

Efeito do Exercício Físico Sobre o Perfil Hematológico de Ratos Wistar com Infecção Oral Induzida

Evaluate the Effect of Physical Exercise on the Blood Profile of Wistar Rats with Induced Oral Infection

Natalino Francisco da Silva^a; Tereza Aparecida Delle Vedove Semenoff^a; Álvaro Henrique Borges^a; Antônio Marcos da Silva Nobreza^b; Fábio Augusto Buche Barros^b; Alex Semenoff Segundo^{a*}

^aUniversidade de Cuiabá, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Odontológicas Integradas, MT, Brasil

^bUniversidade de Cuiabá, Curso de Odontologia, MT, Brasil

*E-mail: semenoff@uol.com.br

Recebido: 09 de junho de 2015; Aceito: 14 de setembro de 2015

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito do exercício físico sobre o perfil hematológico de ratos Wistar com infecção oral induzida. Para este estudo, foram utilizados 24 ratos machos adultos - *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar. Os animais foram divididos em três grupos experimentais (8 em cada grupo): grupo sedentário associado à infecção (GI), grupo exercício associado à infecção (GIE) e grupo controle (GC). A doença periodontal apical e marginal foi induzida nos grupos GI e GIE através da colocação de fio de seda em torno do segundo molar superior direito (para periodontite marginal), e através da perfuração do primeiro molar inferior esquerdo (para periodontite apical). Os animais dos grupos GIE foram submetidos à natação por 60 minutos diários, cinco vezes por semana, durante oito semanas. Após este período de exercício, todos os animais foram submetidos à anestesia e amostras de sangue foram coletadas para a análise hematológica. Os resultados do estudo demonstram que os únicos parâmetros que apresentaram diferenças estatísticas foram os níveis hematimétricos (hemácias, hemoglobina e hematócrito) e contagem de linfócitos. Melhores resultados foram observados para o grupo que passou por exercício físico com infecção oral induzida, quando comparado aos grupos sem exercício físico com infecção oral induzida e grupo controle ($p < 0,05$). Considera-se que o exercício físico foi capaz de aumentar alguns parâmetros hematológicos diante de infecção oral induzida.

Palavras-chave: Exercício. Hematologia. Doenças Periodontais. Endodontia.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of physical exercise on the blood profile of Wistar rats with oral induced infection. To perform this study, 24 adults male rats - Rattus norvegicus Wistar were used. The animals were divided into three experimental groups (8 in each group): sedentary group associated with infection (GI), exercise group associated with infection (GIE) and control group (CG). The apical and marginal periodontal disease was induced in GI and GIE groups through the silk thread placed around the second upper right molar (for marginal periodontitis), and through the drilling of the first lower left molar (for apical periodontitis). The GIE animal groups were submitted to swimming for 60 minutes daily, five times per week for eight weeks. After this period, all animals underwent anesthesia and blood samples were collected for hematological analysis. The results demonstrated that the parameters with significant differences were RBC levels (erythrocytes, hemoglobin and hematocrit) and lymphocyte count. Better results were observed for the group that underwent physical exercise induced periodontitis, when compared to groups without exercise with induced periodontitis and control group ($p < 0.05$). It is concluded that exercise was able to increase some hematological parameters before induced oral infection.

Keywords: Exercise. Hematology. Periodontal Diseases. Endodontics.

1 Introdução

A atividade física regular é reconhecida e testada em vários ensaios como auxiliar na diminuição do processo inflamatório no corpo¹. Além disso, liga-se a uma melhora significativa no metabolismo funcional energético². Outro aspecto relevante é que a atividade física pode ser utilizada como prevenção primária de doenças crônicas e, mesmo na presença de doenças crônicas que atingem estágios avançados, pode auxiliar na reparação destas morbidades³. Estudos demonstram que o exercício físico crônico e sistematizado é capaz de promover um efeito anti-inflamatório no periodonto marginal e a outras partes do corpo⁴. Esta condição parece diminuir indicadores sistêmicos relevantes, porque com a produção de citocinas anti-inflamatórias, ocorre a melhora do efeito antioxidante e a redução dos níveis de proteção de

proteína C-reativa e Fibrinogênio.

Sabe-se que as doenças orais são imuno-inflamatórias, com repercussões sistêmicas e manifestações locais como o sangramento gengival e dor, levando inclusive a perda da função⁵; em algumas situações a doença pode evoluir para um comprometimento sistêmico como a febre, adenopatia, debilidade respiratória e em algumas vezes até mesmo a morte⁶. Esta enfermidade acomete grande parcela da população⁷, além disso, tem impacto direto na qualidade de vida⁸.

As estruturas orais são dinâmicas e compostas por tecidos que apoiam e envolvem o dente. Esses tecidos incluem a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar. Os suprimentos vasculares e o sistema nervoso também são vitais ao funcionamento normal dos tecidos periodontais⁹.

A enfermidade periodontal pode levar à destruição

irreversível dos tecidos circundantes do dente, conduzindo a perda do elemento dental. Esse dano decorre de uma infecção organizada em forma de biofilme dental⁶, que por sua vez, produz respostas sistêmicas detectáveis inclusive por exames laboratoriais comumente usados na prática médica¹⁰.

As células do sistema imune são especializadas em fazer a defesa do organismo contra os agentes infecciosos, assim cada uma desempenha seu papel no combate aos processos inflamatórios. Quando células imunes são encontradas em número aumentado, principalmente leucócitos e macrófagos, constata-se que há um processo infeccioso no organismo¹¹.

Diante do exposto, nota-se que há relação direta entre a atividade física e a resposta imuno-inflamatória. Desta forma, neste estudo, buscou-se melhor compreender o efeito do exercício físico sobre os parâmetros hematológicos em ratos Wistar com indução de infecção oral.

2 Material e Métodos

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as políticas apresentadas pelo *American College of Sport Medicine on Research with Experimental Animals*. Para este estudo, foram utilizados 24 ratos machos adultos - *Rattus Norvegicus* da linhagem Wistar - com peso aproximado de 240 gramas. Estes foram obtidos a partir do Biotério Central da Universidade de Cuiabá - UNIC. Os animais foram mantidos em ambiente submetido a ciclo claro/escuro, temperatura controlada em $\pm 23^{\circ}\text{C}$, umidade entre 40 a 60%, com ração e água *ad libitum*. Os mesmos foram aleatoriamente divididos em grupos comoito animais em suas caixas moradias.

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade de Cuiabá - Unic, sob o número de protocolo 003/2014.

2.1 Grupos envolvidos no estudo

Os animais foram divididos igualmente em três grupos experimentais: Grupo sedentário associado à infecção - GI, Grupo exercício associado à infecção - GIE e Grupo controle - GC. O cálculo amostral baseou-se em outros trabalhos do mesmo grupo de pesquisa e pelo *American College of Sport Medicine on Research with Experimental Animals*.

2.2 Indução de infecção oral

As infecções periodontal marginal e apical foram induzidas nos grupos GI e GIE. Para tanto, os animais foram anestesiados por administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de Ketamina (Dopalen, Agribrands. Saúde Animal, Paulínia - SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de Xylazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo - SP, Brasil), para cada 100 g de peso corporal.

Após o procedimento de anestesia, primeiramente foi induzida a periodontite marginal, no qual colocou-se um fio de sutura de seda estéril, número 4 (ETHICON, Johnson e Johnson, São Paulo - SP, Brasil) envolvendo o segundo molar superior direito de cada rato. Para a indução da periodontite

apical, foi selecionada uma broca diamantada e esférica 1010 (1010-KG - Sorensen, Cotia - SP, Brasil), afixada em uma caneta de alta rotação (Dabi-Atlante, Ribeirão Preto - SP, Brasil), refrigerada com água, realizando a abertura coronária do primeiro molar inferior esquerdo até alcançar a câmara pulpar.

Ao término dos procedimentos, cada rato foi colocado em sua caixa moradia e observado por tempo determinado até que passasse o efeito da anestesia.

2.3 Protocolo de exercício físico

O exercício utilizado teve como referência o protocolo da Sociedade Americana de Fisiologia *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocol*¹², sendo dividido em dois períodos: adaptação e treinamento.

2.4 Período de exercício 1: adaptação

Os animais do grupo GIE foram inicialmente adaptados à natação com o objetivo de reduzir o estresse, sem promover treinamento. A montagem da estrutura física, utilizada para a adaptação e o treinamento, foi feita através de um tanque modificado (1000 m³ de dimensão) com divisórias cilíndricas (tubos de PVC), com medida de 50 cm de profundidade e 25 cm de diâmetro. Esta estrutura possibilitou a natação dos animais de forma individualizada, evitando o contato de uns com os outros, para não interferir no exercício físico de cada indivíduo. Neste período, os procedimentos foram feitos em água rasa por 60 minutos diários, cinco dias por semana, durante duas semanas.

2.5 Período de exercício 2: treinamento

O período de exercício 2 teve início na semana seguinte ao período de adaptação. Neste período, colocaram-se os ratos para nadar durante 60 minutos diários, realizado cinco dias seguidos por semana, com um período de intervalo de dois dias de descanso. No total o protocolo utilizado durou oito semanas^{3,13}. Observando fadiga por parte dos animais, os mesmos eram retirados da sessão, evitando o afogamento e possíveis perdas.

Todo primeiro dia da semana, os animais eram pesados para avaliação de massa corporal e realização do cálculo de proporções das cargas, que foi sempre de 8% da massa corporal. No início de cada nova semana, os animais foram novamente pesados e ajustados os 8% de carga proporcional ao seu peso. Para a carga, utilizou-se chumbos de pesca, que foram colocados dentro de um tecido, e adaptado ao corpo do animal tomando o cuidado de não dificultar sua mobilidade e conforto durante a sessão de exercício.

A água utilizada neste protocolo foi corrente não filtrada, mantida na temperatura de ± 31 por meio de aquecedor adaptado. Dois observadores treinados monitoraram as sessões de exercício, com objetivo de evitar tanto a exaustão física dos animais quanto possíveis afogamentos.

Em cada sessão de exercício, objetivou-se manter os

animais exercitando dentro do prazo máximo de 60 minutos. No decorrer deste tempo, observando-se a exaustão de algum rato e submersão de seu crânio na água até 3 segundos, imediatamente retirava-se o rato do tanque, determinando o fim da sua sessão. Sempre após o treinamento, os animais foram cuidadosamente enxutos e aquecidos antes de retornarem para suas caixas moradias.

2.6 Coleta das amostras

Depois de oito semanas de início do experimento, os animais foram anestesiados, através da injeção intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de Ketamina (Dopalen, Agribands, Saúde Animal, Paulínia-SP, Brasil) associado a 0,05 mL de cloridrato de Xylazina (Rompun, Bayer, Saúde Animal, São Paulo-SP, Brasil) por 100g de peso corporal. Após a administração da anestesia, a pele da parede abdominal foi seccionada na base do abdômen, na diagonal, em forma de “V”. Após o levantamento da parede abdominal, o acesso à cavidade abdominal foi obtido. Os órgãos internos foram levemente deslocados para permitir a visualização da veia cava posterior. O sangue foi colhido por punção venosa de uma agulha 24x7 (Vacutainer - Becton Dickinson, Plymouth, UK) na quantidade de mais ou menos 5 ml, que foi dividida em dois tubos. No primeiro tubo, contendo anticoagulante EDTA, inseriu-se 3 ml de sangue que foi cuidadosamente homogeneizada para a não coagulação e consequente perda das amostras. No segundo tubo, inseriu-se 2 ml restantes de sangue para realizar o exame de albumina e de proteína C-reativa³.

Imediatamente após este procedimento, realizou-se a

eutanásia dos animais através de excesso de anestésico.

2.7 Processamento hematológico

Após a coleta, levou-se as amostras para laboratório especializado em exames hematológicos e bioquímicos com a finalidade de se obter os seguintes parâmetros: contagem total de eritrócitos; leucócitos totais e diferenciais; dosagem de hemoglobina e hematócritos.

O hematócrito foi determinado pelo método do microhematócrito com mesa de leitura (Coleman, Santo André-SP, Brasil). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através da análise dos esfregaços sanguíneos em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de imersão. Para as medições de hemoglobina, utilizou-se o método foto colorimétrico por meio de um espectrofotômetro (Femto 700S, São Paulo-SP, Brasil), diluindo-se as amostras em Drakin líquido (Newprov, Pinhais-PR, Brasil), e a calibração foi feita com uma solução padrão de hemoglobina (Bioclin-Quibasa, Belo Horizonte-MG, Brasil). As análises bioquímicas do sangue foram feitas por foto colorímetro clínico BTS 310 (Biossystem).

Inicialmente avaliou-se a normalidade dos dados. Em ato contínuo, procedeu-se a aplicação do teste Anova Post Roc Tukey.

3 Resultados e Discussão

Os resultados do trabalho demonstram que, para os grupos GC, GI e GIE, não houve diferenças estatísticas entre si para as variáveis mielócitos, metamielócitos, bastonetes, basófilos, monócitos, VCM, CHCM, leucócitos totais e diferenciais ($p > 0,05$) (Quadro 1).

Quadro 1: Refere-se aos resultados dos Hemogramas do estudo

Parâmetros	Grupo Controle		Grupo Exercício + Infecção		Grupo Infecção	
	Média	±	Média	±	Média	±
Hemácias	7,89 ^a	0,36	8,75 ^b	0,44	8,21 ^a	0,30
Hemoglobina	15,26 ^a	0,78	17,17 ^b	0,77	15,95 ^a	0,53
Hematócrito	45,25 ^a	1,98	51 ^b	2	48,14 ^b	2,67
VCM	57,35 ^a	1,20	58,35 ^a	3,53	58,67	3,55
CHCM	33,71 ^a	0,58	33,70 ^a	1,56	33,21 ^a	1,31
Leucócitos	3625 ^a	1978,99	5300 ^a	1039,23	5028,57 ^a	1425,61
Mielócitos	0 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a	0
Metamielócitos	0 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a	0
Bastonetes	0 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a	0
Segmentados	1065,87 ^a	587,13	1162,75 ^a	2750,1	1486 ^a	612,21
Eosinófilos	51,87 ^a	49,28	35,25 ^a	43,12	48,71 ^a	63,31
Basófilos	0 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a	0
Linfócitos	2506,62 ^a	1426	4102 ^a	850,54	3493,85 ^b	878,22
Monócitos	0 ^a	0	0 ^a	0	0 ^a	0
Plaquetas	582 ^a	219,29	551,25 ^a	80,30	566,14 ^a	88,24
PPT	6,77 ^a	0,47	7,07 ^a	0,50	6,97 ^a	0,29

Letras diferentes em colunas demonstram diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Para as variáveis Hemácias e Hemoglobina, os dados demonstram que o GIE apresentou-se com maior quantidade destes tipos celulares na corrente sanguínea, quando comparado ao GI e GC ($p < 0,05$). O GC e GI não tiveram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$). O Hematócrito demonstrou resultado em parte semelhante ao das Hemácias e da Hemoglobina, ou seja, o GIE foi semelhante ao grupo GI, mas ambos diferenciaram-se do GC ($p < 0,05$) (Quadro 1).

O tipo celular linfócito demonstra que para o GIE houve maior quantidade deste tipo celular, com diferenças significativas apenas quando comparado ao GC ($p < 0,05$). Os grupos GIE e GI não se apresentaram diferenças entre si ($p > 0,05$) (Quadro 1).

Os resultados demonstram que a maioria das variáveis incluídas não diferiu estatisticamente entre os grupos envolvidos no estudo. Os itens hematológicos que demonstraram diferenças foram hemácias, hemoglobina e linfócitos, indicando que o exercício físico parece interferir, aumentando estes tipos celulares quando comparado com os demais grupos sedentários. O nível de hematócrito aumentou para ambos os grupos, que tiveram indução de periodontite quando comparados ao GC.

Este estudo buscou, através de um modelo de indução de infecção bucal associado ao exercício físico modular, indicadores sanguíneos estabelecidos na literatura. Há evidências que a periodontite marginal e apical modificam indicadores sistêmicos sanguíneos¹⁴, inclusive como os utilizados no estudo¹⁵. Da mesma forma, o exercício físico demonstra os mesmos achados². Assim buscar informações das patologias associadas torna-se interessante.

O foco de infecção das doenças orais produz mudanças sistêmicas na microcirculação¹⁶ e na macrocirculação¹⁷, portanto foi estabelecido um protocolo de exercício físico com objetivo de compreender quais as variáveis sanguíneas podem sofrer modificações em exames de rotina e com baixo custo. Além disso, resultados amplamente encontrados na literatura subsidiam estas informações¹⁸.

O modelo de indução de doença periodontal é amplamente usado¹⁹. Com este padrão de estudo, é possível compreender o desfecho do foco de infecção nas estruturas em torno do dente²⁰. Além disso, o protocolo de exercício proposto é estabelecido na literatura¹³, sendo inclusive validado com exames hematológicos e bioquímicos²¹. Apesar de seguir todos os padrões estabelecidos pelo protocolo e tomar todos os cuidados em relação aos animais, infelizmente houve a perda de um animal durante o exercício de natação.

Os resultados do estudo demonstram que as variáveis hemácias, hemoglobina, hematócrito e linfócitos estiveram aumentadas no grupo submetido ao exercício físico- GIE quando comparadas aos grupos controle - GC e sedentário - GI. Sabe-se que os eritrócitos estão intimamente relacionados com a oxigenação dos tecidos com várias patologias²². O fato de estarem aumentadas sugere que o modelo experimental de exercício físico foi satisfatório. Além disso, a literatura

estabelece relação entre anemia e a progressão de periodontite²³ que, quando tratada, promove o aumento da quantidade destas hemácias. No nosso estudo, foi possível perceber que o exercício físico foi capaz de aumentar o número de hemácias, de forma semelhante a outros resultados encontrados¹⁴, mesmo na presença de infecção bucal. Houve alteração com aumento do número de linfócitos em ambos os grupos que receberam a indução de periodontite por ligadura e exposição pulpar. Além de evidenciar que a infecção repercutiu no modelo escolhido no estudo, a periodontite parece ter produzido uma resposta específica característica de infecções crônicas¹⁶.

Novamente, torna-se importante entender a hipótese do estudo. Através do exercício físico, sabe-se que é capaz de diminuir a inflamação sistêmica em indicadores inflamatórios. Neste caso, a escolha da periodontite é porque é uma doença com impacto sistêmico²⁴, induz a resposta inata e específica²⁵ e ainda interfere diretamente na qualidade de vida das pessoas⁸. Assim, apesar deste estudo não demonstrar mudanças significativas em vários itens do hemograma, faz-se necessário outros estudos para a obtenção de mais informações relacionadas ao tema deste estudo.

4 Conclusão

Este estudo verificou que poucas modificações foram observadas no hemograma, apesar dos animais estarem condicionados fisicamente.

Referencias

1. Kruk J. Physical activity in the prevention of the most frequent chronic diseases: an analysis of the recent evidence. *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8(3):325-38.
2. Abramson JL, Vaccarino V. Relationship between physical activity and inflammation among apparently healthy middle-aged and older US adults. *Arch Intern Med* 2002;162(11):1286-92.
3. Nunes RB, Tonetto M, Machado N. Physical exercise improves plasmatic levels of IL-10, left ventricular end-diastolic pressure, and muscle lipid peroxidation in chronic heart failure rats. *J Appl Physiol* 2008;10(4):1641-7.
4. Sanders AE, Slade GD, Fitzsimmon TR, Bartold PM. Physical activity, inflammatory biomarkers in gingival crevicular fluid and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009;(36):388-97.
5. Milosavljevic A, Götrick B, Hallström H, Jansson H, Knutsson K. Different treatment strategies are applied to patients with the same periodontal status in general dentistry. *Acta Odontol Scand* 2013;72(4):290-7.
6. Beikler T, Flemming TF. Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol* 2000 2011;55(1):87-103.
7. Giannobile WV, Braun TM, Caplis AK, Doucette-Stamm L, Duff GW, Kornman KS. Patient stratification for preventive care in dentistry. *J Dental Res* 2013;92(8):694-701.
8. Durham J, Fraser HM, McCracken GI, Stone KM, John MT, Preshaw PM. Impact of periodontitis on oral health-related quality of life. *J Dent* 2013;41(4):370-6.
9. Semenoff-Segundo A, Delle Vedove Semenoff TA, Borges ÁH, Pedro FL, Caporossi LS, Bosco AF. The influence of chronic stress imposed on pregnant rats on the induced bone

- loss in their adult offspring. *Arch Oral Biol* 2012;57(5):477-82.
10. Telgi RL, Tandon V, Tangade PS, Tirth A, Kumar S, Yadav V. Efficacy of nonsurgical periodontal therapy on glycaemic control in type II diabetic patients: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontal Implant Sci* 2013;43(4):177-82.
 11. Katagiri S, Nitta H, Nagasawa T, Izumi Y, Kanazawa M, Matsuo A, *et al.* Effect of glycemic control on periodontitis in type 2 diabetic patients with periodontal disease. *J Diabetes Investig* 2013;4(3):320-5.
 12. Kregel KC. American Physiological Society. 2006. [acesso em 11 jul. 2015]. Disponível em <<http://www.theaps.org/mm/SciencePolicy/AnimalResearch/Publications/Animal-Exercise-Protocols>>.
 13. Voltarelli FA, Gobatto CA, Mello MARde. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res* 2002;35(11):1389-94.
 14. Carvalho AA, Farsura PP, Bastos MG, Vilela EM. Influence of non-surgical periodontal treatment on hematological and biochemical parameters of patients with chronic renal failure in pre-dialysis. *Rev Periodontia* 2011;21(1):27-33.
 15. Caporossi LS, Silva Arda, Semenoff TADV, Pedro FMP, Borges AH, Semenoff-Segundo A. Effect of two models of stress associated with ligature-induced periodontitis on hematological parameters in rats / Efeito de dois modelos de estresse associados à periodontite induzida por ligadura sobre parâmetros hematológicos em ratos. *Rev Odonto Ciênc* 2010;25(4):371-5.
 16. Blum A, Front E, Peleg A. Periodontal care may improve systemic inflammation. *Clin Invest Med* 2007;30(3):E114-7.
 17. Blum A, Kryuger K, Mashiach Eizenberg M, Tatour S, Vigder F, Laster Z *et al.* Periodontal care may improve endothelial function. *Eur J Intern Med* 2007;18(4):295-8.
 18. Sugiura H, Nishida H, Sugiura H, Mirbod SM. Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiol Scand* 2002;174(3):247-56.
 19. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J* 2010;4:37-47. doi: 10.2174/1874210601004010037.
 20. Machado WM, Prestes AP, Costa TP, Mendes RT, Olchanheski LR Jr, Sordi R *et al.* The effect of simvastatin on systemic inflammation and endothelial dysfunction induced by periodontitis. *J Periodontal Res* 2014;49(5):634-41.
 21. Hara C, Manabe K, Ogawa N. Influence of activity-stress on thymus, spleen and adrenal weights of rats: possibility for an immunodeficiency model. *Physiol Behav* 1981;27(2):243-8.
 22. Pradeep AR, Anuj S. Anemia of chronic disease and chronic periodontitis: does periodontal therapy have an effect on anemic status? *J periodontol* 2011;82(3):388-94.
 23. Pizzo G, Guiglia R, Lo Russo L, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Eur J Intern Med* 2010;21(6):496-502.
 24. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997;(14):9-11.
 25. Segundo AS, Hennemann K, Fontanella VR, Rösing C. The role of psychoneuroimmune interactions in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *J Int Acad Periodontol* 2007;9(1):26-31.