



Universidade de Cuiabá

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas
Área de Concentração em Odontologia**

CARLOS RODRIGO BARROS DE SIQUEIRA

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES EM
MANDÍBULA DE RATO**

Cuiabá, 2013

CARLOS RODRIGO BARROS DE SIQUEIRA

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES EM
MANDÍBULA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas, Área de Concentração Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Canavarros Palma
Co-Orientador: Prof. Dr. Alex Semenoff Segundo

Cuiabá, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA
Catálogo na Fonte

S618e Siqueira, Carlos Rodrigo Barros de.
Efeito do estresse crônico na osseointegração de implantes em mandíbula de rato / Carlos Rodrigo Barros de Siqueira -- Cuiabá: Universidade de Cuiabá - UNIC, 2013.
59 f. : il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas - Área de Concentração Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Canavarros Palma.

1. Odontologia. 2. Implante Dentário. 3. Doença Periodontal. 4. Dosagem de Cortisol. 5. Osseointegração. 6. Mandíbula - Rato. 7. Saúde Bucal. 8. Qualidade de Vida. 9. Estresse. I. Título. II. Siqueira, Carlos Rodrigo de. III. Universidade de Cuiabá - UNIC.

CDU: 616.314-089.843:159.944

Bibliotecárias
Patrícia Jaeger / CRB1-1736
Valéria Oliveira dos Anjos / CRB1-1713

CARLOS RODRIGO BARROS DE SIQUEIRA

**EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO NA OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES EM
MANDÍBULA DE RATO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Canavarros Palma.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Vinícius Canavarros Palma

Membro Titular: Prof. Dr. Carlos Heitor Moreira

Membro Titular: Prof. Dr. Artur Aburad de Carvalhosa

Cuiabá, ____ de _____ de 2013.

Conceito Final: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade;

À minha esposa Sinara e meu filho Davi, pela compreensão das ausências afetivas e familiares durante a realização desse trabalho;

Aos meus pais, Carlos e Elenir e irmãos, Renata e Rogério, pelo incentivo;

Ao Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas, Área de concentração – Odontologia, da Universidade de Cuiabá;

Ao Professor Dr. Carlo Ralph De Mussis, coordenador de Pós Graduação da UNIC;

Ao Professor Dr. Álvaro Henrique Borges, coordenador do Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vinícius Canavarros Palma pelos expressivos ensinamentos, disponibilidade e dedicação em ensinar na elaboração desse trabalho.

Ao professor Dr. Alex Semenoff Segundo pela sua honrosa e eficiente colaboração;

Ao professor Dr. Luiz Antônio Salata pela sua dedicação e direcionamento desta pesquisa;

Ao amigo Antônio Azoubel Antunes, Doutorando em CTBMF FORP-USP, pela disposição em ajudar no seguimento deste trabalho;

Ao amigo Sebastião Carlos Bianco, técnico de laboratório da FORP-USP, pelo empenho no processamento do material desta pesquisa;

À Adriana Almeida, responsável pelo laboratório de microscopia da FORP-USP, pela atenção dispensada;

Aos demais professores do Mestrado, aos colegas discentes, aos funcionários da Secretaria do Mestrado pela atenção e colaboração;

À NEODENT por fornecer os implantes utilizados nesta pesquisa;

O meu muito obrigado!

RESUMO



RESUMO

SIQUEIRA, C. R. B. **Efeito do estresse crônico na osseointegração de implantes em mandíbula de rato**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade de Cuiabá-UNIC, Cuiabá, 2013.

O estresse é um estado de tensão fisiológica ou psicológica causado por estímulos físico, mental ou emocional adversos, que tendem a perturbar o funcionamento natural do organismo. Estudos têm demonstrado que o estresse psicológico desempenha um papel significativo no resultado de muitas doenças podendo agravar a evolução da doença periodontal por exemplo. A titulação de cortisol na corrente sanguínea é utilizada como parâmetro para o nível de estresse. Este trabalho teve o intuito de investigar a possível influência do estresse no processo de osseointegração de implantes dentários através de análise histométrica e teve como referência para o estresse a titulação do cortisol. Para isso, foi instalado implantes em mandíbula de rato. Os animais foram divididos em 2 grupos, sendo um deles submetidos a ensaio de estresse por contensão física durante 12 horas diárias. A eutanásia ocorreu em 2 tempos experimentais, 18 e 33 dias. Como resultado foi observado a influência do estresse, diminuindo a quantidade de osso em contato com o implante, de forma significativa, no tempo experimental de 18 dias e sem significância estatística no tempo de 33 dias. O cortisol apresentou diferenças relevantes nos dois tempos experimentais. Sendo assim esta pesquisa sugere que o estresse pode influenciar na osseointegração na sua fase inicial.

Palavras-chave: Estresse. Implantes dentários. Ratos. Osseointegração.

GRANDE DE CUIA



ABSTRACT

ABSTRACT

SIQUEIRA, C. R. B. **Eruption of effect of chronic stress in osseointegration jaw implant in rat.** 2013. 59 f. Dissertation (Master's Program) – Post-Graduate Dental Science Integrated, University of Cuiabá-UNIC, Cuiaba, 2013.

Stress is a state of physiological or psychological stress stimuli caused by physical, mental or emotional effects, which tend to disturb the natural functioning of the body. Studies have shown that psychological stress plays a significant role in the result of many diseases and may negatively affect the progression of periodontal disease for example. Titration of cortisol in the bloodstream is used as a parameter to the stress level. This study aimed to investigate the possible influence of stress in the process of osseointegration of dental implants by histometric analysis and had reference to the titration of the cortisol stress. For that was installed implants in the mandible of rats. The animals were divided into 2 groups, one being tested in a physical restraint stress for 12 hours daily. Evaluations were made at two experimental periods, 18 and 33 days. As a result it was observed the influence of stress, decreasing the amount of bone contact with the implant significantly in 18-day experimental period and no statistical significance in time of 33 days. Cortisol showed significant differences in the two experimental times. Therefore this research suggests that stress may influence osseointegration in its initial phase.

Keywords: Stress. Dental implants. Rats. osseointegration.

GRANDE DE CUIA



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Refere-se a análise das mensurações histométricas utilizadas..... 35

Tabela 2 - Refere-se a dosagem de cortisol (μ) na corrente sanguínea aos 18 dias e aos 33 dias e peso final durante o experimento aos 18 e aos 33 dias. 37



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anexo 2 – Estudo piloto.....	55
Figura 2 – Anexo 3 – Implante utilizado no experimento.....	54
Figura 3 – Anexo 4 – Delineamento do trabalho	55
Figura 4 – Anexo 5 – Acesso cirúrgico	56
Figura 5 – Anexo 6 – Preparo do canal mandibular. Broca Lança	57
Figura 6 – Anexo 6 – Preparo do canal mandibular. Broca 2.0	57
Figuras 7 e 8 – Anexo 7 – Instalação do implante.....	58
Figura 9 – Anexo 8 - BIC	58
Figura 10 – Anexo 8 - BA	36
Figura 11 - (A) GC 18; (B) GE 18	36
Figura 12 - (A) GC 33; (B) GE 33	36



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
BA	Área óssea entre as espiras do implante
BIC	Superfície de contato entre osso e implante
CPO-D	Dentes Cariados, Perdidos e Obturados
GC	Grupo Controle
GC 18	Grupo Controle 18 dias
GC 33	Grupo Controle 33 dias
GE	Grupo Estresse
GE 18	Grupo Estresse 18 dias
GE 30	Grupo Estresse 30 dias
HPA	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
PO	pós-operatório
QVRSO	Qualidade de Vida Relacionada à Saúde Oral
SB Brasil	Projeto Brasil sorridente

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	28
4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	28
4.3 DELINEAMENTO DO TRABALHO	29
4.4 ANESTESIA DOS ANIMAIS.....	30
4.5 PROTOCOLO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL	30
4.6 AGENTE ESTRESSOR.....	31
4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA BIOQUÍMICA.....	31
4.8 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA	31
4.9 ANÁLISE HISTOMÉTRICA	32
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.11 CONFIABILIDADE DOS RESULTADOS.....	33
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÕES	44
ANEXOS	51



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Este trabalho trata da avaliação do efeito do estresse crônico na osseointegração de implantes dentais realizados em mandíbula de rato. O estresse é uma resposta orgânica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) a agentes físicos, químicos e estímulos emocionais. A influência desse eixo na progressão de doenças inflamatórias, como a periodontal, é bem sedimentada na literatura. (SEMENOFF SEGUNDO et al., 2010; BARNES; BOWLES; CARTER, 1973; SHANNON; KILGORE; O'LEARY, 1969; ROWLAND, 1999; PERUZZO et al., 2007).

A avaliação foi realizada através de exame bioquímico que quantifica o cortisol sérico, visto que este é importante na resistência ao estresse e à inflamação (GUYTON; HALL, 2006). Outra análise realizada foi a histometria da superfície de contato entre osso e implante. O confronto entre estes dados nortearam esta pesquisa.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Durante muito tempo os serviços públicos de saúde bucal oferecidos à população brasileira foram essencialmente curativos, de elevado custo, pouco abrangentes e de reduzido impacto epidemiológico. Em função disso surgiu uma demanda por níveis de atenção de maior complexidade. Com o projeto Brasil Sorridente (SB Brasil), implementado a partir de 2003, procurou-se ampliar os procedimentos odontológicos ofertados à população brasileira. (SILVA; MAGALHAES; FERREIRA, 2010).

Os dados obtidos nesse projeto mostram que a faixa etária da população entre 35 e 44 anos apresentava condições precárias de saúde bucal, com índice de Dentes Cariados, Perdidos e Obturados (CPO-D) de 20,1. Mais da metade desse índice representa dentes perdidos (P) igual a 13,2. Em indivíduos acima de 65 anos o quadro ainda é mais grave com P de 25,8, representando perda de quase todos os dentes.

Dados mais recentes, SB Brasil 2010, revelaram que o CPO-D médio na faixa etária entre 35 e 44 anos teve uma redução de 19%, caindo para 16,75%. O P, por sua vez, também foi reduzido a 7,3. Ainda assim, mais de 3 milhões de idosos com idade entre 65 e 74 anos necessitam de prótese total nas duas arcadas dentárias e outros 4 milhões precisam usar prótese parcial em pelo menos uma das arcadas (BRASIL, 2010). Mesmo em alguns países desenvolvidos da Europa Central e Oriental, a prevalência de cárie dentária e edentulismo ainda é elevada. (MARTHALER, 2004; PETERSEN et al., 2005).

Os dentes foram projetados para exercer a função de mastigação e favorecer a ação das enzimas digestivas (GUYTON; HALL, 2006). A falta deles, com consequente uso de prótese convencionais (removíveis ou retidas em dentes) promove alterações na fala, na mastigação e na estética. A perda de dentes, portanto, influencia negativamente na autoestima, no convívio social e na qualidade de vida do indivíduo (FERREIRA et al., 2006; FISKE et al., 1998; JONES et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que, para ter saúde bucal satisfatória, é necessário que pelo menos 20 dentes estejam exercendo corretamente sua função,

isto é, ocluindo adequadamente com seus antagonistas (SHEIHAM et al., 2001; SHIMAZAKI et al., 2001).

Pacientes desdentados totais apresentam impacto negativo sobre a qualidade e vida relacionado a saúde oral – QVRSO. (SZENTPETERY et al., 2005).

O tratamento com implantes dentários tem um efeito positivo sobre a QVRSO (EITNER et al, 2012). Pacientes que receberam próteses na mandíbula que eram suportadas por implantes apresentaram melhoria na saúde bucal. (MELAS; MARCENES; WRIGHT, 2001; AWAD et al., 2003; ALLEN et al., 2006; ATTARD et al., 2006).

Allen e McMillian (2003) avaliaram pacientes que, apesar de terem conhecimento da existência de tratamento com implantes dentais, foram tratados com próteses convencionais. A conclusão a que chegaram foi que esses pacientes estavam pouco satisfeitos com o tratamento realizado e a melhora em sua qualidade de vida foi pequena.

Em ensaio clínico prospectivo randomizado foi realizada comparação entre pacientes que receberam próteses implantossuportadas e próteses convencionais por um período de 10 anos. Percebeu-se em todo esse período que pessoas que foram tratadas com próteses implantossuportadas estavam mais satisfeitas com o tratamento. (RAGHOEBAR et al., 2003).

O sucesso da implantodontia é algo bem sedimentado na literatura (BRANEMARK, 1983; LINDQUIST; CARLSSON, 1985; ALBREKTSSON et al., 1986). A osseointegração é o processo onde ocorre a conexão direta, estrutural e funcional entre o osso do leito receptor e a superfície do implante (BRANEMARK, 1983). A compreensão de fatores que podem influenciar na eficácia de tal processo tem sido objeto de estudo de diversas pesquisas. (CORREA et al., 2009).

Os processos inflamatórios são ponto chave de inúmeras doenças, muitas das quais se desconheciam os mecanismos causadores. Em outras, consideradas como degenerativas ou próprias do envelhecimento, a inflamação passou a ser considerada o mecanismo causador. (GOYAL et al., 2011).

Vida sedentária, estresse no trabalho, má alimentação, uso do tabaco e álcool têm contribuído para o agravamento de doenças (GOYAL et al., 2011). É

comum pacientes tratados em clínicas odontológicas exibirem tal perfil. As pessoas que recebem implantes dentários estão incluídos neste contexto.

O estresse é um estado de tensão fisiológica ou psicológica causado por estímulos físicos, mentais ou emocionais, que tendem a perturbar o funcionamento normal do organismo (GOYAL et al., 2011). Condição socioeconômica e carga horária de trabalho podem causar distúrbios emocionais e resultar em estresse na vida moderna do homem (GOYAL et al., 2011). O estresse tem um efeito direto sobre o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). Este estímulo induz a secreção do hormônio corticotrofina, que, por sua vez, estimula a glândula pituitária a secretar o Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH). Esse hormônio entra no fluxo sanguíneo periférico e estimula o córtex adrenal a secretar cortisol e outros esteroides. O cortisol cai na corrente sanguínea e age inibindo a secreção de mais corticotrofina e ACTH, gerando assim um ciclo de *feedback* negativo. A hipótese é que o estresse prolonga a ativação do eixo (HPA) aumentando a produção do cortisol. (BREIVIK et al., 2000; MILLER; O'CALLAGHAN, 2002).

Pesquisas têm demonstrado que o estresse psicológico desempenha um papel significativo no resultado de muitas doenças, podendo agravar a evolução da doença periodontal, por exemplo (FREEMAN; GOSS, 1993). O estresse também piora o processo de cicatrização por acentuar a resposta inflamatória através do aumento de citocinas pró-inflamatórias, as quais retardam a síntese de colágeno e estimulam reabsorção do cálcio do osso e das células osteoclásticas. (BREIVIK et al., 1996, 2000; GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; PERUZZO et al., 2008).

Após induzir doença periodontal em ratos, através de ligadura no segundo molar superior dos animais, um dos grupos foi submetido a protocolo de estresse. Por análise imunohistoquímica comparou-se o grau de hipóxia nos tecidos dos diferentes grupos, através da presença do Fator de hipóxia-1 α . Observou-se maior presença deste fator no grupo de animais submetidos ao estresse. (HUANG et al., 2010).

Trabalhos em humanos têm encontrado correlação entre eventos negativos durante a vida e aumento do índice de doença periodontal, sugerindo que fatores psicológicos envolvidos no estresse podem aumentar a susceptibilidade à periodontite. O estresse pode afetar a doença por alterar a resposta celular e humoral

do indivíduo. No entanto, o mecanismo exato deste processo ainda precisa ser esclarecido. (FREEMAN; GOSS, 1993; MINNEMAN et al., 1995; HENDERSON, 2010; LOHINAI et al., 1998).

Goyal et al. (2011), fizeram uma correlação entre estresse psicossocial e condição periodontal através do nível de cortisol e concluíram que o estresse pode ser um fator contribuinte para a doença periodontal.

Outras pesquisas têm utilizado a titulação de cortisol, um indicador biológico de estresse, para morbidade e mortalidade em diversas doenças crônicas. (HUGO et al., 2006).

O cortisol, principal hormônio glicocorticoide secretado pelo córtex da Glândula Adrenal, tem sua síntese controlada pelo eixo Hipotálamo-Hipofisário, através do ACTH. Esse hormônio é responsável por 95% de toda atividade glicocorticoide do organismo. Tem como principal efeito o estímulo da gliconeogênese e redução da utilização de glicose pelas células com consequente elevação da concentração de glicose sanguínea. Também aumenta a disponibilidade de aminoácidos às células e causa efeito antiinflamatório por estabilizar as membranas dos lisossomos. Reduz liberação de enzimas inflamatórias por diminuir a permeabilidade vascular, o edema, a quimiotaxia dos leucócitos; pela supressão do sistema imune e pela redução da liberação de interleucina-1. (GUYTON; HALL, 2006).

O cortisol também é importante na resistência ao estresse, seja ele físico ou neurogênico. O estresse provoca aumento na secreção de ACTH pela hipófise anterior, seguido, minutos depois, por grande aumento na secreção adrenocortical de cortisol. Situações de estresse, como trauma, infecção, calor ou frio intensos, cirurgia e restrição dos movimentos de um animal aumentam a secreção de cortisol. (GUYTON; HALL, 2006).

Diversos trabalhos vêm correlacionando a progressão da doença periodontal e o estresse, muitos deles induzindo esta em ratos submetidos a protocolo de estresse (SEMENOFF et al., 2009; PORTO et al., 2012; SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010, 2012). A contenção por 12 horas é um modelo experimental bem documentado na literatura para indução ao estresse em animais experimentais. (GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; TAKADA et al., 2004

NAKAJIMA et al., 2006; PERUZZO et al., 2008; SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010, 2012; PORTO et al., 2012). Estes trabalhos foram importantes para fornecer informações sobre a patogênese e progressão da doença periodontal. Este modelo de indução ao estresse certamente provoca mudanças sistêmicas no organismo, principalmente no eixo HPA (GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; TAKADA et al., 2004; NAKAJIMA et al., 2006; PERUZZO et al., 2008). Em estudo utilizando este modelo experimental os autores verificaram a eficácia do método ao avaliar a destruição óssea em ratos com ligadura para indução à doença periodontal e submetidos ao estresse (SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010), o que está de acordo com outros estudos. (GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; TAKADA et al., 2004; NAKAJIMA et al., 2006; PERUZZO et al., 2008).

Diversos estudos analisaram a influência do estresse na doença periodontal (PERUZZO et al., 2008; SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010, 2012) e muitos outros observaram a influência de várias doenças no processo de osseointegração de implantes dentais (ESPOSITO et al., 1998; CORREA et al., 2009). Todavia, até a presente data não existe trabalho que analise o efeito do estresse crônico sobre o processo de formação óssea periimplantar.

ESTADO DE CUIABÁ



3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre o estresse crônico e a osseointegração de implantes em mandíbula de ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Criar uma metodologia de fixação de implantes em mandíbula de ratos;
- Mensurar a área de contato entre osso-implante em ratos submetidos a ensaio de estresse cônico.



4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em um ensaio clínico laboratorial e controlado em ratos. O experimento teve a aprovação do comitê de ética em pesquisa animal com número de protocolo 77/05.

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para realização deste trabalho foram selecionados 36 ratos machos da espécie Wistar com peso aproximado de 400g. Os animais tiveram origem do Biotério da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá-UNIC, Mato Grosso - Brasil. Antes dos experimentos todos os animais foram submetidos a um período de adaptação e ficaram acondicionados em caixas-moradias, confeccionadas de material plástico, medindo 65 cm x 25cm x 15 cm. Para maior conforto dos animais foi disposto papel picado e esterilizado no assoalho das caixas moradias.

A alimentação foi com ração padronizada (antes do início do ensaio) e água, ambos *ad libitum*. Durante todo o período do estudo, foram submetidos a um ciclo claro escuro de doze horas (automatizado) e temperatura e umidade controlada a aproximadamente 24°C e 60% respectivamente.

Os animais ficaram em grupos de até 5 ratos e manipulados por pessoal treinado, diminuindo o risco de qualquer tipo de sofrimento ao animal ou viés durante o experimento. O biotério encontra-se dentro das normas da Agência de Vigilância Sanitária do Estado de Mato Grosso.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram submetidos a procedimento cirúrgico com acesso via extraoral em face lateral da mandíbula. O forame mental foi visualizado e o nervo

mandibular foi removido do canal mandibular através de preparo da cavidade com as brocas lança e 2.0 do kit de implante NEODENT®.

É importante esclarecer que foi realizado estudo piloto com fixação de implantes ortodônticos disponíveis no mercado (Figura 1). Este treinamento piloto orientou no aperfeiçoamento da técnica e definiu as dimensões dos implantes que foram solicitados a empresa fornecedora, produzidos e utilizados neste modelo experimental. O implante fixado neste estudo tem 4mm de comprimento e 2,2mm de diâmetro (Figura 2). Estes implantes foram fabricados e cedidos pela NEODENT®. Dosagem bioquímica através do cortisol foi realizada através de exame laboratorial automatizado.

Todos os animais foram pesados ao final do experimento antes da eutanásia.

4.3 DELINEAMENTO DO TRABALHO

Inicialmente sorteou-se 18 animais, os quais foram considerados Grupo Controle (GC). Este grupo serviu para padrão de referência em relação a dosagem de cortisol e peso. Os animais deste grupo receberam implantes e tiveram o acesso a água e a ração interrompidos em quanto o grupo teste passava pelo ensaio de estresse. Dos 18 animais, 9 foram eutanasiados com 18 dias de pós-operatório (PO), grupo controle 18 dias (GC 18) e os outros 9 com 33 dias de PO, grupo controle 33 dias (GC 33). Outros 18 animais integraram o Grupo Estresse (GE). Estes receberam implante e após período de recuperação pós-operatória de 3 dias foram submetidos a ensaio de estresse de 12 horas por dia. Da mesma forma que no GC, 9 animais foram eutanasiados com 18 dias de PO, grupo estresse 18 dias (GE 18), totalizando 15 dias de ensaio de estresse e os outro 9 animais eutanasiados com 33 dias de PO, grupo estresse 33 dias (GE 33), totalizando 30 dias de ensaio de estresse.

4.4 ANESTESIA DOS ANIMAIS

Antes do protocolo cirúrgico experimental, os animais foram submetidos a anestesia geral através de injeção intramuscular de um combinado de 0,1ml de Cloridrato de Ketamina (50mg/ml; Dopalen[®]; Agribrands Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) e 0,05ml de Hidrocloridrato de Xilazina (2g/100ml; Rompun[®]; Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) por 100g de peso animal.

4.5 PROTOCOLO CIRÚRGICO EXPERIMENTAL

O protocolo cirúrgico seguiu os passos convencionais preconizados para instalação de implante dentário com o mínimo de trauma possível. Após tricotomia, antissepsia da pele com clorexidina a 2%, foi realizado com uma lâmina de bisturi n^o 15 (Norton Biotec[®]) incisão de 3 cm na face lateral da pele do corpo mandibular seguida de dissecação por planos até localização do forame mentual e feixe vasculonervoso (Figura 4). Posteriormente, realizou-se esvaziamento do forame e preparo do alvéolo com brocas lança seguida da broca 2.0mm, ambas do kit cirúrgico NEODENT[®], com 5mm de comprimento, sob irrigação intensa de solução salina estéril a 0,9% durante todo preparo (Figuras 5 e 6). Para estas perfurações utilizou-se brocas adaptadas a contra ângulo redutor de 20:1, marca Kavo[®], previamente conectado a um motor elétrico, marca NSK[®], a 1.200 rpm. A instalação do implante foi realizada manualmente através da chave digital 1.2mm (Figura 7). Os implantes ficaram completamente inseridos no tecido ósseo (Figura 8). Logo após cada cirurgia realizada, foi administrado dose única de Penicilina G Benzatina Intra-Muscular (Pentabiótico Veterinário, Pequeno Porte, Fort Dodge[®], Campinas, SP, Brasil) 20.000 U/Kg intra muscular (IM) preparada e adequada ao peso de cada animal. Os ratos foram acompanhados diariamente no período pós-operatório.

Analgésico a base de paracetamol (Tylenol[®], Janssen-Cilag, São José dos Campos, Brasil), na dose de 30mg/Kg foi administrado, após adequar a dose ao peso de cada animal, e diluído na alimentação por período de dois dias pós cirúrgico.

4.6 AGENTE ESTRESSOR

Imobilização: Os animais foram colocados (delicadamente) em tubos de PVC compatível com o tamanho do animal e posteriormente selados com uma tampa perfurada de forma a possibilitar a respiração do animal. Este procedimento teve duração de 12 horas.

4.7 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E COLETA BIOQUÍMICA

Antes da eutanásia foi coletado o peso final de cada animal. Em seguida, utilizando seringa de 10ml com agulha de 25x7 coletou-se 7ml de sangue através de punção cardíaca, sem anticoagulante, para realização da dosagem do cortisol. Todos os animais foram eutanasiados em horário padrão, às 08 horas da manhã. A amostra de sangue coletada foi acondicionada em caixas de isopor com gelo biológico até a chegada ao laboratório de análises clínicas, onde foi processada. Para a obtenção da dosagem de cortisol foi utilizado método de eletroquimioluminescência, através do equipamento COBAS E – 411 da marca ROCHE® obtendo-se assim a titulação do cortisol de cada animal.

As mandíbulas foram armazenadas em recipiente com formol a 10%.

4.8 PREPARAÇÃO HISTOLÓGICA

Cada uma das peças obtidas foi fixada em solução de formalina a 10% com pH 7 por 10 dias, a qual foi trocada a cada 2 dias. Decorrido este prazo as peças foram transferidas para solução de álcool. As amostras obtidas foram acondicionadas em recipientes próprios, desidratadas em soluções crescentes de álcool. Elas permaneceram por 48 horas em cada uma das concentrações (70%, 80%, 96% e 100%). A cada troca as amostras foram submetidas à agitação durante 4 horas. As amostras desidratadas foram colocadas em recipientes de polietileno contendo resina pura (LR White Hard Grade, London, UK) e mantidas sob agitação

por 60 minutos. Posteriormente, os espécimes foram armazenados e mantidos por no mínimo 12 horas em refrigerador a 4°C. Decorrido este prazo, as peças foram mantidas no vácuo por 1 hora, agitadas por igual tempo e novamente armazenadas em refrigerador a 4°C por 24 horas. Esta rotina se repetiu por 15 dias, trocando-se a resina a cada 48 horas. No 15º dia, após a troca da resina, as peças foram incluídas em moldes de teflon preparados para este fim, devidamente identificadas e levadas ao forno a 60°C por 12 horas para a polimerização da resina. As amostras processadas desta forma adquiriram uma perfeita infiltração da resina e os blocos tornam-se duros, transparentes e puderam ser cortados facilmente. Os blocos de resina polimerizada contendo as amostras foram cortados ao longo eixo do implante, através do sistema Exakt® utilizando serra diamantada e irrigação contínua com água. As superfícies contendo o implante foram desgastadas no sistema Exakt® utilizando lixa com grana 320, 800, 2500 e 4000 até a superfície da peça ficar lisa. Os blocos lixados e polidos foram colados a uma lâmina acrílica por meio do sistema Exakt®. A superfície exposta da peça colada à lâmina foi novamente lixada e polida até a obtenção de espessura aproximada de 70 µm.

Em seguida a lâmina foi submetida à coloração com Azul de Toluidina a 1%.

4.9 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Realizada através do microscópio LEICA DMLB MICROSCOPE (Leica Microsystem Wetzlar GmbH Germany) e programa analisador LAS-4.1.0 VERSION-Image processing and analysis system.

- Superfície de contato entre Osso e Implante (BIC)

Esta histometria avaliou superfície de contato entre osso e implante. Foram consideradas apenas as 4 primeiras espiras do implante, mensurando esta e subtraindo áreas de não contato entre osso e implante desta mesma região (Figura 9).

- Área óssea entre as espiras do implante (BA)

Esta histometria avaliou a área de tecido ósseo localizada entre os passos de rosca dos implantes, ou seja, refere-se aquela situada no V formado entre dois passos de roscas adjacentes, independentes do contato com a superfície do implante, das quatro primeiras espiras (Figura 10).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente os dados foram testados a normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov que apresentam uma distribuição normal de curva Gaussiana. Baseado neste raciocínio, a escolha do teste paramétrico foi o teste *T* de Student para amostras não pareadas.

4.11 CONFIABILIDADE DOS RESULTADOS

Para melhor confiabilidade dos dados, a leitura das lâminas foi realizada por examinador que desconhece os grupos envolvidos no estudo. Este examinador passou por treinamento para compreensão das estruturas histológicas envolvidas.



5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Durante o período de processamento histológico foram perdidas 8 espécimes, sendo 2 de cada grupo (GC 18, GC 33, GE 18 E GE 33).

Os resultados do trabalho em relação ao BIC e a BA – tabela 1 - aos 18 dias de estresse demonstram piora ($p < 0,05$) em ambos os indicadores avaliados (Figura 11). Aos 33 dias o BIC e BA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os grupos (Figura 12).

Tabela 1 - Refere-se a análise das mensurações histométricas utilizadas

	Grupos	N	Média	Desvio padrão
BIC 18	Controle	7	*49,88	20,24
	Estresse	7	*29,00	16,59
BIC 33	Controle	7	59,06	26,83
	Estresse	7	49,52	17,38
BA 18	Controle	7	*50,13	21,25
	Estresse	7	*23,82	7,77
BA 33	Cotrole	7	41,96	17,44
	Estresse	7	43,91	14,75

* Diferença estatística entre os grupos $p < 0,05$. Os dados estão expressos em porcentagem; BIC – contato entre osso e implante; BA – área óssea entre as espiras do implante.

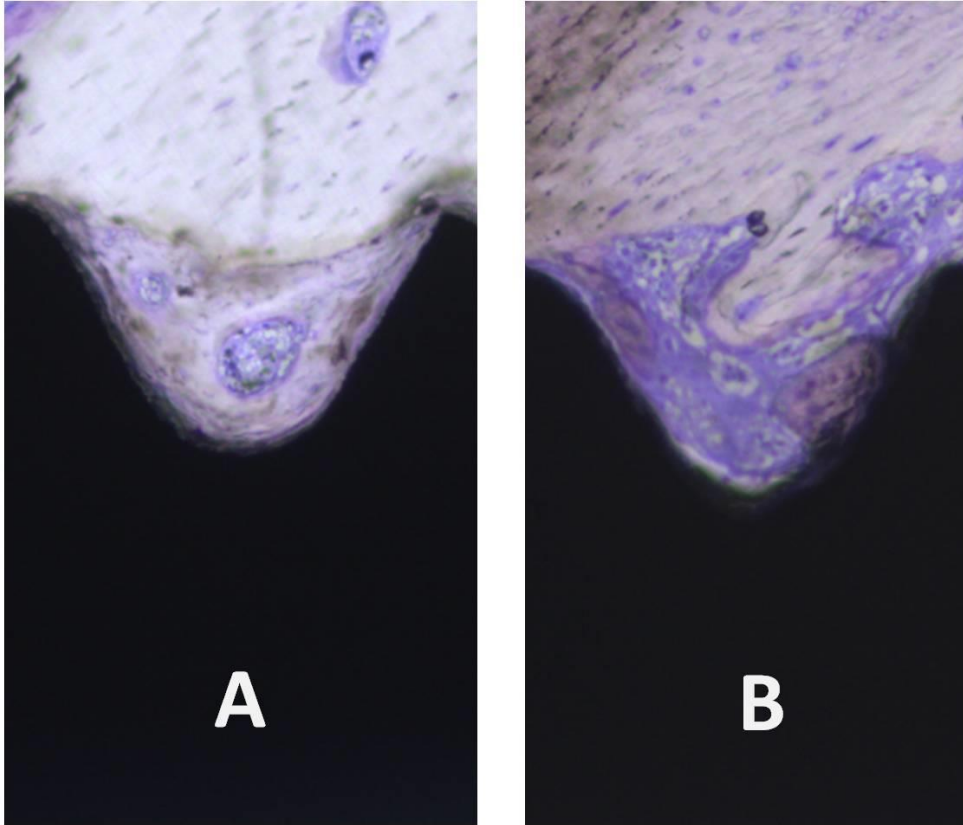


Figura 11 – (A) GC 18; (B) GE 18

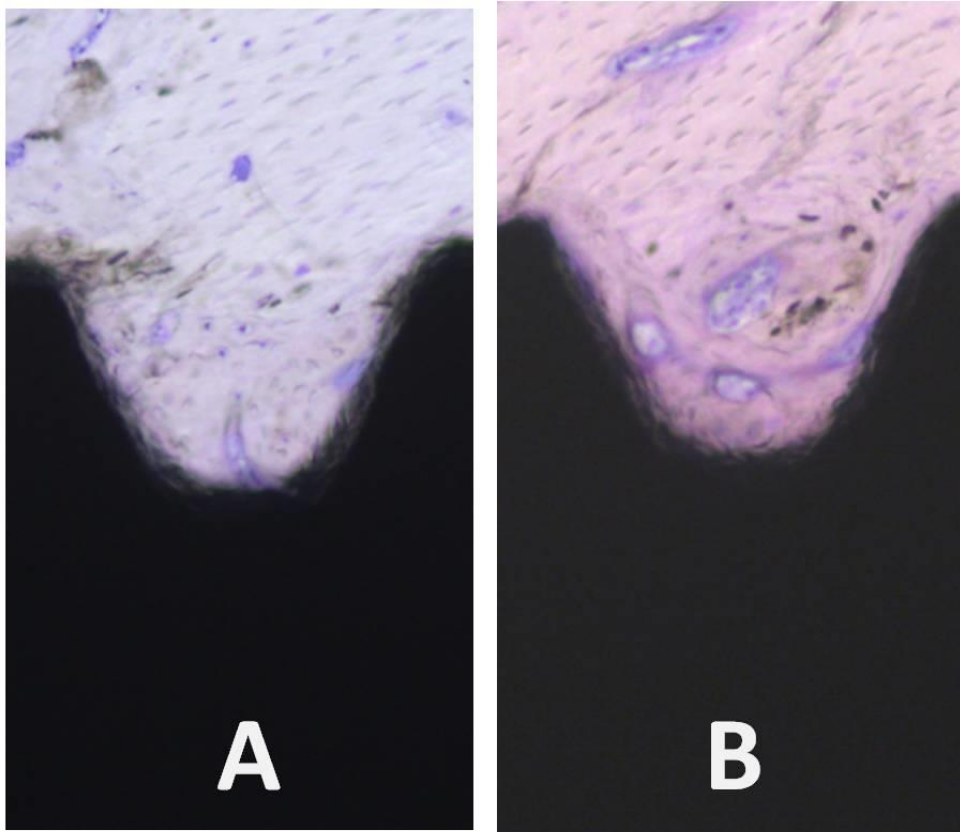


Figura 12 - (A) GC 33; (B) GE 33

Os resultados para a dosagem de cortisona (Tabela 2) para o período experimental de 18 dias e de 33 dias, no GE foram superiores ao GC com diferença estatística ($p < 0,05$). Em relação a diferença de peso (Tabela 2) do animal o GE comparado ao GC aos 15 dias, não demonstraram diferenças estatísticas ($p > 0,05$). Entretanto aos 30 dias houve maior perda de massa corporal no GE com diferença estatística ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Refere-se a dosagem de cortisol (μ) na corrente sanguínea aos 18 dias e aos 33 dias e peso final durante o experimento aos 18 e aos 33 dias.

	Tempos Experimentais	N	Média	Desvio Padrão
Dosagem de Cortisol (μ)	GE 18 Dias	7	3,86*	0,82
	GC 18 Dias	7	3,58*	0,76
	GE 33 Dias	7	5,17**	1,58
	GC 33 Dias	7	3,31**	1,17
Diferença de peso ao final do ensaio	GE 18 Dias	7	21,22	6,30
	GC 18 Dias	7	22,66	4,97
	GE 33 Dias	7	56,22**	7,44
	GC 33 Dias	7	46,33**	8,13

* $P < 0,05$ diferença estatísticas nos grupos de Cortisol e do peso no tempo experimental de 18 dias.

** $P < 0,05$ diferença estatísticas nos grupos de Cortisol e do peso no tempo experimental de 33 dias.

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Esperava-se que o estresse fosse capaz de atrasar o reparo aos 18 dias e aos 33 dias. Entretanto os resultados apresentam piora na osseointegração nos animais que foram submetidos ao estresse aos 18 dias e formação da osseointegração indiferente nas comparações no tempo experimental de 33 dias.

Ao observar a literatura sobre a temática é compreendido que os ratos têm seu processo de osseointegração ainda imaturo aos 18 dias (FUJII; KUSAKARI; MAEDA, 1998; SHIRAKURA et al., 2003), e já com certa maturação óssea aos 28 dias (FUJI; KUSAKARI; MAEDA, 1998; SHIRAKURA et al., 2003), resultados semelhantes são encontrados em cães. (BERGLUND et al., 2003).

Baseado nestes períodos experimentais o estudo buscou a dinâmica de entender o efeito do estresse aos 18 dias em um osso imaturo e aos 33 dias em um osso com maturação adiantada. Ao buscar a literatura percebe-se que o efeito do estresse crônico parece atuar no periodonto, tanto aos 18 dias (SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010; TAKADA et al., 2004) como aos 33 dias. (PERUZO et al., 2008; TAKADA et al., 2004; BERGLUND et al., 2003).

Aos 15 dias a osseointegração de implantes nos maxilares de ratos ainda está em andamento (FUJII; KUSAKARI; MAEDA, 1998). Apesar disso, ainda existe áreas com processo inflamatório celular bem reduzido, além de formações ósseas observadas no grupo controle. No grupo teste submetido ao estresse se percebe atraso na reparação, o que determinou menor área de contato de superfície entre implante-osso, e propriamente a área de osso formada entre as espiras do implante. Em condições normais de formação óssea, aos 28 dias a osseointegração encontra-se madura (FUJII; KUSAKARI; MAEDA, 1998, BERGLUND et al., 2002, SHIRAKURA et al., 2002) após a colocação de implantes. Apesar da descrição das observações histo-patológicas esta não foi objeto do estudo que serão abordados em evidências posteriores.

Já é conhecido que o estresse pode suprimir ou estimular a defesa imunológica, dependendo do agente estressor (KEMENY; GRÜENEWALD, 1999). Também é sabido que o estresse ativa o eixo HPA que tem como resultado a liberação de hormônios neuroendócrinos que resultam na secreção de cortisol pelo

córtex adrenal (DANTZER; KELLEY, 1989), determinando muitas vezes a susceptibilidade do indivíduo a doenças (HERMAN, 2010). No periodonto há diversas evidências que buscam a modulação química ou física com objetivo de obter respostas melhores ou piores frente ao estímulo imuno-inflamatório da indução da periodontite. (SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2012).

A velocidade de reparação tecidual é influenciada por determinantes como o estresse crônico e o estresse agudo (HERMAN, 2010). Observado o estresse crônico de alta intensidade, como o utilizado neste estudo (SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2012), é notada sua influência na piora da cicatrização de tecidos ainda imaturos, como no período experimental deste trabalho de 18 dias. Provavelmente o estresse foi capaz de induzir uma piora na formação da matriz óssea, na formação de osteoblastos, e de fibras colágenas (SEMENOFF et al., 2009; KIECOLT-GLASSER et al., 1995). Um dos fatores determinantes na velocidade de formação óssea é ligado as interleucinas pró-inflamatórias (MARUCHA et al., 1998), as quais tem uma ação mais intensa nas fases iniciais do processo de reparo, inclusive na ativação da base formada por fibroblastos, que por sua vez, sintetizam colágeno, peça chave na formação e organização do tecido conjuntivo dos maxilares. (MARUCHA; KIECOLT-GLASER; FAVAGEHI, 1998).

Os resultados aos 33 dias sugerem que o estresse crônico não influenciou a osseointegração comparado ao grupo controle. Como a literatura demonstra parece que após prazo de reparação de 28 dias as interleucinas pró-inflamatórias como a IL1B e IL6 não influenciam no estágio inflamatório do reparo (BREIVIK et al., 1996; BREIVIK et al., 2000; GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; PERUZZO et al., 2008). Outra questão que pode ser abordada é que os animais aos 33 dias de estresse podem ter apresentado adaptação ao modelo. (SELYE, 1955; SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2007).

Estudos utilizando contenção física por 12 horas como modelo experimental para indução do estresse não são recentes (CARRANZA; SIMES; CABRINE, 1969; CARRANZA et al., 1971). Estes trabalhos foram importantes para fornecer informações sobre a patogênese e progressão da doença periodontal. Infelizmente apesar de ampla revisão da literatura nos principais bancos de dados foi percebido a ausência de parâmetros comparativos entre osseointegração e estresse crônico. Naturalmente buscou-se um modelo estabelecido na literatura que

é o estresse crônico por contenção física por 12h (PERUZZO et al., 2008; SEMENOFF-SEGUNDO et al., 2010, 2012; PORTO et al., 2012).

Atualmente é compreendido que para obter sucesso na implantodontia é necessário alguns critérios como a técnica cirúrgica atraumática, estabilidade primária, seleção do implante (BERGLUND et al., 2003), qualidade e quantidade de osso (ALBREKTSSON et al., 1986), manutenções periódicas preventivas e conhecimento das alterações fisiológicas e/ou patológicas de doenças preexistentes (FRISCH; ZIEBOLZ; RINKE, 2012). Esta última pode ter o envolvimento do estresse. Como já apresentado nos resultados deste trabalho o estresse crônico poderia interferir no processo de reparo inicial (MARUCHA; KIECOLT-GLASER; FAVAGEHI, 1998); logo com o desenvolvimento de técnicas cada vez mais imediatas o paciente que está sob estresse crônico poderia ter um retardo no reparo em uma fase inicial, contribuindo para o sucesso ou não.

O nível de cortisol como parâmetro de alteração fisiológica associado a presença de estresse é amplamente utilizado na literatura (BUYNITSKY; MOSTOFKY, 2009; RIVERA et al., 2012), e neste trabalho comprova, através dos resultados da dosagem que apresentam no modelo experimental de estresse maior quantidade na corrente sanguínea.

Alguns itens metodológicos são relevantes e merecem destaques. Na avaliação histométrica (BIC e BA) adotada é bem conhecida e amplamente utilizada por vários grupos de pesquisa (CORREA et al., 2009). A seleção dos implantes utilizados ocorreu a partir de vários estudos antropométricos dos animais. A partir deste conhecimento anatômico buscou-se o estabelecimento da técnica cirúrgica para avaliar a sobrevivência do animal e possíveis outras mudanças necessárias. Ficou definido, desta forma, uma abordagem diferente apresentada na literatura por via extraoral, esvaziamento do canal mandibular e colocação dos implantes na luz do canal. Técnica esta bem diferente de outras formas utilizadas na cavidade bucal em ratos (FUJII; KUSAKARI; MAEDA, 1998; SHIRAKURA et al., 2003). A dimensão dos implantes que haviam na literatura eram de 1.15 de diâmetro por 3mm de comprimento (FUJII; KUSAKARI; MAEDA, 1998; SHIRAKURA et al., 2003). Ao contato com o fabricante percebeu que implantes de diâmetros dos citados não poderiam ter tratamento de superfície, logo, a mesma produziu implantes de 2,2mm de diâmetro por 4mm de comprimento. Isto produziu no terço final do ápice dos

implantes contato com os dentes, o que determinou a formação de tecido mole, mas que não foi objeto de análise, já que foi determinada uma área padronizada para todos os implantes no terço médio e cervical padronizado no número de 4 espiras.

Diante do exposto fica claro que esta metodologia se trata de estudos iniciais e deve ser interpretados com cautela. Entretanto, a partir destes achados percebe-se que esta metodologia de colocação de implantes nesta região é viável e associado aos estudos do estresse poderá clarificar as informações colhidas através de pesquisas subsequentes.

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- O estresse pode interferir na fase inicial da osseointegração.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALBREKTSSON, T. et al. The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria for success. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 1, n. 1, p. 11-25, 1986.
- ALLEN, P. F. et al. A randomized controlled trial of implant-retained mandibular overdentures. **J Dent Res.**, v. 85, n. 6, p. 547-51, 2006.
- ALLEN, P. F.; MCMILLIAN, A. S. A longitudinal study of quality of life outcomes in older adults requesting implant prostheses and complete removable dentures. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, n. 2, p. 173-9, 2003.
- ATTARD, N. J. et al. A prospective study on immediate loading of implants with mandibular overdentures: patient-mediated and economic outcomes. **Int J Prosthodont.**, v. 19, n. 1, p. 67-73, 2006.
- AWAD, M. A. et al. Oral health status and treatment satisfaction with mandibular implant overdentures and conventional dentures. A randomized clinical trial in a senior population. **Int J Prosthodont.**, v. 16, n. 4, p. 390-6, 2003.
- BARNES, G. P.; BOWLES, W. F. III.; CARTER, H. G. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: a survey of 218 cases. **J Periodontol.**, v. 44, n. 1, p. 35-42, 1973.
- BERGLUNDH, T. et al. De novo alveolar bone formation adjacent to endosseous implants. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, n. 3, p. 251-62, 2003.
- BRANEMARK, P. I. Osseo integration and its experimental background. **J Prosthet Dent.**, v. 50, n. 3, p. 399-410, 1983.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Brasil sorridente: a saúde bucal levada a sério.** Brasília, DF: SUS, 2010. Disponível em: <http://dab.saude.gov.br/CNSB/sbbrasil/arquivos/apresentacao_abbrasil_2010.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais.** Brasília, DF, 2005. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/editora/producao/livros/pdf/05_0053_M.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2013.
- BREIVIK, T. et al. Differential susceptibility to periodontitis in genetically selected Wistar rat lines that differ in their behavioral and endocrinological response to stressors. **Behav Genet.**, v. 30, n. 2, p. 123-30, 2000.
- BREIVIK, T. et al. Effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. **Eur J Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 115-22, 2000.
- BREIVIK, T. et al. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. **Eur J Oral Sci.**, v. 104, n. 4, p. 327-34, 1996.
- BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research:

recent developments. **Neurosci Biobehav Rev.**, v. 33, n. 7, p. 1089-98, 2009.

CARRANZA JR., F. A. et al. Histometric evaluation of periodontal bone loss in rats. I. The effect of marginal irritation, systemic irradiation and trauma from occlusion. **J Periodontal Res.**, v. 6, n. 1, p. 65-72, 1971.

CARRANZA JR., F. A.; SIMES, R. J.; CABRINE, R. L. Effect of combined etiologic factors in experimental periodontal lesions. **J Periodontal Res.**, n. 4, p. 33-4, 1969. Supplement.

CORREA, M. G. et al. Histometric evaluation of bone around titanium implants with different surface treatments in rats exposed to cigarette smoke inhalation. **Clin Oral Impl Res.**, v. 20, n. 6, p. 588-93, 2009.

DANTZER, R.; KELLEY, K. W. Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. **Life Sci.**, v. 44, n. 26, p. 1995-2008, 1989.

EITNER, S. et al. Oral health-related quality of life and implant therapy: an evaluation of preoperative, intermediate, and post-treatment assessments of patients and physicians. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 40, n. 1, p. 20-3, 2012.

ESPOSITO, M. et al. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants (II). Etiopathogenesis. **Eur J Oral Sci.**, v. 106, n. 3, p. 721-64, 1998.

FERREIRA, A. A. A. et al. A dor e a perda dentária: representações sociais do cuidado à saúde bucal. **Ciêns Saúde Coletiva**, v. 11, n. 1, p. 211-8, 2006.

FISKE, J. et al. The emotional effects of tooth loss in edentulous people. **Br Dent J.**, v. 184, n. 2, p. 90-3, 1998.

FREEMAN, R.; GOSS, S. Stress measures as predictors of periodontal disease: a preliminary communication. **Community Dent Oral Epidemiol.**, v. 21, n. 3, p. 176-7, 1993.

FRISCH, E.; ZIEBOLZ, D.; RINKE, S. Long-term results of implant-supported overdenture retained by double crowns: a practice-based retrospective study after minimally 10 years follow-up. **Clin oral impl Res.**, 2012, p. 1-7.

FUJII, N.; KUSAKARI, H.; MAEDA, T. A histological study on tissue responses to titanium implantation in rat maxilla: the process of epithelial regeneration and bone reaction. **J Periodontol.**, v. 69, n. 4, p. 485-95, 1998.

GASPERSIC, R.; STIBLAR-MARTINCIC, D.; SKALERIC, U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rat. **Eur J Oral Sci.**, v. 110, n. 2, p. 125-9, 2002.

GOYAL, S. et al. Estimation of relationship between psychosocial stress and periodontal status using serum cortisol level: a clinico-biochemical study. **Indian J Dent Res.**, v. 22, n. 1, p. 6-9, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro,

Elsevier, 2006.

HENDERSON, B. Integrating the cell stress response: A new view of molecular chaperones as immunological and physiological homeostatic regulators. **Cell Biochem Funct.**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2010.

HERMAN, J. P. Regulation of the HPA axis by acute and chronic stress. In: KOOB, G. F.; LE MOAL, M.; THOMPSON, R. F. (ed.) **Encyclopedia of behavioral neuroscience**. 2010. p. 149-53.

HUANG, S. et al. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. **J Periodontol.**, v. 82, n. 6, p. 934-41, 2011.

HUGO, F. N. 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.**, v. 77, n. 6, p. 1008-14, 2006.

JONES, J. A. et al. Tooth loss and dentures: patient's perspectives. **Int Dent J.**, v. 53, n. 5, p. 327-34, 2003.

KEMENY, M. E.; GRUENEWALD, T. L. Psychoneuroimmunology update. **Semin Gastrointest Dis.**, v. 10, n. 1, p. 20-9, 1999.

KIECOLT-GLASSER, J. K. et al. Slowing of wound healing by psychological stress. **Lancet.**, v. 346, n. 8984, p. 1194-6, 1995.

LINDQUIST, L. W.; CARLSSON, G. E. Long terms effects on chewing with mandibular fixed prostheses on osseointegrated implants. **Acta Odontol Scand.**, v. 43, n. 1, p. 39-45, 1985.

LOHINAI, Z. et al. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **Br J Pharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 353-60, 1998.

MARTHALER, T. M. Changes in dental caries 1953–2003. **Caries Res.**, v. 38, n. 3, p. 173-81, 2004.

MARUCHA, P. T.; KIECOLT-GLASER, J. K.; FAVAGEHI, M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. **Psychosom Med.**, v. 60, n. 3, p. 362-5, 1998.

MELAS, F.; MARCENES, W.; WRIGHT, P. S. Oral health impact on daily performance in patients with implant-stabilized overdentures and patients with conventional complete dentures. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 16, n. 5, p. 700-12, 2001.

MILLER, D. B.; O'CALLAGHAN, J. P. Neuroendocrine aspects of the response to stress. **Metabolism.**, v. 51, n. 6, p. 5-10, 2002. Supplement.

MINNEMAN, M. A. et al. Relationships of personality traits and stress to gin-gingival status or soft-tissue oral pathology: an exploratory study. **J Public Health Dent.**, v. 55, p. 22-7, 1995.

NAKAJIMA, K. et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. **J Periodontol Res.**, v. 41, n. 6, p. 527-34, 2006.

PERUZZO, D. C. et al. A systematic review of stress and psychological factors as possible risk factors for periodontal disease. **J Periodontol.**, v. 78, n. 8, p. 1491-504, 2007.

PERUZZO, D. C. et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. **J Periodontol.**, v. 79, n. 4, p. 697-704, 2008.

PETERSEN, P. E. et al. The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bull World Health Organ.**, v. 83, n. 9, p. 661-9, 2005.

PORTO, A. N. et al. Effects of forced alcohol intake associated with chronic stress on the severity of periodontitis: an animal model study. **Int J Dent.**, v. 2012, 2012.

RAGHOEBAR, G. M. et al. A randomized prospective clinical trial on the effectiveness of three treatment modalities for patients with lower denture problems. A 10 year follow-up study on patient satisfaction. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 32, n. 5, p. 498-503, 2003.

RIVERA, C. et al. Stress increases periodontal inflammation. **Exp Ther Med.**, v. 4, n. 5, p. 883-8, 2012.

ROWLAND, R. W. Necrotizing ulcerative gingivitis. **Ann Periodontol.**, v. 4, n. 1, p. 65-73, 1999.

SELYE, H. Stress and disease. **Science**, v. 122, n. 3171, p. 625-31, 1955.

SEMENOFF SEGUNDO, A. et al. Methodological model of chronic stress associated with ligature-induced periodontitis in rats: a radiographic study. **Braz Oral Res.**, v. 24, n. 4, p. 455-9, 2010.

SEMENOFF, A. S. et al. Effect of chronic stress on the repair of cutaneous wounds in rats. **Rev Odonto Ciênc.**, v. 24, n. 2, p. 140-4, 2009.

SEMENOFF-SEGUNDO, A. et al. Effects of two chronic stress models on ligature-induced periodontitis in Wistar rats. **Arch Oral Biol.**, v. 57, n. 1, p. 66-72, 2012.

SEMENOFF-SEGUNDO, A. et al. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **J Int Acad Periodontol.**, v. 9, n. 1, p. 26-31, 2007.

SHANNON, I. L.; KILGORE, W. G.; O'LEARY, T. J. Stress as a predisposing factor in necrotizing ulcerative gingivitis. **J Periodontol.**, v. 40, n. 4, p. 240-2, 1969.

SHEIHAM, A. et al. The relationship between dental status nutrient intake, and nutritional status in older people. **J Dent Res.**, v. 80, n. 2, p. 408-13, 2001.

SHIMAZAKI, Y. et al. Influence of dentition status on physical disability, mental impairment and mortality in institutionalized elderly people. **J Dent Res.**, v. 80, n. 1, p. 340-5, 2001.

SHIRAKURA, M. et al. Tissue response to titanium implantation in the rat maxilla, with special reference to the effects of surface conditions on bone formation. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, n. 6, p. 687-96, 2003.

SILVA, M. E. S.; MAGALHAES, C. S.; FERREIRA, E. F. Perda dentária e expectativa da reposição protética: estudo qualitativo. **Ciênc Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 813-20, 2010.

SZENTPETERY, A. G. et al. Problems reported by patients before and after prosthodontic treatment. **Int J Prosthodont.**, v. 18, n. 2, p. 124-31, 2005.

TAKADA, T. et al. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 75, n. 2, p. 306-15, 2004.

ANEXOS



Anexo 1 - Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

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




COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "EFEITO DO ESTRESSE CRÔNICO NA OSTEONTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DENTÁRIOS E REPARAÇÃO DE ALVÉOLOS EM RATOS" 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 16 de junho de 2005, de acordo com o protocolo nº 77/05.

Araçatuba, 01 de agosto de 2005.

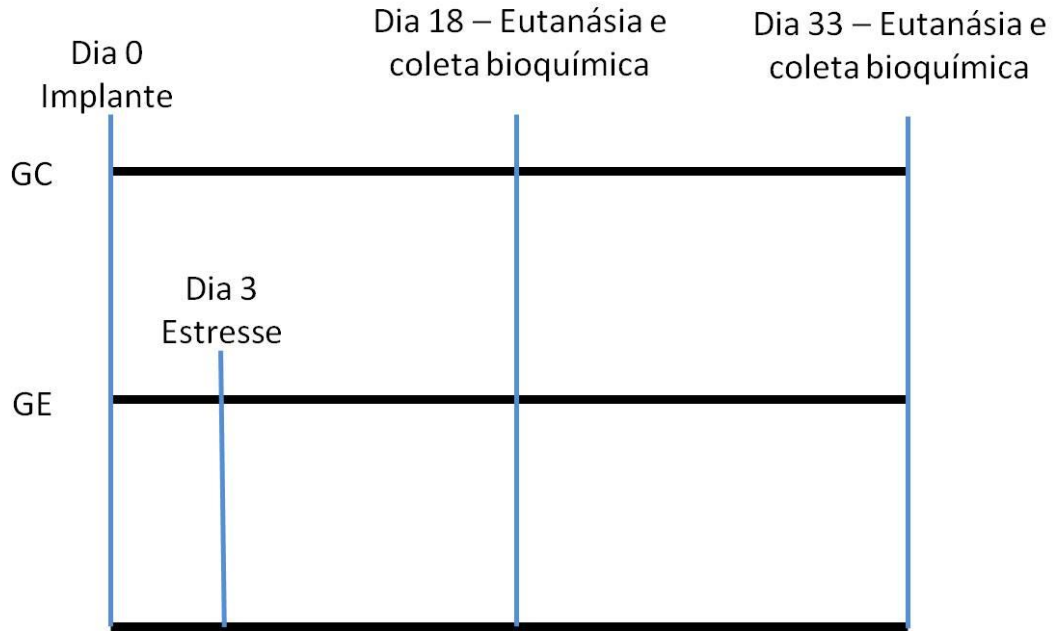

Prof.ª Ass. Dr.ª Maria Gisela Laranjeira
Presidente

Anexo 2 – Figura 1



Anexo 3 – Figura 2



Anexo 4 – Figura 3

Anexo 5 – Figura 4



Anexo 6 – Figuras 5 e 6



Anexo 7- Figuras 7 e 8



Anexo 8 - Figuras 9 e 10

