 1. Acesso da câmara pulpar dos primeiros molares inferiores do lado direito. Primeiro molar inferior direito (A), acesso com broca carbide ¼ em alta rotação e sem refrigeração (B), primeiro molar acessado (C) e confirmação do acesso com lima endodôntica de série especial n° 6 (D).

Após eutanásia dos subgrupos por barbitúricos (Pentobarbital sódico, 150mg/kg, via intravenosa) nos dias estipulados (0, 7, 14 e 28), as hemimandíbulas foram removidas cirurgicamente e armazenadas em formol neutro a 10% durante 48 horas para análise radiográfica e confecção de lâminas histológicas.

3.4 Análise radiográfica

As hemimandíbulas de todos os grupos foram radiografadas em aparelho de raio-X convencional (DabiAtlante®; 63 70Kvp, 8mA) acoplado ao sistema de captura digital de imagem Digora®. A técnica radiográfica empregada foi a do paralelismo (cone longo) utilizando-se posicionador. As hemimandíbulas foram posicionadas paralelamente ao filme radiográfico e a distância foco-filme utilizada foi de 20cm. O tempo de exposição foi estabelecido em 0.25 segundos fixando-se a função para radiografia digital periapical de bateria dentária anterior superior.

As hemimandíbulas direita (lado teste) e esquerda (lado controle) do mesmo animal foram posicionadas na mesma placa de captura digital, o lado direito na porção superior e o lado esquerdo na porção inferior, de modo que a face lingual das peças ficasse em contato com a superfície ativa da placa (Figura 2A). Uma fita matriz de 5mm foi posicionada na porção inferior, abaixo da hemimandíbula esquerda para conversão dos valores de pixels em mm² (Figura 2, A e B).

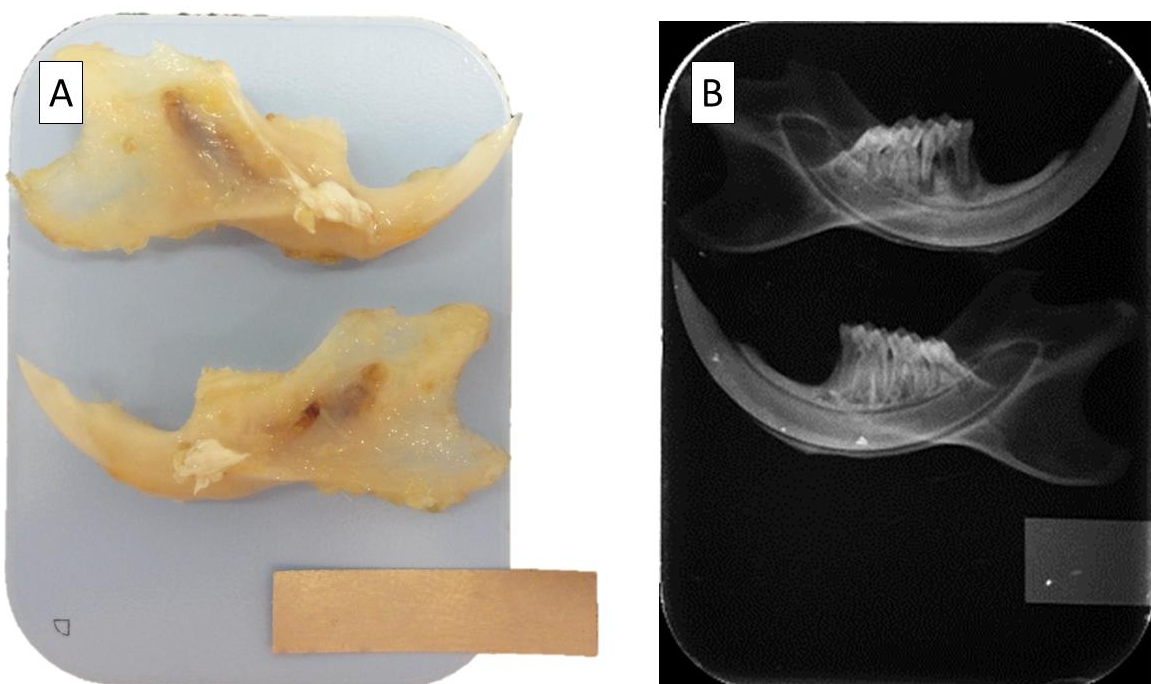


Figura 2. Posicionamento das hemimandíbulas dissecadas e fita matriz de 5mm sob a placa digital (A). Imagem radiográfica obtida a partir do sistema digital de captura Digora® (B).

As radiografias foram então exportadas para o formato de imagem *.jpeg* para análise quantitativa por meio do software de análise de imagem ImageJ® (Instituto Nacional de Saúde, EUA). Após aleatorização, um único operador que desconhecia os grupos experimentais mediu em triplicata a área radiolúcida em mm² nos sítios de periodontite apical, próximo à raiz mesial, através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*) e foi considerada como unidade amostral de cada animal a média aritmética das três mensurações. O resultado foi expresso como média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo (Adaptado de SILVA et al., 2015).

3.5 Confeção de lâminas e análise histológica

As hemimandíbulas foram descalcificadas em solução EDTA 10% (pH 7,3; NaOH, PA) (BEHARI & BEHARI, 2007; KEKLIKOGLU, 2004), durante 30 dias, sendo mantidas em suspensão por todo o período. Em seguida, o material foi incluído em parafina por processamento automatizado PT05 LupTec®, cortados em espessura de 4 µm e corados por Hematoxilina-eosina em lâminas montadas com Enhtellan® (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983; TIMM, 2005). As secções realizadas incluíram a raiz mesial e distal dos primeiros molares inferiores e o ápice radicular.

Os primeiros molares inferiores e os tecidos adjacentes foram analisados seguindo os seguintes parâmetros: presença ou ausência de necrose pulpar coronária, necrose pulpar radicular, reabsorção óssea periapical e micro abscessos. Os dados foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Foi também realizada análise qualitativa nos cortes representativos de cada subgrupo em relação ao processo inflamatório, quanto ao seu tipo e intensidade. Ambas as análises foram realizadas em 10 campos de um mesmo espécime em aumento de 400x junto ao periápice dentário, escolhidos de forma aleatória, em todos os animais de cada subgrupo.

Os critérios considerados para cada análise foram:

a) **Tipo de processo inflamatório:**

Os critérios adotados correspondem ao tipo de célula inflamatória predominante e características inflamatórias como descrito a seguir (Adaptado de BETTES, 2003):

Escore 1: Ausência de infiltrado inflamatório;

Escore 2: Presença de inflamação aguda (Caracterizada pelo predomínio de leucócitos polimorfonucleares);

Escore 3: Presença de inflamação mista (Quando não houver predomínio de nenhum tipo de célula inflamatória);

Escore 4: Presença de inflamação crônica (Caracterizada por resposta proliferativa de fibroblastos e infiltrado celular predominantemente mononuclear: macrófagos, linfócitos e plasmócitos);

b) Intensidade do infiltrado inflamatório:

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em cada corte (Adaptado de PRIETO, 2014):

Escore 1: Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível (menos de 3 células por campo);

Escore 2: Infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo);

Escore 3: Infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo);

Escore 4: Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo)

Os resultados foram expressos como mediana (mínimo e máximo) das unidades amostrais de cada subgrupo.

Todas as análises foram realizadas de maneira cega por um único operador.

3.6 Análise histomorfométrica

Após análise qualitativa, com auxílio da ferramenta Plugin “Cell Counter” do software ImageJ® (Instituto Nacional de Saúde, EUA), os mesmos campos selecionados anteriormente foram fotografados em grande aumento (400x), através de um microscópio com câmera acoplada (Motic BA310 Microscope with Moticom 2000 2.0 M Pixel USB 2.0 com câmera acoplada software Motic Plus 2.0, Motic Medical Diagnostic Systems Co.®, Hong Kong), e realizadas as contagens dos números de células inflamatórias (PMN e MN), como também de osteoclastos, para estes foram selecionados 5 campos no aumento de 400x na região óssea periapical adjacente à lesão (JILKA et al., 2013).

As células foram classificadas com base nas suas características morfológicas, como descrito a seguir (Adaptado de RAHDE, 2010; BRIZENO et al, 2016):

a) **Polimorfonucleares:** células de núcleo segmentado e morfologia multilobulada.

- b) **Mononucleares:** células sem núcleo segmentado e morfologia unilobulada.
- c) **Osteoclastos:** células grandes com citoplasma eosinofílico com três ou mais núcleos.

O somatório das células existentes nos cinco/dez campos por animal foi considerado como uma unidade amostral. Todas as análises foram realizadas de maneira cega por um único operador. Os dados foram expressos na forma de média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo.

3.7 Análise histoquímica de fibras colágenas

As áreas de tecido conjuntivo da lesão apical foram submetidas à análise por Picrosirius Red para verificação da quantidade e tipificação de deposição do colágeno. Essa técnica confere coloração avermelhada para áreas colagenizadas e através de polarização de luz sugere uma possível distinção entre os tipos de colágeno através da birrefringência vermelho-amarelada e verde-esbranquiçada (KLINGE; FARMAN; FIEBELER, 2010).

Cortes de 3 µm foram dispostos em lâminas de vidro e desparafinados em estufa a 60°C por 3h e três banhos de xilol (5 minutos). Após reidratação em série decrescente de álcool, as lâminas foram incubadas em solução de picrosirius (ScyTek®) por 30 minutos e então lavadas rapidamente em dois banhos de ácido clorídrico 5%, contra-coradas com hematoxilina de Harris por 45 segundos e montadas com Enhtellan® (BRIZENO et al., 2016).

Cinco campos (200x) foram selecionados e fotografados na forma convencional e sob luz polarizada (Motic BA310 Microscope with Moticam 2000 2.0 M Pixel USB 2.0 com câmera acoplada software Motic Plus 2.0, Motic Medical Diagnostic Systems Co.®, Hong Kong).

Para a análise de colágeno total, as fotomicrografias foram avaliadas pelo software de análise de imagem ImageJ® (Instituto Nacional de Saúde, EUA), após calibração das imagens pelo comando *Color Thershold* (Image > Adjust > Color Thershold) na função RGB para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92) (Figura 3). Depois da calibração, as imagens foram convertidas para escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em vermelho (Analyse > Analyse Particles) (BRIZENO et al., 2016).

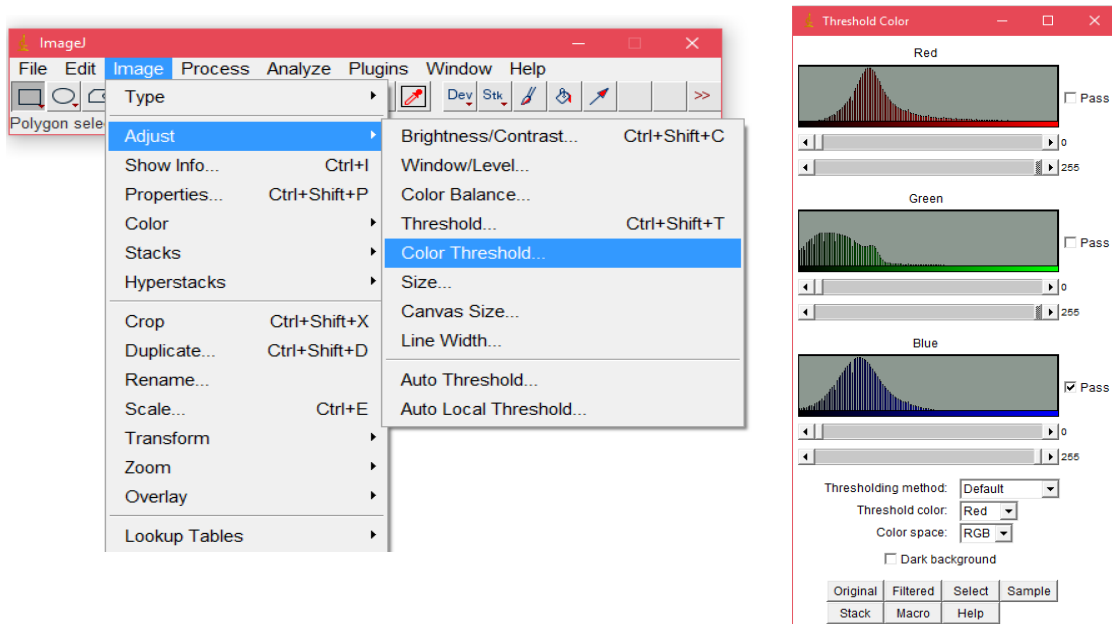


Figura 3. Comando Color Threshold, Software ImageJ®.

Para as imagens polarizadas, o mesmo protocolo foi realizado ajustando-se as cores na função RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32). Após ajuste, as imagens foram convertidas para escala de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado relativa à área marcada em vermelho. A área verde-esbranquiçada foi obtida através de processo semelhante ao descrito anteriormente, alterando-se os canais de cores RGB para: Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 65), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 255) (adaptado de ANDRADE et al., 2011).

As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes se apresentaram coradas de tons de amarelo a vermelho, sugerindo o colágeno tipo I, enquanto as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentaram-se coradas de verde, sugerindo o colágeno tipo III (BETTES, 2003).

A média das porcentagens da deposição de cada tipo de colágeno (total, tipo I e III) nos cinco campos foram utilizadas como uma unidade de amostragem. Todas as análises foram realizadas de maneira cega por um único operador. Os dados foram expressos sob a forma de média±EPM das unidades amostrais de cada subgrupo.

3.8 Processamento e avaliação imunohistoquímica

Foram realizados cortes de 3µm dispostos sobre lâminas sinalizadas para realização de imunohistoquímica, através da técnica da estreptavidina-biotinina-peroxidase (adaptado de HSU et al. 1981) para IL-1. Em seguida, foi realizada a desparafinização, reidratação e a recuperação antigênica pela técnica de aquecimento em micro-ondas, no qual as lâminas foram acondicionadas em recipientes de polipropileno, contendo solução tampão de citrato 10 mM (pH = 6,0) e submetidas a dois aquecimentos sequenciais. Posteriormente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação com anticorpo primário anti-IL-1 (1:175) (Abcam®) durante doze horas.

Após lavagem com PBS, o anticorpo secundário biotilado (Histofine®) foi incubado durante 30 minutos, seguida da incubação com streptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos e revelação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) por 5 minutos (Dako®). As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montadas com Enthellan®.

Foi realizada uma análise qualitativa, para isto foram fotografados 05 campos aleatórios em um aumento de 400x na porção periapical circundante ao ápice da raiz, as avaliações foram realizadas por um único operador, devidamente treinado, que desconhecia os grupos experimentais. As percentagens de células com imunocoloração citoplasmática ou nuclear foram pontuadas numa escala de 0 a 3, como descrito a seguir (BRIZENO et al., 2016):

Score 0: Ausência de células positivas;

Score 1: Marcação leve (1-33% de células positivas);

Score 2: Marcação moderada (34-66% de células positivas);

Score 3: Marcação Intensa (67-100% de células positivas).

Os resultados foram expressos como mediana (mínimo e máximo) das unidades amostrais de cada subgrupo.

3.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, seguido de um teste para verificação da homogeneidade de variância. Os dados paramétricos e quantitativos foram submetidos ao teste ANOVA, unifatorial ou multifatorial, associado ao pós-teste de Bonferroni e expressos em forma de Média±EPM. Os dados não-paramétricos e qualitativos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn e expressos em forma de mediana (mínima-máxima).

Os dados dicotômicos (ausência ou presença) foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados por meio do teste Qui-quadrado e exato de Fisher.

Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* estatístico GraphPad Prism 5.0®, considerando um nível de significância de 95% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise radiográfica digital da área periapical

A área radiolúcida na raiz mesial da região periapical do grupo salina apresentou um tamanho médio de $0,12 \pm 0,03 \text{ mm}^2$ no dia 0 e o grupo prednisona $0,10 \pm 0,01$. No dia 7, o grupo salina apresentou tamanho médio de $0,19 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ e o grupo prednisona $0,35 \pm 0,15 \text{ mm}^2$. Ao longo do protocolo experimental, ambos os grupos apresentaram um aumento gradual da área radiolúcida apical, no entanto, o grupo salina apresentou diferença significativa entre os demais dias quando comparados apenas com o dia 28 ($0,90 \pm 0,18 \text{ mm}^2$) ($p < 0,001$), enquanto que o grupo tratado com prednisona apresentou aumento significativo a partir do dia 14 ($1,13 \pm 0,27 \text{ mm}^2$), sem diferença significativa entre o dia 14 e o dia 28 ($1,09 \pm 0,18 \text{ mm}^2$) ($p = 0,014$).

Já quando comparados entre si, no dia 14, a área radiolúcida dos animais tratados com prednisona foi significativamente maior do que os animais do grupo controle ($0,20 \pm 0,03 \text{ mm}^2$) ($p < 0,001$) (Gráfico 1 / Figura 4).

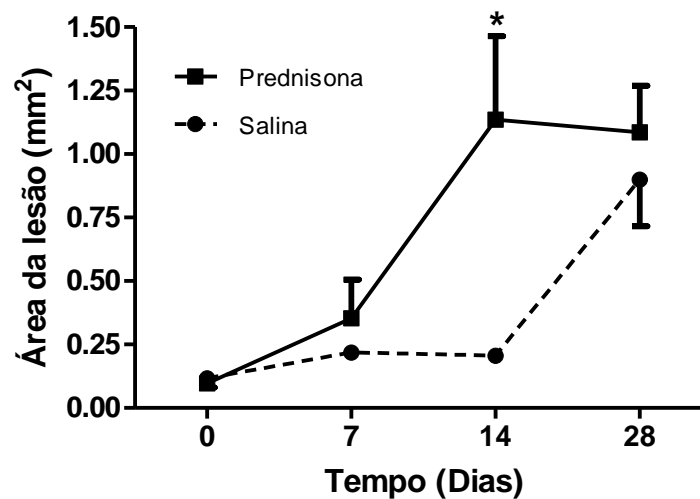


Gráfico 1: Área radiolúcida apical de animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.

* $p < 0,001$ versus controle no 14º dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM).

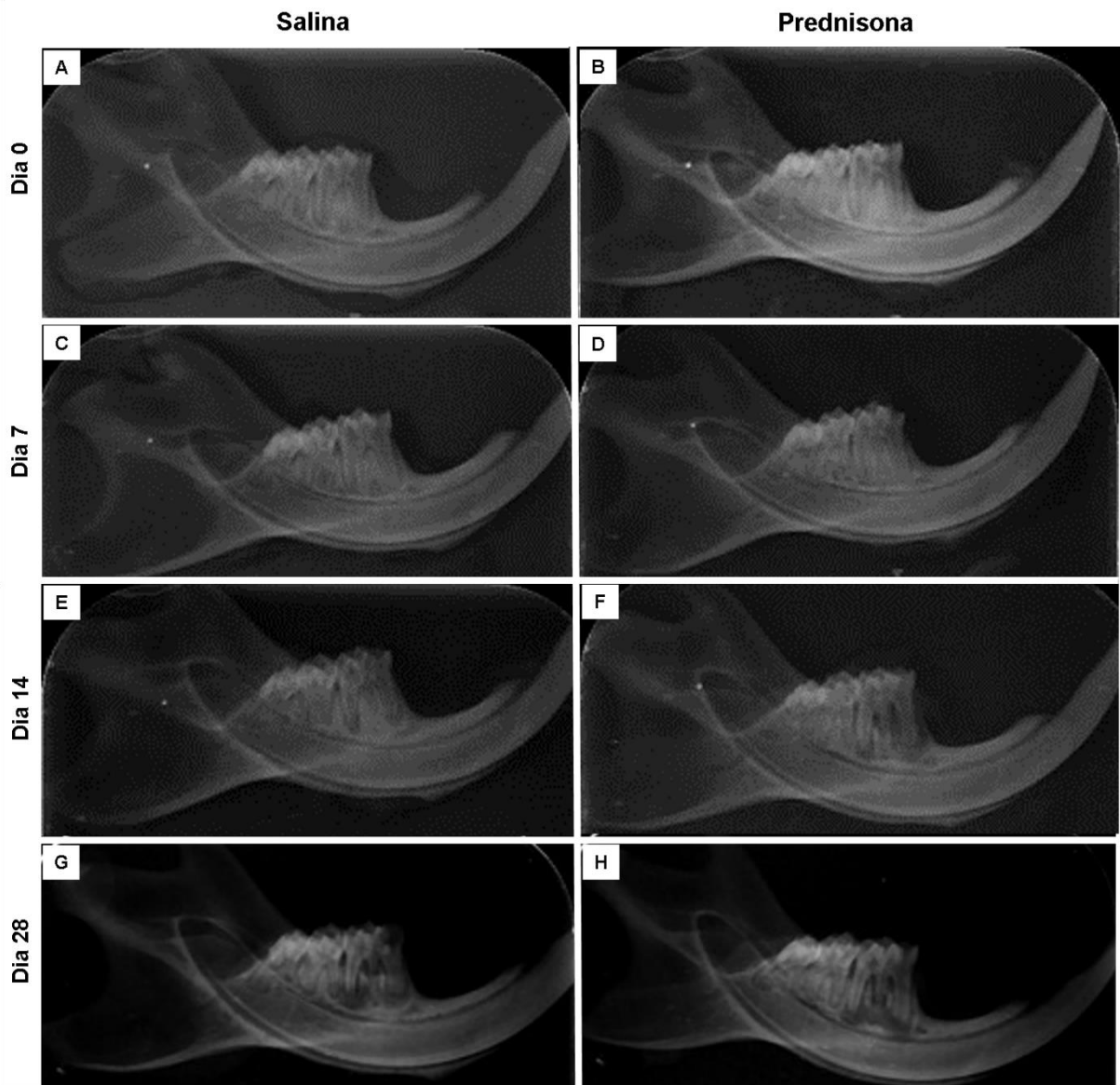


Figura 4. Aspectos radiográficos das áreas da lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28.

4.2 Análise histológica

Histologicamente, nenhum animal exibiu necrose da polpa coronária ou radicular no dia 0 e, independente do grupo, no entanto, 100% dos animais exibiram esse achado histológico a partir do sétimo dia do protocolo experimental ($p < 0,001$). Um aumento significativo na frequência de necrose radicular, em relação ao dia 0, foi observado a partir do dia 14 (77,8%) ($p = 0,010$) no grupo prednisona, atingindo 100% dos animais no dia 28, e, somente a partir do dia 28 (100,0%) no grupo salina ($p = 0,001$) (Tabela 1/ Figura 5).

A presença de reabsorção óssea apical pôde ser observada de forma significativamente mais frequente no dia 14 nos grupos salina (100,0%, $p=0,002$) e prednisona (100,0%, $p=0,047$) em relação ao dia 0 (0,0%), porém, sem diferenças entre os grupos ($p=1,000$), tanto no dia 14 como no dia 28 (100% dos animais) ($p=1,000$).

Em relação à presença de micro abscesso, houve diferença significante na frequência no grupo salina ao longo do protocolo experimental no dia 28 ($p=0,036$), já o grupo prednisona apresentou presença significativa no dia 14 (55,6%) ($p=0,044$). Quando comparados entre si, essa frequência foi significativamente maior no grupo prednisona (55,6) que no salina (0,0%) no dia 14 ($p=0,044$) (Tabela 1/ Figura 5).

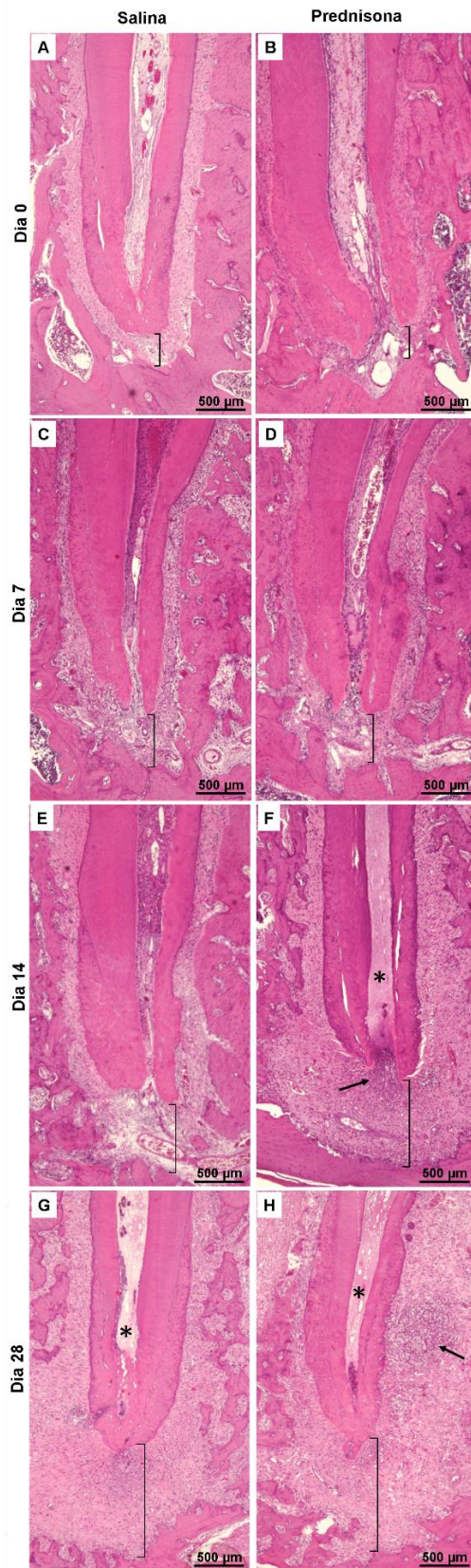


Figura 5. Aspectos histológicos quanto à presença/ausência de necrose pulpar radicular, reabsorção óssea apical e micro-abcesso das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina. 25x.

Legenda: Reabsorção óssea (cochetes), Necrose pulpar radicular (asterisco) e Micro-abcesso (seta).

Tabela 2: Análise de dados dicotômicos quanto a presença/ausência de necrose pulpar e radicular, reabsorção óssea apical e micro-abcesso em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.

	Dia 0			Dia 7			Dia 14			Dia 28			Salina	Prednisona
	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	p-Valor	p-Valor
Necrose pulpar coronária	0	0	1,000	6†	7†	1,000	6†	8†	1,000	8†	8†	1,000	<0,001	<0,001
	0,0%	0,0%		100,0%	100,0%		100,0%	100,0%		100,0%	100,0%			
Necrose pulpar radicular	0	0	1,000	0	2	0,462	2	7†	0,136	8†	8†	1,000	0,001	0,010
	0,0%	0,0%		0,0%	28,6%		33,3%	77,8%		100,0%	100,0%			
Reabsorção óssea	0	0	1,000	5	5	1,000	6†	8†	1,000	8†	8†	1,000	0,002	0,047
	0,0%	0,0%		83,3%	71,4%		100,0%	100%		100,0%	100,0%			
Micro abcesso perirradicular	0	0	1,000	0	2	0,462	0	5*†	0,044	4†	4	1,000	0,036	0,559
	0,0%	0,0%		0,0%	28,6%		0,0%	55,6%		50,0%	50,0%			

*p<0,05 versus grupo controle no mesmo dia; †p<0,05 versus dia 0 do mesmo grupo; Teste qui-quadrado de Pearson e exato de Fisher.

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

O perfil inflamatório mostrou-se geralmente de forma ausente no dia 0, em ambos os grupos, e no dia 7 no grupo salina. Ao longo do protocolo experimental, houve um predomínio de células inflamatórias mistas no grupo salina somente no dia 28 (mediana = 3) ($p=0,001$) com relação aos demais dias analisados. Quanto ao grupo prednisona, houve um predomínio significativo da presença de inflamação aguda no dia 14 (mediana = 2) e de infiltrado inflamatório do tipo misto no dia 28 (mediana = 3) ($p=0,011$) em relação ao dia 0. No dia 14, o perfil inflamatório apresentado no grupo prednisona (inflamação aguda) foi significativamente diferente do apresentado pelo grupo salina, o qual apresentou um perfil inflamatório predominantemente ausente (mediana = 1) ($p=0,007$) (Tabela 2/Figura 6).

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório, no dia 0 não houve diferença significativa nos dois grupos experimentais, como também no 7º dia no grupo salina que, em geral, apresentou intensidade ausente ou desprezível. No grupo tratado com prednisona, no dia 7, alguns dos animais apresentaram intensidade do tipo leve, porém sem diferença significativa em relação ao dia 0 do mesmo grupo, no entanto, a partir do 14º dia, ainda que os animais apresentassem infiltrado inflamatório predominantemente leve (mediana = 2), este resultado foi significativo quando comparado ao dia 0, assim como no dia 28, no qual os animais apresentaram um infiltrado inflamatório do tipo moderado (mediana = 3) em relação ao dia 0 (mediana = 1) ($p=0,001$). O grupo salina apresentou aumento significativo ao longo do período experimental desses escores apenas no dia 28, com predominância do infiltrado inflamatório moderado (mediana = 3) ($p=0,001$). Quando comparados entre si, os dois grupos de tratamento, no 14º dia, a intensidade do infiltrado inflamatório do grupo prednisona (mediana = 2) foi significativamente maior que do grupo salina (mediana = 1) ($p=0,007$) (Tabela 2/Figura 6).

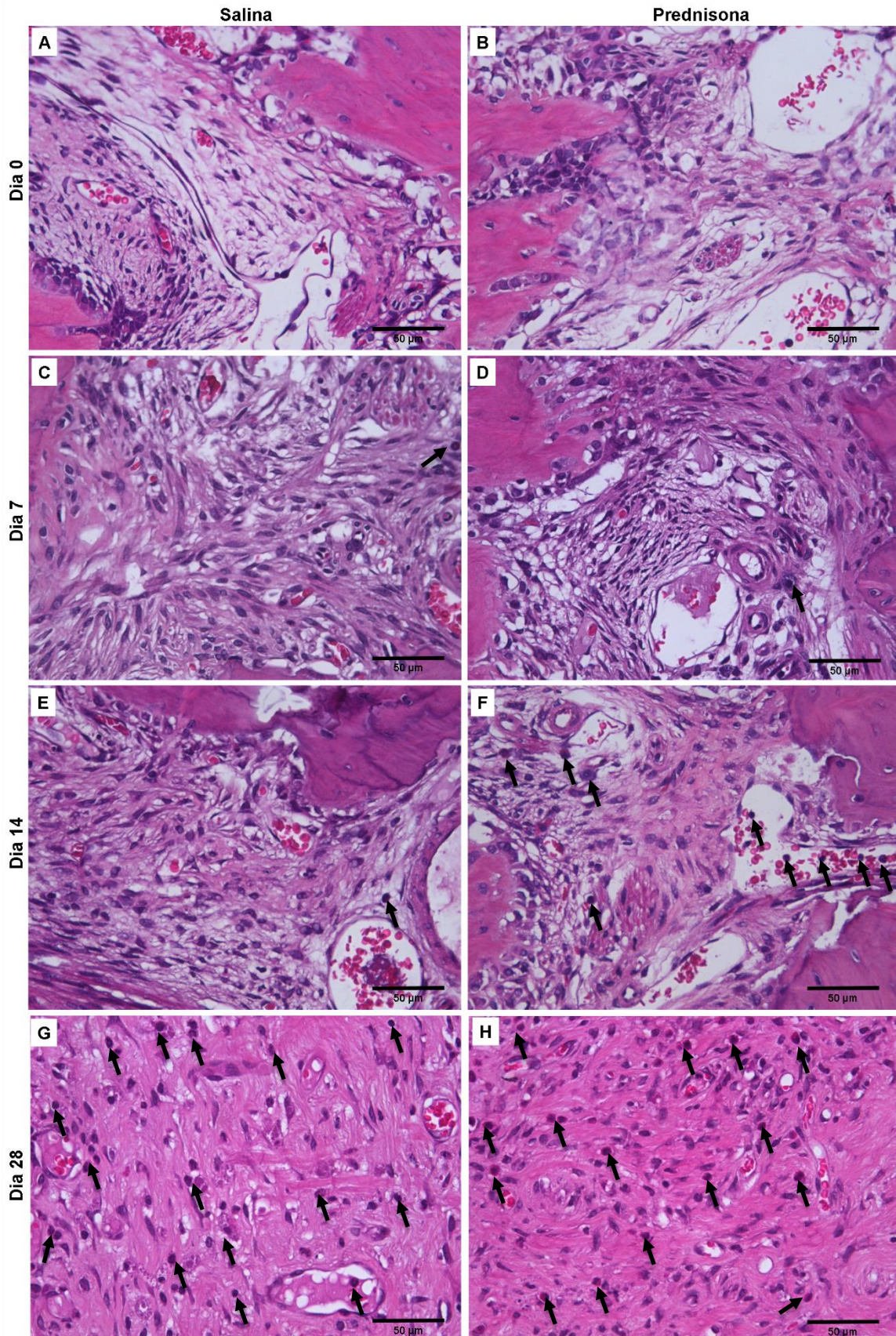


Figura 6. Aspectos histológico quanto ao tipo e intensidade do infiltrado inflamatório das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina. 400x
Legenda: Células inflamatórias (setas).

Tabela 3: Análise qualitativa quanto ao perfil inflamatório, intensidade do infiltrado e imunomarcção para Interleucina-1 β em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de periodontite apical.

	Dia 0			Dia 7			Dia 14			Dia 28			Salina	Prednisona
	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	Salina	Prednisona	p-Valor	p-Valor	p-Valor
Perfil Inflamatório	1 (1-1)	1 (1-4)	1,000	1 (1-2)	2 (1-2)	0,253	1 (1-2)	2 (1-3)* †	0,007	3 (2-4) †	3 (2-4)†	0,746	0,001	0,011
Intensidade infiltrado	1 (1-1)	1 (1-1)	1,000	1 (1-2)	2 (1-3)	0,082	1 (1-2)	2 (1-4)* †	0,007	3 (1-3) †	3 (2-3) †	0,847	0,002	0,021
IL-1β	0 (0-0)	0 (0-0)	1,000	0 (0-1)	0 (0-2)	0,519	1 (0-1)	2 (1-3) *†	0,044	2 (0-3) †	2 (2-3) †	0,660	0,037	0,028

*p<0,05 versus grupo controle no mesmo dia; †p<0,05 versus dia 0 do mesmo grupo; Teste de Mann-Whintey ou Kruskal-Wallis/Dunn.

Dados expressos em forma mediana, mínimo e máximo.

4.3 Análise histomorfométrica

O número de polimorfonucleares neutrófilos mostrou discreto aumento nos grupos tratados com solução salina ($p=0,171$) e prednisona ($p=0,170$) ao longo do protocolo experimental, no entanto, esse aumento mostrou-se significativamente superior somente no grupo prednisona no 14º dia ($15,86\pm 5,8$) em relação ao grupo controle ($1,4\pm 0,4$) ($p=0,006$) (Figura 7A).

Nenhum animal do grupo salina ou prednisona apresentou células inflamatórias mononucleares no dia 0 e ao longo do tempo houve um aumento do número destas células, embora só tenha apresentado aumento significativo desse tipo celular após 28 dias da indução da lesão apical em ambos os grupos (salina $3,9\pm 0,6$ e prednisona $4,8\pm 0,7$); $p<0,001$ e $p<0,001$, respectivamente) (Figura 7B).

O grupo salina apresentou, no 28º dia, aumento significativo do número de osteoclastos na região apical ($2,4\pm 0,3$) em relação aos demais dias avaliados ($p<0,001$) e no grupo prednisona esse aumento ocorreu no 14º dia ($2,9\pm 0,3$) em relação ao momento inicial ($0,0\pm 0,0$) ($p=0,042$). O número médio de osteoclastos do grupo prednisona no 14º dia foi significativamente superior ao grupo salina ($0,6\pm 0,1$) ($p=0,001$) (Figura 7C e 8).

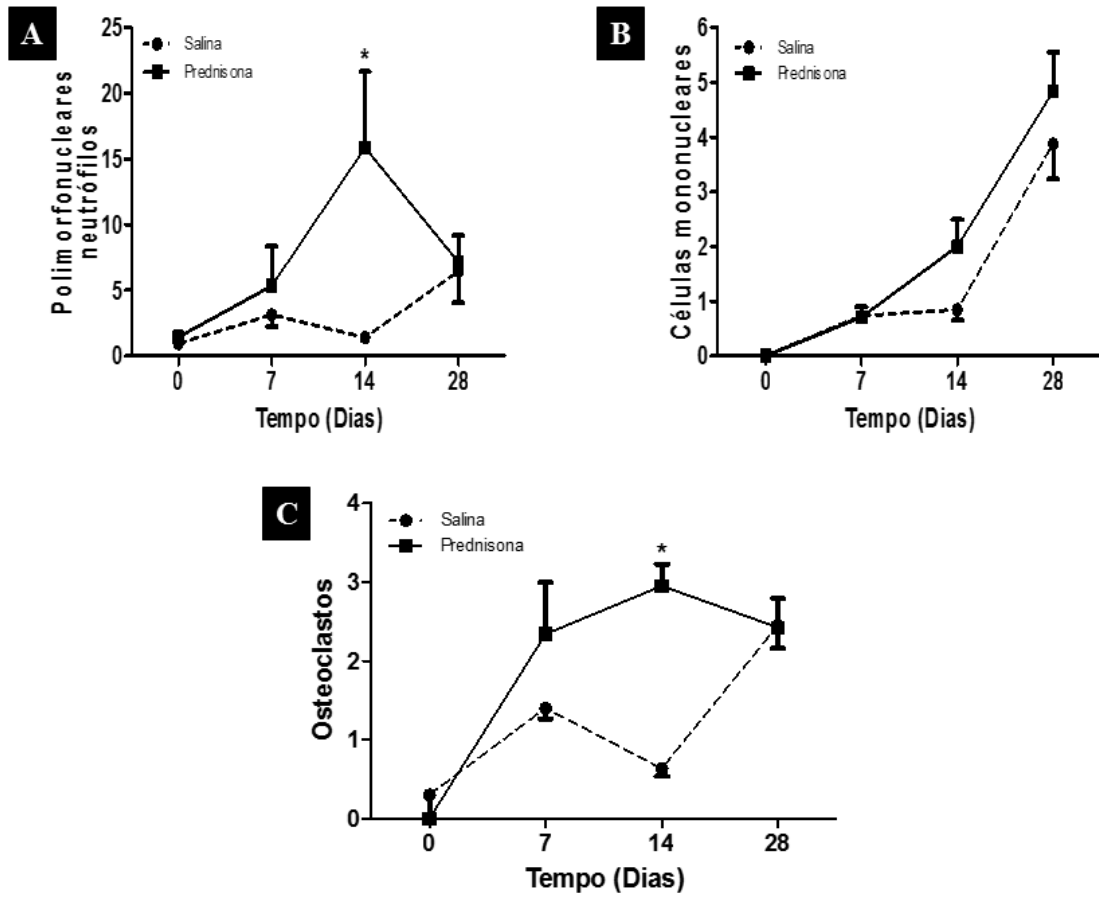


Figura 7: Contagem de polimorfonucleares neutrófilos (A), células mononucleares (B) e osteoclastos (C) em animais cronicamente tratados com prednisona ou salina e submetidos ao modelo experimental de lesão apical.

Legenda: * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media \pm EPM).

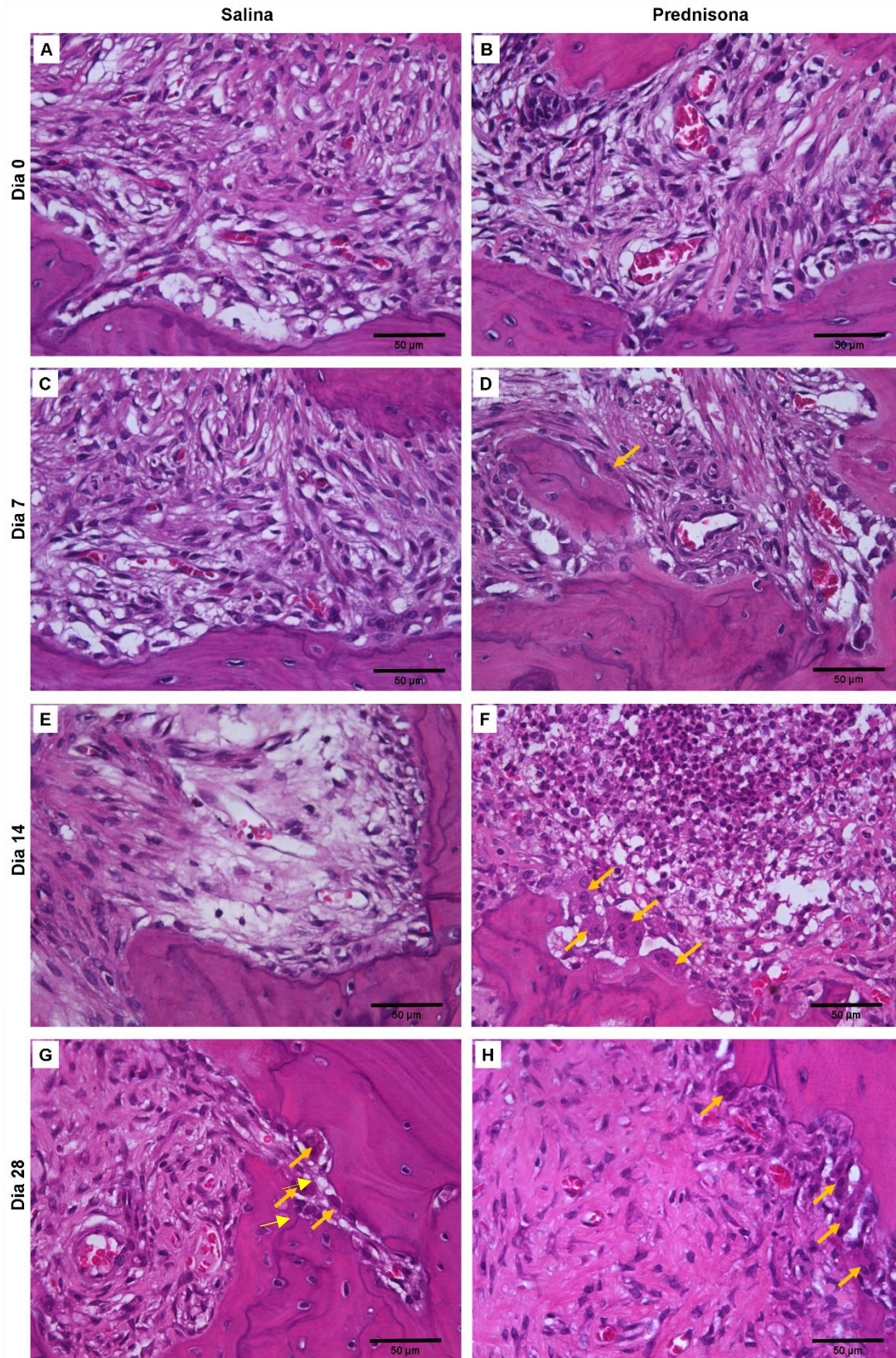


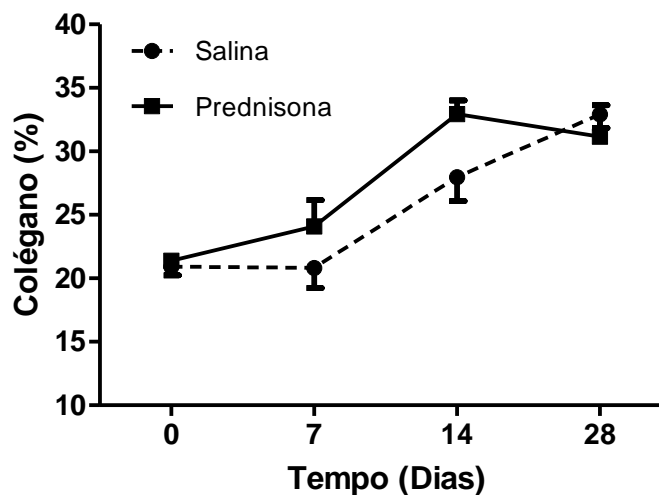
Figura 8. Aspectos histológicos quanto à contagem de osteoclastos nas áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Hematoxilina-eosina. 400x.

Legenda: Osteoclastos (seta amarela).

4.4 Análise histoquímica para fibras colágenas

Com relação à análise de colágeno do tecido conjuntivo da lesão apical, observou-se que o grupo salina apresentou aumento significativo da área marcada total por picrossirius red em relação do dia 0 ($20,9 \pm 0,7\%$) com o dia 28 ($32,9 \pm 1,1\%$) ($p < 0,01$), como também do dia 7 ($20,81 \pm 1,5\%$) com os dias 14 ($27,9 \pm 1,8\%$) ($p < 0,05$) e com o dia 28 ($p < 0,001$). No grupo prednisona, só houve aumento significativo do dia 0 ($21,4 \pm 0,1\%$) em relação ao dia 14 ($32,9 \pm 1,1\%$) ($p = 0,02$). Quando comparados aos grupos tratados com prednisona ou salina, entre si, não houve diferença significativa em nenhum dos dias avaliados (Gráfico 2/ Figura 9).

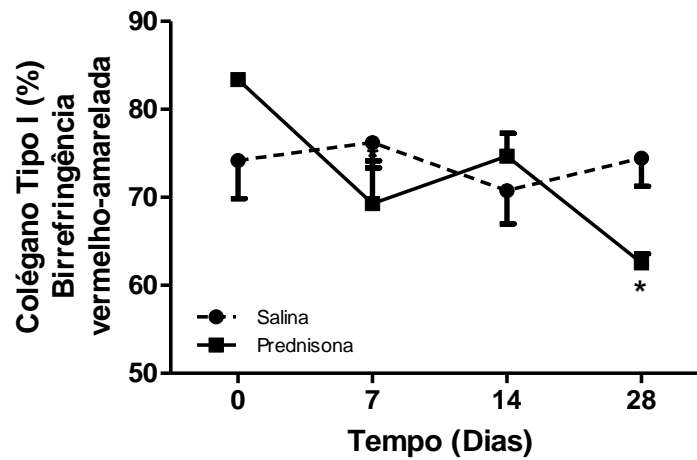
Gráfico 2: Análise de colágeno em tecido conjuntivo nos animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos ao modelo experimental de lesão apical.



Legenda: Prednisona versus salina no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media±EPM).

Sobre a fenotipagem do colágeno por meio de polarização de luz, pôde-se observar que o grupo salina não mostrou variação significativa ao longo do tempo do percentual de área com birrefringência vermelho-amarelada ($p = 0,781$), diferente do grupo prednisona que mostrou redução significativa da área referente a esse tipo de birrefringência no dia 28 ($62,6 \pm 1,0\%$) em relação ao momento inicial ($83,4 \pm 0,2\%$) ($p = 0,012$). A perda de birrefringência vermelho-amarelada mostrou-se significativamente superior no 28º dia no grupo prednisona em relação ao salina ($74,5 \pm 3,2\%$) ($p = 0,040$) (Gráfico 3/ Figura 9).

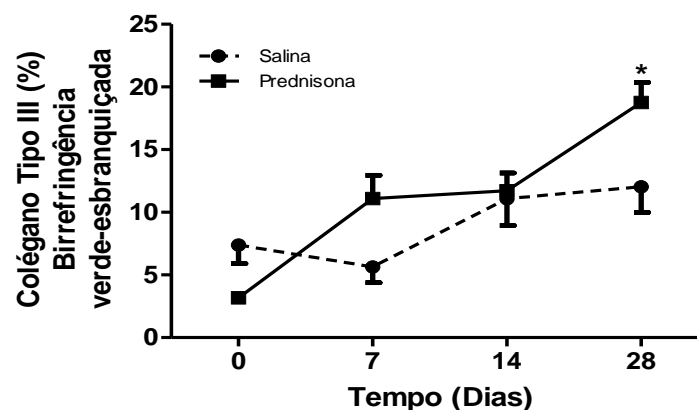
Gráfico 3: Fenotipagem por luz polarizada do perfil de colágeno vermelho-amarelada em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos a modelo experimental de lesão apical.



Legenda: * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media \pm EPM).

Em contrapartida, o percentual de área com birrefringência verde-esbranquiçada não mostrou diferença no grupo salina ao longo do tempo ($p=0,128$). No entanto, o grupo tratado com prednisona mostrou aumento significativo desse tipo de birrefringência no dia 28 ($18,8 \pm 1,6\%$) em relação ao dia 0 ($3,2 \pm 0,1\%$), dia 7 ($11,09 \pm 1,8\%$) e o dia 14 ($11,72 \pm 1,4\%$) ($p=0,001$). O percentual de birrefringência verde-esbranquiçada foi significativamente maior no grupo prednisona que no grupo salina no 28º dia ($12,0 \pm 2,1\%$) ($p=0,039$) (Gráfico 4/ Figura 9).

Gráfico 4: Fenotipagem por luz polarizada do perfil de colágeno verde-esbranquiçada em animais cronicamente tratados com salina ou prednisona e submetidos a modelo experimental de lesão apical.



Legenda: * $p < 0,05$ versus controle no mesmo dia, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (media \pm EPM).

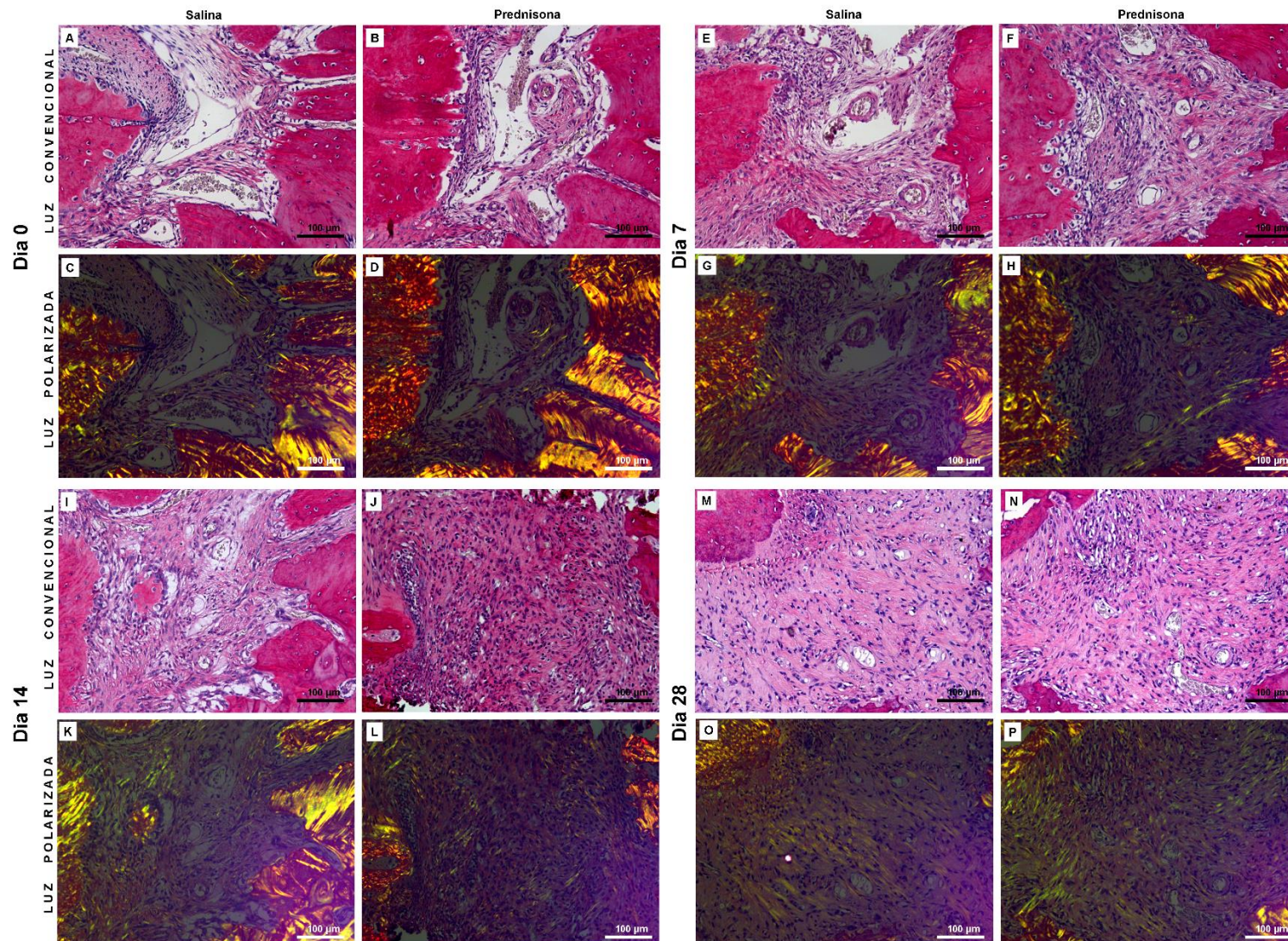


Figura 9. Fotomicrografias representativas da análise de colágeno do tecido conjuntivo das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E, G, I, K, M e O) ou prednisona (B, D, F, H, J, L, N e P), nos dias 0, 7, 14 e 28. Coloração Picrossirius Red sem (imagens acima) e após polarização de luz (a baixo). 200x

4.5 Análise imunohistoquímica para IL-1

No dia 0 do protocolo experimental, independente do grupo, nenhum animal exibiu escore de imunomarcção para IL-1 β (mediana = 0). O grupo tratado com prednisona apresentou aumento significativo da imunomarcção para IL-1 β a partir do dia 14 (Mediana = 2 (1-3)) (p=0,028) mantendo-se elevado no dia 28 (Mediana = 2 (2-3)), em relação ao dia 0, porém o grupo tratado com salina apresentou aumento significativo da imuno-expressão para esse marcador apenas no dia 28 (Mediana = 2 (0-3)) (p=0,037). O percentual de células imunomarcadas para IL-1 β foi significativamente maior no grupo prednisona que no grupo salina no 14º dia (mediana = 1 (1-2)) (p=0,044) (Figura 10/ Tabela 2).

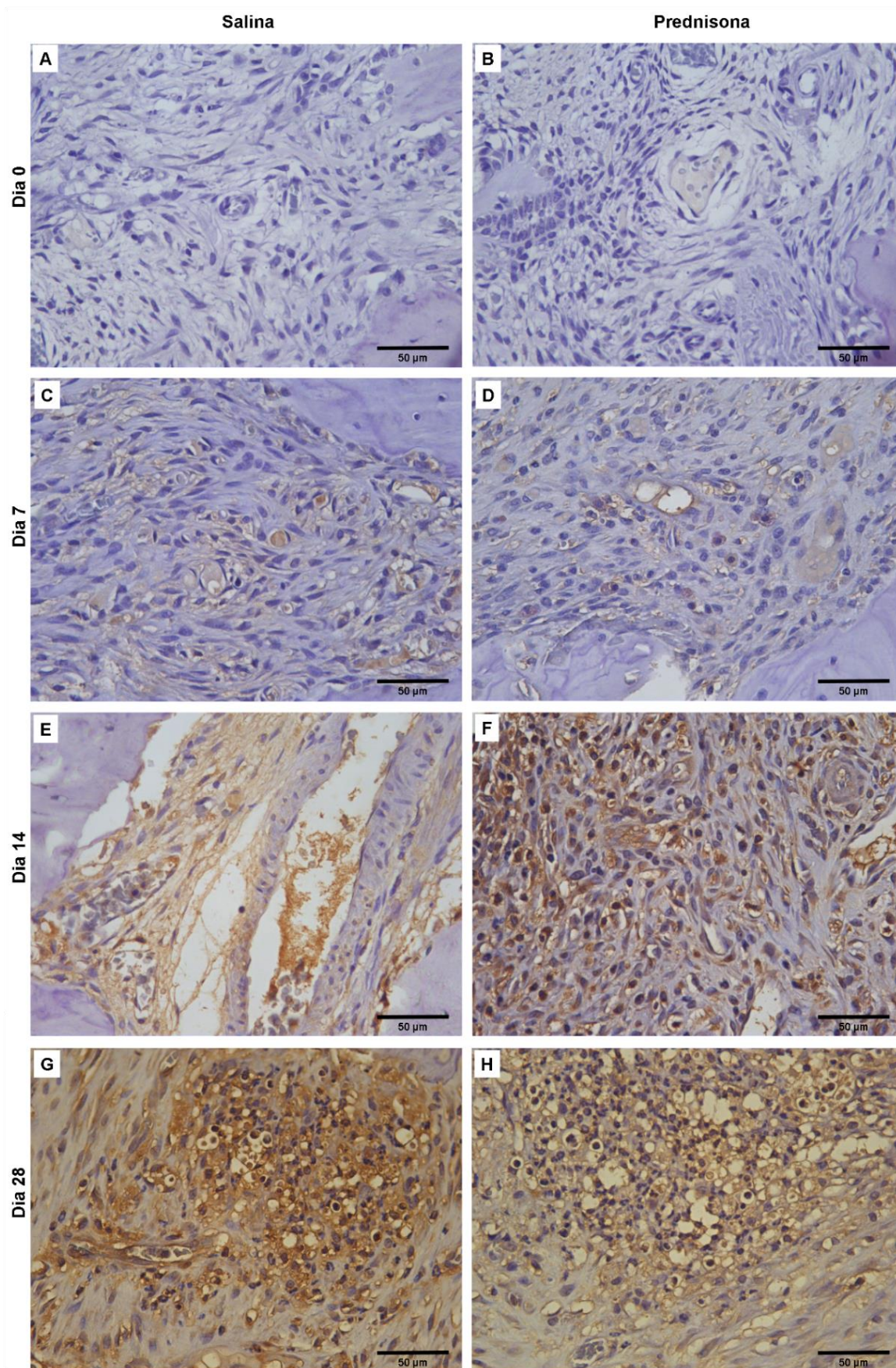


Figura 10. Imunomarcacão de IL-1 β das áreas de lesão periapical dos animais tratados com salina (A,C,E e G) ou prednisona (B, D, F e H), nos dias 0, 7, 14 e 28. 400x

5. DISCUSSÃO

É crescente a quantidade de pacientes portadores de alguma condição médica sistêmica que procuram atendimento odontológico. Este fato se deve, principalmente, pelo aumento da expectativa de vida nos últimos anos (WOLLE et al., 2013). A maioria dessas condições envolvem uma abordagem farmacológica, como o uso de corticoides, o que pode influenciar diretamente o tratamento odontológico de algumas doenças orais.

Os glicocorticoides são fármacos anti-inflamatórios utilizados de forma crônica no tratamento de diversas comorbidades em todo o mundo, como o lúpus eritematoso sistêmico e a artrite reumatoide. No entanto, a cada ano surjam novas modalidades de medicamentos para substituição dessas drogas no tratamento de algumas enfermidades, a indicação de uso desses fármacos apresentou um aumento significativo nos últimos anos (KANEKO et al., 2012; GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014). Seus efeitos anti-inflamatório e imunossupressor são bastante eficazes, no entanto, esses medicamentos apresentam muitos efeitos adversos, como a susceptibilidade a infecções e alterações no metabolismo ósseo (GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014; EZZAT; ABBASS, 2014).

O presente estudo buscou investigar de forma inédita se a corticoterapia crônica sistêmica pode influenciar no processo de desenvolvimento da periodontite apical, doença esta que é de cunho infecto-inflamatório, de ampla prevalência mundial, associada à destruição óssea local (XIONG et al., 2010). Várias pesquisas têm empregado o modelo de periodontite apical experimental induzida, que consiste basicamente da exposição pulpar à infecção através da microflora oral (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). Além disso, o fármaco, a dose e a sua via de administração adotados foram baseados nos conceitos utilizados na clínica médica (RAMOS-REMUS et al, 2002). A prednisona, via oral, é bastante empregada no tratamento de doenças autoimunes, como lúpus eritematoso sistêmico, o qual o tratamento geralmente consiste em doses leves a moderadas (5,0-7,5 mg/dia) diárias, por longos períodos de tempo, a depender da sintomatologia apresentada pelo paciente (BORBA et al., 2008; KUHN et al., 2015).

No modelo experimental do presente estudo, constatou-se que através de análise radiográfica digital, os animais tratados com prednisona apresentaram maior área de reabsorção óssea apical ao longo do processo experimental, e no 14º dia este aumento foi significativo em relação ao grupo controle. Embora, no 28º dia, a área radiográfica indicativa de reabsorção óssea apical foi semelhante em ambos os grupos. Este resultado sugere que os corticoides, sob

uso prolongado, aceleraram e aumentaram a perda óssea induzida pela periodontite apical experimental.

Diferente do nosso estudo, alguns modelos de periodontite apical induzida em ratos utilizando ciclosporina como agente imunossupressor, através de análises de imagem, mostraram ou uma redução no tamanho da lesão ou não haver nenhuma diferença de tamanho quando comparados aos seus grupos controles (KAWAHARA et al., 2004; TEIXEIRA et al., 2000). No entanto, a ciclosporina é classificada como um imunossupressor específico que inibe a linhagem de células T, além de não induzirem à reabsorção óssea, diferente dos corticoides que possuem grande espectro de ação, inibindo diversas vias e mecanismos pró-inflamatórios (KAWAHARA et al., 2004; EZZAT; ABBASS, 2014).

Metzger et al. (2002) observou que a dexametasona, em altas doses e a curto prazo em um modelo de periodontite apical experimental, reduziu radiograficamente o crescimento da lesão. Porém, sabe-se que os glicocorticoides têm a capacidade de regular negativamente o processo inflamatório, mas já foi demonstrado um efeito dual no processo de reabsorção óssea, relacionados ao tempo e à dose administrada (CANALIS; DELANY, 2002).

Cavagni et al. (2005) avaliou a influência da dexametasona no desenvolvimento de periodontite experimental por meio de ligadura durante 30 dias, apesar de inicialmente os animais tratados com dexametasona demonstrarem menores sinais clínicos da doença, foi observada uma perda óssea significativamente mais elevada nesses animais. Estudos anteriores com animais demonstraram que a osteopenia e a imunossupressão causada pelo uso de esteroides, por si só, não inicia a doença periodontal na presença de uma microbiota oral normal, mas na presença de um agente patogênico periodontal, a terapia pode ser um fator agravante da periodontite (VON WOWEREN; KLAUSEN; OLGAARD, 1992).

Um estudo de movimentação ortodôntica induzida em ratos sob terapia aguda e crônica com corticoide mostrou que a superfície óssea total foi reduzida em ambos grupos, no entanto, os animais tratados de forma crônica apresentaram maior superfície de movimentação ortodôntica e maior erosão óssea quando comparado aos animais sob tratamento agudo (KALIA; MELSEN; VERNA, 2004).

Ezzat e Abbass (2014) mostraram, por meio de análise histopatológica, histoquímica, histomorfométrica, e densitometria óssea, que após administração sistêmica de GC constatou-se uma perda óssea alveolar espontânea nas mandíbulas de ratos.

Neste estudo, os animais tratados com prednisona também apresentaram um aumento significativo no número de osteoclastos no dia 14 em relação ao observado no grupo salina.

Sabe-se que os glicocorticoides, quando administrados cronicamente, são capazes de interferir no metabolismo ósseo. Tem sido demonstrado que o aumento da perda óssea causada pelos GC se dá através de supressão e apoptose dos osteoblastos, bem como da sua atividade funcional e de osteócitos, além de induzirem um aumento da sobrevivência dos osteoclastos e a produção de seus precursores (O'BRIEN et al., 2004; JIA et al., 2006; EZZAT; ABBASS, 2014; KANEKO et al., 2012; CANALLIS, et al 2002). Sabe-se ainda que os GC causam regulação negativa no metabolismo do cálcio, através da diminuição de sua absorção intestinal e o aumento da excreção renal (EZZAT; ABBASS, 2014; VON WOWEREN; KLAUSEN; OLGAARD, 1992; KANEKO et al., 2012).

Mais recentemente, tem sido demonstrado que esses medicamentos causam aumento da expressão de RANKL e supressão de seu antagonista natural a OPG (EZZAT; ABBASS, 2014; KANEKO et al., 2012; KONDO et al., 2008). Sendo assim, a administração crônica de prednisona possa resultar em maior produção e ativação de pré-osteoclastos, além de reduzir o número de células formadoras de matriz óssea, o que leva a uma maior reabsorção óssea.

A presença de necrose pulpar coronária ocorreu em 100% dos animais de ambos os grupos a partir do sétimo dia. Já a presença de necrose pulpar radicular foi maior no animais tratados com prednisona no 14º dia em relação ao grupo salina. Anti-inflamatórios esteroidais, como a prednisona, quando administrados em baixas doses e em regimes contínuos, como o utilizado no presente estudo, pode ainda provocar a redução do combate da polpa dentária à infecção e resultar em danos maiores e mais rápidos ao tecido pulpar e periapical (OLCZAK-KOWALCZYK et al., 2012). Esses resultados podem sugerir que a terapia imunossupressora possa facilitar a contaminação bacteriana dos tecidos, acarretando estágios precoces de necrose pulpar (SALLAY et al., 1984).

Nakamura et al. (2002), em modelo de periodontite periapical em ratos imunossuprimidos com metrotexato, observou histologicamente no 7º dia após exposição pulpar, porções da polpa necrótica, outras áreas com intensa inflamação em tecido pulpar residual e presença de reabsorção óssea. A gravidade da inflamação pulpar/periapical foi diretamente relacionada com o número de microorganismos no tecido e com o período de tempo que estes tecidos foram expostos (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

A presença de reabsorção óssea apical foi considerada significativa desde o 7º dia, atingindo a totalidade dos animais a partir do dia 14 e permanecendo até o 28º dia. A reabsorção óssea está diretamente relacionada com a presença e quantidade de células inflamatórias nas lesões periapicais, como também com a produção e liberação de vários mediadores pró-

inflamatórios produzidos por estas células (MATSUMOTO; ANAN; MAEDA, 1998; STASHENKO, 1990).

A presença de infiltrado inflamatório, o aumento no número de osteoclastos e a destruição do osso alveolar já podem ser observados antes da necrose pulpar total se estendendo com a progressão da doença (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; WOLLE et al., 2013).

No presente estudo, o infiltrado inflamatório, no 14º dia, apresentado pelo grupo prednisona, foi do tipo, predominantemente, leve e agudo, resultado este significativamente diferente do apresentado pelo grupo salina, o qual apresentou um infiltrado inflamatório escasso ou ausente. Resultado semelhante foi visto anteriormente por Waterman Jr et al. (1998), que investigaram o efeito do citoxan para imunossupressão, em animais submetidos à indução de lesão periapical. Os animais imunossuprimidos mostraram uma lesão periapical mais grave em relação ao grupo controle com uma resposta inflamatória do tipo aguda.

Além do perfil inflamatório, este estudo demonstrou que o número de polimorfonucleares neutrófilos e a frequência da presença de micro-abcesso foi significativamente superior no grupo prednisona em relação ao grupo controle no 14º dia.

A prednisona, assim como outros anti-inflamatórios esteroidais, inibem a enzima fosfolipase A₂, o que impede a degradação dos fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico, previne a formação de diversos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas, COX-2, Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS), diversas citocinas inflamatórias, tromboxanos e outras moléculas de adesão e quimiotaxia (PEREIRA et al., 2007; GOES; JACOBS; BIJLSMA, 2014;). No entanto, o fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), considerado como um imunomodulador pró-inflamatório, apresenta um aumento da sua secreção desencadeada pelos GC (FRANCHIMONT, 2004).

Sabe-se que os GC causam a redução da diapedese e migração de leucócitos para o local da inflamação, o que faz alterar o padrão de recirculação de linfócitos, aumentando sua retenção em órgãos linfoides. Essa inibição da quimiotaxia de polimorfonucleares aos tecidos inflamados se dá principalmente através da supressão de moléculas de adesão como a L-selectina, no entanto, os GC também favorecem a expressão de Anexina 1, que por sua vez, promovem a liberação de L-selectina em neutrófilos (FRANCHIMONT, 2004). O recrutamento de macrófagos para lugares de inflamação, fagocitose e processamento de antígenos também são inibidos. Além disso, esses fármacos atuam reduzindo a expansão clonal de linfócitos T, através da inibição da transcrição de IL-12 (DAMIANI; SETIAN; DICHTCHEKENIAN, 1984; DAMIANI et al., 2001; PEREIRA et al., 2007).

Provavelmente, através desses mecanismos, a prednisona, neste estudo, talvez possa comprometer a resposta inflamatória crônica imune específica, o que pode estar associado a exarcebação da fase aguda e a dificuldade do aparecimento de uma resposta inflamatória crônica. O mesmo ocorre com pacientes portadores de doenças crônicas que fazem uso de corticoides de maneira contínua, o que pode ocasionar na reagudização de processos infecciosos cronificados (BOURGARIT; LORTHOLARY, 2011). Por outro lado, sabe-se que o alastramento da infecção pode, *per si*, pode justificar o aumento de polimorfonucleares locais, sobretudo devido à liberação de lipopolissacarídeos (LPS) e formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) das bactérias, o que funciona como fatores quimiotáticos para polimorfonucleares neutrófilos (HIDALGO et al., 2015; FINCK et al., 1998).

O pico de infiltrado inflamatório polimorfonuclear observado no 14º dia parece ser importante para o desenvolvimento da lesão periapical. Neutrófilos são células fagocíticas que migram para os tecidos inflamados atuando na defesa imune inata contra a invasão bacteriana. Entretanto, ativadas ou após sua degranulação, essas células liberam enzimas degradativas e citocinas potentes, tais como IL-1 β e TNF- α , o que resulta em um estresse oxidativo que pode causar destruição tecidual e dificultar o aparecimento da inflamação crônica (NAKAMURA et al., 2002; TAKAHASHI, 1998). Tal evidência apoia a possibilidade de que os PMN possam desempenhar um papel importante na destruição óssea em lesões perirradiculares (TAKAHASHI, 1998). No presente estudo, o pico de polimorfonucleares neutrófilos observado no 14º dia coincide com os dias em que houve maior contagem de osteoclastos e maior área radiolúcida sugestiva de lesão, o que pode corroborar, portanto, esses resultados anteriores.

No dia 0 do protocolo experimental independente do grupo nenhum animal exibiu escore de imunomarcção para IL-1 β . O grupo tratado com prednisona apresentou aumento significativo da imunomarcção para IL-1 β a partir do dia 14 e quantidade de imunomarcção foi significativamente maior no grupo prednisona que no grupo salina neste mesmo período. Como descrito anteriormente, a suprarregulação de IL-1 β pode estar diretamente associada à quantidade de PMN, uma vez que estas células, quando ativadas, produzem essa citocina (NAKAMURA et al., 2002; TAKAHASHI, 1998).

A IL-1 β é um dos principais mediadores inflamatórios relacionados à reabsorção óssea periapical tanto nas fases ativas quanto nas fases crônicas no desenvolvimento da lesão periapical (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; METZGER et al., 2002; TAKAHASHI, 1998). A expressão continua em níveis elevados IL-1 β em lesões crônicas podem evitar a formação de osso cicatricial (STASHENKO et al., 1994).

A expressão de IL-1 β no desenvolvimento da periodontite apical experimental em ratos ainda é controverso. Alguns autores relatam que a IL-1 β é uma citocina característica da periodontite apical em humanos, enquanto que no modelo experimental de ratos a IL-1 α seria predominante, no entanto, recentemente, este assunto vêm sendo questionado. Células positivas para IL-1 β não foram observadas na polpa ou em lesões periapicais no período do dia 0 ao dia 30 em animais (STASHENKO et al., 1994; TANI-ISHII; WANG; STASHENKO, 1995).

No entanto, Matsumoto; Anan e Maeda (1998) demonstraram em seu estudo a presença de células positivas para IL-1 β , embora o número de células IL-1 α ter sido duas vezes mais presentes que o número de IL-1 β , no período entre 3 e 14 dias, mostrando decréscimo significativo dessa relação aos 28 dias após a periodontite apical induzida.

Recentemente, estudos evidenciaram um aumento acentuado nos níveis de marcação de IL-1 β em modelos de periodontite apical induzida em ratos durante a fase de inflamação aguda (LU et al., 2015). Além do que, estudos em humanos e ratos tem demonstrado que o bloqueio ou inibição de IL-1, de ambas as suas isoformas, foram capazes de inibir de forma significativa o tamanho das lesões periapicais (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998; METZGER et al., 2002).

Em relação ao estudo do colágeno, o grupo salina apresentou aumento significativo da área marcada por picosirius red, representativa de colágeno total, durante todo o período avaliado, já os grupos tratados com prednisona, mostrou um aumento significativo só no 14º dia, sem diferença significativa entre os grupos em nenhum momento analisado.

O colágeno é a principal proteína degradada durante o desenvolvimento da periodontite periapical e as MMPs são enzimas chave nesse processo de degradação da matriz. Essas enzimas são secretadas por uma variedade de células de defesa, tal como os PMN, fibroblastos, macrófagos e queratinócitos (TAKAHASHI, 1998).

O colágeno I é o mais comum dos tipos de colágeno, estando presente em estruturas rígidas como tendões, ossos e cartilagens, enquanto o tipo III está em abundância em órgãos relacionados com elasticidade, como pulmão e vasos sanguíneos (BARASCUK et al., 2011; COUDROY et al., 2015). O primeiro tipo de colágeno (I) configura-se como um importante componente da matriz óssea, auxiliando na formação dos cristais de apatita e conferindo suporte estrutural, flexibilidade e resistência a tração para o osso neorformado (LINDER et al., 2015).

Sobre a fenotipagem do colágeno, por meio de polarização de luz, pôde-se observar que o grupo prednisona mostrou significativamente uma redução da área referente a birrefringência vermelho-amarelada, correspondente ao colágeno tipo I e concomitantemente, um aumento no percentual de área com birrefringência verde-esbranquiçada, colágeno do tipo

III, ambos no dia 28, tanto ao longo do tempo, como quando comparado ao grupo salina neste mesmo período de tempo. Tais achados são compatíveis com o estudo de Klinge, Farman e Fiebeler (2010), os quais descrevem, em um modelo de cicatrização em pele de ratos tratados com corticoide tópico em baixa e alta dosagem e analisados pelo o método de picrossirius red após polarização, que a aplicação local de GC modificou a composição dos colágenos no tecido cicatricial, no qual a quantidade de colágeno tipo I foi diminuída após altas dose de GC e de forma inversa, o colágeno tipo III foi significativamente aumentado após qualquer tratamento com GC.

Os glicocorticoides podem alterar a função dos osteoblastos fazendo com que ocorra a inibição da síntese de colágeno de tipo I, com consequente diminuição da matriz óssea disponível para mineralização. A diminuição da síntese de colágeno tipo I ocorre tanto por mecanismos de transcrição e pós-transcrição, embora ainda não sejam possíveis determinar como ocorram esses efeitos (CANALIS; DELANY, 2002).

Os estudos com corticoides na periodontite apical se baseiam, basicamente, em avaliar a sua capacidade anti-inflamatória, como possível abordagem terapêutica e não no seu uso de forma sistêmica e crônica como demonstrado no presente estudo. Não existe na literatura, até o presente momento, trabalhos que avaliem o efeito crônico dos GC na biologia do desenvolvimento da lesão apical. Este fato inviabiliza a comparação dos resultados oriundos destes estudos com diferentes metodologias.

É evidente, a partir da literatura disponível, que as respostas imunes que estão envolvidas na patogênese das lesões periapicais são complexas e variáveis. A periodontite apical é uma doença inflamatória com envolvimento ósseo, portanto, os vários efeitos dos glicocorticoides podem afetar o curso desta doença, como visto neste estudo.

Novos estudos devem ser realizados, a fim de investigar com profundidade os mediadores e células envolvidas nesse efeito crônico dos glicocorticoides sobre a doença periapical.

6. CONCLUSÃO

O glicocorticoide utilizado de forma sistêmica e crônica alterou o desenvolvimento da periodontite apical experimental induzida em ratos, principalmente no período de 14 dias.

A prednisona produziu um aumento precoce da reabsorção óssea periapical. Este efeito parece estar associado com uma exacerbação do processo inflamatório agudo, bem como com um aumento nos níveis de IL-1 β e dos osteoclastos.

Foi observado um desequilíbrio na quantidade e qualidade do colágeno, com diminuição do colágeno tipo I e aumento do colágeno tipo III nos animais sob corticoterapia crônica.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, T. A. *et al.* The inflammatory stimulus of a natural latex biomembrane improves healing in rats. **Braz J Med Biol Res** 44:1036–1047, 2011
- BARASCUK, N. *et al.* Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of a specific MMP-9 mediated degradation fragment of type III collagen — A novel biomarker of atherosclerotic plaque remodeling. **Clinical Biochemistry**, v. 44, n. 10-11, p. 900–906, 2011.
- BEHARI, J.; BEHARI, J. Changes in bone histology due to capacitive electric field stimulation of ovariectomized rat. **The Indian journal of medical research**, v. 130, n. 6, p. 720-725, 2009.
- BELIBASAKIS, G. N.; RECHENBERG, D. K.; ZEHNDER, M. The receptor activator of NF- κ B ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. **International endodontic journal**, [S.l.], v.46, p.99 – 111, Aug 2012.
- BETTES, P. S. L. **Análise comparativa histológica e tensiométrica entre a cicatrização de feridas cutâneas tratadas com o adesivo octil-2-cianoacrilato e com sutura intradérmica em ratos.** 2003. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) — Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BEURDEN, A. van *et al.* Periodic acid Schiff loops and blood lakes associated with metastasis in cutaneous melanoma. **Melanoma Research**, v. 22, n. 6, p. 424-429, 2012.
- BORBA, E. F. *et al.* Consensus of Systemic Lupus Erythematosus. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n. 4, p. 196 – 207, Aug 2008.
- BOURGARIT, A.; LORTHOLARY, O. Risk of reactivation or exacerbation of an infectious disease during iatrogenic immunosuppression or immune reconstitution. **La Revue du praticien**, v. 61, n. 8, p. 1051 – 1055, Oct 2011.
- BOYCE, B. F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 473, p. 139-146, 2008.
- BRIZENO, L. A. C. *et al.* Delayed healing of oral mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF- α , IL-1 β and FGF-2. **Life Sciences**, v. 155, p. 36 – 47, 2016.
- CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of Glucocorticoid Action in Bone. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, [S.l.], v.966, p.73 – 81, 2002.
- CAVAGNI, J. *et al.* The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Brazilian oral research**, v. 19, n. 4, p. 290 – 294, Dec 2005.

CINTRA, L. T. A. et al. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. **International endodontic journal**, [S.l.], v.47, p.228 – 37, 8 2014.

COUDROY, R. et al. Use of Type III procollagen measurement as predictor of lung fibroproliferation in ARDS: early measurement for earlier antifibroproliferative therapy? **Intensive care medicine**, v. 41, n. 6, p. 1159–60, jun. 2015.

COUTINHO, A. E.; CHAPMAN, K. E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 335, n. 1, p. 2 – 13, Mar 2011.

DAMIANI, D. et al. Corticoterapia e suas repercussões: a relação custo–benefício. **Jornal de pediatria**, São Paulo, v.1, p.71 – 82, 2001.

DAMIANI, D.; SETIAN, N.; DICHTCHEKENIAN, V. Corticosteróides - conceitos básicos e aplicações clínicas. **Jornal de pediatria**, São Paulo, v.6, p.160 – 166, 1984.

EZZAT, B. A.; ABBASS, M. M. The ability of H1 or H2 receptor antagonists or their combination in counteracting the glucocorticoid-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Oral pathology & medicine**, v. 43, n. 2, p. 148 – 156, Feb 2014.

FINCK, C. M. et al. Endotoxin-stimulated alveolar macrophage recruitment of neutrophils and modulation with exogenous surfactant. **Critical care medicine**, v. 26, n. 8, p. 1414 – 1418, Aug 1998.

FRANCHIMONT, D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1024, p. 124 – 137, Jun 2004.

GOES, M. C. van der; JACOBS, J. W.; BIJLSMA, J. W. The value of glucocorticoid co-therapy in diferente rheumatic diseases–positive and adverse effects. **Arthritis research therapy**, [S.l.], v.16 Suppl 2, jan 2014.

GRAUNAITE, I.; LODIENE, G.; MACIULSKIENE, V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. **Journal of oral maxillofacial research**, [S.l.], v.2, Jan 2014.

HARRIS, E. et al. The Prediction and Monitoring of Toxicity Associated with Long-Term Systemic Glucocorticoid Therapy. **Current rheumatology reports**, v. 17, n. 6, p. 513 – 522, Jun 2015.

HIDALGO, M. A. et al. fMLP-Induced IL-8 Release Is Dependent on NADPH Oxidase in Human Neutrophils. **Journal of immunology research**, Oct 2015.

HOFBAUER, L. C.; HEUFELDER, A. E. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **Journal of molecular medicine** (Berlin, Germany), [S.l.], v.79, p.243 – 53, Aug 2001.

JIA, D. et al. Glucocorticoids Act Directly on Osteoclasts to Increase Their Life Span and Reduce Bone Density. **Endocrinology**, v. 147, n. 12, p. 5592 – 5599, Dec 2006.

JILKA, R. L.; NOBLE, B.; WEINSTEIN, R. S. Osteocyte apoptosis. **Bone**, v. 54, n. 2, p. 264-271, 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U., JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.

KALIA, S.; MELSEN, B.; VERNA, C. Tissue reaction to orthodontic tooth movement in acute and chronic corticosteroid treatment. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 7, n. 1, p. 26 – 34, Feb 2004.

KANEKO, K. et al. Changes of Serum Soluble Receptor Activator for Nuclear Factor- B Ligand after Glucocorticoid Therapy Reflect Regulation of Its Expression by Osteoblasts. **J Clin Endocrinol Metab**, [S.l.], v.97, n.10, p.1909 – 1917, October 2012.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, p. 5050-5055, 2001.

KIMACHI, K. et al. Zoledronic acid inhibits RANK expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, [S.l.], v.383, p.297 – 308, Jan 2011.

KLINGE, U.; FARMAN, N.; FIEBELER, A. Evaluation of the collaborative network of highly correlating skin proteins and its change following treatment with glucocorticoids. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, v. 7, n. 16, p. 1 – 10, 2010.

KNOP, L. A. H. et al. Non-steroidal and steroidal anti-inflammatory use in the context of orthodontic movement. **European Journal of Orthodontics**, [S.l.], v.34, p.531 – 535, 2012.

KONDO, T. et al. Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. **Journal of cellular biochemistry**, [S.l.], v.103, p.335 – 45, 5 2008.

KUHN, A. et al. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 112, n. 25, p. 423 – 432, Jun 2015.

LINDER, R. et al. Serum metalloproteinase-9 is related to COPD severity and symptoms - cross-sectional data from a population based cohort-study. **Respiratory research**, v. 16, n. 1, p. 28 –, Feb 2015.

LIU, L. et al. The expression of MCP-1 and CCR2 in induced rats periapical lesions. **Archives of oral biology**, [S.l.], v.59, p.492 – 9, Mar 2014.

LU, B. et al. Expression of Interleukin-1b and Matrix Metalloproteinase-8 in Cytolytic and Noncytolytic Enterococcus faecalis-induced Persistent Apical Periodontitis: A Comparative Study in the Rat. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 8, p. 1288 – 1293, Aug 2015.

MATSUI, H. et al. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. **International endodontic journal**, [S.l.], v.44, p.739 – 45, 3 2011.

MATSUMOTO, A.; ANAN, H.; MAEDA, K. An immunohistochemical study of the behavior of cells expressing Interleukin-1 α and Interleukin-1 β within experimentally induced periapical lesions in rats. **Journal of endodontics**, v. 24, n. 12, p. 811 – 816, Dec 1998.

METZGER, Z. et al. Periapical Lesion Development in Rats Inhibited by Dexamethasone. **Journal of endodontics**, v. 28, n. 9, p. 643 – 645, Sep 2012.

MEYER-HOFFERT, U; WIEDOW, O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. **Current Opinion in Hematology**, v. 18, n.1, p. 19-24, 2011.

NAKAMURA, K. et al. Effect of methotrexate-induced neutropenia on pulpal inflammation in rats. **Journal of endodontics**, v. 28, n. 4, p. 287 – 290, Apr 2012.

NOBUHARA, W. K.; CARNES, D. L.; GILLES, J. A. Anti-inflammatory effects of dexamethasone on periapical tissues following endodontic overinstrumentation. **Journal of endodontics**, [S.l.], v.19, p.501 – 7, 10 1993.

O'BRIEN, C. A. et al. Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1835–1841, 2004.

OLCZAK-KOWALCZYK, D. et al. The status of dental and jaw bones in children and adolescents after kidney and liver transplantation. **Annals of transplantation**, v. 17, n. 4, p. 72 – 81, Dec 2012.

OLIVEIRA, C. M. B. de et al. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, [S.l.], v.61, n.2, p.255 –265, 2011.

PEREIRA, A. L. C. et al. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, [S.l.], v.35, n.1, p.35 – 50, 2007.

POPA, C, et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **The Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 751-762, 2007.

PRIETO, A. K. C. **Metabolismo oxidativo sérico em ratos diabéticos com lesão periapical**. 2014. Dissertação (Mestrado em Endodontia) — Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

RAHDE, N. D. M. **Efeitos dos bisfosfonatos nitrogenados sobre o osso alveolar**. 2010. Tese (Doutorado em Estomatologia) — Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul.

RAMOS-REMUS et al. Prednisone Induces Cognitive Dysfunction, Neuronal Degeneration, and Reactive Gliosis in Rats. **J Investig Med**. v.50, n.6, p.458-64, Nov, 2002.

SALLAY, K. et al. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. **Infection and immunity**, v. 43, n. 3, p. 1091 – 1093, Mar 1984.

SATO, E. I. et al. Brazilian consensus for the treatment of systemic erythematous lupus. **Revista brasileira de reumatologia**, [S.l.], v.42, n.06, p.362-370, Dez, 2002.

SILVA, P. G. de B. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of oral biology**, v. 60, p. 1237 – 1245, 2015.

SILVA, T. A. et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of dental research**, [S.l.], v.86, p.306-19, Mar 2007.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. **Brazilian dental journal**, [S.l.], v.18, p.267 – 80, Feb 2008.

SODEK J, MCKEE ME. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**, v. 24, p.99-126. 2000.

STASHENKO, P. et al. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, [S.l.], v.78, p.494 – 502, oct 1994.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endodontics & dental traumatology**, v. 6, n. 3, p. 89 – 96, Jun 1990.

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. Periapical inflammatory responses and their modulation. **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, [S.l.], v.9, p.498 – 521, Nov 1998.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International endodontic journal**, [S.l.], v.31, p.311 – 25, Nov 1998.

TANI-ISHII, N.; WANG, C. Y.; STASHENKO, P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. **Oral microbiology and immunology**, v. 10, n. 4, p. 213 – 219, Aug 1995.

TEIXEIRA, R. C. **Análise radiográfica e histopatológica da inflamação pulpar e reabsorção óssea periapical induzidas em ratos Wistar**. 2007. Dissertação (Mestrado em Estomatologia) — Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo, Bauru-SP.

TIMM, L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, v. 2, n. 1, p. 231 - 239, 2005.

WANG, C. Y.; STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in induced periapical lesions. **Journal Dental Research**, v.70, p.1362- 1366, 1991.

WANG, L.; PENG, B. Correlation between platelet-derived growth factor B chain and bone resorption in rat periapical lesions. **Journal of endodontics**, [S.l.], v.33, p.709 – 11, May 2007.

WATERMAN Jr, P. A. et al. Development of periradicular lesions in immunosuppressed rats. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics**, v. 85, n. 6, p. 720 – 725, Jun 1998.

WOLLE, C. F. B. et al. Outcome of Periapical Lesions in a Rat Model of Type 2 Diabetes: Refractoriness to Systemic Antioxidant Therapy. **Journal of endodontics**, v. 39, n. 5, p. 643 – 647, May 2013.

WOWERN, N. V.; KLAUSEN, B.; OLGAARD, K. Steroid-induced mandibular bone loss in relation to marginal periodontal changes. **Journal of clinical periodontology**, v. 19, n. 3, p. 182– 186, Mar 1992.

XIONG, H. et al. Effect of alendronate on alveolar bone resorption and angiogenesis in rats with experimental periapical lesions. **International Endodontic Journal**, [S.l.], v.43, p.485 – 91, 2010.

XIONG, H.; WEI, L.; PENG, B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. **Journal of endodontics**, [S.l.], v.35, p.216 – 20, Jan 2009.

ZHANG, Y. H. et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. **The Journal of biological chemistry**, [S.l.], v.276, p.563 – 8, Oct 2000.

ANEXO



Universidade Federal do Ceará
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
 Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CORTICOTERAPIA SISTÊMICA CRÔNICA NO DESENVOLVIMENTO DA PERIODONTITE APICAL EM RATOS.”, protocolo n° 38/2016, sob responsabilidade do Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 26 de março de 2016.

Vigência do projeto	15/01/2015 a 31/12/2016
Espécie/Linhagem	Rato heterogênico
N° de Animais	100
Peso/Idade	180g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 26 de março de 2016

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira
 Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
 RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
 COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
 ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734