

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Alessandra Nogueira Porto

**EFEITO DO ESTRESSE COMO FATOR ISOLADO OU
ASSOCIADO À INGESTÃO DE ÁLCOOL SOBRE A DOENÇA
PERIODONTAL. E, IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO
ESTRESSE-PERIODONTITE SOBRE O SISTEMA NERVOSO
CENTRAL E PERFIL LIPÍDICO**

Taubaté-SP

2010

UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ

Alessandra Nogueira Porto

EFEITO DO ESTRESSE COMO FATOR ISOLADO OU ASSOCIADO À INGESTÃO DE ÁLCOOL SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL. E, IMPACTO DA ASSOCIAÇÃO ESTRESSE-PERIODONTITE SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERFIL LIPÍDICO

Tese apresentada para obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli.

Co-orientador: Prof. Dr. Alex Semenovff Segundo.

Taubaté-SP

2010

ALESSANDRA NOGUEIRA PORTO

Data: _____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Universidade _____

Assinatura _____

O meu agradecimento eterno:

Aos meus pais Eduardo e Odete pelo amor incondicional.

Ao meu eterno amor Glauco pelo carinho e por compreender as
minhas ausências.

E aos meus sobrinhos – a alegria da minha vida: Isabella, Gabriela,
Alice e Lucas.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Sheila Cavalca Cortelli, Coordenadora da Periodontia da UNITAU, pela confiança, disponibilidade e, principalmente pelo carinho ao longo do Doutorado.

Ao Prof. Dr. Alex Semenoff Segundo pela amizade e confiança ao longo de todos esses anos.

Ao Prof. Dr. José Roberto Cortelli, Pró-reitor de Pesquisa e Pós-graduação da UNITAU, pelo exemplo de dedicação à Odontologia.

À Profa. Dra. Ana Christina Claro Neves, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UNITAU, pela dedicação aos alunos.

À Pró Reitora Acadêmica Profa. Ms. Elizabet Aguirre do Centro Universitário de Várzea Grande- UNIVAG pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Silas Borges pela disponibilidade e amizade.

À Profa. Dra. Giana Lima, Coordenadora do Curso de Odontologia do UNIVAG por toda ajuda e compreensão das minhas ausências.

As minhas amigas Suzi e Denise pela grande amizade, carinho e paciência.

Ao Centro Universitário de Várzea Grande - UNIVAG pelo apoio financeiro através da bolsa concedida.

PORTO AN. Efeito do estresse como fator isolado ou associado à ingestão de álcool sobre a doença periodontal. E, impacto da associação estresse-periodontite sobre o Sistema Nervoso Central e perfil lipídico [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010.115f.

RESUMO

A relação do estresse com a Odontologia e mais especificamente com a Periodontia não é recente. E, além do estresse, outros problemas sistêmicos têm sido associados com a condição bucal. **Objetivos:** os objetivos destes estudos em ratos foram: 1) Analisar o impacto de dois modelos de estresse crônico na modulação da doença periodontal; 2) Avaliar o efeito da ingestão de álcool etílico associado ao estresse crônico na gravidade da periodontite induzida; 3) Avaliar o efeito da periodontite associada a estresse crônico sobre o sistema nervoso central (SNC); 4) Avaliar o efeito de dois modelos de estresse associados à periodontite sobre o perfil lipídico. **Método:** Para analisar o impacto do estresse crônico na modulação da doença periodontal (estudo 1) foi realizado o ensaio de estresse físico e estresse variável e após dez dias a periodontite foi induzida por ligadura nos grupos específicos. Decorridos sessenta dias os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica de perda de inserção e reabsorção óssea. Para o estudo 2 selecionou-se 24 animais adultos Lewis os quais foram divididos aleatoriamente em três grupos (n=8/grupo): GAL- álcool + ligadura, GASL- álcool + estresse físico crônico + ligadura e GCN- controle negativo. Após a divisão, os animais GAL e GASL foram submetidos à ingestão de álcool etílico a 20% *ad libitum* e GCN recebeu água *ad libitum*, durante sessenta dias. No dia seguinte ao início da ingestão de álcool etílico pelos respectivos grupos foi realizado o procedimento de indução da doença periodontal, exceto no grupo GCN. O estudo 3 hipotetizou que a indução de periodontite por ligadura em ratas estressadas afetaria a resposta do SNC. Selecionaram-se 48 animais Wistar divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=12/grupo): GLSP- ligadura + estresse físico crônico, GLSV- ligadura + estresse variável crônico, GL- ligadura e GCN- controle negativo. Iniciou-se o ensaio de estresse físico (SP) e estresse variável (SV) e após dez dias a periodontite foi induzida por ligadura nos grupos específicos. Decorridos cinquenta dias da colocação da ligadura, um examinador cegado submeteu os animais aos testes comportamentais de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Por sua vez, o estudo 4 comparou o efeito de dois modelos de estresse crônico associado à periodontite induzida por ligadura, sobre parâmetros parciais do perfil lipídico. Selecionaram-se 48 animais adultos Wistar, divididos aleatoriamente em quatro grupos: GPSL - estresse físico crônico, GVSL - estresse variável crônico, GL - ligadura e GC - controle negativo. Realizou-se o estresse físico e estresse variável durante sessenta dias. Decorridos dez dias do início do ensaio de estresse, a periodontite foi induzida por ligadura nos grupos específicos. E, decorridos sessenta dias do experimento foi realizado a punção sanguínea a vácuo. Foi realizado a

análise dos parâmetros: VLDL, HDL, triglicérides e colesterol. Compararam-se as médias do perfil lipídico dos grupos experimentais utilizando-se análise de Variância (ANOVA) e o teste Tuckey para as comparações entre os grupos. Todos os testes tiveram um nível de significância de 5%. **Resultados:** No estudo 1, no lado da indução por ligadura, o estresse físico apresentou perda de inserção e óssea significativamente maiores que o estresse variável, controle positivo e controle negativo (testes ANOVA e Bonferroni; $p < 0,05$). A análise dos dados no estudo 2 (ANOVA e Tuckey; $p < 0,05$) demonstrou que o grupo com maior destruição periodontal foi o grupo que consumiu álcool associado a ligadura (GAL), seguido pelo grupo de animais estressados que também consumiu álcool associado a ligadura. O grupo controle negativo (GCN) exibiu a melhor condição periodontal. O parâmetro da análise do estudo 3 foi para o campo aberto o número de segmentos centrais e periféricos percorridos, o número de vezes que o animal se manteve em duas patas sem apoio e a quantidade de auto-limpeza (coçar o nariz). Para o labirinto em cruz o número de entradas nos braços, assim como o tempo de permanência nos respectivos locais foram observados. A análise pelos testes ANOVA e Tuckey ($p < 0,05$), não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos considerando-se o teste neurológico campo aberto ($p < 0,05$), demonstrando ausência de alterações do SNC. Os resultados obtidos no estudo 4 para o parâmetro lipídico colesterol, o grupo estresse variável + ligadura (VSL) mostrou-se com menor média, confirmando diferenças estatísticas em relação aos grupos ligadura (GL) e controle negativo (GC). O grupo estresse físico + ligadura (PSL) apresentou-se com ausência de diferenças estatísticas comparado aos demais grupos; o parâmetro triglicérides obteve a maior média para o controle negativo (GC) comparativamente a estresse variável + ligadura (VSL) e estresse físico + ligadura (PSL). O VLDL apresentou-se sem diferenças estatísticas entre o estresse físico (PSL) e estresse variável (VSL); situação semelhante entre ligadura (GL) e controle negativo (GC). O VSL apresentou o menor valor médio para VLDL e obteve diferenças estatísticas comparado com os ligadura (GL) e controle negativo (GC). O parâmetro HDL demonstrou ausência de diferenças estatísticas entre os grupos. **Conclusões:** Conclui-se no estudo 1 que o estresse físico proporcionou maior destruição periodontal. No estudo 2, os fatores álcool-estresse não pareceram ter efeito sinérgico uma vez que o grupo exposto isoladamente ao álcool apresentou a pior condição periodontal. Embora quando associados os fatores estresse/periodontite não tenham afetado o SNC no estudo 3, isoladamente a indução de periodontite por ligadura teve efeito sobre o mesmo. Finalmente, de forma geral parece que o estresse associado à periodontite induzida foi capaz de diminuir indicadores em parâmetros lipídicos.

Palavras-chave: Estresse fisiológico; Periodontite; Fatores de risco.

PORTO AN. Effect of stress as a factor alone or associated with the ingestion of alcohol on periodontal disease. And, the impact of stress-periodontitis association in the Central Nervous System and lipid profile [Tese de doutorado]. Taubaté: Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2010.115f.

ABSTRACT

The relationship of stress with the dental and more specifically to Periodontics is not recent. And, in addition to stress, other systemic problems have been associated with oral health condition. The aims of this animal studies were: 1) analyze the impact of two models of chronic stress in the modulation of periodontal disease, 2) evaluate the effect of alcohol consumption associated with chronic stress on the severity of induced periodontitis, 3) evaluate the effect of chronic stress-associated periodontitis on the central nervous system (CNS), and 4) evaluate the effect of two models of periodontitis-associated stress on the lipid profile. **Method:** To analyze the impact of chronic stress in the modulation of periodontitis (study 1), we tested the physical stress and variable stress in specific groups after ten days of periodontitis, induced by ligation. The animals were euthanized after sixty days for histological analysis of attachment loss and bone loss. The second study involved selection of 24 adult animals Lewis, which were divided randomly into three groups (n = 8/group): GAL-alcohol + ligature, GASL-alcohol + stress physical chronic + ligature and group GCN - negative control group. The GAL and GASL animals were subjected to ingestion of 20% ethyl alcohol ad libitum for sixty days, while the GCN animals received water ad libitum for sixty days. The procedure for induction of periodontal disease was carried out the day after initiation of alcohol intake (or water for the GCN group). The third study was designed to test the hypothesis that ligature stress-induced periodontitis in rats affects responses of the CNS. We divided 48 animal Wistar randomly into four groups (n = 12/group): GLSP-ligature + physical stress chronic; GLSV-ligature + variable stress chronic; GL-ligature and GCN-negative control. Physical stress (PS) and variable stress (VS) were initiated after ten days of ligation-induced periodontitis. After fifty days of ligation, an examiner blinded to the experimental groups performed elevated-plus-maze and open-field behavioral tests on the rats. The fourth study compared the effect of two models of chronic stress associated with periodontitis induced in rats on partial parameters of the lipid profile. We randomly divided 48 adult animals Wistar into four groups: GPSL—ligature + physical stress chronic; GVSL — ligature + variable stress chronic; GL — ligature and GCN — control negative. These groups were subjected to physical stress and variable stress for sixty days. After the first ten days of the stress test,

periodontitis was induced by ligature in the specified groups. After sixty days of experimentation, the animals blood punctures were performed under a vacuum. The analysis of the parameters, including: VLDL, HDL, triglycerides and cholesterol. The averages of the lipid profiles of the experimental groups were compared using analysis of variance (ANOVA) and the Tuckey test was used for the comparisons between groups. All tests had a significance level of 5%. **Result:** Study 1 On the ligature induced periodontitis side, physical stress presented significantly greater histological attachment loss and also greater bone loss ($p < 0.05$) than variable stress, positive control and negative control (test ANOVA and Bonferroni; $p < 0.05$). Study 2 the data were analyzed (ANOVA and Tuckey; $p < 0.05$), the group with greater periodontal destruction revealed by analysis of the parameters histological attachment loss and bone loss was the group alcohol associated with ligation (GAL), followed by alcohol group associated with stress and ligature (GASL) and negative control group (GCN). Study 3 The number of central and peripheral segments flown, the number of times the animal stood on two legs without support and the amount of self-cleaning (itchy nose) were used as analysis parameters for the open-field test. The number of arm entries and the time spent on sites were measured for the maze test. The data were analyzed by ANOVA and Tuckey ($p < 0.05$). Our analysis showed no statistically significant differences between the groups in the neurological open-field test ($p < 0.05$), indicating that stress-induced periodontitis did not affect the CNS performance of these animals. Although these findings indicate that factors associated with stress and periodontitis did not affect the CNS in isolation. Study 4 The lipid parameters and cholesterol were significantly lower in the variable stress group than in the ligature and negative control groups. The physical stress group was not statistically different from the other groups. The triglyceride level was highest for the negative control group and statistically different from the levels in groups variable stress and physical stress. The physical stress group had the lowest triglyceride level, which was statistically different from that of the negative control group. There was no statistical difference between physical stress and variable stress with respect to VLDL; a similar finding was obtained for ligature and negative control. The variable stress group had the lowest VLDL level, which was statistically different from those of the ligature and negative control groups. HDL showed no statistical differences between groups. **Conclusion:** Study 1 it may be concluded that physical stress modulated the response pattern to experimentally induced periodontitis in rats since greater periodontal breakdown was observed in the ligature side. Study 2 Alcohol-stress factors appear to have synergistic no effect when combined since the group exposed to alcohol alone had the worst condition. Although these findings indicate that factors associated with stress and periodontitis did not affect the CNS (Study 3) in isolation, the ligature induction of periodontitis did affect the CNS. In conclusion, despite the limitations of the methodology, it seems that the stress model variable associated with periodontitis improved lipid parameters in the study.

Keywords: Physiological stress; Periodontitis; Risk factors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ESTRESSE E DOENÇA PERIODONTAL	15
2.2 ESTRESSE, INGESTÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO E DOENÇA PERIODONTAL	17
2.3 ESTRESSE, DOENÇA PERIODONTAL E SISTEMA NERVOSO CENTRAL	20
2.4 ESTRESSE, DOENÇA PERIODONTAL E PERFIL LIPÍDICO	24
3 PROPOSIÇÃO	28
4 CAPÍTULO 1	30
4.1 EFFECT OF TWO CHRONIC STRESS MODELS ON THE INFLUENCES OF LIGATURE-INDUCED PERIODONTITIS IN WISTAR RAT	30
5 CAPÍTULO 2	51
5.1 EFEITO DA INGESTÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO ASSOCIADO AO ESTRESSE CRÔNICO NA GRAVIDADE DA PERIODONTITE: ESTUDO EM MODELO ANIMAL	51
6 CAPÍTULO 3	68
6.1 EFEITO DA PERIODONTITE INDUZIDA POR LIGADURA EM RATAS SUBMETIDAS A ESTRESSE CRÔNICO SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)	68
7 CAPÍTULO 4	85
7.1 LIPID PROFILE PARAMETERS UNDER INFLUENCE OF PERIODONTITIS ASSOCIATED WITH CHRONIC STRESS: AN ANIMAL MODEL STUDY	85
8 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103
ANEXOS	110

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As doenças periodontais são infecções intimamente associadas à colonização de microrganismos patogênicos na área subgengival, causando inflamação, que pode levar a destruição dos tecidos periodontais. Contudo, o estabelecimento e gravidade da doença parecem resultar da interrelação entre a resposta do hospedeiro com a microbiota bacteriana (Seymour, 1991).

As doenças periodontais não afetam uniformemente todos os indivíduos de uma população, como foi sugerido no estudo de Løe et al. (1965), que observaram enorme variabilidade entre os indivíduos em seus índices de desenvolvimento e progressão da doença periodontal, indicando que alguns fatores de risco aumentam a chance de ocorrência da doença periodontal. Portanto, existem condições de natureza comportamental, ambiental e/ou biológica que podem influenciar tanto o estabelecimento quanto a progressão da doença. Trabalhos da literatura mostram de modo consistente que o fumo, diabetes mellitus não controlado e infecções com patógenos periodontais específicos, aumentam o risco a doença periodontal (Grossi et al., 1994; Taylor, 2001; Albandar, 2002). Todavia, outros fatores como o estresse, a osteoporose e a obesidade exibem menor evidência científica tendo sido identificados até o momento apenas como indicadores de risco para periodontite (Genco, 1996).

O estresse está universalmente presente no cotidiano da humanidade, sendo que há uma variação dos graus de estresses apresentados pelas pessoas. Paralelamente, os efeitos do estresse afetam os indivíduos de maneira distinta

(Jolanta et al., 2002). Interessantemente, o grau de estresse apresentado pelo indivíduo pode ser modificado pelo mecanismo de enfrentamento e pela presença ou ausência do suporte social (Aleksenjuniené et al., 2002).

Seyle (1976) definiu o estresse como um estado de resposta do organismo a forças que agem simultaneamente no corpo e, se excessiva – isto é, quando supera a capacidade adaptativa - leva a doença de adaptação e, eventualmente, doenças de exaustão e morte. Essas forças estressantes podem ser físicas ou mentais (exemplo: emocionais). O papel desempenhado pelo estresse no organismo tem sido alvo de vários estudos, tanto na área médica como na odontológica. Foi demonstrado por Green et al. (1986), que fatores emocionais e estresse tem relação com a etiologia da gengivite ulcerativa necrosante.

Por outro lado, Deinzer et al. (2001) mostraram que o estresse acadêmico no período de prova, levou a um aumento do acúmulo de biofilme além da redução na frequência da higienização bucal dos estudantes. Neste contexto, é importante considerar que o estresse psicológico e o biofilme bucal agem sinergicamente provocando um aumento da concentração periodontal (Deinzer et al., 2000) de interleucina 1- beta, citocina que induz a reabsorção óssea e reduz a neoformação óssea in vivo.

Ader et al. (2001) relataram que quando ocorre um estímulo cerebral, no caso do estresse emocional, existe ativação do eixo Hipotálamo Pituitário Adrenal (HPA) da qual decorre eventos importantes como a produção de cortisol que afeta a resposta imuno inflamatória predispondo o indivíduo a infecções como a doença periodontal. Alterações comportamentais associadas ao estado de estresse também podem influenciar a progressão e a gravidade da doença periodontal. Indivíduos

estressados tendem a negligenciar a higienização, aumentar o consumo de cigarros e de bebidas alcoólicas o que leva a um desequilíbrio das funções do sistema imune (Monteiro da Silva et al., 1995). E, é importante ressaltar que por si só o consumo excessivo de álcool etílico também atua como agente estressor, pois além dos fatores psicológicos envolvidos, ainda exerce forte agressão físico química ao organismo.

No Brasil, estima-se que 68% da população consomem álcool e que 11,2% são dependentes alcoólicos (Amaral et al., 2008). Além da ligação entre estresse e consumo de álcool, ensaios epidemiológicos têm relacionado à doença periodontal ao consumo de bebidas.

Tezal et al. (2004), em um estudo transversal, verificaram uma ligação entre o abuso do álcool e uma piora nos indicadores de saúde periodontal. Neste mesmo sentido, outros fatores interferem na ativação do eixo HPA e sua consequente redução imuno inflamatória (Breivik et al., 1996; Hilgert et al., 2006) decorrente da liberação de cortisol e adrenalina dos quais podemos citar a ausência de insulina e dislipidemia, que consiste na presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue. A resposta do hospedeiro associada à doença periodontal é caracterizada por aumento das proteínas de fase aguda provavelmente pela capacidade da natureza crônica da periodontite iniciar e perpetuar a elevação sistêmica de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF), IL-1, IL-6, bem como de alterar os níveis de triglicerídeos séricos e o metabolismo do colesterol (Ebersole & Cappelli, 2005).

Losche et al. (2000) demonstraram que indivíduos com hipercolesterolemia têm condição periodontal significativamente pior que indivíduos controles.

Além disso, o grau de destruição periodontal foi positivamente correlacionado com níveis lipídicos alterados (Pohl et al., 1995). Estudos em humanos, relacionando níveis de lipídeos séricos e status periodontal têm sido conduzidos e sugerem que dislipidemia é um indicador para a presença de periodontite (Saito et al., 1998; Moeintaghavi et al., 2005; Ruffail et al., 2005). Entretanto, não está claro se alterações no metabolismo lipídico são causa ou consequência da periodontite.

Assim, mais uma vez fica demonstrado que os mecanismos subjacentes a determinadas condições ou doenças, como estresse e periodontite, exibem pontos semelhantes e por vezes sobreposição de fatores. A avaliação em modelo animal do papel do estresse, isoladamente ou associado a outras variáveis de risco, na doença periodontal auxiliará o esclarecimento das observações e questionamentos provenientes de estudos epidemiológicos. Dessa forma, este trabalho justifica-se pela viabilidade de execução e pela possibilidade de contribuir com a literatura a fim de avaliar questões específicas dentro de um cenário bastante amplo e complexo que é a relação bidirecional do estresse com a doença periodontal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Um novo horizonte na Periodontia iniciou-se nos anos 90, quando emergiu o paradigma denominado Medicina Periodontia (Willians & Offenbacher, 2001). Essa nova forma de entender o processo saúde doença periodontal considera factualmente os fatores de ordem comportamental, sistêmica, genética, dentre outros, como co responsáveis pelo processo etiopatogênico. Ademais, também surgiram as evidências de associação entre a presença da doença periodontal e eventos negativos gerais, em especial eventos cardiovasculares, nascimento de bebês prematuros de baixo peso, dificuldade de controle de diabetes mellitus dentre outros (Nunn, 2003).

O estresse é considerado como um indicador de risco a doença periodontal, isto é, um possível fator associado à doença identificado em estudos caso controle e em estudos transversais. Estudos clínicos experimentais têm demonstrado que o estresse está associado com a alteração da função imunológica, aumentando a suscetibilidade a infecção, câncer, doenças auto imunes e alergia (Deinzer et al., 2000; Glaser, 2005). O estresse pode alterar o sistema imunológico (SI) pela interferência no sistema nervoso central (SNC) e no sistema endócrino (SE). O mecanismo de comunicação entre SI e o SNC ocorre por duas vias: o sistema nervoso autônomo (SNA) e o eixo HPA. O SNA enerva os órgãos do SI (nódulos linfáticos, medula óssea, timo, baço e tecidos linfóides), e o eixo HPA, por sua vez, libera neurotransmissores e hormônios que regulam a atividade de diversos órgãos e células envolvidas na resposta inflamatória (Breivik & Thrane, 2000).

Um fator que estimula a realização de estudos sobre estresse e doença periodontal é o impacto de ambas na qualidade de vida do ser humano (Genco et al., 1999). Todavia, a investigação direta em seres humanos está condicionada a dificuldades metodológicas como o controle de alguns vieses, por exemplo, ação de fatores ambientais, a complexidade da fisiologia além da própria psique humana. Assim, a adoção de modelos experimentais animais tem contribuído para o esclarecimento de questões relacionadas à interação estresse e periodonto (Takada et al., 2004).

2.1 ESTRESSE E DOENÇA PERIODONTAL

Vários estudos relatam a interferência da psique humana nas doenças, entre elas a periodontite, o que é um achado importante (Genco et al., 1999; Reiche et al., 2004; Glaser, 2005). Uma das dificuldades deste tipo de relação é a complexidade do ser humano, no que se refere ao comportamento. Neste momento estudos em animais levantam hipóteses auxiliares no conhecimento da área da Psiconeuroimunologia (PNI) (Glaser, 2005), sendo que alguns deles evidenciaram uma correlação entre a PNI e a periodontite (Breivik et al., 1996; Breivik, 2002), através do estímulo do eixo HPA.

A relação entre a condição periodontal e fatores psicossociais (como por exemplo, estresse, depressão e ansiedade) está relativamente bem estabelecida,

principalmente nos casos de gengivite ulcerativa necrosante (GUN) (Monteiro da Silva et al., 1995). Moos et al. (1996) realizaram um estudo caso controle com observações de fatores psicossociais, depressão e reação frente às dificuldades, comparando-os ao desfecho periodontal. Os autores aplicaram os questionários psicológico associado a avaliações periodontal, bioquímica e microbiológica. Os seus achados apontaram um risco de desenvolver a doença periodontal associado a problemas no trabalho e tensões no geral. Em relação às análises microbiológicas, existiram fortes correlações entre *Bacteroides. foythus* e depressão.

Buscando estudar amostras maiores, Shizukuishi et al. (1998) realizaram estudo de caso controle em trabalhadores japoneses buscando correlacionar doença periodontal com estilo de vida. Para o exame periodontal foi usado o índice periodontal comunitário (CPI) e a avaliação psicológica considerou os fatores psicossociais diários, depressão e personalidade. Os resultados demonstraram uma relação de risco entre idade, consumo de álcool e hábito de fumar, ao passo que os indicadores associados com hábitos de saúde bucal, apresentaram correlação de risco com frequência de escovação e uso de fio dental. Genco et al. (1999), em um estudo observacional transversal, relacionaram as possíveis associações entre cinco diferentes questionários de fatores psicossociais com doença periodontal, em uma amostra de 1426 indivíduos. Os parâmetros clínicos, radiográficos e microbiológicos evidenciaram uma ligação entre periodontite e estresse. Outros fatores como depressão, problemas financeiros, tabagismo, e a bactéria *B. forsythus* também exibiram relação com periodontite.

Todos estes estudos apresentam limitações, e é importante deixar claro que as evidências estabelecidas aqui, ainda não sustentam por completo a ligação entre

estresse e doença periodontal, sendo importantes estudos longitudinais em humanos e de plausibilidade biológica, principalmente em animais, para compreender melhor esta ligação.

2.2 ESTRESSE, INGESTÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO E DOENÇA PERIODONTAL

Existe uma grande variedade de fatores que influenciam a gravidade da periodontite, incluindo características individuais, fatores sociais/comportamentais, fatores sistêmicos, fatores genéticos, fatores dentários e microbianos. Os fatores sociais/comportamentais incluem tabagismo, status sócio econômico, estado nutricional, fatores psicológicos e excessivo consumo de álcool. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a mortalidade e limitação da condição funcional associada ao consumo de bebidas alcoólicas superam aquelas associadas ao tabagismo (Nunn, 2003). Nas últimas décadas, o consumo de álcool vem aumentando no mundo todo, sendo o uso abusivo mais frequente entre homens (Hornecker et al., 2003; Tezal et al., 2004).

O álcool não é armazenado no corpo, mas sim metabolizado no fígado (Lieber, 2005) resultando em altos níveis de oxigênio reativo (ROS). Embora produtos do metabolismo celular normal e conhecidos pela ação secundária no

controle de funções fisiológicas, quando produzidos excessivamente o ROS tem efeito prejudicial no sistema de defesa antioxidante celular uma vez que induz a oxidação de proteínas, lipídeos e DNA que contribui ao dano tecidual (Gahill et al., 1997; Valko et al., 2007). Em particular, a peroxidação dos lipídios, que se refere à degradação oxidativa de lipídios, tem papel importante na patogênese da doença alcoólica do fígado, progredindo para fibroses (Lieber, 2004).

Demori et al. (2006) verificaram que o estresse oxidativo hepático seguido do consumo do álcool pode ser aumentado por outros fatores de risco provocando injúrias no fígado, como por exemplo, álcool e dieta gordurosa, que observaram ter efeito adicional no dano oxidativo tecidual em modelo animal.

Recentemente, estudos em animais, indicaram que a periodontite está envolvida no aumento de ROS no nível sanguíneo (peróxido de hidrogênio e peróxido de lipídio) e que tal condição pode ser prejudicial para a saúde hepática. Tomofuji et al. (2007) afirmaram que a periodontite é um dos fatores de risco para lesões hepáticas e que o nível de peróxido de hidrogênio no sangue foi positivamente correlacionada com a gravidade da lesão hepática.

Vários trabalhos relatam que o efeito do álcool nos tecidos periodontais se alicerça na higiene pobre, explicando assim a alta incidência e maior gravidade da doença periodontal encontrada em indivíduos consumidores de álcool (Larato, 1972; Novacek et al., 1995).

Shimazaki et al. (2005) afirmaram que o álcool é considerado um importante fator de risco para várias desordens ósseas, como a redução da massa óssea e aumento na ocorrência de fraturas. Além disso, estes autores sugeriram que o abuso crônico do álcool é um grande fator de risco para osteoporose. Em outro trabalho, na

mesma linha de pesquisa, observou-se que o álcool pode afetar os tecidos periodontais através de diferentes mecanismos, um deles representado pelo efeito adverso que ele provoca na defesa do hospedeiro, decorrente da deficiência e função alterada dos neutrófilos, o que acaba por aumentar a susceptibilidade a infecções. Outros mecanismos incluem a interferência no metabolismo protéico e na cicatrização dos tecidos (Irie et al., 2008).

Tezal et al. (2001) realizaram um estudo transversal para avaliar o efeito do consumo de álcool, estratificado segundo a relação doses/semana, e gravidade da doença periodontal. Foram avaliados diversos tipos de bebidas alcoólicas (vinho, cerveja e liquor) separadamente, mas não houve diferença entre elas no que se refere aos seus efeitos sobre os tecidos periodontais. O aumento no número de doses consumidas segundo as categorias adotadas (> 5 , ≥ 5 , < 10 e ≥ 10) influenciou os resultados. Exames clínicos e microbiológicos foram realizados e os autores verificaram que o álcool não exibiu relação com a perda óssea alveolar nem com os microrganismos subgingivais, mostrou alta atividade contrária a alguns patógenos periodontais. Já o grau de sangramento gengival foi maior dentre os consumidores pesados (\geq dez doses/semana). Os resultados sugerem que o álcool parece afetar mais fortemente a gengiva e o efeito do álcool na doença periodontal, pode depender da dose, frequência, tempo e tendência a exposição.

Irie et al. (2008) realizaram um estudo em ratos, avaliando o efeito do consumo de álcool 36%, na inflamação periodontal. Foram utilizados 26 ratos divididos em quatro grupos: 1 – ingestão de álcool; 2 - álcool e indução de doença periodontal; 3 ingestão de água e 4 – indução de doença periodontal. Análises histológica e histoquímica foram realizados e os resultados mostraram que o consumo de álcool

aumentou a inflamação periodontal e especificamente a produção de TNF – alfa pelos fibroblastos do ligamento periodontal.

Embora a literatura apresentada evidencie uma relação entre estresse e consumo de álcool, assim como entre estresse e doença periodontal e entre consumo de álcool e doença periodontal, o possível efeito sinérgico entre ingestão de álcool e estresse sobre a doença periodontal ainda não foi testado.

2.3 ESTRESSE, DOENÇA PERIODONTAL E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A estimulação cerebral leva a um estímulo dos centros hipotalâmicos que, por sua vez, vão estimular especificamente áreas da parte anterior da glândula pituitária, gerando produção de alguns hormônios. O centro estimulador mais importante é o corticotrópico, responsável pela produção e armazenamento dos hormônios adenocorticotrópico (ACTH) e β -endorfina. A descarga destas substâncias no sangue estimula as glândulas adrenais a secretar uma série de hormônios do tipo glicocorticóides, sendo que o mais importante na resposta imuno inflamatória é o cortisol. Este tem ação antiinflamatória que interfere no complexo de histocompatibilidade do tipo I e II, além de atuar sobre o produto final de células natural Killer, células T supressoras ou T auxiliares, acarretando uma predisposição

facilitada para a instalação de infecções, como a doença periodontal (Breivik et al., 1996).

Seyle (1936) relatou que a origem da palavra estresse deriva da área do conhecimento da física que tem como significado tensão. O organismo, quando submetido a tensões emocionais, físicas ou químicas desencadeia uma série de eventos intra e extracelulares que promovem ativação do organismo frente a uma resposta, seja positiva ou negativa. As experiências conduzidas por Seyle incluíram mais de 1500 ratos, os quais foram submetidos a estímulos físicos e emocionais como: frio, uso de agentes químicos, privação alimentar e exaustão física. Estas tensões produziram interações neuroendócrinas que refletiram em hipertrofias ou atrofia das glândulas timo e adrenal, lesões gástrica, perda de massa corpórea, problemas no fígado, perda de apetite, taquicardia, modificação no metabolismo do carboidrato, metabolismo da glicose e metabolismo dos eletrólitos. O autor dividiu as reações em quatro fases: 1 - fase de não choque, 2 - reação de alarme, esta última não necessariamente ligada a um processo patológico, 3 - fase de resistência, na qual o organismo busca uma adaptação ao estímulo podendo até entrar em colapso e 4 - fase de exaustão, na qual o organismo revela seu limite, podendo levar a morte.

Vários modelos de estresse podem ser utilizados como método de pesquisa a fim de possibilitar o desenvolvimento dos estágios anteriormente descritos. Frequentemente, os modelos de estresse são subdivididos em físico ou variável. O estresse físico pode ser instituído através de imobilização (Peruzzo et al., 2008), imobilização associado ao frio (Shapira et al., 2000) enquanto o estresse variável pode ser instituído através da exposição a luz intermitente, isolamento por 24 horas,

exame da cavidade bucal, ambiente congestionado, odor de sangue e ruído (Susin & Rosing, 2003).

Breivik et al. (2001) evidenciaram uma relação direta entre o periodonto e as vias associadas do eixo HPA. Takada et al. (2004) realizaram estudo em ratos usando periodontite induzida associada ou não ao modelo de estresse físico intenso e observaram a existência de maior progressão de periodontite, bem como de mudanças qualitativas no infiltrado inflamatório do periodonto mediante estresse.

Peruzzo et al. (2008) investigaram o efeito do estresse crônico na perda óssea resultado da indução de periodontite por ligadura em ratos e avaliaram o impacto do estresse crônico no nível de RNA de fatores que regulam o processo inflamatório e reabsorção dos tecidos periodontais. Os autores verificaram que o estresse aumentou significativamente a perda óssea periodontal, medida histometricamente, e na expressão dos níveis de RNAm para os genes das citocinas pró inflamatórias (IL-1beta, IL-6, INF-gama, TNF-alfa) . No entanto, a literatura é controversa. Um trabalho que utilizou estresse variável moderado verificou que o estresse foi capaz de modular a periodontite, reduzindo a perda de inserção (Susin & Rosing, 2003). Semenoff–Segundo et al. (2007) também evidenciaram a natureza protetora do modelo de estresse variável em relação a doença periodontal.

Breivik (2002) elaborou uma extensa revisão da literatura de forma a sustentar uma possível ligação bidirecional entre o SNC e a doença periodontal (DP). O organismo frente a um estímulo estressor pode modular a resposta do hospedeiro por três principais caminhos: a) no primeiro, ocorre uma ativação do sistema nervoso autônomo simpático capaz de modular respostas em órgãos importantes, como timo, adrenal, medula óssea entre outros; b) no segundo, a relação existente é através do sistema nervoso sensorial em que, após o estímulo,

ocorre a produção de agentes químicos (como substância P e peptídeo gene relacionado com calcitonina-cgrp) nas porções terminais dos neurônios e c) na terceira e última ocorre à ativação do eixo HPA produzindo o hormônio ACTH, estimulante dos hormônios corticóides, sendo o principal o cortisol. Como pode se observar existe várias formas de modulação da resposta imuno inflamatória, fazendo com que o organismo possa reagir mais ou menos, de acordo com a intensidade do estímulo. No SNC, a área hipocampal possui uma série de receptores aos hormônios glicocorticóides, principais produtos produzidos pelo eixo HPA e que modulam a resposta imuno inflamatória, de forma a determinar sua homeostasia. Sob um estímulo estressante, por vezes a condição de estresse propriamente dita, haverá uma grande liberação destes hormônios, o qual sensibilizará estes receptores de forma a produzir um processo inflamatório de variável intensidade no organismo, ou seja, lesões nesta região poderão gerar desequilíbrios nessa homeostasia. Baseado nesta linha de raciocínio, em outra parte de sua tese, o autor selecionou ratos da espécie Wistar e, sob anestesia, realizou lesões no hipocampo e induziu periodontite com um fio de seda em volta da coroa do segundo molar. Em seus resultados verificou-se que o grupo com lesões no hipocampo desenvolveram destruição periodontal mais significativa.

Como a adrenal é a glândula responsável pela liberação dos glicocorticóides, é de se esperar que sua remoção leve a uma redução na produção destes hormônios. Fazendo uso destes conceitos e associando a indução de periodontite, Breivik & Thrane (2000) obtiveram os resultados que confirmaram este conceito. Outra forma descrita na literatura de avaliar a ativação do eixo HPA é trabalhar com ratos que possuem uma hiper resposta (*Ficher*) ou hipo resposta (*Lewis*), induzindo periodontite em ambas as espécies. Os resultados encontrados corroboram com os

demais achados, ou seja, os animais com maior ativação do eixo HPA, foram os animais com maior progressão de doença (Breivik et al., 2001). Em outro estudo, com metodologia semelhante, o autor induziu periodontite e implantou abaixo do escalpo de ratos, cápsulas de corticosterona com 200mg, capaz de liberar o hormônio durante sessenta dias. Em seus resultados perceberam maior destruição periodontal no grupo com o medicamento (Breivik, 2002).

Vários trabalhos associaram o estresse com a periodontite induzida, entretanto poucos tentaram associar o efeito de tais fatores (periodontite e estresse) combinados ou não sobre o SNC. É notório que este assunto é complexo, existindo a necessidade de mais estudos para compreender melhor esta ligação.

2.4 ESTRESSE, DOENÇA PERIODONTAL E PERFIL LIPÍDICO

Tradicionalmente, espera-se que as complicações sistêmicas modulem a resposta inflamatória no periodonto. Entretanto, a partir da década de 90, seguindo a recomendação da American Academy of Periodontology (1998), diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar a relação entre a doença periodontal e as disfunções sistêmicas. Agora, no sentido inverso, o papel das doenças periodontais sobre as alterações sistêmicas estaria relacionada à alta produção de citocinas pró inflamatórias, lançadas na corrente sanguínea, durante os períodos de doença periodontal ativa, que, por sua vez, estaria implicada no aparecimento ou

agravamento de diversas condições metabólicas sistêmicas (Page, 1998). As periodontites são doenças infecciosas causadas predominantemente por bactérias anaeróbias Gram negativa. O epitélio ulcerado das bolsas periodontais serve como meio de entrada para as bactérias e seus produtos na corrente circulatória, portanto, são lançados na corrente circulatória produtos da inflamação periodontal. E, de outro modo, as periodontites poderiam estimular os hepatócitos a produzir citocinas em quantidade maiores (Annals, 1996; American Academy of Periodontology, 1998).

As evidências existentes indicam que condições inflamatórias podem contribuir para o aparecimento desses distúrbios. Microrganismos periodontopatogênicos produzem endotoxinas na forma de lipopolissacarídeos que são ativadores da resposta imune destrutiva do hospedeiro. Sabe-se que a destruição dos tecidos periodontais é mediada por citocinas pró inflamatórias (IL-1, IL-6 e IL-8, TNF alfa). Essas citocinas estão suficientemente elevadas no fluido crevicular gengival para serem lançadas na corrente sanguínea, sendo detectáveis em ensaios séricos (1 a 3micro mol /l) assim, pode-se supor que, em algum nível, essas substâncias possam contribuir para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos e doenças associadas (American Academy of Periodontology, 2002; Ritchie & Kinane, 2003).

O perfil lipídico está relacionado com o metabolismo das lipoproteínas plasmáticas, as quais são compostas por lipídios (moléculas gordurosas); pacientes que demonstram uma alteração nestes exames são incluídos como sujeitos com risco elevado para desenvolver uma cardiopatia de sérias consequências, inclusive com impacto em sua qualidade de vida (Moeintaghavi et al., 2005). As anormalidades nos lipídios e lipoproteínas são extremamente comuns na população geral, e são consideradas um fator de risco altamente modificável para doenças cardiovasculares, devido à influência do colesterol, uma das substâncias lipídicas

cl clinicamente mais relevantes, na aterosclerose. Algumas formas de dislipidemia podem também predispor à pancreatite aguda.

Dislipidemia sinônimo de hiperlipidemia ou hiperlipoproteinemia, é a presença de níveis elevados ou anormais de lipídios e/ou lipoproteínas no sangue. Os lipídios (moléculas gordurosas) são transportados numa cápsula de proteína, e a densidade dos lipídios e o tipo de proteína determinam o destino da partícula e sua influência no metabolismo (Iacopino & Cutler, 2000).

Segundo Cutler et al. (1991) os fatores de risco para o desenvolvimento de arterosclerose e infarto agudo do miocárdio incluem a presença de periodontite, diabetes mellitus e certas formas de obesidade. Diabetes mellitus não controlado e dieta gordurosa excessiva podem conduzir a uma hiperlipidemia, que tem efeito profundo na função e ativação de células mielóides (Howard et al., 1987).

Os lipídeos podem interagir diretamente com as células mielóides, alterando a expressão gênica de citocinas pró inflamatórias e fatores de crescimento. É possível que anormalidades na função dos macrófagos causadas por elevações de lipídios alterem a secreção de citocinas necessárias para a cicatrização normal (Iacopino, 1995).

O estado crônico de hiperlipidemia pode prejudicar a resistência do hospedeiro a infecção bacteriana, promovendo a destruição cardiovascular, pulmonar, renal e de tecidos periodontais. Segundo Doxey et al. (1998) a presença elevada de lipídio no soro pode além disso modular a liberação de citocinas pró inflamatórias e fatores de crescimento nos ratos. O controle pobre do diabetes mellitus tipo II com hiperlipidemia tem maior inflamação gengival e tendência para

aumentar os níveis de interleucina 1 beta no fluido crevicular gengival (Cutler et al., 1991). A citocina interleucina 1 beta tem papel na regulação da resposta imune, e na estimulação do osteoclasto na perda óssea. Existem as dislipidemias primárias, de causa genética e as dislipidemias secundárias, provenientes de outros quadros patológicos, como por exemplo o diabetes mellitus. Para a realização do diagnóstico do perfil lipídico são medidos laboratorialmente os níveis plasmáticos de Colesterol total, VLDL, HDL e Triglicérides. Interessantemente, o perfil lipídico pode ser influenciado pelo estresse, fato comprovado pelos estudos clássicos de Selye (1936-1946). Por outro lado, a obesidade que é um desequilíbrio lipídico, mostra alguma relação de risco com a periodontite (Dalla-Vechia et al., 2005), além dos principais exames do lipidograma que também demonstraram esta relação (Moeintaghavi et al., 2005).

Pelo exposto, fica claro que o estresse influencia a condição sistêmica de várias formas, tornando o indivíduo mais suscetível a várias doenças, inclusive a DP. Por outro lado, não está claro se a combinação estresse-DP exerce influência sobre determinadas condições sistêmicas, uma vez que frequentemente apenas a DP isolada tem sido investigada como fator de risco sistêmico.

3 PROPOSIÇÕES

Os objetivos gerais do presente estudo em modelo animal são avaliar o papel do estresse como agente modulador da doença periodontal bem como os efeitos sistêmicos desta mesma associação estresse-periodontite. Assim, os objetivos específicos de cada delineamento experimental são:

- a) analisar o impacto de dois modelos de estresse crônico na modulação da doença periodontal;
- b) avaliar o efeito do estresse crônico associado à ingestão de álcool na gravidade da periodontite;
- c) avaliar o efeito da periodontite associada a estresse crônico sobre o sistema nervoso central (SNC);
- d) avaliar o efeito de dois modelos de estresse associados à periodontite sobre o perfil lipídico.

Hipóteses testadas:

- a) o estresse crônico físico está associado à maior gravidade da DP comparativamente ao estresse variável de mesma duração;
- b) o estresse crônico associado à ingestão de álcool provocam aumento na gravidade da periodontite;
- c) o estresse crônico associado à DP altera a resposta do SNC;

d) o estresse crônico associado à DP altera o perfil lipídico.

4 CAPITULO 1

4.1 Effect of Two Chronic Stress Models on the Influences of Ligature-Induced Periodontitis in Wistar Rat

SEMENOFF-SEGUNDO Alex¹; PORTO Alessandra Nogueira²; SEMENOFF Tereza Aparecida Dele Vedove³; BOSCO Álvaro Francisco⁴; CORTELLI Jose Roberto⁵; CORTELLI Sheila Cavalca.⁶

¹School of Dentistry of Cuiabá University - Unic-Cuiabá, MT, Brazil

²Postgraduate Program in Periodontology, Faculty of Dentistry of Taubaté, São Paulo, Brazil.

⁴Discipline of Periodontics, Department of Surgery and Integrated Clinics, School of Dentistry of Araçatuba, São Paulo State University - UNESP- Araçatuba, SP, Brazil

⁵PHD Professor, Discipline of Periodontology, Taubaté University – UNITAU-Taubaté, SP, Brazil.

Address Correspondence, Proofs and Reprint Requests to:

Prof. Dr. Alex Semenoff Segundo

Rua Professora Azélia de Mello, 318, ap.63, Ed. Renoir, Bairro Araés, 78005-700 Cuiabá, MT, Brasil. Phone: +55-65-3322-8390. e-mail: semenoff@uol.com.br

ABSTRACT

Objective: The present study to compare the influences effect of physical and variable chronic stress on ligature-induced periodontitis in rats. **Material and Methods:** Forty-eight adult Wistar rats were randomly assigned to four groups (n=12): physical stress, variable stress, positive control and negative control. The models of physical stress were immobilization and immobilization associated with exposure to cold and the models of variable stress were exposure to intermittent light, 24 hours isolation, oral cavity examination, crowded environment, smell of blood and noise. After 10 days of stress, physical stress and variable stress animals underwent experimental induction of periodontal disease. The positive control also underwent experimental induction of periodontal disease. Negative control did not receive any type of intervention. At the end of the experimental period (60 days), all animals were killed. After routine laboratorial processing, images of the histological sections were digitized and submitted to histometric measurement using two parameters: histologic attachment loss and bone loss. **Results:** On the ligature induced periodontitis side, physical stress presented significantly greater histological attachment loss and also greater bone loss ($p < 0.05$) than variable stress, positive control and negative control. On the non periodontitis side these same histological parameters did not significantly differ among groups **Conclusion:** Within the limits of this study, it may be concluded that physical stress influenced the response pattern to experimentally induced periodontitis in rats.

Key Words: Physiological stress, rats, periodontitis

INTRODUCTION

Animal studies are important resources for generating data that might help elucidate controversial issues raised by epidemiological studies. Animal models also allow researchers to run certain procedures that can not be carried out in humans. A previous study on the main pathways of stress and periodontal disease, demonstrated a direct relationship between the periodontium and the pathways associated with the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) (Breivik et al., 2001). Takada et al. (2004) using a severe stress model (12-hours physical restraint) in rats with induced periodontitis, observed the existence of an accelerated progression of periodontitis as well as qualitative changes in the periodontal inflammatory infiltrate. Another study (Susin & Rosing, 2003) demonstrated that variable, moderate, chronic stress associated with ligature-induced periodontitis modulated the disease by avoiding attachment loss. Using a similar variable-stress model (Semenoff-Segundo et al., 2007), we also observed a protective tendency; However, it was mediated by different pathways.

Several studies have examined HPA axis modulation (Moynihan, 2003; Fujioka et al., 2006). More recently, the HPA axis has been investigated for its ability to modulate periodontitis, either by avoiding periodontal attachment loss or contributing to apical migration of the junctional epithelium (Gaspersic et al., 2002; Takada et al., 2004; Breivik et al., 2006; Semenoff-Segundo et al., 2007).

Despite the large number of studies on this subject, a causal relationship between environmental factors and periodontal disease has not been established (Sheiham & Nicolau, 2000). Smoking, diabetes mellitus and stress have been

implicated as risk factors or risk indicators of periodontitis (Sheiham & Nicolau, 2000; Genco, 2004).

The epidemiological relationship between psychosocial diseases and periodontitis has been observed since the time of ancient civilizations. In addition, a lot of evidence has emerged from studies involving soldiers because they experience highly stressful situations and usually have poor oral hygiene, which may produce necrotizing ulcerative gingivitis and necrotizing ulcerative periodontitis (Monteiro da Silva et al., 1995). Methodological difficulties regarding the diagnostic determinants of somatic diseases are one of the limiting factors for establishing a correlation between stress and periodontal disease (Solis et al., 2004; Castro et al., 2006). Understanding the effects of different stress models on the periodontium in animal studies may help elucidate the biological events that are involved and produce valuable information for future human research. Moreover, this knowledge may lead to novel treatments for periodontitis and help prevent periodontal disease.

Thus, the purpose of this study was to compare the modulating effect of physical – and variable chronic stress on ligature-induced periodontitis in rats.

MATERIALS AND METHODS

Experimental groups

For the present study, 48 adult Wistar rats (*Rattus Norvegicus*) of an average initial weight of 232.81 g were selected and allowed to adapt to the new environment for four weeks (Peruzzo et al., 2008). Six animals were kept in each housing box (polyethylene 16x40x30) with standard rations and water *ad libitum* under a light/dark

cycle of 12 hours that was temperature and humidity controlled at 23° C and + 40%, respectively. The experiment was approved and registered by the ethics committee in animal experimentation.

Initially, animals were randomly divided (by the auxiliary technique) into four experimental groups, described by the following:

- 1- PS Group: physical stress (n=12).
- 2- VS Group: variable stress (n=12).
- 3- PC Group: positive control (n=12).
- 4- NC Group: negative control (n=12).

After 10 days of stress, physical stress and variable stress animals underwent experimental induction of periodontal disease (described below). The positive control also underwent experimental induction of periodontal disease; in the first 10 days of the experiment, this group was not subjected to induction of periodontitis. Beginning from the introduction of the ligature for the induction of periodontitis, the ligature remained until the end of the study and served as a retention device for oral microorganisms (Fig. 1).

Finally, the negative control group did not receive any type of intervention; however, this group was maintained in the same environment as the other groups.

Experimental periodontal disease

For the induction procedure of periodontal disease, the physical stress, variable stress and positive control animals received general anesthesia through

intramuscular administration of 0.1 ml ketamine hydrochloride (Dopalen, AgribRANDS. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) per each 100 g of body weight.

After anesthesia, a #4 sterile silk suture thread was wrapped around the second upper right molar (Semenoff-Segundo et al., 2007).

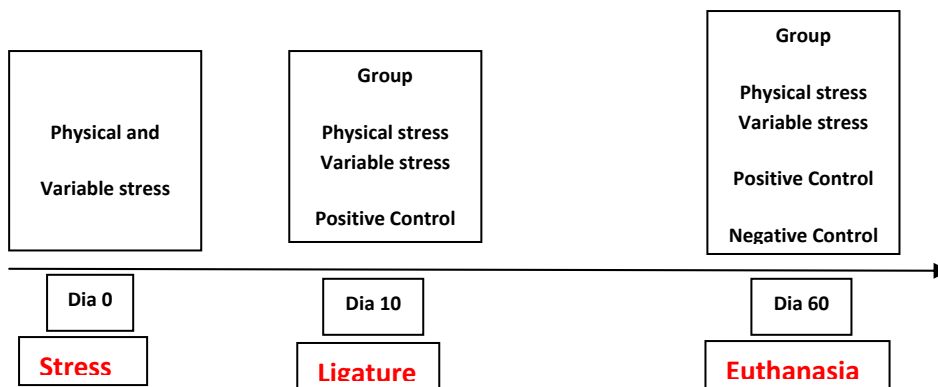


Fig. 1- Experimental procedure

Stress Induction

The models of physical stress were immobilization (Takada et al., 2004) and immobilization associated with exposure to cold (Shapira et al., 2000) applied for two months, six times a week, at various times on alternate days. The models of variable stress (Susin & Rosing, 2003; Semenoff et al., 2007) were exposure to intermittent light, 24 hours isolation, oral cavity examination, crowded environment, smell of blood and noise. One type of variable stress was conducted each day between 6:00 and 18:00.

- a) Immobilization:** The animals in the physical stress group were exposed to an average temperature of 26°C by placing them in polyvinyl chloride tubes compatible with their size. Then, the tubes were stopped up on both sides with

- metallic wire, enabling the animals to breathe while they were immobilized for 4 hours.
- b) **Immobilization and exposure to cold:** After immobilization as previously described, the animals in the physical stress group were exposed to an average temperature of 7°C for a period of 4 hours.
 - c) **Exposure to intermittent light:** The animals housing boxes were placed in larger boxes that blocked the entrance of natural light, and a 60-watt lamp was intermittently used for 4 hours.
 - d) **Isolation:** The animals were individually separated in one new housing-box for a period of 24 hours while receiving food and water *ad libitum*.
 - e) **Ligature exam:** Each animal was gently immobilized by the researcher, and then the ligature was examined by looking at the molar teeth with the aid of an n° 7 spatula.
 - f) **Crowded environment:** All animals (n=12) were grouped together in one new housing box for a period of 24 hours while receiving food and water *ad libitum*.
 - g) **Odor of blood:** Two plastic five-milliliter test tubes with small perforations in the upper region were filled with the same species blood together with an anticoagulant (EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid) to release the odor into the interior of the housing box. This container was stabilized to prevent the rats from contacting the product during the 4 hours of the procedure.
 - h) **Noise:** The animals were placed in their house-boxes within a framework that prevented the entrance of light, and they were exposed to noise produced by musical sound at an intensity of 90 decibels for 4 hours.

Histological Procedures

At the end of the experimental period (60 days), all animals were killed and the weights of the adrenal glands, spleen and thymus (g) were registered using a standardized scale (FA2104N Bioprecisa, Ipiranga, SP, Brazil), the left and right segments of the maxillae were dissected out and fixed in 10% neutral buffered formalin. The tissue blocks were decalcified in EDTA for 5 weeks. After dehydration in graded alcohol, the samples were embedded in paraffin. The decalcified tissue blocks were sectioned in a mesio-distal plane, to obtain serial 6 µm thick sections. As a prerequisite, the coronal pulp had to be clearly indentified in at least 2 teeth and the root pulp. The sections were stained with hematoxylin and eosin.

For the histometric analysis, 10 serial sections containing the 1st and 2nd molars were selected. In each section the entire dental pulp, the mesial cement-enamel junction (CEJ) of the 2nd molar, interproximal alveolar bone crest (between 1st and 2nd molars) and connective fiber attachment should be clearly identifiable (Semenoff-Segundo et al., 2007). Images were captured using a trinocular microscope (Coleman, Santo André, SP, Brazil, Model 200/TC; lens 4/0,10 - 160/160) attached to a video camera (Samsung SDC-313, Chorea). All measurements were taken in pixels and converted into mm by a blinded examiner using a digital image-processing software (ImageLab 2000; Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brazil). The following histometric parameters were evaluated: (a) distance between the mesial CEJ of the 2nd molar and the most apical portion of the junctional epithelium (CEJ-JE), defined as histological attachment loss; (b) distance between the CEJ and the alveolar bone crest (CEJ-BC), defined as histological bone loss (Fig. 2). A single examiner blinded to the experimental groups performed the histometric analysis.

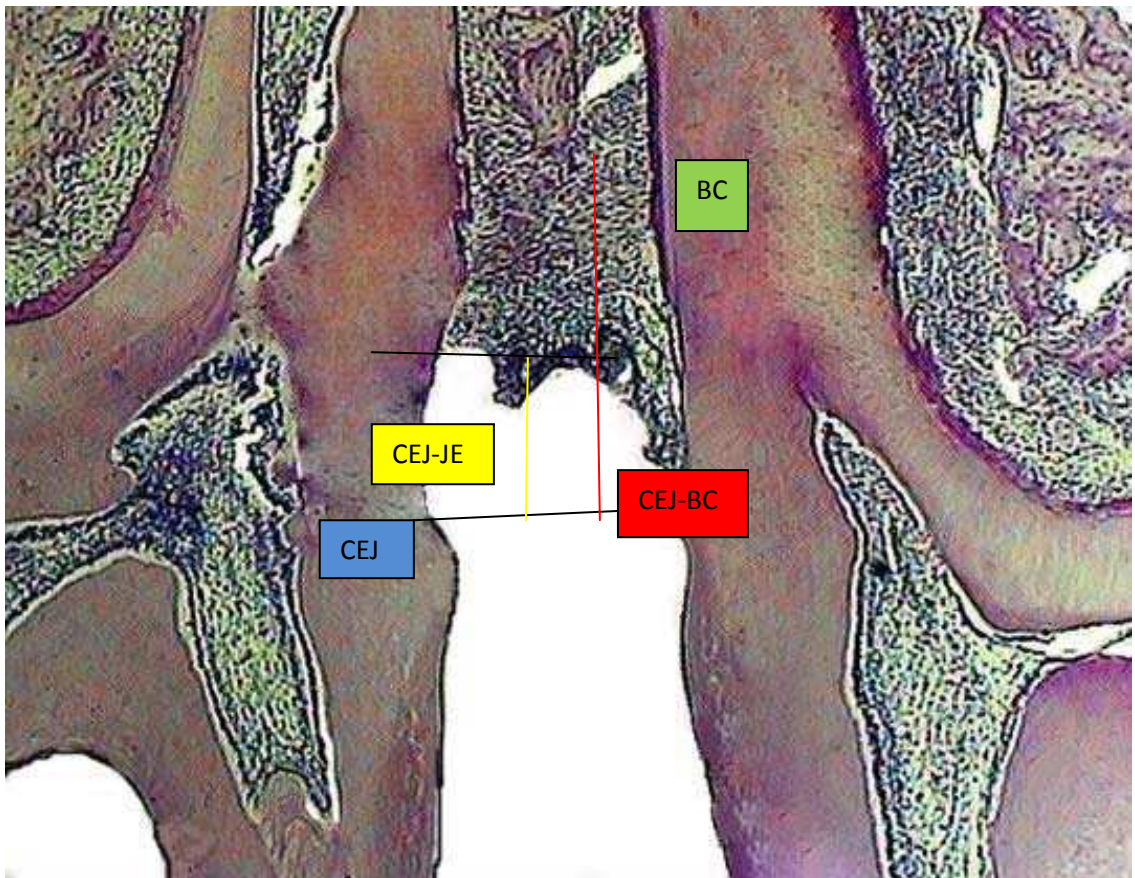


Fig. 2- Photomicrograph of a histological section illustrating the destruction of the periodontium in the ligature induced periodontitis. CEJ-JE: histological attachment loss; CEJ-BC: histological bone loss; BC: bone crest; CEJ: cement enamel junction

Statistical Analysis

Among groups, histological attachment loss and histological bone loss values from the right hemi-maxillae (ligature induced periodontitis side) were compared to values from the left hemi-maxillae (not induced periodontitis side).

The parameter body weight was calculated weekly as the difference between the weight recorded at each interval and the initial weight. The means of thymus, spleen, adrenal and liver weight recorded for each group were compared to each other.

Statistical analysis was performed using one-way Analysis of Variance (ANOVA) and Bonferroni tests. Differences were considered significant if $p < 0.05$. The statistical software used was SPSS (Statistical Package for the Social Sciences; SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Calibration intra examiner was performed using the standard error of measurement. For all parameters evaluated obtained a standard error of the measure greater than 0.8 so the examiner was considered calibrated.

RESULTS

Body Weight

There were no statistically significant differences ($p < 0.05$) among the body weights of the groups at any of the evaluation periods (Table 1).

Table 1- Mean and Standard deviation of animal whole body weight (g) during the study. No differences were observed (ANOVA; $p > 0.05$).

Weeks	GPS		GVS		GPC		GNC	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Media	±SD
1	02.75	22.07	22.41	29.08	22.41	16.40	23.08	32.71
2	12.16	19.94	22.50	36.02	24.83	15.23	25.33	37.70
3	16.16	20.10	26.83	29.91	25.91	11.58	29.91	50.65
4	28.16	22.55	36.23	30.63	30.75	12.45	35.33	25.68
5	25.66	22.85	37.16	26.00	38.91	11.57	36.66	31.98
6	30.91	20.38	22.58	27.90	34.25	16.77	36.41	29.30
7	27.83	21.41	44.16 ^a	26.38	37.41	12.99	41.08	32.30

Histometric Results

On the ligature induced periodontitis side, physical stress presented significantly greater histological attachment loss and also greater bone loss ($p < 0.05$) than variable stress, positive control and negative control. On the non periodontitis side these same histological parameters did not significantly differ among groups (Table 2).

Table 2 – Comparisons among groups of histometric parameters (mean values) considering the periodontitis and non periodontitis sides.

	Periodontitis sides				Non periodontitis sides			
	CEJ-JE		CEJ-BC		CEJ-JE		CEJ-BC	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD
Variable stress	0.25 ^a	0.16	0.92 ^a	0.20	0.01 ^a	0.06	0.45 ^a	0.14
Physical stress	0.47 ^b	0.12	1.11 ^b	0.13	0.05 ^a	0.01	0.45 ^a	0.10
Positive control	0.29 ^a	0.19	0.96 ^a	0.13	0.00 ^a	0.00	0.48 ^a	0.05
Negative control	0.05 ^c	0.01	0.45 ^c	0.10	0.03 ^a	0.09	0.59 ^a	0.21

Different lower case letter within the same column indicate differences among groups. Mean values (mm) and standard deviations (SD) from periodontitis and non periodontitis sides were considered and statistically analyzed by ANOVA and Bonferroni tests ($p < 0.05$). CEJ-JE: histological attachment loss; CEJ-BC: histological bone loss

Weight of Collected Organs

The thymus variable stress were differed significantly from positive control and negative control; Physical stress was significantly different from positive control ($p<0.05$). The weight of adrenal glands decreased more significantly in physical stress compared to positive control and negative control ($p<0.05$). Physical stress had lower liver weight compared to positive control and negative control ($p<0.05$). Variable stress showed a decrease in liver weight compared to the negative control ($p<0.05$) (Table 3).

Table 3 – Comparisons of wet organ weight (g) among groups

	GPS		GVS		GPC		GNC	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD
Spleen	1.13 ^a	0.22	1.17 ^a	0.20	1.10 ^a	0.19	1.12 ^a	0.15
Thymus	0.07 ^{abc}	0.008	0.04 ^{ab}	0.009	0.03 ^d	0.005	0.03 ^{cd}	0.006
Adrenal	0.09 ^a	0.01	0.10 ^{acd}	0.01	0.11 ^{bc}	0.01	0.11 ^{bd}	0.01
Liver	7.74 ^a	1.13	8.70 ^{ac}	1.33	9.71 ^{bc}	1.35	10.23 ^b	1.60

Different lower case letters within the same line indicate differences among groups. Mean values (mm) and standard deviations (SD) were considered and statistically analyzed by ANOVA and Bonferroni tests ($p<0.05$). Adrenal weight is the total weight of both glands. GPS: group physical stress; GVS: group variable stress; GCP: positive control; GCN: negative control

DISCUSSION

Although most people present a slow, progressive periodontal attachment loss and lose teeth during their lifetime, epidemiological studies have demonstrated that a small part of the population show a significant loss of periodontal attachment followed by an early loss of teeth (Löe et al., 1986). Interestingly, this occurs in response to the same number of microorganisms (Baelum et al., 1988). Therefore, several contributing factors, such as socioeconomic, age, diabetes mellitus and smoking, seem to be linked to attachment loss (Emrich et al., 1991; Genco et al., 1999; Genco, 2004; Susin, 2004).

Though controversial, epidemiological studies have demonstrated the existence of a relationship between psychosocial diseases and periodontitis (Castro et al., 2006; Moss et al., 2007). In this context, animal models are important for investigating certain biological events to help determine the viability of future research.

In the present study, the induction of periodontal disease in a model of physical stress showed significantly greater histological attachment loss and bone loss compared to the variable-stress and positive control groups. Other studies examining ligature-induced periodontitis in a model of physical restraint stress have reported destructive periodontal disease. Indeed, studies have reported histological attachment loss and bone loss (Gaspersic et al., 2002), furcation defects areas (Takada et al., 2004) and morphometric measurements (Nakajima et al., 2006).

Animal studies have shown that mild stress tends to confer a protective effect rather than a destructive effect on the periodontium (Moynihan, 2003; Fujoika et al., 2006). Using a variable-stress model, Susin & Rösing (2003) and Semenoff-Segundo et al. (2007) observed a “protection” of the periodontium, which corroborated the

outcomes of the stress methodology of the present study. It may be hypothesized that the divergent results from studies on this subject result from the methodology of HPA axis activation and periodontal response interpretation. Although clinical and radiographic models are a good alternative (Sallay et al., 1982), qualitative histological analyses of cell and tissue events, combined with quantification of periodontal destruction, seemed to produce the most accurate data (Gaspersic et al., 2002; Takada et al., 2004). In the present study, we chose the histometric analysis of periodontal breakdown based on its clinical relevance in periodontics. Also, it has been used for more than 50 years to measure the destruction of periodontal structures such as junctional epithelium, gingival fibers, connective tissue and alveolar bone height (Ramfjord, 1959). Therefore, we paid extra attention to standardization, selection of histological sections, blind examination and intra-examiner reproducibility to obtain an effective and reproducible histometric analysis. Differences in these variables could explain the differences found in the literature (Semenoff et al., 2008).

Stress acts as an environmental factor in periodontal disease and has been shown to change the response against pathogens in human (Page & Korman, 1997). Based on animal studies investigating stress pathways (Breivik & Thrane, 2000), it would be plausible to assume that we observed a T helper cells (Th2) response, which stimulated the plasmocytes to produce interleukins and enzymes, such as metalloproteinases. These molecules have been shown to be capable of destroying the periodontal tissues, which determined the progression of periodontitis (Lee et al., 1995; Elenkov & Chrousos, 1999; Gammell & Seymour, 2004).

However, animal studies demonstrated, the side without induction of periodontal disease did not present histological attachment loss or bone loss in either of the

groups (Gaspersic et al., 2002; Takada et al., 2004). Following HPA axis stimulation, however, Breivik & Thrane (2000) and Semenoff-Segundo et al. (2007) found apical migration of the junctional epithelium without induction of disease. These divergent results could be attributed to the different modes of HPA axis activation used in those experiments. Additionally, several aspects of neuroendocrine-immune axis functioning remain unclear, which means that more studies are needed.

To confirm the efficiency of the stress models, the organs of stressed and non-stressed animals were weighed in this study, which is a valid parameter to assess systemic changes. Both of the chronic stress regimens resulted in lower liver weights, which corroborated the study of Selye (1946).

Thymus and adrenal glands work in synergism; thus, when one of the glands is compromised, the function of the other is modified (Selye, 1936; Selye, 1946). In this study, thymus and adrenal weights were contradictory to the results of other studies examining the association between stress and periodontitis in rats. Gaspersic et al. (2002) observed thymus reduction while Takada et al. (2004) and Nakajima et al. (2006) found atrophic thymus and spleen. This might be attributed to the short term (12 hours) chronic stress model (Gaspersic et al., 2002; Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006).

Two points of this study's methodology could have led to different results than previous studies (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006; Semenoff-Segundo et al., 2007); the duration of the stress regimen imposed on the animals (60 days), and the experimental induction of periodontitis 10 days after the stress protocols had been initiated. The longer stress regimen was an attempt to correlate the experimental findings to those of individuals under long-term stress load, for

example, business executives of major companies and prisoners (Freeman & Goss, 1993; Fazel & Danesh, 2002).

Because periodontal disease is capable of inducing a systemic response (Ivanyi & Lehner, 1970; Page, 1998; Nakajima et al., 2006), it may be speculated that immunoinflammatory response was stimulated. This led the thymus to produce a large number of T-cells and the adrenal glands to secrete a small amount of adrenaline and cortisone, which increased thymus weight and decreased adrenal weight with no significant differences between the stress models. One study suggested that these effects might occur when chronic stress stimuli are maintained for an extended period of time (Elenkov & Chrousos, 1999).

The applied model chronic stress did not lead the animals to exhaustion or death. The maintenance of body weight did not suggest systemic severe disorder (Forbes et al., 1996). On the other hand, other ligature induced periodontitis studies in rats which applied physical stress (12 hours a day) found lost of body weight among stressed animals (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006). In comparison to chronic model, this last finding suggested a higher level of stress associated with high secretions of IL 1 and TNF which decrease the appetite through HPA stimulation.

The fact that all groups of rats maintained their body weight with no significant differences compared with the negative control animals confirmed that body weight was a valid indicator of systemic health (Selye, 1946; Semenoff-Segundo et al., 2007). No significant differences in body weight were observed during the experiment or at the conclusion of the experiment. Other similar studies that associated ligature-induced periodontitis and stress in rats found significant differences (i.e., stressed

animals had lower weights) (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006). Those studies likely achieved a high level of stress, which increased the production of interleukin-1 (IL1) and tumor necrosis factor (TNF-beta), which can induce the HPA axis to decrease the desire to feed. Thus, the fact that we did not observe any weight loss reinforced the premise that the animals reached the end of the experiment in a good health status.

Some issues regarding stress have become more clearly understood. However, the neuroendocrine-immune axis is highly complex, and several aspects remain unknown. Longitudinal epidemiological investigations, animal studies and clinical trials are required to further elucidate the role of stress in the pathogenesis of periodontal disease.

Within the limits of this study, it may be concluded that physical stress modulated the response pattern to experimentally induced periodontitis in rats.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank UNIVAG (Centro Universitário de Várzea Grande – MT- Brazil) for the financial support.

REFERENCES

1. Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK, Pabst R, Hörsten SV. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodont Res* 2001; 36: 295-300.
2. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004; 75: 306-315.

3. Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 273-277.
4. Semenoff-Segundo A, Henneman C, Fontanela VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007; 9: 26-31.
5. Moynihan JA. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003; 17Suppl1: S11–S16.
6. Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 2006; 141: 907-915.
7. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci* 2002; 110: 125-129.
8. Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibits ligature-induced periodontitis in adults rats. *J Periodontol Res* 2006; 41: 23-32.
9. Sheiham A, Nicolau B. Evaluation of social and psychological factors in periodontal disease. *Periodontology 2000* 2005; 39: 118-131.
10. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 2004; 75: 133-141.
11. Monteiro da Silva AM, Newman NH, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 516-526.
12. Solis AC, Lotufo RF, Pannuti CM, Brunheiro EC, Marques AH, Lotufo-Neto F. Association of periodontal disease to anxiety and depression symptoms, and psychosocial stress factors. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 633-638.

13. Castro GD, Oppermann RV, Haas AN, Winter R, Alchieri JC. Association between psychosocial factors and periodontitis: A case-control study. *J Clin Periodontol* 2006; 33: 109-114.
14. Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol* 2008; 79: 697-704.
15. Shapira L, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS- stimulated secretion of nitric oxide. *J Periodontol* 2000; 71: 476-481.
16. Løe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 431-440.
17. Baelum V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal disease in adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 445-452.
18. Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insuline-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991; 62: 123-130.
19. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Todesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999;70: 711-723.
20. Susin C. Periodontal diseases in representative urban population in south Brazil. Bergen, Noway: University of Bergen, 2004, 46p. Thesis.
21. Moss ME, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Gary W, Genco RJ, Mathei EE, Tedesco LA. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 2007; 78: 1491-1504.

22. Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontol Res* 2006; 46: 527-534.
23. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Berhling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontol Res* 1982; 17: 263-274.
24. Ramfjord, SP. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J Periodontol* 1959; 30: 51-59.
25. Semenoff TADV, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJ, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analysis of ligature-induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *J Appl Oral Sci* 2008; 16: 251-256.
26. Page CR, Korman KS. The Pathogenesis of Human Periodontitis: An Introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9-11.
27. Breivik T, Thrane PS. Psychoneuroimmune interactions in periodontal disease. In: Alder R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press. 3 ed. 2000. 627-644.
28. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontol Res* 1995; 30: 23-33.
29. Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trend Endocrinol Metab* 1999; 10: 359-368.
30. Gammell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology* 2000 2004; 35: 21-41.
31. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 1946; 6: 117-230.

32. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
33. Freeman R, Goss S. Stress measures as predictors of periodontal disease - A preliminary communication. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993; 21: 176-177.
34. Fazel S, Danesh J. Serious mental disorder in 23000 prisoners: A systematic review of 62 surveys. *The Lancet* 2002; 359: 545-550.
35. Ivanyi L, Lehner T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1970; 15: 1089-1096.
36. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: Inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998; 3: 108-120.
37. Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav* 1996; 60: 1481-1484.

5 CAPITULO 2

5.1 Efeito da ingestão de álcool etílico associado ao estresse crônico na gravidade da periodontite: estudo em modelo animal

Porto AN¹, Semenoff Segundo A², Semenoff TAD³, Borges AH⁴, Cortelli JR⁵, Cortelli SC⁶.

RESUMO

O presente estudo hipotetizou que a ingestão de álcool etílico associada ao estresse crônico aumentaria a gravidade da doença periodontal. **Metodologia:** Selecionou-se vinte e quatro animais Lewis adultos, as quais foram divididas aleatoriamente em três grupos (n=8/grupo): grupo GAL- álcool + ligadura, grupo GASL- álcool + estresse físico crônico + ligadura e grupo GCN- controle negativo. Após a divisão, os animais GAL e GASL foram submetidos à ingestão de álcool etílico a 20% *ad libitum*, e o grupo GCN recebeu água *ad libitum*, durante 60 dias. No dia seguinte ao início da ingestão de álcool pelos respectivos grupos foi realizado o procedimento de indução da doença periodontal (GAL e GASL). Durante dois meses, seis vezes por semana, em horários alternados, os animais foram imobilizados caracterizando estresse físico crônico. O parâmetro da análise histométrica do presente estudo foi à distância entre a junção amelo-cementária na face mesial do segundo molar e a porção mais coronária do epitélio juncional. Esse parâmetro foi definido como perda de inserção histológica (CEJ-JE). Analisou-se, também, à distância (mm) entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar a qual foi considerada como o indicador de perda óssea (CEJ-BC). Os valores

individuais foram tabulados, e as médias dos respectivos grupos estatisticamente analisadas (testes Análise de Variância e Tuckey, $p < 0,05$). **Resultados:** O grupo com maior destruição periodontal revelada pela análise dos parâmetros CEJ-JE e CEJ-BC foi o grupo exposto ao álcool associado a ligadura (GAL), seguido pelo grupo exposto ao álcool associado ao estresse e ligadura (GASL). O grupo controle negativo (GCN) apresentou os menores valores de CEJ-JE e CEJ-BC comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). **Conclusão:** Os fatores álcool–estresse parecem não ter efeito sinérgico quando associados, uma vez que o grupo exposto isoladamente ao álcool apresentou a pior condição periodontal. O álcool como fator isolado teve maior impacto sobre os parâmetros avaliados do que quando combinado ao estresse. Outros estudos deverão ser conduzidos para avaliar o efeito do estresse isoladamente.

Palavras-chave: Estresse fisiológico, ratos, periodontite, etanol

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença multifatorial, de origem infecciosa, iniciada pelo acúmulo de biofilme dental, que acomete os tecidos de proteção e sustentação dos dentes. Existem vários fatores que influenciam a periodontite, incluindo características pessoais e sociais, bem como fatores comportamentais, sistêmicos, genéticos, dentários e composição da microbiota do biofilme dental (Genco, 1996; Nunn, 2003; Stanford & Rees, 2003).

O estresse pode ser definido como a soma das respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos (estressores) a qual permitirá ao indivíduo (humano ou animal) superar determinadas exigências do meio-ambiente

além de superar ainda o próprio desgaste físico e mental causado pelo processo (Seyle 1936). O estresse tem sido relacionado não apenas com a maior ocorrência como também com a gravidade da doença periodontal (Hugo et al., 2006).

Por outro lado, fatores como tabagismo, status sócio econômico, estado nutricional, aspectos psicológicos e consumo excessivo de álcool (Nunn, 2003) representam os fatores designados como sociais e comportamentais. O álcool etílico é uma das poucas drogas psicotrópicas que tem seu consumo admitido e incentivado pela Sociedade. Em estudo conduzido por Amaral et al. (2008) ele reforçou considerações da Organização Mundial da Saúde, a qual vem reportando que a mortalidade e limitação funcional associadas ao consumo excessivo de bebidas alcoólicas superam aquelas associadas ao tabagismo.

O alcoolismo se tornou um sério problema de saúde pública (Hornecker et al., 2003). E, sabe-se que esta doença impõe ao organismo um estado de estresse, pois além da demanda psicológica, ainda atua como agente agressor físico-químico. O álcool etílico ingerido pelo consumo de bebidas alcoólicas não permanece armazenado no corpo, e para ser eliminado ele primeiramente é metabolizado no fígado o que resulta em altos níveis de oxigênio reativo (Lieber, 2005; Valko et al., 2007).

Ensaio epidemiológicos têm relacionado à doença periodontal ao consumo de bebidas alcoólicas. Vários estudos transversais verificaram uma associação entre o consumo abusivo de álcool etílico e uma piora nos parâmetros periodontais (Shiziushi et al., 1998; Tezal et al., 2001; Shimazaki et al., 2005). Adicionalmente, o consumo excessivo de álcool é um dos fatores que têm sido associados com a gravidade da periodontite (Genco, 1996; Nunn, 2003; Stanford & Rees, 2003).

Algumas questões decorrentes destes estudos podem ser respondidas por pesquisas laboratoriais. A condução de estudos com modelos animais podem auxiliar na elucidação de questões relacionadas à ingestão de álcool ao estresse e a doença periodontal (Khisti et al., 2005; Breivik et al., 2006).

Considerando-se a escassez de informação disponível em relação ao possível efeito sinérgico álcool-estresse, o objetivo deste estudo em animal foi avaliar o efeito da ingestão de álcool etílico associada ao estresse crônico na gravidade da periodontite induzida por ligadura.

MATERIAIS E MÉTODOS

Vinte e quatro animais, com dois meses de idade, da espécie *Rattus Novergicus* e linhagem Lewis, com peso inicial médio de 250 gramas foram selecionados para o presente experimento. Todos os animais selecionados foram submetidos a um período de adaptação ambiental durante quatro semanas. Os animais mantiveram-se em caixas moradia (polietileno 16x40x30) em número de oito, com ração padronizada, água *ad libitum* e/ou álcool etílico a 20% também *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada a 24°C e umidade \pm 50%. O experimento foi realizado no biotério do Centro Universitário de Várzea Grande – UNIVAG e aprovado e registrado pelo Comitê de ética em pesquisa animal CEP/UNIC-2009. N°307-321 da Instituição.

Grupos Experimentais

Inicialmente, um assistente de pesquisa dividiu aleatoriamente os animais em três grupos experimentais:

1. Grupo GAL: álcool + ligadura (n=8).

2. Grupo GASL: álcool + estresse + ligadura (n=8).
3. Grupo GCN: controle negativo (n=8).

Após a divisão, os animais dos grupos teste GAL e GASL foram submetidos à ingestão de álcool etílico a 20% *ad libitum*, durante 60 dias consecutivos (Hogan et al., 1997) e quanto ao grupo controle (GCN) recebeu água *ad libitum* pelo mesmo período (Fig. 1).

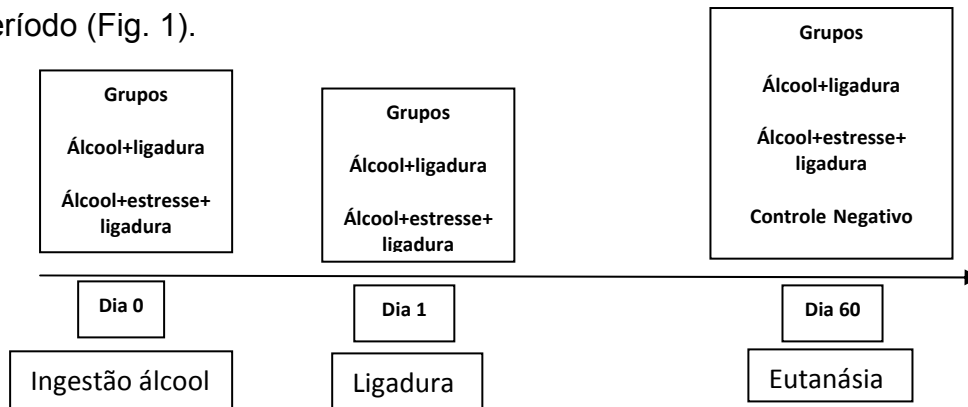


Fig. 1- Delineamento experimental

Ingestão do Álcool

A ingestão de álcool eram realizadas de forma compulsória em duas garrafas de 1000ml colocadas *ad libitum* durante o período do experimento. Duas vezes por semana, as mesmas eram lavadas e adicionadas o álcool na água filtrada na proporção de 20%. Este procedimento era realizado com auxílio do Alcoolômetro (Densímetro para determinar a porcentagem de álcool por volume segundo Gay lussac. Densímetros com haste de 6mm e corpo de 23mm; Faixas novas para medição: separada em duas partes; Faixa do alcoolômetro de 0/100°GL; Escala: 0/50°GL; Divisão: 0,1°GL). Ou seja, as duas substâncias eram líquidas V/V.

Doença periodontal experimental

Como no primeiro dia, a ingestão de álcool etílico é bastante reduzida, no dia seguinte ao início da ingestão de álcool pelos grupos teste (GAL e GASL) foi realizado o procedimento de indução da doença periodontal. Os animais receberam anestesia geral, através da administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de xylazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP. Brasil) por cada 100 gramas de peso corporal.

Após anestesia um fio de sutura de seda estéril número 4 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) foi inserido no sulco gengival do segundo molar superior direito (Semenoff-Segundo et al., 2007). Os animais do grupo controle negativo (GCN) não receberam nenhum tipo de intervenção, mas foram mantidos juntos em caixa-moradia durante todo o experimento.

Indução de estresse

O modelo de indução de estresse físico foi imobilização aplicada durante 60 dias, seis vezes por semana, em momentos variados do dia (Susin & Rosing, 2003; Semenoff-Segundo et al., 2007). Sob temperatura ambiente, os animais (GASL) foram colocados por 4 horas em tubos de cloreto de polivinilal (PVC), compatíveis com seu tamanho. Posteriormente, interrompeu-se a passagem de ambos os lados com fio metálico, de forma a impedir a movimentação sem, todavia interferir com a respiração dos animais.

Exame histológico

Após 60 dias foi realizada a eutanásia dos animais por excesso de anestésico e as peças removidas, contendo as hemimaxilas direita e esquerda, as quais foram fixadas em formol a 10% por 48 horas. Em seguida as hemimaxilas foram

descalcificadas em EDTA por um período próximo a cinco semanas (totalizando seis trocas), sendo lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram incluídos em parafina permitindo cortes histológicos seguindo o longo eixo dos dentes no sentido mesio-distal. Os cortes, com espessura de 6 μ m, foram corados com hematoxilina de Haris e eosina alcoólica e montados em lâminulas.

Para análise, foram selecionadas dez lâminas seriadas, nas quais necessariamente deveriam ser observados o 1° e o 2° molares superiores, e as seguintes estruturas a) polpa coronária, b) polpa radicular, c) junção amelo-cementária mesial do segundo molar, d) crista óssea interproximal e) inserção conjuntiva. A histometria foi realizada através da captação das imagens no microscópio, e mensurada em milímetros, utilizando-se o software ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

O examinador cegado em relação aos grupos realizou a histometria, das lâminas previamente codificadas por um outro pesquisador.

Para confiabilidade da leitura dos dados realizou-se a calibração intra-examinador, sendo uma prévia e outra durante a análise das lâminas. Na calibração prévia ao estudo foram selecionadas aleatoriamente 10% do total de lâminas, sendo realizada duas leituras com intervalo de uma semana de diferença. Para a calibração trans-experimento, a cada 10 lâminas examinadas retornou-se à primeira desse mesmo grupo e uma nova leitura foi realizada. Foi executado uma calibração intra examinador utilizando o teste de reprodutibilidade denominado erro padrão da medida (EPM). Para todos os parâmetros avaliados obteve-se um valor de EPM superior a 0,8 desta forma o examinador foi considerado calibrado.

Análise estatística

Os valores individuais foram tabulados e calculadas as médias dos respectivos grupos. Os dados foram estatisticamente analisados aplicando-se os testes Análise de Variância (ANOVA) e Tuckey ($p < 0,05$).

O parâmetro da análise histométrica foi a distância (mm) entre a junção amelo-cementária na face mesial do segundo molar superior e a porção mais coronária do epitélio juncional. Esse parâmetro foi definido como perda de inserção histológica (CEJ-JE). Analisou-se, também, a distância (mm) entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar a qual foi considerada como o indicador de perda óssea (CEJ-BC) (Fig. 2).

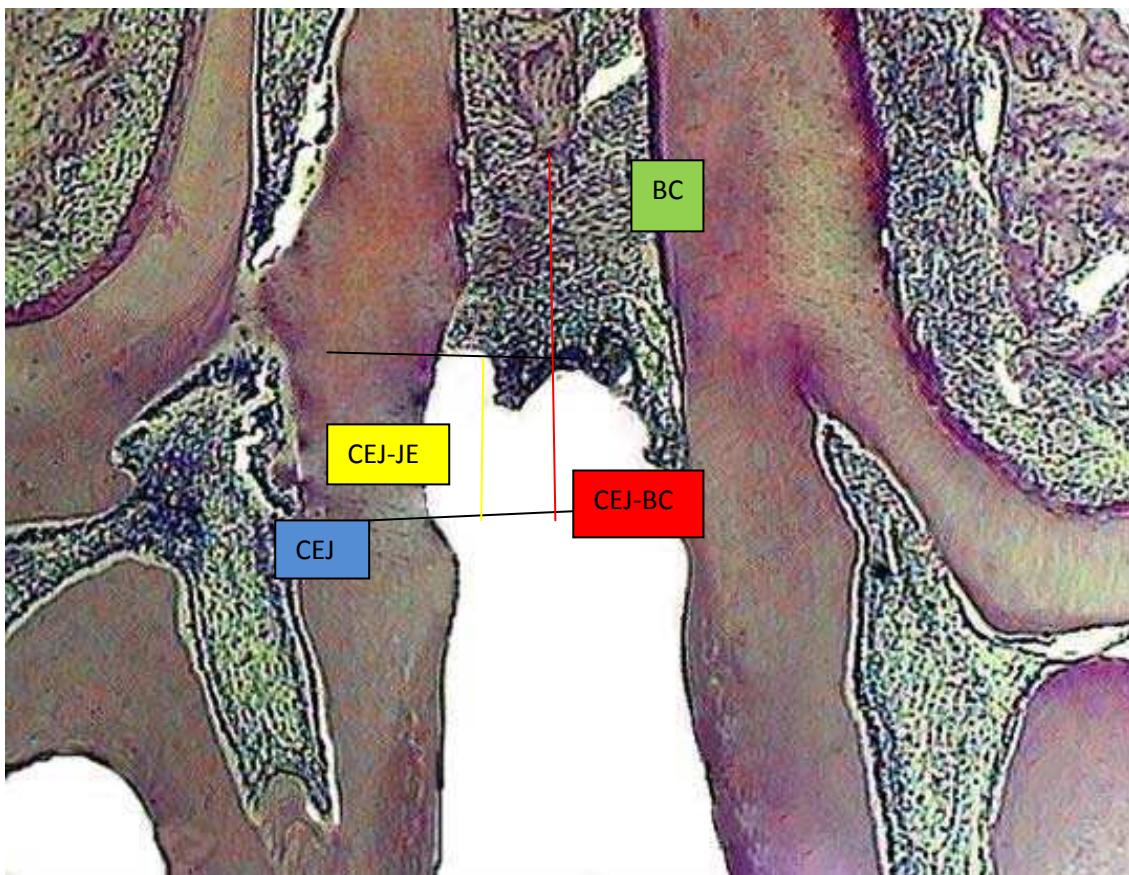


Fig. 2- Fotografia ilustrando a destruição no periodonto por ação da indução de periodontite induzida por ligadura. CEJ-JE: histological attachment loss; CEJ-BC: histological bone loss; BC: bone crest; CEJ: cement enamel junction

RESULTADOS

Peso Corporal

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os pesos dos grupos em nenhum dos períodos de avaliação (Tabela 1).

Tabela 1 - Média e desvio padrão de peso corporal do animal (g) durante o estudo. Não foram observadas diferenças (ANOVA, $p > 0,05$).

Semanas	GPS		GVS		GPC		GNC	
	Média	±SD	Média	±SD	Média	±SD	Média	±SD
1	02.75	22.07	22.41	29.08	22.41	16.40	23.08	32.71
2	12.16	19.94	22.50	36.02	24.83	15.23	25.33	37.70
3	16.16	20.10	26.83	29.91	25.91	11.58	29.91	50.65
4	28.16	22.55	36.23	30.63	30.75	12.45	35.33	25.68
5	25.66	22.85	37.16	26.00	38.91	11.57	36.66	31.98
6	30.91	20.38	22.58	27.90	34.25	16.77	36.41	29.30
7	27.83	21.41	44.16 ^a	26.38	37.41	12.99	41.08	32.30

O álcool associado ao estresse e ligadura (GASL) foi estatisticamente diferente do grupo álcool associado à ligadura (GAL), tanto para perda de inserção

histológica (CEJ-JE) quanto para perda óssea (CEJ-BC) ($p < 0,05$). Entretanto, a maior destruição periodontal, revelada pela análise dos parâmetros CEJ-JE e CEJ-BC, foi observada no grupo exclusivamente exposto ao álcool associado à ligadura (GAL), seguido então pelo grupo exposto à combinação álcool e estresse (GASL).

Finalmente, o grupo controle negativo (GCN) apresentou os menores valores de CEJ-JE e CEJ-BC comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), tendo assim apresentado a melhor condição periodontal.

Tabela1- Valores médios (mm) da perda de inserção histológica (CEJ-JE) e perda óssea (CEJ-BC) para os diferentes grupos.

	CEJ-JE (Média DP)	CJE-BC (Média DP)
GASL	0.33 \pm 0,09 a	0.61 \pm 0,03 a
GAL	0.77 \pm 0,27 b	1.09 \pm 0,32 b
GCN	0.06 \pm 0,14 c	0.21 \pm 0,02 c

Letras diferentes na mesma coluna significam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$). GASL – grupo álcool associado a estresse e ligadura; GAL – grupo álcool associado à ligadura; GCN grupo controle negativo. CEJ-JE – junção amelo-cementária até a porção mais apical do epitélio juncional; CEJ-BC - junção amelo-cementária até a crista óssea.

DISCUSSÃO

Embora iniciada pelo biofilme dental, a manifestação e progressão da periodontite são influenciadas por uma grande variedade de determinantes e fatores de risco os quais, incluem características sociais e sistêmicas, fatores genéticos, dentários e composição do biofilme dental. Outros fatores, mesmo que ainda não

tenham atingido o status necessário para poderem ser classificados como fator de risco, têm emergido uma vez que alguns indivíduos parecem ser mais suscetíveis sob determinadas condições. Dados consistentes na literatura sugerem que o padrão de higiene bucal, o tabagismo, o diabetes, a idade e a presença de microrganismos específicos representem fatores de risco para a doença periodontal (Razali et al., 2005; Nunn, 2005). Entretanto, a combinação destes reconhecidos fatores não é suficiente para explicar a variação que ocorre na progressão e ocorrência da doença. Tem-se eventualmente atribuído tal variabilidade a outras doenças ou condições sistêmicas como o estresse (Genco et al., 1999), a osteoporose (Edwards & Migliorati, 2008), a obesidade (Dumitrescu & Kawamura, 2010) e consumo abusivo de álcool (Amaral et al., 2008).

O álcool tem sido frequentemente investigado, tanto no que se refere a seus efeitos sobre o organismo humano quanto os distúrbios funcionais a ele associados.

Tal interesse é justificado pela multiplicidade de ações tóxicas e lesivas que a ingestão de álcool provoca sobre órgãos e tecidos as quais são observadas em diferentes doenças (Lieber, 2000; Crabe, 2001).

Além disso, a Organização Mundial da Saúde estima que 2 bilhões de pessoas em todo o mundo são consumidores de álcool, e 76 milhões apresentam algumas complicações induzidas por álcool. No Brasil, estima-se que 68% da população consumam álcool, enquanto 11,2% dela sejam dependente de álcool.

Amaral et al. (2008) sugeriu ainda que os homens brasileiros consomem álcool em uma taxa mais elevada do que as mulheres. Similarmente, Martins et al. (2006) também demonstraram que o consumo de álcool modulou diretamente a

progressão da perda óssea resultante da periodontite induzida. Além disso, os autores verificaram que o álcool pode ter tido um efeito indireto sobre a destruição do osso de ratos, associado com dieta altamente calórica.

Por outro lado, vários trabalhos ao contrário de uma ação direta do álcool, sobre os tecidos periodontais sugerem que estes efeitos se baseiam na higiene bucal pobre, a qual explicaria a maior ocorrência e severidade da doença periodontal nos consumidores de bebidas alcoólicas (Larato, 1972; Novacek et al., 1995). Nesse contexto, trabalhos em animais são importantes auxiliares na compreensão dos eventos biológicos uma vez que possibilitam a eliminação ou controle de algumas variáveis. Assim, em estudos animais também se observou que o álcool afetou os tecidos periodontais através de diferentes mecanismos. Imunidade reduzida devido à deficiência e alterações funcionais de neutrófilo (Christen, 1983; Drake, 1995) bem como alteração no metabolismo protéico e na cicatrização dos tecidos foram previamente relatadas.

Sempre que se expõem os animais ao livre consumo de álcool que se torna um substituto da água nos experimentos laboratoriais surgem dúvidas a respeito da equivalência com o consumo em humanos. Esta é uma questão difícil de ser respondida, sobretudo ao considerarmos a rapidez do metabolismo dos ratos. Entretanto, a Organização Mundial de Saúde considera bebedores moderados os homens que consomem menos que 21 unidades de álcool por semana e mulheres que consomem até 14 unidades por semana. Cada unidade equivale a 10 gramas de álcool sendo que por exemplo, 90 ml de vinho tinto possui uma concentração de álcool de 12 % e 1.1 unidade de álcool. Já a cerveja 5% o que equivale a 1.7 unidade

de álcool, enquanto “bebidas destiladas” como vodka e uísque exibem a concentração de álcool de 40% equivalentes a 2.0 unidade de álcool.

Interessantemente, Tezal et al.(2001) realizaram um estudo transversal para avaliar o efeito do consumo de álcool e severidade da doença periodontal relacionada ao consumo de diversos tipos de bebidas alcoólicas (vinho, cerveja e liquor). O efeito sobre os tecidos periodontais não diferiu em função do tipo de bebida. Adicionalmente, estes mesmos autores verificaram atividade contrária do álcool em relação a alguns patógenos periodontais, como *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados clínicos sugeriram que o álcool parece afetar mais fortemente a gengiva, seguido pelo ligamento periodontal e osso alveolar e que o efeito do álcool na doença periodontal, pode depender da dose, frequência e tempo de exposição. Shimazaki et al. (2005) também demonstraram que os indivíduos que consumiam mais que 15 gramas por dia de álcool, tiveram aumento significativo na progressão da doença periodontal e maior infiltrado inflamatório além de maior número de bolsas periodontais comparado com aos que não consumiam álcool.

Assim, estudos futuros deverão ser conduzidos a fim de melhor elucidar os efeitos do álcool sobre os tecidos periodontais. Não se esperava que os animais estressados consumidores de álcool apresentassem melhor condição periodontal que os consumidores não estressados. Os dados do presente estudo sugerem que embora isoladamente os fatores álcool e estresse sejam prejudiciais ao periodonto a associação de ambos provavelmente desencadeia processos diferentes. Pela associação consumo de álcool/estresse representar uma condição frequente em seres humanos adultos com periodontite a avaliação de seus efeitos torna-se

relevante. Por outro lado, os efeitos do consumo de álcool isoladamente confirmaram ser importantes para a evolução da doença periodontal.

CONCLUSÃO

Os fatores álcool–estresse parecem não ter efeito de interação quando associados uma vez que o grupo exposto isoladamente ao álcool apresentou a pior condição periodontal. O álcool como fator isolado teve maior impacto sobre os parâmetros periodontais avaliados do que quando fator combinado ao estresse.

Outros estudos deverão ser conduzidos para avaliar o efeito do estresse isoladamente.

REFERENCIAS

1. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol* 1996; 64: 1041-1049.
2. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000* 2003; 32: 11-23.
3. Stanford TW, Rees TD. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. *Periodontol 2000* 2003; 32: 118- 135.
4. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
5. Hugo FN, Hilgert JB, Bozzetti MC, Bandeira DR, Tonantzin RG, Pawlowski J et al. Chronic stress, depression, and cortisol levels as risk indicators of elevated

- plaque and gingivitis levels in individuals aged 50 years and older. *J Periodontol* 2006; 77: 1008-1014.
6. Amaral CSF, Luiz RR, Leão ATT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79: 993-998.
 7. Hornecker E, Muub T, Ehrenreich H, Mausberg R. A pilot study on the oral conditions of severely alcohol addicted persons. *J Contemp Dent Pract* 2003; 4: 51-59.
 8. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 1-35.
 9. Valko M, Leibfrits D, Moncol J, Gronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
 10. Shizuishi S, Hayashi N, Tamagawa H, Hanioka T, Maruyama S, Takeshita T. Lifestyle and periodontal health status of Japanese works. *Ann Periodontol* 1998; 3: 303-311.
 11. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 2001; 72: 183-189.
 12. Shimazaki, Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol* 2005; 76: 1534-1541.
 13. Khisti RT, Boyd KN, Kumar S, Leslie Morrow AL. Systemic ethanol administration elevates deoxycorticosterone levels and chronic ethanol exposure attenuates this response. *Brain Research* 2005; 1049: 104-111.
 14. Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibits ligature-induced periodontitis in adult rats. *J Periodont Res* 2006; 41: 23-32.

- 15.Hogan HÁ, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 809-816.
- 16.Semenoff-Segundo A, Henneman C, Fontanela VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007; 9: 26-31.
- 17.Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 273-277.
- 18.Razali M, Palmer RM, Coward P, Wilson RF. A retrospective study of periodontal disease severity in smokers and non-smokers. *Br Dent J* 2005; 23: 495-498.
- 19.Nunn ME. Periodontal risk factors and indicators. *Periodontology* 2000 2005; 32: 5-12.
- 20.Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 70: 711-723.
- 21.Edwards BJ, Migliorati CA. Osteoporosis and its implications for dental patients. *J Am Dent Assoc* 2008; 139: 545-552.
- 22.Dumitrescu AL, Kawamura M. Involvement of psychosocial factors in the association of obesity with periodontitis. *J Oral Sci* 2010; 52: 115-124.
- 23.Lieber CS. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *Journal of Hepatology* 2000; 32: 113-128.
- 24.Crabe JC. Use of genetic analyses to refine phenotypes related to alcohol tolerance and dependence. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2001; 25: 288-292.

25. Martins DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci* 2006; 14: 50-62.
26. Larato DC. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. *J Periodontol* 1972; 23: 155-158.
27. Novacek G, Plachetzky U, Potzi R. Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis-role of etiology of liver disease. *J Hepatol* 1995; 22: 576-582.
28. Christen AG. Dentistry and the alcoholic patient. *Dent Clin North Am* 1983; 27: 341.
29. Drake CW. Three-year tooth loss among Black and White older adults in North Carolina. *J Dent Res* 1995; 74: 675-680.

6 CAPITULO 3

6.1 Efeito da periodontite induzida por ligadura em ratas submetidas a estresse crônico sobre o sistema nervoso central (SNC).

Effect of ligature-induced periodontitis in rats submitted to chronic stress on the central nervous system (SNC).

Alessandra N. Porto¹, Alex Semenoff Segundo², Tereza A.D.V.Semenoff³, José Roberto Cortelli⁴, Sheila Cavalca Cortelli⁵.

RESUMO

O presente estudo hipotetizou que a indução de periodontite por ligadura em ratas estressadas afetaria a resposta do SNC. Os métodos de campo aberto e labirinto em cruz elevado foram selecionados para mensurar o efeito da periodontite associada ao estresse crônico sobre o SNC. Selecionaram-se 48 ratas Wistar adultas as quais foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (n=12/grupo): grupo GSPL– estresse físico e ligadura, grupo GSVL- estresse variável e ligadura, GL- ligadura e grupo CN- controle negativo. Iniciou-se o ensaio de estresse físico e estresse variável e após 10 dias a periodontite foi induzida por ligadura nos grupos específicos. E, após 50 dias da colocação da ligadura, um examinador cegado submeteu os animais ao teste de labirinto em cruz elevado e campo aberto. A análise pelos testes ANOVA e Bonferroni ($p < 0,05$), não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos considerando-se o teste neurológico campo aberto ($p < 0,05$), demonstrando ausência de alterações do SNC. Entre os grupos GCN e GL houve diferença significativa apenas para uma variável considerando-se o ensaio labirinto em cruz elevado, indicando uma leve alteração neurológica pelo grupo exposto apenas a periodontite induzida. Embora quando associados os fatores estresse/periodontite não tenham afetado o SNC, isoladamente a indução de periodontite por ligadura teve efeito sobre o mesmo.

Palavras-chave: Estresse, ratos, periodontite, sistema nervoso central

ABSTRACT

The present study hypothesized that ligature induced periodontitis in stressed rats could affect the central nervous system (CNS). Actividad motora and central nervous system tools were selected to measure the induced periodontitis associated with stress effect on SNC. It was selected 48 Wistar adult rats which were randomly allocated into 4 groups (n=12/group): GSPL group – physical stress and ligature, GSVL group – variable stress and ligature, GL group – ligature and CN group - negative control. The physical and variable stress assays take place and after 10 days ligature periodontitis was induced in the specific groups. A blinded examiner submitted the animals to actividad motora and central nervous system tests 50 days after ligature placement. The analysis by ANOVA and Bonferroni tests ($p < 0.05$) did not reveal significant differences among groups considering the neurologic test actividad motora, demonstrating lack of CNS changes. Between GCN and GL groups it was a significant difference for one variable considering the central nervous system assay, indicating a minor neural change by the isolated induced periodontitis group. Although, when associated the factors stress/periodontitis did not affect the CNS, isolate the development of periodontitis by ligature placement had impact on it.

Key-words: Stress, rats, periodontitis, central nervous system

INTRODUÇÃO

Há três décadas surgiram as pesquisas que envolvem a Psiconeuroimunologia (PNI). Este novo paradigma – PNI - tenta elucidar as possíveis associações do sistema nervoso central com o sistema endócrino e com o sistema imunológico, correlacionando o primeiro com o estabelecimento de diversas doenças, dentre elas, o câncer. Atualmente sabe-se que um dos principais responsáveis por tal interação é o estresse (Reiche et al., 2004; Glaser, 2005) uma vez que esse desencadeia reações específicas tanto pelo sistema imunológico quanto pelo sistema endócrino. Após estímulo por agentes estressores, quer sejam

eles químicos, físicos ou psicológicos, o organismo libera uma série de hormônios, como a cortisona e a adrenalina, que associados a impulsos elétricos, direcionam as respostas de defesa tecidual, incluindo o periodonto; Como efeito desta cascata, na fase imunológica efetora, os linfócitos (*T helper 1*) TH1 e (*T helper 2*) TH2 poderão determinar uma maior susceptibilidade ao desafio microbiano. Assim, este padrão de resposta imune está ligado à maior fragilidade do hospedeiro estressado frente a infecções, como por exemplo a periodontite (Breivik, 2002). O caminho reverso também tem sido estudado. Trabalhos em animais demonstraram a produção de interleucinas no periodonto, as quais são capazes de atuar no eixo hipotálamo-pituitário-adrenal –HPA (Breivik, 2002).

A relação do estresse com a odontologia e mais especificamente com a periodontia não é recente (Barnes et al., 1973; Genco et al., 1999; Hilgert et al., 2006), além do estresse, outros problemas sistêmicos têm sido associados com a condição bucal (Page & Kornman, 1997).

Um fator que estimula a realização de estudos sobre estresse e doença periodontal é o impacto de ambas na qualidade de vida do ser humano. O aumento do número de bolsas periodontais afeta de modo prejudicial à qualidade de vida de seus portadores (Needleman et al., 2004). Similarmente, o estresse está fortemente associado a condições e doenças que acarretam impacto negativo sobre a qualidade de vida da população (Steptoe & Whitehead, 2005).

Vários pesquisadores têm direcionado seus esforços no sentido de elucidar a relação entre o estresse e a condição bucal ou sistêmica do indivíduo. Assim, vários são os modelos observados na literatura. O modelo de estresse selecionado para o presente estudo tem sido empregado de forma satisfatória, inclusive em pesquisas

envolvendo estresse e periodontite induzida em ratos (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006). De modo semelhante, a indução de periodontite por ligadura é um método validado (Rovin et al., 1966; Sallay et al., 1982; Needleman et al., 2004) e amplamente utilizado (Dannan & Alkattan, 2008).

Finalmente, os critérios de avaliação do SNC utilizados em trabalhos desta natureza são o de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Nestes modelos observam-se as reações motoras dos animais, que dependendo da resposta, representam ansiedade, agressividade, interação com o meio, locomoção, dentre outras. A análise destes comportamentos pode indicar a presença de alteração do SNC (Breivik, 2002). Trabalhos de outras áreas da saúde também utilizam este tipo de metodologia (Bowman, 2005; Colomina et al., 2005).

No presente estudo hipotetizou-se que a indução de periodontite por ligadura em ratas estressadas modificaria a resposta do SNC. Assim utilizamos os métodos de campo aberto e labirinto em cruz elevado para mensurar a interferência da periodontite associada ao estresse crônico sobre o SNC.

MATERIAL E MÉTODO

Grupos experimentais

Para o presente experimento foram selecionadas, 48 ratas adultas da espécie *Rattus Novergicus* da linhagem Wistar, com peso inicial médio de 232,81 gramas. As mesmas passaram por uma adaptação ao novo ambiente durante quatro semanas. Os animais mantiveram-se em caixas moradia (polietileno 16x40x30) em número doze, com ração padronizada e água *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12 horas,

temperatura controlada a 23°C e umidade \pm 40%. O experimento foi aprovado e registrado pelo Comitê de ética em pesquisa animal.

Inicialmente os animais foram divididos de forma aleatória (por auxiliar técnico) em quatro grupos experimentais, descritos a seguir:

1 - grupo GSPL: estresse físico + ligadura (n=12).

2 - grupo GSVL: estresse variável + ligadura (n=12).

3 - grupo GL: ligadura (n=12).

4 - grupo GCN: controle negativo (n=12).

Os animais GSPL e GSVL foram submetidos a estresse físico e a estresse variável, respectivamente. Após 10 dias de estresse (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006) os animais GSPL, GSVL passaram pelo processo de indução de doença periodontal experimental (abaixo descrita). O grupo GL também passou pelo processo de indução de doença periodontal, tendo nos primeiros dez dias de experimento permanecido sem indução de periodontite. A partir da colocação da ligadura para indução de periodontite os animais permaneceram com a ligadura até o final do estudo.

Finalmente, o GCN não recebeu nenhum tipo de intervenção, porém foi mantido no mesmo ambiente dos demais grupos.

Doença periodontal experimental

Para o procedimento de indução da doença periodontal, os animais GSPL, GSVL e GL receberam anestesia geral, através da administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP,

Brasil), associado a 0,05ml de cloridrato de xylazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP. Brasil) por cada 100 gramas de peso corporal.

Após anestesia foi acondicionado um fio de sutura de seda estéril número 4 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) em volta do segundo molar superior direito (Semenoff- Segundo et al., 2007).

Indução de estresse

Os modelos de submissão ao estresse físico (GSPL) foram imobilização e imobilização associada à exposição ao frio aplicadas durante dois meses, seis vezes por semana, em momentos variados do dia alternadamente. Já os modelos de submissão ao estresse variável (GSVL) foram exposição à luz intermitente, isolamento por 24 horas, exame da cavidade bucal, ambiente congestionado, odor de sangue e ruído (Semenoff-Segundo, 2007). Executou-se um tipo de estresse variável por dia entre as 6:00 e as 18:00 horas.

Imobilização: Os animais expostos (GSPL) a uma temperatura média de 26°C foram acondicionados em tubos de cloreto de polivinilal (PVC), compatíveis com seu tamanho e, posteriormente, interrompeu-se a passagem de ambos os lados com fio metálico, de forma a possibilitar a respiração dos animais que permaneceram imobilizados por 4 horas.

Imobilização e exposição ao frio: Após imobilização como anteriormente descrita (Semenoff-Segundo et al., 2007), os animais (GSPL) foram expostos a uma temperatura média de 7°C por um período de 4 horas.

Exposição à luz intermitente: Os animais em suas caixas-moradia foram colocados dentro de um arcabouço, que impossibilitava a entrada de luminosidade.

Uma lâmpada de 60watts, previamente instalada com um adaptador (pastilha), foi acionada dentro do ambiente estressor, fazendo com que a luz piscasse de forma intermitente. Os animais foram submetidos a esse modelo de estresse por 4 horas.

Isolamento: Os animais foram separados, individualmente, em uma nova caixa–moradia, por um período de 24 horas, sendo mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

Exame das ligaduras: Cada animal foi gentilmente imobilizado pelo pesquisador e em seguida examinou-se a ligadura pela visualização dos dentes molares com auxílio de espátula n° 7.

Ambiente congestionado: Todos (n=12) os animais permaneceram agrupados em uma única nova caixa–moradia, por um período de 24 horas, sendo mantidos com alimentação e água *ad libitum*.

Odor de sangue: Dois tubos de ensaio plásticos de 5ml com pequenas perfurações na parte superior foram preenchidos com sangue da mesma espécie junto com anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetracético), de forma que exalasse o odor característico no interior da caixa-moradia. Este recipiente foi estabilizado a fim de evitar que os ratos tivessem contato com o produto durante as 4 horas de procedimento.

Ruído: Colocaram-se os animais em suas caixas-moradia, dentro de um arcabouço, que impossibilitava a entrada de luminosidade, expondo-os ao som musical gerado por aparelho de som portátil, na intensidade de 90 decibéis durante 4 horas.

Teste comportamental

Para realização de avaliação motora e psicológica, utilizaram-se os testes comportamentais campo aberto (Figura 1) e labirinto em cruz elevado (Figura 2).

O aparato do campo aberto constituiu-se de uma arena circular, com 50cm de raio, dividida por segmentos lineares em dois círculos, formados por oito partes iguais centrais e dezesseis periféricas enquanto o aparato do labirinto em cruz consistiu-se de quatro braços; dois abertos e dois fechados com paredes de 30 cm de altura, sendo 53cm o comprimento dos braços e largura de 13cm.

O Teste de Campo Aberto possibilita registrar o medo através da atividade exploratória do animal, e a Avaliação da Atividade Motora. Ratos estressados apresentam um comportamento tigmotáxico, ou seja, eles procuram não se aventurar para longe das paredes do campo aberto, além de evitarem em ficar sobre as patas traseiras ou se limpar (Cruz et al., 1997).



Figura 1- Ilustração campo aberto

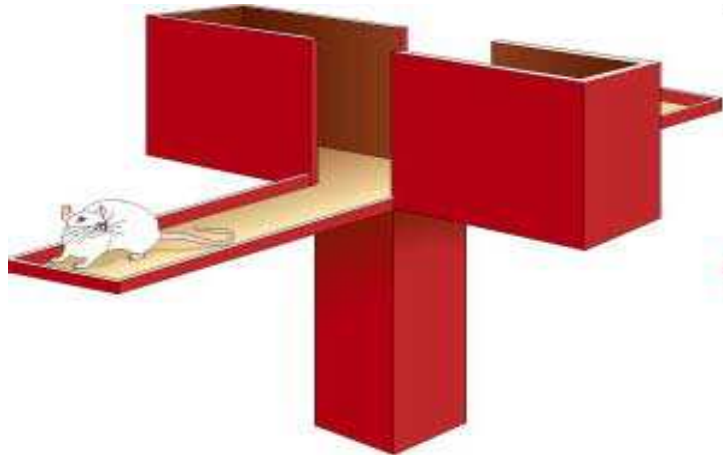


Figura 2- Ilustração labirinto em cruz elevado

Em ambiente silencioso, bem iluminado e com temperatura de 24°C, os animais foram colocados na porção central do campo aberto e observados durante cinco minutos. A seguir, os mesmos foram transferidos para o labirinto em cruz elevado e observados por mais cinco minutos. Após cada observação os aparatos foram limpos com água destilada. Um dos modelos animais de ansiedade mais eficiente e mais usado é o Labirinto em Cruz Elevado.

Para o campo aberto o número de segmentos centrais e periféricos percorridos, o número de vezes que o animal se manteve em duas patas sem apoio e a quantidade de auto-limpeza (coçar o nariz) foram utilizados como parâmetros. Para o labirinto em cruz o número de entradas nos braços, assim como o tempo de permanência nos respectivos locais foram observados.

Análise dos resultados

Tanto para os parâmetros para o campo aberto (número de segmentos centrais e periféricos percorridos, número de vezes que se manteve em duas patas sem apoio, quantidade de auto-limpeza (coçar o nariz)) quanto os do labirinto em cruz (número de entradas nos braços, assim como, o tempo de permanência nos

respectivos locais) foram calculadas as médias individuais e as médias do grupo para a realização da análise estatística. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de aderência Lilliefors.

A análise inter-grupos foi realizada ao final do período experimental (60 dias) e incluiu a análise isolada de cada parâmetro. Os grupos GSPL, GSVL, GL e GCN comparados entre si. Para todas as análises comparativas o teste estatístico Análise de Variância (ANOVA), com o teste corretivo de Bonferroni foram aplicados com auxílio do software SPSS for Windows. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos para o campo aberto, analisando-se as variáveis centro e periferia (quantidade de segmentos percorridos), auto-limpeza e levantar (número de vezes que se manteve em duas patas sem apoio), não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre nenhum dos grupos ($p < 0,05$) – Tabela 1. Este resultado demonstra ausência de alterações do SNC considerando-se esses indicadores neurológicos.

No teste do labirinto em cruz elevado houve diferenças significativas apenas na quantidade de entradas no braço fechado entre os grupos controle (GC) e grupo ligadura (GL). Para os demais parâmetros e grupos, os valores não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Este achado indica uma pequena modificação sobre o SNC no grupo GL, grupo este exposto apenas a indução de periodontite.

DISCUSSÃO

Atualmente os estudos que relatam a interferência da psique humana nas doenças, entre elas a periodontite, é um achado importante (Genco et al., 1999; Reiche et al., 2004; Glaser, 2005). Uma das dificuldades desta linha de pesquisa é a complexidade do ser humano, no que se refere ao comportamento. Neste momento estudos em animais levantam hipóteses auxiliares no conhecimento da área da PNI (Glaser, 2005). Vários trabalhos evidenciaram uma correlação entre a PNI e a periodontite induzida em ratos (Breivik et al., 1996; Breivik, 2002), através do estímulo do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal – organizador da resposta neuroendócrina ao estímulo estressor, apesar desta relação existir, ainda não é clara se a periodontite realmente tem a capacidade de estimular o eixo HPA, como se buscou neste trabalho, utilizando como modelo experimental o estresse crônico.

Em uma revisão de literatura Breivik et al. (1996) levantaram uma hipótese que o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) poderia interferir no processo inflamatório ocasionado pela periodontite, assim como, a periodontite poderia atuar no eixo HPA.

Este estudo se propôs a avaliar a interferência da periodontite associada ou não ao estresse sobre o SNC baseando-se nos resultados do teste de labirinto em cruz elevado e do teste de campo aberto. Trabalhos na área do conhecimento da medicina de diversas especialidades como a neurologia, a obstetrícia, a imunologia, a toxicologia utilizam parâmetros avaliativos do sistema nervoso e do modelo de estresse crônico próximos aos utilizados neste estudo. Em um artigo com objetivo de avaliar a capacidade cognitiva em ratos e ratas submetidos a ensaio de estresse, demonstraram a interferência do estresse em uma pior resposta para os animais

machos (Bowman, 2005). Em outro trabalho, na mesma linha de pesquisa, ratas prenhas foram submetidas a estresse de contenção associado ou não a exposição de alumínio (Colomina et al., 2005).

Seus resultados demonstraram que o estresse crônico interfere na resposta dos animais em sua prole. Com a descrição destes estudos observou-se que o ensaio de estresse utilizado e a forma de avaliação do Sistema Nervoso de outras áreas da saúde são próximos a metodologia utilizada neste trabalho (Bowman, 2005; Colomina et al., 2005).

A interferência do estresse e indução da periodontite tem sido assunto de estudos desde a década de 60 (Carranza et al., 1969). A interferência do estresse em uma maior progressão de periodontite tem sido demonstrada por vários estudos. Györfi et al. (1994) no intuito de evidenciar a relação entre o SNC e periodontite, administraram em ratos jovens um medicamento que destruía parte das fibras nervosas. Após induzir periodontite e avaliar o principal componente da inflamação neurogênica, que é a permeabilidade vascular, os autores não encontraram diferenças estatísticas entre o lado no qual, a periodontite foi induzida comparativamente ao lado sem indução de doença periodontal. Estes achados demonstraram a clara relação que existe a partir da dificuldade de comunicação entre as vias nervosas do periodonto, com sua resposta imuno-inflamatória por indução de periodontite.

Vários trabalhos associaram o estresse com a periodontite induzida (Takada et al., 2004; Nakajima et al., 2006; Semenoff-Segundo, 2007), entretanto poucos tentaram associar o efeito de tais fatores (periodontite e estresse) combinados ou não sobre o SNC.

Os resultados do presente trabalho não indicaram associação entre a periodontite instalada, induzida por ligadura, sobre os parâmetros de avaliação do SNC utilizados no estudo. A exceção foi o labirinto em cruz, para o grupo ligadura – com indução de periodontite - que teve associação comparado ao grupo controle. Este dado demonstra ansiedade do animal, entretanto de oito variáveis (campo aberto: centro, periferia, auto-limpeza e levantar; labirinto em cruz: número de entradas no braço fechado, número de entrada no braço aberto e tempo de permanência no braço fechado e aberto) referente ao SNC utilizadas, apenas a supracitada demonstrou diferença estatística.

Breivik et al. (2002) em estudo utilizando o microrganismo *Salmonella enteritidis* injetado através do peritônio em ratos, para avaliar a resposta frente à periodontite induzida por ligadura, demonstraram que há uma forte relação entre o SNC com a periodontite e a periodontite com o SNC. As variáveis do SNC são próximas a utilizadas neste estudo; as divergências dos resultados podem ter ocorrido pelo modelo de ativação do eixo HPA utilizado e a idade dos animais. Sabe-se que os estímulos em idade precoce dos ratos interfere na neurogênese. Este fato, talvez tenha ocasionado interferências na resposta do eixo HPA, devido os padrões de respostas dos dois estudos.

Embora o presente estudo não tenha se utilizado de testes bioquímicos para avaliar o grau de estresse decorrente da inserção da ligadura, Nakajima et al. (2006), através de método próximo não evidenciaram mudanças de corticosterona e cortisol comparado-se a periodontite induzida por bactérias com aquela induzida por meio de ligadura o que suporta os achados do presente experimento.

É notório que este assunto é complexo, existindo a necessidade de inclusão de outros parâmetros em estudos futuros para confirmação dos achados encontrados.

CONCLUSÃO

A indução de periodontite por ligadura em ratas estressadas não modificou a resposta nas atividades motoras pelo SNC. Embora a associação desses fatores não tenha acarretado alterações do SNC, isoladamente a indução de periodontite por ligadura teve efeito sobre o SNC.

Agradecimento

Agradeço ao UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande pelo incentivo financeiro para o Doutorado.

REFERÊNCIAS

1. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lanted Oncol* 2004; 5: 617-625.
2. Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior, and Immunity* 2005; 19: 3-11.
3. Breivik TJ. Brain-neuro-endocrine-immune interactions in periodontal disease. [Tese de doutorado]. Norway:University of Oslo, 2002. 62p.
4. Barnes GP, Bowles WF, Carter HG. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: a survey of 218 cases. *J Periodontol*1973; 44: 35-42.

5. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Todesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 70: 711-723.
6. Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC. Stress, cortisol, and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res* 2006; 85: 324-328.
7. Page CR, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9-11.
8. Needleman I, McGrath, Floyd P, Biddle A. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 454-457.
9. Steptoe A, Whitehead DL. Depression, stress, and coronary heart disease: the need for more complex models. *Heart* 2005; 91; 419-420.
10. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004; 75: 306-315.
11. Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontol Res* 2006; 46: 527-534.
12. Rovin S, Costich ER, Gordon HA. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germ free and conventional rats. *J Periodontal Research* 1966; 1: 193-203.
13. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Berhling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodont Res* 1982; 17: 263-274.

14. Dannan A, Alkattan F. Animal models in periodontal research: a mini-review of literature. *Journal of Veterinary Medicine* 2008; 5:1-19.
15. Bowman RE. Stress-induced changes in spatial memory are sexually differentiated and vary across the lifespan. *Journal of Neuroendocrinology* 2005; 17: 526–535.
16. Colomina MT, Roig JL, Torrente M, Vicens P, Domingo JL. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicology and Teratology* 2005; 27: 565- 574.
17. Semenov-Segundo A, Semenov TADV, Bosco AF, Biasoli ER, Ribeiro RV, Rocatto GEGD, Buzelle SL, Cirilo DM, Rosa SLG. Efeito do estresse crônico na progressão da periodontite induzida por ligadura em ratos. *Revista Periodontia* 2007; 17: 82-86.
18. Cruz APM, Júnior HZ, Graeff FG, Landeira-Fernandez J. Modelos animais de ansiedade. *Psicologia Teoria e Pesquisa* 1997; 13: 269-278.
19. Semenov-Segundo A. Efeito do estresse crônico na modulação da periodontite induzida por ligadura em ratos. [Tese de doutorado]. Araçatuba: Universidade Estadual de São Paulo, UNESP, 2007. 116p.
20. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 327-334.
21. Carranza FA, Simes RJ, Cabrini RL. Effect of combined etiologic factors in experimental periodontal lesions. *J Periodontal Res* 1969; 4: 33-34.
22. Györfi A, Fazekas A, Suba Z, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component ligature-Induced periodontitis in rat. *J Clin Periodontol* 1994; 21: 601-605.

Tabela 1 – Análise comparativa da atividade dos animais no campo aberto

	GSPL		GSVL		GL		GCN	
	Média	±	Média	±	Média	±	Média	±
Centro	5,92 ^a	4,70	5,69 ^a	4,68	5,08 ^a	3,23	4,08 ^a	4,27
Periferia	54,31 ^a	26,01	69,54 ^a	29,54	54,42 ^a	29,95	60,50 ^a	26,02
Auto-limpeza	1,23 ^a	1,30	0,69 ^a	1,03	0,75 ^a	0,97	1,25 ^a	1,76
Levantar	3,92 ^a	4,05	4,85 ^a	7,41	1,42 ^a	1,31	2,67 ^a	3,68

Média seguida de letras diferentes na horizontal indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos (ANOVA, seguido por teste corretivo de Bonferroni, $p < 0,05$); GSPL: grupo estresse físico associado a ligadura; GSVL: grupo estresse variável associado a ligadura; GL: grupo ligadura; GCN: grupo controle negativo

Tabela 2 – Análise comparativa da atividade dos animais no labirinto em cruz elevado

	GEF		GEV		GL		GC	
	Média	±	Média	±	Média	±	Média	±
Aberto	1,15 ^a	1,07	0,92 ^a	1,04	0,92 ^a	1,00	1,75 ^a	1,29
Tempo A	44,62 ^a	63,33	13,85 ^a	18,05	29,58 ^a	51,10	35,42 ^a	35,38
Fechado	3,31 ^{ab}	2,63	3,54 ^{ab}	3,02	2,67 ^a	2,39	5,83 ^b	3,01
Tempo B	255,38 ^a	63,33	286,15 ^a	18,05	270,42 ^a	51,10	264,58 ^a	35,38

Média seguida de letras diferentes na horizontal indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos (ANOVA, seguido por teste corretivo de Bonferroni, $p \leq 0,05$). T A – tempo de permanência no braço aberto do labirinto em segundos. T B – tempo de permanência no braço fechado do labirinto em segundos

7 CAPITULO 4

7.1 Lipid profile parameters under influence of periodontitis associated with chronic stress: an animal model study

Porto AN, Semenoff-Segundo A, Semenoff TA, Pedro FLM, Oliveira F, Cortelli SC.

ABSTRACT

The present study compared the effect of two chronic stress models associated with periodontitis induced in rats on partial lipid profile parameters. Forty-eight Wistar rats were selected and randomly divided into 4 groups (n=12/group): Physical stress, variable stress, ligature and control. Physical stress and variable stress occurred over 60 days. After the first ten days of the stress test, periodontitis was induced by ligature in the specified groups. After 60 days of experimentation, the animals underwent incision and visualization of the posterior vena cava, and blood punctures were performed under a vacuum. Impartial and trained examiners performed the analysis of the parameters, including: VLDL, HDL, triglycerides and cholesterol. The lipid parameters and cholesterol were significantly lower in the variable stress group than in the ligature and negative control groups. The physical stress group was not statistically different from the other groups. The triglyceride level was highest for the negative control group and statistically different from the levels in groups variable stress and physical stress. The physical stress group had the lowest triglyceride level, which was statistically different from that of the negative control

group. There was no statistical difference between physical stress and variable stress with respect to VLDL; a similar finding was obtained for ligature and negative control. The variable stress group had the lowest VLDL level, which was statistically different from those of the ligature and negative control groups. HDL showed no statistical differences between groups. In conclusion, despite the limitations of the methodology, it seems that the stress model variable associated with periodontitis improved lipid parameters in the study.

Key-words: Metabolism lipid, stress, periodontitis

INTRODUCTION

Although periodontal disease has been viewed as a local oral infection it seems that due to its pathologic mechanisms, periodontitis could affect the systemic health. Therefore, researchers are trying to identify what cells, tissues and functions could be altered by development and progression of periodontal disease aiming at elucidating the possible relationship between periodontitis and systemic diseases such as diabetes, respiratory and cardiac disorders (Noack et al., 2000; Izumi et al., 2009).

The lipid profile of patients is related to the metabolism of plasma lipoproteins, which are composed of lipids (cholesterol, phospholipids and triglycerides). Patients who demonstrate lipid changes are included in the risk groups for heart disease, which leads to serious consequences, including impacting their quality of life (Moeintaghavi et al., 2005). Interestingly, lipid profiles can be influenced by stress as firstly demonstrated by Selye (1936; 1946) and confirmed by Fazel & Danesh (2002) and Chuang et al. (2010).

Although the first studies to investigate the changes in cholesterol levels resulting from infection are not recent, few studies have focused on the effects of periodontal disease on lipid metabolism. Iacopino & Cutler (2000) reviewed the literature and reported that it was not clear whether the changes occurring in immune cell function associated with periodontitis could dysregulate lipid metabolism through processes involving pro inflammatory cytokines. In addition, evaluation of lipid markers in the blood has also demonstrated an association with periodontal status (Moeintaghavi et al., 2005). However, Machado et al. (2005) did not find a significant association between lipidemia and the presence or severity of periodontitis.

Moreover, Katz et al. (2002) conducted a large cohort study of 10,590 Israeli military service men and women. Although no significant association was observed among the women, in the men, the presence of periodontal pockets was positively associated with higher cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) blood levels.

In addition to its impact on lipidemia, stress has been suggested as a risk factor for periodontal status (Sam & Keung Leung, 2006). Stress seems to alter the immune-inflammatory component that is closely associated with periodontal disease pathogenesis, especially in relation to cytokine production (Giannopoulou et al., 2003). However, the reported results are still controversial (Solis et al., 2004).

In contrast, using an animal model, Jain et al. (2003), demonstrated that groups with periodontitis show a more extensive accumulation of lipids in the aorta than in the non-periodontitis animals.

Considering that stress has become a common systemic condition in adults and that chronic periodontitis is more prevalent, it would be reasonable to consider that they could act together. To verify whether this association occurs, we selected

an outcome that is an important systemic parameter: the lipid profile. Therefore, it was hypothesized that under chronic stress, rats with ligature-induced periodontitis would show an increase in the levels of cholesterol, triglycerides, LDL and HDL. In the present study, the lipid parameters of periodontitis rats that were under physical or variable stress were compared.

MATERIALS AND METHODS

Experimental groups

For the present study, 48 adult Wistar rats (*Rattus Norvegicus*) of an average initial weight of 232.81 g were selected and allowed to adapt to the new environment for four weeks. Six animals were kept in each housing box (polyethylene 16x40x30) with standard rations and water *ad libitum* under a light/dark cycle of 12 hours that was temperature and humidity controlled at 23° C and + 40%, respectively. The experiment was approved and registered by the ethics committee in animal experimentation.

Initially, animals were randomly divided (by the auxiliary technique) into four experimental groups, described by the following:

1-PSLG Group: physical stress + ligature (n=12).

2-VSLG Group: variable stress + ligature (n=12).

3-LG Group: ligature (n=12).

4-CG Group: negative control (n=12).

After 10 days of stress, physical stress and variable stress animals underwent experimental induction of periodontal disease (described below). The ligature group also underwent experimental induction of periodontal disease; in the first 10 days of the experiment, this group was not subjected to induction of periodontitis. Beginning from the introduction of the ligature for the induction of periodontitis, the ligature remained until the end of the study.

The animals in the PSLG and VSLG groups were respectively exposed to physical stress and variable stress. After being exposed to stress for ten days, these groups went through the process of ligature induced periodontitis described below.

The animals in the LG group also went through the same process on the 10th day of the study, but were not exposed to stress. The ligatures remained in position until the end of the study. Finally, the negative control group did not receive any type of intervention; however, this group was maintained in the same environment as the other groups.

Experimental periodontal disease

For the induction procedure of periodontal disease, the physical stress, variable stress and ligature animals received general anesthesia through intramuscular administration of 0.1 ml ketamine hydrochloride (Dopalen, Agribands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) per each 10 g of body weight (Fig.1).

After anesthesia, a #4 sterile silk suture thread was wrapped around the second upper right molar (Semenoff-Segundo et al., 2007).

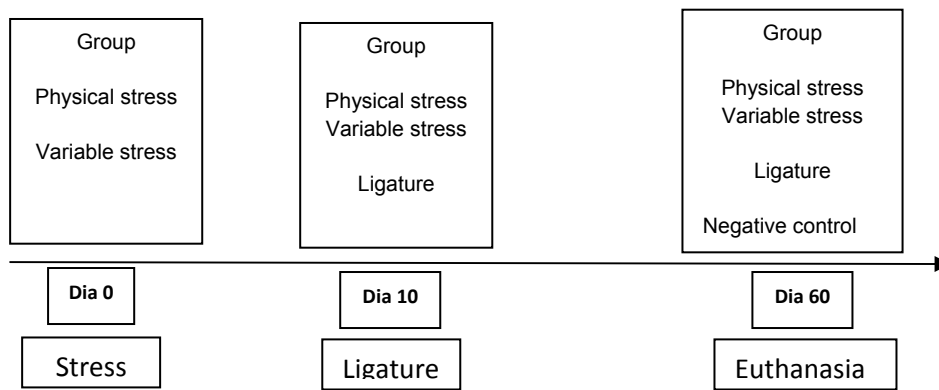


Fig. 1- Experimental procedure

Stress Induction

The models of physical stress were immobilization (Takada et al., 2004) and immobilization associated with exposure to cold (Shapira et al., 2000) applied for two months, six times a week, at various times on alternate days. The models of variable stress (Susin & Rosing, 2003; Semenoff-Segundo et al., 2007) were exposure to intermittent light, 24 hours isolation, oral cavity examination, crowded environment, smell of blood and noise. One type of variable stress was conducted each day between 6:00 and 18:00.

- a) **Immobilization:** The animals in the physical stress group were exposed to an average temperature of 26°C by placing them in polyvinyl chloride tubes compatible with their size. Then, the tubes were stopped up on both sides with metallic wire, enabling the animals to breathe while they were immobilized for 4 hours.
- b) **Immobilization and exposure to cold:** After immobilization as previously described, the animals in the physical stress group were exposed to an average temperature of 7°C for a period of 4 hours.

- c) **Exposure to intermittent light:** The animals housing boxes were placed in larger boxes that blocked the entrance of natural light, and a 60 watt lamp was intermittently used for 4 hours.
- d) **Isolation:** The animals were individually separated in one new housing-box for a period of 24 hours while receiving food and water *ad libitum*.
- e) **Ligature exam:** Each animal was gently immobilized by the researcher, and then the ligature was examined by looking at the molar teeth with the aid of an n° 7 spatula.
- f) **Crowded environment:** All animals (n=12) were grouped together in one new housing box for a period of 24 hrs while receiving food and water *ad libitum*.
- g) **Odor of blood:** Two plastic five-milliliter test tubes with small perforations in the upper region were filled with the same species blood together with an anticoagulant (EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid) to release the odor into the interior of the housing box. This container was stabilized to prevent the rats from contacting the product during the 4 hours of the procedure.
- h) **Noise:** The animals were placed in their house-boxes within a framework that prevented the entrance of light, and they were exposed to noise produced by musical sound at an intensity of 90 decibels for 4 hours.

Collection and blood analysis

After day 60 of the experiment, the animals were anesthetized through intramuscular administration of 0.1 ml ketamine hydrochloride, (Dopalen, Agribands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brazil) associated with 0.05 ml xylazine

hydrochloride (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil) for each 100g of body weight.

After anesthesia, the skin and abdominal wall at the base of the abdomen were diagonally incised, forming a V. After the displacement of the upper portion flap, access to the abdominal cavity was obtained. The internal organs were dislodged, enabling visualization of the posterior vena cava. Blood was collected by venous puncture using a 25x7 needle (Vacutainer system, Becton Dickinson, Plymouth, UK) in a 5 ml tube with the anticoagulant EDTA, and the samples were carefully homogenized. After the blood puncture, the animals underwent euthanasia.

After centrifugation of the blood plasma at 3000 RPM for 10 minutes, the lipid profile was analyzed using the following markers: cholesterol (mg/dL), triglycerides (mg/dL), HDL (mg/dL) and VLDL. To calculate the levels of the markers, the photocolometric method using a spectrophotometer was performed (Femto 700S, São Paulo, SP); calibration of the equipment with standard solution was previously conducted (Bioclin – Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brazil).

Statistical analysis

The averages of the lipid profiles of the experimental groups were compared using analysis of variance (ANOVA), and the Tukey and Bonferroni test was used for the comparisons between groups. All tests had a significance level of 5%.

RESULTS

Body Weight

There were no statistically significant differences ($p>0.05$) among the body weights of the groups at any of the evaluation periods (Table 1).

Table 1- Mean and Standard deviation of animal whole body weight (g) during the study. No differences were observed (ANOVA; $p>0.05$).

Weeks	PSLG		VSLG		LG	CG		
	Mean	±SD	Media	±SD		Mean	±SD	Media
1	02.75	22.07	22.41	29.08	22.41	16.40	23.08	32.71
2	12.16	19.94	22.50	36.02	24.83	15.23	25.33	37.70
3	16.16	20.10	26.83	29.91	25.91	11.58	29.91	50.65
4	28.16	22.55	36.23	30.63	30.75	12.45	35.33	25.68
5	25.66	22.85	37.16	26.00	38.91	11.57	36.66	31.98
6	30.91	20.38	22.58	27.90	34.25	16.77	36.41	29.30
7	27.83	21.41	44.16	26.38	37.41	12.99	41.08	32.30

PSLG- physical stress + ligature, VSLG- variable stress + ligature, LG- ligature, CG- negative control

Hematologic Parameters

The lipid parameters and cholesterol were significantly lower in the variable stress group than in the ligature and negative control groups. The physical stress group was not statistically different from the other groups. The triglyceride level was highest for the negative control group and statistically different from the levels in groups variable stress and physical stress. The physical stress group had the lowest triglyceride level, which was statistically different from that of the negative control group.

There was no statistical difference between physical stress and variable stress with respect to VLDL; a similar finding was obtained for ligature and negative control. The variable stress group had the lowest VLDL level, which was statistically different from those of the ligature and negative control groups. HDL showed no statistical differences between groups (Table 2).

Table 2 – Comparison of hematological parameters

	PSLG		VSLG		LG		CG	
	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD	Mean	±SD
Cholesterol	54.07 ^{ab}	7.45	48.98 ^a	7.28	6294 ^b	11.43	62.51 ^b	10.62
Triglycerides	73.77 ^{ab}	19.78	60.65 ^a	26.45	99.85 ^{bc}	38.63	118.53 ^c	45.60
VLDL	14.75 ^{ab}	3.95	12.13 ^a	5.29	19.97 ^{bc}	7.72	21.33 ^c	4.83
HDL	61.05 ^a	9.47	58.26 ^a	8.35	68.99 ^a	12.35	69.05 ^a	11.19

Standard deviation (\pm); different lower case letters within lines indicate significant differences among groups (ANOVA and Tuckey and Bonferroni test, $p < 0.05$). PSLG- physical stress + ligature, VSLG- variable stress + ligature, LG- ligature, CG- negative control

DISCUSSION

Cardiovascular disease is a major public health problem in the world. Young people are exposed to the most severe risk factors for this illness, including obesity, smoking, bad eating habits, lack of exercise and stress. These young people have already begun the process of heart disease (Fazel & Danesh, 2002; Semenoff-Segundo et al., 2007). The risk factors described indicate that poor metabolic control due to dyslipidemia, emotional factors, and the absence of insulin interferes with the

activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Among the neurohormones involved, cortisol and adrenaline have a direct effect on immuno-inflammatory responses (Beck et al., 1996; Beck et al., 2000).

Periodontal disease is similar to heart disease in some respects, with many risk factors in common including smoking and diabetes (Susin & Rosing, 2003). Simple indicators such as a lipid profile associated with the dental clinical history and examination could therefore be used by periodontists to give some idea of how the treatment of periodontitis could aid in the treatment of heart disease or emotional problems and vice-versa. However, the development of such indicators remains difficult (Semenoff et al., 2008).

The study results were surprising. Although there was an infection in the animal's mouth and a stressor with a systemic manifestation, there was still a "protective effect" in the vascular system, especially for the stress variable, associated with the induction of chronic periodontal disease by ligature (Susin & Rosing, 2003; Semenoff-Segundo et al., 2007). The indicator values in the stressed groups were lower than those in the control group. Studies show that medical triglycerides, cholesterol and VLDL can predict cardiac pathology (Fazel & Danesh, 2002).

It is possible that the stress models chosen, particularly the stress variable, might have caused some kind of protection for the cardiovascular system because humans are subjected to a heavy load of stress and their responses are often unpredictable, especially in terms of mental health (Fazel & Danesh, 2002). However, the protective effect of stress was not confirmed with respect to the lipid profile (Nielsen et al., 2006).

In most studies of stress associated with ligature-induced periodontitis in rats, the degree of stress is statistically different from models of stress induced by 12 hours of restraint. The stress load in such models is close to the limit of survival of the organism, so the findings of such models may be linked to a stage that Selye described as the burnout stage. In the proposed model of this study, we sought the stage described by Selye as the resistance phase, where the animal responds to stimuli, including serious systemic changes, without coming close to collapse. Such a response may have stimulated the cardiovascular system to decrease the parameters chosen for evaluation (Selye, 1936; Selye, 1946).

It is known that lipids are associated with carrier proteins for transport to the liver and other organs; such activity can directly affect platelet-mediated inflammatory events (Libby et al., 2002). This response usually starts in the vessel wall and also involves structures such as smooth muscle, endothelium and inflammatory cells (Beck et al., 2000). Such a process seems not to have occurred in animals only receiving periodontitis when compared to the negative control group. One hypothesis is that the adopted model of periodontitis may have brought about a significant systemic response, although other studies with a similar induction of disease show the systemic response to the induction of periodontitis (Semenoff-Segundo et al., 2007).

Periodontal health is related to a balance between microorganisms and host response. Some of these microorganisms are considered pathogens and might lead to disease (Genco, 1992). Because of the similarities between the periodontal anatomy of rats and humans, animal models represent an important tool to study periodontal diseases (Listgarten, 1975). In rats, this disease may be induced through changes in diet (Robinson et al., 1991), inoculation of periodontal pathogens or

bacterial toxins as well as through ligature insertion in gingival crevice (Klausen, 1991).

One item to note is the feeding of the animals. The type of food is linked to problems in the cardiovascular system (Williams et al., 2002). This study was designed such that the food intake and the feed itself would be the same for all groups. The body masses of the groups were not statistically different between the beginning and end of the experiment. This shows an important measure of overall health (Semenoff Segundo et al., 2007).

Modulation of stress has been studied by many researchers in the field of psychoneuroimmunology (PNI). However, it remains generally controversial whether periodontitis can be epidemiologically linked to stress. Contributing to the difficulty in establishing such a linkage is the absence of studies with longitudinal design, as well as the large variability in the methods of the available studies (Solis et al., 2004; Nielsen et al., 2006). A link has also been shown between heart disease and periodontitis, as well as between stress factors and the outcomes of major illnesses; however, there is still a lack of good quality evidence to support such a link (Scannapieco et al., 2003).

It is known so far that there is a link between the stress triad, ligation and periodontitis, and greater efforts are needed to try to connect stress with periodontitis and serum lipids in rats. In conclusion, despite the limitations of the methodology, it seems that the stress model variable associated with periodontitis improved lipid parameters in the study.

CONCLUSION

In conclusion, despite the limitations of the methodology, it seems that the stress model variable associated with periodontitis improved lipid parameters in the study.

REFERENCES

- 1.Noack B, Jachmann I, Roscher S, Sieber L, Kopprasch S, Luck C, Hanefeld M, Hoffmann T. Metabolic diseases and their possible link to risk indicators of periodontites. *J Periodontol* 2000; 71: 898-903.
- 2.Izumi A, Yoshihara A, Hirotsuki T, Miyazaki H. The relationship between serum lipids and periodontites in elderly non-smokers. *J Periodontol* 2009; 80: 740-748.
- 3.Moeintaghavi A, Haerian-Ardakani A, Talebi-Ardakani M, Tabatabaie I. Hyperlipidemia in patients with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005; 6: 78-85.
- 4.Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br J Exp Pathol* 1936; 17: 234-248.
- 5.Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 1946; 6: 117-230.
- 6.Fazel S, Danesh J. Serious mental disorder in 23000 prisoners: A systematic review of 62 surveys. *The Lancet* 2002; 359: 545-50.
- 7.Chuang Jc, Cui H, Mason BL, Mahgoub M, Bookout AL, Yu HG, Perello M, et al. Chronic social defeat stress disrupts regulation of lipid synthesis. *Journal of Lipid Research* 2010; 51: 1344-1353.

8. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: Recent concepts involving serum lipids. *Journal of Periodontology* 2000; 71: 1375-1384.
9. Machado ANP, Quirino MRS, Nascimento LFC. Relation between chronic periodontal disease and plasmatic levels of triglycerides, total cholesterol and fractions. *Braz Oral Res* 2005; 19: 284-289.
10. Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M. Association Between Periodontal Pockets and Elevated Cholesterol and Low Density Lipoprotein Cholesterol Levels. *J Periodontol* 2002; 73: 494-500.
11. Sam KS, Keung Leung W. A community study on the relationship between stress, coping, affective disposition and periodontal attachment loss. *Community Dentistry & Oral Epidemiology* 2006; 34: 252-266.
12. Giannopoulou C, Kamma JJ, Mombelli A. Effect of inflammation, smoking and stress on gingival crevicular fluid cytokine level. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 145-153.
13. Solis ACO, Lotufo RFM, Pannuti CM, Brunheiro EC, Marques AH, Lotufo Neto F. Association of periodontal disease to anxiety and depression symptoms, and psychosocial stress factors. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 633-638.
14. Jain A, Batista Jr EL, Serhan C, Stahl GL, Van Dyke TE. Role for Periodontitis in the Progression of Lipid Deposition in an Animal Model. *Infection and Immunity* 2003; 71: 6012-6018.
15. Semenov-Segundo A, Henneman C, Fontanela VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007; 9: 26-31.

16. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004; 75: 306-315.
17. Shapira L, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their P. *Gingivalis* LPS- stimulated secretion of nitric oxide. *J Periodontol* 2000; 74: 476-481.
18. Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 273-77.
19. Beck J, Garcia R, Heiss G, Vokonas PS, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* 1996; 67: 1123-1137.
20. Beck JD, Slade G, S Offenbacher. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontology* 2000, 2000; 23: 110-120.
21. Semenoff TADS, Semenoff-Segundo A, Bosco AF, Nagata MJHN, Garcia VG, Biasoli ER. Histometric analyses of ligature induced periodontitis in rats: a comparison of histological section planes. *J Appl Oral Sci* 2008; 16: 251-256.
22. Nielsen NR, Kristensen TS, Prescott E, Larsen KS, Schonhr P, Gronbaerk M. Perceived stress and risk of ischemic heart disease causation *or bias?* *Epidemiology* 2006; 17: 391–397.
23. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-1143.
24. Genco RJ. Host response in periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992; 63: 338-355.
25. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingival of rat and man. *J Periodontol* 1975; 46: 677-680.

26. Robinson M, Hart D, Pigott GH. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. *Lab Anim* 1991; 25: 247-253.
27. Klausen B. Microbiological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991; 62: 59-73.
28. Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J, Paridon S, et al. Hypertension, and obesity in the young (AHOY) of the council on cardiovascular disease in the young. *Circulation* 2002; 106: 143-160.
29. Scannapieco FA, Busch RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for atherosclerosis, cardiovascular disease, and stroke. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003; 8: 38-53.

8 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, no geral, pode-se concluir que o estresse é um fator a ser considerado quando do estudo da ocorrência e progressão da periodontite. A análise deste isoladamente ou em associação mostrou que o estresse parece atuar por vários mecanismos, por vezes com efeitos distintos entre si. A periodontite por si só parece representar um fator estressor. Além disso, algumas conclusões específicas também foram estabelecidas:

- a) o estresse crônico físico agravou o padrão de resposta à periodontite induzida experimentalmente em ratos;
- b) o consumo de álcool etílico por animais não estressados induziu a uma maior progressão da periodontite comparativamente ao consumo similar por animais estressados;
- c) a indução de periodontite sob condição de estresse não modificou a resposta nas atividades motoras pelo SNC. Embora a associação desses fatores não tenha acarretado alterações do SNC, isoladamente a ocorrência de periodontite teve efeito sobre o SNC;
- d) a periodontite associada à condição de estresse se mostrou capaz de diminuir alguns indicadores do perfil lipídico.

REFERÊNCIAS

- 1.Seymour GJ. Importance of the host response in the periodontium. J Clin Periodontol 1991; 18: 421-426.
- 2.Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontal 1965; 36: 177-187.
- 3.Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dungord RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. J Periodontol 1994; 65: 260-267.
- 4.Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal disease: na epidemiologic perspective. Ann Periodontol 2001: 64: 99-112.
- 5.Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. Periodontol 2000 2002; 29: 177-206.
- 6.Genco JR. Current view of the risk factors for periodontal diseases. J Periodontol 1996; 67: 1041-1049.
- 7.Jolanta A, Dorthe H, Harald ME, Per Gjermo. Psychosocial stress, lifestyle and periodontal health. J Clin Periodontol 2002; 29: 326-335.
- 8.Aleksejuniene J, Eriksen HM, Gjermo P. Psychosocial stress, lifestyle and periodontal health. J Clin Periodontol 2002; 29: 326-335.

9. Seyle H. Stress in health and disease. Boston: Butterworths; 1976. p.235.
10. Green LW, Tryon WW, Marks B, Huryn J. Periodontal disease as a function of life events stress. *J Human Stress* 1986; 12: 32-36.
11. Deinzer R, Hilpert D, Bach K, Schawacht M, Herforth A. Effects of academic stress on oral hygiene- a potential link between stress and plaque associated disease? *J Clin Periodontol* 2001; 28: 459-464.
12. Deinzer R, Kottmann W, Forsters P, Herforth A, Stiller-Winkler R, Idel H. After effects of stress on crevicular interleukin -1B. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 74-77.
13. Ader R, Felten DL, Cohen N. Psychoneuroimmunology. *Current Direction in Psychological Science* 2001; 10: 94-98.
14. Monteiro da Silva AM, Newman NH, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 516-526.
15. Amaral CSF, Luiz RR, Leão ATT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol* 2008; 79: 993-998.
16. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 484-488.
17. Breivik T, Thrane PS, Murison R, Germon P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 327-334.
18. Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC. Stress, cortisol and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res* 2006; 85: 324-328.

19. Ebersole JL, Capelli D. Reagentes de fase aguda nas doenças infecciosas e inflamatórias. *Periodontology* 2000 2005; 7: 19-49.
20. Losche WJ, Karapetow F, Pohl C, Kocher T. Plasma lipids and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 537-541.
21. Pohl A, Pohl C, Krause S. Hyperlipidaemia, atherosclerosis and oral inflammatory disease. *Acta Angiologica* 1995; 1: 133 -213.
22. Saito T, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *N Engl J Med* 1998; 7: 482-483.
23. Moeintaghavi A, Haerian-Ardakani A, Talebi-Ardakani M, Tabatabaie I. Hyperlipidemia in patients with periodontitis. *J Contemp Dent Pract* 2005; 6: 78-85.
24. Rufai ML, Schenkein HA, Barbour SE, Tew JG, Antwerpen R. Altered lipoprotein subclass distribution and PAF-AH activity in subjects with generalized aggressive periodontitis. *J Lipid Res* 2005; 46: 2752-2760.
25. Williams RC, Offenbacher S. Periodontal medicine: The emergence of a new branch of periodontology. *Periodontol* 2000 2001; 23: 9-12.
26. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol* 2000 2003; 32: 11-23.
27. Glaser R. Stress-associated immune dysregulation and its importance for human health: a personal history of psychoneuroimmunology. *Brain, Behavior, and Immunity* 2005; 19: 3-11.

28. Breivik T, Thrane PS. Psychoneuroimmune interactions in periodontal disease. In: Alder R, Felten DL, Cohen N. Psychoneuroimmunology. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2000. p.627-644.
29. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Todesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999; 70: 711-723.
30. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004; 75: 306-315.
31. Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol* 2004; 5: 617-625.
32. Breivik TJ. Brain-neuro-endocrine-immune interactions in periodontal disease. [Tese de doutorado]. Norway: University of Oslo, 2002. 62p.
33. Moss ME, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch GG, et al. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 1996; 67: 1060-1069.
34. Shizuishi S, Hayashi N, Tamagawa H, Hanioka T, Maruyama S, Takeshita T, et al. Lifestyle and periodontal health status of Japanese workers. *Ann Periodontol* 1998; 3: 303-311.
35. Hornecker E, Muub T, Ehrenreich H, Mausberg RF. A pilot study on the oral conditions of severely alcohol addicted persons. *J Contemp Dent Pract* 2003; 2: 51-59.
36. Lieber CS. Metabolism of alcohol. *Clin Liver Dis* 2005; 9: 1-35.
37. Gahill A, Wang X, Hoek JB. Increased oxidative damage to mitochondrial DNA following chronic ethanol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 286-290.

38. Valko M, Leibfruits D, Moncol J, Gronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
39. Lieber CS. Alcohol fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 37: 9-19.
40. Demori I, Voci A, Fugassa E, Burlando B. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. *Alcohol* 2006; 40: 185-191.
41. Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Kusano H, Azuma T, Sanbe T. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol* 2007; 78: 1999-2006.
42. Larato DC. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. *J Periodontol* 1972; 43: 772-773.
43. Novacek G, Plachetzky U, Potzi R. Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis-role of etiology of liver disease. *J Hepatol* 1995; 22: 576-582.
44. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol* 2005; 76: 1534-1541.
45. Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Rest* 2008; 5: 456-460.
46. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 2001; 72: 183-189.
47. Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br J Exp Pathol* 1936;17: 234-248.

48. Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol* 2008; 79: 697-704.
49. Shapira L, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. Experimental stress suppresses recruitment of macrophages but enhanced their *P. gingivalis* LPS- stimulated secretion of nitric oxide. *J Periodontol* 2000; 71: 476-481.
50. Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003; 61: 273-277.
51. Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK, Pabst R, Hörsten SV. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodont Res* 2001; 36: 295-300.
52. Semenoff-Segundo A, Henneman C, Fontanela VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007; 9: 26-31.
53. American Academy of Periodontology. Periodontal disease as a potential risk factor for systemic disease. *J Periodontol* 1998; 69: 841-850.
54. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic disease: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998; 3: 108-120.
55. Periodontal disease: epidemiology and diagnosis. *Ann Periodontol* 1996; 1: 216-222.
56. American Academy of Periodontology. Periodontal management of patients with cardiovascular disease. *J Periodontol* 2002; 73: 954-968.
57. Ritchie CS, Kinane DF. Nutrition, inflammation, and periodontal disease. *Nutrition* 2003; 19: 475-476.
58. Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease. *J Periodontol* 2000; 71: 1375-1384.

59. Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. Defective neutrophil function in an insulin-dependent diabetes mellitus patient. A case report. *J Periodontol* 1991; 62: 394-401.

60. Howard BV, Scheniderman N, Falner B, Laws A. Insulin, health behaviors and lipid metabolism. *Metabolism* 1987; 42: 25-35.

61. Iacopino AM. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. *Oral Diseases* 1995; 1: 214-229.

62. Doxey DL, Cutler CW, Iacopino AM. Diabetes prevents periodontitis-induced increases in gingival platelet derived growth factor- B and interleukin 1-beta in a rat model. *J Periodontol* 1998; 69: 113-119.

63. Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 1946; 6: 117-230.

64. Dalla Vecchia CFD, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol* 2005; 76: 1721-1728.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado de Aprovação pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual Paulista



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Campus de Araçatuba




COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "MODULAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO FRENTE A DOIS MODELOS DE ESTRESSE CRÔNICO" sob responsabilidade de ÁLVARO FRANCISCO BOSCO, ALEX SEMENOFF SEGUNDO E VALDIR GOUVEIA GARCIA está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião ordinária de 26 de abril de 2005, de acordo com o protocolo nº 74/05.

Araçatuba, 01 de agosto de 2005.


Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

ANEXO B – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP- UNIC



HOSPITAL GERAL UNIVERSITÁRIO

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÇÃO À MATERNIDADE
E À INFÂNCIA DE CUIABÁ

Entidade Mantenedora

Registro: nº 009 CEP/UNIC/2009 – protocolo nº 0307-321

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNIC

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa: **“Efeito da ingestão crônica de álcool associado ou não ao estresse crônico, na periodontite induzida em ratos da linhagem Lewis”** do (a) pesquisador (a) **Alex Semenoff Segundo** foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Cuiabá-MT, 27 de fevereiro de 2009.

Prof. Dra. Bianca Borsatto Galera
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
UNIC/HGU

ANEXO C – Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP- UNIC



HOSPITAL GERAL UNIVERSITÁRIO

ASSOCIAÇÃO DE PROTEÇÃO À MATERNIDADE
E À INFÂNCIA DE CUIABÁ

Entidade Mantenedora

Registro: nº 061 CEP/UNIC

Protocolo: nº 2009-051

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNIC

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o Projeto de pesquisa: "Efeito de dois modelos de estresse associados à periodontite induzida por ligadura sobre parâmetros do perfil lipídico" do (a) pesquisador (a) Alex Semenoff Segundo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Cuiabá - UNIC

Cuiabá-MT, 29 de maio de 2009.

Prof. Dra. Bianca Borsatto Galera
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
UNIC/HGU

ANEXO D – Certificado American Journal Experts



www.journalexperts.com

American Journal Experts Editorial Certification

This document certifies that the manuscript titled "Effect of two chronic stress models on the modulation of ligature-induced periodontitis in Wistar rat" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com

Manuscript title: Effect of two chronic stress models on the modulation of ligature-induced periodontitis in Wistar rat

Authors: Semenoff-Segundo A; Porto AN; Semesnoff TAD; Bosco AF; Cortelli JR; Cortelli SC

Key: E5B8-33A9-81F9-F1AF-C2FF

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate

American Journal Experts is an association of Ph.Ds and Ph.D. graduate students from America's top 10 research universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. We provide the quickest turnaround times at the lowest prices in the industry. For more information, please visit www.journalexperts.com, or for volume discounts for academic journals, please contact us by email at sales@journalexperts.com

ANEXO E – Certificado American Journal Experts



www.journalexperts.com

American Journal Experts Editorial Certification

This document certifies that the manuscript titled "Lipidic profile parameters under influence periodontitis associated with chronic stress- an animal model study" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@joumalexperts.com

Manuscript title: Lipidic profile parameters under influence periodontitis associated with chronic stress- an animal model study

Authors: Porto AN, Cortelli SC

Key: 7797-72B6-D1ED-A34E-945A

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate

American Journal Experts is an association of Ph.Ds and Ph.D. graduate students from America's top 10 research universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. We provide the quickest turnaround times at the lowest prices in the industry. For more information, please visit www.journalexperts.com, or for volume discounts for academic journals, please contact us by email at sales@joumalexperts.com

ANEXO F – Certificado American Journal Experts.

**American Journal Experts Editorial Certification**

This document certifies that the manuscript titled "Tese Doutorado = Abstract" was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process.

Documents receiving this certification should be English-ready for publication - however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns over this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com

Manuscript title: Tese Doutorado = Abstract

Authors: Porto AN

Key: 0ABF-2F95-BE94-7ACC-FF73

This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Alessandra Nogueira Porto

Taubaté, agosto de 2010.