



RENATA DE CARVALHO FOUREAUX

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA,
MORFOMÉTRICA E HISTOMÉTRICA DE
TERAPIA PROBIÓTICA (*Bacillus subtilis*) EM
MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS SUBMETIDOS A
ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO**

LAVRAS - MG

2012

RENATA DE CARVALHO FOUREAUX

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, MORFOMÉTRICA E
HISTOMÉTRICA DE TERAPIA PROBIÓTICA (*Bacillus subtilis*) EM
MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS
SUBMETIDOS A ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luciano José Pereira

Coorientadores

Dr. Raimundo Vicente de Sousa

Dr. Márcio Gilberto Zangerônimo

Dra. Mônica Rodrigues Ferreira

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Foureaux, Renata de Carvalho.

Avaliação radiográfica, morfométrica e histométrica de terapia
probiótica (*Bacillus subtilis*) em modelo de doença periodontal
induzida em ratos submetidos a estresse crônico por imobilização /
Renata de Carvalho Foureaux. – Lavras : UFLA, 2012.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Luciano José Pereira.

Bibliografia.

1. Periodonto. 2. Inflamação. 3. Probióticos. 4. Restrição física.
5. Modelos animais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.0897632

RENATA DE CARVALHO FOUREAUX

**AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA, MORFOMÉTRICA E
HISTOMÉTRICA DE TERAPIA PROBIÓTICA (*Bacillus subtilis*) EM
MODELO DE DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS
SUBMETIDOS A ESTRESSE CRÔNICO POR IMOBILIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2012.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa UFLA

Dr. Michel Reis Messoria USP-Ribeirão Preto

Dr. Luciano José Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2012

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, por manterem luz e proteção constante em minha vida e por permitirem que tudo fosse possível.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

Às minhas queridas Mãe e Irmã, e ao meu Pai (*in memoriam*), pelo apoio e carinho incondicionais, em todos os momentos de minha vida.

Ao meu professor e orientador, Luciano José Pereira, minha eterna gratidão por toda sua ajuda, amizade, paciência e dedicação. Um verdadeiro Mestre na condução da busca do conhecimento.

Aos professores Michel Reis Messora e Raimundo Vicente de Souza, por sua imensurável atenção e por aceitarem o convite para compor a banca examinadora.

Ao reitor da UFLA, professor Antônio Nazareno Guimarães Mendes; ao pró-reitor de pesquisa, Professor Luis David Solis Murgas e ao coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Prof. Márcio Gilberto Zangerônimo, minha gratidão pela oportunidade de realizar o mestrado em tão renomada instituição.

Aos professores da UFLA, Ana Paula Peconick, Suely de Fátima Costa, Francisco Duque de Mesquita Neto, Antônio Marcos Guimarães, Chrystian Hirsch e Stela Márcia Pereira, pelos ensinamentos e sabedoria.

À pós-doutoranda Mônica Rodrigues Ferreira, pelo apoio.

Aos alunos do mestrado e doutorado, Matheus Soares da Silva Ferreira, Vivian de Oliveira Silva, Thiago Santos Araújo, Thiago da Silva Teófilo, Priscila Faria Rosa Lopes, Edna Lopes e César Augusto Pospissil Garbossa, agradeço pela amizade.

Aos alunos de graduação, Bruno Generoso Faria, Andressa Naira de Jesus Pereira, Jéssica Antunes Garcia, Luiz Gustavo Pessoa Rocha, Luiz Fernando Ferreira de Oliveira e André Filipe Rodarte Paiva, por toda disposição e ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária, Willian César Cortez, Dircéia A. C. Custódio e José Reinaldo dos Reis Ferreira “Berin”, pelo carinho e dedicação.

À reitora do UNILAVRAS, professora Christiane Amaral Lunkes Argenta e aos professores Cássio Vicente Pereira e Adolfo de Oliveira Azevedo, por sua disponibilidade e ajuda.

Aos funcionários do UNILAVRAS, Ademir Felício Alves, Admilson Cândido de Jesus e Fátima Aparecida Gumercindo.

Ao professor da Faculdade São Leopoldo Mandic Marcelo Henrique Napimoga, por toda a ajuda na realização do experimento.

À funcionária da Faculdade São Leopoldo Mandic Jeruza Pinheiro, pelo carinho na realização de análises laboratoriais.

Aos cirurgiões dentistas Letícia Cambraia Martins e Marden Santos Pôrto, pela ajuda na realização das radiografias.

Às famílias Carvalho e Foureaux, por acreditarem em mim sempre!

Aos amigos e compadres Zezé e Cristina, pelo carinho.

À minha querida secretária, Fabiana Alves de Abreu, por sua dedicação e companheirismo.

Às minhas amigas Luciana Botezelli, Érika Rodrigues Costa Andrade e Edna Aparecida de Souza, pelo incentivo e pelas risadas.

Ao querido Lucca Bernard, pela paciência e carinho.

Aos queridinhos Belle, Juan e Linda, por ficarem ao meu lado em todas as horas de estudos.

Agradecimentos especiais à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, pelo auxílio financeiro concedido (CNPq - Processo 475468/2010-4 e bolsa concedida a Luciano José Pereira).

RESUMO

Objetivou-se, com este estudo, avaliar o efeito de terapia probiótica (*Bacillus subtilis*) em doença periodontal induzida em ratos submetidos a estresse por imobilização. Um total de 40 ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foi utilizado. Os animais foram divididos em oito grupos, de acordo com os tratamentos, com cinco repetições cada, sendo: sem tratamento, probiótico, doença periodontal, estresse crônico e as associações probiótico e estresse crônico, probiótico e doença periodontal, estresse crônico e doença periodontal e estresse crônico, doença periodontal e probiótico. A doença periodontal foi induzida com o protocolo de ligadura, em ambos os primeiros molares mandibulares, por 15 dias. O probiótico foi administrado, oralmente, pela água, por 45 dias, iniciando quatro semanas antes da ligadura, na proporção de $1,5 \times 10^8$ UFC/kg. Nos grupos que foram submetidos a estresse, este foi realizado por meio de imobilização por um período de 2h30min diariamente, por 30 dias. Os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais, durante todo o período. Após o término dos tratamentos, os ratos foram eutanasiados com auxílio de guilhotina. Amostras de sangue foram coletadas para avaliação de níveis de glicose e corticosterona. Os molares do lado direito foram utilizados para avaliação dos graus de perda óssea por análise radiométrica e histométrica, enquanto os molares do lado esquerdo foram utilizados para análise morfométrica. Os dados foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) para comparação entre os grupos estudados em modelo fatorial 2x2x2, (com e sem probiótico, com e sem estresse, com e sem doença periodontal). Ratos submetidos a modelo de estresse crônico por imobilização apresentaram níveis significativamente superiores de corticosterona plasmática e glicemia em relação aos não-estressados ($p < 0,05$). Observou-se que a perda óssea foi significativamente superior ($P < 0,05$) nos animais que receberam a ligadura em comparação aos animais controles, tanto em grupos submetidos a estresse crônico como em grupos não estressados. Nos grupos não submetidos a estresse crônico houve benefício da utilização de probiótico, prevenindo a perda óssea observada em todas as análises realizadas ($P < 0,05$). Nos grupos estressados, o efeito do probiótico não foi significativo ($P > 0,05$). Não houve diferença para a perda óssea observada em animais estressados e não estressados que receberam ligadura ($P > 0,05$). Houve correlação significativa entre as medidas radiográficas, morfométricas e histométricas ($P < 0,05$). Concluiu-se que a doença periodontal não foi agravada pelo modelo de estresse proposto em ratos machos e que o uso de probióticos foi benéfico na prevenção da perda óssea induzida por doença periodontal, quando os animais não foram submetidos a condições de estresse.

Palavras-chave: Inflamação. Periodonto. Probióticos. Restrição física. Modelos animais.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of probiotic therapy (*Bacillus subtilis*) in rats induced to periodontal disease and subjected to immobilization stress. Forty adult males of Wistar rats (*Rattus norvegicus albinos*) were used. The animals were divided into eight groups according to the treatments containing five replicas each one: no treatment, probiotic, periodontal disease, chronic stress and the associations: chronic stress and probiotic, probiotic and periodontal disease, periodontal disease and chronic stress, chronic stress, periodontal disease and probiotics. Periodontal disease was induced by ligature protocol in both first mandibular molars for 15 days. The probiotic was administered orally in water for 45 days, starting four weeks prior to ligature in the proportion of 1.5×10^8 CFU / kg. In the groups subjected to stress, the probiotic was done through immobilization during 2.5 daily hours for 30 days. The animals were accommodated in individual metabolic cages throughout the period. Finishing the treatments, rats were euthanized with the aid of a guillotine. Blood samples were collected in order to assess levels of glucose and corticosterone. Molars from the right side were used to evaluate the degree of bone loss by radiometric and histometric analysis, while molars from the left side were used for morphometric analysis. Data were assessed through variance analysis (ANOVA) for comparison between groups in 2x2x2 factorial design (with and without probiotic, with and without stress, with and without periodontal disease). Rats subjected to chronic stress model by immobilization showed significant higher levels of plasma corticosterone and glucose in relation to non-stressed rats ($p < 0.05$). It was observed that bone loss was significantly higher ($P < 0.05$) in animals that received the ligature when compared to control animals, both in groups subjected to chronic stress as in non-stressed groups. In groups not subjected to chronic stress there was no benefit in relation to the use of probiotics in preventing bone loss in all tests performed ($P < 0.05$). For stressed groups, the effect of probiotic was not significant ($P > 0.05$). There was no difference in the bone loss observed in stressed and unstressed animals which received ligature ($P > 0.05$). It was observed a significant correlation between the radiographic, morphometric and histometric measurements ($P < 0.05$). It was concluded that periodontal disease was not aggravated by the stress model proposed and that the use of probiotics was beneficial on preventing bone loss induced by periodontal disease in rats not subjected to stress conditions.

Keywords: Inflammation. Periodontium. Probiotics. Physical restriction. Animal models.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Cultura em TSA ágar do probiótico *Bacillus subtilis* para avaliar sua viabilidade, após dissolvido por 24 horas, em água 32
- Figura 2 Método de restrição de movimentação para indução do estresse crônico: os animais ficaram confinados dentro de uma garrafa plástica, de acordo como o tamanho e o peso. Eles não puderam se mexer nem ter acesso à água e à ração 33
- Figura 3 A. Rato posicionado para colocação da ligadura. B. Ilustração da indução da doença periodontal por ligadura com fio de algodão, antes da fixação do fio. C. Ligadura já posicionada ao redor do 1^o molar mandibular do rato 34
- Figura 4 Representação esquemática do delineamento experimental 35
- Figura 5 Análise radiográfica: foram considerados quatro pontos no molar selecionado - ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B \square). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB \square / AC \times 100$ 37
- Figura 6 A. Perda de suporte ósseo periodontal (**SOP**): foram considerados quatro pontos no molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B \square). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB \square e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB \square / AC \times 100$. Perda óssea alveolar (**POA**): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e ápice da crista alveolar distal do primeiro molar inferior (B). Perda de inserção epitelial (**PIE**): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e inserção epitelial (E). Coloração HE, aumento 39
- Figura 7 Avaliação da perda óssea (obtida pela média das duas raízes: lingual-CD e distal-AB) entre as distâncias lineares da junção esmalte-cimento (JEC) a crista óssea (CO) localizadas no centro de cada raiz seguindo seu longo eixo 40
- Figura 8 Figura representando cada tratamento para a análise radiográfica: A- Grupo controle; B- Grupo estresse crônico; C- Grupo doença periodontal; D- Grupo probiótico; E- Grupo estresse crônico e doença periodontal; F- Grupo estresse crônico e probiótico; G-

	Grupo doença periodontal e probiótico; H- Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico.....	47
Figura 9	Figura representando cada tratamento para a análise morfométrica A- Grupo controle; B- Grupo estresse crônico; C- Grupo doença periodontal; D- Grupo probiótico; E- Grupo estresse crônico e doença periodontal; F- Grupo estresse crônico e probiótico; G- Grupo doença periodontal e probiótico; H- Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico.....	48
Figura 10	Figura representando cada tratamento para a análise histométrica perda de suporte ósseo periodontal (SOP), perda óssea alveolar (POA) e perda de inserção epitelial (PIE) 10.1 - Grupo controle; 10.2 - Grupo estresse crônico; 10.3 - Grupo doença periodontal; 10.4- Grupo probiótico; 10.5 - Grupo estresse crônico e doença periodontal; 10.6 - Grupo estresse crônico e probiótico; 10.7 - Grupo doença periodontal e probiótico; 10.8 - Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Grupos experimentais (n = 5 em cada grupo).....	31
Tabela 2	Média e desvio padrão (DP) das medidas radiográficas e morfométricas em mandíbula de ratos	44
Tabela 3	Média e desvio padrão (DP) das medidas histométricas em mandíbula de ratos	45
Tabela 4	Média e desvio padrão (DP) do ganho de peso médio diário e glicemia de ratos não submetidos a estresse crônico	46
Tabela 5	Matriz de correlação entre as variáveis radiométricas, histométricas e morfométricas	46

LISTA DE ABREVIATURAS

PGE ₂	Prostaglandina E ₂
COX-2	ciclooxigenase-2
EJ	epitélio juncional
LPS	lipopolissacarídeo
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa B</i>
IL	interleucina
EC	estresse crônico
IFN-γ	interferon-γ
RANKL	receptor activator do fator nuclear kappa B ligante
qRT-PCR	reação quantitativa da polimerase em tempo real
APO	área de perda óssea alveolar
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico
mRNA	RNA mensageiro
FAO	United Nations For Food and Agriculture Organization
WHO	Organização Mundial de Saúde
UFC	unidades formadoras de colônia
Lf	lactoferrina salivar
RT-PCR	reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da
IgE	imunoglobulina E
TNF-α	fator de necrose tumoral α
kg	quilograma
mg	miligrama
cm	centímetro
kV	quilovolts
mA	miliampere
SOP	suporte ósseo periodontal
POA	perda óssea alveolar
PIE	perda de inserção epitelial
nm	nanômetro
pg	picograma
ml	mililitro
DP	desvio padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Doença periodontal	17
2.2	Doença periodontal em animais domésticos	20
2.3	Estresse e doença periodontal	21
2.4	Probióticos e doença periodontal	25
2.5	Probióticos, trato gastrointestinal e imunidade	27
2.6	Objetivo geral	29
2.6.1	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Coleta de amostras	35
3.2.1	Eutanásia e coleta de sangue	35
3.2.2	Coleta de tecidos	35
3.2.3	Análise radiográfica	36
3.2.4	Análise histométrica	37
3.2.5	Análise morfométrica	39
3.2.6	Erro do método	41
3.2.7	Níveis sanguíneos de corticosterona	41
3.2.8	Análise da glicemia por meio de teste colorimétrico	41
3.3	Análise estatística	41
4	RESULTADOS	43
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	55
	ANEXOS	61

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (periodontite) é caracterizada por um processo inflamatório crônico dos tecidos de suporte dos dentes (SAVAGE et al., 2009), que resulta na sua destruição e degradação (FERNANDES; GARCIA; BOSCO, 2010), afetando tanto humanos como animais (ANTHONY et al., 2010; HUGOSON; NORDERYD, 2008; KORTEGAARD; ERIKSEN; BAEUM, 2008). Alterações bucais podem levar à perda de peso, a baixo desempenho, à dor e a anomalias de comportamento. Além de causar desconforto aos indivíduos acometidos, há grande evidência de que um foco de infecção oral pode causar processos patológicos sistêmicos, tais como alterações cardiológicas e parto prematuro com baixo peso (GLICKMAN et al., 2009; SEYMOUR et al., 2007; GAZOLLA et al., 2007), além de fornecer citocinas que contribuem para eventos como aterosclerose e trombose (COTTI et al., 2010). Apesar desse impacto, a ocorrência e o estudo de alterações bucais em populações de animais domésticos não são frequentemente relatados (ANTHONY et al., 2010).

A etiologia da periodontite crônica está relacionada à ação de periodontopatógenos (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*, entre outros) localizados no biofilme e a evolução clínica da doença está intimamente relacionada à resposta imunológica do hospedeiro (KINANE; LAPPIN, 2001; PARK et al., 2010). Os produtos bacterianos iniciam uma resposta local no tecido gengival, que envolve ativação de células inflamatórias, liberação de prostaglandinas, leucotrienos, citocinas e ativação de osteoclastos (BREIVIK et al., 1996), levando à reabsorção do osso de suporte alveolar (SAVAGE et al., 2006).

A remoção do biofilme e a diminuição do número de agentes bacterianos por meios físicos - raspagem e alisamento coronoradicular,

fototerapia (ALMEIDA et al., 2007; LOPES et al., 2010) e químicos locais -, clorexidina e óleos essenciais (HAFFAJEE et al., 2009; KRAYER; LEITE; KIRKWOOD, 2010) são comumente propostas no tratamento. Medidas alternativas, tais como antibioticoterapia local ou sistêmica, também têm sido empregadas, em casos que não respondem ao tratamento convencional. Entretanto, essas terapias apresentam efeitos indesejáveis e contribuem para o desenvolvimento de resistência bacteriana a essas drogas (HARINI; ANEGUNDI, 2010; LOPEZ; GAMONAL; MARTINEZ, 2000). Assim, existe uma crescente necessidade de desenvolverem-se terapias não antibióticas para a prevenção, o tratamento e o controle de doenças bacterianas (KODUGANTI et al., 2011).

Neste contexto, medidas de controle da resposta imunológica e do ambiente microbiano, como, por exemplo, o emprego de probióticos, surgem como alternativas aos tratamentos convencionais. *Lactobacillus salivarius* WB21 têm sido empregados com sucesso no tratamento de pacientes com periodontite crônica, após três aplicações diárias, pelo período de oito semanas (MAYANAGI et al., 2009; SHIMAUCHI et al., 2008). Adicionalmente, Tsubura et al. (2009) avaliaram a aplicação de enxaguatório bucal contendo *Bacillus subtilis*, observando melhora do índice gengival e redução do número de periodontopatógenos. Sugere-se que os probióticos secretam surfactinas (lipopeptídeos cíclicos) que têm potencial antibacteriano, inibindo a fosfolipase A₂ e reduzindo a resposta inflamatória (SELVAM et al., 2009).

Uma vez que os probióticos interferem tanto na microbiota quanto na resposta imunológica, sua aplicação sistêmica é de interesse. Adicionalmente, não foram encontrados, na literatura, estudos envolvendo modelos de estresse e o uso de probióticos em doença periodontal induzida. O impacto do estresse no agravamento dos processos inflamatórios tem um particular interesse no manejo

da doença periodontal (BENSLEY; VANEENWYK; OSSIANDER, 2011; BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009).

Além dos microrganismos existentes na cavidade bucal, o estresse pode ter efeitos anti-imunológicos e ou mediar efeitos comportamentais nas defesas do organismo, contribuindo sobremaneira com a etiologia e a perpetuação da periodontite crônica (BENSLEY; VANEENWYK; OSSIANDER, 2011; LINDHE, 2005). O estresse pode alterar a resistência tecidual do hospedeiro por mecanismos autonômicos e endócrinos, resultando, principalmente, na elevação dos níveis de corticosteroides e catecolaminas, reduzindo a microcirculação da gengiva e do fluxo salivar, com relatos de redução das funções de neutrófilos e linfócitos, o que facilita a invasão bacteriana e o dano tecidual (HORNING; COHEN, 1995; JOHNSON; ENGEL, 1986).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença periodontal

A doença periodontal é caracterizada por uma infecção bacteriana oral crônica associada à presença de biofilme, que resulta na inflamação das gengivas, levando a uma destruição gradual dos tecidos periodontais e osso alveolar de suporte dos dentes (FERNANDES; GARCIA; BOSCO, 2010; IRFAN; DAWSON; BISSADA, 2001; MICHAUD et al., 2007). O termo biofilme descreve uma comunidade microbiana relativamente indefinida associada à superfície do dente ou a qualquer outro material duro não descamativo (WILDERER; CHARAKLIS, 1989). Consiste em um depósito microbiano de ocorrência natural (biofilme verdadeiro) que contém bactérias em uma matriz composta, principalmente, de polímeros extracelulares e produtos do exsudato do sulco gengival e/ou saliva. Biofilmes formam-se particularmente de maneira rápida em sistemas fluidos, em que uma fonte regular de nutrientes é fornecida às bactérias, contribuindo para uma rápida proliferação de microrganismos e excreção de uma grande quantidade de polímeros extracelulares (LINDHE, 2005).

Numerosas espécies de bactérias periodontopatógenas (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*) residentes no biofilme são responsáveis pela indução e a manutenção da inflamação periodontal (ALMEIDA et al., 2007; COUSSENS; WEB, 2002; LOSS, 2005; MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006; ORINGER, 2009). A doença periodontal também afeta o osso alveolar, reduzindo sua massa. O acúmulo de células inflamatórias e citocinas estimula os precursores de osteoclastos, cuja formação e atividade causam reabsorção óssea (BEHL et al., 2008).

As doenças periodontais induzidas por biofilme são infecções em que grande parte da destruição observada ocorre como resultado de uma resposta imunoinflamatória do hospedeiro ao biofilme (ARMITAGE, 2002; FERNANDES; GARCIA; BOSCO, 2010; MOUTSOPOULOS; MADIANOS, 2006). Os produtos bacterianos iniciam uma resposta local na gengiva, que envolve recrutamento de células inflamatórias, geração de prostanoídes e citocinas, síntese de enzimas líticas e ativação de osteoclastos. As prostaglandinas e outros metabólitos do ácido aracídico têm reconhecido papel na patogenia da doença periodontal como um importante mediador pró-inflamatório na gengivite e na reabsorção do osso alveolar (DRISKO, 1996). Elevados níveis de prostaglandina E₂ (PGE₂) são detectados no fluido do sulco gengival de pacientes com doença periodontal, achado esse que tem sido associado com o aumento da gravidade da doença. A ciclo-oxigenase-2 (COX-2), que cataliza a formação de PGE₂, é potencialmente o mais importante mediador da perda de osso alveolar e é expressa durante as condições inflamatórias induzida por citocinas inflamatórias e endotoxinas (MIYAUCHI et al., 2004).

Miyauchi et al. (2004) afirmam que o incremento da prostaglandina E₂ (PGE₂) na doença periodontal é fator importante na destruição dos tecidos periodontais. Em um estudo prévio, estes autores demonstraram as mudanças dinâmicas da imunolocalização da ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em tecidos periodontais de ratos depois da aplicação tópica de lipopolissacarídeo (LPS:5mg/ml em solução salina) de *Escherichia coli* no sulco gengival. Em tecidos periodontais normais, pequenos números de células do epitélio juncional (EJ) e numerosos osteócitos presentes nos constituintes do osso alveolar expressaram COX-1. A aplicação do LPS induziu expressão de COX-2 pelas células do EJ com pico no dia 1. Estes achados sugerem que as células do EJ desempenham papel crítico na primeira linha de

defesa contra LPS e que a PGE₂ das células do EJ pode ser responsabilizada pelo início da inflamação periodontal. A aplicação de LPS causou incremento da expressão de COX-2 em ligamentos fibroblásticos, cementoblastos e osteoblastos. Este fato sugere que a produção induzida de PGE₂ via COX-2 por estas células pode ser associada à destruição do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar.

Holzhausen et al. (2002) propuseram um estudo para avaliação do efeito de um inibidor seletivo da ciclooxigenase-2 na progressão da perda do osso alveolar num modelo de doença periodontal em ratos. Cento e oitenta ratos *Wistar* foram divididos em três grupos experimentais. Ligaduras de algodão foram localizadas no nível da margem gengival dos primeiros molares inferiores direitos. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, tendo alguns animais recebido tratamento com Celecoxib. Os grupos tratados com Celecoxib tiveram menor perda óssea, comparados com os controles e houve interação entre o tratamento com Celecoxib e o tempo. Comparações adicionais mostraram que em ambos os grupos tratados com Celecoxib a perda óssea tornou-se significativa somente após dez dias de colocação da ligadura, enquanto no grupo controle esta alteração já era evidente após cinco dias apenas. Os dados evidenciaram que a terapia sistêmica com Celecoxib modificou a progressão de doença periodontal induzida experimentalmente em ratos.

Aquino et al. (2009) avaliaram as rotas sinalizadoras associadas com os mediadores inflamatórios ativados em dois modelos de doença periodontal experimental: injeções de lipopolissacarídeo (30 µg LPS de *Escherichia coli*) e colocação de ligadura. Ratos *Wistar* foram utilizados. Um grupo controle recebeu injeções de PBS no lado lingual gengival enquanto nenhuma ligadura foi colocada nos molares inferiores. Amostras foram coletadas após 5, 15 e 30 dias e processadas para análise por Western Blotting e histoquímica. O modelo de ligadura foi associado a uma rápida ativação das quinases de regulação

extracelular (*extracellular-regulated kinases*- ERK) e das quinases ativadas por mitógeno p38 (*mitogen-activated protein kinase* - MAPK) tanto quanto o fator nuclear kappa B (*nuclear factor kappa B* - NF-κB). A ativação destas vias sinalizadoras no modelo LPS foi atrasado, porém, se manteve pelos 30 dias do período experimental. As mudanças inflamatórias produzidas por ambos os modelos foram similares.

2.2 Doença periodontal em animais domésticos

Em recente estudo, Anthony et al. (2010) realizaram um levantamento de anomalias bucais em equinos. Os autores examinaram associações entre as anomalias mais comuns e consideraram a relação entre a idade do cavalo e os tipos de anomalias observadas. Os cavalos utilizados nesta pesquisa apresentavam idades, condições de criação, condições corporais e origens variadas. As alterações bucais mais comuns foram presença de bordas dentárias afiadas, abrasões bucais, cálculos, úlceras linguais, recessão gengival e bolsas periodontais. Neste estudo constatou-se que a prevalência de bolsas periodontais e recessão gengival eram mais altas em animais com idade avançada.

Kortegaard, Eriksen e Baelum (2009) estimaram a prevalência e descreveram a extensão e a severidade da doença periodontal e parâmetros associados à periodontia em cães da raça beagle. Um exame específico foi feito em 98 animais. No estudo avaliaram-se a perda de junção clínica, a profundidade de bolsa e o sangramento durante a sondagem. A prevalência da perda de junção clínica maior que 1,0 mm foi de 20%, em animais com um ano de idade, aumentando para 84% nos cães com idade maior que três anos. A prevalência da perda maior que 4,0 mm foi de somente 7%. Uma profundidade de bolsa acima de 4,0 mm foi observada em 44% até 81 % dos cães, dependendo da idade. Os dentes mais prováveis de ter uma perda de junção clínica maior que

1,0 mm foram os P2, P3 e P4 da maxila. Os dentes mais prováveis de ter profundidade de bolsa maior que 4,0 mm foram os caninos maxilares. A doença periodontal, em termos de perda de junção clínica maior que 1,0 mm e profundidade de bolsa maior que 4,0 mm, é comum em cães da raça beagle. Os autores concluíram que a prevalência aumentou com o avanço da idade, porém, já se encontrava elevada na idade de dois anos.

Girard et al. (2009) investigaram a prevalência e os diferentes padrões de inflamação periodontal em gatos (n=109). Um único exame periodontal completo foi feito, incluindo a condição periodontal de cada dente e dez radiografias foram tiradas de cada gato. Dentes perdidos com evidência radiográfica de ápices radiculares residuais estavam presentes em 34,0% dos gatos. A presença de doença periodontal foi comum e 13,0% dos gatos tinham periodontite agressiva. Todos os gatos tinham alguma forma de inflamação periodontal e só 4,0% dos gatos estavam livres de inflamação gengival. Gengivite moderada a severa estava presente em 13,0% dos dentes. Exposição da furca dental estava presente em 18,0% de todos os dentes multirradiculares. Perda óssea periodontal foi observada em 31,2% dos dentes e a maioria (98,2%) dos gatos tinha alguma forma de perda óssea periodontal. Os efeitos da raça e da idade foram identificados como fatores de risco para algumas variáveis.

2.3 Estresse e doença periodontal

O estresse tem sido ligado a inúmeros processos patológicos. Evidências têm indicado que o estresse crônico é um importante fator no desenvolvimento de supressão imune entre outros processos patológicos (SUTANTO; KLOET, 1994). A variação observada nas respostas imunes pode refletir a liberação de glicocorticoides em razão da presença de agentes estressores específicos. Estressores tais como confinamento ou odores de predadores, tanto como baixa

temperatura ou deficiência alimentar, levam a mudanças fisiológicas e perturbam a homeostasia (BOWERS et al., 2008).

No estudo de Semenoff-Segundo et al. (2010), os autores avaliaram a perda óssea periodontal em ratos estressados por imobilização, concluindo que o estresse por restrição demonstrou maior destruição óssea em ratos com periodontite induzida por ligadura, e que o estresse crônico perturbou o equilíbrio interno do corpo refletindo no peso do animal em 15 e 30 dias pós-indução e prejudicou não só a capacidade do sistema imunológico na relocação de células, mas também a capacidade dessas células para fazer seu trabalho de reconhecer e responder aos agentes patogênicos.

Peruzzo et al. (2008) avaliaram a influência do estresse crônico na doença periodontal induzida por ligadura e o impacto do estresse crônico (EC) nos níveis de mRNA de interleucina IL-1 β , IL-1, IL-6 e IL-10, interferon- γ (IFN- γ), receptor ativador de fator nuclear kappa B, ligante (RANKL) e osteoprotegerina nos tecidos gengivais de ratos. Sessenta ratos *Wistar* foram distribuídos aleatoriamente em três grupos G1 (controle; sítios não ligados), G2 (doença periodontal) e G3 (doença periodontal associada com estresse de restrição por 12horas/dia por todo o estudo). Depois de 30 dias, todos os animais foram eutanasiados por decapitação. As concentrações de corticosterona e catecolaminas foram medidas como biomarcadores. Tecidos marginais aos dentes ligados e não ligados foram coletados e a expressão gênica foi avaliada por reação quantitativa da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Ainda mais, a área de perda óssea (APO) foi determinada histometricamente. Os resultados mostraram que o EC aumentou os níveis séricos de biomarcadores de estresse. A colocação de ligadura resultou em significativa APO, comparada com os sítios não ligados. O EC aumentou significativamente a quantidade de APO em sítios de inflamação e também o EC aumentou significativamente os níveis de mRNA

dos mediadores proinflamatórios (IL-1beta e IL-6 e IFN-gama) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10) e fator pro-reabsorção (RANKL) em sítios ligados.

Nakajima et al. (2006) avaliaram os efeitos do estresse de restrição na doença periodontal induzida por *Porphyromonas gingivalis*, em ratos. Vinte ratos machos foram divididos em quatro grupos: grupo A (controle), grupo B (exposto ao estresse de restrição por 12 horas/dia por 22 dias), grupo C (*P. gingivalis*) e grupo D (exposto ao estresse de restrição por 12 horas/dia por 22 dias com *P. gingivalis*). A distância da crista do osso alveolar até a junção cimento-esmalte foi determinada, as concentrações do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foram medidas como marcador de estresse e atrofia do timo e baço também foram medidas. A área de furca dos molares maxilares foi examinada histologicamente, enquanto a expressão gênica de citocinas gengivais foi avaliada por mRNA usando qRT-PCR. Os resultados mostraram que, no grupo de restrição, todos os marcadores de estresse foram elevados e o timo e o baço foram atrofiados. Combinando estresse de restrição e mudança oral com *P. gingivalis*, resultou em aumento significativo da perda óssea e de osteoclastos. Estes resultados sugerem que a presença do estresse de restrição aumentou significativamente a progressão da doença periodontal por *Porphyromonas gingivalis* em ratos.

Takada et al. (2004) avaliaram a influência do estresse de restrição em modelo de doença periodontal em ratos. Uma ligadura de náilon foi colocada em volta do segundo molar superior maxilar. Os animais foram, então, divididos em grupo S, exposto ao estresse de restrição por 12 horas/dia, por dez dias e grupo N foi utilizado como controle. Dez animais foram sacrificados nos dias 2, 4, 6, 8 e 10. Amostras do sangue foram coletadas e o nível de glicose e concentrações de ACTH, corticosterona e adrenalina foram mensurados como marcadores de estresse. A área de furca do segundo molar maxilar foi examinada histologicamente. Os resultados mostraram que, no grupo S, todos os valores dos

marcadores de estresse foram aumentados e o timo e o baço foram atrofiados. Os resultados do estudo sugeriram que o estresse de restrição modulou a progressão da inflamação periodontal e que esse modelo de rato foi adequado para investigação da associação entre estresse e doença periodontal.

Gaspersic, Stiblar-Martincic e Skaleric (2002) avaliaram a influência do estresse na doença periodontal induzida por colocação de ligaduras de fio de seda em volta do segundo molar superior maxilar de ratos. Os ratos foram divididos em três grupos com dez animais cada. O primeiro grupo foi exposto a estresse de restrição por 12 horas/dia, por um período de quatro semanas. O segundo grupo foi exposto a estresse de restrição por 2h30min/dia, por um período de quatro semanas. O terceiro grupo serviu como grupo controle. Ligaduras por quatro semanas resultaram em aceleração da degradação periodontal, embora o estresse, por si só, não tenha apresentado efeito significativo. A combinação de estresse e ligadura resultou em aumento da perda de junção e reabsorção do osso alveolar. Depois de quatro semanas, uma redução do peso corporal foi vista nos dois grupos de estresse de ratos e atrofia do timo nos ratos com restrição por 12 horas/dia, enquanto nenhuma mudança foi observada no peso ou na composição das glândulas suprarrenais. Os autores concluíram que o estresse pode modular o processo fisiopatológico da inflamação periodontal já presente, resultando em aceleração da degradação dos tecidos periodontais.

Bensley, Vaneenwyk e Ossiander (2011) sugeriram que o estresse psicossocial é um fator de risco para a doença periodontal, contribuindo para outras doenças crônicas por meio de supressão imunológica ou mudanças comportamentais. A amplitude das possíveis associações e as relações de causalidade não são bem compreendidas.

2.4 Probióticos e doença periodontal

Os probióticos são definidos como microrganismos, principalmente bactérias, que são seguras para o consumo e que, quando ingeridos em quantidades suficientes, têm efeitos benéficos dentro de uma nutrição básica (BORCHERS et al.; 2009). Esta definição foi aprovada pela Food And Health Agricultural Organization Of The United Nations (FAO) e World Health Organization (WHO) (2002). Os probióticos são, geralmente, regulamentados como suplementos dietéticos e comercializados para melhorar ou manter a saúde (TSUBURA et al., 2009)

Bactérias benéficas têm sido extensamente estudadas (PARVEZ et al., 2006). O principal campo de estudo tem sido o trato gastrointestinal. Na saúde oral, os efeitos benéficos nos dentes, tais como redução de cáries e redução da desmineralização do esmalte dental, têm sido relatados por mais de duas décadas (HEROD, 1991), além de poder beneficiar a saúde bucal, impedindo o crescimento da microbiota prejudicial ou por modular a imunidade da mucosa na cavidade oral (KODUGANTI et al., 2011).

Nos últimos anos, os probióticos têm sido investigados para a saúde periodontal (TEUGHELIS et al., 2007). Certas bactérias intestinais podem exercer efeitos benéficos na cavidade oral pela inibição de espécies patógenas. O conceito da terapia de reposição periodontal consiste em aplicar bactérias benéficas orais subgengivalmente, para prevenir a recolonização de bolsas periodontais por patógenos depois de raspagem e alisamento radicular. Teughels et al. (2007) afirmam que o mecanismo parece estar relacionado à interferência bacteriana e à modulação imune. Este mecanismo é similar aos mecanismos dos probióticos de interação com outras partes do trato alimentar.

Tem sido demonstrado que a administração de probióticos reduz eficientemente o número de *Streptococcus mutans*, sugerindo, assim, um papel

na profilaxia da cárie (HE et al., 2009). Além disso, Hatakka et al. (2007) relataram que os probióticos também reduziram a contagem de *Candida* oral em idosos e podem assim oferecer uma nova estratégia para controlar infecções fúngicas orais.

No campo das periodontopatias, Krasse et al. (2006) demonstraram que o sangramento gengival e a gengivite diminuíram após a administração do probiótico *Lactobacillus reuteri*. Mayanagi et al. (2009) estudaram os efeitos da administração oral do probiótico *Lactobacillus salivarius* WB21 na população bacteriana de biofilme supra/subgengival. Sessenta e seis voluntários humanos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, para receber placebo ou lactobacilos, durante oito semanas. As quantidades de bactérias em amostras de biofilme foram analisadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A soma numérica de cinco bactérias periodontopatogênicas (*A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia*) selecionadas no grupo teste foi reduzida significativamente.

Shimauchi et al. (2008) estudaram o efeito da intervenção com probiótico, usando lactobacilos na condição periodontal em voluntários com periodontite crônica. Foram utilizados tabletes contendo *Lactobacillus salivarius* WB21 ou com um placebo em 66 voluntários que receberam comprimidos contendo WB21 (6.7×10^8 UFC) com xilitol ou somente xilitol (placebo), três vezes ao dia, durante oito semanas. Parâmetros clínicos periodontais e conjunto de amostras de saliva foram obtidos no início do estudo, após quatro semanas e ao final do período de intervenção. Os níveis de lactoferrina salivar (Lf) foram medidos por ensaio imunoenzimático. Lactobacilos na saliva e amostras de placa bacteriana foram detectados pela RT-PCR semiquantitativa, utilizando-se *primers* 16S rRNA. Os autores avaliaram parâmetros clínicos periodontais que foram melhorados em ambos os grupos, após as oito semanas de intervenção. Pacientes fumantes apresentaram melhorias do índice de placa e profundidade de

sondagem do início do estudo quando comparado com os do grupo placebo. O nível de Lf salivar também diminuiu significativamente nos fumantes do grupo. Os resultados indicaram que os probióticos podem ser úteis na melhoria/manutenção da saúde oral em indivíduos com alto risco de doença periodontal.

Tsubura et al. (2009) reportaram que o *Bacillus subtilis* é um produto probiótico efetivo na prevenção de infecções entéricas, tanto em humanos quanto em animais. Os autores levantaram uma hipótese que um enxaguatório bucal contendo *Bacillus subtilis* poderia aderir e colonizar os tecidos periodontais. A habilidade do enxágue contendo *Bacillus subtilis*: (E-300) foi comparada com um líquido enxaguante bucal *Neosteline Green* (benzetoniumclorido; NG), que é usado comumente no Japão. O enxaguatório E-300 resultou em melhora significativa no índice gengival, enquanto a profundidade de sondagem e o sangramento mostraram pequenas melhoras. O enxágue bucal com E-300 reduziu significativamente os patógenos periodontais, comparado ao NG. Estes resultados sugeriram que o *Bacillus subtilis* foi eficiente como terapia para indivíduos com periodontite crônica.

2.5 Probióticos, trato gastrintestinal e imunidade

Há evidências de que os probióticos podem prover benefícios em modular funções imunes. Em modelos animais, a suplementação probiótica é capaz de gerar proteção de colite espontânea e induzida quimicamente por *downregulation* de citocinas inflamatórias ou induzir mecanismos regulatórios em usos em raças específicas. Em modelos animais de sensibilização alérgica e modelos de asma e rinite alérgica, os probióticos administrados oralmente diminuíram a produção alergênico-específico de IgE, em parte pela modulação da produção de citocinas sistêmicas. Seguramente, os probióticos têm

demonstrado diminuição da resposta inflamatória pela indução de mecanismos regulatórios. Resultados promissores têm sido obtidos com probióticos no tratamento de doenças inflamatórias do intestino (BORCHERS et al., 2009).

Pagninia et al. (2010) reportaram que as formulações probióticas são largamente disponíveis e têm uma variedade de efeitos benéficos, incluindo a promoção da saúde intestinal. Os mecanismos de ação das bactérias do probiótico no intestino são ainda obscuros, mas são, geralmente, atribuídos a um efeito anti-inflamatório. Os autores demonstraram que as múltiplas formulações probióticas previnem o início da inflamação intestinal pela estimulação local das respostas imunes epiteliais inatas (p.ex. aumento da produção de epitélio-derivado TNF- α e restauração da função da barreira epitelial *in vivo*).

Corr, Gahan e Hill (2007) estudaram a patogenia da *Listeria monocytogenes* que apresenta habilidade de anexar e invadir o epitélio gastrointestinal e, subsequentemente, resistir à resposta imune do hospedeiro. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são dois gêneros importantes na microbiota do intestino humano propostos para terem efeitos probióticos. Os autores demonstraram que bactérias probióticas inibiram significativamente a infecção listerial subsequente em modelo *in vitro* C2Bbel (modelo celular epitelial). No caso do *Lactobacillus*, a inibição foi unida com a combinação da produção de ácido e secreção de uma proteína não identificada ainda. No caso do *Bifidobacterium*, a inibição foi atribuída a um composto proteico extracelular secretado. Em adição, observou-se redução significativa na produção de IL-8 e um aumento de IL-10 secretadas das células epiteliais, seguindo o pré-tratamento probiótico e infecção subsequente com *Listeria*. Uma redução na infecção das células epiteliais e uma resposta imune alterada da mucosa sugerem que as bactérias probióticas podem ser de benefício terapêutico contra infecção listerial. Concluiu-se que bactérias probióticas podem atuar como antagonistas de infecção por *Listeria monocytogenes*.

2.6 Objetivo geral

Objetivou-se, com a realização deste trabalho, avaliar o efeito do uso de terapia probiótica (*Bacillus subtilis*) em doença periodontal induzida em ratos submetidos a estresse e ratos não submetidos a estresse por imobilização.

2.6.1 Objetivos específicos

1) Avaliação da doença periodontal induzida em ratos submetidos a estresse e ratos não submetidos a estresse por imobilização, uso de probióticos e combinação de ambos por meio de:

- a) análise morfométrica dos tecidos periodontais;
- b) análise radiográfica dos tecidos periodontais;
- c) análise histométrica dos tecidos periodontais.

2) Avaliação dos tratamentos em parâmetros sistêmicos:

- a) avaliação do ganho de peso médio diário;
- b) avaliação dos níveis plasmáticos de corticosterona;
- c) avaliação da glicemia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos foram realizados somente após aprovação pela Comissão de Bioética na Utilização de Animais (Nintec/PRP-UFLA), de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Experimentação Animal (SBCAL), sob o Protocolo n°036/2010.

3.1 Animais

Um total de 40 ratos machos adultos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), em estado hígido, pesando aproximadamente 200 g cada, foram utilizados no presente estudo. Os mesmos eram provenientes do Biotério do Centro Universitário de Lavras - UNILAVRAS.

Os animais foram acomodados em gaiolas metabólicas individuais e submetidos a um período de sete dias de aclimação com o ambiente e a equipe de execução do projeto. A sala foi climatizada à temperatura de 22 ± 2 °C e mantida em ciclos de 12/12 horas claro-escuro. No período de aclimação foi realizado leucograma em todos os animais, para descartar a possibilidade de infecção prévia. Ração (Nuvilab – Nuvital Nutrientes S/A, Curitiba, PR, Brasil) e água foram fornecidas *ad libitum*, durante todo o período experimental.

Após uma semana de aclimação, os animais foram selecionados de forma aleatória e separados por grupos de cinco animais cada, recebendo um dos oito tratamentos descritos na Tabela 1. Os animais dos grupos de 1 a 4 foram considerados como controles, uma vez que não receberam qualquer tratamento ou receberam tratamentos isolados. Os animais dos grupos 5 a 8 receberam associações de modelos de estresse, doença periodontal e uso de probiótico.

Tabela 1 Grupos experimentais (n = 5 em cada grupo)

Grupos experimentais
1) Controle (sem estresse e sem doença periodontal) - Grupo C
2) Estresse crônico (1 sessão diária de imobilização por 2h30min/30 dias) - Grupo EC
3) Doença periodontal (indução de doença periodontal – 15 dias) - Grupo DP
4) Probiótico (45 dias) - Grupo PROB
5) Estresse crônico + doença periodontal – Grupo EC/DP
6) Estresse crônico + probiótico – Grupo EC/PROB
7) Doença periodontal + probiótico - Grupo DP/PROB
8) Estresse crônico + doença periodontal + probiótico – Grupo EC/DP/PROB

O probiótico administrado por 45 dias nos devidos grupos foi o *Bacillus subtilis* (Bioplus® PS – CHR HANSEN – Hørsholm - Denmark), iniciando-se 30 dias antes da ligadura e administrado oralmente, dissolvido na água do bebedouro, com base na ingestão diária de água, na proporção de $1,5 \times 10^8$ UFC/kg ao dia (SELVAM et al., 2009). Teste de crescimento do bacilo, após dissolvido em água, foi realizado previamente à sua administração aos animais para garantia de sua viabilidade em meios de cultura BHI-infusão ágar TSA-ágar (Acumedia Manufacturers, Inc., Baltimore, Mariland, USA) (Figura 1).



Figura 1 Cultura em TSA ágar do probiótico *Bacillus subtilis* para avaliar sua viabilidade, após dissolvido por 24 horas, em água

O modelo de indução de estresse por imobilização utilizado foi baseado em uma revisão de literatura que indica essa modalidade como preferível para estudo de estresse, uma vez que o procedimento não é doloroso e não debilita o animal (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009). Os ratos foram imobilizados por meio de seu posicionamento em recipientes plásticos adaptados (Figura 2), de acordo com o tamanho/peso do animal. Os mesmos foram submetidos à imobilização por um período de 2h30min por dia, por um total de 30 dias (BUYNITSKY; MOSTOFSKY, 2009; GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002). Os recipientes plásticos apresentavam uma abertura de 1 cm, posicionada nas vias aéreas, para garantia da respiração. A imobilização foi

realizada em ambiente silencioso, sempre no mesmo horário, para evitar estresse adicional ou interferências de ciclo circadiano.

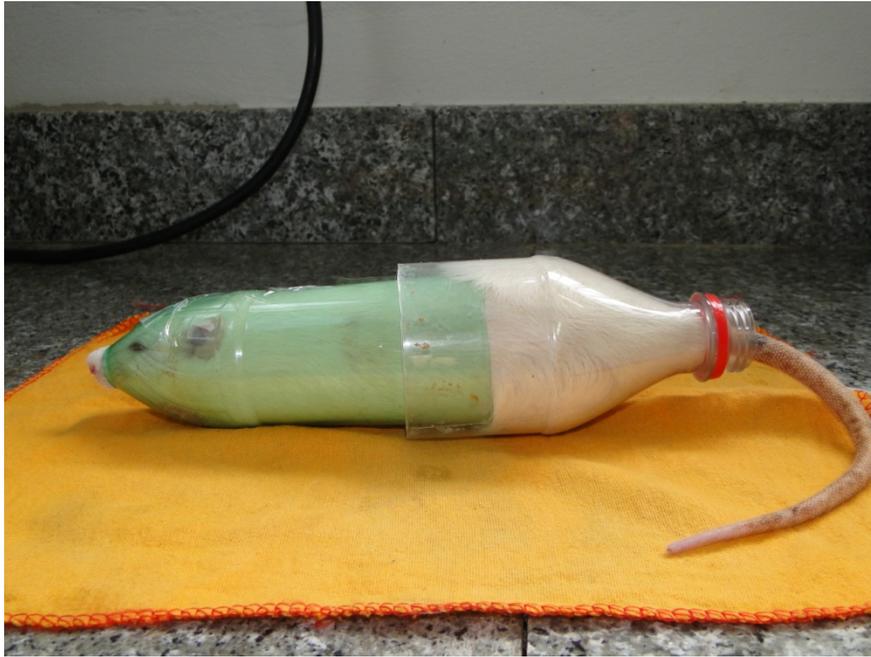


Figura 2 Método de restrição de movimentação para indução do estresse crônico: os animais ficaram confinados dentro de uma garrafa plástica, de acordo como o tamanho e o peso. Eles não puderam se mexer nem ter acesso à água e à ração

A doença periodontal foi induzida com o protocolo de ligadura (Figura 3), em ambos os primeiros molares mandibulares. Os animais receberam anestesia geral com injeção intraperitoneal de Ketamina 5mg/kg e Xilazina 20mg/kg. Depois de anestesiados, os animais receberam a ligadura com fio de algodão (Coats-Corrente, São Paulo, SP, Brasil) posicionado subgingivalmente, de acordo com a metodologia descrita por Almeida et al. (2007) e Holzausen et al.(2002).



Figura 3 A. Rato posicionado para colocação da ligadura. B. Ilustração da indução da doença periodontal por ligadura com fio de algodão, antes da fixação do fio. C. Ligadura já posicionada ao redor do 1^o molar mandibular do rato

Dessa forma, após 45 dias, todos os animais foram eutanasiados e seus tecidos foram utilizados para as análises subseqüentes.

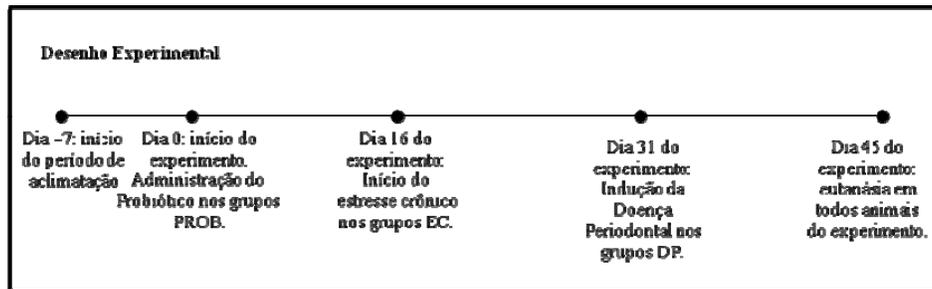


Figura 4 Representação esquemática do delineamento experimental

3.2 Coleta de amostras

3.2.1 Eutanásia e coleta de sangue

Após o término do período experimental, os ratos foram pesados e, posteriormente, decapitados, com auxílio de uma guilhotina própria para ratos da marca Insight Equipamentos Ltda. – EPP, Ribeirão Preto, SP, Brasil. A escolha do método de eutanásia foi baseada na possibilidade de indução de estresse adicional por métodos de anestesia, que poderiam interferir na dosagem de corticosterona. Neste momento, amostras de sangue foram coletadas para avaliação de níveis de glicose e corticosterona, utilizando kits comerciais colorimétricos e ELISA, respectivamente.

3.2.2 Coleta de tecidos

Após a coleta de sangue, as mandíbulas foram removidas, divididas em lados direito e esquerdo e fixadas em solução formalina 10%, com um volume

de líquido pelo menos 30 vezes maior que a peça removida, com o objetivo de manter a integridade dos tecidos após a morte, sem alteração da estrutura celular.

Os molares do lado direito foram utilizados para avaliação dos graus de perda óssea por análise radiográfica e histométrica, enquanto os molares do lado esquerdo foram utilizados para análise morfométrica.

3.2.3 Análise radiográfica

A hemimandíbula do lado direito dos ratos foi reduzida para permitir a tomada radiográfica somente da área de interesse após fixado por 48 horas, em solução de formalina 10%. As radiografias foram obtidas utilizando-se um aparelho de radiografia dental convencional do modelo Spectro 70x, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). As peças foram colocadas sobre o filme radiográfico (Kodak Dental Intraorale-SpeedFilm , São Paulo, SP, Brasil) e o cone foi posicionado perpendicularmente a ele, mantendo uma distância objeto-fonte de 50 cm, com o tempo de exposição de 0,4 segundo, estando a radiação a 70 kV e 8 mA. A revelação das radiografias foi feita em processadora automática (FERNANDES et al., 2007; SEMENOFF-SEGUNDO, et al. 2010). As radiografias, após processadas, foram escaneadas em equipamento Microtek ScanMaker i800, Microtek , Santa Fe Springs, Califórnia, USA e mensurações foram realizadas utilizando-se o software ImageLab – DiraconBio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil.

Nas radiografias, foram considerados três pontos no molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C) e o ápice da crista óssea entre o primeiro e o segundo molar (B). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB (Figura 5). Então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB \div AC \times 100$ (KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989). O resultado foi dado em porcentagem.

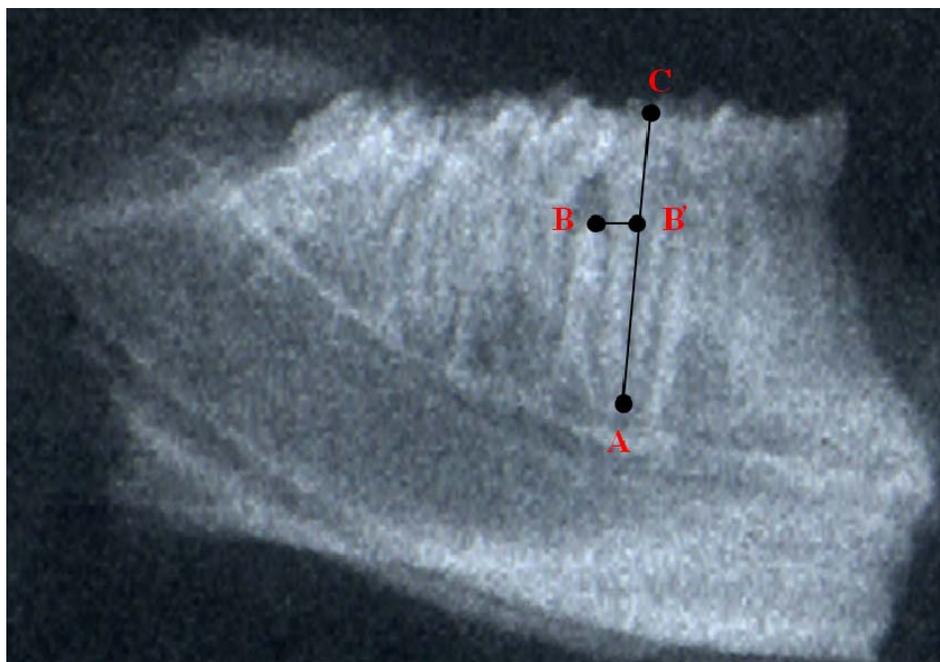


Figura 5 Análise radiográfica: foram considerados quatro pontos no molar selecionado - ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B'). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = \frac{AB}{AC} \times 100$

3.2.4 Análise histométrica

Depois da obtenção das radiografias, foi feita a análise histométrica nas hemimandíbulas do lado direito, realizada após a confecção de lâminas. Para isso, as mandíbulas foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%, durante 90 dias (ALMEIDA et al., 2007), parafinadas, cortadas em um diâmetro de 5,0 μm em cortes semisseriados em direção mésio-distal. Os cortes foram fixados em lâminas, desparafinados e corados com hematoxilina e eosina. As imagens foram capturadas no microscópio Olympus CX31, no programa AnalySIS getIT.

A análise histométrica consistiu na avaliação de três medidas: perda de suporte ósseo periodontal (SOP), perda óssea alveolar (POA) e perda de inserção epitelial (PIE) (Figura 6). A SOP foi medida considerando-se quatro pontos na raiz distal do primeiro molar: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), o ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e a projeção do ponto B na reta AC (B'). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = \frac{AB'}{AC} \times 100$, sendo o resultado em porcentagem. O nível da perda óssea alveolar (POA) foi medido pela distância entre a junção cimento-esmalte e o ápice da crista alveolar distal do primeiro molar mandibular. Já a perda de inserção epitelial (PIE) foi medida pela distância entre a junção cimento-esmalte e inserção epitelial. As medidas POA e PIE foram tomadas em milímetros. As mensurações também foram realizadas utilizando-se o software ImageLab – DiraconBio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil.

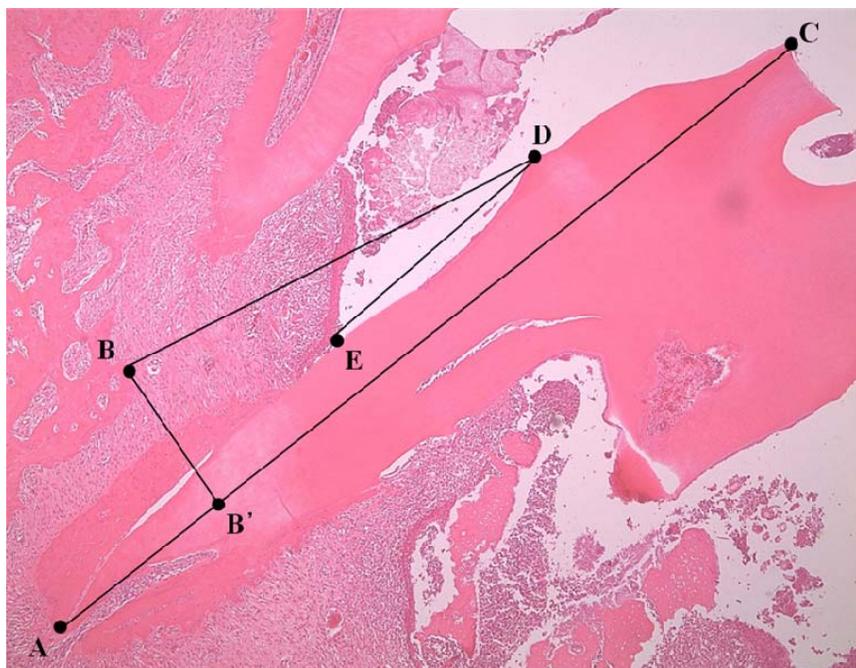


Figura 6 A. Perda de suporte ósseo periodontal (**SOP**): foram considerados quatro pontos no molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C), ápice da crista óssea distal do primeiro molar (B) e projeção do ponto B na reta AC (B'). Foram mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB' e, então, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula: $SOP = AB' / AC \times 100$. Perda óssea alveolar (**POA**): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e ápice da crista alveolar distal do primeiro molar inferior (B). Perda de inserção epitelial (**PIE**): foi medida a distância entre a junção cimento-esmalte (D) e inserção epitelial (E). Coloração HE, aumento

3.2.5 Análise morfométrica

As mandíbulas do lado esquerdo do rato foram fixadas em solução de formalina a 10%. Posteriormente, foram imersas em água oxigenada a 30%, por 2 horas e foram removidos os tecidos moles com gaze, seguindo coloração com

azul de metileno a 1%, por 30 minutos e lavagem em água corrente para a remoção do excesso de corante (Figura 7). As peças foram secas e imagens foram capturadas utilizando-se microscópio (Brook-Anco, Rochester, NY), para medição da perda óssea.

A perda óssea foi avaliada pela mensuração da distância, em milímetros, entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar, seguindo a inclinação radicular na região lingual do primeiro molar mandibular nas raízes distal e lingual. As mensurações foram realizadas utilizando-se o software ImageLab – DiraconBio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil.

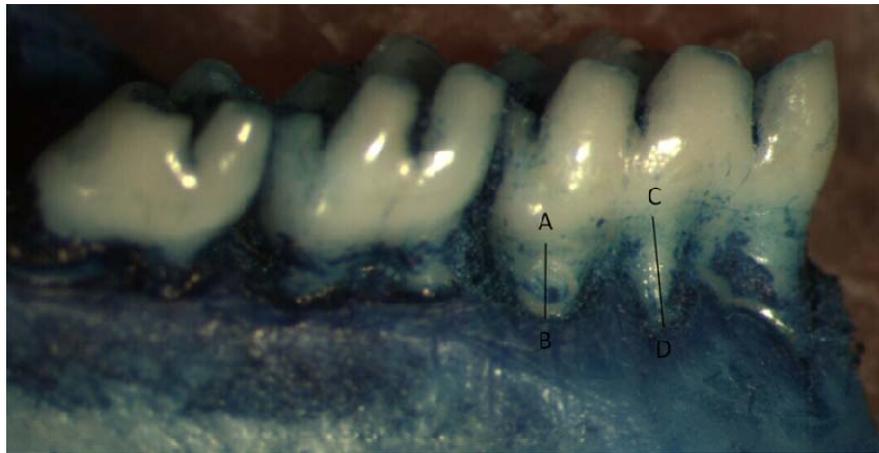


Figura 7 Avaliação da perda óssea (obtida pela média das duas raízes: lingual-CD e distal-AB) entre as distâncias lineares da junção esmalte-cimento (JEC) a crista óssea (CO) localizadas no centro de cada raiz seguindo seu longo eixo

3.2.6 Erro do método

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

3.2.7 Níveis sanguíneos de corticosterona

A determinação dos níveis sanguíneos de corticosterona foi realizada utilizando-se kit comercial ELISA (DetectX[®] Corticosterona Enzyme Immunoassay kit – Arbor Assays) projetado para medir quantitativamente a corticosterona presente em amostras de soro em leitor com comprimento de onda de 450 nm.

3.2.8 Análise da glicemia por meio de teste colorimétrico

O exame foi feito em soro, utilizando-se kit comercial para glicose enzimática líquida (DolesReag. Equip. para Laboratórios Ltda., Goiânia, GO, Brasil). A leitura foi feita no aparelho TP Analyzer Plus Thermo Plate, China (importado por Equipar Comércio Indústria e Equipamentos Laboratório e Hospitalares Ltda., Curitiba, PR, Brasil).

3.3 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste “t” de Student, para comparação dos níveis de corticosterona entre os grupos estressados e não estressados. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para a comparação de médias entre os grupos estudados em modelo fatorial 2x2x2

(com e sem probiótico; com e sem estresse; com e sem doença periodontal). Quando valores de F indicaram diferença significativa nas interações, estas foram desdobradas entre os fatores. Coeficientes de Pearson foram utilizados para avaliação da correlação entre os parâmetros periodontais, tais como histométricos, morfométricos e radiométricos. As análises foram realizadas utilizando-se o Programa SigmaStat 3.1 (Sigma StatStatistical Package Software Inc., USA). O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Ratos submetidos a modelo de estresse crônico por imobilização apresentaram níveis significativamente superiores de corticosterona plasmática ($104,08 \pm 16,85$ pg/ml) em relação aos não estressados ($54,32 \pm 25,26$ pg/ml) ($p < 0,05$), indicando que o modelo foi adequado na indução de estresse.

Os resultados das análises radiográfica, morfométrica e histométrica estão expressos na Tabela 2 e 3 e exemplificados nas Figuras 8 a 10. Observou-se que a perda óssea foi significativamente superior ($P < 0,05$) nos animais que receberam a ligadura, em comparação aos animais controles, tanto em grupos submetidos a estresse crônico como em grupos não estressados e administrado o probiótico. Adicionalmente, observou-se que, nos grupos não submetidos a estresse crônico, houve benefício da utilização de probiótico, prevenindo a perda óssea observada em todas as análises realizadas ($P < 0,05$). Nos grupos estressados, o efeito do probiótico não foi significativo ($P > 0,05$). Não houve diferença para a perda óssea observada em animais estressados e não estressados que receberam ligadura ($P > 0,05$). Os animais submetidos a protocolo de estresse crônico apresentaram elevação significativa da glicemia ($P < 0,05$). Não houve diferença para o ganho de peso médio diário entre os tratamentos ($P > 0,05$) (Tabela 4). Houve correlação significativa entre as medidas radiográficas, morfométricas e histométrica ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 2 Média e desvio padrão (DP) das medidas radiográficas e morfométricas em mandíbula de ratos

Estresse	Doença	Probiótico		Média
		sem	com	
Radiográfico				
sem	sem	56,51 (4,25)	56,66 (3,81)	56,58(4,03) a
	com	35,40 (7,09)B	48,83 (7,85)A	42,11(7,47) b
	média	45,95(5,67)	52,74(5,83)	
com	sem	52,67 (4,23)	57,32 (4,15)	54,99(4,19) a
	com	31,20 (3,84)	35,47 (2,70)	33,33(3,27) b
	média	41,93(4,03)	46,39(3,42)	
	CV (%)	10,08		
Morfométrico				
sem	sem	0,72 (0,04) b	0,74 (0,01)	0,73(0,02)
	com	1,02 (0,02) aB	0,86 (0,04)A	0,94(0,03)
	Média	0,87(0,03)	0,8(0,02)	
com	sem	0,80 (0,05)	0,78 (0,13)	0,79(0,09) b
	com	1,00 (0,01)	0,91 (0,11)	0,95(0,06) a
	Média	0,9(0,03)	0,84(0,12)	
	CV (%)	9,20		

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem, pelo teste F (P<0,05)

Tabela 3 Média e desvio padrão (DP) das medidas histométricas em mandíbula de ratos

Estresse	Doença	Probiótico		Média
		sem	com	
Histométrico SOP (suporte ósseo periodontal)				
sem	sem	58,99(7,52)	58,55(4,48)	58,77(6,00) a
	com	18,25(4,44) B	29,48(5,04) A	23,86(4,74) b
	Média	38,62(5,98)	44,01(4,76)	
com	sem	59,66(5,00)	63,34(1,72)	61,5(3,36) a
	com	19,45(7,28)	22,49(1,99)	20,97(4,63) b
	Média	39,55(6,14)	42,91(1,85)	
	CV (%)	12,81		
Histométrico POA (perda ossea alveolar)				
sem	sem	0,95(0,38)	0,98(0,20)	0,96(0,29) b
	com	4,07(0,32) A	3,38(0,17) B*	3,72(0,24) a
	Média	2,51(0,35)	2,18(0,18)	
com	sem	1,06(0,22)	0,88(0,14)	0,97(0,18) b
	com	3,93(0,72)	3,91(0,31)	3,92(0,51) a
	Média	2,49(0,47)	2,39(0,22)	
	CV (%)	15,97		
Histométrico PIE (perda de inserção epitelial)				
sem	sem	0(0)	0(0)	0(0) b
	com	2,67(0,45) A	1,78(0,63) B	2,22(0,54) a
	Média	1,33(0,22)	0,89(0,31)	
com	sem	0(0)	0(0)	0(0) a
	com	2,45(0,76)	1,85(0,53)	2,15(0,64) b
	Média	1,22(0,38)	0,92(0,26)	
	CV (%)	22,69		

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem, pelo teste F (P<0,05). * Difere do tratamento com estresse, pelo teste F (P<0,5)

Tabela 4 Média e desvio padrão (DP) do ganho de peso médio diário e glicemia de ratos não submetidos a estresse crônico

Estresse	Doença	Probiótico		Média
		sem	com	
Glicemia				
Sem*	sem	90,19 (13,22)	89,34 (7,45)	89,76 (10,33)
	com	89,31 (10,66)	96,93 (0,96)	93,12 (5,81)
com	Média	89,75 (11,94)	93,13 (4,20)	
	sem	106,67 (12,32)	107,31 (18,19)	106,99 (15,25)
	com	107,87 (5,67)	106,74 (25,53)	107,30 (15,60)
	Média	107,27 (8,99)	107,02 (21,86)	
	CV (%)	9,02		
Ganho de peso médio diário				
sem	sem	3,83 (0,02)	3,52 (0,41)	3,67 (0,21)
	com	3,76 (0,11)	3,50 (0,74)	3,63 (0,42)
	Média	3,79 (0,65)	3,51 (0,57)	
com	sem	4,38 (0,43)	3,11 (0,66)	3,74 (0,54)
	com	3,14 (0,68)	2,80 (0,41)	2,97 (0,55)
	Média	3,76 (0,55)	2,95 (0,53)	
	CV (%)	11,08		

^{a,b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha diferem, pelo teste F (P<0,05). * Difere do tratamento com estresse, pelo teste F (P<0,5)

Tabela 5 Matriz de correlação entre as variáveis radiométricas, histométricas e morfométricas

		SOP	POA	PIE	Morfometria
Radiometria	r	0,510	-0,579	-0,557	-0,524
	P	<0,01	<0,01	<0,01	0,008
SOP	r		-0,972	-0,935	-0,527
	P		<0,01	<0,01	0,004
POA	r			0,936	0,445
	P			<0,01	0,020
PIE	r				0,589
	P				0,00123

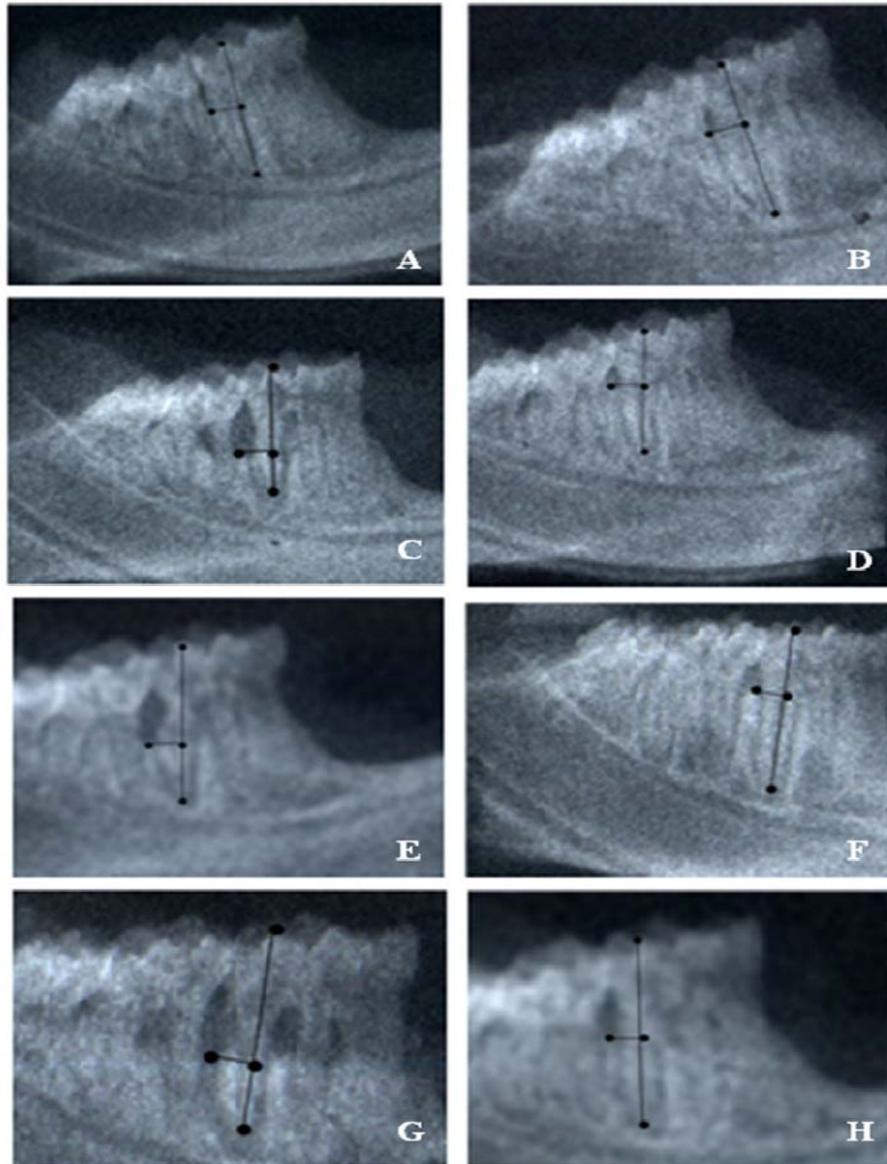


Figura 8 Figura representando cada tratamento para a análise radiográfica: A- Grupo controle; B- Grupo estresse crônico; C- Grupo doença periodontal; D- Grupo probiótico; E- Grupo estresse crônico e doença periodontal; F- Grupo estresse crônico e probiótico; G- Grupo doença periodontal e probiótico; H- Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico

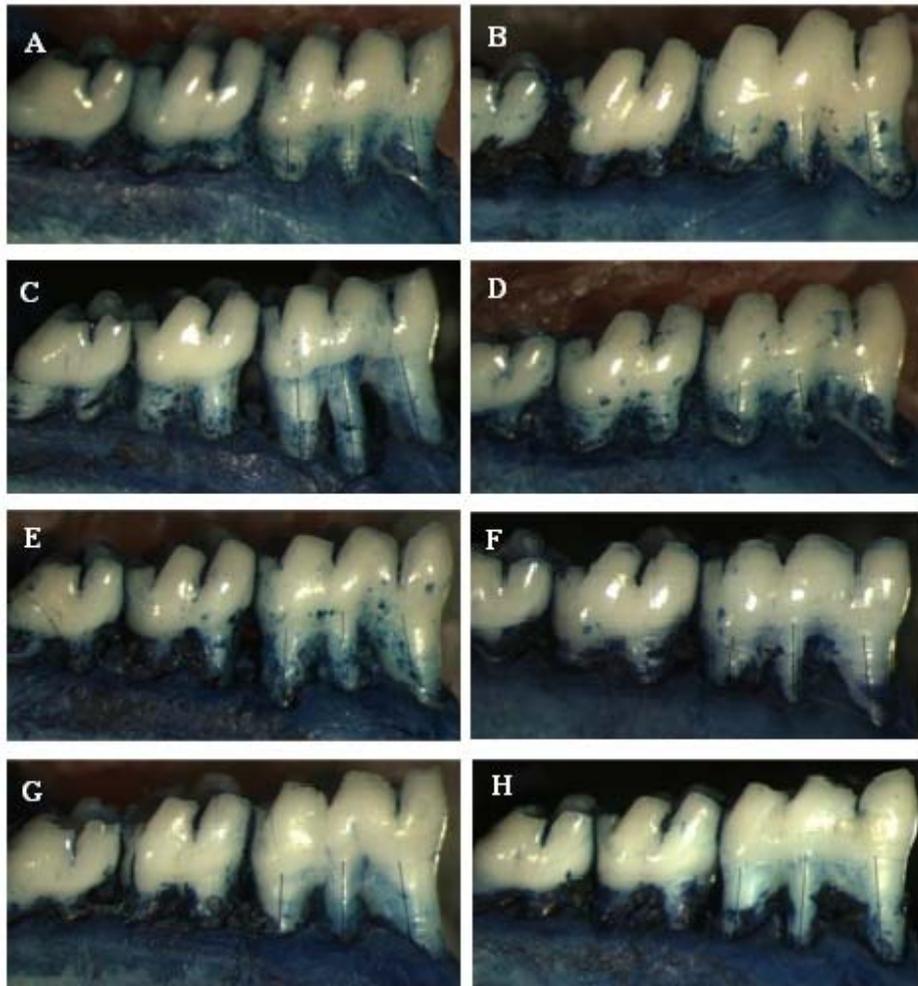


Figura 9 Figura representando cada tratamento para a análise morfométrica A- Grupo controle; B- Grupo estresse crônico; C- Grupo doença periodontal; D- Grupo probiótico; E- Grupo estresse crônico e doença periodontal; F- Grupo estresse crônico e probiótico; G- Grupo doença periodontal e probiótico; H- Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico

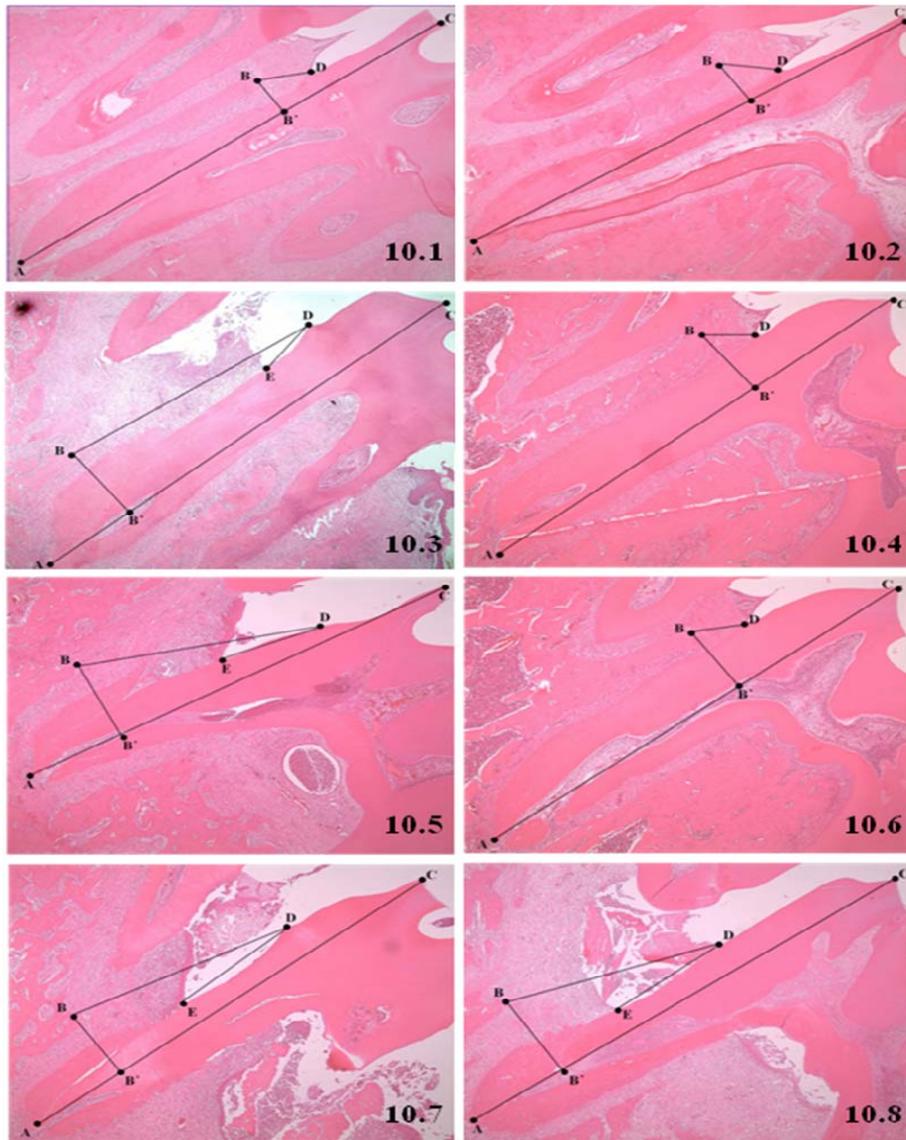


Figura 10 Figura representando cada tratamento para a análise histométrica perda de suporte ósseo periodontal (SOP), perda óssea alveolar (POA) e perda de inserção epitelial (PIE) 10.1 - Grupo controle; 10.2 - Grupo estresse crônico; 10.3 - Grupo doença periodontal; 10.4- Grupo probiótico; 10.5 - Grupo estresse crônico e doença periodontal; 10.6 - Grupo estresse crônico e probiótico; 10.7 - Grupo doença periodontal e probiótico; 10.8 - Grupo estresse crônico e doença periodontal e probiótico

5 DISCUSSÃO

Devido ao aumento da incidência da resistência a antibióticos, os probióticos têm se tornado uma alternativa promissora aos métodos tradicionais de controle da doença periodontal (KODUGANTI et al., 2011). Apesar do aumento do número de trabalhos avaliando a eficácia destes microrganismos, muitos estudos ainda são necessários para aumentar a evidência, de forma a suportar a sua indicação no tratamento clínico de pacientes (DHINGRA, 2012), justificando a realização de estudos preliminares em animais (OZ; PULEO, 2011). Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a progressão e o efeito de diferentes tratamentos da doença periodontal. No presente estudo optou-se pelo modelo de ratos, devido às grandes semelhanças com os humanos em relação à anatomia da região de molares, baixo custo da pesquisa e fácil manuseio (WEINBERG; BRAL, 1999). Ademais, a colocação de ligadura com fio de seda ou algodão ao redor da região cervical de primeiros molares inferiores ou superiores tem sido amplamente utilizada na indução da doença periodontal experimental (OZ; PULEO, 2011).

No presente estudo, houve correlação significativa entre os métodos de avaliação empregados (radiométrico, morfométrico e histométrico). Estas técnicas têm se mostrado eficientes para avaliação de perda óssea induzida pela doença periodontal no modelo adotado (ALMEIDA et al., 2007; DUMITRESCU et al., 2006; FERNANDES; GARCIA; BOSCO, 2010; GASPERSIC; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 2002; KLAUSEN; EVANS; SFINTESCU, 1989; NAKAJIMA et al., 2006; TOMOFUJI et al., 2009 a, 2009b; YU et al., 2007). A partir deste resultado, observou-se que a utilização das três técnicas acarretou em resultados semelhantes.

No presente estudo demonstrou-se, *in vivo*, o efeito benéfico do uso de um probiótico (*Bacillus subtilis*) na prevenção da perda óssea causada por doença periodontal induzida por ligadura em ratos não estressados. Uma vez que os microrganismos (*Bacillus subtilis*) foram adicionados à água dos bebedouros, os presentes resultados corroboram a idéia de que probióticos administrados por via oral podem causar benefícios tanto ao passar pela cavidade bucal dos animais como por modularem a imunidade da mucosa oral sistemicamente (SHIMAUCHI et al., 2008).

Existem evidências de que a colonização do intestino por probióticos pode causar efeitos benéficos sistêmicos, promovendo proteção contra doenças em sítios distantes (LENOIR-WIJNKOOP et al., 2007). Dessa forma, sugere-se que as possíveis explicações para os efeitos benéficos do uso de probióticos no presente estudo incluem: prevenção da adesão de microrganismos patogênicos aos tecidos do hospedeiro ao passar pela cavidade bucal na ingestão, estímulo e modulação do sistema imune, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentando, provavelmente, a produção de citocinas anti-inflamatórias, melhora

da integridade da barreira intestinal e aumento da produção de mucinas, e eliminação ou inibição do crescimento de patógenos pela produção de bacteriocinas ou outros produtos, como ácidos e peróxidos (KODUGANTI et al., 2011) e diminuição do pH luminal (CORR, GAHAN & HILL, 2006).

Segundo Park et al. (2010), a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* confere propriedades anti-inflamatórias pela inibição da produção do fator de necrose tumoral α , interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-12.

No presente estudo, o estresse, por si só, não induziu qualquer alteração significativa nos tecidos periodontais, como demonstrado em estudos prévios de Gaspersic, Stiblar-Martincic e Skaleric (2002), Huang et al. (2011), Nakajima et al. (2006), Semenoff-Segundo et al. (2012) e Takada et al. (2004). Porém, os presentes resultados discordam dos estudos citados com relação ao fato de que os animais submetidos a modelo de estresse por imobilização não apresentaram perda óssea mais pronunciada que os animais não estressados nos grupos com indução da doença periodontal.

A relação entre o estresse e a progressão da doença periodontal ainda é controversa na literatura. O provável mecanismo envolvido na patogenia do estresse na doença periodontal está relacionado ao aumento na produção de glicocorticóides (como evidenciado no presente estudo pelo aumento de corticosterona plasmática nos animais submetidos a estresse) e catecolaminas.

A indução de estresse por imobilização é um método simples que pode ser aplicado a um grande grupo de animais simultaneamente e é comprovadamente eficiente para o estudo das respostas centrais e periféricas relacionadas ao estresse (GLAVIN et al., 1994). Porém, existem variações na literatura quanto ao período de imobilização dos animais (BOTELHO et al., 2010; GAMEIRO et al., 2005). Gaspersic, Stiblar-Martincic e Skaleric (2002) demonstraram que o estresse aumentou a perda óssea alveolar em fêmeas *Wistar* induzidas com ligadura, com protocolos de imobilização por 12 horas, durante 4 semanas e também com o protocolo de 2h30min pelo mesmo período. No presente estudo, optou-se pelo segundo protocolo, devido ao menor período de desconforto a que os animais eram submetidos, em cada sessão. Os resultados indicaram que, aparentemente, o modelo de indução por 2h30min foi eficiente em aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona, porém, não foi suficiente para aumentar a perda óssea induzida pela ligadura em ratos machos.

Provavelmente, este resultado se deve a diferentes influências dos hormônios sexuais sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e simpaticoadrenal, que tornam as fêmeas mais reativas a estímulos estressantes que os machos (ALOISI; STIBLAR-MARTINCIC; SKALERIC, 1998; PAULMYER-LACROIX et al., 1996; RIVER, 1999; WATANOBE et al., 1996). Assim, pode-se concluir que o estresse moderado não foi capaz de provocar incremento da perda óssea alveolar em modelo de doença periodontal induzida por ligadura, corroborando os achados de Susin e Rosing (2003).

No presente estudo, os efeitos preventivos do probiótico na doença periodontal não foram observados em ratos estressados. O estresse é considerado um importante fator de risco para doença periodontal (GENCO et al., 1999) e estudos avaliando a influência do uso de probióticos em modelo de ligadura em ratos ainda não foram realizados, o que dificulta comparações. O estresse apresenta efeitos importantes no trato gastrintestinal, que podem ter afetado seu papel modulador do sistema imune no modelo realizado. O estresse aumenta a secreção de mediadores, especialmente norepinefrina e corticosterona em ratos, influenciando a interação das células do hospedeiro envolvidas na proteção da mucosa intestinal com as bactérias comensais que povoam a superfície da mucosa (LYTE; VULCHANOVA; BROWN, 2011).

Estudos em roedores revelaram que a exposição aguda e crônica a estressores pode levar a patologias do intestino delgado e grosso, incluindo secreção de íons alterada e incremento na permeabilidade epitelial (tanto pelas vias paracelular como transcelular). A exposição prolongada ao estresse pode, ainda, induzir baixo grau de inflamação, causar anormalidades ultraestruturais do epitélio e alterar interações entre bactérias intestinais, permitindo maior translocação microbiana (GAREAU; SILVA; PERDUE, 2008). Adicionalmente, eventos estressantes promovem alterações de temperatura e acidez do trato gastrintestinal (CORCORAN et al., 2011), que promovem dificuldades na viabilidade dos probióticos e este conjunto de reações fisiológicas do estresse sobre o trato gastrintestinal pode ter contribuído para a ineficiência dos bacilos, em comparação com os grupos não estressados.

No presente estudo, a glicemia dos animais submetidos a modelo de estresse, bem como os níveis de corticosterona, estava aumentado significativamente. Este resultado era esperado devido à ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e também do sistema simpático, o que resulta em aumento da produção de glicocorticoides e catecolaminas, respectivamente, com consequente aumento da produção de glicose pelo fígado e diminuição de sua utilização pelos tecidos (EGUCHI et al., 2011). O estresse mental ou físico estimula o sistema simpático, provocando a estimulação da secreção adeno-hipofisária de ACTH e, dentro de poucos minutos, o aumento pronunciado da secreção de cortisol e corticosterona pelo córtex suprarrenal. Essa secreção aumentada promove diferentes respostas fisiológicas, tais como pressão arterial elevada, intensidade aumentada do metabolismo celular em todo o corpo, maior concentração sanguínea de glicose e maior glicólise no fígado e no músculo, dentre outros. A corticosterona tem a capacidade de estimular a gliconeogênese (formação de carboidratos a partir de proteínas e algumas outras substâncias) pelo fígado, resultando em aumento das enzimas necessárias para converter os aminoácidos em glicose nas células hepáticas. Ainda, os glicocorticoides causam a mobilização de aminoácidos dos tecidos extra-hepáticos, em particular do músculo. Em consequência, existe maior quantidade disponível de aminoácidos no plasma, que entram no processo de gliconeogênese do fígado, promovendo, assim, a formação de glicose.

Adicionalmente, os glicocorticoides deprimem a oxidação do NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina). Como ele deve ser oxidado para permitir a rápida ocorrência da glicólise, esse efeito poderia explicar a menor utilização de glicose pelas células (Hall, 2011).

Em relação ao ganho de peso, observou-se que não houve diferença entre os tratamentos, indicando que o modelo de indução de doença periodontal não provocou perda de peso significativa nos animais. Resultado semelhante foi obtido em modelo com indução por LPS, após período de 7 dias (DUMITRESCU et al., 2004). Da mesma forma, a utilização de probiótico não causou alteração do ganho de peso dos animais, demonstrando uma ação de manutenção do peso corporal em animais recebendo dieta normal (DOCK; AGUILAR-NASCIMENTO; LATORRACA, 2004).

6 CONCLUSÕES

Concluiu-se que a doença periodontal não foi agravada pelo modelo de estresse proposto e que o uso de probióticos foi benéfico na prevenção da perda óssea induzida por doença periodontal em ratos não submetidos a condições de estresse crônico. Este efeito não foi observado quando os animais foram submetidos a estresse por imobilização, indicando um efeito modulatório do estresse sobre a ação do probiótico em animais com doença periodontal induzida.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. M. de et al. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 78, n. 3, p. 566-575, Mar. 2007.

ALOISI, A. M.; CECCARELLI, I.; LUPO, C. Behavioral and hormonal effects of restraint stress and formalin test in male and female rats. **Brain Research Bulletin**, New York, v. 47, n. 1, p. 57-62, Mar. 1998.

ANTHONY, J. et al. A survey of equine oral pathology. **Journal of Veterinary Dentistry**, Poise, v. 27, n. 1, p. 12-15, 2010.

AQUINO, A. et al. Signaling pathways associated with the expression of inflammatory mediators activated during the course of two models of experimental periodontitis. **Life Sciences**, Varsóvia, v. 84, n. 21/22, p. 745-754, May 2009.

ARMITAGE, G. C. Classifying periodontal diseases: a long standing dilemma. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 30, n. 1, p. 9-23, 2002.

BEHL, Y. et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 181, n. 12, p. 8711-8718, Dec. 2008.

BENSLEY, L.; VANEENWYK, J.; OSSIANDER, E. M. Associations of self-reported periodontal disease with metabolic syndrome and number of self-reported chronic conditions. **Centers for Disease Control and Prevention**, Georgia, v. 8, n. 3, p. 1-10, May 2011.

BORCHERS, A. T. et al. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, Tokyo, v. 44, n. 1, p. 23-46, Jan. 2009.

BOTELHO, A. P. et al. The effects of acute restraint stress on nociceptive responses evoked by the injection of formalin into the temporomandibular joint of female rats. **Stress**, Washington, v. 13, n. 3, p. 269-275, May 2010.

BOWERS, S. L. et al. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, Orlando, v. 22, n. 1, p. 105-113, Jan. 2008.

BREIVIK, T. et al. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 104, n. 4, p. 327-334, Aug. 1996.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D. I. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 7, n. 33, p. 1089-1098, July 2009.

CORCORAN, B. M. et al. Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 14, n. 14, p. 1382-1399, 2008.

CORR, S. C.; GAHAN, G. M. C.; HILL, C. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 3, p. 380-388, Aug. 2007.

COTTI, E. et al. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease?: a review of the literature. **International Journal of Cardiology**, Amsterdam, v. 148, n. 1, p. 4-10, Jan. 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, London, v. 420, n. 6917, p. 860-867, Dec. 2002.

DHINGRA, K. Methodological issues in randomized trials assessing probiotics for periodontal treatment. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 47, n. 1, p. 15-26, Feb. 2012.

DOCK, D. B.; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; LATORRACA, M. Q. Probiotics enhance the recovery of gut atrophy in experimental malnutrition. **Biocell**, Mendoza, v. 28, n. 2, p. 143-50, Aug. 2004.

DRISKO, C. Non-surgical pocket therapy: pharmacotherapeutics. **Annals of Periodontology**, Chicago, v. 1, n. 1, p. 491-566, Dec. 1996.

DUMITRESCU, A. L. et al. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 31, n. 8, p. 596-603, 2004.

EGUCHI, E. C. et al. Fish oil consumption prevents glucose intolerance and hypercorticosteronemia in footshock-stressed rats. **Lipids in Health and Disease**, London, v. 10, n. 1, p. 71-76, Jan. 2011.

FERNANDES, L. A.; GARCIA, V. G.; BOSCO, A. F. Experimental periodontal disease treatment by subgingival irrigation with tetracycline hydrochloride in rats. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 18, n. 6, p. 635-640, Dec. 2010.

FERNANDES, M. I. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 216-221, June/Sept. 2007.

FOOD AND HEALTH AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Rome, 2002. 11 p.

GAMEIRO, G. H. et al. The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 82, p. 338-344, Oct. 2005.

GAREAU, M. G.; SILVA, M. A.; PERDUE, M. H. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. **Current Molecular Medicine**, Sharjah, v. 8, n. 4, p. 274-281, June 2008.

GASPERIC, R.; STIBLAR-MARTINCIC, D.; SKALERIC, U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. **European Journal of Oral Sciences**, Copenhagen, v. 110, n. 2, p. 125-129, Apr. 2002.

GAZOLLA, C. M. et al. Evaluation of the incidence of preterm low birth weight in patients undergoing periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, Chicago, vol. 78, n. 5, p. 842-848, May 2007.

GENCO, R. J. et al. Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 70, n. 7, p. 711-723, July 1999.

GIRARD, N. et al. Periodontal health status in a colony of 109 cats. **Journal of Veterinary Dentistry**, Poise, v. 26, n. 3, p. 147-155, 2009.

GLAVIN, G. B. et al. Restraint stress in biomedical research: an update. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 223-249, 1994.

GLICKMAN, L. T. Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 234, n. 4, p. 486-494, Feb. 2009.

HAFFAJEE, A. D. et al. Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters. **Journal of Clinical Dentistry**, Curitiba, v. 20, n. 7, p. 211-217, July 2009.

HALL, J. E. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12th ed. New York: Wiley, 2011. 1120 p.

HARINI, P. M.; ANEGUNDI, R. T. Efficacy of a probiotic and chlorhexidine mouth rinses: a short-term clinical study. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, New Delhi, v. 28, n. 3, p. 179-182, July/Sept. 2010.

HATAKKA, K. et al. Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly: a randomized controlled trial. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 86, n. 2, p. 125-130, Feb. 2007.

HE, X. et al. Achieving probiotic effects via modulating oral microbial ecology. **Advances in Dental Research**, Washington, v. 21, n. 1, p. 53-56, July 2009.

HEROD, E. L. The effect of cheese on dental caries: a review of the literature. **Australian Dental Journal**, North Sydney, v. 36, n. 2, p. 120-125, Apr. 1991.

HOLZAUSEN, M. et al. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 1030-1036, Sept. 2002.

HORNING, G. M.; COHEN, M. E. Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 66, n. 11, p. 990-998, Nov. 1995.

HUANG, S. et al. The role of psychologic stress-induced hypoxia-inducible factor-1 α in rat experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 82, n. 6, p. 934-941, June 2011.

HUGOSON, A.; NORDERYD, O. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 35, n. 8, p. 338-345, Sept. 2008. Supplement.

IRFAN, U. M.; DAWSON, D. V.; BISSADA, N. F. Epidemiology of periodontal disease: a review and clinical perspectives. **Journal of the International Academy of Periodontology**, New Orleans, v. 3, n. 1, p. 14-21, Jan. 2001.

JOHNSON, B. D.; ENGEL, D. Acute necrotizing ulcerative gingivitis: a review of diagnosis, etiology and treatment. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 57, n. 3, p. 141-150, Mar. 1986.

KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 59, n. 3, p. 154-160, June 2001.

KLAUSEN, B.; EVANS, R. T.; SFINTESCU, C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Copenhagen, v. 97, n. 6, p. 494-499, 1989.

KODUGANTI, R. R. et al. Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. **Indian Journal of Dental Research**, New Delhi, v. 22, n. 2, p. 324-330, Mar./Apr. 2011.

KORTEGAARD, H. E.; ERIKSEN, T.; BAELUM, V. J. Periodontal disease in research beagle dogs-an epidemiological study. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 49, n. 12, p. 610-616, Dec. 2008.

KRASSE, P. et al. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. **Swedish Dental Journal**, Stockholm, v. 30, n. 2, p. 55-60, 2006.

KRAYER, J. W.; LEITE, R. S.; KIRKWOOD, K. L. Non-surgical chemotherapeutic treatment strategies for the management of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 54, n. 1, p. 13-33, Jan. 2010.

LENOIR-WIJNKOOP, I. et al. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. **Nutrition Reviews**, New York, v. 65, n. 11, p. 469-489, Nov. 2007.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 846 p.

LOOS, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 76, n. 11, p. 2106-2115, Nov. 2005. Supplement.

LOPES, B. M. et al. Clinical and microbiologic follow-up evaluations after non-surgical periodontal treatment with erbium: YAG laser and scaling and root planing. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 81, n. 5, p. 682-691, May 2010.

LÓPEZ, N. J.; GAMONAL, J. A.; MARTINEZ, B. Repeated metronidazole and amoxicillin treatment of periodontitis: a follow-up study. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 71, n. 1, p. 78-89, Jan. 2000.

LYTE, M.; VULCHANOVA, L.; BROWN, D. R. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. **Cell and Tissue Research**, New York, v. 343, n. 1, p. 23-32, Jan. 2011.

MAYANAGI, G. et al. Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus salivarius* WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 506-513, June 2009.

MICHAUD, D. S. et al. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v. 99, n. 1, p. 171-175, Jan. 2007.

MIYAUCHIA, M. et al. Immuno-localization of COX-1 and COX-2 in the rat molar periodontal tissue after topical application of lipopolysaccharide. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 49, n. 9, p. 739-746, Sept. 2004.

MOUSOPOULOS, N. M.; MADIANOS, P. N. Low-grade inflammation in chronic infectious diseases: paradigm of periodontal infections. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, n. 1088, p. 251-264, Nov. 2006.

NAKAJIMA, K. et al. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental rat model. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 41, n. 6, p. 527-534, Dec. 2006.

ORINGER, R. J. Modulation of the host response in periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 73, n. 6, p. 460-470, June 2009.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2011, n. 1, p. 1-8, Feb. 2011.

PAGNINIA, C. et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 1, p. 454-459, Jan. 2010.

PARK, S. Y. et al. Heme oxygenase-1 signals are involved in preferential inhibition of pro-inflammatory cytokine release by surfactin in cells activated with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 188, n. 3, p. 437-445, Dec. 2010.

PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, Jan. 2006.

PAULMYER-LACROIX, O. et al. Themodulatory role of estrogens on corticotrophin releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of ovariectomised rats: role of adrenal gland. **Journal of Neuroendocrinology**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 515-519, 1996.

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

RIVER, C. Gender, sex steroids, corticotropin-releasing factor, nitric oxide and HPA response to stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Fayetteville, v. 64, n. 4, p. 739-751, Dec. 1999.

SAVAGE, A. et al. A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 36, n. 6, p. 458-467, June 2009.

SELVAM, R. et al. Effect of *Bacillus subtilis* PB6, a natural probiotic on colon mucosal inflammation and plasma cytokines levels in inflammatory bowel disease. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 46, n. 1, p. 79-85, Feb. 2009.

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

_____. Methodological model of chronic stress associated with ligature-induced periodontitis in rats: a radiographic study. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 24, n. 4, p. 455-459, Oct./Dec. 2010.

SEYMOUR, G. J. Relationship between periodontal infections and systemic disease. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 4, p. 3-10, Oct. 2007.

SHIMAUCHI, H. et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 35, n. 10, p. 897-905, Aug. 2008.

SUSIN, C.; RÖSING, C. K. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 61, n. 5, p. 273-277, Oct. 2003.

SUTANTO, W.; KLOET, E. R. The use of various animal models in study of stress and stress-related phenomena. **Laboratory Animals**, London, v. 28, n. 4, p. 293-306, Aug. 1994.

TAKADA, T. et al. Effect of restraint stress on the progression of experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 306-315, Feb. 2004.

TEUGHELDS, W. et al. Guiding periodontal pocket recolonization: a proof of concept. **Journal of Dental Research**, Washington, v. 86, n. 11, p. 1078-1082, Nov. 2007.

TOMOFUJI, T. et al. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 80, n. 8, p. 1324-1329, Aug. 2009.

_____. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 80, n. 11, p. 1799-1808, Nov. 2009.

TSUBURA, S. et al. The effect of *Baccilus subtilis* Mouth rinsing in patients with periodontitis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 28, n. 11, p. 1353-1356, Nov. 2009.

WATANOBE, H. et al. Effects of gender and gonadectomy on ACTH response to interleukin-1 beta in the rat: comparison with the modulation of ACTH response to immobilization stress. **Neuroimmunomodulation**, Basel, v. 3, n. 4, p. 254-258, July/Aug. 1996.

WEINBERG, M. A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 335-340, June 1999.

WILDERER, P. A.; CHARAKLIS, W. G. Structure and function of biofilms. **Journal Wiley**, Chichester, v. 50, n. 3, p. 5-17, 1989.

YU, J. J. et al. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. **Blood**, New York, v. 109, n. 9, p. 3794-3802, May 2007.

ANEXOS

Tabela 1A Variável analisada: RX

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	554,3580	554,3580	23,4715	0,0000
Estresse (E)	1	264,5923	264,5923	11,2028	0,0019
Doença (D)	1	4300,5021	4300,5021	182,0828	0,0000
P*E	1	139,9544	139,9544	5,9257	0,0199
P*D	1	235,2200	235,2200	9,9592	0,0032
E*D	1	9,0981	9,0981	0,3852	0,5386
P*D*D	1	0,0935	0,0935	0,0040	0,9502
erro	37	873,8805	23,6184		
CV %	10,08				

Tabela 2A Variável analisada: MORFOM

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	0,0049	0,0049	0,7716	0,3902
Estresse (E)	1	0,0065	0,0065	1,0222	0,3241
Doença (D)	1	0,2927	0,2927	46,0869	0,0000
P*E	1	0,0049	0,0049	0,7653	0,3921
P*D	1	0,0221	0,0221	3,4862	0,0766
E*D	1	0,0073	0,0073	1,1417	0,2980
P*D*D	1	0,0334	0,0334	5,2510	0,0329
erro	20	0,1270	0,0064		
CV %	9,20				

Tabela 3A HistSPO

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	73,6424	73,6424	2,2718	0,1438
Estresse (E)	1	83,2517	83,2517	2,5683	0,1211
Doença (D)	1	11924,5567	11924,5567	367,8640	0,0000
P*E	1	5,4454	5,4454	0,1680	0,6853
P*D	1	217,7953	217,7953	6,7188	0,0154
E*D	1	33,6500	33,6500	1,0381	0,3177
P*D*D	1	269,5730	269,5730	8,3161	0,0078
erro	26	842,8073	32,4157		
CV %	12,81				

Tabela 4A Variável analisada: HISTPOA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	0,0362	0,0362	0,3112	0,5817
Estresse (E)	1	0,0219	0,0219	0,1882	0,6680
Doença (D)	1	66,4898	66,4898	571,7098	0,0000
P*E	1	0,1043	0,1043	0,8971	0,3523
P*D	1	0,5302	0,5302	4,5586	0,0423
E*D	1	0,0185	0,0185	0,1591	0,6933
P*D*D	1	0,8267	0,8267	7,1079	0,0130
erro	26	3,0238	0,1163		
CV %	15,97				

Tabela 5A Variável analisada: HISTPIE

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	0,0161	0,0161	0,8497	0,3651
Estresse (E)	1	0,0611	0,0611	3,2291	0,0840
Doença (D)	1	17,8634	17,8634	943,7675	0,0000
P*E	1	0,0337	0,0337	1,7809	0,1936
P*D	1	0,2558	0,2558	13,5158	0,0011
E*D	1	0,0005	0,0005	0,0264	0,8721
P*D*D	1	0,0589	0,0589	3,1092	0,0896
erro	26	0,4921	0,0189		
CV %	22,69				

Tabela 6A Variável analisada: GLICEMIA

Opção de transformação: Raiz quadrada - SQRT (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	1,1365	1,1365	1,3344	0,2549
Estresse (E)	1	6,6290	6,6290	7,7833	0,0080
Doença (D)	1	0,0088	0,0088	0,0103	0,9197
P*E	1	0,1766	0,1766	0,2073	0,6514
P*D	1	1,3948	1,3948	1,6376	0,2080
E*D	1	2,6645	2,6645	3,1285	0,0846
P*D*D	1	0,0612	0,0612	0,0719	0,7900
erro	40	34,0677	0,8517		
CV %	9,02				

Tabela 7A Variável analisada: GPMD

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

FV	GL	SQ	QM	F	P>F
Probiótico (P)	1	0,6125	0,6125	3,0936	0,1041
Estresse (E)	1	0,2476	0,2476	1,2506	0,2853
Doença (D)	1	0,1267	0,1267	0,6400	0,4392
P*E	1	0,7592	0,7592	3,8346	0,0739
P*D	1	0,0524	0,0524	0,2648	0,6162
E*D	1	0,2971	0,2971	1,5006	0,2441
P*D*D	1	0,0784	0,0784	0,3959	0,5410
erro	12	2,3759	0,1980		
CV %	11,88				