

Comparação de métodos para mensuração da perda óssea alveolar periodontal em ratos submetidos a estresse

Comparison of methods for measurement of periodontal bone loss in rats submitted to stress

Renata de Carvalho Foureaux¹, Michel Reis Messoria², Luiz Fernando Ferreira de Oliveira², Leandro Silva Marques³, Viviam de Oliveira Silva⁴, Márcio Gilberto Zangerônimo⁴, Luciano José Pereira⁵

RESUMO

Objetivo: Comparar os métodos radiográfico, morfométrico e histométrico para avaliação da perda do osso alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura e submetidos a estresse crônico. **Materiais e Métodos:** Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) machos adultos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (com e sem doença periodontal (DP), com e sem estresse crônico (EC)) com oito repetições em cada grupo. O EC foi realizado por meio de imobilização diária por 2,5 horas por 30 dias, enquanto que a DP foi induzida com o protocolo de ligadura no primeiro molar mandibular direito e esquerdo nos últimos 14 dias. Após esse período, os ratos foram eutanasiados. **Resultados:** Na análise radiográfica e histométrica foi determinado o suporte ósseo periodontal (SOP). Adicionalmente, na análise histométrica foi calculada a perda do osso alveolar (POA) e a perda de inserção epitelial (PIE) na face distal do primeiro molar. Na análise morfométrica, a perda do osso alveolar foi obtida pela determinação das distâncias lineares da junção cimento-esmalte (JEC) até crista óssea (CO) no centro das raízes linguais e distais. Observou-se aumento dos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) nos animais submetidos a imobilização e a perda do osso alveolar foi superior ($p < 0,05$) nos animais que receberam a ligadura, independentemente da associação com estresse, enquanto que a imobilização isoladamente não influenciou esses parâmetros. Houve correlação significativa entre as três variáveis utilizadas para avaliação da perda óssea ($p < 0,05$). **Conclusão:** Métodos histométricos, radiográficos e morfométricos não apresentaram resultados divergentes na avaliação da perda óssea alveolar em ratos com DP e submetidos ao EC.

Descritores: Modelos animais. Periodontite. Ligadura. Perda do osso alveolar.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal é caracterizada por uma infecção bacteriana oral crônica que leva a uma destruição gradual dos tecidos adjacentes aos dentes^{1,2}. O acúmulo de microrganismos bem como a liberação de citocinas e quimiocinas promove uma resposta inflamatória local com conseqüente ativação de osteoclastos levando a reabsorção do osso alveolar de suporte³. Porém, além dos microrganismos existentes na cavidade bucal, o estresse pode modular a resposta imune do organismo, contribuindo sobremaneira com a etiologia e a perpetuação da periodontite crônica⁴.

O estresse pode ser definido como um conjunto de reações fisiológicas que envolvem o eixo hormonal hipotálamico-hipofisário-adrenal e o sistema nervoso autônomo simpático, frente a situações ameaçadoras a homeostasia do organismo⁵. Evidências têm indicado que o estresse crônico é um importante fator no desenvolvimento de supressão imune, entre outros processos patológicos⁶.

O estresse pode alterar a resistência tecidual do hospedeiro por mecanismos autonômicos e endócrinos resultando, principalmente, na elevação dos níveis de corticosteróides e catecolaminas,

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil

²Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial e Periodontia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP, Universidade de São Paulo, USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

³Departamento de Ortodontia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, Diamantina, Minas Gerais, Brasil

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil

⁵Departamento de Ciências da Saúde, UFLA, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

Contatos: renatafoureaux@yahoo.com.br, michel_messoria@terra.com.br, luizfernando013@hotmail.com, lsmarques.prof@gmail.com, vivian_osbio@yahoo.com.br, zangeronimo@dmv.ufla.br

reduzindo a microcirculação da gengiva e do fluxo salivar com decremento das funções de neutrófilos e linfócitos, facilitando a invasão bacteriana e o dano tecidual⁷.

Modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a progressão e o efeito de diferentes tratamentos em doença periodontal induzida⁸, bem como os efeitos do estresse sobre a progressão da perda do osso alveolar^{9,10}. A colocação de ligadura com fio de seda ou algodão ao redor da região cervical de primeiros molares inferiores ou superiores tem sido amplamente utilizada¹¹. A partir da indução, vários métodos podem ser empregados para avaliação da evolução da doença periodontal, tais como os métodos radiográfico¹², morfométrico¹³ e histométrico¹⁴.

De acordo com Klausen¹⁵, a análise morfométrica é a metodologia mais apropriada para mensuração da perda do osso alveolar em maxilas dissecadas de ratos, devido a possibilidade de avaliação direta dos tecidos. Porém, de acordo com Fernandes et al.¹⁶ e Souza et al.¹⁷, as medidas obtidas por esse método não diferem daquelas obtidas pelo método histométrico. Ademais, Holzausen et al.¹⁸ afirmaram que o método radiográfico também pode ser empregado na avaliação do modelo de periodontite crônica induzida, sendo comparável ao método morfométrico com relação a reprodutibilidade e capacidade de distinção entre os vários grupos experimentais¹⁹.

Dessa forma, apesar do amplo conhecimento utilizando os três métodos mencionados, existem controvérsias na literatura com relação a reprodutibilidade e sensibilidade dos métodos citados. Almeida et al.¹⁴ consideraram que o método radiográfico e histométrico apresentaram diferenças nas mensurações da perda do osso alveolar após cinco dias de tratamento com terapia fotodinâmica. Ademais, Semenoff et al.²⁰ citaram que, apesar da análise histométrica apresentar uma informação mais completa dos dados qualitativos celulares e teciduais associados à perda de inserção causada pela doença periodontal, esta depende de um processamento criterioso e uma padronização com relação ao número de amostras, a fim de se evitar distorções durante a comparação de tratamentos. Assim, as metodologias usadas para quantificar a progressão da periodontite induzida variam na literatura, gerando a necessidade da comparação dos três métodos em um único estudo, incluindo a presença de um fator modificador que é o estresse crônico.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi

avaliar a perda do osso alveolar pelos métodos radiográfico, histométrico e morfométrico em ratos com indução de doença periodontal e submetidos a estresse crônico e determinar a correlação entre as medidas encontradas pelas três técnicas.

MATERIAIS E MÉTODO

Trinta e dois ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) em estado hígido, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA), pesando aproximadamente 200g, foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 (com e sem doença periodontal – DP, com e sem estresse crônico – EC) com oito repetições com um animal por parcela experimental. Os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais (27x19x20cm) confeccionadas em arame trefilado e zincado, contendo chapa galvanizada para recepção das fezes e urina, comedouro tipo túnel e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300ml. A sala foi mantida à temperatura de 22±2 °C em ciclos de 12/12 horas claro-escuro. Foram fornecidas ração comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento. O experimento obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA (PRP-UFLA), Protocolo 036/2010.

O modelo de indução de estresse por imobilização foi feito por contenção dos ratos em recipientes plásticos adaptados, de acordo com o tamanho/peso do animal²¹. Os recipientes plásticos apresentavam uma abertura de 1,0 cm, posicionada nas vias aéreas, para garantia da respiração. Os mesmos foram submetidos à imobilização por um período diário de 2,5 horas durante 30 dias²¹. A imobilização foi realizada em ambiente silencioso sempre as 6h00min.

A doença periodontal foi induzida com o protocolo de ligadura, em ambos os primeiros molares mandibulares. Os animais receberam anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina 80 mg/kg (Francotar- Virbac-Roseira, SP, Brazil) e Xilazina 10 mg/kg (Rompum-Bayer-São Paulo, SP, Brazil)²¹. Depois de anestesiados, os animais receberam a ligadura com fio de algodão (Coats-Corrente, São Paulo, SP, Brasil) posicionado subgengivalmente, de acordo com a metodologia descrita por Holzausen et al.¹⁸ e Almeida et al.¹⁴. A ligadura foi mantida por 14 dias consecutivos para indução da doença periodontal (Figura 1).

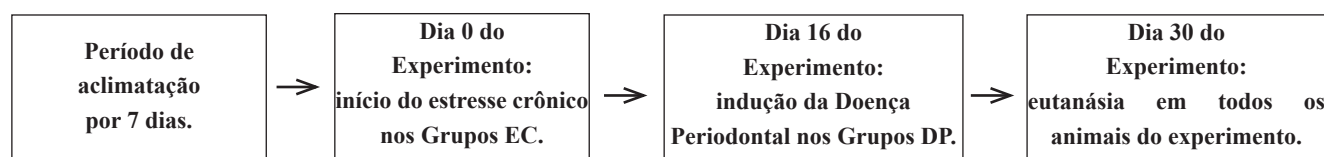


Figura 1 - Representação esquemática do delineamento experimental.

Após o término do período experimental, os ratos foram eutanasiados com auxílio de uma guilhotina própria (Insight Equipamentos Ltda. – EPP, Ribeirão Preto, SP, Brasil)²². As mandíbulas foram removidas, divididas em lados direito e esquerdo, reduzidas e fixadas em solução formalina 10% com volume de líquido pelo menos 30 vezes maior que a peça removida durante 48 horas. A redução das peças foi feita cuidadosamente mantendo os três molares mandibulares²³. As hemimandíbulas do lado direito foram utilizadas para avaliação dos graus de perda do osso alveolar por análise radiográfica e histométrica, enquanto as do lado esquerdo foram utilizadas para análise morfométrica.

As radiografias foram obtidas utilizando-se um aparelho de radiografia dental convencional Spectro 70x (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As peças foram colocadas sobre o filme radiográfico (Kodak® Dental Intraorale-Speed Film, São Paulo, SP, Brasil) e o cone foi posicionado perpendicularmente, mantendo uma distância objeto-fonte de 50 cm, com o tempo de exposição de 0,4 segundo, estando a radiação a 70kV e 8 mA²³. A revelação das radiografias foi feita em processadora automática A/T2000 XR (Air Techniques, Melville, Nova York, EUA), durante oito minutos com as soluções reveladora e fixadora Kodak (Rochester, Nova York, EUA) recém preparadas. As radiografias, após processadas, foram escaneadas (MicrotekScanMaker i800, Microtek, Santa Fe Springs, Califórnia, USA) e mensurações foram realizadas utilizando-se o software ImageLab (DiraconBio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) também utilizado nas análises histométrica e morfométrica.

Nas radiografias, foram considerados três pontos no molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C) e o ápice da crista

óssea entre o primeiro e o segundo molar (B). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB (Figura 2A). Então, o SOP foi calculado pela fórmula: $SOP = AB' / AC \times 100$ e o resultado expresso em porcentagem¹⁹.

A análise histométrica nas hemimandíbulas do lado direito foi realizada após a confecção de lâminas. Para isso, as mandíbulas foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%, durante 90 dias¹⁴, parafinadas, cortadas em um diâmetro de 5,0 µm em cortes semisseriados em direção méso-distal. Os cortes foram fixados em lâminas, desparafinadas e coradas com hematoxilina e eosina. Os cortes histológicos foram identificados em uma sequência numérica aleatória na região onde foi evidenciada a área proximal entre primeiro e segundo molar²⁴ e escolhidos para fazerem parte da análise. As imagens foram capturadas no microscópio Olympus CX³¹, no programa AnalySISgetIT (Olympus Corporation - Tokyo, Japan) (Figura 2B). A análise histométrica consistiu na avaliação de três medidas: SOP, perda do osso alveolar (POA) e perda de inserção epitelial (PIE) (Figura 2B).

Para as análises morfométricas as hemimandíbulas do lado esquerdo foram imersas em água oxigenada a 30% por 2 horas. Os tecidos moles foram removidos com gaze, seguindo coloração com azul de metileno a 1% por 30 minutos e lavagem em água corrente para a remoção do excesso de corante. As peças foram secas e imagens foram capturadas utilizando-se microscópio (Brook-Anco, Rochester, New York, USA) para medição da perda do osso alveolar. A perda do osso alveolar foi avaliada pela mensuração da distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar, seguindo a inclinação radicular na região lingual do primeiro molar mandibular nas raízes distal e lingual¹³ (Figura 2C).

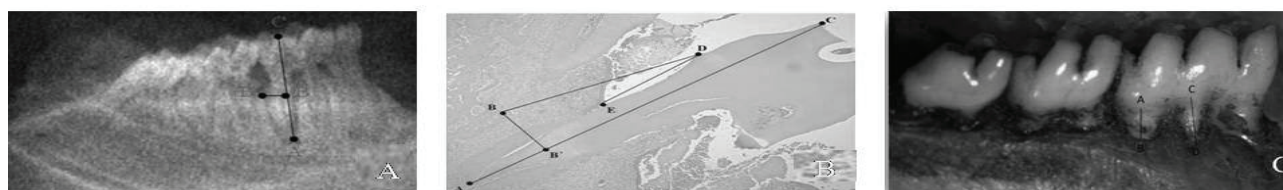


Figura 2 - **2A** - Análise radiográfica: foram considerados quatro pontos no molar selecionado - ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B'). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB' / AC \times 100$. **2B** - Análise Histométrica: Perda de suporte ósseo periodontal (SOP): foram considerados quatro pontos no molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B'). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB' e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB' / AC \times 100$. Perda do osso alveolar (POA): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e ápice da crista alveolar distal do primeiro molar inferior (B). Perda de inserção epitelial (PIE): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e inserção epitelial (E). Coloração HE, aumento 20x. **2C** - Análise morfométrica: avaliação da perda do osso alveolar (obtida pela média das duas raízes: lingual-CD e distal-AB) entre as distâncias lineares da junção esmalte-cimento (JEC) a crista óssea (CO) localizadas no centro de cada raiz seguindo seu longo eixo.

A coleta de sangue foi feita no momento da eutanásia para avaliação dos níveis sanguíneos de corticosterona para determinação da indução do estresse crônico foi realizada utilizando-se kit comercial ELISA (DetectX® Corticosterona Enzyme Immunoassay kit – Arbor Assays, New Orleans, L.A., EUA) projetado para medir quantitativamente a corticosterona presente em amostras de soro em leitor com comprimento de onda de 450 nm. Foi seguido o protocolo informado pelo fabricante e o resultado foi lido em leitora automática de placas (Thermoplate - TP-READER – PLUS – Equipar – Curitiba- Paraná – Brasil).

As medidas radiométricas, histométricas e morfométricas foram realizadas por dois examinadores, com avaliação cega e em concordância intra e interexaminador superior a 90% (correlação de Pearson $r^2 > 0,90$).

Os dados foram analisados por meio de teste de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F. O teste de correlação de Pearson foi realizado entre as medidas obtidas pelos métodos radiográfico,

histométrico e morfométrico. As análises foram realizadas utilizando-se o Programa Sigma Stat 3.1 (Sigma Stat Statistical Package Software Inc., USA). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

RESULTADOS

O modelo de estresse empregado no presente estudo provocou aumento nos níveis de corticosterona ($p < 0,05$) comprovando indução de estresse (Figura 3). Nos três métodos empregados, foi possível observar que os animais com indução da ligadura apresentaram maior perda do osso alveolar em relação aos controles sem DP ($p < 0,05$) (Figura 3). O estresse isoladamente não foi capaz de promover reabsorção óssea. A indução de estresse por imobilização não promoveu incremento da perda do osso alveolar nos animais que receberam ligadura. Houve correlação significativa entre as três variáveis utilizadas para avaliação da perda óssea: variáveis radiométrica, histométrica (SOP, POA e PEI) e morfométrica ($p < 0,05$) (Figuras 4-6 e Tabela 1).

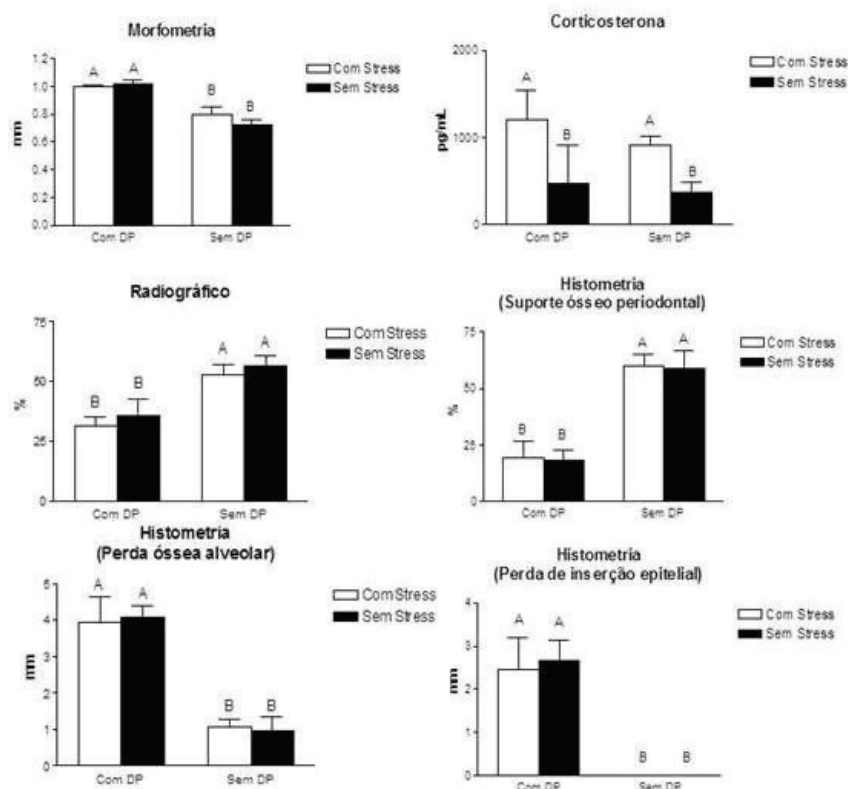


Figura 3 - Níveis médios de corticosterona; análise morfométrica, radiográfica e histométrica para avaliação da perda do osso alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura e submetidos a estresse crônico. A,B Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas se referem a diferença significativa entre com e sem doença periodontal pelo teste F ($p < 0,05$). a,b Médias seguidas por diferentes letras minúsculas se referem a diferença significativa entre com e sem estresse pelo teste F ($p < 0,05$).

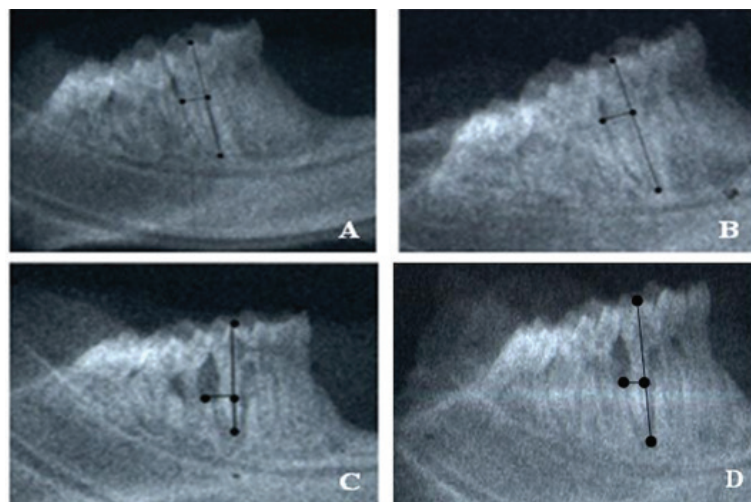


Figura 4 - Figura representando cada tratamento para a análise radiográfica: A - Grupo controle; B - Grupo estresse crônico; C - Grupo doença periodontal; D- Grupo estresse crônico e doença periodontal.

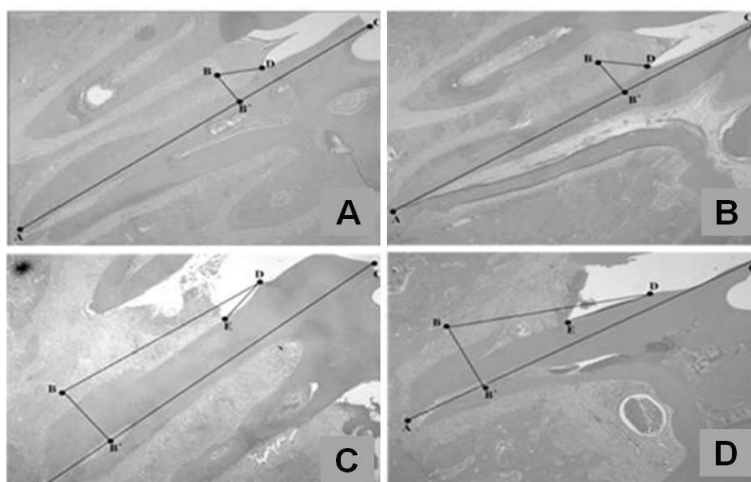


Figura 5 - Figura representando cada tratamento para a análise histométrica perda de suporte ósseo periodontal (SOP), perda do osso alveolar (POA) e perda de inserção epitelial (PIE): A - Grupo controle; B - Grupo estresse crônico; C - Grupo doença periodontal; D - Grupo estresse crônico e doença periodontal.

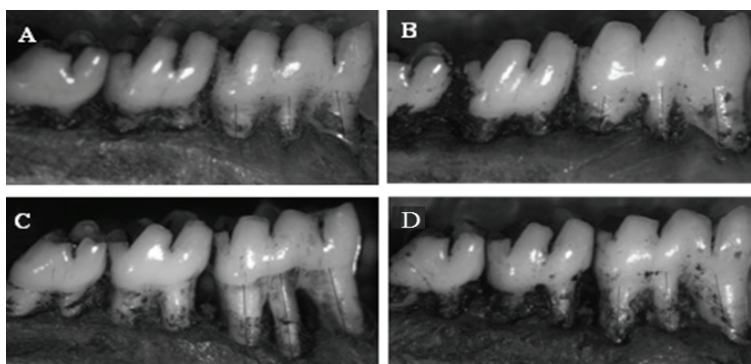


Figura 6 - Figura representando cada tratamento para a análise morfométrica: A - Grupo controle; B - Grupo estresse crônico; C - Grupo doença periodontal; D - Grupo estresse crônico e doença periodontal.

Tabela 1 - Matriz de correlação entre as variáveis radiométrica, histométrica e morfométrica

		Variáveis Histométricas			Variável Morfométrica	
		SOP	POA	PEI		
Variável Radiométrica	r	0,51	-0,58	-0,56	-0,52	
	P	<0,01	<0,01	<0,01	0,01	
	SOP	r		-0,97	-0,94	-0,53
		P		<0,01	<0,01	<0,01
Variáveis Histométricas	POA	r		0,94	0,45	
		P		<0,01	0,02	
	PIE	r			0,59	
		P			<0,01	

r: coeficiente de correlação linear; P: p-valor; variáveis histométricas - SOP: suporte ósseo periodontal; POA: perda do osso alveolar PIE: perda de inserção epitelial

DISCUSSÃO

A doença periodontal comumente pode ser induzida em ratos pela manipulação da dieta com alta ingestão de carboidratos, pela injeção de lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos diretamente no sulco gengival ou pela colocação de ligadura com fio de nylon ou algodão que atua como um fator facilitador do acúmulo de bactérias periodontopatógenas^{9,25,26}. Uma vez que a doença periodontal é induzida pelo método da ligadura pode ser detectada em poucas semanas, com baixo custo e facilidade de realização com baixa possibilidade de injúria dos tecidos, justificando-se no presente estudo a opção por este método de indução da doença periodontal. Adicionalmente, roedores apresentam anatomia periodontal semelhante a humanos, facilitando a extrapolação dos resultados^{15,27}.

O método mais frequente de mensuração da altura óssea em estudos em animais são as medidas microscópicas, utilizadas há mais de 50 anos, porém este método apresenta algumas desvantagens como: padrão de reabsorção óssea não uniforme¹⁹, processamento histológico com maior custo, riscos de artefatos de processamento, além do longo tempo para desmineralização das peças anatômicas. No entanto, as secções histológicas podem ser utilizadas não só para a determinação da perda de osso alveolar, mas também para outros estudos, tais como avaliação de tecidos moles, perda de inserção, infiltrado inflamatório, além de possibilidade de análises imunohistoquímicas^{16,28}.

Assim, autores têm proposto que a análise morfométrica é mais fácil, rápida, e capaz de detectar a perda do osso alveolar periodontal vertical com menor custo¹⁶. Porém, há de se ressaltar que esta técnica somente propicia a mensuração da perda do osso alveolar. Nesse mesmo sentido, ganhou força a análise radiográfica, que permite a detecção *in vivo* de pequenas mudanças na densidade óssea. Porém, esta técnica também é passível a erros técnicos, tais como tempo de exposição, angulação, uso de filmes

convencionais/técnica digital e processamento dos filmes²⁸. Porém, corroborando os presentes resultados, Klausen et al.¹⁹ afirmaram que tanto o método morfométrico quanto o método radiográfico foram comparáveis na reprodutibilidade e habilidade em avaliar a perda do osso alveolar.

Assim, no presente estudo as três técnicas avaliadas (radiográficas, morfométricas e histométricas), se mostraram eficientes e comparáveis para avaliação de perda do osso alveolar induzida pela doença periodontal no modelo adotado, corroborando estudos prévios utilizando uma ou duas das referidas técnicas^{2,12,13,14,16,19,25,29,30}. Porém estudos comparando os três métodos simultaneamente não foram encontrados, além do mais ainda não foram pesquisados em animais submetidos a estresse. Há de se discutir de que no presente estudo, as comparações foram feitas utilizando-se as hemimandíbulas do lado direito para as análises radiográfica e histométrica, enquanto as do lado esquerdo foram utilizadas para análise morfométrica, devido a impossibilidade de uso da mesma peça para o desenvolvimento das análises morfométricas e histométricas. Porém, este procedimento concorda com os trabalhos de Takada, et al.⁹ e Nackaerts et al.²⁸ que afirmaram que os resultados não divergiram entre os lados direito e esquerdo em animais com DP induzida.

Estudos mostraram a influência do estresse crônico em modelo de doença periodontal induzida por ligadura e observaram que os níveis plasmáticos de corticosterona, a atividade locomotora, o peso da glândula adrenal e a perda óssea alveolar foram aumentados nos grupos com periodontite e estresse⁵. A indução de estresse por imobilização no presente estudo foi uma opção de forma a se criar uma morbidade que pudesse influenciar a perda do osso alveolar, de forma que pequenas alterações pudessem ser detectadas por um ou outro método de mensuração. Trata-se de um método simples que pode ser aplicado a um grande grupo de animais simultaneamente e é comprovadamente eficiente para o estudo das

respostas centrais e periféricas relacionadas ao estresse²¹. Assim, observou-se no presente estudo que independentemente da presença de estresse, pelos três métodos empregados os resultados foram semelhantes. Estes resultados corroboram os achados de Klausen et al.¹⁹ e Fernandes et al.¹⁶, onde não foram observadas diferenças estatísticas entre os métodos de avaliação.

CONCLUSÃO

Os três métodos apresentaram resultados semelhantes na análise de progressão da perda do osso alveolar em ratos com doença periodontal induzida por ligadura e submetidos ao protocolo de estresse crônico podendo ser empregados na avaliação da progressão da doença periodontal.

AGRADECIMENTOS

Fapemig - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Projeto Financiamento Edital Universal CNPq - 475468/2010-4

UFLA - Universidade Federal de Lavras

NIRO - Núcleo de Imagem Odontológica

ABSTRACT

Aim: Compare the radiographic, morphometric, and histometric methods to assess alveolar bone loss in rats with ligature-induced periodontal disease and submitted to chronic stress.

Methods: Male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were distributed in a completely randomized framework in a 2x2 factorial design (with and without periodontal disease (PD) with and without chronic stress (CE), using eight replicates in each group. CE was performed by immobilization for 2.5 hours daily for 30 days, while PD was induced by ligation with the protocol in the first left and right mandibular molar in the last 14 days. After this period, the rats were euthanized. **Results:** The radiographic and histometric analyses determined the periodontal bone support (PBS). Additionally, the histometric analysis calculated alveolar bone loss (ABL) and clinical attachment loss (CAL) in the distal face of the first molar. In morphometric analysis, bone loss was obtained by determining the linear distances from the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar crest (AC) in the center of the lingual and distal roots. The present study observed increased levels of corticosterone in animals subjected to immobilization ($p < 0.05$), and bone loss was greater ($p < 0.05$) in animals with ligatures, regardless of association with stress. Immobilization alone did not influence these parameters ($p > 0.05$). A significant correlation could

be identified among the three evaluation techniques ($p < 0.05$). **Conclusion:** The histometric, radiographic, and morphometric methods showed similar results in the analysis of alveolar bone loss in rats with PD submitted to CE.

Uniterms: Animal models. Stress. Periodontitis. Ligature. Clinical attachment loss.

REFERÊNCIAS

1. American Academy of Periodontology. Parameters of care. J Periodontol. 2000 May; 71 Suppl. 5
2. Fernandes LA, Martins TM, Almeida JM, Nagata MJ, Theodoro LH, Garcia VG, et al. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. J Appl Oral Sci. 2010 Dec;18(6):635-40.
3. Behl Y, Siqueira M, Ortiz J, Li J, Desta T, Faibish D, et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. J Immunol. 2008 Dec 15;181(12):8711-8.
4. Bensley L, VanEenwyk J, Ossiander EM. Associations of self-reported periodontal disease with metabolic syndrome and number of self-reported chronic conditions. Prev Chronic Dis. 2011 May;8(3):A50.
5. Rettori E, De Laurentiis A, Zorrilla Zubilete M, Rettori V, Elverdin JC. Anti-inflammatory effect of the endocannabinoid anandamide in experimental periodontitis and stress in the rat. Neuroimmunomodulation. 2012 Jul;9(5):293-303.
6. Sutanto W, De Kloet ER. The use of various animal models in the study of stress and stress-related phenomena. Lab Animal. 1994 Oct; 28(4): 293-306.
7. Horning GM, Cohen ME. Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. J Periodontol. 1995 Nov;66(11):990-8.
8. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. J Clin Periodontol. 1999 Jun;26(6):335-40.
9. 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 Feb;75(2):306-15.
10. Zhao YJ, Li Q, Cheng BX, Zhang M, Chen YJ. Psychological stress delays periodontitis healing in rats: the involvement of basic fibroblast growth factor. Mediators Inflamm. 2012;2012:732902.
11. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. J Biomed Biotechnol. 2011;2011:754857.
12. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, Browning E, Dawson D, Novak JM, et al. Omega-3 fatty

- acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):648-52.
13. Yu JJ, Ruddy MJ, Wong GC, Sfintescu C, Baker PJ, Smith JB, et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood.* 2007 May 1;109(9):3794-802.
 14. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar; 78(3):566-75.
 15. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991 Jan; 62(1):59-73.
 16. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res.* 2007 Jul-Sep; 21(3):216-21.
 17. Souza DM, Rocha RF. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. *Braz Oral Res.* 2009 Oct-Dec;23(4):460-6.
 18. Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2002 Sep;73(9):1030-6.
 19. Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. *Scand J Dent Res.* 1989 Dec; 97(6):494-9.
 20. Semenoff TA, 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 Jul-Aug;16(4):251-6.
 21. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci.* 2002 Apr;110(2):125-9.
 22. Breivik T, Opstad PK, Gjermo P, Thrane PS. Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *Eur J Oral Sci.* 2000; 108: 115-22.
 23. Souza 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 Dec;14(6):443-7.
 24. Claudino M, Ceolin DS, Alberti S, Cestari TM, Spadella CT, et al. Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats. *PLoS ONE.* 2(12): e1320. DOI:10.1371/journal.pone.0001320.
 25. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol.* 2004 Aug; 31(8):596-603.
 26. Kim SE, Lee ER, Lee Y, Jeong M, Park YW, Ahn JS, et al. A modified method for inducing periodontitis in dogs using a silk-wire twisted ligature. *J Vet Sci.* 2012 Jun;13(2):193-7.
 27. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Tedesco LA. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol.* 1999 Jul;70(7):711-23.
 28. Nackaerts O, Jacobs R, Quirynen M, Rober M, Sun Y, Teughels W. Replacement therapy for periodontitis: pilot radiographic evaluation in a dog model. *J Clin Periodontol.* 2008 Dec;35(12):1048-52.
 29. Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umamoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontal Res.* 2006 Dec;41(6):527-34.
 30. Tomofuji T, Yamamoto T, Tamaki N, Ekuni D, Azuma T, Sanbe T, et al. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *J Periodontol.* 2009 Aug;80(8):1324-9.