

Alex Semenovff Segundo

**Efeito do estresse crônico na
modulação da periodontite induzida
por ligadura em ratos**

**Araçatuba - SP
2007**

Alex Semenovff Segundo

**Efeito do estresse crônico na
modulação da periodontite induzida
por ligadura em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba - UNESP, para obtenção do Grau de Doutor em Odontologia - Área de Concentração Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Francisco Bosco.

**Araçatuba - SP
2007**

Dedicatória

Dedico este trabalho para aqueles que anonimamente trabalham para o crescimento da humanidade.

Agradecimentos especiais

Ao meu Papai, Minhas Vovós; Auta, Nina e Luzia e meus Vovôs Antônio e Georges. *(in memoriam)*

Agradecimentos

À **Deus**, por oferecer-me a oportunidade de progredir propiciando o meu desenvolvimento intelectual e moral.

Tê, minha companheira, você é uma dádiva que Deus colocou em meu caminho.

Ky, obrigado pelo amor desprendido e por aceitar a ausência do Papai.

A minha **Mamãe**, por oferecer-me uma educação fundamentada no exemplo.

As minhas irmãs **Tati** e **Lalá** pelas ótimas artes realizadas na infância e adolescência...

Aos cunhados **Leo** e **Cláudio** pela convivência harmônica.

Aos meus sobrinhos **Tatá**, **Igor** e **Yuri** pela alegria.

A Minha Sogra **Alice** pelo aconchego do seu lar e meu Sogro **Zé Caipora** pelas viagens de caminhão pelo Mato Grosso.

Ao amigo **Claro** pelo amor e carinho que dedica a Mamãe.

Ao professor **Madeira**, pelo excelente exemplo de educador e homem de bem.

Ao meu orientador Professor Dr. **Álvaro Francisco Bosco**, Tu és um exemplo de profissional de sucesso e um exemplo como Pai.

Aos Professores Doutores **Valdir Gouveia Garcia** e **Maria José Hitomi Nagata** pela ajuda carinhosa na minha formação acadêmica.

A todos meus **colegas** de Doutorado com carinho.

Aos meus amigos **Tati, Michel e Flávia** pelo apoio em momentos tão difíceis, assim como o prazer da companhia de vocês!

A **UNESP** e todo seu corpo administrativo, Professores, alunos e em especial a **TODOS** os amigos da **biblioteca**.

Ao **UNIVAG-MT**, através do corpo gerencial da instituição, meus colegas, alunos, a todos os funcionários, em especial, Dona Edna e Dona Louise.

À **Samira** que é uma Jóia inestimável.

Ao **Regis** pela coragem e determinação principalmente nas horas mais difíceis do trabalho!

A **Grace** pela disciplina tenaz implantada no laboratório.

A querida Professora **Marileide** que me assistiu com carinho e paciência, resgatando o poder de expressar-me com a escrita.

Epígrafe

As pessoas que vivem plenamente nunca terão medo de viver e de morrer.

Elisabeth Kübler-Ross

Lista de figuras

	página
Artigo 1 - Estudo de dois modelos de estresse crônico na modulação da periodontite induzidas por ligadura em ratos	
Figura 1 - Figura demonstrativa do delineamento do trabalho	39
Figura 2 - Figura demonstrativa dos parâmetros de mensuração histométrica	43
Figura 3 - Figura demonstrativa da periodontite induzida por ligadura no grupo de estresse físico	49
Figura 4 - Figura demonstrativa da hemi - maxila esquerda, sem indução de doença	49
Artigo 2 - Efeito do estresse crônico na gravidez, interferindo na progressão de periodontite induzida na prole: estudo histométrico em ratos.	
Figura 1 - Figura demonstrativa do delineamento do trabalho.	84
Figura 2 - Figura demonstrativa da histometria da perda de inserção histológica e óssea dos filhos das mães estressadas	88
Figura 3 - Figura demonstrativa da histometria da maxila esquerda, sem indução de doença	89

Lista de quadros

	página
Artigo 1 - Estudo de dois modelos de estresse crônico na modulação da periodontite induzida por ligadura em ratos.	
Quadro 1 - Quadro-1 Refere-se à explicação dos grupos em relação às hemi-maxilas direitas e hemi-maxilas esquerdas.	38

Lista de tabelas

	página
Artigo 1 - Estudo de dois modelos de estresse crônico na modulação da periodontite induzida por ligadura em ratos.	
Tabela 1 - Tabela demonstrativa dos resultados das análises histométricas.	47
Tabela 2 - Tabela demonstrativa da comparação entre os pesos dos órgãos dos animais.	48
Tabela 3 - Média e Desvio Padrão (\pm) em gramas da diferença do peso dos animais no decorrer das semanas	49
Artigo 2 - Efeito do estresse crônico na gravidez, interferindo na progressão de periodontite induzida na prole: estudo histométrico em ratos.	
Tabela 1 - Resultados das análises histométricas em mm do lado direito com indução de doença.	88
Tabela 2 - Resultados das análises histométricas em mm do lado esquerdo sem indução de doença.	89

Lista de abreviaturas

ACTH -	Hormônio adenocorticotrófico
EDTA -	Ácido etileno diaminotretacético
GCN -	Grupo controle negativo
GCP -	Grupo controle positivo
GEF -	Grupo estresse físico
GEV -	Grupo estresse variável
GI -	Grupo dos filhos das mães estressadas
GII -	Grupo dos filhos das mães não estressadas
HPA -	Hipotálamo-pituitário-adrenal
Jac E -	Junção amelo-cementária a porção mais coronária do epitélio juncional.
Jac O -	Junção amelo-cementária a porção mais coronal da crista óssea alveolar
M -	Média
MHC tipo I -	Complexo de histocompatibilidade principal tipo I
MHC tipo II -	Complexo de histocompatibilidade principal tipo II
ml -	Militros
mm -	Milímetros
SN -	Sistema nervoso
SNA -	Sistema nervoso autônomo
SNC -	Sistema nervoso central
Th1 -	Célula T helper1
Th2 -	Célula T helper2
± -	Desvio padrão
μm -	Micrometro

Sumário

	página
1 Introdução geral (relação entre os artigos do trabalho)	18
2 Capítulo 1 - Estudo de dois modelos de estresse crônico na modulação da periodontite induzida por ligadura em ratos	22
2.1 Resumo	23
2.2 Abstract	26
2.3 Introdução	29
2.4 Proposição	34
2.5 Material e método	36
2.6 Resultados	46
2.7 Discussão	51
2.8 Conclusão	59
2.9 Referências	61
3 Capítulo 2 - Efeito do estresse crônico na gravidez, interferindo na progressão de periodontite induzida na prole: estudo histométrico em ratos	68
3.1 Resumo	69
3.2 Abstract	72
3.3 Introdução	75
3.4 Proposição	79
3.5 Material e método	81
3.6 Resultados	87
3.7 Discussão	90
3.8 Conclusão	95
3.9 Referências	97
Anexos Gerais	105

1 Introdução geral

Com a publicação dos estudos clássicos de Hans Selye, a área da saúde começou a perceber que o organismo trabalha com seus sistemas integrados, coordenados pelo Sistema Nervoso (SN). Mais tarde observou-se que a psique humana tem papel modulador na rede de informações propagadas a partir do eixo Hipotálamo-Pituitário-Adrenal (HPA), fundamental no estabelecimento de doenças auto-imunes e das neoplasias malignas. O periodonto constitui-se um local estratégico do corpo humano, tendo em vista que sustenta o dente, único órgão com uma parte no meio interno e outra no meio externo. Ao redor dessa área, uma frágil barreira mecânica de tecido conjuntivo, tecido epitelial e tecido nervoso, juntos de uma complexa rede de defesa, é capaz de conviver "harmonicamente" contra mais de 300 tipos de microorganismos diferentes. Embora nos dias atuais seja grande o conhecimento das causas das doenças do periodonto, nossa terapêutica ainda está assentada na desorganização dos microorganismos do biofilme, como nos relatos históricos da antiga civilização egípcia, e esta informação, sugere a necessidade de novas terapêuticas baseados em estudos que fortaleçam a compreensão dos eventos biológicos associado a

questões ambientais como o estresse. A modulação do eixo neuro-endócrino-imunológico é uma importante ferramenta de trabalho e de custos baixos, e a exemplo de outras áreas do conhecimento como na oncologia, AIDS, doenças auto-imunes, dentre outras, os resultados são bem promissores. Apesar disso os estímulos do sistema nervoso central à piora nos indicadores de saúde periodontal ainda são pouco elucidados. Neste momento, surgem importantes estudos em animais nas descrições dos eventos biológicos capazes de facilitar essa conexão. Nos dois trabalhos dessa tese, buscou-se modular o estresse na tentativa de obter respostas em relação à migração do epitélio juncional para apical. O objetivo do primeiro artigo foi avaliar uma possível progressão da periodontite com o modelo de estresse físico e com o modelo de estresse variável. Os resultados confirmam ser o estresse físico modulador da doença. No segundo ensaio, provocou-se estresse crônico entre o sétimo e o décimo oitavo dia do período gestacional das ratas. Após o crescimento dos filhotes (adultos jovens), induziu-se neles periodontite por ligadura durante sessenta dias. Como resultado, teve-se uma maior progressão de periodontite nos filhos das mães estressadas, o que evidencia o efeito modulador do estresse. É importante deixar claro que as duas formas de estresse interferiram sistemicamente no organismo, sendo qualquer extrapolação para seres humanos, neste momento, ainda precoce e necessitada de melhor avaliação. Dentre os limites destes

estudos, pode-se concluir que o estresse tem efeito modulador na periodontite induzida em ratos.

2 Capítulo 1

**Estudo de dois modelos de estresse crônico na modulação
da periodontite induzida por ligadura em ratos**

2.1 Resumo

O objetivo do estudo foi comparar o efeito modulador do estresse crônico variável e do estresse crônico físico sobre a periodontite induzida por ligadura. Utilizaram-se 48 ratas Wistar adultas, divididas aleatoriamente nos grupos: estresse físico GEF (n = 12), estresse variável GEV (n = 12), controle positivo GCP (n = 12) e controle negativo GCN (n = 12). Iniciou-se ensaio de estresse físico associado a frio (contenção) e estresse variável (exposição à luz piscante, isolamento, exame da cavidade bucal, ambiente congestionado, odor de sangue e barulho). Decorridos dez dias de estresse, submeteram-se os grupos GEF, GEV e GCP à anestesia, acondicionando fio de seda em volta do segundo molar superior direito, servindo o lado esquerdo como controle. Após processamento laboratorial, realizaram-se a digitalização e a mensuração histométrica das imagens, usando-se dois parâmetros: perda de inserção histológica e perda óssea. No lado com indução de doença, observaram-se maior perda de inserção e perda óssea para o GEF, comparado aos demais grupos. O GEV não apresentou diferenças estatísticas, comparado ao grupo GCP. O lado, sem indução de doença, demonstrou ausência de diferença estatística. Em relação ao peso do timo, o GEV teve um aumento e diferenciou-se do GCP e GCN. O timo do

GEF também aumentou, diferenciando-se do GCP. O peso das adrenais diminuiu no GEF, diferenciando-se do GCP e GCN. Com relação ao peso do fígado as diferenças estatísticas foram notadas no GEF, se comparado ao GCP e ao GCN. Também se observou diferença estatística entre GEV e GCN. Concluindo, o estresse físico modulou o padrão de resposta da periodontite induzida.

Palavras chaves: Estresse, Ratos, Periodontite.

2.2 Abstract

Stress is an intrinsic factor in modern society, though its relation with periodontal disease is controversial. In the light of this problem, the modulatory effect of variable chronic stress and chronic physical stress on ligature-induced periodontitis was compared. Forty-eight adult Wistar rats were used, randomly divided into four groups: physical stress (PSG n=12), variable stress (VSG n=12), control positive (PC n=12), and control negative (NC n=12). Experiments for physical stress, immobilization associated with cold, and variable stress, including flickering light exposure, isolation, buccal cavity exam, overcrowded environment, blood odor and noise, were realized. After ten days of stress, the PSG, VSG and PC groups were anesthetized and a suture thread was placed around the upper right second molar, with the left side serving as control. The experimental results revealed a greater loss of insertion and bone destruction for the PSG compared to the remaining groups. The VSG in relation to the PC, though with no statistical difference. On the left side with no ligature-induced disease, no statistical differences were observed between the groups. The thymus was found to be enlarged in the VSG, differentiating this group from the PC and NC. The thymus in the PSG was different from the PC. the

adrenals were diminished in the PSG, differentiating this group from the PC and NC. Statistical differences were found in the liver between the PSG and the PC and NC, with differences also observed between the VSG and NC. In conclusion, stress models physical modulated the standard response to ligature-induced periodontitis in rats.

Key words: Stress, Rats, Periodontitis.

2.3 Introdução

A doença periodontal inicia-se com uma organização de microrganismos em forma de ecossistema. Cada sítio corresponde a uma comunidade diferente, interagindo os próprios microrganismos entre si e com as estruturas do periodonto, contudo, apenas o biofilme organizado por si só não é capaz de conduzir à destruição do periodonto [1]. Apesar de todo aporte literário sobre o assunto, ainda não se apresenta uma relação causal dos fatores ambientais com a doença periodontal [2]. O tabagismo, o diabetes e o estresse estão ligados como fatores de risco ou indicadores de risco para a doença periodontal [3].

A relação epidemiológica entre doenças emocionais e doença periodontal é conhecida desde as civilizações antigas até os dias atuais. Uma das maiores divulgações do seu surgimento são estudos que envolvem militares, que, de forma geral, acumulam o somatório de alto estresse e pobre higiene bucal, o que pode produzir gengivite ulcero - necrosante ou periodontite ulcero - necrosante [4]. As dificuldades metodológicas em

¹ Artigo escrito nas normas da Revista Acta Ontont Scand - Anexo B

relação aos determinantes de diagnóstico das doenças somáticas são um dos fatores limitadores da correlação do estresse com a doença periodontal [5-6].

Em dois estudos de caso-controle [5, 7] encontrou-se ausência de correlação nessa associação. Dois outros estudos, um transversal [6] e outro caso-controle [8], demonstram que pacientes com problemas financeiros e depressão, aliados à presença de *Tannerella forsythia*, apresentaram risco aumentado de desenvolver periodontite.

O eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) atua diretamente em funções do sistema nervoso autônomo (SNA). Sua interação químico-elétrica conduz-nos a respostas adequadas ou não frente às necessidades orgânicas básicas e estímulos ambientais [9-10].

A patogênese do estresse, interferindo no periodonto, ocorre após estímulo do SNC, ativando a adeno-hipófise a produzir vários produtos. Os mais relevantes são o hormônio adenocorticotrópico (ACTH) e a β -endorfina. Estes neurohormônios estimulam a região do córtex e a medula da glândula adrenal a produzir glicocorticóides e adrenalina. Ambos, na fase efetora do antígeno, acicatham células T helper (Th2), produtoras da resposta humoral através dos plamócitos, que posteriormente estimulam os neutrófilos. As células T Helper (Th1), produtoras da resposta celular, estimulam macrófagos. Ambas, Th1 e Th2, determinam, respectivamente, maior e

menor progressão de periodontite. Quando os estímulos são das células Th 1, há menor destruição do periodonto, e quando as células Th2 são estimuladas há maior destruição do periodonto [11-15].

Estudos em animais corroboram na geração de informações capazes de auxiliar a compreensão das controvérsias produzidas pelos estudos epidemiológicos, além de permitir ensaios que, nos seres humanos, são impossíveis de realizar. Em trabalhos que estudam as principais vias do estresse e da periodontite, Breivik e Thrane [14] evidenciam uma relação direta entre o periodonto e as vias associadas do eixo HPA. Em estudo em ratos, usando um intenso modelo de estresse (12 h de contenção) associado à periodontite induzida, observou-se a existência de maior progressão de periodontite, bem como de mudanças qualitativas no infiltrado inflamatório do periodonto [15].

Em outro trabalho com estresse moderado variável, Susin e Rösing [16] inferiram que o estresse crônico variável moderado, associado à periodontite induzida por ligadura, modulou a periodontite, evitando a perda de inserção. Em outra evidência, Semenoff-Segundo et al. [17], com modelo de estresse variável semelhante, perceberam tendência protetora por vias diferentes do trabalho antes apresentado.

A modulação do eixo HPA tem sido objeto de análise de vários estudos [18-19]. O eixo HPA, como agente modulador da doença periodontal, seja

para melhorar, evitando a perda de inserção, seja para colaborar para a migração apical do epitélio juncional, começa a ser divulgado na literatura [11, 15-17, 20]. Compreender o efeito dos diferentes modelos de estresse no periodonto, com estudos em animais, pode, não somente auxiliar na compreensão dos eventos biológicos, mas também gerar informações para futuros estudos em seres humanos.

2.4 Proposição

O presente trabalho teve por objetivo comparar o efeito do estresse crônico físico e do estresse crônico variável sobre a periodontite induzida por ligadura em ratos.

2.5 Material e método

Para o presente experimento selecionaram-se quarenta e oito ratas da espécie *Rattus Novergicus* da linhagem Wistar, com peso inicial médio de 232,81 e desvio padrão de 24,45 gramas. As mesmas passaram por uma adaptação ao novo ambiente durante uma semana. Os animais foram mantidos em caixas moradia (polietileno 16x40x30) em número de seis, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada a 23° C e umidade \pm 60% com ração padronizada e água *ad libitum*. O experimento foi aprovado e registrado pelo comitê de ética na experimentação animal da Faculdade de Odontologia "Júlio d Mesquita Filho" Câmpus Araçatuba (Anexo A)

Delineamento do estudo

Quarenta e oito animais foram divididos de forma aleatória em quatro grupos de 12 cada um: grupo estresse físico (GEF), grupo estresse variável (GEV), grupo controle positivo (GCP) e grupo controle negativo (GCN).

Após a separação dos grupos os animais foram pesados uma vez por semana durante todo experimento, sendo posteriormente os dados agrupados e realizado a análise estatística.

Os animais GEF e GEV foram submetidos a estresse físico e estresse variável, respectivamente, do início até o final do ensaio. Após 10 dias do

início do estresse, os animais do GEF, GEV e GCP receberam indução de doença periodontal. Todos os procedimentos desta etapa foram realizados sob anestesia geral, através da administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de cetamina -50mg/ml- (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de xilazina -2 gramas por cada 100ml- (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) para cada 100 gramas de peso corporal. Após a anestesia, acondicionou-se um fio de sutura de seda estéril número 4 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) em volta do segundo molar superior direito [21] (Figura -1).

O GCN não recebeu nenhum tipo de intervenção, porém foi mantido no mesmo ambiente dos demais grupos. Todos os animais foram pesados uma vez por semana (quadro-1).

Quadro-1 Refere-se à distribuição dos grupos em relação às hemi-maxilas direitas e hemi-maxilas esquerdas com e sem indução de doença periodontal.

<i>Grupo estresse físico</i>	<i>hemi-maxila direita</i>	<i>com indução de doença</i>
Grupo estresse físico	hemi-maxila esquerda	sem indução de doença
Grupo estresse variável	hemi-maxila direita	com indução de doença
Grupo estresse variável	hemi-maxila esquerda	sem indução de doença
Controle positivo	hemi-maxila direita	com indução de doença
Controle positivo	hemi-maxila esquerda	sem indução de doença
Controle negativo	hemi-maxila direita e esquerda	nada realizado

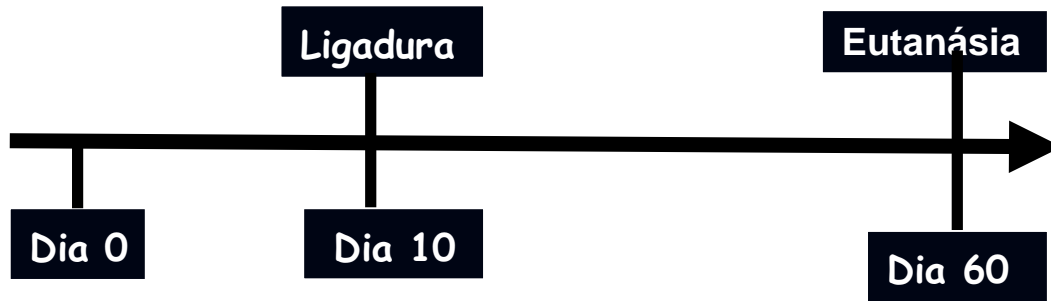


Figura 1 - Figura demonstrativa do delineamento do trabalho

Modelos de estresse

No modelo escolhido para o estresse físico (GEF), os animais foram somente imobilizados e imobilizados e expostos ao frio. Alternou-se os modelos de estresse, durante dois meses, seis dias da semana no período de 6:00h às 18:00h [16-17].

Imobilização: Os animais foram expostos a uma temperatura média de 26°C, acondicionados em tubos de PVC compatíveis com seu tamanho, tendo a passagem de ambos os lados interrompida com fios de arame, embora permitindo a circulação livre do ar, possibilitando a respiração. Esse procedimento teve a duração de 4 horas diárias.

Imobilização e exposição ao frio: Após a imobilização, realizada como descrita anteriormente, os animais foram expostos a uma temperatura média de 7°C (geladeira) por um período de 4 horas diárias.

No modelo escolhido para o estresse variável (GEV), os animais, durante dois meses, foram expostos a um dos seguintes modelos de estresse: isolamento, exposição à luz piscante, exame da cavidade bucal, ambiente congestionado, odor de sangue e barulho uma vez ao dia, no período das 06:00 às 18:00h, [16-17].

Isolamento: Os animais foram separados, individualmente, em uma nova caixa-moradia, por um período de 24 horas, sendo mantidos com alimentação e água à vontade.

Exposição à luz piscante: Os animais permaneceram em suas caixas-moradia e foram colocados dentro de um arcabouço que impossibilitava a entrada de luminosidade. Uma lâmpada (60 watts) foi ligada dentro do ambiente estressor, fazendo com que a luz piscasse de forma intermitente (40 vezes por minuto). Esse modelo de estresse teve a duração de 4 horas.

Exame da cavidade bucal: Os animais eram pegos um a um e delicadamente imobilizados pelo pesquisador. Após alguns instantes, o animal se acalmava, e possibilitava a abertura da cavidade bucal. Então, visualizavam-se os dentes molares das ratas com auxílio de espátula nº 7.

Ambiente congestionado: Os animais foram agrupados (n=12) em uma nova caixa-moradia, por um período de 24 horas.

Odor de sangue: Dois tubos de ensaio plásticos de 5ml com pequenas perfurações na parte superior foram usados. Dentro do tubo colocou-se

sangue de rato junto com um anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetracético), de forma que se exalasse o cheiro dentro da caixa-moradia. Esse recipiente era estabilizado a fim de evitar que os ratos tivessem contato com o produto. Esse procedimento teve a duração de 4 horas.

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

Coleta de órgãos

Decorridos 60 dias do experimento, após a anestesia, a pele e a barreira abdominal foram incisadas em forma de V voltado para a cauda do animal. Procedeu-se o deslocamento das vísceras para o lado, então passou-se à coleta das glândulas adrenais, baço e fígado, e, na seqüência, estendeu-se a incisão do tórax para a traquéia, localizando a glândula timo. Todos os órgãos removidos foram pesados em balança analítica (FA2104N Bioprecisa, Ipiranga, SP, Brasil). Em ato contínuo, as maxilas foram retiradas, divididas na porção central em duas hemi-maxilas e, juntamente com todos os órgãos, fixadas em formol tamponado a 10%.

Exame histológico

As peças removidas, contendo hemi-maxila direita e esquerda, foram fixadas em formol a 10% por 48 horas. Em seguida foram descalcificadas

em EDTA por 5 semanas, sendo lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram incluídos, de maneira a permitir cortes histológicos, longitudinais no sentido mesio-distal.

Durante o processo de microtomia, cuidados foram tomados a fim de que os cortes visualizados ao microscópio permitissem identificar os 1º e 2º molares, a crista óssea interproximal, a câmara pulpar - coronária e radicular. Encontrados esses critérios, procedeu-se a obtenção de cortes seriados de 6 μm , os quais foram corados com hematoxilina e eosina.

Para análise histométrica foram selecionadas dez lâminas seriadas, nas quais necessariamente deveriam ser observados o 1º e o 2º molar, contendo polpa coronária e polpa radicular, junção amelo-cementária evidente na porção mesial do segundo molar, crista óssea interproximal e inserção conjuntiva [17]. A histometria foi realizada através da captação das imagens (microscópio trinocular, Coleman, Santo André, SP, Brasil, Modelo 200/TC, lente 4/0,10 - 160/160, acoplado a Câmara Samsung SDC-313, Coreia), e mensurada em mm, utilizando-se o "software" ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Os parâmetros da análise histométrica do presente estudo foram:

(a) distância entre a junção amelo-cementária na face mesial do segundo molar e a porção mais apical do epitélio juncional (Jac-E), estabelecida como perda de inserção histológica (figura 2).

(b) distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar (Jac-O), estabelecida como medida representativa de perda óssea (figura 2).

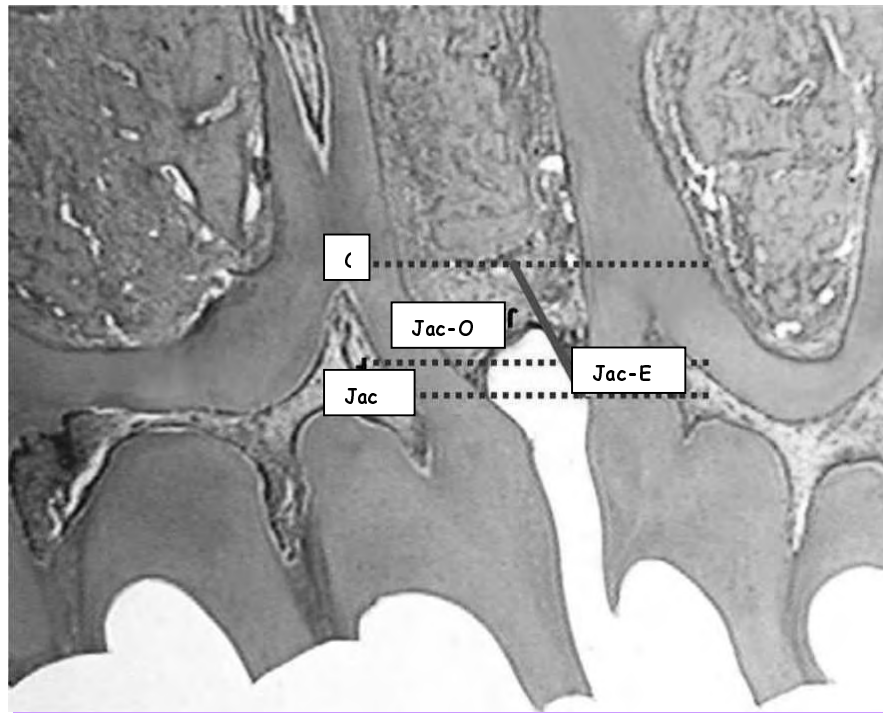


Figura 2 - Figura demonstrativa dos parâmetros de mensuração histométrica

O examinador que realizou a histometria estava cego ao estudo, sendo as lâminas codificadas por um pesquisador alheio ao trabalho.

Para confiabilidade da leitura dos dados foram realizadas calibrações intra-examinador, sendo uma prévia e outra durante a análise das lâminas. Na calibração prévia ao estudo, selecionaram-se aleatoriamente 10% do total de lâminas, sendo realizadas duas leituras com intervalo de uma

semana de diferença. Para calibragem durante a análise, a cada 10 lâminas examinadas retornava-se à primeira desse grupo de lâminas e uma nova leitura era realizada. Os dados foram submetidos ao teste T de *Student* pareado - $p < 0,05$. Ambas as calibrações não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), sendo a diferença do erro padrão da média para a calibragem prévia de 0,002 mm e 0,023 mm, e para a calibragem durante, 0,004 mm e 0,026 mm, respectivamente, para perda de inserção histológica e perda óssea histológica.

Análise dos resultados

Depois de realizadas as análises histométricas, os grupos foram identificados em: GEV, GEF, GCP, lado com indução e lado sem indução, e GCN sem indução.

Os dados obtidos nos parâmetros Jac-E e Jac-O foram agrupados e a eles aplicados o teste ANOVA (análise de variância) de uma via com análise Pós-Hoc de Bonferroni. Todos os testes tiveram um nível de significância de 5%.

O cálculo do parâmetro peso corporal foi realizado semanalmente, através da diferença entre o peso observado em cada semana em que se realizou o experimento e o peso final. As médias dos pesos dos órgãos timo, baço, adrenal e fígado dos grupos foram comparadas entre si.

Os dados obtidos em relação à massa corpórea e ao peso dos órgãos foram agrupados e neles aplicado o teste ANOVA (análise de variância) de uma via com análise Pós-Hoc (Bonferroni). Todos os testes foram analisados a um nível de significância de 5%, utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

2.6 Resultados

3.6.1) Peso de massa corporal

As médias do peso corporal não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela-3).

Tabela 3 - Média e Desvio Padrão (\pm) em gramas da diferença do peso dos animais no decorrer das semanas

Semanas	GEF		GEV		GCP		GCN	
	Média	\pm	Média	\pm	Média	\pm	Média	\pm
1	02,75 ^a	22,07	22,41 ^a	29,08	22,41 ^a	16,40	23,08 ^a	32,71
2	12,16 ^a	19,94	22,50 ^a	36,02	24,83 ^a	15,23	25,33 ^a	37,70
3	16,16 ^a	20,10	26,83 ^a	29,34	25,91 ^a	11,58	29,91 ^a	50,65
4	28,16 ^a	22,55	36,23 ^a	30,63	30,75 ^a	12,45	35,33 ^a	25,68
5	25,66 ^a	22,85	37,16 ^a	26,00	38,91 ^a	11,57	36,66 ^a	31,98
6	30,91 ^a	20,38	22,58 ^a	27,90	34,25 ^a	16,77	36,41 ^a	29,30
7	27,83 ^a	21,41	44,16 ^a	26,38	37,41 ^a	12,99	41,08 ^a	32,30

As letras na horizontal indicam semelhanças estatísticas entre os grupos (ANOVA, $p \leq 0,05$).

Resultado em gramas das médias das diferenças entre peso semanal e inicial entre os GEF, GEV, GL e GC. Não existiram diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$) em nenhum período.

3.6.2) Análise histométrica

Para os parâmetros de perda de inserção histológica e perda óssea em relação à periodontite induzida (figura 3), o GEF demonstra maior perda,

com diferenças significantes ($p < 0,05$) em ambos os parâmetros, quando comparados com os grupos *GEV*, *GCP* e *GCN* (Tabela-1).

Tabela 1 - Tabela demonstrativa dos resultados das análises histométricas.

	Lado com indução de doença				Lado sem indução de doença			
	Jac-E		Jac-O		Jac-E		Jac-O	
	Média	±	Média	±	Média	±	Média	±
Estresse Variável	0,25 ^a	0,16	0,92 ^a	0,20	0,01 ^a	0,06	0,45 ^a	0,14
Estresse Físico	0,47 ^b	0,12	1,11 ^b	0,13	0,05 ^a	0,01	0,45 ^a	0,10
Controle Positivo	0,29 ^a	0,19	0,96 ^a	0,13	0,00 ^a	0,00	0,48 ^a	0,05
Controle Negativo	0,05 ^c	0,01	0,45 ^c	0,10	0,03 ^a	0,09	0,59 ^a	0,21

Letras distintas na vertical indicam diferenças significantes entre os grupos. Médias em milímetros (mm) e desvios padrões (+) dos lados com indução de doença (direito) e sem indução de doença (esquerdo), para análise dos grupos (ANOVA, seguido por teste corretivo de Bonferroni, $p \leq 0,05$).

O *GCP* não apresentou diferenças estatisticamente significantes para os parâmetros perda de inserção histológica e perda óssea, comparado ao *GEV* ($p > 0,05$). O *GCN* demonstrou as menores distâncias histométricas, quando comparado aos demais grupos, com diferenças estatísticas significantes (Tabela-1).

As medidas obtidas do lado sem indução de periodontite (figura 4) não apresentaram diferenças estatísticas em relação às medidas dos demais grupos, para os parâmetros perda de inserção histológica e perda óssea (Tabela-1).



Figura 3 - Figura demonstrativa da periodontite induzida por ligadura no grupo de estresse físico

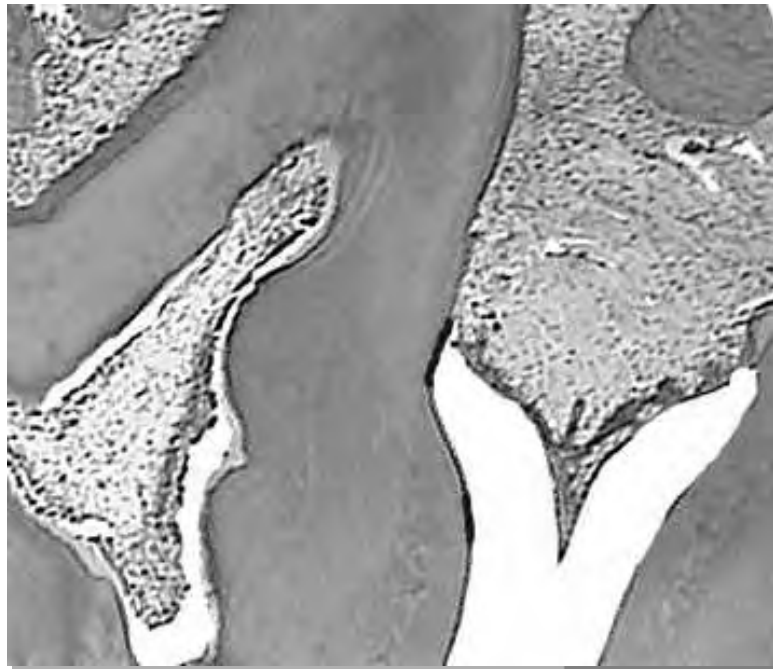


Figura 4 - Figura demonstrativa da hemi - maxila esquerda, sem indução de doença

3.6.3) Peso dos órgãos

O peso do baço não obteve diferenças significativas entre os grupos. Com relação ao peso do timo, o GEV apresentou maior aumento, quando comparado o GCP e GCN ($p < 0,05$), o GEF se apresentou maior, quando comparado ao GCP, os pesos das glândulas adrenais tiveram maior redução de peso no GEF ($p < 0,05$), quando comparados aos GCP e GCN. Analisando o peso do fígado, no GEF, constatou-se menor peso, quando comparado aos GCP e GCN ($p < 0,05$), no GEV apesar da redução do peso do fígado, inexistiram diferenças estatísticas, quando comparado com o GCN (Tabela-2).

Tabela 2 - Tabela demonstrativa da comparação entre os pesos, em gramas, dos órgãos dos animais.

	GEF		GEV		GCP		GCN	
	Média	±	Média	±	Média	±	Média	±
Baço	1,13 ^a	0,22	1,17 ^a	0,20	1,10 ^a	0,19	1,12 ^a	0,15
Timo	0,04 ^{abc}	0,008	0,04 ^{ab}	0,009	0,03 ^d	0,005	0,03 ^{cd}	0,006
Adrenal	0,09 ^a	0,01	0,10 ^{acd}	0,01	0,11 ^{bc}	0,01	0,11 ^{bd}	0,01
Fígado	7,74 ^a	1,13	8,70 ^{ac}	1,33	9,71 ^{bc}	1,35	10,23 ^b	1,60

Desvio padrão (±) seguido de letras diferentes na horizontal indicam diferenças estatísticas significativas entre os grupos (ANOVA, seguido por teste corretivo de Bonferroni, $p \leq 0,05$). Pesos úmidos em gramas. Peso da adrenal corresponde às duas Glândulas.

2.7 Discussão

Frente a uma mesma quantidade de microrganismos, estudos epidemiológicos têm demonstrado que uma pequena parcela da população apresenta grande quantidade de perda de inserção, seguida de perda precoce dos dentes, enquanto a maioria da população apresenta velocidade lenta de perda de inserção, seguida por uma menor perda de dentes ao longo da vida [22-23]. Portanto, muitos fatores ambientais parecem estar ligados à perda de inserção periodontal, dentre eles os fatores sócios - econômicos, a idade, o diabetes e o uso do cigarro [3, 6, 24-25].

Embora controversos, estudos epidemiológicos têm demonstrado relação entre doenças emocionais e a periodontite [5-8]. Neste contexto, trabalhos em animais são importantes auxiliares na compreensão dos eventos biológicos, colaborando na plausibilidade de futuros trabalhos.

O resultado do presente trabalho, quanto à indução de doença para o GEF, mostrou maior perda, com diferença significativa, se comparado ao GCP e GEV, para os parâmetros perda de inserção histológica e perda óssea. Resultados de destruição periodontal também foram relatados por outros autores nos parâmetros de perda de inserção histológica e óssea [20], em

áreas de furca [15] e mensuração morfométrica [26], quando utilizado estresse de contenção associado à colocação de ligadura.

Quando animais são submetidos a estresse de pequena intensidade parecem existir efeitos protetores ao invés de destrutivos [18-19]. Susin e Rösing [16] e Semenoff-Segundo et al. [17], aplicando um modelo de estresse variável, sugerem existir certa "proteção" ao periodonto, o que corrobora os resultados apresentados neste trabalho e nesta metodologia de estresse. A tentativa de proteger a progressão da periodontite em ratos foi objeto de dois estudos de Breivik et al. [11, 27]. Em ambos, administraram-se medicamentos, como a dexametasona e tianeptine (antidepressivo), mostrando uma menor progressão de periodontite e modulando o eixo HPA.

Uma hipótese sobre divergência dos resultados obtidos em estudos sobre o assunto, reside na metodologia de ativação do eixo HPA e da interpretação da resposta periodontal. Embora os modelos clínicos e radiográficos sejam uma boa alternativa, avaliações histológicas qualitativas de eventos celulares e teciduais, associados à quantificação de destruição do periodonto, parecem ser a alternativa que produz informações mais completas [15, 20]. Neste estudo, a escolha dos parâmetros de mensuração histométrica de destruição no periodonto foi considerada pela relevância clínica estabelecida na periodontia [28]. Portanto, para que a análise

histológica do presente trabalho fosse efetiva e reproduzível, cuidados quanto à padronização, seleção dos cortes, cegamento do examinador à leitura das lâminas e à calibragem foram tomados assim divergências nestes padrões poderiam explicar os diferentes resultados encontrados na literatura [29].

Com relação à ativação do eixo HPA, os modelos de aplicação do estresse também têm influência nos resultados, tanto é que, no estresse físico, ocorreu uma maior progressão da periodontite, enquanto no estresse variável, houve uma tendência de proteção.

Na doença periodontal o estresse entra como um fator ambiental, conduzindo a modificação do padrão de resposta aos microrganismos, influenciados pelos fatores genéticos [30]. Pelos achados de trabalhos que estudam as vias do estresse [14], seria coerente acreditar que no presente trabalho tenha ocorrido uma resposta do complexo de histocompatibilidade classe-2 (MHC) no periodonto, ativando as células Th1 e Th2. A resposta Th1, possivelmente, estaria ligada ao modelo de estresse variável e Th2, ao modelo de estresse físico. A resposta Th1 tem sua fase efetora através do estímulo de macrófagos ligados a uma estabilização da periodontite [13-14]. A resposta Th2 ativa os plasmócitos a produzirem interleucinas e enzimas, como as metaloproteinases, capazes de destruir os componentes do periodonto, produzindo maior periodontite [12-13, 31].

A escolha da linhagem Wistar e do modelo de estresse deu-se por haver padrões variados de respostas do eixo HPA, o que acaba se assemelhando, em parte, aos seres humanos, que reagem de forma diferente frente aos estímulos da vida diária [14, 16-17].

O lado sem indução de doença não apresentou perda de inserção histológica e óssea em nenhum dos grupos, corroborando com os resultados encontrados na literatura [15, 20]. Entretanto, Breivik et al. [14] e Semenoff-Segundo et al. [17] encontraram uma migração do epitélio juncional para apical frente a estímulos do eixo HPA, sem qualquer indução de doença. Estas divergências de resultados poderiam ser atribuídas ao modelo de ativação do eixo HPA que variou entre os experimentos. Somados a este fato, sabe-se que o funcionamento do eixo neuroendócrino-imunológico tem muitos pontos obscuros, necessitando de mais tempo para reprodução de novos trabalhos e possíveis ajustes.

O modelo desenvolvido no presente experimento possibilitou demonstrar, através da análise da saúde sistêmica, que os animais foram estressados [32-33]. O fígado é um órgão muito importante na resposta imuno-inflamatória do organismo [32, 34]. Através de estímulos químicos, físicos ou emocionais, inicia-se uma cascata de eventos a partir da IL1, FNT e glicocorticóides, capazes de estimularem a produção de diversas proteínas, como a proteína C-reativa e o fibrinogênio. Estas substâncias são

importantes como marcadores de doenças como a cardiopatia, estimulantes de fagocitose, amplificadores da resposta inflamatória, ativadores da via clássica do sistema complemento, inibidores de crescimento de células de tumor metastático, moduladores da função dos polimorfonucleares e estimulantes da cicatrização.

Os resultados deste estudo demonstram que o fígado foi comprometido com perda de peso nos dois modelos de estresse crônico, o que evidencia um fator importante sobre a efetividade do modelo de estresse aplicado, corroborando com os achados de Selye [35].

O timo e as glândulas adrenais trabalham em sinergismo, de modo que, existindo alteração em uma delas, ocorre modificação de suas funções [35-36]. Nesse trabalho o peso do timo e o peso das glândulas adrenais tiveram resultados antagônicos aos demonstrados em outros estudos que analisaram a associação entre o estresse e a periodontite em ratos, provavelmente este fato tenha ocorrido pelo modelo de estresse crônico optado [15, 20, 26].

A grande diferença desse trabalho foi o tempo de 60 dias de estresse, a que estiveram submetidos os animais, além da indução da doença ocorrer depois de 10 dias do início do ensaio, o que poderia ter induzido a um resultado antagônico aos mostrados por outros autores [15-17, 26]. Buscou-se um prolongamento do modelo de estresse por correlacionar pacientes

submetidos à longa carga de estresse, como por exemplo, executivos de grandes empresas e presidiários [37-38]. A periodontite é uma doença com capacidade de induzir a uma resposta sistêmica no organismo [26, 39-40], logo, o que pode ter ocorrido, é um estímulo da resposta imuno-inflamatória, produzindo alta quantidade de células T pelo timo e pouca quantidade de adrenalina e cortisona, gerando aumento no peso do timo e diminuição do peso das glândulas adrenais sem diferenças estatísticas nos dois modelos de estresse utilizados. Este fator pode ocorrer quando o estímulo de estresse crônico é mantido por longos períodos [12].

A manutenção do peso corporal total, em todos os grupos, sem diferença estatística, comparado ao controle negativo, sugere que o peso corporal dos animais foi determinado como forma de análise de saúde sistêmica, a qual é utilizada por diversos autores [33]. Nos resultados do presente estudo, houve ausência de significância estatística em relação ao peso corporal, durante e ao final do experimento. Outros estudos semelhantes, associando periodontite induzida por ligadura em ratos e estresse, encontraram diferenças estatísticas, demonstrando menor peso dos animais estressados [15, 26]. Este dado pode sinalizar um alto padrão de estresse, produzindo uma grande quantidade de IL1 e FNT, que são capazes de induzir o eixo HPA a diminuir a vontade de alimentar-se. Esta

situação reforça a premissa de que os animais chegaram ao final do estudo em bom estado de saúde.

Alguns pontos em relação ao estresse começam a ser compreendidos. Entretanto, o eixo neuroendócrino-imunológico é complexo e em muitos aspectos desconhecido, sendo assim, necessários estudos epidemiológicos longitudinais, estudos em animais e ensaios clínicos para melhor compreender esta questão.

2.8 Conclusão

Dentro dos limites deste trabalho, conclui-se que o estresse físico proporcionou maior destruição da periodontite induzida.

2.9 Referências

- [1] Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005;38:135-87.
- [2] Baelum V. The epidemiology of destructive periodontal disease. Causes, paradigms, problems, methods and empirical evidence. Aarhus, Denmark, Royal Dental College Faculty of Health Sciences University of Aarhus 1998, 189pp. Thesis.
- [3] Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 1996;67:1041-49.
- [4] Monteiro da Silva AM, Newman NH, Oakley DA. Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 1995;22:516-26.
- [5] Castro GD, Oppermann RV, Haas AN, Winter R, Alchieri JC. Association between psychosocial factors and periodontitis: A case-control study. *J Clin Periodontol* 2006;33:109-14.
- [6] Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Todesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal

² Artigo escrito nas normas da Revista Acta Ontont Scand - Anexo B

- disease. *J Periodontol* 1999;70:711-23.
- [7] Solis AC, Lotufo RF, Pannuti CM, Brunheiro EC, Marques AH, Lotufo-Neto F. Association of periodontal disease to anxiety and depression symptoms, and psychosocial stress factors. *J Clin Periodontol* 2004;31:633-38.
- [8] Moss ME, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Gary W, Genco RJ, Mathei EE, Tedesco LA. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 1996;67:1060-69.
- [9] Anisman H, Baines MG, Berczi, I, Bernstein CN, Blennerhassett MG, Gorczynski RM, et al. Neuroimmune Mechanisms in Health and Diseases: 1. Health. *CMAJ* 1996;155:867-74.
- [10] Reiche EMV, Nunes SOV, Morimoto HK. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lanted Oncol* 2004;5:617-25.
- [11] Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibits ligature-induced periodontitis in adults rats. *J Periodontol Res* 2006;41:23-32.
- [12] Elenkov IJ, Chrousos GP. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *Trend Endocrinol Metab* 1999;10:359-68.

- [13] Gammell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontology* 2000 2004;35:21-41.
- [14] Breivik T, Thrane PS. Psychoneuroimmune interactions in periodontal disease. In: Alder R, Felten DL, Cohen N, editors. *Psychoneuroimmunology*. San Diego: Academic Press. 3rd ed. 2000. p.627-44.
- [15] Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004;75:306-15.
- [16] Susin C, Rösing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2003;61:273-77.
- [17] Semenov-Segundo A, Henneman C, Fontanela VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007;9:26-31.
- [18] Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 2006;141:907-15.

- [19] Moynihan JA. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003;17Suppl1:S11-S16.
- [20] Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci* 2002;110:125-29.
- [21] Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Berhling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontol Res* 1982;17:263-74.
- [22] Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986;13:431-40.
- [23] Baelum V, Fejerskov O, Manji F. Periodontal disease in adult Kenyans. *J Clin Periodontol* 1988;15:445-52.
- [24] Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disease in non-insuline-dependent diabetes Mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123-30.
- [25] Susin C. Periodontal diseases in representative urban population in south Brazil. Bergen, Norway: University of Bergen, 2004, 46pp. Thesis.
- [26] Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Umemoto T, et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodontol Res* 2006;46:527-34.

- [27] Breivik T, Gundersen Y, Opstad PK, Fonnum F. Chemical sympathectomy inhibits periodontal disease in Fischer 344 rats. *J Periodontol Res* 2005;40:325-30.
- [28] Ramfjord, SP. Indices for prevalence and incidence of periodontal disease. *J Periodontol* 1959;30:51-59.
- [29] Altman DC. Designing research. In: Altman DC editors. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman & Hall; 2nd ed. 1991. p74-103.
- [30] Page CR, Korman KS. The Pathogenesis of Human Periodontitis: An Introduction. *Periodontology* 2000 1997;14:9-11.
- [31] Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontol Res* 1995;30:23-33.
- [32] Chrousos, GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995;332:1351-61.
- [33] Forbes NF, Stewart CA, Matthews K, Reid IC. Chronic mild stress and sucrose consumption: validity as a model of depression. *Physiol Behav* 1996;60:1481-84.
- [34] Ebersole JL, Cappelli D. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology* 2000 2000;23:19-49.

- [35] Selye H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol* 1946;6:117-230.
- [36] Selye H. Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxication. *Br J Exp Pathol* 1936;17:234-48.
- [37] Fazel S, Danesh J. Serious mental disorder in 23000 prisoners: A systematic review of 62 surveys. *The Lancet* 2002;359:545-50.
- [38] Freeman R, Goss S, Stress measures as predictors of periodontal disease - A preliminary communication. *Community Dent Oral Epidemiol* 1993;21:176-177.
- [39] Ivanyi L, Lehner T. Stimulation of lymphocyte transformation by bacterial antigens in patients with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 1970;15:1089-96.
- [40] Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: Inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* 1998;3:108-120.

3 Capítulo 2

**Efeito do estresse crônico na gravidez, interferindo
na progressão de periodontite induzida na prole: estudo
histométrico em ratos**

3.1 RESUMO

Objetivo: Trabalhos em diversas áreas da saúde vêm mostrando que o estresse durante a gravidez pode alterar a suscetibilidade dos filhos na idade adulta. Buscou-se usar o estresse crônico durante a fase de gestação em ratas da linhagem Lewis, com o objetivo de avaliar histometricamente uma possível progressão de periodontite em sua prole na fase adulta.

Métodos: Após confirmação da gravidez, as ratas foram divididas, através de sorteio, em dois grupos: grupos das mães estressadas e grupo das mães não-estressadas. As ratas do grupo das mães estressadas passaram a receber ensaio de estresse crônico (contenção associada à exposição ao frio), entre o sétimo e o décimo oitavo dia gestacional. Após o nascimento, escolheram-se 12 ratos machos provenientes das mães estressadas (GI) e 12 ratos machos provenientes das mães não-estressadas (GII). Ao atingirem 250 gramas de peso corporal, foi acondicionada uma ligadura em volta do segundo molar superior direito de cada animal, servindo o lado esquerdo como controle. Decorridos 60 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por excesso de anestésico. Após processamento laboratorial de rotina, realizaram-se a digitalização e a mensuração histométrica das imagens, usando-se dois parâmetros: perda de inserção histológica e perda

óssea. **Resultados:** No lado com indução de doença, o GI mostrou maior perda de inserção histológica e perda óssea, quando comparada com o GII. No lado controle sem indução de doença, os dois grupos mantiveram-se sem alterações. **Conclusão:** O estresse crônico em ratas prenhas da linhagem Lewis, conduziu à maior progressão de periodontite induzida na prole na fase adulta.

Palavras chaves: Periodontite, Gravidez, Lewis, Estresse

3.2 Abstract

Objective: Works in diverse health areas have demonstrated that stress during pregnancy can alter the susceptibility of the offspring in adult life. Chronic stress was used during the pregnancy phase in rats, with the objective of evaluating the possible progression of periodontitis induced in the offspring when adult. **Methods:** After confirmation of pregnancy, female LEW strain rats were randomly divided into two groups: stressed dams and nonstressed dams. The stressed dams group was subjected to chronic stress, immobilization associated with exposure to cold, during the second and third gestational periods. After birth, 12 male pups originating from stressed dams (GI) and another 12 originating from nonstressed dams (GII) were selected. After reaching 250 g of body weight, a suture thread ligature was placed around the upper right second molar of each rat, with the left side serving as control. After 60 days the rats were submitted to euthanasia by excess anesthesia. Following routine laboratory processing, the digitalization and measurement of the sample slices was realized using two parameters: loss of histological insertion and bone loss. **Results:** On the ligature side, GI showed greater loss of histological insertion compared to GII, whereas on the control side, both groups showed no alterations.

Conclusion: Chronic stress in pregnant LEW strain rats led to greater periodontitis progression in the offspring during the adult phase.

Key words: Periodontitis, Inbred, Lew, Pregnancy.

3.3 Introdução

O efeito do estresse químico, físico ou emocional em ratas, durante a gravidez, tem sido motivo de estudo por diversas áreas do conhecimento, que vem demonstrando uma alteração no padrão de funcionamento do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) das mães e da progênie de mães submetidas a ensaios de estresse crônico (1, 2, 3, 4).

Os mecanismos de entendimento do estresse ainda são controversos e de difícil compreensão. Fujioka et al. (5) estudaram o efeito de dois modelos de estresse em ratas prenhes, sendo um de baixa intensidade e outro de alta intensidade. Seus resultados demonstram um fator modulador estimulante das estruturas do hipocampo e seus receptores diante do estresse de baixa intensidade e um fator modulador de supressão perante o de alta intensidade. As conseqüências dessas mudanças refletem uma maior ou menor susceptibilidade a diversas doenças (6).

Sabe-se, nos dias atuais, que o sistema nervoso, sistema endócrino e sistema imunológico trabalham integrados. Estímulos externos ou internos

³ Artigo escrito nas normas da Revista Journal of Periodontal Research - Anexo C

ativam neurotransmissores, neuropeptídios, células inflamatórias e interleucinas que desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares e extracelulares capazes de interferir no processo saúde-doença nos seres humanos (6,7). Na busca de uma compreensão desta cascata de eventos biológicos, os ratos endogâmicos tornam-se uma alternativa. Estes animais têm padrões específicos de forte ou fraca ativação do eixo neuroendócrino-imunológico, o que determina uma maior ou menor susceptibilidade a doenças infecciosas ou de caráter genético (8). Em relação à doença periodontal, a utilização destes animais também demonstrou uma maior progressão de periodontite induzida nos ratos de forte ativação do eixo HPA - ratos Fischer - e menor progressão de periodontite induzida nos ratos de baixa ativação do eixo HPA - ratos Lewis - (8, 9).

Estudos epidemiológicos ainda são controversos, no que se refere à ligação entre doenças de ativação do eixo HPA e parâmetros clínicos de saúde periodontal (10, 11, 12, 13). Embora os trabalhos em animais sejam uma boa alternativa para compreender problemas do estresse na gravidez e suas conseqüências nos filhos, o efeito do estresse crônico na progressão da doença periodontal em ratos ainda é um assunto discutido e inconclusivo.

Em alguns estudos o estresse conduz a uma maior progressão de periodontite (14), em outros, parece evitar a progressão da mesma (15, 16), e ainda há os que não revelam diferenças (17).

Estudando-se o efeito de lipopolissacarídeos injetados em ratos endogâmicos recém-nascidos, Breivik et al. (8) observaram uma maior progressão de periodontite nestes animais, quando a doença foi induzida por ligadura na fase adulta. Estes resultados demonstraram modificação no padrão de resposta do hospedeiro, como consequência de uma maior ativação do eixo HPA, ocasionando maiores perdas das estruturas periodontais dos ratos na fase adulta. Estes resultados sugerem que, ratas endogâmicas da linhagem Lewis, frente a estímulos estressores, dão origem a filhotes mais sensíveis a mudanças neuroendócrinas (8).

Embora o modelo experimental de estresse durante a gravidez com influências nas respostas da prole na idade adulta tenha sido bem estabelecido em várias áreas médicas (1, 2, 3, 4, 5), com relação à doença periodontal ainda carece de informações.

3.4 Proposição

O presente estudo tem por objetivo analisar histometricamente o efeito do estresse crônico, em ratas endogâmicas grávidas, na progressão de periodontite induzida, em sua progênie, na idade adulta.

3.5 Material e método

Para o presente experimento foram selecionados 15 ratos (10 fêmeas e 5 machos) da espécie *Rattus norvegicus* endogâmicos Lewis, mantidos com ração balanceada e água *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, temperatura controlada de 23°C e umidade de $\pm 50\%$. Os mesmos passaram por uma adaptação ao novo ambiente durante 10 dias. O experimento foi registrado e aprovado pelo comitê de ética na experimentação animal da Faculdade de Odontologia "Júlio de Mesquita Filho" Câmpus Araçatuba (Anexo A)

Delineamento do estudo

Após atingirem três meses de idade, os animais foram colocados para reprodução na proporção de duas fêmeas para um macho. Confirmada a gravidez através da técnica do esfregaço vaginal, aguardou-se um período de sete dias, dividindo-se as ratas, através de sorteio, em dois grupos: grupo das mães estressadas e grupo das mães não-estressadas. O grupo de mães não-estressadas foi mantido sem qualquer procedimento. No grupo das mães estressadas, a partir do sétimo dia de gravidez, iniciou-se ensaio de estresse, através da contenção física associada à exposição ao frio. Para

tanto, as ratas foram delicadamente embutidas em canos (PVC) compatíveis com seu tamanho e imediatamente expostas ao frio de 7°C (geladeira), por duas horas ininterruptas, uma vez ao dia, variando no período das 06:00h às 18:00h, durante 11 dias (4, 5). Ocorrido o nascimento padronizou-se o número de 8 animais por cada mãe. Após as fases de crescimento, desmama e a separação por sexo, separou-se, aleatoriamente, 24 animais machos, constituídos em dois grupos: grupo I - filhos das mães estressadas (n=12) e grupo II - filhos das mães não-estressadas (n=12). Ao atingirem 250 gramas de peso corporal, com idade de 2 meses e meio, iniciou-se a indução da doença periodontal (18).

Todos os procedimentos de indução de doença periodontal foram realizados sob anestesia geral, por meio da administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de cetamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) -50mg/ml-, associado a 0,05 ml de cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP. Brasil) -2 gramas por cada 100ml- para cada 100 gramas de peso corporal. Para a indução da doença periodontal, um fio de seda estéril número 4 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) foi utilizado para realização de ligadura em volta do segundo molar superior direito de cada animal, servindo o segundo molar superior esquerdo como controle (18, 19). Decorridos 60 dias após a colocação da ligadura, os animais foram submetidos à eutanásia por dose

excessiva de anestésico - administração intramuscular de cloridrato de cetamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil) - (figura-1).

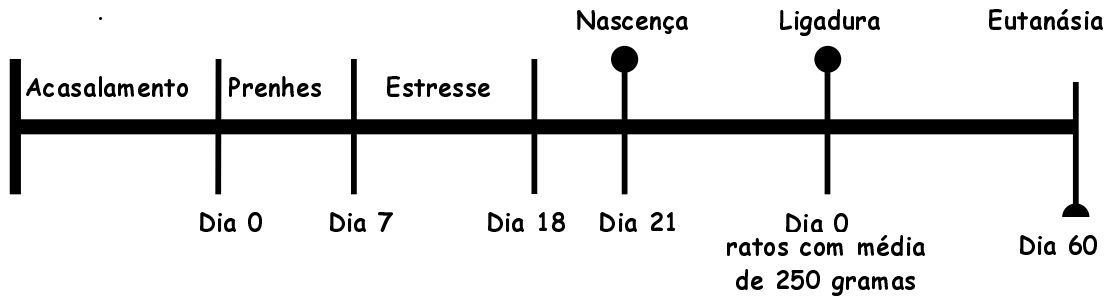


Figura 1 - Figura demonstrativa do delineamento do trabalho

Exame histológico

As peças removidas, contendo hemi-maxilas direita e esquerda, foram fixadas em formol a 10% por 48 horas. Em seguida foram descalcificadas em ácido nítrico a 5% por um período de 2 semanas, sendo lavadas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Os blocos foram incluídos, de maneira a permitir cortes histológicos, longitudinais no sentido méso-distal. Durante o processo de microtomia, cuidados foram tomados, a fim de que os cortes visualizados ao microscópio permitissem identificar os 1º e 2º molares, a crista óssea interproximal, a câmara pulpar coronária e a radicular. Encontrados esses critérios, procedeu-se à obtenção de cortes seriados de 6 μ m, os quais foram corados com hematoxilina e eosina.

Para a análise, foram selecionadas dez lâminas seriadas, nas quais necessariamente deveriam ser observados o 1º e o 2º molar, contendo polpa coronária e polpa radicular, junção amelo-cementária evidente na porção mesial do segundo molar, crista óssea interproximal e inserção conjuntiva (15). A histometria foi realizada através da captação das imagens (Microscópio trinocular, Coleman, Santo André-SP, Modelo 200/TC, lente 4/0,10 - 160/160, acoplado a Câmara Samsung SDC-313, Coreia), e mensurada em mm, utilizando-se o "software" ImageLab 2000 (Diracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil). Os parâmetros da análise histométrica do presente estudo foram:

(a) distância entre a junção amelo-cementária na face mesial do segundo molar e a porção mais apical do epitélio juncional (Jac-E), estabelecida como perda de inserção histológica.

(b) distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar (Jac-O) estabelecida como medida representativa de perda óssea histológica.

O examinador que realizou a histometria estava cego ao estudo, sendo as lâminas codificadas por um pesquisador alheio ao trabalho.

Para confiabilidade da leitura dos dados foram realizadas calibrações intra-examinador, sendo uma prévia e outra durante a análise das lâminas. Na calibragem prévia ao estudo, selecionaram-se aleatoriamente 25% do

total de lâminas, sendo realizadas duas leituras com intervalo de uma semana de diferença. Para calibragem durante a análise, a cada 10 lâminas examinadas retornava-se à primeira desse grupo de lâminas analisadas e uma nova leitura era realizada. Os dados foram submetidos ao teste T de *Student* pareado com nível de significância de 5%. Ambas as calibrações não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$), sendo a diferença do erro padrão da média para a calibragem prévia de 0.004 mm e 0.002 mm, e para a calibragem durante a análise, de 0,011 mm e 0,022 mm, respectivamente, para perda de inserção histológica e perda óssea histológica.

Análise dos resultados

Depois de realizadas as análises histométricas, os grupos foram identificados em: filhos das mães estressadas, lados com indução e sem indução (Grupo I) e filhos das mães não estressadas, lados com indução e sem indução (Grupo II).

Os dados obtidos foram agrupados nos parâmetros Jac-E e Jac-O e neles aplicado o teste *T* para amostras independentes para análise dos resultados. Todos os testes foram analisados a um nível de significância de 5%, utilizando-se o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

3.6 Resultados

No lado com indução de doença (Figura 2), o Grupo I mostrou maior perda de inserção histológica ($p = 0,001$) e perda óssea ($p = 0,015$), com diferença significativa comparado ao Grupo II (Tabela-1).

Tabela 1. Resultados das análises histométricas em mm do lado direito com indução de doença.

Maxila direita				
	GRUPO I	GRUPO II	Valor do P	N
Jac-E	0,44 ± 0,14	0,20 ± 0,05	0,001	12
Jac-O	0,85 ± 0,26	0,62 ± 0,08	0,015	12

Grupo I - filhos das mães estressadas e Grupo II - filhos das mães não estressadas (teste T de Student para amostras independentes). Jac-E distância da junção amelo-cementária ao epitélio. Jac-O distância da junção amelo-cementária ao osso.

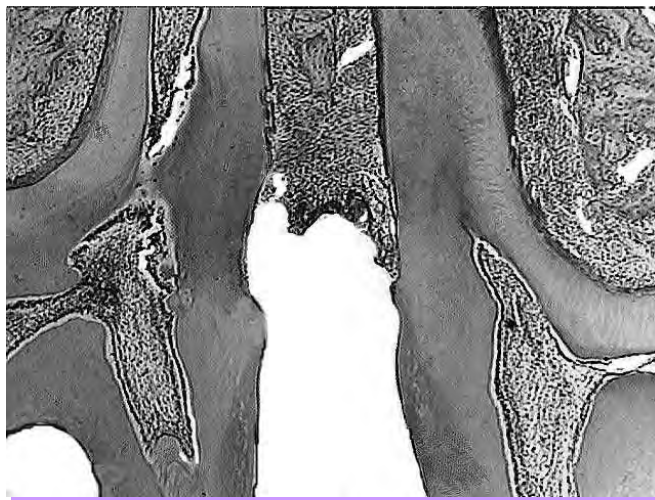


Figura 2 - Figura demonstrativa da histometria da perda de inserção histológica e óssea dos filhos das mães estressadas.

No lado sem indução de doença (figura 3), os parâmetros de perda de inserção histológica e perda óssea não demonstraram diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$) entre os grupos I e II (Tabela-2).

Tabela 2. Resultados das análises histométricas em mm do lado esquerdo sem indução de doença.

Maxila esquerda				
	GRUPO I	GRUPO II	Valor do P	N
Jac-E	0,000 \pm 0,001	0,003 \pm 0,003	0,83	12
Jac-O	0,420 \pm 0,090	0,400 \pm 0,060	0,46	12

Grupo I - filhos das mães estressadas e Grupo II - filhos das mães não estressadas (teste T de Student para amostras independentes). Jac-E distância da junção amelo-cementária ao epitélio. Jac-O distância da junção amelo-cementária ao osso.



Figura 3 - Figura demonstrativa da histometria da maxila esquerda, : indução de doença.

3.7 Discussão

Diversas especialidades médicas, como cardiologia, pediatria, neurologia, psicologia e outras mais vêm demonstrando que o estímulo do eixo HPA durante a prenhes ou em idade precoce influencia o desenvolvimento das respostas neuroendócrinas de animais na idade adulta (4, 20, 21, 22, 23, 24), resultado confirmado neste trabalho. Possivelmente, em relação aos filhos das mães estressadas, ocorreram modificações nas estruturas do eixo HPA, devido à grande quantidade de glicocorticóide gerada no ensaio de estresse crônico durante a prenhes. Os produtos gerados pelo estímulo nessas fases são fontes geradoras de modificações estruturais na formação eixo HPA (5), o que, frente ao estímulo da indução de periodontite na idade adulta, resultou em maior destruição do periodonto.

Os mecanismos que possivelmente conduziram a um efeito mais destruidor da periodontite, neste trabalho, ligam-se a mudanças das respostas do eixo neuroendócrino-imunológico. Quando estimulada, a adeno-hipófese produz uma grande quantidade do hormônio adeno-corticotrópico (ACTH), desencadeando uma ampla produção de cortisona pela glândula adrenal. Este neurohormônio estimula as células helper Th2, que, por sua

vez, ativam vários componentes, dentre eles, as metaloproteinases, capazes de destruírem o periodonto (9, 14, 18, 24, 25, 26, 27).

O raciocínio do efeito do eixo HPA, interferindo na progressão da periodontite, confirma-se, com a possibilidade de maior ativação do sistema nervoso central (SNC) em conduzir à maior destruição no periodonto (8). Apesar da plausibilidade construída, os resultados sobre o estresse ainda são controversos.

Breivik et al. (24) injetaram lipopolissacarídeos em ratos recém-nascidos da linhagem Lewis, com baixa reatividade do eixo HPA. Seus resultados comprovaram as mudanças geradas no eixo neuroendócrino, com maior destruição do periodonto. Gaspersic et al. (14), utilizando diferentes modelos de ativação do eixo, utilizando o estresse por contenção de 2,5h e de 12h, observaram maior progressão de periodontite em ambos os tempos experimentais.

Em experimento com ratos, utilizando glicocorticóide e antidepressivos Breivik et al. (16) observaram que a administração destes fármacos evitou a progressão de periodontite, tanto em ratos de linhagem endogâmica como de linhagem não endogâmica.

Diferente dos trabalhos supracitados, Benatti et al., estudando o efeito do estresse associado à nicotina, não encontraram diferenças entre o grupo controle positivo (somente indução de periodontite) e o grupo

estressado (17), assim observa-se uma tendência nos trabalhos atuais de buscar uma compreensão do processo de modulação do eixo HPA na tentativa de maior conhecimento nesta área.

Embora a doença periodontal seja um processo infecto-inflamatório iniciado por uma organização de microrganismos (28, 29) estes são capazes de conduzir o periodonto a destruir-se ou estabilizar-se (30, 31, 32) o que poderia estar ligado à mudança do padrão de resposta dos indivíduos influenciados por problemas de origens emocionais (28). Contudo vários trabalhos na área da epidemiologia têm mostrado resultados controversos. Alguns estabelecem uma relação de risco entre estresse e piora nos indicadores de saúde periodontal (10, 11, 33, 34, 35, 36), e outros, não (12, 13). Neste contexto, estudos em ratos podem controlar muitos vieses e facilitar o entendimento de muitas questões que envolvam a biologia do sistema.

Portanto, no presente experimento, optou-se por essa metodologia de estresse durante a gravidez por ser bem referenciada na literatura, mostrando vários grupos de pesquisa nas mais diferentes áreas da saúde, sendo capazes de modificar o padrão de respostas do eixo HPA, diagnosticado de diferentes formas (4, 5, 23, 37, 38, 39, 40, 41).

Estudos em animais facilitam a compreensão dos mecanismos da etiopatogenia da doença, além de controlar vieses como os fatores

ambientais e a maior complexidade da fisiologia do ser humano. Neste mister, mais trabalhos nessa área da periodontia, buscando-se uma confirmação desses resultados, são importantes para se compreender melhor os mecanismos complexos de patogênese do estresse, influenciando uma maior ou menor progressão da doença periodontal em filhos das mães estressadas.

3.8 Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo, pôde-se concluir que, ratos adultos, filhos de mães submetidos a estresse apresentaram maior progressão de periodontite induzida por ligadura.

3.9 Referências

1. Estanislau C, Morato S. Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *Int J Dev Neurosci* 2006; **24**: 255-262.
2. Hansen-Trench LS, Barron S. Effects of neonatal alcohol and/or cocaine exposure on stress in juvenile and adult female rats. *Neurotoxic and Teratol* 2005; **27**: 55-63.
3. Stefanski V, Raabe C, Schulte M. Pregnancy and social stress in female rats: Influences on blood leukocytes and corticosterone concentrations. *J Neuroimmunol* 2005; **162**: 81-88.
4. Koenig JI, Elmer GI, Shepar PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, et al. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 2005; **156**: 251-261.
5. Fujioka A, Fujioka T, Ishida Y, Maekawa T, Nakamura S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 2006; **141**: 907-915.

⁴ Artigo escrito nas normas da revista Journal of Periodontal Research - Anexo B

6. Moynihan JA. Mechanisms of stress-induced modulation of immunity. *Brain Behav Immun* 2003; **17**Suppl1: S11-S16.
7. Anisman H, Baines MG, Berczi, I, Bernstein CN, Blennerhassett MG, Gorczynski RM, et al. Neuroimmune mechanisms in health and diseases: 2. Disease. *Can Med Assoc J* 1996; **155**: 1075-1082.
8. Breivik TJ. Brain-Neuro-Endocrine-Immune Interactions in Periodontal Disease. Oslo, Norway: University of Oslo, 2002, 62pp. Thesis.
9. Breivik T, Thrane PS. Psychoneuroimmune interaction in periodontal disease. In: Alder R, Felten DL, Cohen N eds. *Psychoneuroimmunology*. San Diego. CA: Academic Press 3rd edition. 2000: 627-644.
10. Moss ME, Beck JD, Kaplan BH, Offenbacher S, Weintraub JA, Koch GG et al. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol* 1996; **67**: (10 Suppl): 1060-1069.
11. Genco RJ, Ho AW, Grossi SG, Dunford RG, Todesco LA. Relationship of stress, distress, and inadequate coping behaviors to periodontal disease. *J Periodontol* 1999; **70**: 711-723.
12. Solis AC, Lotufo RF, Pannuti CM, Brunheiro EC, Marques AH, Lotufo-Neto F. Association of periodontal disease to anxiety and depression symptoms, and psychosocial stress factors. *J Clin Periodontol* 2004; **31**: 633-638.

13. Castro GD, Oppermann RV, Haas AN, Winter R, Alchieri JC. Association between psychosocial factors and periodontitis: a case-control study. *J Clin Periodontol* 2006; **33**: 109-114.
14. Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci* 2002; **110**: 125-129.
15. Semenoff-Segundo A, Henneman K, Fontanella VRC, Rösing CK. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Inter Acad Periodontol* 2007; **9**: 26-31.
16. Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and tianeptine treatment inhibits ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodont Res* 2006; **41**: 23-32.
17. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontol Res* 2003; **38**: 351-353.
18. Breivik T, Sluyter F, Hof M, Cools A. Differential susceptibility to periodontitis in genetically selected Wistar rat lines that differ in their behavioral and endocrinological response to stressors. *Behav Genetics* 2000; **30**: 123-130.

19. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Berhling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodont Res* 1982; **17**: 263-274.
20. MacDolnad TJ, Franko KL, Brown JM, Jenkins SL, Nathanielsz PW, Nijland MJ, et al. Betamethasone in the last week of pregnancy causes fetal growth retardation but not adult hypertension in rats. *J Soc Gynecol Investig* 2003; **10**: 469-473.
21. Moss TJ, Nitsos I, Harding R, Newnham JP. Differential effects of maternal and fetal betamethasone injections in late-gestation fetal sheep. *J Soc Gynecol Investig* 2003; **10**: 474-479.
22. Özkan KU, Özokutan BH, İnanç F, Boran Ç, Kilingç M. Does maternal nicotine exposure during gestation increase the injury severity of small intestine in the newborn rats subjected to experimental necrotizing enterocolitis. *J Pediatric Surgery* 2005; **40**: 484-488.
23. Samuelsson AM, Öhrn I, Dahlgren J, Eriksson E, Angelin B, Folkow B, et al. Prenatal exposure to interleukin-6 results in hypertension and increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult rats. *Endocrinology* 2004; **145**: 4897-4911.
24. Breivik T, Stephan M, Brabant GE, Straub RH, Pabst R, von Hörsten S. Postnatal lipopolysaccharide-induced illness predisposes to periodontal disease in adulthood. *Brain Behav Immun* 2002; **16**: 421-438.

25. Takada T, Yoshinari N, Sugiishi S, Kawase H, Yamane T, Noguchi T. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* 2004; **75**: 306-315.
26. Figueredo MS. Hyperreactive Neutrophils: A Mechanism of Tissue Destruction in Periodontitis. Stocolm, Denmark: Institute of Karolinska, 1999. 58pp. Thesis.
27. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction *in vivo*: role of active enzyme in human periodontitis. *J Periodontol Res* 1995; **30**: 23-33.
28. Page CR, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology 2000* 1997; **14**: 9-11.
29. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology 2000* 2005; **38**: 9-12.
30. Löe H, Änerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan tea laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol* 1986; **13**: 431-445.
31. Baellum V, Fejerskov O, Manji F. Periododontal disease in adults Kenyans. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 445-452.

32. Baellum V, Ferjerskov O, Karring T. Oral hygiene, gingivitis and periodontal breakdown in adult Tanzanians. *J Periodontol Res* 1986; **21**: 221-232.
33. Croucher R, Marcenes WS, Torres MC, Hughes F, Sheihan A. The relationship between life-events and periodontitis: a case-control study. *J Clin Periodontol* 1997; **24**: 39-43.
34. Shizukuishi S, Hayashi N, Tamagawa H, Hanioka T, Maruyama S, Takeshita T, et al. Lifestyle and periodontal health status of Japanese factor workers. *Ann Periodontol* 1998; **3**: 303-11.
35. Elter JR, White A, Gaynes BN, Bader JD. Relationship of clinical depression to periodontal treatment outcome. *J Periodontol* 2002; **73**: 441-449.
36. Teng HC, Lee CH, Hung HC, Tsai CC, Chang YY, Yang YH, et. al. Lifestyle and psychosocial factors associated with chronic periodontitis in Taiwanese adults. *J Periodontol* 2003; **74**: 1169-1175.
37. Colomina MT, Roig JL, Torrente M, Vicens P, Domingo JL. Concurrent exposure to aluminum and stress during pregnancy in rats: Effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Neurotoxicol and Teratol* 2005; **27**: 565-574.
38. Tobe I, Ishida Y, Tanaka M, Endoh H, Fujioka T, Nakamura S. Effects of repeated maternal stress on FOS expression in the hypothalamic

- paraventricular nucleus of fetal rats. *Neuroscience* 2005; **134** :387-395.
39. Bhatnagar S, Lee TM, Vining C. Prenatal stress differentially affects habituation of corticosterone responses to repeated stress in adult male and female rats. *Hormones and Behavior* 2005; **47**: 430-438.
40. Hougaard KS, Andersen MB, Kjaer SL, Hansen AM, Werge T, Lund SP. Prenatal stress may increase vulnerability to life events: comparison with the effects of prenatal dexamethasone. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; **159**: 55-63.
41. Bosch OJ, Krömer SA, Neumann ID. Prenatal stress: opposite effects on anxiety and hypothalamic expression of vasopressin and corticotrophin-releasing hormone in rats selectively bred for high and low anxiety. *Euro J Neurosci* 2006; **23**: 541-551.

Anexo A

Comitê de Ética



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

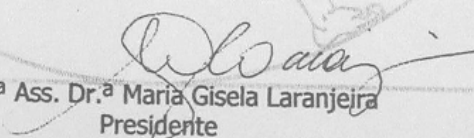


COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

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

Araçatuba, 01 de agosto de 2005.


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

Anexo B

Acta Odont Scand (Normas)

Instructions for Authors

Scope of the Journal

The scope of the journal covers all aspects of dentistry, both basic and clinical science. In general, analytical studies are preferred to descriptive studies. Articles reporting novel research showing cause and effect relationships for experimental studies and explanatory / associative relationships for those of an observational nature are favored. Hypothesis driven research are encouraged since simple descriptive reports tend to have relatively low scientific priority for publication.

Original research papers, review articles, short communications, and letters to the Editor will be considered for publication. Review articles may be invited by the Editor-in-Chief, but will be subjected to peer review. Proposals for review articles should be discussed with the Editor prior to submission. Short communications should not be longer than two printed pages, and should contain new and important information. Short communications should follow the usual division into Material and methods etc. and have a short abstract.

For more information on most aspects of scientific writing, consult *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, published by the International Committee of Medical Journal Editors and freely available at: www.icmje.org.

Manuscript submission

All submissions should be made in final, fully corrected form online at *Acta Odontologica Scandinavica's Manuscript Central site*. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site submissions should be made via the Corresponding Author Centre.

Receipt of the manuscript in the editor's office will be acknowledged via email. The manuscript will then be distributed to two or more external peer reviewers allotted a time period of four weeks for the review. The reviewers will be anonymous, but the authors' names will be known to the reviewers. If reviewers' opinions conflict, the manuscript may be sent to an extra reviewer. Efforts are made to avoid all types of conflict of interest when the reviewers are selected. The authors must always suggest two reviewers, and also have the option to name unsuitable reviewers.

Cover letter

It must be stated in the cover letter, that the manuscript has not been published, simultaneously submitted, or already accepted for publication elsewhere, and that all authors have read and approved the manuscript. If there is more than one author, the contribution of each author should be stated. Gift authorship is not acceptable. State any conflict of interest related to individual authors' commitments and any project support. Give reference (registration number or the like) to research ethical permission, if applicable, as locally regulated for research on humans or animals.

Make a full statement about all submissions and previous reports that could be regarded as redundant or as duplicate publication of the same or similar work, and alert the editor if the manuscript includes subjects about which the authors have published a previous report or have submitted a related report to another journal. Refer to and reference any such report in the new paper. Upload copies of such material as supplementary files.

Authors are responsible for obtaining permission from everyone acknowledged by name in Acknowledgment section, because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Therefore, state explicitly that acknowledged persons have seen the text and given their permission to be named.

Manuscript preparation

Editors and reviewers spend many hours reading manuscripts, and therefore they appreciate receiving material that has been carefully prepared in accordance with these Instructions to Authors.

Authors are advised to consult a recent issue of the Journal to be familiar with its style and format. The whole manuscript should be submitted in correct English. Authors whose native language is not English are strongly recommended to obtain assistance from someone proficient in scientific English. Manuscripts not submitted in the proper format or in poor English may be returned without review.

The parts of a manuscript should be as follows: Title page, abstract page, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, references, figure legends, tables, and figures, arranged in that order. This division is also appropriate for short communications. For review papers and qualitative studies, other headings may be used as appropriate. Use the built-in system of headings of your word processor to divide up and clarify the text; however, use not more than three levels of division. All text files (including abstract, keywords and figure legends) should be uploaded onto Manuscript central as one MS Word file and in the format described below.

To facilitate the editing of your manuscript, and lessen the time to publication, please adhere to the following simple general guidelines and advices:

1. Use double spacing throughout and left and margin of at least 3 and 5 cm, respectively leaving space for the reviewer to add notes.
2. Begin each of the following sections on a separate sheet: title page; abstract and key words; body of the text starting with introduction; acknowledgements; references; figure legends and tables (each on a separate sheet).
3. Use font Times New Roman 12 point. If you use a non-English word processor, program it for English. Be especially careful to use full stop as decimal point, not comma. As spell checker, use American English. Check that diacritic signs are found in names only.
4. Number the pages consecutively beginning with the title page. Do not number lines.
5. Use the left alignment feature for a paragraph.
6. Avoid end-of-line hyphens.
7. The beginning of paragraphs should be properly marked with an indent.
8. Use a single hyphen to hyphenate compound words and a double hyphen (-) to indicate a dash in the text.
9. Enter only one space after the full stop at the end of a sentence.
10. Be consistent: use the same form of units, etc., and key these elements in exactly the same way throughout the manuscript. Put a space between the digits and the unit, e.g. 5.2 mm.
11. When emphasizing words (seldom necessary), use the italics feature of your word processor software rather than the underline feature.
12. Do not use the lowercase l for 1 (one) or the uppercase O for 0 (zero), use the proper numerals instead.
13. Use the space bar only as a word separator, not as a tabulator.
14. Format tables using the table functions of your word processor.

Title page

The title page has to contain the following information:

1. A concise but fully informative title (a subtitle may be used in addition, but must be short). Avoid unnecessary words such as "Study on", "An investigation of" etc, and also affirmative wordings. The title should include species used (if appropriate) and any non-standard acronyms or abbreviations should be avoided. Include all information in the title necessary to make electronic retrieval of the article both sensitive and specific. Do not capitalize the title: only the first word and proper nouns have capital initials.
2. The full name of each author. Use capital letters. Do not include academic degrees.
3. The departments and institutions to which the work should be attributed, including the city and country, for each author. Using numbering in superscript, key each author to the relevant institution.
4. A short title not exceeding 40 letters and spaces for use as a running head.

5. Give the name and current address of the author to whom correspondence, proofs, and reprints are to be sent. Include telephone and telefax numbers as well as e-mail address. Observe that these data will be published with the paper.
6. The number of figures and tables.

Abstract and key words

Present the abstract limited to 250 words on a separate page. The abstract should briefly state the objective of the investigation, basic procedures, main findings, and principal conclusions. Use only standard abbreviations, and include no references. Structure the abstract using the headings *Objective*, *Material and methods*, *Results*, and *Conclusions* in one paragraph.

Give not more than five key words in alphabetical order after the abstract, and, wherever possible, use terms from the Medical Subject Headings list of *Index Medicus*. Do not repeat words from the article title.

Abstract and keywords should be included in the main document file.

Introduction

Provide a context or background for the study (i.e. the nature of the problem and its significance). Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported. In the last paragraph of the section, state the aim of the study concisely, and, where applicable, give the research hypothesis (but not the null hypothesis). When drawing comparisons for experimental or interventional studies, the latter must always be expressed explicitly.

Material and methods

In this section, describe all methods, materials and subjects so that researchers can readily repeat the study. Use appropriate subheadings for the different sections to obtain clarity. Define the material and equipment used in as detailed manner as necessary by, for example, name, product number and batch, and identify the manufacturer by product, city, and country in parentheses. For common methods, a brief description and a reference may be enough; however, if you deviate from the common method, give a full description. Quantitative estimates of the validity and reliability of the methods are desirable. Report length, height, weight, and volume in metric units (meters, kilograms, or liters), or their decimal multiples. Give temperatures in degrees Celsius and use of the International System of Units (SI) is recommended. Correct unit abbreviations should be used (e.g. "yr", "wk", "d", "h", "min", "s" and "µm"). For many details the Biochemical Journal web site <http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm#NOMENCLATURE> can be a valuable resource. Scientific names of bacteria, binomials in italics, must be given in full when first mentioned. Subsequent mention may abbreviate genus, taking care that this abbreviation is unambiguous (Staph. or Strep. instead of S.).

Describe subjects participating in the study in detail so that a similar group of subjects can be identified readily. Include eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. If applicable, describe ethical aspects here. Indicate that informed consent has been obtained. However, submit such details as the diary number in the covering letter. When submitting review manuscripts, particularly Systematic Reviews, include a section describing the methods used in locating, selecting, extracting, and synthesizing data. Summarize these methods in the abstract.

Statistics

Conclude the Material and methods section with a paragraph dealing with statistics, if applicable. Name and specify all non-descriptive statistical methods if applicable. The praxis of naming statistical terms and methods is very variable. Therefore, define statistical terms, abbreviations, and most symbols. However, the following abbreviations may be used without definition: ANOVA (analysis of variance), CI (Confidence interval), r (coefficient of correlation, sample), r^2 (coefficient of determination, sample), R (coefficient of multiple correlation), R^2 (coefficient of multiple determination), CV (coefficient of variation), df (degrees of freedom), n (number of observations), NS (non significant), P (probability (level of significance)), SD (standard deviation), SEM (standard error of the mean), t (statistical datum derived in Student's t test), F

(variance ratio). Use mean(SD) for mean and standard deviation, for example "The mean(SD) was 19.2(2.3)". Median, range etc. are written out in text and tables. Specify the computer software used. Authors are advised to consult a statistician or a person with in-depth statistical knowledge.

Results

Present your results in logical sequence giving the main or most important findings first, usually in past tense, without subjective comments and reference to previous literature. For clarity, the results section may have subheadings. The Result section is not the place for interpretation of the data, and must not include any references to other articles.

Do not repeat in the text, data easily found in the tables or illustrations (double documentation is not acceptable). Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid non-technical uses of technical terms in statistics, such as "random", "normal", "significant", "correlations," and "sample."

Tables

Present each table on a separate sheet. Do not submit tables as graphics but use the table facility of most word processors. Format the table as you expect it to appear in print and therefore hide internal vertical and horizontal lines. Number the tables consecutively in Roman numerals and give each a short descriptive heading. Give each column a short or abbreviated head. Place explanatory matter in footnotes to the table, not in the heading. Explain all non-standard abbreviations in footnotes to the table.

If data from another published or unpublished source are used, obtain permission and acknowledge fully. As far as possible, tables have to be self-explanatory and understandable without reference to the text of the article.

Figures

Upload figures (illustrations) in electronic form in JPG or TIFF file format only. Optimize the size of the file for printing with 800 DPI for line graphics and 300 DPI for halftone figures, but depending on the character of the article and the quality of those electronic files, the author(s) may be asked to supply files of higher quality. Consult the editor if you have special figures to submit such as camera-ready originals or transparencies. Authors will be charged for the extra cost of reproducing illustrations in color.

Make sure that letters, numbers, and symbols added to illustrations are clear, in proportion to each other, and large enough to be legible when reduced for publication. Refer to the journal and decide whether the figure is to cover one, one-and-a-half, or two columns of the journal when printed, and then plan the figure accordingly.

Create line drawings using dedicated professional software, not spreadsheets. Prepare the figures in proportion to each other, so that lettering, numerals, and symbols in different figures will be roughly the same size after reduction. Use sans-serif fonts for lettering the axes, and capitalize only the first letter. If submitting photographs, prepare them as near to the size they will appear in print as possible, and, if magnification is significant, indicate this by a bar on the print, *not* by a magnification factor in the figure legend. Arrows, letters, etc., affixed to a photograph in a file must be secure.

Give each figure a legend containing sufficient information to make it intelligible without reference to the text, and type all the legends together, double-spaced, on a separate page(s). Consider all illustrations as figures and number them consecutively in Arabic numerals. If a figure has been published previously, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce it. If images of persons are used, render the subject unidentifiable (not only a black bar covering the eyes), and obtain written permission to use them, and submit with the manuscript.

Discussion

The Discussion section should present the interpretation of the findings. This section is the only proper section for subjective comments. Authors are strongly urged to avoid undue repetition of what has already been reported in the results section, or introduced in the introduction.

The last paragraph should be dedicated to the conclusions of the study. There ought to be a correspondence between the aims and hypotheses in the end of the introduction and conclusions.

Acknowledgements

Acknowledge the source of financial support here, and state any links to companies or other commercial organizations. Authors are responsible for obtaining permission from everyone acknowledged by name (see section on Cover Letter above).

References

References in languages not understood by all scientists must be avoided. Therefore, only articles written in English should be used as references. This applies also to law texts, other official texts and internet sites. Furthermore, avoid references difficult to retrieve, e.g. old textbooks, journals not indexed in Medline, etc. Avoid references to websites, since these are often changed or removed.

References to 'personal communication' are permitted in the text only, not in the list of references, but should be avoided. Documentary evidence from the person quoted showing agreement with the quotation must be provided in the cover letter. A reference to 'unpublished work' (text only) must be supported by the names of all involved and included in the cover letter. The use of 'in preparation', 'private communication' and 'submitted for publication' is not allowed.

References in the text

The number of references should not normally exceed 40, and 20-30 references are frequently adequate. However, for review articles there is no upper limit. Number each reference consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in the text by Arabic numerals in square brackets. If more than one reference, separate them by a comma: [2,4-6,8]. Avoid putting references in tables and figure legends. Give cross-references by the name of the author followed by the appropriate number in parentheses, e.g. "Lagerlöf [1] has reported ...", "Oliveby & Lagerlöf [2] have reported ...", or simply by giving the appropriate number in parentheses, e.g. "As has recently been reported [1] ..." When there are three or more authors, give only the name of the first author, followed by 'et al.': "Oliveby et al. [1] have reported...". Ensure that all listed references are cited in the text.

The Reference list

At the end of the paper references should be listed in numerical order, in the style shown in the following examples, preceded by the number. For reference list entries, follow the style set out in the examples below. Abbreviate the names of journals in accordance with *MedLine*. List the names of the first six authors in reference-list entries before adding 'et al.'

Here are some examples to follow:

Journals

Standard journal article

[1] Flink H, Tegelberg Å, Thörn M, Lagerlöf F. Effect of oral iron supplementation on unstimulated salivary flow rate: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Oral Pathol Med* 2006;35:540-7.

[2] Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Källestål C, Lagerlöf F, et al. Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: A systematic review. *Acta Odontol Scand* 2003;61:347-55.

Article in supplement or special issue

[3] Fleischer W, Reimer K. Povidone iodine antiseptics. State of the art. *Dermatology* 1997;195 Suppl 2:3-9.

Corporate (collective) author

[4] American Academy of Periodontology. Sonic and ultrasonic scalers in periodontics. *J Periodontol* 2000;71:1792-801.

Unpublished article

[5] Garoushi S, Lassila LV, Tezvergil A, Vallittu PK. Static and fatigue compression test for particulate filler composite resin with fiber-reinforced composite substructure. *Dent Mater* 2006. In press.

Books and other monographs

Personal author(s)

[6] Hosmer D, Lemeshow S. Applied logistic regression, 2nd edn. New York: Wiley-Interscience; 2000.

Chapter in book

[7] Nauntofte B, Tenovou J, Lagerlöf F. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O, Kidd EAM, editors. Dental caries: The disease and its clinical management. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2003. p. 7-27.

No author given

[8] World Health Organization. Oral health surveys - basic methods, 4th edn. Geneva: World Health Organization; 1997.

More information about other reference types is available at www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html, but observe some minor deviations (no full stop after journal title, no issue or date after volume, etc).

Abbreviations

Use only standard abbreviations. Consult *Scientific Style and Format. The CBE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 7th ed. ISBN 0-9779665-0-X, 2006. Explain any non-standard abbreviations (to be avoided if possible) in the text at first mention. Avoid abbreviations in the title of the article. Give tooth designations in accordance with the two digit system (ISO 3950-1977).

Proofs and offprints

One set of proofs (pdf) is sent to the corresponding author by e-mail. S/he is requested to return the proof, duly corrected, with the minimum possible delay. Follow the enclosed instructions. Authors are liable to pay the costs of correction of any errors not due to printer's errors. Offprints can be ordered by filling out the form accompanying the proofs. Authors will be charged USD 95 for each printed page in excess of 4 pages.

Copyright

It is a condition of publication that authors vest copyright in their articles, including abstracts, in Taylor & Francis. This ensures full copyright protection and dissemination of the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after publication provided that prior permission is obtained from Taylor & Francis. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. To view 'Copyright Transfer Frequently Asked Questions', please visit www.tandf.co.uk/journals/copyright.asp.

Extra issues

Proceedings from scientific meetings, monographs or other longer texts may be published as additional issues, if considered to have a significant scientific value. Further information may be obtained from the Editor-in-Chief.

Anexo C

Journal of Periodontal Research (normas)

Manuscripts should be submitted through the Journal of Periodontal Research - Manuscript Central electronic editorial office, which can be accessed through the following site URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>

The corresponding author will need to create an account (top left hand corner) the first time he/she accesses the site. The author will be asked to provide a full postal address, email address, and telephone and fax numbers. *Journal of Periodontal Research* - Manuscript Central will then create a user name and password which should be retained for future access to the site. Once the author is logged into the system, the Main Menu will be displayed. Clicking on the Author Centre will bring up instructions for uploading the manuscript and associated files. The review process is entirely electronic-based.

Copyright - Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Blackwell Munksgaard if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like **or reproduced photographically** without the **prior** written permission of the publisher.

Manuscripts:

Electronic submission: Authors must submit their manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/jre> , Author Center. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site.

Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received.

Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of GBP70 per page.

The article should be clearly divided as follows:

Title page - should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

Abstract - A separate abstract should *not exceed 250 words*. The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

Introduction - Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

Material and methods - Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

Results - Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

Discussion - Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Acknowledgements - Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

Short communication. Short communications, limited to one printed page, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a fulllength paper. Short communications need not follow the usual divisions.

References - References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in parentheses. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; **48**: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; **125**: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; **2**: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; **283**: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; **92** (2 pt 2): 316-324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; **54** (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; **16** (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*, 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. *Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975*. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. *Infrared spectroscopic studies of solid oxygen*. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

Illustrations - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Submit at least one original set of illustrations, identifying each with a label on the back which indicates the number, author's name, and the top. Alternatively, arrange micrographs into plates fitting the space appropriately. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

Tables - Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Scientific names. Proper names of bacteria should be binomial and should be single underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, A must be attached when the term is first used.

Abbreviations and symbols The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will

be metric. Use **no roman** numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

Author material archive policy - Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Offprints - A PDF offprint will be supplied to the corresponding author. Additional offprints may be ordered on the form accompanying the proofs.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.