

REAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO SUBCUTÂNEO DE RATOS AO IMPLANTE DE ARTGLASS®: ESTUDO HISTOLÓGICO

REACTION OF THE SUBCUTANEOUS TISSUE OF RATS TO ARTGLASS™: HISTOLOGICAL STUDY

Maria Cristina Rosifini **ALVES-REZENDE**¹
Márcio Leandro Von Dreiffus **MARINHO**²
Ricardo **KUSUDA**³
Renata Callestini **FELLIPINI**¹
Roberta **OKAMOTO**¹
Tetuo **OKAMOTO**¹
Luís Guilherme Rosifini **ALVES-REZENDE**⁴
Ana Paula Rosifini **ALVES-CLARO**¹

RESUMO

Sistemas indiretos de resina composta têm sido rotineiramente indicados para confecção de restaurações em pacientes estressados. O propósito deste trabalho foi estudar histologicamente em ratos o efeito do estresse crônico sobre a reação do tecido conjuntivo subcutâneo ao implante de Artglass®. Para tanto, 60 ratos, divididos em quatro grupos (GI (controle), GII (estressado), GIII (Artglass®) e GIV (Artglass®/Estressado) receberam implante subcutâneo, bilateral e dorsal, de tubos de polietileno contendo soro fisiológico (Grupos I e II) ou Artglass® (Grupos III e IV). Em grupos de cinco, os animais foram sacrificados aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. Os resultados obtidos permitiram observar reação inflamatória mais intensa e organização do tecido conjuntivo mais tardia nos animais submetidos ao estresse.

UNITERMOS: Cicatrização de feridas, Sistema hipotálamo-hipofisário, Sistema hipófise-supra-renal, Cerômero

INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos novos sistemas indiretos de resina composta surgiram no arsenal odontológico: os chamados polímeros de vidro, porcelanas de vidro polimérico, resinas compostas de laboratório de segunda geração ou cerômeros (**CER**amic **O**ptimized **P**oly**M**ER). Caracterizam-se como resinas microhíbridas com alta quantidade de partículas cerâmicas, responsáveis por melhores propriedades mecânicas¹¹. De fácil manuseio durante sua confecção laboratorial e na fase de prova, apresentam ainda resistência flexural elevada, mínima contração de polimerização, dureza semelhante à do esmalte, união química com os cimentos resinosos, facilidade de execução de eventuais reparos após a cimentação e gama considerável de opções para manipulação estética de cores, oferecendo também uma melhor dinâmica de luz. Como resultado, comportam-se como materiais muito semelhantes às cerâmicas, com maior grau de polimento e condições de translucidez quando comparados à resina composta direta^{11,21}.

Devido a essas propriedades, esses materiais asseguram o sucesso de *inlays*, *onlays*, *overlays*, *veneers*, coroas unitárias livres de metal²⁰, bem como alternativa viável e frequente para as restaurações estéticas em porcelana, quando de uso contra-indicado.

No entanto, a promoção da saúde bucal de qualidade passa pelo desafio do ajuste do conteúdo técnico-científico à prática diária, o que implica na modulação das respostas biológicas dos materiais em função de alterações sistêmicas do indivíduo.

A frequência de pacientes atendidos na clínica odontológica em situações de estresse é acentuada. Eli et al.⁶ lembra que os aspectos comportamentais e emocionais dos pacientes são essenciais para o resultado final do tratamento odontológico, uma vez que a situação de tratamento odontológico está profundamente relacionada com manifestações de ansiedade e estresse, já que coexistem estímulos fisiológicos e aspectos psicológicos no tratamento dentário que podem ser avaliados pelos pacientes como potencialmente ameaçadores ao seu bem-estar.

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp

²Programa de Pós-Graduação em Odontologia/ Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Unesp

³Programa de Pós Graduação em Fisiologia/ Faculdade de Medicina/ Universidade de São Paulo

⁴Curso de Medicina – Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo

O processo do estresse envolve o organismo todo^{10,19}, o qual assume uma certa postura diante dos estímulos proporcionados pelo cotidiano, de tal sorte a ser considerado o denominador comum de todas as reações de adaptação do corpo, isto é, o estado manifestado por todas as alterações inespecíficas produzidas em um sistema biológico¹⁸.

Guiado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual se encontra organizado funcionalmente na forma de arco reflexo neuroendócrino, com centro nos núcleos paraventriculares e vias aferentes de estimulação positiva e negativa, o estresse leva à convergência de todos os estímulos aferentes no sistema nervoso central a nível de hipotálamo médio basal, onde ocorre um verdadeiro processamento de informações, culminando com a secreção pelos capilares primários da eminência média de uma série de peptídeos (CRFs), particularmente o CRH₄₁, que possuem a capacidade de estimular a liberação de corticotrofina. Na sequência, via comunicação sanguínea portal, estes CRFs alcançam as células corticotróficas adenohipofisárias, desencadeando a ativação de um complexo processo enzimático que promove a síntese e a secreção do hormônio adenocorticotrófico (ACTH) e de outros derivados da propimelanocortina, representados pela beta-lipotrofina, beta-endorfina e alfa-MSH^{7,9}.

Quando liberado na corrente sanguínea, o hormônio adenocorticotrófico (ACTH) inicia seus efeitos sobre as camadas corticais das adrenais, estimulando principalmente a secreção de hormônios esteróides (glico e mineralocorticóides) que agem periféricamente exercendo importantes efeitos na regulação do metabolismo glicídico, equilíbrio hidrossalino e nos processos inflamatórios e imunológicos, respondendo ainda pela retroalimentação negativa a nível hipofisário e hipotalâmico⁷.

Bump e Kolodny⁵ sugerem que o estresse provoca aumento da fibrinólise, graças à ação das catecolaminas sobre as células endoteliais, estimulando a liberação dos ativadores de plasminogênio.

O sistema enzimático fibrinolítico representa um processo dinâmico na dissolução do coágulo sanguíneo pelo organismo, podendo ser descrito como um mecanismo formado por ativadores (ativadores do plasminogênio) que atuam sobre o plasminogênio, uma enzima proteolítica relativamente inativa, resultando na ativação da plasmina, enzima proteolítica ativa. Regulados por inibidores que ocorrem naturalmente no plasma (os antiativadores), os ativadores do plasminogênio são encontrados em todos os fluidos corporais, incluindo urina, fluido gengival e saliva^{12,13}. Em contrapartida, a atividade plasmínica está sob controle de um grupo de alfa-globulinas presentes no plasma circulante: as antiplasminas¹⁶.

Quando na coagulação sanguínea a fibrina é formada, o ativador do plasminogênio e a plasmina são adsorvidos ao coágulo de modo sequencial e ordenado. A fibrina aumenta essencialmente a concentração local de plasminogênio por criar uma

interação adicional entre o ativador de plasminogênio e seu substrato. Na presença de fibrina, a afinidade entre o ativador de plasminogênio e o plasminogênio é bastante elevada, indicando que uma eficiente ativação pode ocorrer^{14-16, 22}.

Alves-Rezende e Okamoto¹ destacam que o aumento da fibrinólise no estresse estaria diretamente relacionado ao aumento maciço dos níveis dos ativadores do plasminogênio, os quais, incorporados ao coágulo sanguíneo, explicariam sua dissolução e/ou desorganização.

Considerando-se a influência do estresse sobre os processos de reparação do organismo e a seleção freqüente dos cerômeros como materiais eletivos na construção de restaurações indiretas, o propósito deste trabalho foi estudar histologicamente em ratos estressados a biocompatibilidade do Artglass® em tecido conjuntivo subcutâneo.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, variedade *Wistar*), com peso entre 150 e 200 gramas. Durante todo o período experimental os animais foram alimentados com ração granulada Produtor (Anderson Clayton S.A.) e água à vontade, e mantidos em caixas plásticas de 40x32x17 cm, em condições controladas de iluminação (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (21 a 25°C). Os animais foram divididos em 4 grupos que receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 : ratos controle submetidos ao implante subcutâneo com tubos de polietileno contendo soro fisiológico nos lados direito e esquerdo;

Grupo 2 : ratos estressados submetidos ao implante subcutâneo com tubos de polietileno contendo Artglass®;

Grupo 3: ratos submetidos ao implante subcutâneo com tubos de polietileno contendo Artglass® nos lados direito e esquerdo;

Grupo 4: ratos estressados submetidos ao implante subcutâneo com tubos de polietileno contendo Artglass® nos lados direito e esquerdo.

Os animais dos grupos 2 e 4 receberam estímulo estressor durante 2 horas diárias no período da manhã pela imobilização em tubos de PVC confeccionados para este fim, conforme metodologia proposta por Alves-Rezende e Okamoto^{1,2}. O estresse foi aplicado nos quarenta dias pré-operatórios e em todos os dias pós-operatórios até o sacrifício.

Para os procedimentos cirúrgicos os animais foram pesados, sedados e anestesiados com solução composta de 1,0ml de cloridrato de tiazina – Rompum Bayer S.A. (0,02 g do sal) e 0,5ml de Ketamina – Dopalen – Agribands do Brasil Ltda (0,05g do sal), administrados lentamente via intramuscular, com seringa descartável, na dosagem de 0,1ml para cada 100g de massa corpórea. Após tricotomia, na região dorsal dos animais foi realizada incisão com 1.0 cm de extensão sobre a linha média, equidistante da

inserção da cauda e da cabeça do animal, e o tecido subcutâneo divulsionado lateralmente, à direita e à esquerda, com o auxílio de tesoura de ponta romba, formando duas lojas cirúrgicas, uma a cada lado da incisão, com aproximadamente 2,5cm de profundidade. Completadas as lojas cirúrgicas, dois tubos de polietileno estéreis com 10 mm de comprimento e 1mm de diâmetro interno, foram implantados nos animais, à direita e à esquerda e as bordas das feridas suturadas de modo convencional com fio mononylon 4-0.

Em grupos de cinco, os animais foram sacrificados aos 7, 14 e 30 dias pós-operatórios. Após o sacrifício, ambas as tíbias foram seccionadas com tesoura de ponta romba e, após a remoção dos excessos de tecidos duros e moles, foram fixadas em formalina a 10%. A seguir, foram descalcificadas em solução de citrato de sódio e ácido fórmico em partes iguais, e incluídas em parafina para possibilitar a microtomia. Os cortes semi-seriados com 6 micrometros de espessura foram corados com hematoxilina-eosina para estudo histológico.

RESULTADOS

7 DIAS

No Grupo I (Controle) é possível encontrar razoável formação de tecido de granulação imaturo altamente celularizado, ao lado de intenso infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear e abundante neoformação vascular com diminutos capilares e início de produção colagênica por fibroblastos jovens. Nos espécimes examinados, foi comum o achado de fibrina com polimorfonucleares neutrófilos na região correspondente à secção do tubo preenchido por soro fisiológico (Figura 1). No Grupo II (Estressado) observa-se grande formação de tecido de granulação com pouca maturidade e grande celularidade, o que sugere um retardo do processo de reparação em relação ao grupo controle. Houve dificuldade na reabsorção do coágulo sanguíneo, caracterizado por atraso tanto na fase de organização quanto de maturação do tecido de granulação (Figura 2). No Grupo III (Artglass®) é possível observar razoável produção de tecido de granulação com reabsorção do coágulo e organização tecidual, razoável celularidade e moderado infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 3), ao passo que no grupo IV (Artglass®/Estressado) observa-se processo inflamatório misto com exsudação superficial, além de formação capilar discreta, sendo caracterizada por poucos capilares neoformados (Figura 4)

14 Dias

No Grupo I (Controle) observa-se grande produção de colágeno, mas ainda com significativa população celular apesar da redução no número de capilares (Figura 5). No Grupo II (Estressado) além de exacerbada produção de tecido de granulação observa-se resposta inflamatória intensa de polimorfonucleares neutrófilos em coleção localizada na área correspondente à luz do tubo, evidenciando atraso na maturação do tecido conjuntivo

neoformado, o qual possui inúmeros vasos sanguíneos congestos (Figura 6). Já no Grupo III (Artglass®) a formação de tecido cicatricial ainda é evidente com permanência de exsudato fibrinoso, mas com certa aceleração do processo quando comparado com o grupo de 7 dias, evidenciada por maior formação vascular e diminuição do processo inflamatório reacional (Figura 7). No grupo IV (Artglass®/Estressado) evidencia-se discreta produção colagênica e alta população celular (Figura 8).

28 Dias

No Grupo I (Controle) o processo de reparo sofreu maturação com aumento considerável de fibras colágenas, diminuição do infiltrado inflamatório e do número de vasos capilares.(Figura 9). No Grupo II (Estressado) houve retração e maturação do tecido conjuntivo neoformado, sendo que fibrose discreta substitui o tecido anteriormente produzido (Figura 10). No Grupo III (Artglass®) observa-se fibrose acentuada, sinalizando a maturação do processo de reparo. O infiltrado inflamatório é inexistente. (Figura 11). Já no grupo IV (Artglass®/Estressado), quando comparado ao período de observação anterior, o tecido conjuntivo neoformado se mostra mais abundante e a população celular menor. Porém, ainda se observa infiltrado inflamatório junto à fibrina superficial (Figura 12).

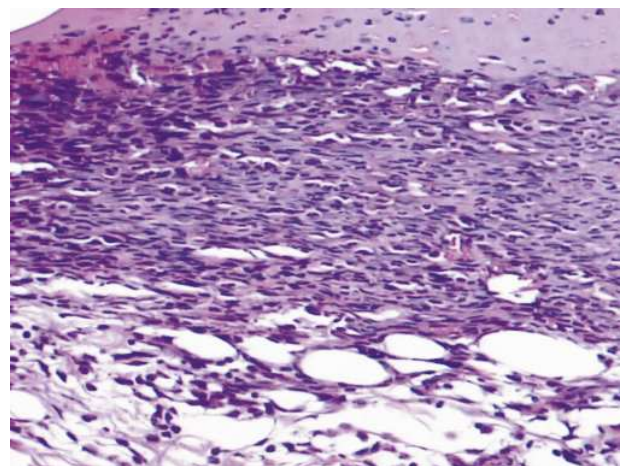


Figura 1 - Grupo Controle - 7 dias

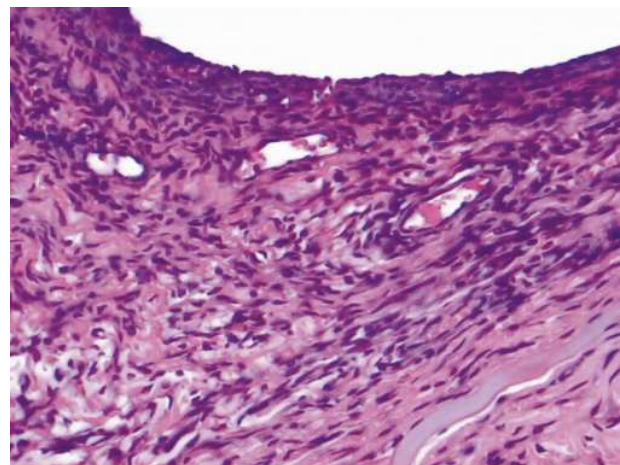


Figura 2 - Grupo Estresse - 7 dias

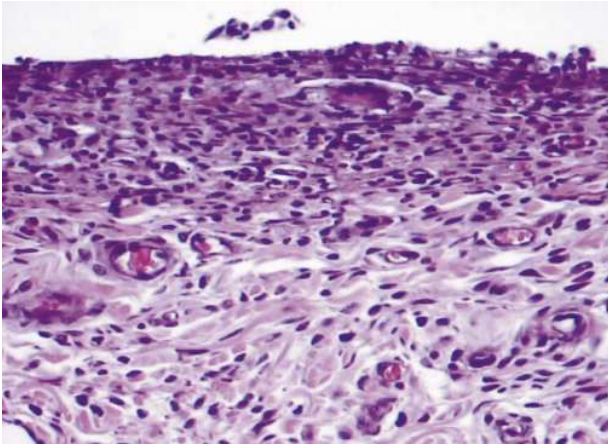


Figura 3 - Grupo Artglass®- 7 dias

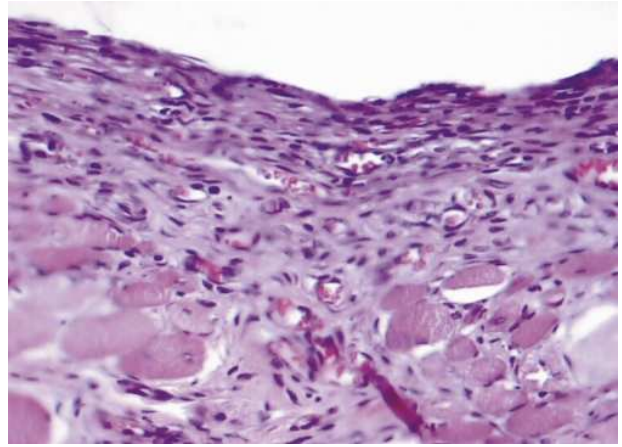


Figura 7 - Grupo Artglass® - 14 dias

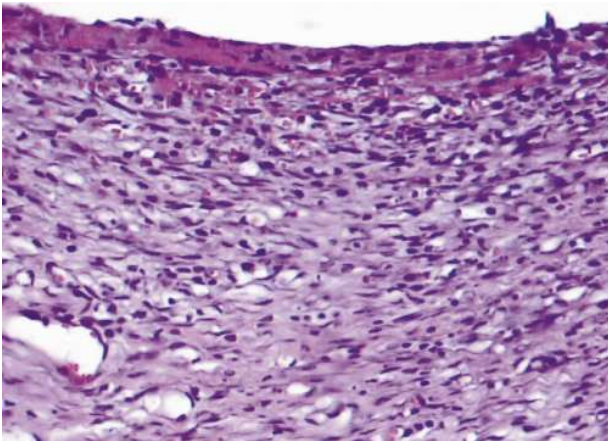


Figura 4- Grupo Artglass®/Estressado - 7 dias

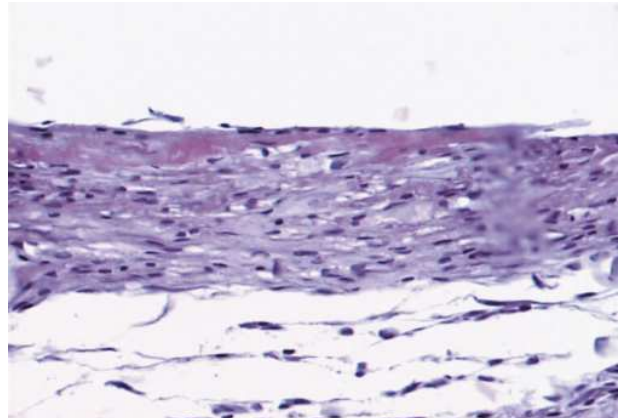


Figura 8 - Grupo Artglass®/Estressado - 14 dias

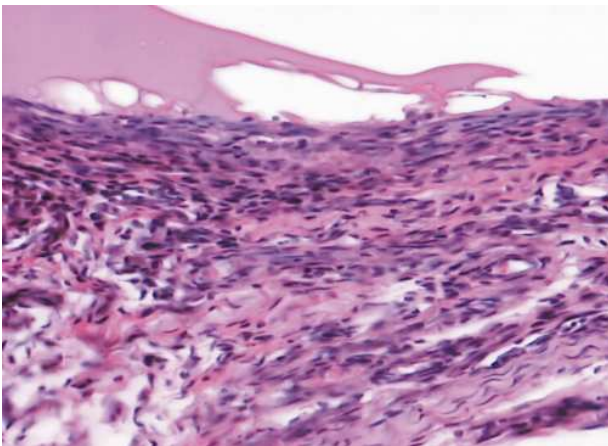


Figura 5 - Grupo Controle - 14 dias

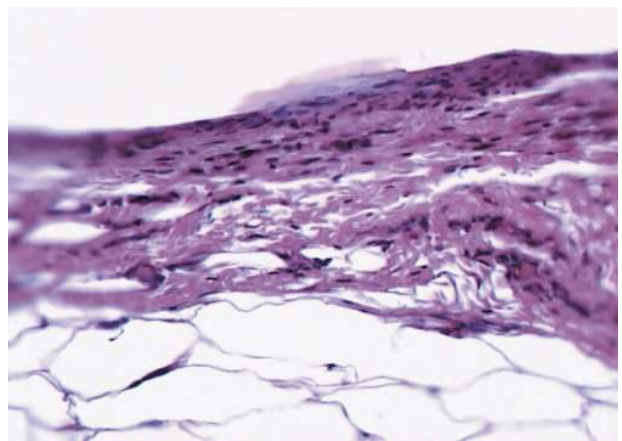


Figura 9 - Grupo Controle - 28 dias

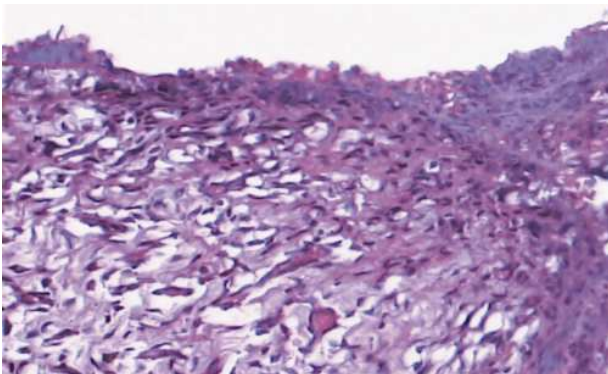


Figura 6 - Grupo Estresse - 14 dias

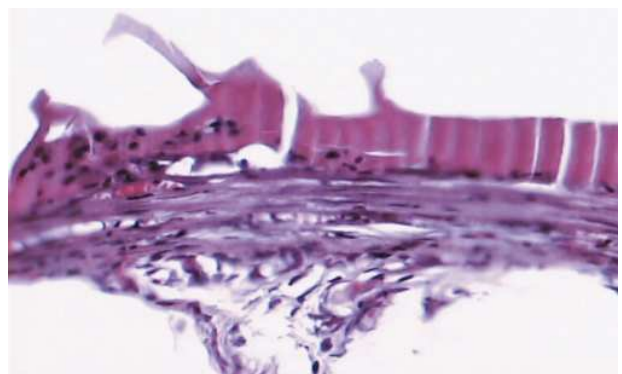


Figura 10 - Grupo Estresse - 28 dias

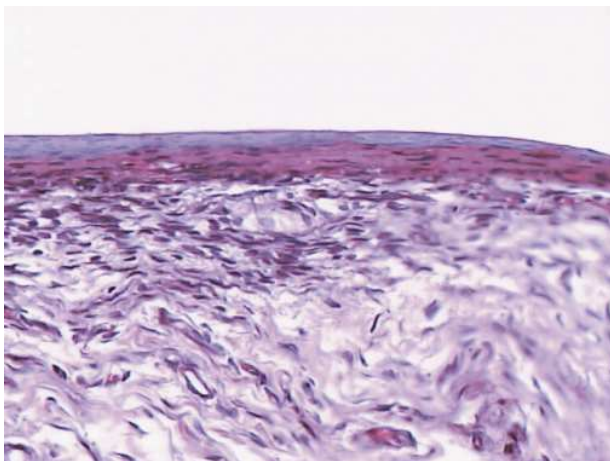


Figura 11 - Grupo Artglass® - 28 dias

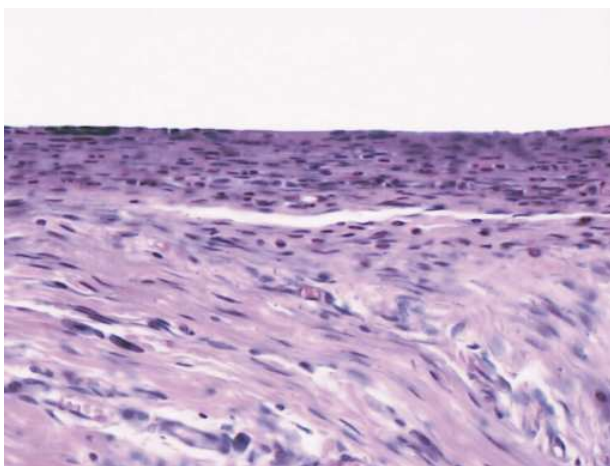


Figura 12 - Grupo Artglass®/Estressado - 28 dias

DISCUSSÃO

Os sistemas restauradores de resina indireta (Artglass®/Heraeus Kulzer®, BelleGlass HP®/SDS, Kerr®, Sculpture®/Pentron Laboratory Technologies® e Targis®/Ivoclar Vivadent®) são uma opção estética conservadora a ser considerada durante o planejamento protético de elementos unitários e de pequenos espaços desdentados. As vantagens desses materiais relacionam-se com melhor propriedade de união às estruturas dentais, associadas com a cimentação adesiva e à possibilidade de executar eventuais reparos após a cimentação. Também permitem ajustes e polimentos intrabuciais e promovem menor abrasão à dentição antagonista, quando comparado com as cerâmicas. Tais materiais têm sido sistematicamente utilizados na Odontologia na confecção de *inlays*, *onlays*, *overlays*, coroas totais e facetas laminadas^{11,21}.

O paciente do consultório odontológico está submetido em seu cotidiano a vários fatores que são potencialmente estressante. Jacob⁸ afirma que o estresse vivenciado pelo paciente amplia as percepções de medo e de dor, diminuindo a sua capacidade de colaborar com o tratamento.

Ademais, as alterações físicas e químicas provocadas pelo estresse modulam as respostas teciduais aos diferentes materiais odontológicos¹.

Neste estudo, os resultados obtidos apontam para a biocompatibilidade do Artglass®, já que os achados histológicos mostram aos 28 dias fibrose acentuada e infiltrado inflamatório inexistente, o que sinaliza a maturação do processo de reparo. Outrossim, os resultados também exibem atraso na reabsorção do coágulo sanguíneo nos grupos estresse e Artglass®/estresse quando comparados ao Grupo controle. Dados semelhantes ao grupo estressado foram encontrados por Alves-Rezende e Okamoto^{1,2} e Alves-Rezende et al.³ Este achado parece estar relacionado não só a fibrinólise sistêmica disparada pelos altos níveis de ativadores do plasminogênio, liberados pelas células endoteliais em resposta ao aumento das catecolaminas pelo estresse, como também à fibrinólise local, desencadeada pelos ativadores de plasminogênio presentes na saliva, fluido gengival ou liberados pelas células lesadas no ato cirúrgico. Graessler et al.⁷ acrescentam que o estresse por imobilização resulta em resposta potencializada das catecolaminas e inibição da resposta do ACTH à hemorragia, sugerindo portanto aumento da susceptibilidade à hemorragia frente ao estresse. Também estes grupos exibiram diminuição na taxas de formação do tecido conjuntivo; achados semelhantes foram observados Alves-Rezende et al.³, Alves-Rezende e Okamoto^{1,2} e Bombonato⁴. A menor colagenização pode ser explicada não somente pelo atraso na organização do coágulo sanguíneo, como também pela inibição do crescimento fibroblástico, com alteração na formação do tecido de granulação¹⁷.

Certamente, o grau de formação de tecido de granulação e a extensão da fibrose são indicadores da capacidade de resposta do organismo, já que a substituição do tecido inflamatório por um complexo de fibras colágenas representa a resolução da resposta inflamatória inicial. A avaliação comparativa da fibrose encontrada em nossos achados histológicos pode ser considerada um parâmetro para a verificação da menor capacidade de resposta dos grupos estresse e Artglass®/Estresse.

CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos podemos concluir que:

- O estresse crônico atrasou a reparação do tecido conjuntivo subcutâneo no grupo estressado quando comparado ao grupo controle;
- O estresse crônico atrasou a reparação do tecido conjuntivo subcutâneo no grupo Artglass®/estressado quando comparado ao grupo controle;
- O material Artglass® apresentou biocompatibilidade aceitável

ABSTRACT

Indirect composite resin systems have been routinely recommended for making restorations in distressed patients. The purpose of this study was to evaluate histologically in rats the effect of chronic stress on the reaction of subcutaneous connective tissue after implant of Artglass™. For this purpose, 60 rats were divided into four groups (GI (control), GII (stressed), GIII (Artglass™) and GIV (Artglass™ / stressed) received dorsal subcutaneous implants of polyethylene tubes containing saline solution (GI and GII) or Artglass™ (GIII and GIV). In groups of four animals were sacrificed at 7, 14 and 28 days postoperatively. The results allowed to observe more intense inflammatory reaction and tissue organization later in the animals subjected to stress.

UNITERMS: *Wound healing, Hypothalamo-hypophyseal system, Pituitary-adrenal system, Ceromer.*

REFERÊNCIAS

1. Alves-Rezende MCR, Okamoto T. Effects of fibrin adhesive material (Tissucol) on alveolar healing in rats under stress. *Braz Dental J.* 1997; 8:13-9.
 2. Alves-Rezende MCR, Okamoto T. Influência do estresse no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. *Rev Odontol Unesp.* 1989; 18:119-30.
 3. Alves-Rezende MCR, Kusuda RK, Alves LMN, Okamoto T, Okamoto R, Alves-Rezende LGR. et al. Efeito do estresse crônico de contenção sobre o reparo de cavidades ósseas: estudo histológico em tíbias de ratos. *Rev Odontol Araçatuba.* 2009; 30: 71-6.
 4. Bombonato KF. Estudo histométrico do efeito do estresse e do tratamento com diazepam no reparo alveolar de ratos. [Dissertação]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1998.
 5. Bumpy RL, Kolodny SC. Fibrinolysis: a possible factor in the control of postoperative hemorrhage in the patient with hemophilia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 36:195-200.
 6. Eli L, Uziel N, Bath R, Kleinhauz M. Antecedents of dental anxiety: Learned responses versus personality traits. *Commun Dent Oral Epidemiol.* 1992; 25: 233-7.
 7. Graessler J, Kvetnansky R, Jezova D, Dobrakokova M, Van Loon GP. Prior immobilization stress alters adrenal hormone responses to hemorrhage in rats. *Am J Physiol.* 1989; 257: 661-7.
 8. Jacob LS. Psicologia e odontologia. In: Rangé B. *Psicoterapia comportamental e cognitiva.* São Paulo: Psy; 1998.
 9. Jimenez MAL. Efeito da hemidecorticação sobre o controle neuro-endócrino do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. [Tese]. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 1990.
 10. Kawano S, Ohmori S, Kanda K, Ito T, Murata Y, Seo H. Adrenocortical response to tail suspension in young and old rats. *Environ Med.* 1994; 38: 7-12.
 11. Koczarski MJ. Utilization of ceromer inlays/onlays for replacement of amalgam restorations. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1998; 10: 405-12.
 12. Komesaroff PA, Funder JW. Differential glucocorticoid effects on catecholamine response to stress. *Endocrinol Metab.* 1994; 29: 118-28.
 13. Lee LE, Bols NC. Action of cortisol on the proliferation of rainbow trout fibroblasts. *Cell Tissue Kinet.* 1989; 22: 291-301.
 14. Lucas ON, Fujita D, Bremner F. Plasminogen activator in the normal gengiva of dog. *J Period Res.* 1975; 10: 203-10
 15. Moody GH. Plasminogen in human saliva. *Int J Oral Surg.* 1982; 11:110-3.
 16. Rasik AM, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type wounds. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81:257-63.
 17. Saito T, Tazawa K, Yokoyama Y, Saito M. Surgical stress inhibits the growth of fibroblasts through the elevation of plasma catecholamine and cortisol concentrations. *Surg Today.* 1997; 27: 627-31.
 18. Selye H. The general adaptation syndrome and the disease of adaptation. *J Clin Endocrinol.* 1946; 6: 117-52.
 19. Sherry S. Fibrinolysis. *Ann Rev Med.* 1968; 19: 247-59.
 20. Stringheto K, Caruso M. No limite. *Isto é.* 1999; 15: 47-54.
 21. Touati B, Aidan N. Second generation laboratory composite resins for indirect restorations. *J Esthet Dent.* 1997; 9:108-18.
- Wedgwood D. The fibrinolytic system with special reference to its relevance to oral surgery. *Br J Oral Surg.* 1970; 8: 82-92.

Endereço para correspondência

Maria Cristina Rosifini Alves Rezende

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese
Faculdade de Odontologia de Araçatuba (Unesp)
rezende@foa.unesp.br