

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES
MORFOLÓGICAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL E
OSSO ALVEOLAR DO RATO SUJEITO A RUÍDO DE
BAIXA FREQUÊNCIA**

JOSÉ JOÃO BALTAZAR MENDES

Tese de doutoramento em Ciências Biomédicas
2009

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO LIGAMENTO
PERIODONTAL E OSSO ALVEOLAR DO RATO SUJEITO A RUÍDO DE BAIXA
FREQUÊNCIA**

JOSÉ JOÃO BALTAZAR MENDES

**CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DO
LIGAMENTO PERIODONTAL E OSSO ALVEOLAR DO RATO
SUJEITO A RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA**

Tese de Candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientação científica pelo Professor Doutor José Martins dos Santos, professor catedrático do Instituto de Ciências da Saúde Egas Moniz e co-orientação pelo Professor Doutor Artur Águas, professor catedrático do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

À Mariana e à Maria Inês
À Sofia

“Escolhe um trabalho que amas e não terás que trabalhar um único dia na tua vida.”

Confúcio

“Os dias prósperos não vêm ao acaso; são granjeados, como as searas, com muita fadiga e com muitos intervalos de desalento.”

Camilo Castelo Branco

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	7
I. INTRODUÇÃO	15
RUÍDO E SAÚDE: PERSPECTIVA HISTÓRICA	17
EFEITOS NÃO AUDITIVOS DO RUÍDO: ALTERAÇÕES DO PERIODONTO	21
DEFINIÇÕES E CONCEITOS DE SOM E RUÍDO	23
O RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA	23
NÍVEL SONORO	24
FREQUÊNCIA E COMPRIMENTO DE ONDA	24
ATENUAÇÃO E RESSONÂNCIA	25
AVALIAÇÃO DO RUÍDO E CONCEITO DE RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA (RBF)	26
RUÍDO AMBIENTAL E RBF	29
RELAÇÃO DO RUÍDO COM OS TECIDOS BIOLÓGICOS	31
CONCEITO DE DOENÇA VIBROACÚSTICA (DVA)	32
ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA (RBF)	34
Alterações Neurológicas, psicológicas e sensoriais	34
Alterações Cardíacas e vasculares	37
Alterações Respiratórias	39
Alterações Imunológicas e genéticas	40
Alterações Digestivas	41
Alterações da Coagulação e hemostase	43
Alterações Renais e urinárias	43
EMBRIOLOGIA E MORFOLOGIA NORMAL DO PERIODONTO	44
PERIODONTO	44
EMBRIOLOGIA DO PERIODONTO	44
LIGAMENTO PERIODONTAL	47
Matriz extracelular	48
Fibras de colagénio	49
Fibras do sistema elástico	50
OSSO ALVEOLAR	52
OBJECTIVOS DO ESTUDO	54
II. MATERIAL E MÉTODOS	55
MODELO ANIMAL	57
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	57
EXPOSIÇÃO AO RBF	57
MACROSCOPIA - ESTUDO VASCULAR	59
MICROSCOPIA	59
ÓPTICA	59
ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO	60
MORFOMETRIA	60

RECOLHA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS	60
Análise morfométrica - Tempo de exposição ao ruído e efeito sobre as razões de áreas e sobre as razões de perímetros	60
Análise morfométrica - Tempo de exposição ao ruído e efeito sobre a Imunomarcacão para colagénio I, IV e V	62
III. RESULTADOS	65
MICROSCOPIA ÓPTICA	67
CONTROLO	67
GRUPOS EXPOSTOS AO RBF	68
Alterações Fibras do ligamento periodontal	68
Alterações no Cimento	69
Alteração no Osso alveolar	69
Alterações Vasculares	70
IMUNOHISTOQUÍMICA	84
IMUNOHISTOQUÍMICA - ANÁLISE ESTATÍSTICA	90
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES AO NÍVEL DE IMUNOMARCAÇÃO, POR TIPO DE COLAGÉNIO	90
MORFOMETRIA DO LIGAMENTO PERIODONTAL	94
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES ÀS RAZÕES DE ÁREAS E PERÍMETROS DO LIMITE INTERNO E EXTERNO DO LIGAMENTO PERIODONTAL	94
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO	100
CONTROLO	100
GRUPOS EXPOSTOS AO RBF	103
MORFOLOGIA - MACROSCÓPICA - ESTUDO VASCULAR	111
CONTROLO	111
GRUPOS EXPOSTOS AO RBF	111
IV. DISCUSSÃO	115
V. CONCLUSÕES	143
VI. RESUMOS	147
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	171
VIII. ANEXO	209

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Martins dos Santos

Professor, vejo em si a referência.

Tenho uma profunda e reconhecida admiração pela sua competência, capacidade de liderança, disponibilidade, conhecimento e pela sua dedicação constante à pesquisa científica.

Tenho o enorme privilégio de poder contar com a sua amizade. Beneficiar dos seus sábios conselhos.

Muito fica por dizer nesta imperfeita, e curta elocução, um forte abraço do seu amigo, com quem eternamente pode contar,

Muito obrigado.

Ao Professor Doutor Artur Águas

Pela sua postura como Cientista e Académico, tem sido incentivo e fonte de inspiração para o meu trabalho.

Sua constante disponibilidade e rigor foram essenciais na interpretação das imagens de microscopia electrónica de transmissão e análise dos resultados.

Pela confiança em mim depositada,

O meu muito obrigado.

Gostaríamos de deixar o nosso sentido agradecimento a todos os que nos ajudaram a levar por diante a concretização deste trabalho e muito especialmente:

Ao Professor Doutor Nuno Grande, referência incontornável das Ciências Médicas em Portugal, de quem pudemos ter privilégio do acompanhamento inicial deste trabalho com a sua orientação e conselhos que são verdadeira sabedoria.

À Professora Doutora Maria João Oliveira que acompanhou e enriqueceu este trabalho na apresentação de primeiro ano.

Ao Dr. Castelo Branco a quem muito devemos e a quem deve ser atribuída a “paternidade” da doença vibroacústica que nos motivou para este estudo.

À Dr.^a Eduarda Monteiro da Silva pelo entusiasmo e empenho que colocou no nosso trabalho. Sem a sua inextinguível ajuda, como anatómo-patologista, este trabalho não teria, certamente, sido possível.

À Professora Doutora Odete Guimarães, pela sua extraordinária ajuda, como anatómo-patologista, na interpretação dos resultados ao nível do osso.

Ao Sr. Emanuel Monteiro do Serviço de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar pelo extraordinário profissionalismo com que preparou toda a Microscopia electrónica de transmissão.

Ao meu colega Professor Doutor Pedro Oliveira pela amizade e companheirismo que demonstrou ao longo das muitas horas de trabalho conjunto no desenvolvimento do protocolo experimental.

À Dr.^a Rita Certã e ao Dr. José Ferreira do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pelo zeloso trabalho das preparações histológicas e imunohistoquímicas para microscopia óptica.

À Eng.^a Mariana Alves-Pereira que tem um absoluto entusiasmo pelo estudo dos efeitos do Ruído de Baixa Frequência sobre os tecidos biológicos e que trouxe novas perspectivas e ideias, algumas das quais ousámos utilizar.

Ao Professor Doutor José Brito pela análise estatística dos resultados morfométricos.

Ao Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz e ao seu director, Professor Doutor Queiroz de Medeiros e ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar e ao

seu director, Professor Doutor António de Sousa Pereira, pelos apoios concedidos para a realização deste projecto.

Ao Professor Doutor Mário Polido, pela amizade e pelas ajudas na revisão do texto.

Ao Sr. Jorge Proença do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz pela aplicada colaboração na manutenção dos animais que utilizamos para este estudo.

Aos meus colegas da Direcção da Clínica Dentária Universitária do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Mestre Ana Delgado e Dr. João Rua pelo incentivo.

Aos meus colegas do Serviço de Anatomia, Professor Doutor Carlos Zagalo, Professor Doutor José Grillo, Professor Doutor Vítor Tavares, Mestre Alzira Cavacas e Mestre António José de Sousa pelo ambiente e pelo espírito de equipa e de entreaajuda.

Aos Directores do Hospital Militar Principal que me acompanharam e incentivaram ao longo dos anos.

Aos meus colaboradores do Serviço de Medicina Dentária e Estomatologia do Hospital Militar Principal pela manutenção da capacidade de resposta do serviço.

Aos meus colegas, sócios e colaboradores, da Clínica D. Manuel I e Instituto Dentário do Alto das Amoreiras pela compreensão ao longo destes anos.

A todos os que de alguma maneira puderam contribuir para a realização deste trabalho.

I. INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

RUÍDO E SAÚDE: PERSPECTIVA HISTÓRICA

A preocupação com o meio ambiente e a sua relação com a saúde não é recente. Há mais de 2500 anos, Hipócrates, através da sua obra “Ares, Água e Lugares”, já atribuía aos desequilíbrios ambientais (incluindo o ruído) a causa de várias doenças (Fernandes, 2003). Durante os últimos dois milénios, diversos eventos acústicos têm sido associados com a perda de audição. A mais antiga referência sobre os efeitos concretos do ruído na audição foi numa observação registada no século I por Plínio, o Velho, no seu trabalho “História Natural”, onde mencionava que as pessoas que viviam perto das cataratas do Nilo apresentavam perda de audição. Também na antiguidade, os gregos, indignados com o ruído, expulsaram os barulhentos ferreiros para fora das cidades. Na Roma antiga, existia legislação relativa ao ruído associado às rodas de ferro dos vagões, que perturbavam o sono das pessoas e em algumas cidades da Europa Medieval as charretes não eram permitidas durante o período nocturno (WHO, 1999).

Em 1700 era publicada em Itália a obra “De Morbis Artificum Diatriba”, do médico Bernardino Ramazzini, que relatava diversas doenças que ocorriam em cerca de 50 profissões que se desenvolviam a partir da transformação de uma sociedade predominantemente agrícola em industrial. Nos finais do século XIX, com a descoberta da máquina a vapor e o início da era industrial, o ruído é reconhecido como um problema de saúde pública, uma vez que as lesões na audição devidas à exposição permanente a ambientes ruidosos são cumulativas e irreversíveis (Carnicelli, 1994).

No seguimento do trabalho de Ramazzini (considerado o pai da Medicina do Trabalho) surgiram diversas referências que correlacionaram o desempenho de determinada actividade profissional com a perda de audição, nomeadamente Fosbroke, em 1831, que referiu a surdez frequente nos ferradores; Wittmarck em 1907 que efectuou um trabalho em que se refere ao efeito histológico do ruído no ouvido; em 1927 McKelvie e Legge que referiram esta patologia nos trabalhadores da indústria têxtil; em 1939 Lars que se referiu aos trabalhadores da indústria naval e em 1946 Krisstensen que referenciou os pilotos de aviação e tripulações dos submarinos (Sanchez *et al.*, 2006).

Actualmente, os programas de conservação da audição estão omnipresentes para a maioria dos trabalhadores expostos ao ruído e parecem ser eficazes na prevenção da perda de audição. A legislação é bastante específica e limita a exposição ao ruído, para níveis sonoros bem definidos, após os quais os trabalhadores devem retirar-se do ambiente ruidoso.

A importância do ouvido humano e de todo o aparelho sensorial e neurológico está patente no seu aperfeiçoamento ao longo de milhões de anos de evolução da espécie humana, no sentido de captar, transmitir e interpretar o fenómeno acústico vibratório.

Apesar da evidência científica demonstrar que fenómenos acústicos afectam mais do que apenas o ouvido, o “ruído”, continua a ser entendido como só sendo nocivo o que é audível (Alves-Pereira *et al.*, 1999).

O ruído não limita a sua acção ao efeito auditivo, e apesar de menos valorizados, há muito que foram notados os efeitos sistémicos do ruído.

Genericamente afirma-se que o ruído pode afectar a saúde mental e física, além de influenciar negativamente a qualidade de execução de múltiplas tarefas. A hipótese do ruído de baixa frequência (RBF) influenciar o desempenho na realização de diversas tarefas laborais foi testada inúmeras vezes (Kyriakides *et al.*, 1977; Landstrom *et al.*, 1991; Persson-Waye *et al.*, 1997; 2001).

As alterações sistémicas não podem, com rigor, ser atribuídas ao ruído de baixa frequência, dado que a sua descrição raramente foi acompanhada de análise espectral, mas invariavelmente todas as conclusões apontam para o facto do ruído ser um agente causal de doença sistémica.

Contudo, desde o século passado, efeitos não auditivos do ruído, “non-auditory effects of noise,” são referidos habitualmente na literatura por múltiplos investigadores.

Em 1928, Laird publicou um dos primeiros estudos sobre os efeitos fisiológicos do ruído em dactilógrafas, concluindo que, trabalhando neste tipo de ambiente ruidoso, existiam custos fisiológicos para os humanos e, desde então, um número elevado de estudos médicos e biomédicos tem surgido na literatura científica (Alves-Pereira, 1999).

Em 1946, E. Dart, médico do trabalho da fábrica de motores de aeronaves da Ford, em Detroit, EUA, descreveu um conjunto de sintomas observados em técnicos de aeronáutica. Em 1953, os efeitos não auditivos do ruído e a sua importância foram

realçados no Relatório Benox (Von Gierke *et al.*, 2002). Rumancev, em 1961, descreveu um quadro de sintomas num grupo de trabalhadores de uma fábrica de betão armado, na União Soviética, relacionando-os com a exposição ao ruído. Cohen, nos Estados Unidos, em 1976, referiu queixas clínicas de trabalhadores de fábricas de caldeiras antes e depois da implementação de um programa de protecção auditiva e enunciou os mesmos sintomas que Dart e Rumancev (Cohen, 1976). Grechkovskaia *et al.* mencionaram uma patologia de “vibroruído” (*vibronoise pathology*) em trabalhadores da indústria aeronáutica em Kiev (Castelo Branco *et al.*, 2004a).

Em Portugal, nas Oficinas Gerais de Material Aeronáutico (OGMA), Castelo Branco iniciou uma linha de investigação, cujo objectivo era relatar alterações sistémicas provocadas pela exposição contínua ao ruído, nomeadamente o aparecimento de movimentos de natureza epiléptica (Castelo Branco *et al.*, 1999a), alterações neurológicas (Pimenta *et al.*, 1999a), que incluíam lesões cerebrais e o aumento na latência da condução nervosa (Pimenta *et al.*, 1999b), decréscimo da cognição (Gomes *et al.*, 1999) e o aparecimento de reflexos arcaicos (Pimenta *et al.*, 1999c). Com a publicação destes estudos clínicos, surgiu a confirmação da existência de efeitos não auditivos do ruído, constituindo estas publicações, um marco assinalável para a relação entre os fenómenos acústicos e diversos sintomas. Todos estes estudos decorreram no mesmo ambiente, levando a outra conclusão assinalável, que se tratava de um ambiente rico em ruído de baixa frequência (RBF) de alta intensidade.

Castelo Branco, como corolário do atrás referido, definiu o conceito de Doença Vibroacústica, como resultado da exposição crónica ao ruído de baixa frequência (Castelo Branco *et al.*, 1999a). Estes estudos clínicos e experimentais, tiveram continuidade em dois pólos distintos no nosso país, inicialmente no Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) e posteriormente, também no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM).

Foram descritas lesões no sistema respiratório – nos pulmões (Grande *et al.*, 1999), na pleura (Sousa Pereira *et al.*, 1999a; Oliveira *et al.*, 1999, 2003a, 2003b), na traqueia (Sousa Pereira *et al.*, 1999b; Oliveira *et al.*, 2002a, 2002b), nos brônquios (Oliveira *et al.*, 2005); alterações imunológicas (Águas *et al.*, 1999a, 1999b); lesões no sistema vascular – em artérias (Martins dos Santos *et al.*, 2002) e linfáticos (Martins dos Santos *et al.*, 2004) no sistema urinário (Martins dos Santos *et al.*, 2005); no sistema digestivo – estômago (da Fonseca *et al.*, 2006a) e no duodeno (da Fonseca *et al.*, 2006b); na glândula parótida (Oliveira *et al.*, 2007) e no periodonto (Mendes *et al.*, 2007).

EFEITOS NÃO AUDITIVOS DO RUÍDO: ALTERAÇÕES DO PERIODONTO

O primeiro estudo efectuado sobre os efeitos do ruído nos tecidos periodontais surgiu em 1975, quando Haskell avaliou três grupos de vinte e cinco militares da *Pensylvania Air National Guard*. O grupo 1 era constituído pelos pilotos de caça F-102, o grupo 2 pelos pilotos, tripulação e pessoal de manutenção dos aviões a hélice C-121, o grupo 3 pelos militares não sujeitos ao ruído, como grupo de controlo. A altura do osso alveolar foi registada em radiografias efectuadas nos três grupos, tendo-se concluído que a maior perda óssea alveolar foi observada nos elementos de tripulação dos aviões a hélice. Este estudo concluiu que havia uma perda de osso alveolar ao longo dos anos, associada à exposição ao ruído e vibração das tripulações dos aviões a hélice e uma perda muito menor nas tripulações dos jactos (Haskell, 1975).

Em 1977, Olof *et al.* realizaram um estudo de *follow-up*, durante dez anos nos militares de voo da Força Aérea Sueca. A perda marginal de osso alveolar mandibular foi examinada com radiografias, sendo estas realizadas a intervalos de cinco anos. A altura do osso alveolar foi comparada com as radiografias efectuadas dez anos mais cedo e a perda era incomparavelmente maior no pessoal de voo. Os autores concluíram que esta perda de osso mandibular poderia estar relacionada com *stress*, alteração da pressão do oxigénio (boca seca, alterações na composição da saliva, aumento da produção de lactobacilos) e com o ruído ou as vibrações (Olof *et al.*, 1977).

Mais recentemente, Pimentel (1988), afirma existir uma relação entre o ruído e a perda de osso alveolar.

Durante muitos anos, pensou-se que a periodontite (doença periodontal) era causada somente por factores locais, sendo o tratamento localizado de sucesso dúbio. Muitos doentes desenvolvem a periodontite de uma forma recorrente e persistente. Actualmente, sabe-se que a periodontite resulta de factores locais e sistémicos e não de um único factor. Factores psicossomáticos, como a ansiedade e o stress, foram reportados como desencadeadores da periodontite. Sendo o ruído um desencadeador do *stress*, terá de ser tido em consideração no aparecimento e desenvolvimento da doença periodontal. O sistema nervoso autónomo exerce um controlo sobre o aporte sanguíneo e nutritivo a todo o organismo, desenvolvendo, como resposta a extensos períodos de tensão emocional, como o *stress*, a vasoconstrição dos vasos sanguíneos. Segundo Haskell

(1975) é possível que a patologia periodontal ocorra como uma resposta a um inadequado aporte de oxigénio, nutrientes ou a uma vasoconstrição contínua.

As alterações morfológicas do periodonto exposto continuamente ao ruído de baixa frequência continuam por estudar, havendo poucos trabalhos publicados, sendo o objectivo principal deste trabalho dar um contributo para a elucidação da acção do RBF sobre o periodonto.

DEFINIÇÕES E CONCEITOS DE SOM E RUÍDO

O RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA

A definição de ruído é uma tarefa complexa, dado, que o ruído, não é apenas um fenómeno físico, tendo várias implicações a nível fisiológico e psicológico.

Do ponto vista fisiológico e psicológico o ruído será todo o som que produza uma sensação auditiva desagradável, incomodativa.

Do ponto de vista físico, pode definir-se ruído, como toda a vibração mecânica de um meio elástico propagada através de um meio sólido, líquido ou gasoso, com velocidade diferente, consoante o meio utilizado na sua propagação (Miguel, 1992).

Os meios de propagação são denominados meios elásticos, por serem capazes de se deformar à passagem das ondas sonoras e restaurar a sua forma original após a passagem das mesmas; qualquer meio material que propague uma onda sonora é considerado elástico. Sendo assim, pode-se afirmar que o som e o ruído correspondem ao mesmo fenómeno físico.

O som pode ser definido como uma variação de pressão passível de identificação pelo ouvido humano. As ondas de pressão sonora, tal como as peças de um dominó, colocadas verticalmente de forma sequencial, propagam-se quando uma partícula de ar imprime movimento à partícula que lhe está mais próxima, alargando-se este movimento até às partículas que estão mais distantes da fonte sonora ou da peça de dominó que iniciou todo o processo.

Dependendo do meio, o som propaga-se a diferentes velocidades. No ar, o som propaga-se a uma velocidade aproximada de 340 m/s, enquanto em meios líquidos e sólidos a velocidade é substancialmente superior, sendo 1500m/s na água e de 5000 m/s no alumínio (Bruehl e Kjaer, 2000).

As principais características de um som são: o nível sonoro; a frequência se for um som puro ou a composição ou espectro se for um som complexo.

NÍVEL SONORO

Qualquer fonte sonora emite uma determinada potência acústica, de características e valor fixo, relacionada com a saída da mesma. As vibrações sonoras originadas pelas fontes têm, no entanto, valores variáveis, dependentes de factores externos, tais como, a distância, a orientação do receptor, variações da temperatura, tipo de local, entre outros.

A intensidade das vibrações sonoras designa-se por *Pressão Sonora* e exprime-se em Newton por metro quadrado (N.m^{-2}) ou Pascal (Pa). A medida da pressão sonora numa escala linear é contudo impraticável, pois compreende cerca de 1 milhão de unidades. Segundo Broch, o limiar da audibilidade a 1000Hz é provocado por uma pressão de 20 μPa , enquanto o limiar da dor ocorre a uma pressão de 100 Pa (Broch, 1973).

O ouvido não responde linearmente aos estímulos, mas sim logaritmicamente. Por estas razões, os parâmetros acústicos são avaliados numa escala logarítmica expressa em decibéis (dB). O decibel é, por definição, o logaritmo da razão entre o valor medido e um valor de referência padronizado, e corresponde à mais pequena variação da *Pressão Sonora* que um ouvido humano normal pode distinguir, em condições normais de audição (Miguel, 1992).

FREQUÊNCIA E COMPRIMENTO DE ONDA

A frequência de uma onda sonora é o número de oscilações que ocorrem por segundo (Hertz). Para uma determinada velocidade, dependente do meio de propagação, a frequência varia inversamente ao comprimento da onda sonora. A velocidade de propagação das ondas sonoras no ar é de cerca de 340 m.s^{-1} . A uma frequência de 10 Hertz (Hz) corresponde um comprimento de onda de 34 m. A 100 Hz corresponde um comprimento de onda de 3,4 m, de acordo com a relação:

$$C = \lambda \cdot f$$

Em que:

C é a velocidade do som

λ é o comprimento de onda expresso em metros

f é a frequência expressa em Hz

A escala de frequências é usualmente, dividida em três grupos:

-infrasons

-gama de frequência audível

-ultrasons

A gama audível compreende os sons cujas frequências vão de 20 a 20000 Hz e, como o seu nome sugere, é susceptível de provocar reacção ao nível da audição humana. Abaixo de 20 Hz situam-se os infrasons e acima de 20000 Hz os ultra-sons (Miguel, 1992).

ATENUAÇÃO E RESSONÂNCIA

O som, ao propagar-se em qualquer meio, como o ar, perde intensidade. Esta atenuação aumenta de forma proporcional ao quadrado da frequência, sendo contudo de realçar que o ruído de baixa frequência está sujeito a uma escassa atenuação, provocando, desta forma, efeitos adversos.

Quando o comprimento de onda atinge o dobro da dimensão do espaço em áreas fechadas ou parcialmente fechadas, ocorre o fenómeno de ressonância. Este fenómeno provoca a redistribuição do som criando áreas de grande intensidade. Um compartimento cujas dimensões se situem entre 0,85 e 8,5 m, facilmente poderá dar origem a fenómenos de ressonância, sendo de realçar que muitas das divisões de uma habitação têm estas dimensões. Nas instalações industriais, as áreas são muito maiores, havendo

no seu interior máquinas com capacidade de produzir ruídos intensos com frequências muito baixas. Para tornar um espaço de grandes dimensões numa zona com propriedades acústicas, devem-se criar aberturas, portas ou janelas para ligar as áreas contíguas, modificando desta forma a ressonância em frequências muito baixas, até à faixa dos infrasons. Frequentemente, as baixas frequências associam-se às vibrações através de fenómenos de ressonância.

Quando estamos perante vibrações que têm origem no ruído de baixa frequência, através dos fenómenos de ressonância, a estimulação é aplicada a todo o corpo humano, sendo no entanto mais intensa no tórax e na cabeça (Mohr *et al.*, 1965; Slarve *et al.*, 1975).

AVALIAÇÃO DO RUÍDO E CONCEITO DE RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA (RBF)

No nosso estudo, utilizamos como critério de ruído de baixa frequência (RBF) o espectro inferior ou igual a 500Hz. No entanto este não é o único critério, havendo outros como o inferior a 250, 200 ou até 100 Hz, que dependem da forma como se efectua a medição do ruído (Takahashi *et al.*, 2005).

Os sons que encontramos habitualmente são sons complexos, com variações de intensidade ao longo do espectro. Os instrumentos utilizados na maioria das avaliações exprimem o som em valor numérico linear (dB), ou seja exprimem o som sob a forma de intensidade. O aparelho habitualmente utilizado para efectuar estas medições utiliza um filtro que capta as frequências de forma a mimetizar o ouvido humano “*A-weighting*”. Os filtros utilizados podem ser de malha A, C, G ou outras, sendo os valores obtidos designados de dB(A), dB(C), dB(G), dependendo do tipo de filtro usado.

A maioria das avaliações do ruído efectua-se com o filtro de malha A, porque a prioridade na protecção contra o ruído está centrada na patologia auditiva. Ao filtro “*A-weighting*” corresponde uma curva de atenuação que cai rapidamente nas frequências inferiores a 500Hz e, conseqüentemente, desvaloriza a intensidade do som nesta faixa. A utilização da escala “*A-weighting*” não permite a medição do ruído com espectro heterogéneo (Hellman *et al.*, 1987). Berglund *et al.*, em 1999, mencionaram explicitamente perante a comunidade científica e autoridades públicas que a utilização da escala dB(A) era desadequada para a avaliação do RBF e chamaram a atenção para a presença de fontes de RBF nas habitações e locais de trabalho.

Nos tempos actuais, existe uma presença generalizada de fontes domésticas e laborais de RBF, sendo as consequências sistémicas da exposição ao ruído, subavaliadas pelos métodos utilizados. As consequências sistémicas do RBF constituem um importante problema de saúde pública (Berglund *et al.*, 1999; Castelo Branco *et al.*, 2005a; Alves-Pereira *et al.*, 2005a). Gradualmente, têm vindo a implementar-se novas recomendações e metodologias (Mirowska, 2001), mas utilizando ainda a escala tradicional de dB(A), que não é a mais adequada (Rushforth *et al.*, 2002; Schust, 2004).

No nosso protocolo experimental optamos por um critério de RBF com o espectro de frequência inferior ou igual a 500 Hz, incluindo os infrasons. Este limite corresponde ao critério mais frequentemente usado e engloba toda a faixa desvalorizada pela avaliação em dB(A). O ambiente acústico escolhido foi aquele que tem a sua expressão linear em dB(A) e dB(L). O dB(L) corresponde ao “Linear Weighting” também designado por Z-weighting e mantém uma atenuação igual entre 10 e 20 000 Hz, sem valorizar ou desvalorizar quaisquer frequências.

Perante os conhecimentos actuais é inevitável a adopção de atitudes preventivas (Alves-Pereira, 2005) e a introdução de terapêuticas para os indivíduos expostos ao RBF, como por exemplo, a administração de anti-oxidantes sugerida por Bletkin e Postnov (2005).

RUÍDO AMBIENTAL E RBF

Castelo Branco *et al.* referiram em 1999, que não existem ambientes puros no que diz respeito ao ruído, sendo comum num determinado ambiente acústico existirem diversas fontes de ruído. Também num documento da OMS de 1980, surge o conceito de que não se poderia relacionar determinado efeito nocivo com um único ruído, mas sim com a exposição de um indivíduo a um ambiente acústico com múltiplas fontes de ruído (WHO, 1980).

Desde a década de 70, surgiram várias referências que relacionam o incómodo com o ruído ambiental (Schultz, 1978; Hall *et al.*, 1985; Fidell *et al.*, 1991; Bradley, 1994; Paulsen *et al.*, 1995; Berglund *et al.*, 1997). A noção de incómodo provocada pelo ruído ambiental pode ser descrita por uma sensação desagradável, associada a um determinado factor, sendo que o indivíduo tem a percepção que esse factor está a interagir sobre ele (Lindvall *et al.*, 1973; Koelega, 1987). Ao ruído ambiental também foram atribuídas responsabilidades por diversas alterações emocionais, nomeadamente, ansiedade, agitação, distração, desapontamento, entre outras (Karpova *et al.*, 1970; Brown *et al.*, 1975; Job, 1993; Fields *et al.*, 1997; Pawlaczyk-Luszczynska *et al.*, 2003).

Nakamura *et al.* (1998) e Inukai *et al.* (2000) elaboraram escalas de resposta em função do incómodo, para estudar especificamente o ruído de baixa frequência. Estes autores concluíram que entre o incómodo sentido como vibração no tórax e a resposta auditiva, a percepção auditiva seria um factor limitante. Não sendo portanto de estranhar que os indivíduos que usavam protecção auditiva e laboravam em ambientes ruidosos de uma forma contínua, manifestassem um acentuar das queixas gástricas, que já previamente referiam (Cohen, 1976). O facto de estes trabalhadores já não estarem aparentemente expostos ao ruído (utilização de protecção auditiva), levava-os a uma maior exposição. Nos países nórdicos (Dinamarca e Suécia), não eram consideradas como valorizáveis as baixas frequências e os infrasons, até que alguns autores consideraram o conceito de incómodo associado ao RBF (Persson-Waye *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, foram publicados diversos trabalhos que valorizam os efeitos da exposição ao ruído, também em função de filtros sensíveis às baixas frequências, que existem no ambiente da nossa sociedade (Ising *et al.*, 2004). Esta mudança de mentalidade surge como consequência da percepção de que existe uma evidente associação entre o ruído ambiental e alterações cognitivas (Miedema *et al.*, 1998), o

desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Babisch, 2000; Passchier-Vermees *et al.*, 2000) e as perturbações do sono (Ising *et al.*, 2002). Bluhm *et al.* (2007) desenvolveram estudos onde demonstraram a correlação entre o ruído ambiental (presente no tráfego rodoviário) e a hipertensão arterial e as perturbações do sono, concluindo que os efeitos do RBF presentes no ruído ambiental devem continuar a ser estudados.

RELAÇÃO DO RUÍDO COM OS TECIDOS BIOLÓGICOS

O aparelho auditivo tem a capacidade de captar a vibração mecânica transportada pelo ar, e interpretá-la como sons se forem percebidos como agradáveis ou como ruído, caso sejam desencadeadores de sensação desagradável.

O som é a sensação produzida quando as vibrações longitudinais das moléculas no meio externo (fases alternadas de condensação e rarefacção das moléculas) incidem sobre a membrana timpânica. Do ponto de vista anatómico, o órgão da audição ou ouvido divide-se em três partes distintas: o ouvido externo, o ouvido médio e o ouvido interno.

Do ponto de vista funcional, o ouvido externo e o ouvido médio estão associados, com a função de captar os sons e transformar a energia acústica em energia mecânica. As ondas sonoras são transformadas pelos tímpanos e ossículos auditivos em movimentos da base do estribo, que produzem movimentos no líquido do ouvido interno. A acção da movimentação do líquido sobre o órgão de Corti gera potenciais de acção nas fibras nervosas (Lonsbury – Martin *et al.*, 2003). A transmissão da vibração aos meios líquidos do ouvido interno pode ser efectuada por outra via, que não a via aérea, através da vibração óssea. Este conhecimento é aplicado clinicamente no teste de Rinne. Este é realizado colocando um diapasão vibrante (512 ou 256 Hz) em contacto com a apófise mastóide, comparando a percepção dos sons transmitidos pela via aérea com a condução óssea (Molins *et al.*, 1980).

Segundo a pesquisa efectuada por Dimaragonas (1990), a teoria da vibração, da música e da acústica foram desenvolvidas de uma forma conjunta no século 5 a.C.. Nessa época descobriu-se que as notas musicais resultavam das características físicas dos instrumentos, não dependendo somente da forma como eram tocados. Este conceito foi definido como frequência natural ou de ressonância de um corpo. Na Grécia antiga, houve a necessidade de desenvolver o isolamento da vibração, nas rodas das carruagens, criando rodas com poucos raios, aros finos e eixos flexíveis. Este tipo de construção permitia maiores velocidades em terrenos acidentados com menores níveis de vibração. O conceito de isolamento da vibração estava directamente relacionado com a frequência natural da vibração ou frequência da suspensão da carruagem.

A preocupação referida anteriormente está ligada com o facto de que a vibração aérea que constitui o ruído, (mesmo sem o mecanismo de transdução que se inicia na

membrana timpânica) quando atinge a superfície do corpo humano, transforma-se em vibração dos tecidos. Estas vibrações dos tecidos resultam de flutuações dinâmicas de pressão que “embatem” com o corpo humano (Montalvão Silva *et al.*, 1988) e são frequentemente perceptíveis como um incómodo (Takahashi *et al.*, 2005).

Takahashi *et al.* (2003), já tinham referido que, a vibração induzida dependia de forma linear, da intensidade ou pressão sonora, sendo que Hession *et al.* (2004) e Diricks *et al.* (2004) consideraram que a transmissão da vibração nos tecidos ocorria de forma variável não sendo igual de indivíduo para indivíduo.

No organismo humano, o tórax é a região mais susceptível a este tipo de vibração (Smith, 2002), e é reconhecido que, a vibração induzida pelo RBF entre 20 a 50 Hz, é mais intensa no tórax do que no abdómen, correlacionando-se negativamente com o índice de massa corporal (Takahashi *et al.*, 1999; 2002a; 2002b).

O RBF atinge também as outras regiões do corpo humano, como a cabeça, sendo nesta, não só valorizada a vibração mas também a intensidade sonora (Takahashi *et al.*, 2002a), de forma mais intensa em alguns indivíduos particularmente sensíveis (Poullsen, 2003).

Segundo Alves-Pereira *et al.* (2004a), a generalidade dos tecidos é atingida pelo RBF, conduzindo à proliferação do colagénio e à lesão das estruturas actínicas e tubulínicas.

CONCEITO DE DOENÇA VIBROACÚSTICA (DVA)

Os transportes, a indústria e algumas actividades de lazer, são exemplos de como os imperativos da vida moderna sujeitam o indivíduo, diariamente, a níveis excessivos de ruído ou poluição sonora.

Nos anos 80, nas Oficinas Gerais de Material Aeronáutico (OGMA) da Força Aérea Portuguesa, o médico responsável, referiu a ocorrência recorrente de sintomatologia neurológica em trabalhadores expostos ao ruído produzido pelos motores de jacto que reparavam. Castelo Branco ao visitar os locais de trabalho observou um indivíduo com movimentos não propositados, no que lhe pareceu ser um automatismo, de natureza epiléptica (Castelo Branco, 1999a). Esta observação originou um estudo sistemático dos registos médicos de todos os técnicos de aeronáutica, para determinar quantos é que poderiam já ter sido diagnosticados com epilepsia tardia. Nesta pesquisa das fichas

clínicas, constatou-se uma elevada prevalência (10%) de casos de epilepsia de aparecimento tardio, uma ocorrência rara na população em geral (< 2%) (Castelo Branco, 1999).

Os investigadores procederam também a uma avaliação retrospectiva dos acidentes de trabalho ocorridos e à avaliação neurológica sistemática dos técnicos envolvidos nos procedimentos de “run-up” dos motores, em situações em que o RBF era particularmente intenso (Coelho *et al.*, 1999). A elevada prevalência de alterações neurológicas foi considerada como uma forma da doença induzida pela vibração sistémica já estudada nas décadas de 50 e de 60 com a terminologia anglo-saxónica “whole-body vibration” (Dieckmann, 1959; Duffner *et al.*, 1962). É reconhecido por vários autores que as vibrações induzem alterações neurosensoriais (Dennis, 1965; Lee *et al.*, 1971; Eskenazy, 1972; Pyykko *et al.*, 1982).

Após estes factos, os problemas que afectavam os técnicos das OGMA, passaram a ser encarados como uma importante questão de saúde ocupacional (Castelo Branco, 1988a; 1988b; 1988c), sendo também averiguados os problemas físicos (Montalvão Silva *et al.*, 1988) e as manifestações clínicas e médico-legais (Pimenta *et al.*, 1988; Castelo Branco, 1988c; 1991).

Mais recentemente, surgiram vários investigadores externos à instituição militar que se interessaram pelas manifestações clínicas do RBF, cada vez mais presente na actual sociedade urbana (Alves-Pereira *et al.*, 2004a; 2004b; Okada, 2005; Alves-Pereira 2005). A utilização de modelos animais tornou-se uma necessidade e contribuiu para esclarecer que a patologia provocada pelo RBF é diferente da causada pela vibração sistémica (VS) (Castelo Branco *et al.*, 1999a; 1999b), com manifestações clínicas específicas, induzindo o aparecimento de uma nova terminologia – a Doença Vibroacústica (DVA); e permite também multiplicar os estudos em diversos órgãos e sistemas sujeitos a este tipo de ruído.

A DVA é uma patologia de natureza sistémica, causada por uma exposição prolongada (> 10 anos) a ruído de baixa frequência (RBF) ($\leq 500\text{Hz}$). Inicialmente identificada com as alterações neurológicas, psicológicas e sensoriais e posteriormente com as manifestações cardíacas e respiratórias, a DVA passou a ser considerada uma entidade nosológica autónoma.

A doença vibroacústica tem vindo a ser estudada pelo Dr. Castelo Branco, do Centro para a Performance Humana (CPH), e pelo grupo do Prof. Doutor Nuno Grande do

Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) e, mais recentemente, pelo nosso grupo no Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM).

Investigadores destes grupos descreveram fibrose dos tecidos, proliferação das matrizes extracelulares e alterações dos epitélios, na ausência de processo inflamatório, nos sistemas cardiovascular e respiratório, nomeadamente pericárdio (Castelo Branco *et al.*, 1999c; Marciniak *et al.*, 1999), vasos (Castelo Branco *et al.*, 1999c; Martins dos Santos *et al.*, 2002), incluindo linfáticos (Grande *et al.*, 2001), traqueia (Oliveira *et al.*, 2002a; 2002b), parênquima pulmonar (Grande *et al.*, 1999), pleura (Oliveira *et al.*, 2003a; 2003b) mas também noutros órgãos ou sistemas como o digestivo (Oliveira *et al.*, 2005; da Fonseca *et al.*, 2006a; 2006b), urinário ou nervoso (Castelo Branco *et al.*, 1999a; 1999b). Estão ainda documentadas alterações imunitárias e de carácter maligno no Adn atribuíveis à exposição ao ruído de baixa frequência (Silva *et al.*, 1999). Como o RBF é um agente físico capaz de atingir quaisquer tecidos (Alves-Pereira, 1999), têm sido descritas alterações em vários órgãos, sendo expectável, que muitos órgãos ainda não estudados possam também sofrer de alterações com uma relação directa ou indirecta com o RBF.

Também o periodonto, nomeadamente o ligamento periodontal e o osso alveolar, pela sua constituição anatómica, serão um potencial alvo das vibrações (Haskell, 1975). A doença vibroacústica é considerada “órgão não específica”, pelo que, todos os órgãos e sistemas são alvo dos efeitos nocivos do ruído de baixa frequência sobre a estrutura que suporta as células, ao induzir um crescimento anormal da matriz extracelular.

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO RUÍDO DE BAIXA FREQUÊNCIA (RBF)

Alterações neurológicas, psicológicas e sensoriais

Estudos efectuados em modelos animais por Busnel *et al.* (1978), demonstraram que os ratos geneticamente surdos expostos aos infrasons apresentavam uma menor resistência à fadiga, tornando-se desta forma claro, que se tratava de um mecanismo de agressão não auditivo. Em outro artigo de Lehmann *et al.* (1979), concluiu-se que os infrasons potenciavam significativamente a toxicidade do álcool, enquanto Yamamura *et al.* (1980), evidenciaram que o desempenho dos ratos diminuía também, após a exposição aos infrasons.

Já anteriormente, em 1976, Harris, considerou que os efeitos da exposição aos infrasons pareciam exagerados, mais concretamente os que descreviam um estado idêntico à embriaguez ou o desencadear de nistagmo (Harris e Johnson, 1976). Em outro estudo, sobre a exposição aos infrasons durante um curto período, não se identificaram alterações no rendimento cognitivo (Harris *et al.*, 1978). No entanto, outros autores, chegaram a conclusões diferentes, tendo verificado que após uma exposição entre 6 a 16 Hz, ocorria uma depressão do estado de vigília (Landstrom *et al.*, 1984) e uma sensação de incómodo (Moller, 1984; 1987). Outras manifestações inespecíficas, como insónias e alterações do sono (Persson Waye, 2004), cefaleias ou dificuldade na concentração (Moller *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2004) foram também relatadas.

Como já foi referido, em Portugal, foi a observação de movimentos automáticos e involuntários de um técnico de aeronáutica nas suas normais tarefas de reparação de um motor de avião que desencadeou a investigação a todos os técnicos expostos às mesmas condições (Castelo Branco, 1999). A incidência de 10% de epilepsia com aparecimento tardio, com controlo difícil, constituiu um facto significativo e marcante para o interesse desta equipa de investigadores pelos efeitos do RBF (Castelo Branco, 1984; Pimenta *et al.*, 1999b). Em muitos indivíduos expostos ao RBF, foram identificadas uma sensação de incómodo, irritabilidade, menor capacidade de raciocínio (Berglund *et al.*, 1997), alterações neurológicas clássicas (Pimenta *et al.*, 1991; 1999a), alterações do equilíbrio (Pimenta *et al.*, 1999d), presença de reflexos primitivos (Pimenta *et al.*, 1999a) e alterações neuropsicológicas (Pacheco *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 1999; Foreid *et al.*, 2005a).

Este grupo de técnicos foram sujeitos a uma avaliação clínica, imagiológica e funcional, tendo-se determinado a presença de alterações funcionais através de estudos electroencefalográficos (Pimenta *et al.*, 1999a). Maurício *et al.* em 1988 publicaram a primeira avaliação por ressonância magnética nuclear (RMN) efectuada a um grupo restrito de 8 indivíduos sujeitos ao RBF, onde demonstraram a existência de alterações morfológicas encefálicas. Posteriormente, grupos alargados de trabalhadores expostos ao RBF foram avaliados por esta técnica (Maurício *et al.*, 1991; Maurício *et al.* 1999), tendo os resultados demonstrado um elevado número de alterações, nomeadamente focos hiper-intensos da substância branca subcortical e periventricular, gânglios basais e tronco cerebral.

As alterações descritas no sistema nervoso central e autónomo (Foreid *et al.*, 2005a; 2005b) não surgiram somente nos técnicos de reparação de aeronaves, tendo sido também relatadas em outros indivíduos sujeitos a outras fontes de RBF.

Foram também relatadas, perturbações da visão, sendo consideradas secundárias às alterações da circulação coroideia e da microcirculação da retina, com características de cronicidade (van Zeller *et al.*, 1988; 1991). Pawlaczyk-Luszczynska (2004a) e a sua equipa identificaram uma perda parcial na capacidade de responder a uma bateria de testes cognitivos após exposição a RBF, interferindo com a concentração, atenção e funções visuais. Já em estudos publicados na década de 80, tinham sido relatadas alterações na acuidade visual, sendo que, níveis de ruído superior a 93 dB, interferiam nos sensores ópticos, fazendo com que o indivíduo não distinguisse as cores adequadamente. Quando o nível de ruído era reduzido para 80-85 dB, a sensibilidade passava a ser igual para todas as cores (Colleoni *et al.*, 1981).

Nas alterações neurológicas, também foram descritas alterações otológicas. Nekhoroshev em 1985 utilizou ratos, expondo-os ao ruído com frequências de 4, 31,5 e 53 Hz e 110dB durante 30min, 3 horas e 9 horas por dia, durante 40 dias. Deste estudo conclui-se que o infrassom causou alterações mais expressivas do que a exposição ao ruído de 31,5 ou 53 Hz. As alterações observadas incluíram a redução da actividade da fosfatase alcalina em vasos da estria vascular com consequente prejuízo da permeabilidade vascular. Esta situação conduzia a uma alteração da hemodinâmica do labirinto, com alteração da acuidade auditiva.

Sendo do senso comum que o ruído audível pode conduzir a lesões, torna-se interessante notar que os infrasons também podem induzir alterações no aparelho auditivo. Na pesquisa que efectuámos, encontrámos trabalhos da década de 70, que concluíram, que após a exposição aguda aos infrasons com intensidades moderadas, não eram encontradas alterações sistémicas significativas, mas descreviam o aparecimento de sensação de pressão e de dor (Westin, 1975). A utilização de protectores auditivos permitia um alívio significativo destes sintomas, inferindo-se daqui que estes sintomas eram uma resposta a algo que era transmitido por via auditiva. Sabe-se que o ouvido médio e interno podem ser afectados por níveis intensos de infrassom (100-170 Hz) (Lim *et al.*, 1982), sendo sensível abaixo do limiar convencional (16 a 20 Hz) para a audição humana (Moller *et al.*, 2002; Scholz *et al.*, 2005).

Bohne e Harding (2000) procuraram determinar se o ruído produzia alterações no órgão de Corti. Estes autores, confirmaram que a exposição contínua ao RBF produzia lesões na zona coclear.

A expectativa de que o ruído na gama das frequências audíveis, mesmo o RBF, provocasse lesões no ouvido interno, foi acentuada pela presença de lesões histológicas

induzidas por frequências muito baixas, sugerindo mecanismos patogénicos mais diversificados do que os atribuídos ao trauma acústico. Foram descritas lesões cocleares, nomeadamente o colapso da membrana de Reissner, após exposição ao ruído de 10 Hz (Yoshida *et al.*, 1986). Taenaka (1989) comparou os efeitos cocleares do infra-som, do RBF na faixa audível e da vibração sistémica (VS), concluindo que o RBF é o que mais afecta a cóclea. Trabalhos desenvolvidos em modelos experimentais demonstraram o efeito sinérgico do ruído e vibração sistémica observando-se lesão das estruturas sensoriais do ouvido interno (Nekhoroshev, 1990).

Alterações cardíacas e vasculares

As alterações cardíacas encontram-se bem documentadas há muito. Uma revisão da literatura revelou que Matoba, no Japão, já tinha identificado espessamentos do pericárdio em indivíduos que desenvolviam a sua actividade profissional com motosserras (Matoba, 1994). Entre as lesões cardíacas mais evidentes, documentadas ecocardiograficamente, incluem-se o espessamento das válvulas cardíacas, do pericárdio e do endocárdio, (Marciniak *et al.*, 1999; Castelo Branco *et al.*, 1999d; 2005a; 2005b) e que podem ocorrer até em crianças (Araújo *et al.*, 2004). Este espessamento das estruturas cardiovasculares foi observado em técnicos de aeronáutica (Marciniak *et al.*, 1999), pilotos comerciais e tripulações de cabine (Araújo *et al.*, 2001), numa população residente numa ilha ambientalmente exposta ao RBF (Torres *et al.*, 2001) e em modelos animais expostos a RBF (Castelo Branco *et al.*, 2003). Vários autores procederam à avaliação microscópica deste espessamento, concluindo das suas observações que existia um significativo desenvolvimento do tecido conjuntivo laxo do pericárdio (Castelo Branco *et al.*, 1999c; Alves-Pereira *et al.*, 2005b). Em avaliações efectuadas através de Microscopia electrónica de transmissão (MET), foram observadas células mesoteliais tumefactas e em rotura em consequência de *stress* mecânico (Castelo Branco *et al.*, 2004a). No entanto, apesar de ser conhecida uma relação entre o risco de enfarte do miocárdio e a exposição ao ruído, quer ocupacional (Davies *et al.*, 2005), quer da vida quotidiana (Babisch *et al.*, 2005), as alterações do miocárdio parecem menos incisivas. Nekhoroshev *et al.* (1985) após a exposição de animais ao ruído efectuaram a medição da concentração das enzimas responsáveis pelas reacções de oxidação-redução do miocárdio. Foram encontradas alterações nas células do miocárdio, alterações na microcirculação, aumento da destruição das mitocôndrias nas células endoteliais dos capilares e focos de isquémia do miocárdio, sendo estas alterações reversíveis após cessar a exposição ao ruído. Ratos e porcos expostos aos infrasons de 120 a 140 dB

durante 3 horas por dia (1 a 40 dias), apresentavam alterações morfológicas e fisiológicas do miocárdio (Nekhoroshev *et al.*, 1991) e em alguns doentes foram identificadas sequelas de enfarte do miocárdio (Castelo Branco, 1999).

No sistema vascular, os efeitos da vibração e do RBF, são bem conhecidos, particularmente no que diz respeito aos vasos de pequena dimensão (Takeuchi *et al.*, 1984; Okada *et al.*, 1987; Inaba *et al.*, 1988). Podemos até afirmar de uma forma mais correcta que as alterações vasculares estão largamente descritas em indivíduos expostos ao RBF, não só nos pequenos vasos, como nos do olho (van Zeller *et al.*, 1988; 1991), como também na carótida, que apareceu espessada em 70% dos doentes estudados por Albuquerque e Sousa *et al.* (1991). Os espessamentos poderão estar em relação com a vasoconstrição periférica (Kryter *et al.*, 1980) e com o aumento da pressão arterial, descrito após a exposição ao infrassom. Foi demonstrado em modelo animal (rato), que o *stress* acústico se associa à carência de magnésio, causando hipertensão arterial sistólica e diastólica (Ising, 1981). A proliferação da matriz extracelular origina a hiperplasia da íntima com migração das células lisas da média. Littleford *et al.* documentaram que na doença vibro acústica, os doentes com o fenómeno do “white finger” apresentavam uma redução da pressão sanguínea em combinação com a vasoconstrição e o estreitamento do lume dos vasos (Littleford *et al.*, 1997). Em 1984 Takeuchi descreveu que a íntima surgia mais espessada nos dedos dos trabalhadores que utilizavam ferramentas vibratórias. A presença de fibrose celular nas artérias de pequeno calibre de ratos expostos à vibração durante 90 dias foi relatada por Okada (Okada *et al.*, 1987). No ano seguinte, Inaba *et al.* reportaram alterações na íntima dos vasos de pequena dimensão após 30 dias de exposição. A acção do RBF e da vibração nas paredes dos vasos é directa, causando nos vasos de pequena dimensão, um aumento da permeabilidade e a proliferação da íntima com espessamento fibrocelular (Inaba *et al.*, 1988). O aumento da permeabilidade capilar conduz a uma concentração intravascular, com aumento da viscosidade sanguínea e danos microvasculares (Greenstein *et al.*, 1997).

Em modelo animal do rato Wistar sujeito ao RBF, Martins dos Santos *et al.* (2002) confirmaram o espessamento da camada íntima das artérias, acompanhada da rotura da membrana elástica interna. Noutro trabalho, efectuado pelo mesmo grupo, verificou-se que as alterações atingem também o sistema linfático, nomeadamente os vasos, que se encontram dilatados, com as paredes espessadas e com rotura valvular, parecendo estarem mais estruturas vasculares atingidas. Experimentalmente, a inibição da contractilidade dos linfáticos expostos ao infra-som, foi comprovada, levando à conclusão

de que as paredes dos vasos são estruturas alvo das alterações biológicas induzidas pelo RBF (Krivolesova *et al.*, 2001). Podemos assim compreender a natureza sistémica desta patologia, sendo talvez uma das suas consequências mais graves.

Alterações respiratórias

As alterações do sistema respiratório, há muito que têm sido estudadas, constituindo um dos sistemas com mais alterações morfológicas em consequência do RBF. Foram descritas lesões nas vias aéreas, nomeadamente na traqueia, no parênquima pulmonar, no mesotélio pleural e mais recentemente na modulação da voz.

A observação clínica, efectuada aos funcionários das OGMA, mostrou que, estes sofriam de queixas respiratórias recorrentes, mesmo quando a exposição ocupacional ao RBF era inferior a 4 anos (Castelo Branco, 1999a; Castelo Branco e Alves-Pereira, 2004b). Um achado clínico que foi valorizado, foi a observação de fibrose pulmonar, mesmo em indivíduos que nunca fumaram, nem tinham estado expostos a qualquer agente reconhecido como potencial causador de fibrose (Reis Ferreira *et al.*, 1999). Em vários estudos, ficou comprovado também, que o controlo neurológico da ventilação ficava comprometido (Reis Ferreira *et al.*, 2004a; 2004b; 2005a).

Outros autores têm descrito os efeitos subjectivos imediatos da exposição ao RBF, que incluíram tosse, sensação de asfixia e pressão sobre o tórax (Mohr *et al.*, 1965; Cole *et al.*, 1966). O parênquima pulmonar foi estudado pelo grupo do Professor Nuno Grande, tendo sido encontradas modificações, nomeadamente dilatação dos alvéolos e aumento do número de pneumócitos tipo II (Grande *et al.*, 1999). A nível pleural demonstrou-se que a exposição ao RBF, provoca redução das microvilosidades nas células pleurais (Sousa Pereira *et al.*, 1999a; Oliveira *et al.*, 2003b) e o parênquima pulmonar subpleural apresenta-se espessado por fibrose (Reis Ferreira *et al.*, 2004a). Também a resposta imune do epitélio pleural parece estar comprometida (Oliveira *et al.*, 1999). No epitélio traqueobrônquico, foram encontradas alterações, com aparecimento de células em escova (Castelo Branco *et al.*, 2003) e lesões nas células ciliadas (Sousa Pereira *et al.*, 1999a; Oliveira *et al.*, 2002b), que no rato têm uma distribuição característica em faixas (Oliveira *et al.*, 2003b). Estas alterações contribuem para o compromisso do desenvolvimento do epitélio traqueobrônquico durante o crescimento e envelhecimento dos animais (Oliveira *et al.*, 2002b; 2005).

As alterações respiratórias foram também encontradas em crianças, quando expostas ao ruído e emissões poluentes do tráfego. Estas alterações teriam uma relação com o ruído do tráfego nocturno, induzindo a activação do eixo hipotálamo-hipofisário-suprarenal (Ising *et al.*, 2004). A fibrose, também no sistema respiratório é uma sequela frequente, tendo sido encontrados quadros de fibrose pulmonar por Reis Ferreira. As lesões de fibrose não foram somente encontradas no pulmão, mas também ao longo de toda a árvore brônquica, aquando da realização de broncoscopias. Neste grupo de doentes (incluindo os não fumadores), todas as lesões neoplásicas respiratórias identificadas eram carcinomas epidermóides (Reis Ferreira *et al.*, 2005a).

Nas vias aéreas superiores foram também há muito identificadas, alterações na voz associadas à exposição aguda ao ruído de frequência muito baixa e de grande intensidade (Slarve e Johnson, 1975). Mais recentemente, foram descritas alterações na modulação da voz associadas à exposição crónica ao ruído de baixa frequência (Mendes *et al.*, 2005).

Alterações imunológicas e genéticas

Foram desenvolvidos vários estudos em animais, no sentido de identificar alterações imunológicas e genéticas. Em cobaias expostas aos infrasons, foi encontrada uma diminuição das reacções de hipersensibilidade do tipo I (Batanov, 1995). Nos vários estudos efectuados em animais, foram encontrados resultados interessantes, nomeadamente, o estudo em modelo animal efectuado por Oliveira *et al.* (1999), que demonstrou o compromisso da resposta imunológica tecidual e celular na infecção microbacteriana da pleura. Estas alterações na resposta imunológica foram reportadas por Águas *et al.* (1999a), que identificaram uma significativa depleção de linfócitos CD4⁺ e sobretudo CD8⁺, no baço de ratos submetidos ao ruído de baixa frequência. Ficou também patente que, nos ratos que desenvolvem naturalmente doenças auto-imunes, a exposição ao RBF conduz ao aparecimento precoce de manifestações clínicas semelhantes às do lúpus eritematoso sistémico, mais precisamente proteinúria e lesão renal (Águas *et al.*, 1999b). Num outro estudo, foram encontradas alterações cromossómicas significativas, nos animais submetidos ao RBF e vibração (Silva *et al.*, 2002). A pesquisa deste tipo de alterações não se ficou pelo modelo animal, tendo sido publicados estudos em humanos, que confirmaram o exposto. Castro *et al.*, em 1999, identificaram um aumento de linfócitos circulantes CD4⁺ e CD8⁺ em trabalhadores da indústria aeronáutica, o que poderia levar à maior frequência de doenças auto-imunes,

nomeadamente vitíligo, lúpus eritematoso sistémico, tendo sido também descritas alterações cromossómicas significativas nestes trabalhadores (Silva *et al.*, 1996; 1999) e em pilotos da força aérea (Silva *et al.*, 1999). Mais recentemente, o lúpus foi também identificado em tripulantes de voo (Araújo *et al.*, 2001) e em famílias inteiras expostas a RFB ambiental (Torres *et al.*, 2001). Na pesquisa bibliográfica, encontrámos outros autores que têm confirmado a existência de processos auto-imunes em trabalhadores expostos a RBF (Lippmann *et al.*, 1973; Soutar *et al.*, 1974; Jones *et al.*, 1976; Matsumoto *et al.*, 1989; 1992). Estas alterações poderão ser parte da explicação para os inúmeros casos de neoplasia, encontrados em órgãos ocos de trabalhadores sujeitos ao RBF (Castelo Branco, 2005e).

Alterações digestivas

As alterações digestivas começaram a ter mais atenção da comunidade científica com o trabalho efectuado por Anthony e Harclerode em cobaias. Estes animais, quando expostos a ruído intenso de 144 dB, com frequências variando de 300 a 4800Hz, apresentavam zonas de constrição gástrica. Este trabalho, embora tivesse como limitação o facto de utilizar ruído numa larga faixa de frequências, demonstrou haver a possibilidade de o ruído provocar lesões com uma inequívoca expressão morfológica (Anthony e Harclerode, 1959). Outro trabalho interessante, foi o desenvolvido por Kim em 1968, que utilizou a gravação do ruído do motor de um avião a jacto F-86F colhida a 3 metros. Voluntários jovens e cães foram expostos a este ruído, durante 30 a 60 minutos, tendo-se verificado importantes alterações gástricas. Este tipo de ruído foi também utilizado durante períodos variáveis em 24 ratos, sendo que destes, 22 apresentaram ulcerações gástricas.

Cohen em 1976, desenvolveu um trabalho com trabalhadores de uma caldeiraria, que permitiu caracterizar minuciosamente a sintomatologia e organizar as manifestações por órgãos e sistemas. Das manifestações clínicas avaliadas, as queixas digestivas incluíam epigastralgias, pirose, náuseas e diarreia, sendo que, estas agravavam-se aquando da introdução de protecções auditivas. Na época, esta situação não foi justificada por Cohen, mas hoje sabe-se que o facto da protecção auditiva retirar a sensação de incómodo, levava a uma exposição excessiva, permitindo desta forma um prolongamento da agressão acústica (Cohen, 1976).

Kiec *et al.* (1977) avaliaram 100 mineiros expostos a ruído e vibração de intensidades muito elevadas. Este trabalho não permitiu relacionar a alteração das secreções ácida basal e máxima com o tempo de exposição, permitindo o diagnóstico radiológico de úlcera péptica em cerca de 10% dos mineiros.

Em 1984, Sonnenberg tentou relacionar o aparecimento de úlceras pépticas com a hipersecreção ácida, causada pelo *stress* em indivíduos expostos ao ruído, mas sem sucesso, pois não foram encontradas alterações significativas da secreção (Sonnenberg *et al.* 1984).

Gue *et al.* (1987) concluíram que o *stress* acústico pode induzir alterações da motilidade no estômago de cães. Estas alterações da motilidade poderiam ser abolidas por uma vagotomia.

O ruído de baixa frequência e as vibrações do corpo, “whole-body vibration” embora sejam “entidades” distintas, apresentam o mesmo fenómeno. Estudos efectuados no sistema gastrointestinal de pacientes sujeitos à vibração de corpo inteiro e em modelos animais foram utilizados para se tentarem entender as alterações na motilidade (Kjellberg and Wikstrom, 1987; Ishitake *et al.*, 1998; 1999).

Nakamura *et al.* (1992) demonstraram que as lesões gástricas não eram somente mediadas por alterações do sistema nervoso e endócrino, mas que poderiam ser provocadas pelo efeito directo da vibração.

Pode-se referir que as manifestações digestivas são referidas nos indivíduos expostos ao ruído (Castelo Branco, 1999; Maschke, 2004; Castelo Branco e Alves-Pereira, 2004c) com lesões erosivas no estômago de indivíduos com prolongada exposição ao RBF (da Fonseca *et al.*, 2005).

Nekhoroshev e Glinchikov estudaram as alterações digestivas induzidas pelos infrasons, tendo identificado alterações da arquitectura do parênquima hepático com disposição em “mosaico”, lesões focais do tipo isquémico e em situações mais graves associadas a uma exposição mais prolongada, lesões irreversíveis dos hepatócitos (Nekhoroshev *et al.*, 1991)

As alterações digestivas encontradas não se resumem às atrás referidas, tendo sido desenvolvida recentemente uma nova linha de investigação na busca de alterações da glândula parótida. Oliveiras *et al.* (2005; 2007) encontraram degenerescência vacuolar, necrose celular, fibrose do tecido conjuntivo e espessamento da parede dos pequenos

vasos da glândula parótida. Estes aspectos microscópicos foram também encontrados na mucosa do estômago (da Fonseca *et al.*, 2005; 2006a) e duodeno (da Fonseca *et al.*, 2005) de animais expostos ao RBF.

Alterações da coagulação e hemostase

As alterações da coagulação e da hemostase foram descritas por Crespo *et al.* (1988), num trabalho efectuado em trabalhadores das OGMA. Neste, foi demonstrado que ocorria um aumento da agregação plaquetária e uma tendência para a diminuição dos valores do factor de von Willebrand.

Quirk *et al.* (1994) efectuaram uma exposição prolongada de ratos a ruído de banda larga, tendo encontrado um significativo aumento da endotelina plasmática.

Mais recentemente, num trabalho de investigação efectuado, utilizando pessoal da aviação civil, aviação militar e um grupo de controlo sem exposição ao RBF, verificou-se que existiam alterações na agregação plaquetária, factor de von Willebrand, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial e da fibrinólise (Ribeiro *et al.*, 2005).

Alterações renais e urinárias

Foram também descritas alterações no sistema urinário quer em modelo animal, quer em humanos. Martins dos Santos *et al.* (2005), utilizando modelo animal, verificaram que o glomérulo renal do rato Wistar exposto ao RBF mostrava tumefacção e degeneração de podócitos. Por sua vez, Castelo Branco verificou, em trabalhadores expostos ao RBF, que estes apresentavam alterações urinárias significativas (Castelo Branco, 1999a; 2005a).

EMBRIOLOGIA E MORFOLOGIA NORMAL DO PERIODONTO

PERIODONTO

O periodonto (*peri* = em redor de, *odontos* = dente) é composto por quatro estruturas de suporte do dente: a gengiva, o ligamento periodontal, o cimento radicular e o osso alveolar.

A principal função do periodonto é constituir a interface dente/tecido ósseo dos alvéolos e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória. O periodonto forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre alterações com a idade e, além disso, está sujeito a alterações relacionadas com o meio ambiente.

- O ligamento periodontal, tal como a gengiva, é composto por tecido conjuntivo contendo fibras, células, vasos e nervos. Contém células capazes de regenerar e manter três tecidos distintos - o próprio ligamento, o cimento e o osso alveolar.
- O osso alveolar é constituído por tecido cortical e por tecido esponjoso. Dentro do tecido cortical existe o tecido cortical externo vestibular e lingual ou palatino e o tecido cortical interno ou lâmina crivosa (lâmina dura) que por sua vez é composto por osso fasciculado e osso laminar (Hassell, 1993).

EMBRIOLOGIA DO PERIODONTO

A odontogénese inicia-se como resultado da interacção entre o epitélio oral e o ectomesênquima subjacente. Esta interacção dá origem à banda epitelial primária e a seguir à lâmina dentária.

Os germens dentários passam sequencialmente pelas fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz. Porém, a formação específica dos diversos tecidos que constituem o dente e as estruturas de suporte inicia-se a partir da fase de campânula. A dentinogénese, amelogénese, cimentogénese e osteogénese correspondem respectivamente, à formação da dentina, esmalte, cimento e osso (Thesleff, 2003).

Os tecidos que constituem o periodonto de inserção são formados durante a fase de raiz. A fase de raiz e o processo de odontogênese propriamente dito concluem-se com a formação da dentina radicular e com o encerramento do ápice dentário.

A fragmentação da bainha radicular epitelial de Hertwig permite o contacto do folículo dentário com a dentina radicular em formação. Assim, após contactar com a dentina, as células ectomesenquimais do folículo diferenciam-se em cimentoblastos, produzindo a matriz orgânica do cimento. Simultaneamente, as células do lado externo do folículo diferenciam-se em osteoblastos, formando o osso alveolar, enquanto as da região central se diferenciam em fibroblastos, formando o ligamento periodontal. Dessa forma, as fibras de colagénio do ligamento são formadas ao mesmo tempo que o colagénio que constitui a matriz do cimento e do osso alveolar, possibilitando que as extremidades das fibras do ligamento, denominadas fibras de Sharpey, fiquem inseridas quando cimento e osso se mineralizam.

Enquanto ocorre a fase de raiz e o dente erupciona, na coroa, aumenta o teor de mineral do esmalte. Posteriormente, o órgão do esmalte colapsa completamente, constituindo o epitélio reduzido do esmalte, recobrimdo esse tecido até ao aparecimento da coroa na cavidade oral. Após a completa erupção do dente, o epitélio reduzido contribuirá para a formação do epitélio juncional da gengiva.

O ligamento periodontal, derivado do folículo dentário, começa o seu desenvolvimento imediatamente após o início da formação da raiz do dente. Durante a diferenciação de algumas células ectomesenquimais do folículo dentário em cimentoblastos, ocorre a diferenciação de outras células da região central do folículo em fibroblastos.

Estas células dispõem-se obliquamente, com uma extremidade voltada para o osso, localizada mais cervicalmente, e outra voltada para o cimento em formação, mais apicalmente. Esses fibroblastos recém diferenciados formam a matriz extracelular do ligamento periodontal. Do lado do cimento, os fibroblastos são responsáveis pela formação das fibras extrínsecas, especialmente no cimento acelular da região cervical. Do lado oposto, os fibroblastos do ligamento formam as fibras que ficarão inseridas no osso alveolar (Palmer *et al.*, 1995).

Como a formação do ligamento periodontal ocorre durante a formação da raiz do dente e, portanto, durante o processo eruptivo, os feixes de fibrilhas de colagénio sofrem mudanças no seu arranjo e disposição à medida que vão sendo formados.

A orientação dos fibroblastos e, consequentemente dos feixes de colagénio no terço cervical altera-se durante a rizogénese e a erupção. A estrutura final do ligamento periodontal somente é alcançada após o fim da erupção, quando o dente entra em contacto com o seu antagonista e recebe as forças funcionais correspondentes.

A formação do ligamento periodontal envolve síntese intensa e secreção de matriz extracelular de natureza conjuntiva, especialmente colagénio e outros constituintes como a fibronectina e proteoglicanos (Cho *et al.*, 2000).

A interacção entre esses elementos da matriz, em conjunto com os fibroblastos, confere ao tecido uma certa contractibilidade e motilidade. Dessa forma, a génese do ligamento periodontal está associada ao mecanismo de erupção do dente. Apesar de muitos acreditarem que o ligamento desempenha algum papel durante a erupção dentária, existem casos como a osteoporose, em que, apesar da completa formação do ligamento, o dente não erupciona. Em contraste, dentes com displasia dentinária formados sem raiz, e portanto sem ligamento periodontal, erupcionam e chegam a ter oclusão funcional com os dentes antagonistas (Ten Cate, 1997).

Em relação ao osso alveolar, a primeira porção óssea a se formar é aquela que corresponde ao osso basal. Este começa a sua formação à sexta semana do desenvolvimento embrionário, quando a maioria dos germens dentários estão na fase de botão.

Como, tanto o maxilar como a mandíbula (com excepção do côndilo e de pequenas regiões da sínfise) se desenvolvem por ossificação intra-membranosa, o primeiro evento observado é a condensação ectomesenquimatosa nas regiões correspondentes. O factor indutor desencadeante deste processo foi discutido durante muito tempo. Na mandíbula, por exemplo, a cartilagem de Meckel foi descrita como responsável por esse processo. Entretanto, foi demonstrado que interacções epitélio-ectomesênquima nessas regiões são responsáveis pela iniciação do desenvolvimento do osso basal tanto na maxila como na mandíbula. A cartilagem de Meckel desempenharia, então, apenas uma função de suporte enquanto o corpo da mandíbula é formado, sendo posteriormente reabsorvida (Ten Cate, 1996).

A formação do osso basal continua com o aparecimento de trabéculas de osso primário ou imaturo que se anastomosam enquanto os processos maxilares e mandibular crescem como um todo. Desse modo, na fase de capuz da odontogénese, o osso do processo alveolar é constituído por trabéculas de osso imaturo que rodeiam o germen dentário,

formando a base e as paredes laterais da crista óssea. Quando é atingida a fase de campânula, o processo alveolar acaba por envolver completamente o gérmen, perdendo a sua ligação com a lâmina dentária e com o epitélio oral. Forma-se, assim, o tecto da crista óssea, sendo este fenómeno considerado essencial para a protecção das regiões correspondentes às futuras cúspides do dente, pois logo após a formação do tecto da crista, começam os fenómenos de diferenciação de odontoblastos e ameloblastos, com o correspondente desenvolvimento da dentina e do esmalte. Entretanto, a permanência das delgadas trabéculas do tecto da crista é muito curta, porque rapidamente aparecem os osteoclastos para as reabsorver. Esta reabsorção, ocorre primeiro para permitir o crescimento da coroa do dente, pela aposição de dentina e esmalte, durante a fase de coroa e, depois, para permitir a erupção do dente, coincidindo com a fase de raiz (Ten Cate, 1996).

Entre o osso que forma as paredes da crista e o gérmen (órgão do esmalte e papila), está presente o folículo dentário, um tecido ectomesenquial que rodeia o gérmen na sua totalidade até ao início da fase de raiz. A partir destas células ectomesenquimais da porção externa do folículo, diferenciam-se os osteoblastos e inicia-se a formação de novo tecido ósseo sobre o osso preexistente das paredes da crista. A formação do osso alveolar tem início simultaneamente com a formação do cimento e do ligamento periodontal.

Durante o desenvolvimento do osso alveolar, parte das fibras principais do ligamento, originadas a partir dos fibroblastos, vão sendo incorporadas na matriz óssea, constituindo assim, as fibras de Sharpey, de maneira similar ao que ocorre na cimentogénese.

A deposição do osso alveolar ocorre com alguns períodos de repouso, originando, portanto, linhas de crescimento paralelas à parede do alvéolo (Cho, 1995).

LIGAMENTO PERIODONTAL

O ligamento periodontal define-se como uma estrutura conjuntiva fibrosa densa, situada entre o cimento e o osso alveolar, unindo assim os dentes aos maxilares por fibras que estão inseridas no cimento, de um lado e no osso alveolar do outro.

Ao contrário das outras estruturas do periodonto, o ligamento periodontal possui uma elevada actividade metabólica e o seu potencial reparador é muito elevado (Hassell, 1993).

São muitas as funções atribuídas ao ligamento periodontal entre as quais:

- Responsável pelas forças de resistência ao deslocamento, protegendo os tecidos dentários do dano causado por uma excessiva carga oclusal;
- Manutenção e reparação do osso alveolar e do cimento;
- Controlo neurológico da mastigação através dos mecanoreceptores.

O ligamento periodontal comporta-se como o perióstio do cimento e do osso alveolar.

As células do ligamento periodontal participam na formação e na reabsorção desses tecidos, o que acontece no momento de um deslocamento fisiológico dos dentes, na adaptação do periodonto às forças oclusais e na cicatrização das lesões. Essas fases alternadas de aposição e de reabsorção permitem o reajuste das fibras em função das solicitações sofridas pelo dente (Berkovitz, 2004).

Como todos os tecidos conjuntivos fibrosos densos, o ligamento periodontal é formado por uma matriz extracelular de fibras e de substância fundamental, em que as células, os vasos sanguíneos, os linfáticos e os nervos estão entrelaçados (Hassell, 1993; Mariotti, 1993).

Matriz extracelular

A matriz extracelular do ligamento periodontal é composta por 4 tipos de macromoléculas principais:

- Colagénios;
- Elastina;
- Proteoglicanos;
- Glicoproteínas de estrutura.

Fibras de colagénio

Estas fibras constituem o elemento principal da matriz extracelular do ligamento periodontal, representando 70 a 80 % do volume total. São responsáveis pelas propriedades físicas do ligamento e pela ancoragem do dente ao alvéolo (Hassell, 1993).

As fibras colagénias encontradas são de seis tipos diferentes (colagénio fibrilhar) tipos I, III e V e (não fibrilhar) tipos IV, VI e VII (Mariotti, 1993).

A maior parte do colagénio está presente sob a forma de fibras do tipo I e III, na proporção de 3:1. Podemos afirmar que as fibras de colagénio tipo III, estão presentes nos tecidos jovens, em desenvolvimento, no tecido de granulação e dispersas no ligamento periodontal, participando na renovação do colagénio e na mobilidade dentária. Estes dois tipos de colagénio não mostram uma evidente separação espacial dentro do ligamento periodontal, contudo, as fibras do tipo III, podem ser encontradas à periferia das fibras de Sharpey, que estão inseridas dentro do osso alveolar (Mariotti, 1993).

Os diâmetros das fibrilhas de colagénio são relativamente pequenos, com cerca de 50nm e não sofrem uma alteração significativa com a idade (Berkovitz, 2004).

As características relacionadas com o arranjo espacial dos colagénios minor do ligamento periodontal incluem:

O tipo VI começa a estar ausente a partir do meio do ligamento, durante a fase da erupção; segundo Everts *et al.*, a organização estrutural do colagénio tipo VI varia da estrutura microfibrilhar, associada ao sistema de fibras de colagénio e elastina, até um significativo arranjo junto aos feixes de oxitalam (Everts *et al.*, 1998).

O colagénio do tipo XII aparece relativamente mais tarde, no processo de desenvolvimento, quando os dentes já estão erupcionados.

Com a doença periodontal, pode haver uma alteração na natureza do colagénio (com alguma evidência para a presença de fibras de colagénio do tipo V) e no diâmetro das fibras. Talvez que, uma das características mais específicas do colagénio, seja a sua elevada taxa de “turnover”. Aliás, esta taxa é provavelmente a mais elevada em todo o organismo, tendo nos roedores uma semivida de poucos dias (Berkovitz, 2004).

O complexo de fibras de colagénio do ligamento periodontal está localizado imediatamente abaixo da gengiva, sendo o limite indistinguível entre os dois.

Tal como na gengiva, a maior parte do colagénio do ligamento periodontal, está agregado em feixes conhecidos por grupos de fibras principais.

Estes feixes de fibras densas, estão ligados ao cimento, atravessam o espaço do ligamento periodontal em vários planos e inserem-se, tal como as fibras de Sharpey, dentro da parede cribiforme do alvéolo (Raspanti *et al.*, 2000).

As fibras principais têm uma orientação definida de acordo com a sua função, dispondo-se em grupos.

Fibras do sistema elástico

O sistema de fibras elásticas é composto por elastina e microfibrilhas. Dependendo das proporções de microfibrilhas e elastina, o sistema de fibras elásticas pode ser dividido em fibras de oxitalam, fibras elauininas e fibras elásticas. Na gengiva, encontramos fibras elásticas (contêm grandes quantidades de elastina amorfa rodeada perifericamente por microfibrilhas) e fibras de eulanina (contêm pouca quantidade de elastina), enquanto no ligamento vamos encontrar fibras de oxitalam (feixes de microfibrilhas puras sem elastina) (Fullmer *et al.*, 1974; Johnson *et al.*, 1992; Tsuruga *et al.*, 2002).

As fibras de oxitalam são um componente importante da rede elástica e o único reconhecido no ligamento periodontal (Johnson *et al.*, 1992).

As fibras de oxitalam foram descritas por Fullmer *et al.*, como sendo fibras do tecido conjuntivo presentes entre o dente e o osso alveolar (Fullmer *et al.*, 1958). Estudos com microscopia electrónica de varrimento e com microscopia confocal, têm mostrado uma arquitectura 3D de um arranjo das fibras de oxitalam no ligamento “*in situ*” com uma relação espacial com os vasos sanguíneos (Tashiro *et al.*, 2002), podendo ter um papel preponderante na sua sustentação, bem como participar, directa ou indirectamente, no sistema mecanoreceptor do ligamento periodontal.

Baseados nestes resultados, conclui-se que as fibras de oxitalam são componentes onnipresentes e significativos do ligamento periodontal (Chantawiboonchai *et al.*, 1998).

Estas fibras, do tipo pré-elastina, não constituem mais de que 3 % das fibras do ligamento. Elas estão ancoradas ao cimento do dente e distribuem-se pelo ligamento periodontal em várias direcções, sendo raramente incorporadas dentro do osso.

As fibras de oxitalam têm uma orientação apico-oclusal, estando localizadas no ligamento periodontal, mais perto do cimento do que do osso alveolar (Sculean *et al.*, 1997). Na região dorsal, elas seguem o trajecto das fibras de colagénio gengival e transeptal, mas dentro do ligamento periodontal, elas tendem a estar orientadas longitudinalmente, cruzando feixes de fibras oblíquas mais ou menos perpendicularmente (Berkovitz, 2004).

Durante o desenvolvimento do dente, as fibras de oxitalam, aumentam em quantidade e em tamanho, principalmente na porção do ligamento periodontal mais próxima do osso. Além disso, o aumento da quantidade de fibras de oxitalam coincide com o aumento da densidade da rede vascular no desenvolvimento do ligamento periodontal (Tashiro *et al.*, 2002).

As funções das fibras de oxitalam permanecem desconhecidas, no entanto, diversos autores, referem que elas se tornam mais numerosas e finas nos dentes que têm cargas anormais.

Apesar das funções específicas destas fibras não estarem totalmente esclarecidas pensa-se que elas são responsáveis por:

- Ancoragem do dente ao alvéolo;
- Entrelaçar com as fibras de colagénio e reforçar o suporte do dente (aumento da coesividade do colagénio) (Johnson *et al.*, 1992);
- Manutenção da elasticidade;
- Orientação para a migração celular;
- Estabilização dos vasos sanguíneos;
- Regulação do fluxo vascular (Takagi *et al.*, 1989).

No que diz respeito à capacidade regenerativa das fibras de oxitalam, Sculean *et al.*, referem que estas fibras se formam “de novo” com uma orientação apico-oclusal no ligamento periodontal regenerado (Sculean *et al.* 1997).

OSSO ALVEOLAR

O osso alveolar é uma parte especializada da mandíbula e da maxila, que forma uma estrutura primária de suporte para o dente (Alejandro *et al.*, 2003).

A formação do osso alveolar tem início durante o crescimento fetal, por ossificação intramembranosa e, consta de uma matriz calcificada com osteócitos encerrados em espaços, as lacunas.

As maiores alterações do osso alveolar ocorrem durante o desenvolvimento das raízes do dente e na erupção dentária. À medida que as raízes do dente se desenvolvem há um crescimento do processo alveolar. As células do folículo dentário iniciam a diferenciação para fibroblastos do ligamento periodontal e cimentoblastos, responsáveis pela formação do ligamento periodontal e cimento respectivamente.

Ao mesmo tempo, algumas células no folículo dentário, diferenciam-se em osteoblastos e formam o osso alveolar (Hoffman, 1966; Ten Cate *et al.*, 1972; Schoeder, 1986; Cho *et al.*, 2000).

O desenvolvimento das raízes dentárias determina a forma e a estrutura do osso em redor dos dentes.

O osso alveolar é o menos estável dos tecidos periodontais porque está sujeito a uma contínua e rápida remodelação, associada com a erupção dentária e com aspectos funcionais do dente (Alejandro *et al.*, 2003).

A remodelação do osso é um processo fisiológico que ocorre nos vertebrados para manter uma massa óssea constante (Frost, 2001; Parfitt, 2002).

A manutenção da integridade do esqueleto envolve um processo sequencial de reabsorção óssea osteoclasto-induzida, com formação óssea osteoblasto-mediada nos locais de remodelação, bem como com a presença de factores moleculares que regulam estas duas actividades opostas (Deniz *et al.*, 2003).

A remodelação óssea é efectuada por estruturas temporárias conhecidas como unidades multicelulares básicas (Parfitt, 2001).

Os osteoblastos activos e os osteoclastos estão presentes na superfície das trabéculas ósseas do osso esponjoso, nas superfícies do osso cortical que circunda o maxilar, nas

paredes alveolares voltadas para o ligamento periodontal e no interior do osso cortical, ao nível dos espaços medulares.

O osteoblasto participa na osteogénese da parede alveolar, sintetizando o colagénio e a substância fundamental do osso (Hassell, 1993).

A composição do osso depende das suas células, cuja actividade é parcialmente regulada por hormonas (PTH, calcitonina, androgénios, estrogénios), factores de crescimento (TGF- β - transforming growth factor beta, PDGF- platelet derived growth factor, ILGF- insulin like growth factor, etc.), citoquinas (interleucinas e linfoquinas), factores locais (prostaglandinas), nutrição (cálcio e vitamina D) e factores mecânicos.

O osso é composto principalmente por minerais, tais como o cálcio e o fosfato, bem como o carbonato e o citrato, com pequenas quantidades de sódio, magnésio e flúor.

Os minerais estão distribuídos em cristais de hidroxiapatite. Os espaços entre os cristais são preenchidos por matriz orgânica com uma predominância de colagénios e água e por pequenas quantidades de mucopolissacarídeos, particularmente o sulfato de condroitina. O colagénio ósseo, que é somente produzido pelos osteoblastos, é essencialmente do tipo I, com pequenas quantidades dos tipos III e V.

As principais funções do osso alveolar são:

- Alojar as raízes dos dentes;
- Absorver e distribuir as pressões oclusais geradas durante os contactos dentários;
- Ancorar os dentes aos alvéolos através da inserção das fibras de Sharpey (Cho *et al.*, 2000).

O osso alveolar é sensível a doenças sistémicas e agentes tóxicos. Cooper reportou que, condições sistémicas, que podem provocar perda de osso, são um dos factores que influencia a susceptibilidade individual para a doença alveolar (Cooper, 2000).

OBJECTIVO DO ESTUDO

O objectivo deste estudo é caracterizar, sob o ponto de vista morfológico, as alterações do periodonto, em animais expostos ao RBF, nomeadamente:

1. Confirmar microscopicamente, ultra-estruturalmente e em imunohistoquímica a presença de alterações no osso alveolar e no ligamento periodontal induzidas pelo RBF.
2. Caracterizar a evolução das alterações morfológicas do osso alveolar e do ligamento periodontal com o tempo de exposição ao RBF.
3. Estudar macroscopicamente as alterações vasculares no osso alveolar e no ligamento periodontal induzidas pelo RBF.

II. MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Utilizámos 70 ratos albinos (*Mus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, adultos, em semelhante número de género, com idades entre oito meses e um ano, e peso médio de 364g (DP $\pm$ 91g). Os animais foram adquiridos ao laboratório Charles River, Barcelona, Espanha.

Os ratos foram colocados em gaiolas, onde podiam movimentar-se livremente, em grupos de dois ou três, de um só género. Foram alimentados com ração “standard” para roedores e tiveram livre acesso a água. Mantiveram ciclos de luz/escuro de 12h.

Foram tratados de acordo com a directiva da União Europeia para protecção aos animais utilizados para estudos científicos e experimentais (86/609/EEC) e de acordo com a transposição para a legislação Portuguesa para os mesmos efeitos (Decreto-Lei 197/96).

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

EXPOSIÇÃO AO RBF

As gaiolas, com os animais, foram colocadas, em prateleiras, num compartimento, isolado, construído para o efeito, medindo 217×211×195 cm.

Um computador (Compaq) reproduziu, em contínuo, um “ruído branco”, previamente gravado, amplificado num amplificador (QSC) de 200W, filtrado e emitido por um sub-woofer (Magnat XTC 1200), colocado em posição frontal às gaiolas, criando um ambiente rico em baixas frequências de alta intensidade, incluindo infrasons.

O ruído foi avaliado com um analisador espectral digital (B&K 2144), que fornece informações em tempo real, nos vários pontos onde os animais estavam expostos ao RBF (Fig. 1).

A análise espectral revelou frequências concentradas nas bandas inferiores a 500Hz, correspondendo a uma pressão sonora superior a 85dB nas bandas de frequência entre os 20Hz e os 400Hz. A média dos níveis de pressão sonora revelou-se superior a 109 dB - pressão sonora real - ou 98 dBA - filtro de ponderação A. A análise espectral foi sobreponível em todas as zonas de exposição dos animais.

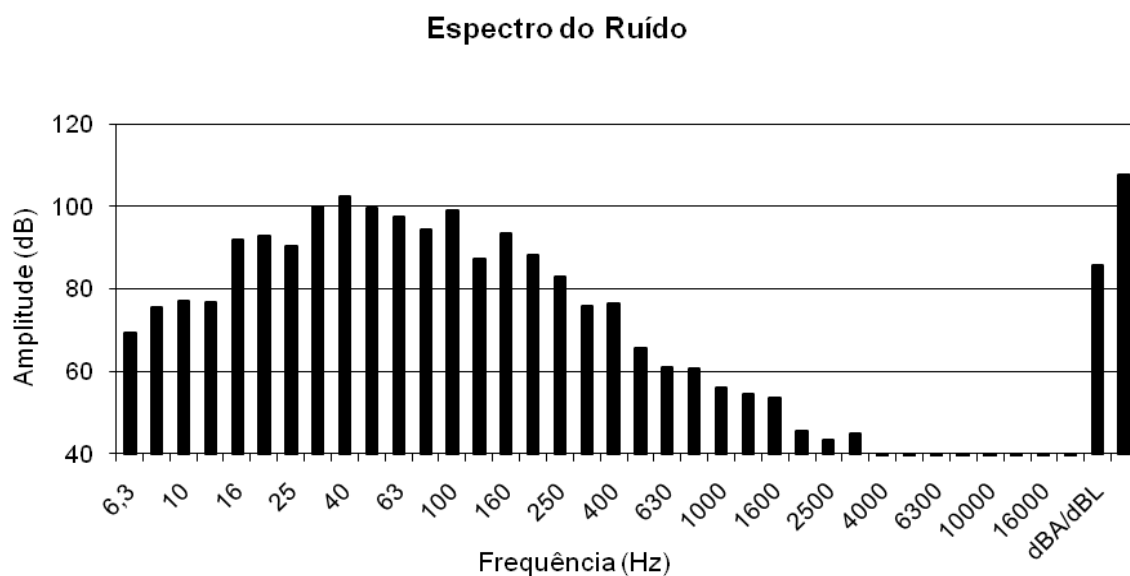


Figura 1 - Distribuição da frequência no ambiente ao qual foram expostos os animais.

Os animais foram divididos em 6 grupos:

Grupo	Número de Animais	Horas de exposição ao RBF (contínuo)
gC	15	0 horas (silêncio)
g1	10	168h (1 semana RBF)
g2	10	504h (3 semanas RBF)
g3	10	840h (5 semanas RBF)
g4	10	1512h (9 semanas RBF)
g5	15	2184h (13 semanas RBF)

Após os tempos de exposição, os animais foram sacrificados com uma injeção intraperitoneal de ketamina (Ketalar, Parke-Davis Co., Barcelona, Spain; 4,0-8,0 mg/Kg peso). A remoção cirúrgica das mandíbulas foi efectuada de acordo com o protocolo cirúrgico para dissecação de estruturas cervicais (Krinke, 2000). Foi utilizado procedimento semelhante para o grupo de controlo.

MACROSCOPIA – ESTUDO VASCULAR

Estudo efectuado em 5 animais nos grupos gC e g5.

Observação com lupa esterioscópica após injeção de contraste seguida de diafanização pela técnica de Spalteholz.

A injeção do Micropaque foi precedida de uma cuidadosa lavagem do sistema vascular com soro fisiológico aquecido a 37°C, tendo o cateter para injeção sido introduzido na aorta abdominal.

Para a diafanização foi utilizada a técnica de Spalteholz que pode ser aplicada a peças de todas as dimensões. Depois de dissecada, a mandíbula foi fixada em formol tamponado a 10%.

Após lavagem, a mandíbula foi colocada em água oxigenada a 10V, para branqueamento. Foi novamente lavada e desidratada em álcool com concentrações crescentes 50, 70, 90, 95, 99% e álcool absoluto.

Posteriormente, as mandíbulas foram sujeitas a um banho em benzol puro, sendo de seguida, colocadas numa mistura de salicilato de metilo com benzoato de benzilo.

MICROSCOPIA

ÓPTICA

Após observação macroscópica, fixaram-se as mandíbulas em formol tamponado a 10%, para observação em microscopia óptica. As lâminas foram coradas com:

- Hematoxilina-eosina (HE)

- Tricrómico de Masson

- Orceína

Efectuámos, ainda, nas mandíbulas dos animais dos grupos gC, g1, g2, g3, g4 e g5, imunomarcacão para os colagénios IV e V e dos gC, g1, g2 e g5, imunomarcacão para o colagénio I. A recuperaçao antigénica realizou-se por digestão enzimática com pepsina, com pH entre 1,5 e 2 e temperatura de 37,5°C.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos das mandíbulas de todos os grupos, foram fixados de acordo com a técnica descrita por Águas *et al.* (1991), à temperatura ambiente, numa solução composta por 4% de formaldeído, 1,25% de gluteraldeído e 10nmol/L em 0,05 mol/L de cacodilato tamponado, pH 7,2.

Os fragmentos foram posteriormente lavados com uma solução tamponada, e *post-fixados* numa solução composta por 1% de ferrocianato de potássio e 1% de tetróxido de ósmio, em água destilada. As amostras foram, em seguida, desidratadas em etanol de concentrações crescentes, incluídas em Epon e cortadas com um ultramicrotomo LKB.

Os cortes foram montados em grelhas de cobre, corados com acetato de uranilo e citrato de chumbo, e observados num microscópio electrónico JEOL 100C.

MORFOMETRIA

RECOLHA DE DADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

Análise morfométrica - Tempo de exposição ao ruído e efeito sobre as razões de áreas e sobre as razões de perímetros

Procedemos a uma análise de variância com um factor ordinal para averiguar se o tempo de exposição ao RBF (horas de exposição) tinha um efeito significativo sobre a variável dependente – área de conjuntivo do ligamento periodontal.

Efectuámos, para esse efeito, medições para um valor ordinal absoluto, medindo a área do dente, mais concretamente o valor da área, perímetro e circularidade da porção mais externa da raiz do dente (consequentemente, correspondente ao limite do ligamento periodontal do lado dentário) e o valor da área, perímetro e circularidade da porção do ligamento periodontal que estava em contacto com o osso alveolar.

Estas medições foram efectuadas no gC, g1, g2, g4 e g5.

As medições foram efectuadas com um software de análise de imagem OPTIMAS (OPTIMAS; Corporation of Edmonds, Washington), em imagens captadas com um microscópio óptico, com uma ampliação $\times 100$, em lâminas coradas com HE.

Efectuaram-se vinte medições nos gC, g1, g2, g4 e g5. Em cada lâmina, foram realizadas tantas medições quanto possível, de acordo com os critérios previamente estabelecidos, aproveitando o maior número de dentes possível por lâmina.

Grupo	gC	g1	g2	g3	g4	g5
Nº de medições	20	20	20	*	20	20

* Não obtivemos medições suficientes para efectuar comparação

Tendo em conta o objectivo da análise morfométrica, nomeadamente saber se o tempo de exposição ao ruído tinha um efeito sobre as razões de áreas e sobre as razões de perímetros, aplicou-se a Análise de Variância a um factor (ANOVA one-way), para cada caso separadamente. Em ambos os casos, o factor experimental considerado foi o tempo de exposição, em semanas, sendo a variável dependente a razão de áreas ou a razão de perímetros.

A aplicação da ANOVA one-way, foi antecedida da verificação dos seus pressupostos, nomeadamente a normalidade da distribuição dos dados referentes às razões em cada

um dos grupos experimentais, assim como a sua homocedasticidade. Estes pressupostos foram verificados através da aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de uniformidade de variâncias de Levene.

Análise morfométrica - Tempo de exposição ao ruído e efeito sobre a imunomarcação para colagénio I, IV e V.

Efectuámos, também observações nas lâminas de imunomarcação para os colagénios I no gC, g1, g2 e g5, colagénios IV e V no gC, g1, g2, g3, g4 e g5.

Procedemos à captação das imagens em ampliação x200 com microscópio óptico, que foram posteriormente analisadas no programa – Image J desenvolvido pelo National Institute of Health – NIH. Este programa permite ao utilizador criar *pluggins* para o processamento e análise de imagens. No nosso trabalho utilizamos o *plugin colour deconvolution* desenvolvido por Ruifrok & Johnston's para a avaliação da quantidade de coloração numa determinada imagem obtida aquando da captação da imagem. As imagens captadas foram analisadas em vectores pré-definidos, pelos autores do *plugin* – *haematoxylin, eosin and DAB* - que permitem a separação dos tons castanhos e a tradução gráfica das intensidades através de um histograma com uma escala de 1 a 255.

Os dados recolhidos, foram posteriormente analisados estatisticamente, tendo sido a quantificação numérica das intensidades de cor separadas em três intervalos: de 1 a 113, maior densidade de castanhos; de 1 a 226, castanhos totais; de 227 a 255, ausência de coloração. Foi efectuado o quociente das somas dos valores do primeiro intervalo (1 a 113) pelo segundo intervalo (1 a 226) para se determinar, para cada imagem, a quantidade relativa de coloração.

Imunomarcação Colagénio I						
Grupo	gC	g1	g2	g3	g4	g5
Nº de medições	11	14	15	*	*	14

* Não foi possível obter resultados

Imunomarcacão Colagénio IV						
Grupo	gC	g1	g2	g3	g4	g5
Nº de medições	11	12	12	11	14	11

Imunomarcacão Colagénio V						
Grupo	gC	g1	g2	g3	g4	g5
Nº de medições	11	11	13	13	11	11

Tendo em conta o objectivo do trabalho, a saber, se o tempo de exposição ao ruído tem um efeito sobre o nível de imunomarcacão observado para colagénios de vários tipos (I, IV e V) recolhidas em animais, procedeu-se a uma análise de variância a um factor (ANOVA one-way), definindo como factor experimental, o tempo de exposição, em semanas, e como variável endógena ou dependente o nível de castanho.

Uma vez que a ANOVA one-way é uma técnica paramétrica, a sua aplicação pressupõe a normalidade da distribuição dos dados referentes ao nível de castanho, em cada um dos grupos experimentais, assim como a sua homocedasticidade, ou seja, uniformidade de variâncias. Estes pressupostos foram verificados através da aplicação do teste de normalidade de Shappiro-Wilk e de uniformidade de variâncias de Levene, para cada tipo de colagénio.

No que respeita ao pressuposto de normalidade, foram observadas violações generalizadas para os colagénios de tipo I e IV. Contudo, esta situação não foi impeditiva da aplicação da ANOVA one-way, uma vez que os grupos têm dimensões comparáveis.

Para a análise da uniformidade de variâncias, o teste de Levene, cuja aplicação não é sensível à normalidade dos dados, apenas na análise do colagénio IV, se verificou uma violação do mesmo. Consequentemente, e apenas para este tipo de colagénio, aplicou-se a ANOVA de Brown-Forsythe em vez da razão F. Finalmente, as comparações entre diferentes grupos experimentais foram efectuadas através do teste de Tukey (Colagénios I e V).

III. RESULTADOS

RESULTADOS

MICROSCOPIA ÓPTICA

CONTROLO

O grupo de controlo (gC) não apresentou alterações. Observou-se a normalidade das estruturas dentárias e periodontais, nomeadamente a polpa, a dentina, o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar.

No ligamento periodontal deste grupo, observou-se a perfeita orientação e organização das fibras, dirigindo-se de dente para dente, (fibras horizontais) e do osso alveolar para a raiz do dente (fibras oblíquas).

As fibras principais do ligamento periodontal, que estão inseridas no cimento e no osso alveolar do alvéolo dentário, são designadas fibras de Sharpey.

No ligamento periodontal, encontrámos como células predominantes, os fibroblastos, sendo também visíveis células formadoras junto ao cimento e ao osso alveolar; os cimentoblastos e os osteoblastos respectivamente.

O cimento tem o limite bem definido e contorno regular, bem como o osso alveolar com linhas de crescimento (linhas incrementais) bem definidas, de acordo com a sua fisiologia (Fig. 2). Estas linhas incrementais estão presentes e são paralelas à parede do alvéolo resultando da deposição do osso alveolar que ocorre com alguns períodos de repouso. O osso alveolar é extremamente dinâmico, com indicação “de ter respondido” a estímulos que induzem a formação e a reabsorção, sendo visíveis as várias linhas de aposição óssea.

Neste grupo observámos o osso alveolar e células em diferentes fases do desenvolvimento: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteócitos estão dispersos aleatoriamente e separados pela matriz extracelular (Fig. 2 e 27). O contorno externo do osso alveolar (junto ao ligamento periodontal) é regular, apresentando numerosas aberturas que passam da medula óssea do osso esponjoso ao ligamento periodontal, através das quais passam numerosos vasos sanguíneos e fibras nervosas.

O cimento recobre a porção externa da raiz do dente, podendo identificar-se o cimento acelular (primário) e celular (secundário) (Fig. 3), com limites bem definidos e contornos regulares.

GRUPOS EXPOSTOS AO RBF

Observámos uma destruição progressiva do ligamento periodontal com desorientação espacial das fibras que aumenta com a exposição ao RBF, alterações no cimento, no osso alveolar e alterações vasculares.

Alterações nas fibras do ligamento periodontal

Nas mandíbulas dos ratos Wistar expostos ao RFB, observou-se uma progressiva desorientação espacial das fibras do ligamento periodontal, com o aparecimento de espaços entre as fibras (Fig. 8). A desorientação espacial das fibras surge logo no g1 (Fig. 4), verificando-se que se torna progressivamente mais evidente nos grupos com mais tempo de exposição ao RBF (Fig. 5 e 6).

Esta desorganização das fibras do ligamento periodontal evidencia-se também na deficiente ancoragem que estas apresentam, nomeadamente do lado do osso alveolar. Parece que as fibras do ligamento periodontal se desgarram da porção óssea, tornando a articulação dente-osso menos eficaz. O ligamento periodontal apresenta espaços vazios, com menor quantidade de fibras inseridas no osso alveolar (Fig. 7). No grupo das fibras principais identificamos alterações na orientação e ancoragem nos grupos das fibras horizontais, das fibras oblíquas e das fibras inter-radiculares (Fig. 8).

As fibras de Oxitalan (fibras elásticas) apresentam-se num trajecto longitudinal cruzando os feixes das fibras oblíquas de uma forma perpendicular (Fig. 9). A desorganização e desorientação das fibras colagénias e elásticas são bem visíveis na figura 10.

Na comparação das imagens do gC com as imagens dos grupos expostos ao RBF, há uma diminuição aparente do número de núcleos de fibroblastos no ligamento periodontal.

Alterações no cimento

O cimento dos dentes dos animais expostos ao RBF apresenta alterações em todos os grupos. Estas alterações traduzem-se por uma irregularidade do cimento, apresentando-se este muito irregular em algumas zonas, com aumento da actividade dos cimentoclastos (Fig. 6 e 11) e mais espesso em outras (Fig. 7). A presença de áreas de reabsorção, de desmineralização e hipermineralização é uma constante nos grupos expostos ao RBF, sendo mais frequente a hipermineralização (Fig. 6, 7 e 8). Observou-se frequentemente uma camada mais espessa e uniforme de novo cimento depositada sobre o cimento preexistente (Fig. 6). Em contraste, nos casos onde não existe cimento preexistente, a camada de novo cimento apresentou-se mais fina e irregular, depositada directamente sobre a superfície de dentina. Nas zonas onde ainda não teria ocorrido a deposição de novo cimento, encontramos lacunas de reabsorção associadas às irregularidades radiculares, produzidas pelos cimentoclastos. Observamos a presença de cimentículos (pequenas massas globulosas de cimento) dispersos no ligamento periodontal (Fig. 12 e 13).

Alterações no osso alveolar

A irregularidade do contorno do osso alveolar surge logo no g1 (1 semana de exposição ao RBF) e é também observada em todos os grupos expostos ao RBF (Fig. 5 e 6).

Observam-se também fragmentos ósseos dispersos no ligamento periodontal. Estes fragmentos ósseos (necróticos), que aparecem nos grupos expostos ao RBF (Fig. 15), vão sendo mais numerosos à medida que o tempo de exposição aumenta e aparecem mais distantes do osso alveolar.

O aumento da actividade osteoclástica é também aparente pela presença de inúmeros osteoclastos em actividade nas lâminas com coloração de Tricrómico de Masson do g5 (Fig. 16). Essas células aparecem próximas ou fixas ao osso alveolar nas depressões conhecidas como lacunas de Howship. Aparecem como células gigantes, multinucleadas e com citoplasma acidófilo (Fig. 16).

O tecido ósseo apresenta-se perifericamente muito irregular com osteoblastos e osteoclastos alojados em várias lacunas e a matriz óssea rica em osteócitos (Fig. 17).

Observaram-se também algumas linhas delimitando novas formações ósseas no g5, com um intenso processo de remodelação (linhas incrementais) (Fig. 14).

Alterações vasculares

Encontramos alterações nas paredes dos vasos periodontais, nomeadamente, vacuolização da parede (Fig. 22), proliferação da íntima (“thrombosis like”) (Fig. 18), hialinização dos vasos (Fig. 19), congestão vascular, ectasia e hemorragia (Fig. 22 e 23). Estas alterações surgem em todos os grupos expostos ao RBF, tornando-se mais frequentes e exuberantes no g5.



Figura 2 - Periodonto de rato Wistar do grupo de controlo. Observam-se todas as estruturas periodontais normais, nomeadamente: cimento, ligamento periodontal, osso alveolar, em que são visíveis linhas incrementais (H.E. x 200).

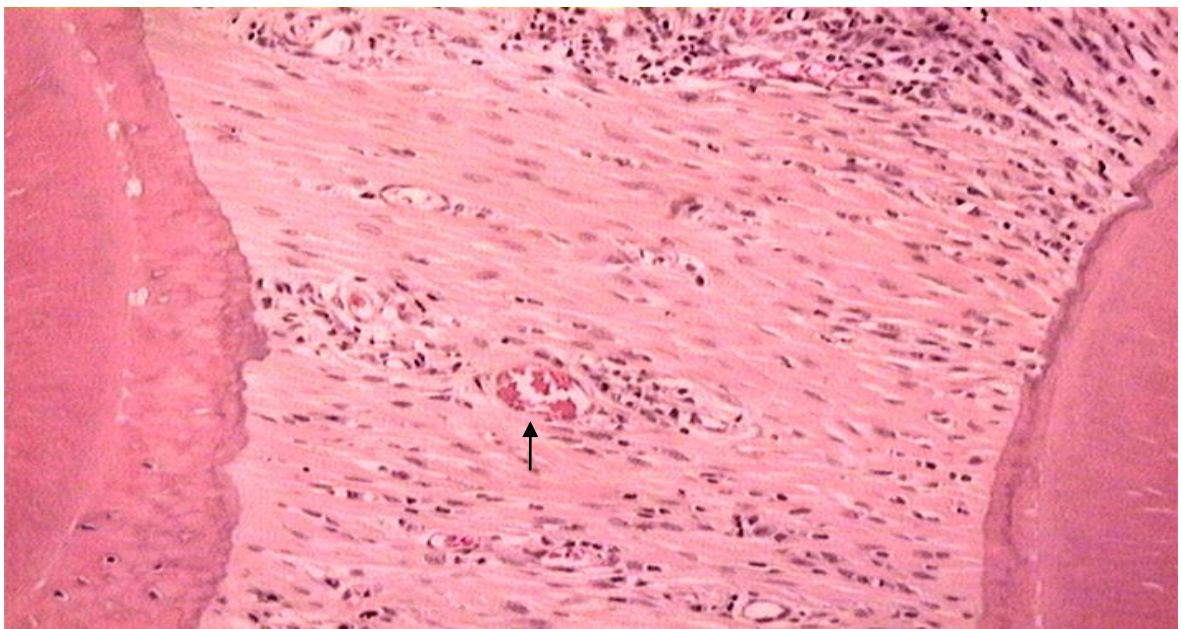


Figura 3 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo de controlo. Ligamento periodontal com as fibras com disposição transversal, perfeitamente distribuídas e compactas dispostas transversalmente com uma ancoragem perfeita. Presença de cimento primário e secundário. É também visível vaso periodontal normal (↑) (H.E. x 200).

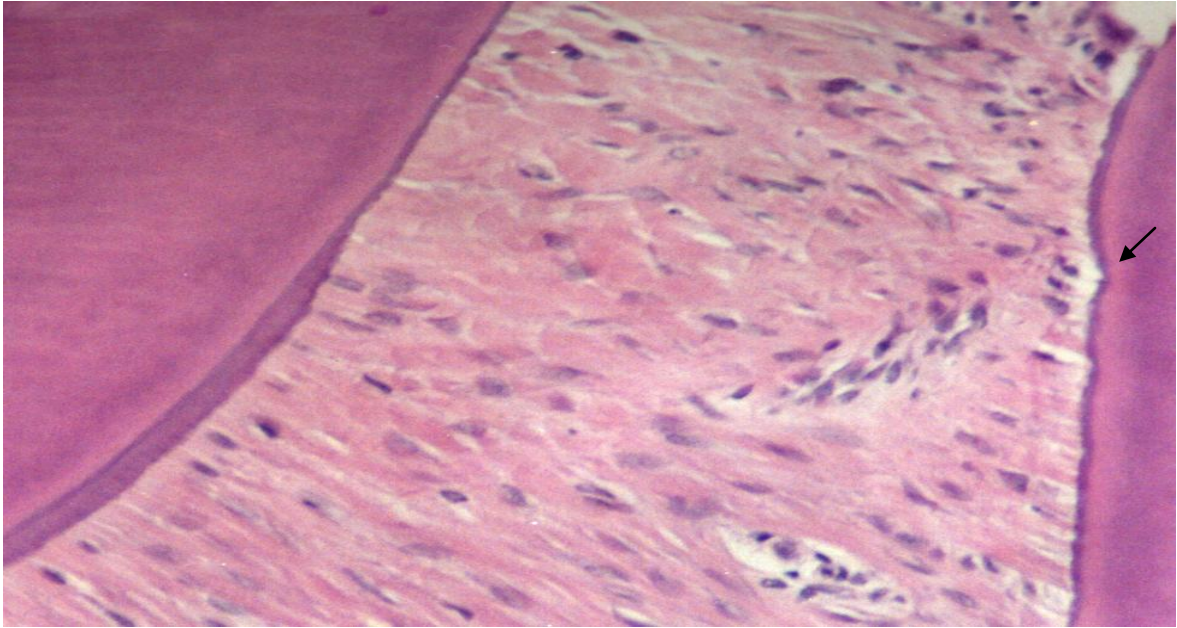


Figura 4 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 1. Observa-se uma aparente diminuição do número de núcleos de fibroblastos do ligamento e também uma deficiente ancoragem das fibras (↑) (H.E. x 200).

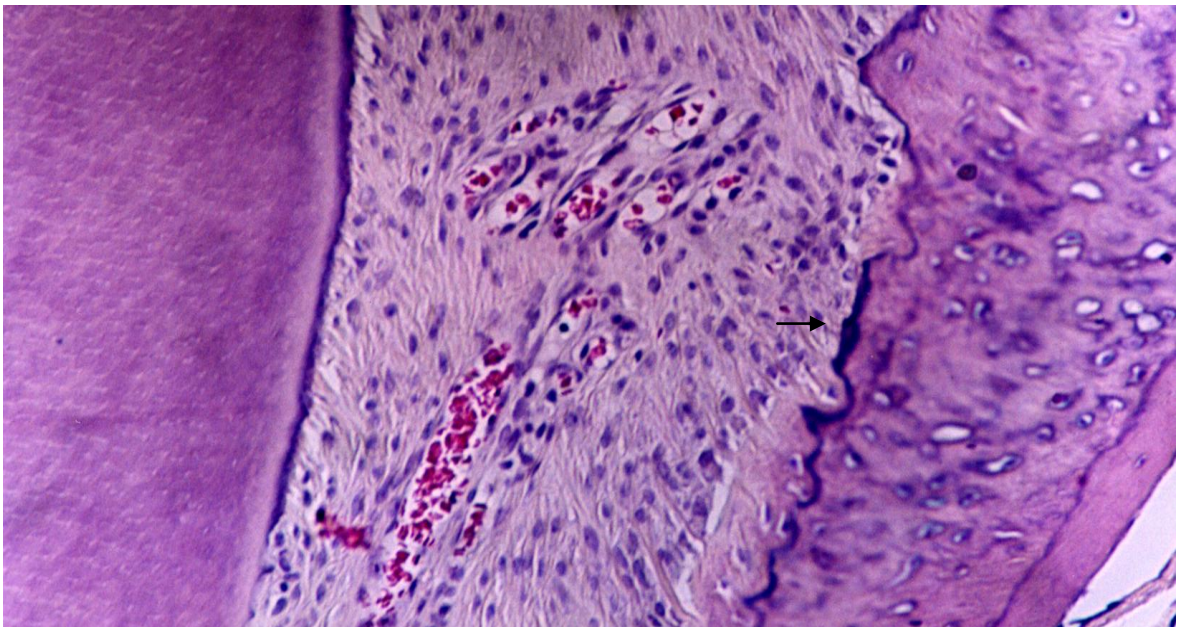


Figura 5 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 4. Observa-se um aumento do número de vasos periodontais com ectasia, num ligamento com fibras desorganizadas. O osso alveolar apresenta contorno muito irregular (→) (H.E. x 200).

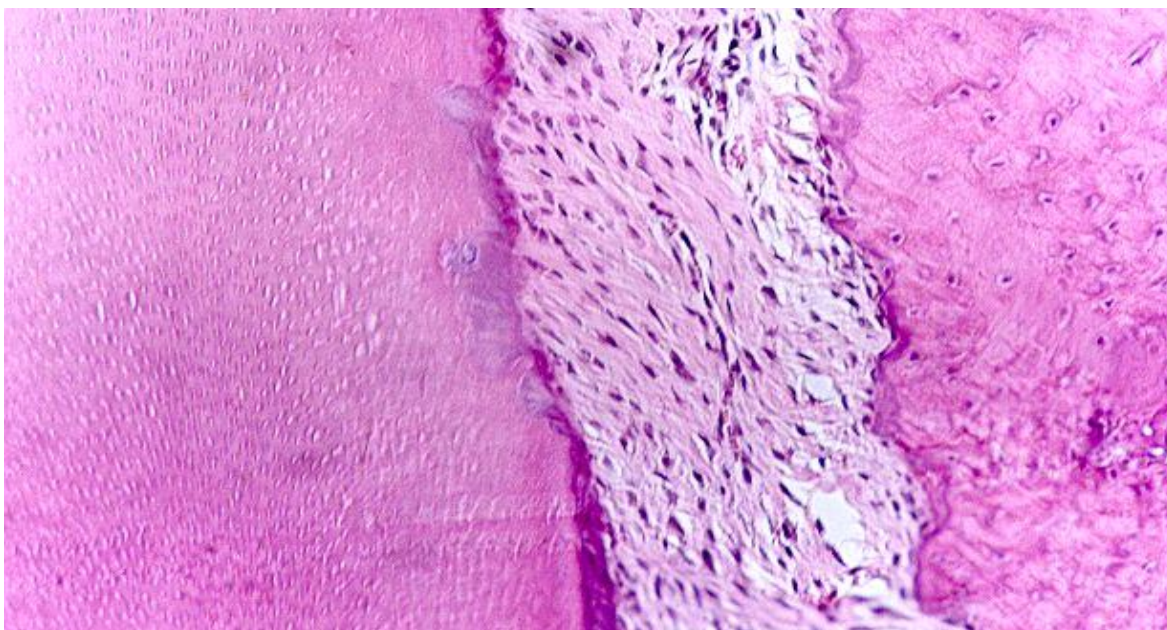


Figura 6 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Observam-se alterações no cimento e no contorno do osso alveolar. Há desorganização das fibras do ligamento e espaços entre as fibras (H.E. x 200).

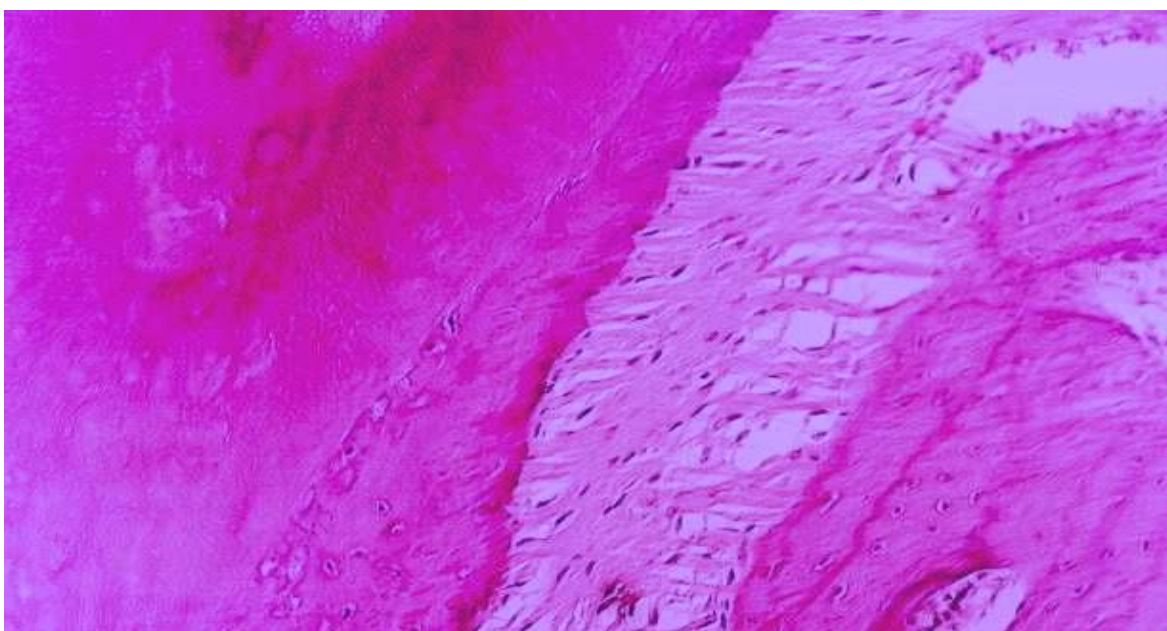


Figura 7 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Observa-se um aumento da espessura do cimento, fibras ligamentares com escassos núcleos e desgarradas do osso alveolar (H.E. x 200).

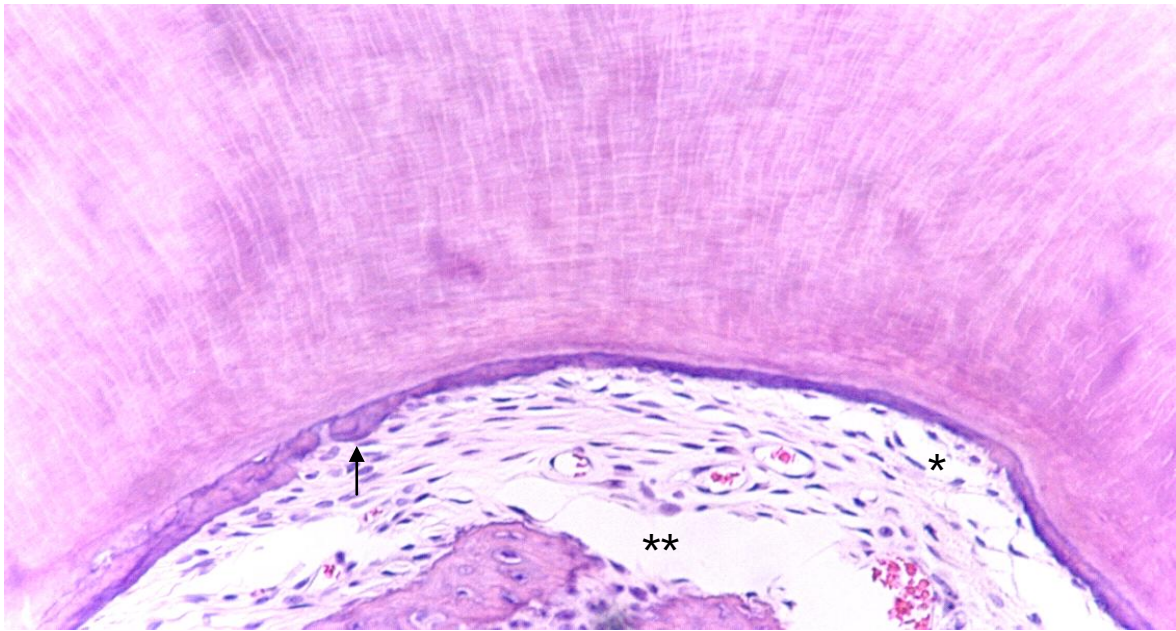


Figura 8 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Observa-se desorganização das fibras, com espaços entre elas (*) e entre as fibras e o osso alveolar (**). O cimento apresenta-se irregular com formações globosas (↑) (H.E. x 200).

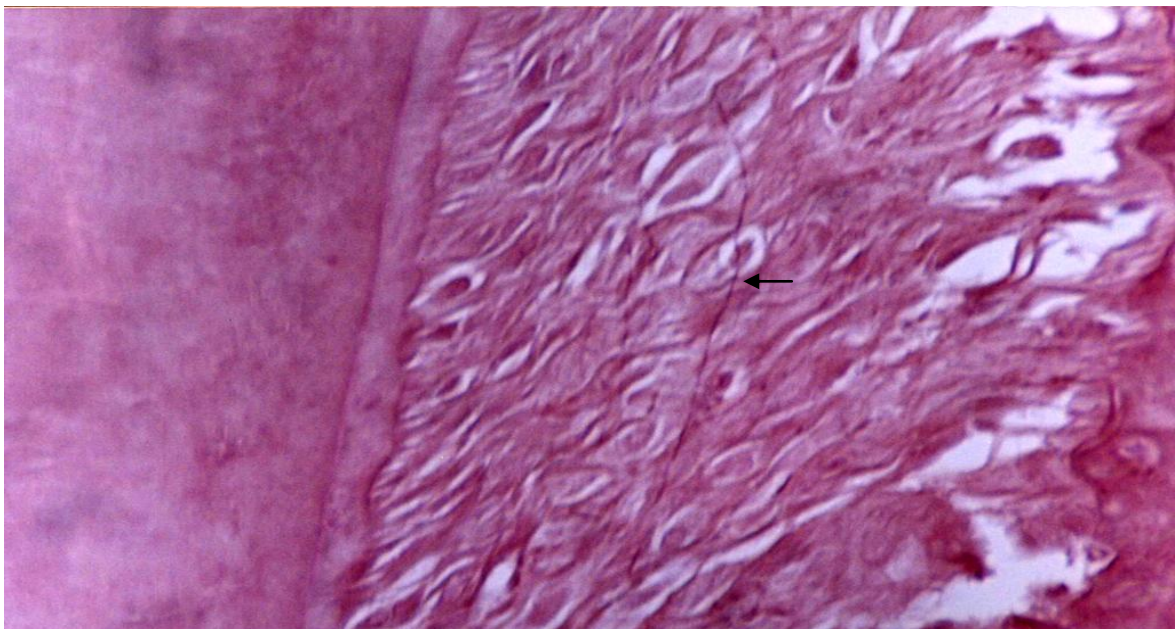


Figura 9 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Visualizam-se fibras de oxitalam afiladas, perpendiculares aos feixes das fibras oblíquas (←). São também evidentes espaços entre as fibras (Orceína X 400).

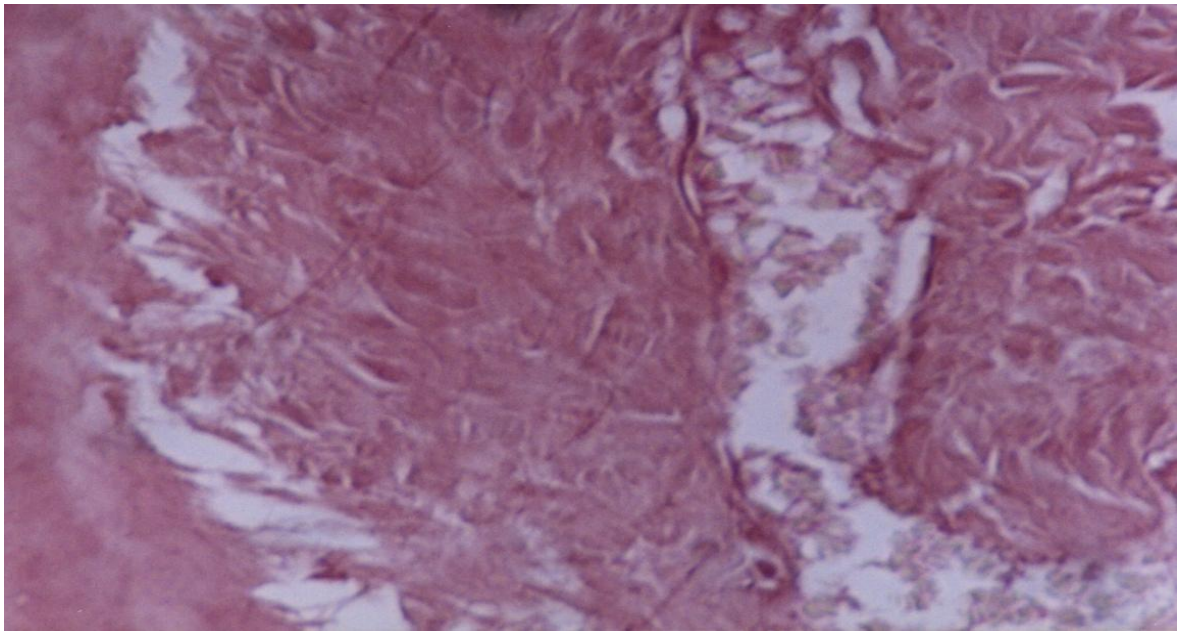


Figura 10 – Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Observam-se fibras colagénias e elásticas com uma desorganização e desorientação bem visível (Orceína X 400).

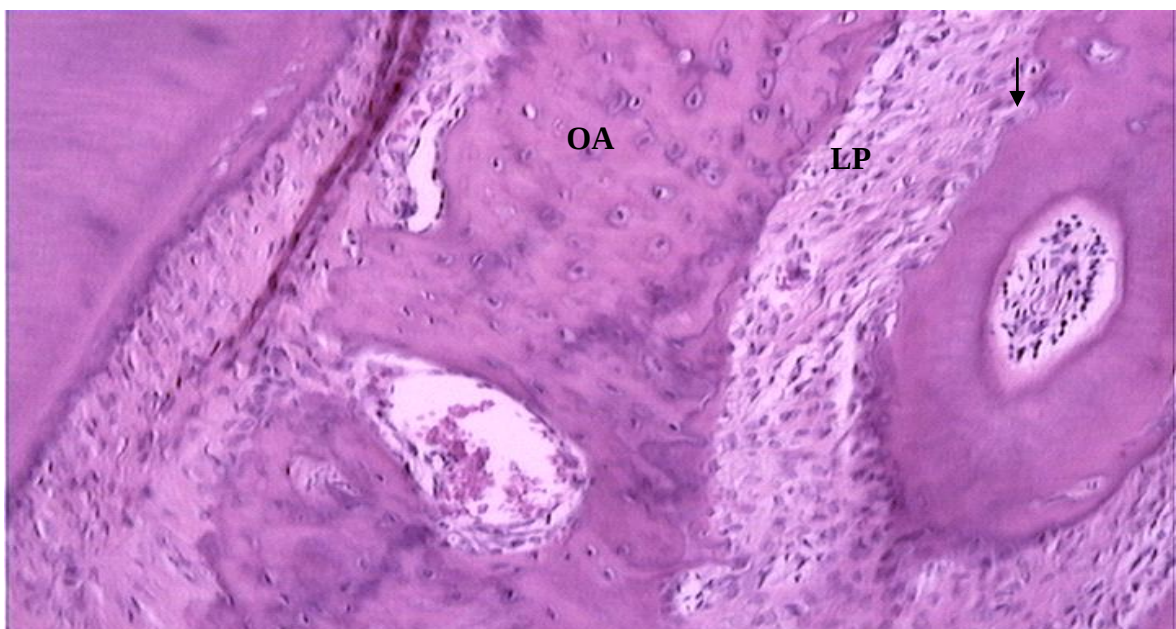


Figura 11 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 1. Observa-se cimento com contorno irregular (↓). No ligamento periodontal (LP) as fibras apresentam espaços entre elas, com evidente desorientação e uma incorrecta ancoragem no lado do osso alveolar. De notar o contorno irregular do osso alveolar (OA) (H.E. x 200).

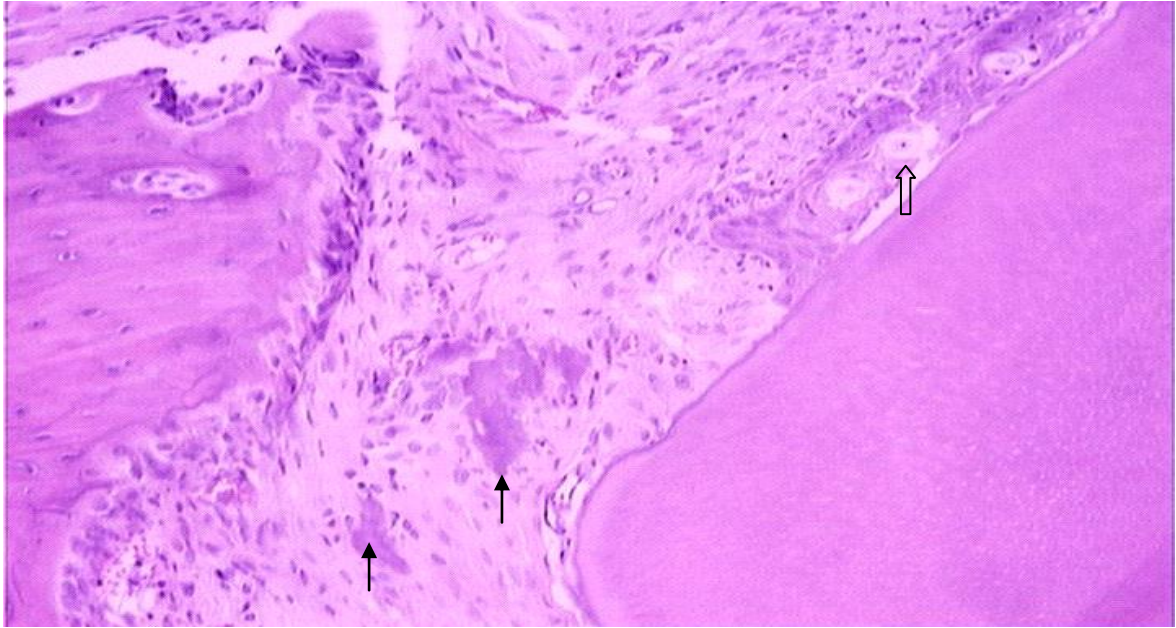


Figura 12 - Estruturas dentárias de rato Wistar do g5. No ligamento periodontal identificam-se cimentículos (↑) e odontoclastos (⇑). Desorganização das fibras (H.E. x 200).

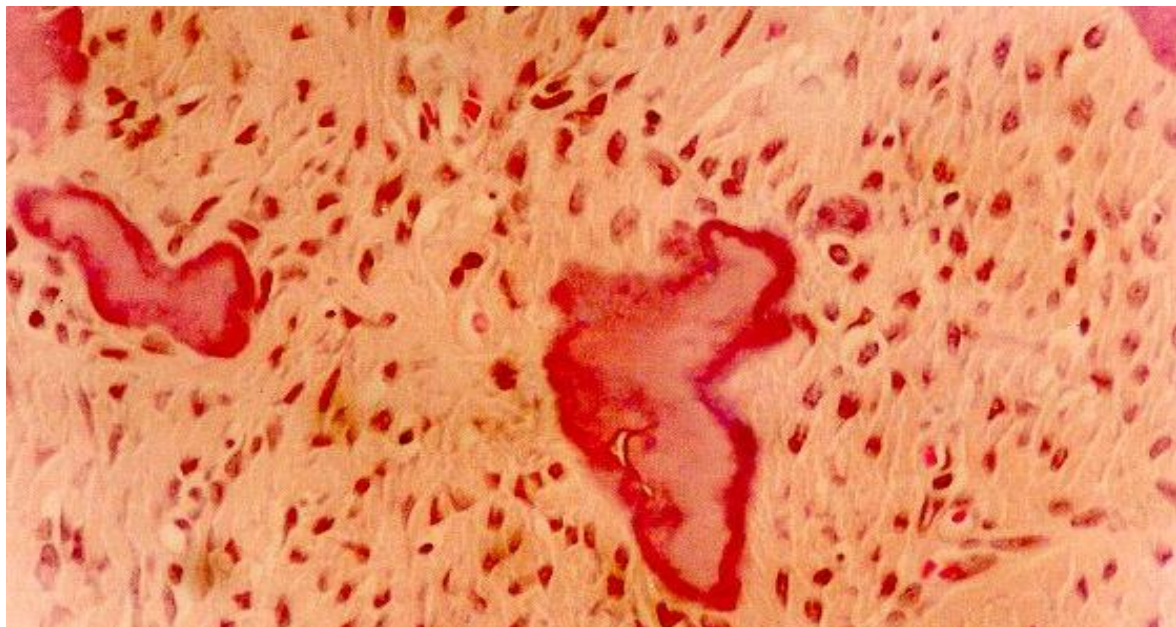


Figura 13 – Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Observam-se cimentículos dispersos nas fibras do ligamento (H.E. x 400)

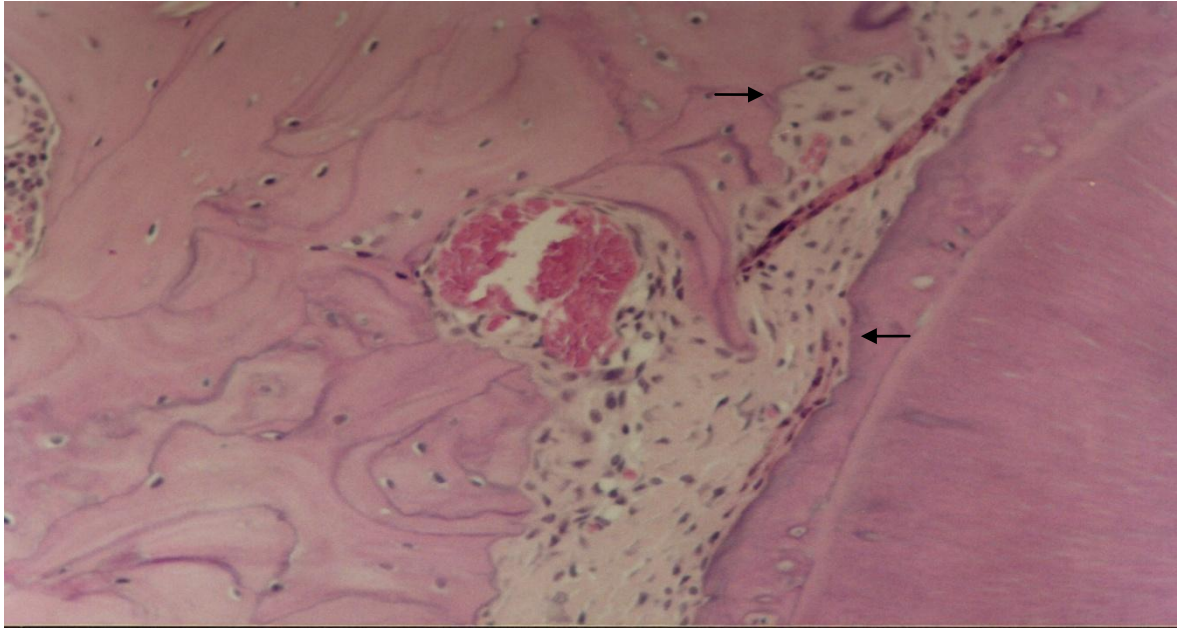


Figura 14 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Observa-se o osso alveolar com contorno irregular (→). Ligamento periodontal com as fibras desorganizadas. Note-se que o cimento apresenta também contorno irregular (←). Presença de intenso processo de remodelação (H.E. x 200).

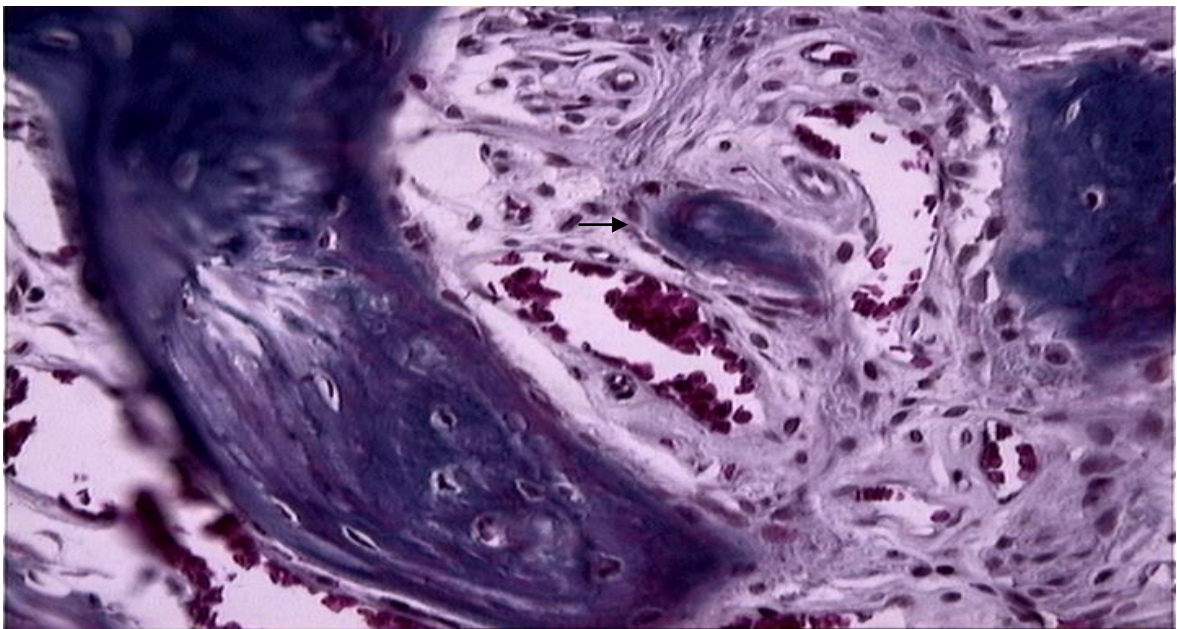


Figura 15 - Estruturas dentárias de rato Wistar do g5. Observa-se o osso alveolar e o ligamento periodontal. No ligamento periodontal observa-se um fragmento ósseo (→).(Tricrômico de Masson x 400).

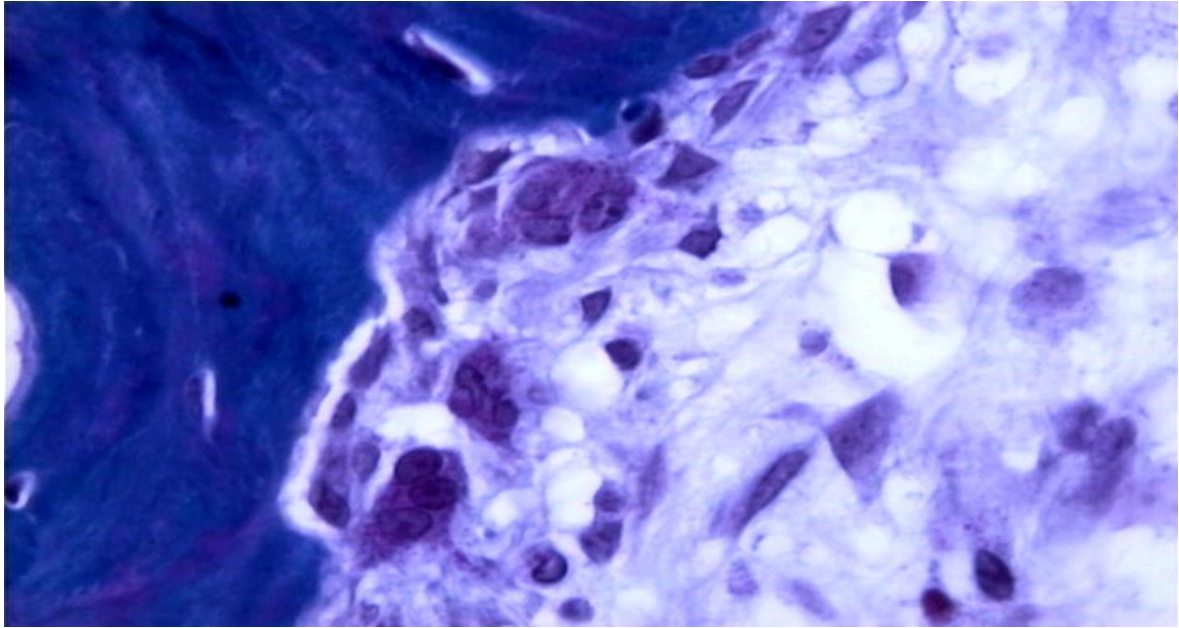


Figura 16 - Estruturas dentárias do rato Wistar do grupo 5. Observa-se reabsorção do osso alveolar com presença de osteoclastos numa lacuna de Howship. O ligamento periodontal apresenta-se vacuolizado (Tricrómico de Masson x 400).

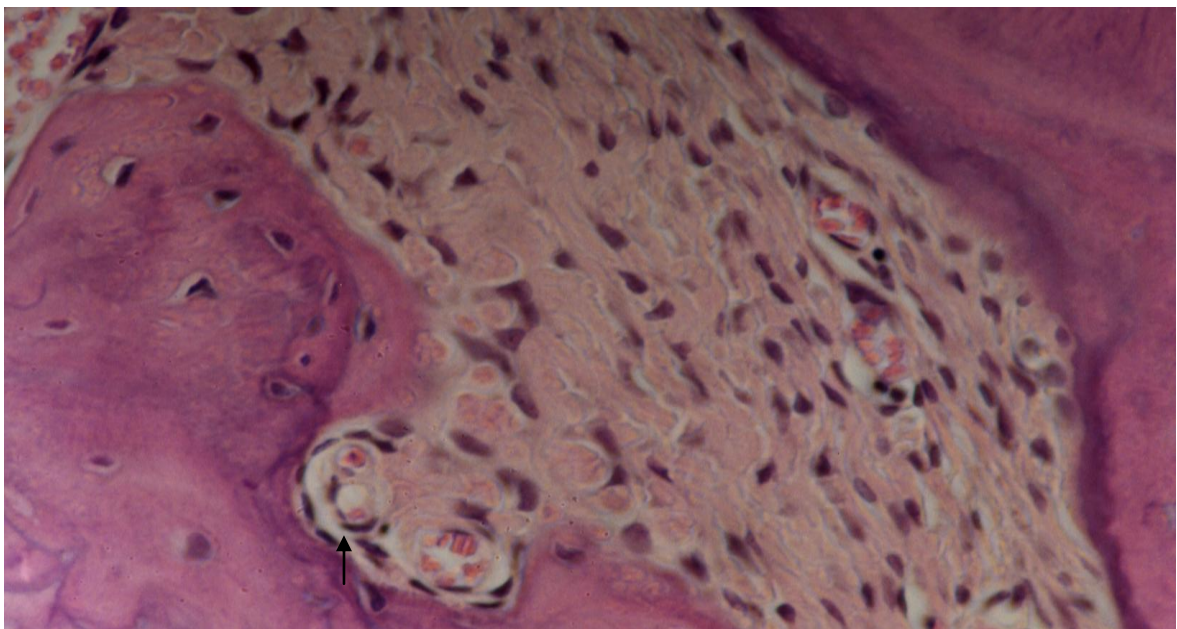


Figura 17 - Estruturas dentárias de rato Wistar do grupo 5. Visualiza-se irregularidade do contorno do cimento e marcada actividade clástica (osteoclasto numa lacuna de Howship)(↑). Matriz óssea rica em osteócitos (H.E. x 200).

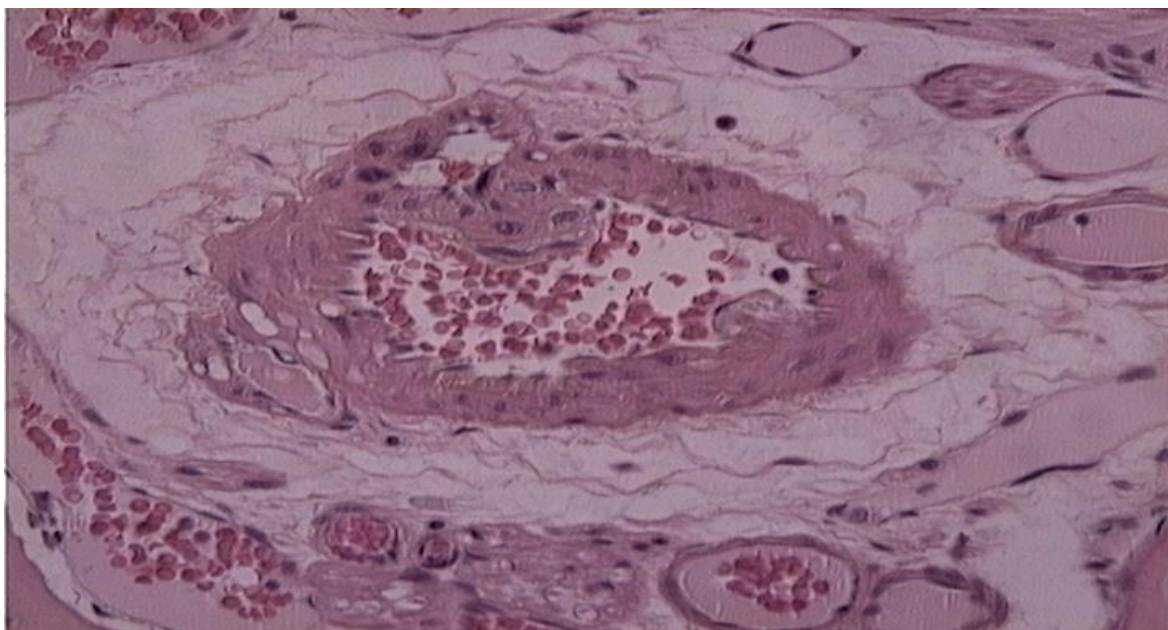


Figura 18 - Rato Wistar do grupo 5. Vaso do ligamento periodontal. É visível a formação de um espessamento da íntima ("thrombosis-like") (H.E. x 200).

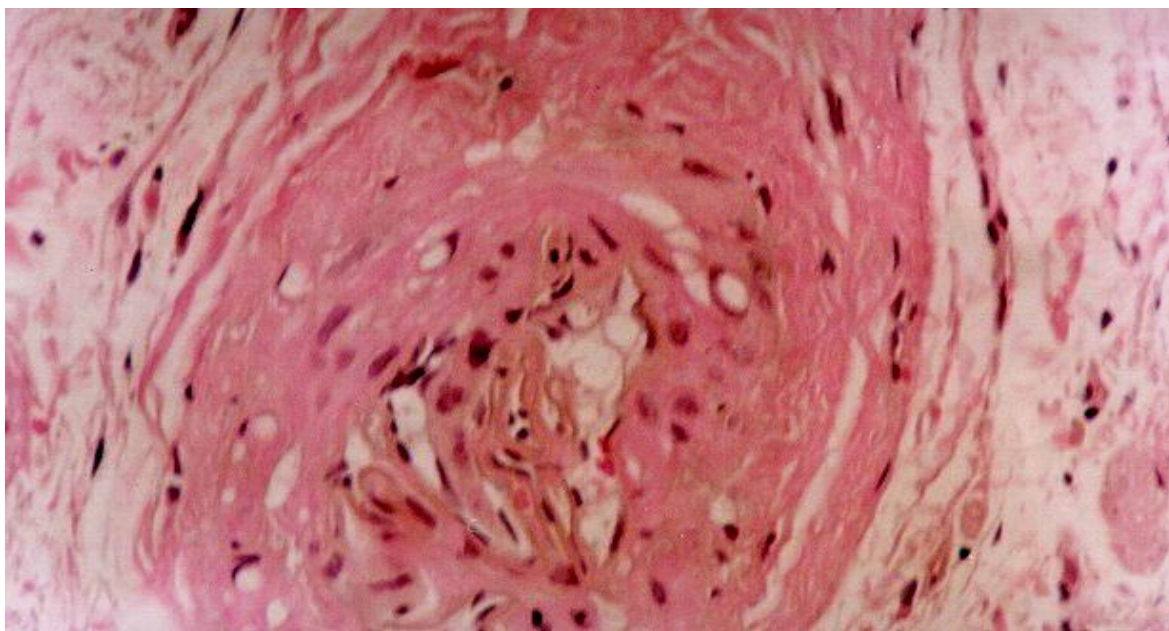


Figura 19 - Vaso do ligamento periodontal do grupo 5 num processo de hialinização, ocorrendo a sua obstrução total (H.E. x 400).

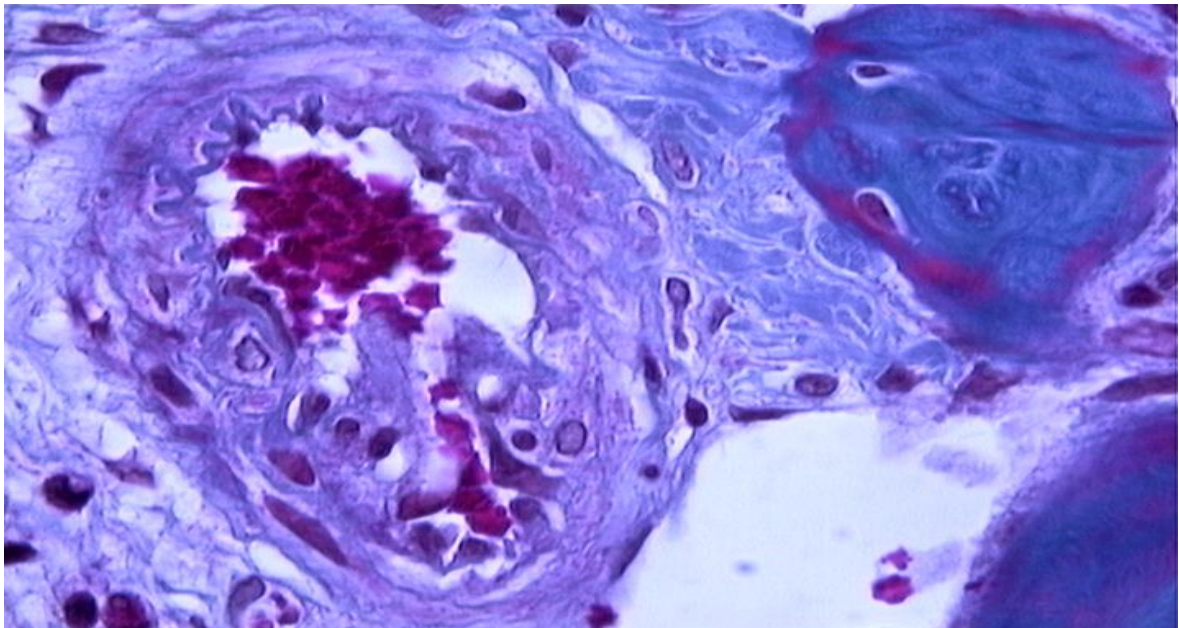


Figura 20 - Estrutura vascular do ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Observa-se um vaso do ligamento periodontal. É visível a formação de um espessamento focal da íntima. Rotura da limitante elástica interna e vacuolização da parede (Tricrômico de Masson x 400).

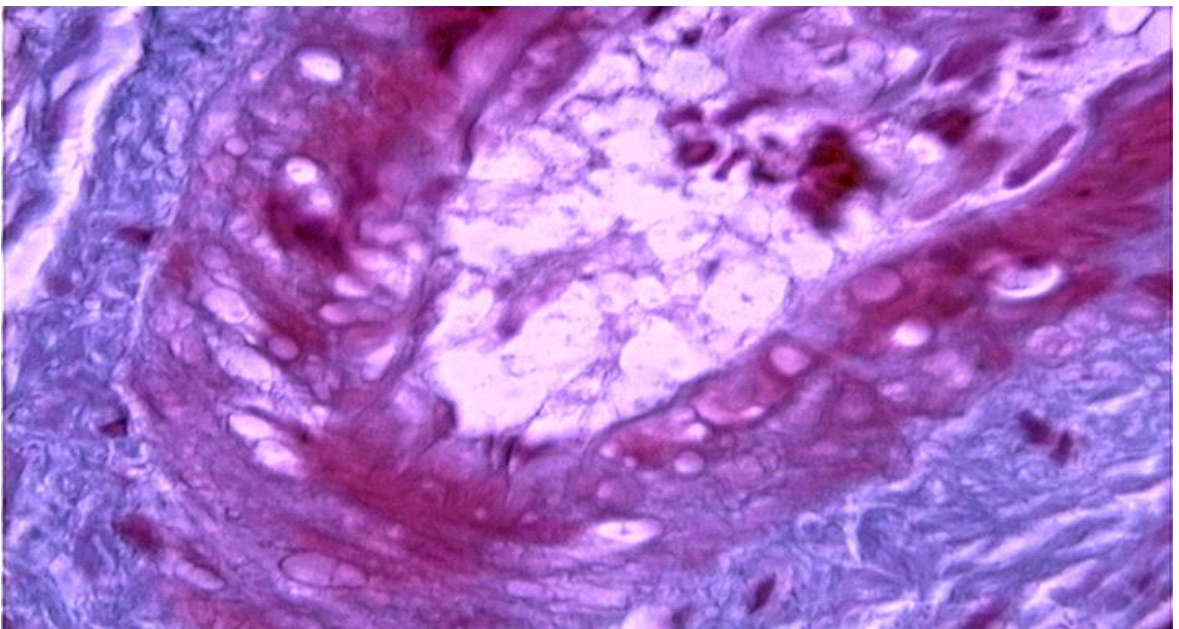


Figura 21 - Estrutura vascular do ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. É visível a vacuolização da parede (Tricrômico de Masson x 1000).

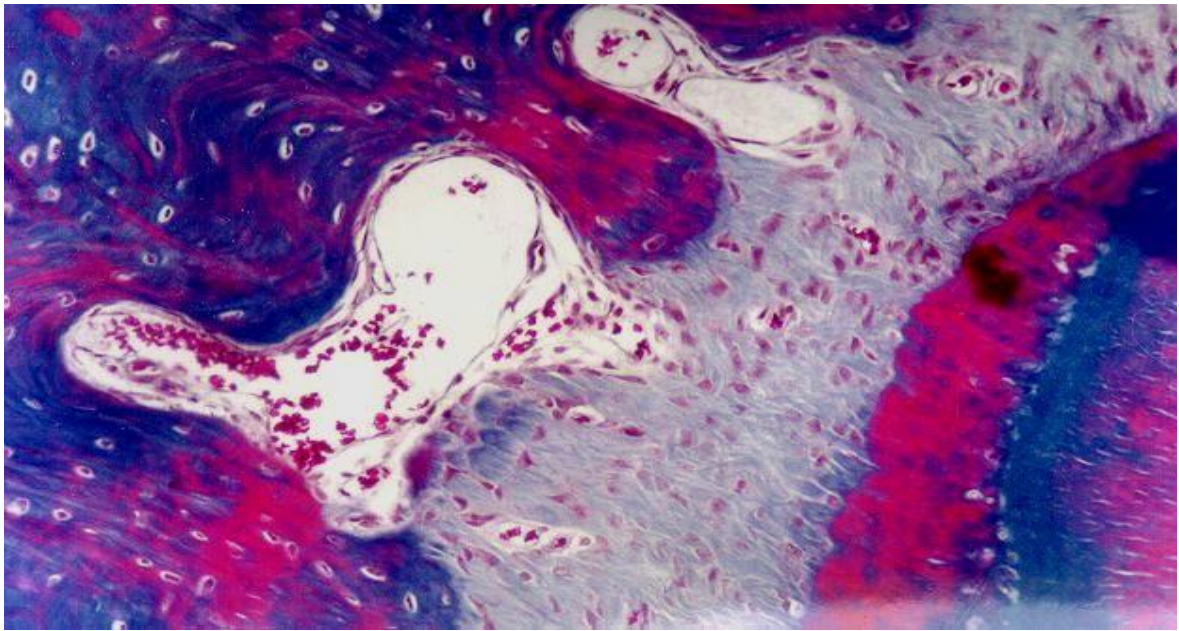


Figura 22 – Vasos ectasiados do ligamento periodontal do grupo 5. Cimentose muito evidente (Tricrômico de Masson x 200).

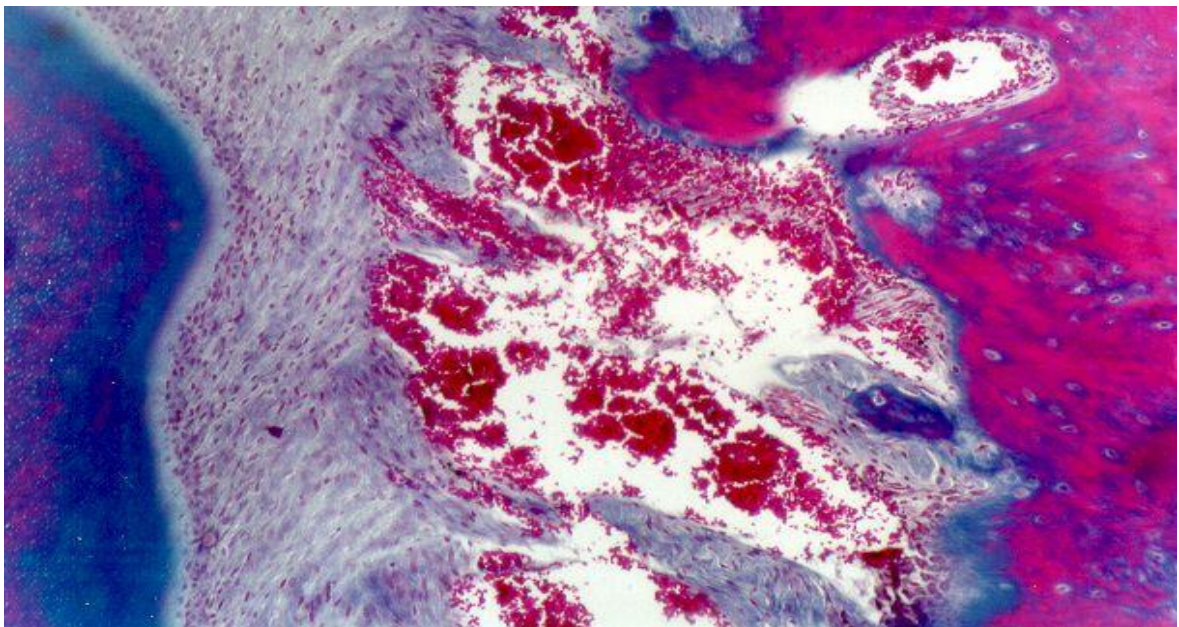


Figura 23 - Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Observa-se congestão vascular, ectasia e hemorragia (Tricrômico de Masson x 200).

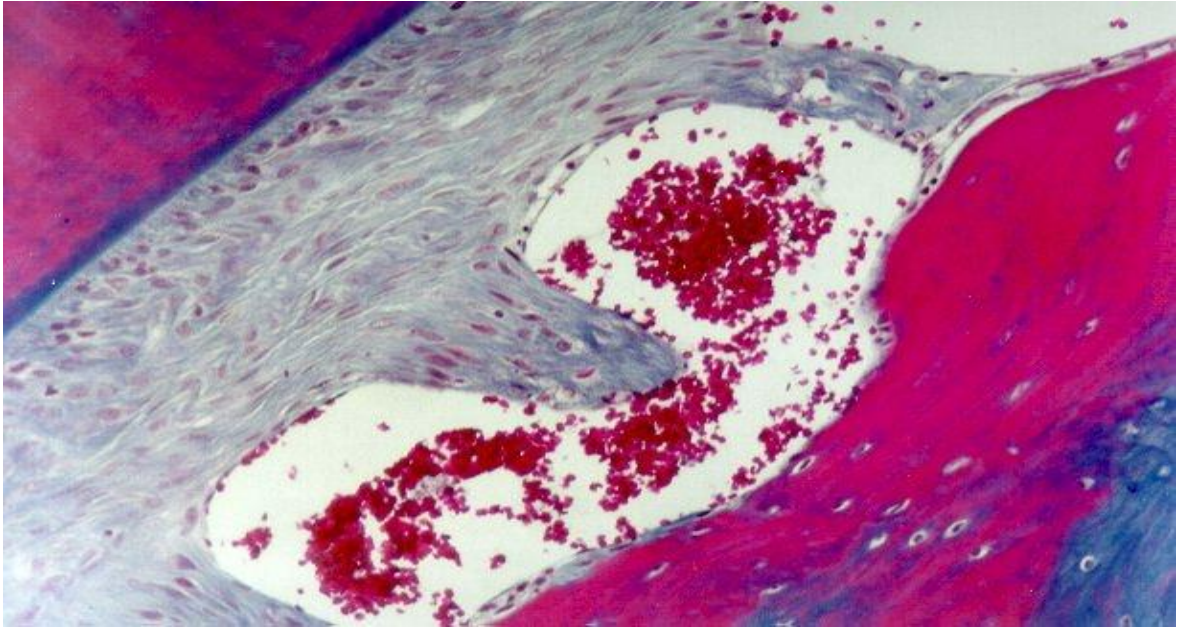


Figura 24 - Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Presença de um processo de congestão vascular, ectasia e hemorragia (Tricrômico de Masson x 200).

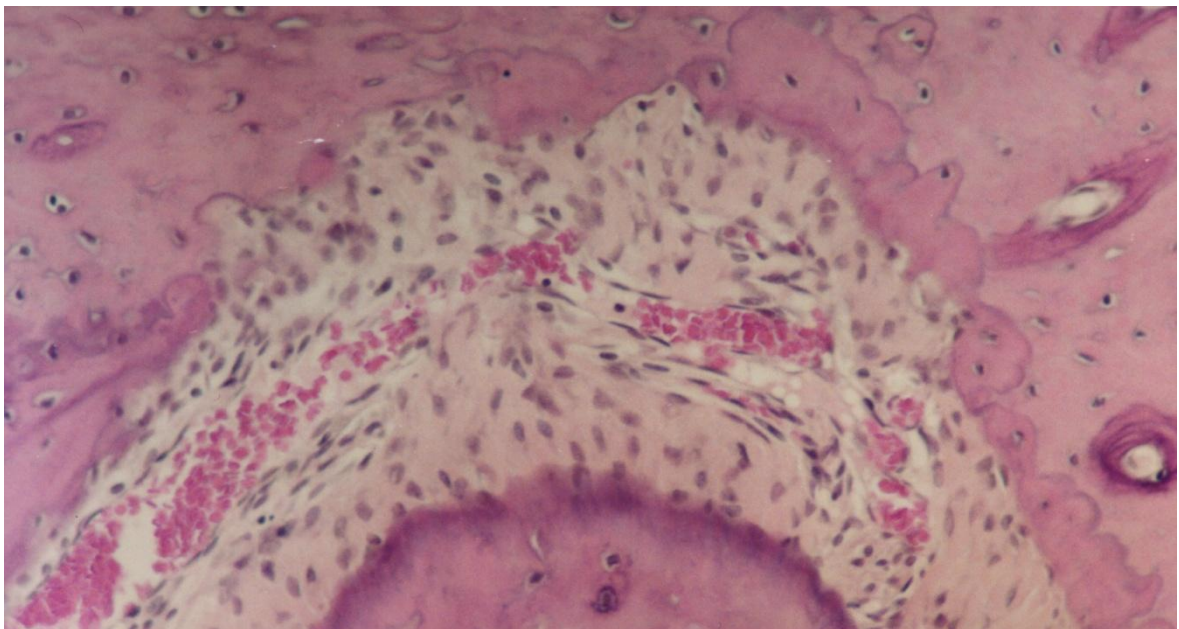


Figura 25 - Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Observa-se congestão vascular e irregularidade marcada do contorno ósseo. Desorganização do ligamento (H. E. x 200).

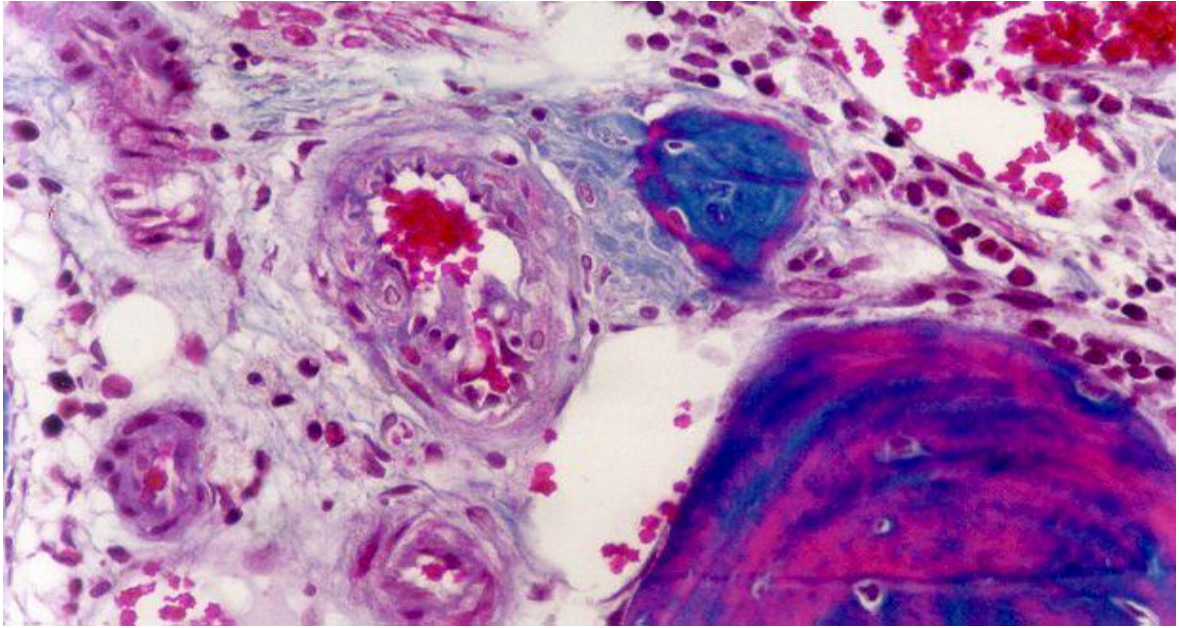


Figura 26 - Ligamento periodontal de rato Wistar do grupo 5. Congestão vascular, ectasia e hemorragia. Vasos com paredes espessadas, proliferação da íntima. Observa-se no ligamento periodontal fragmentos ósseos (Tricrômico de Masson. x 200).

IMUNOHISTOQUÍMICA

As imagens de imunomarcção para o colagénio I, IV e V, foram captadas com a ampliação x200 e analisadas no programa – “Image J” do National Institutes of Health (NIH). A variação na coloração dos “castanhos” foi analisada estatisticamente, de forma a obter-se uma caracterização mais objectiva dos dados. Utilizou-se o *pluggin colour deconvolution*, criado por Ruifrok & Johnston’s que avalia a quantidade de coloração numa preparação com imunomarcção. Como foi referido no capítulo dos Materiais e Métodos, foi necessário utilizar o vector pré-definido – *pluggin – haematoxylin, eosin and DAB*. Este *pluggin* permitiu a separação dos tons de castanho e a tradução gráfica da variação de intensidade de cor através de um histograma.

No que diz respeito às lâminas com imunomarcção para o colagénio I, observámos que a marcação ocorre no ligamento periodontal e osso alveolar (Figs. 27 a 30). Não há alteração significativa na coloração do grupo de controlo para o grupo de uma semana de exposição (Figs. 27 e 28).

Contudo, o grupo de controlo apresenta níveis de coloração do colagénio significativamente mais baixos que os apresentados pelos grupos de 3 e de 13 semanas de exposição, o que traduz um aumento significativo da quantidade deste tipo de colagénio a partir da 3ª semana de exposição ao RBF. Salienta-se que não existem diferenças entre o grupo de 3 semanas de exposição e o de 13 semanas.

Relativamente ao colagénio IV não se verificaram variações na intensidade da marcação entre o gC e g5 no ligamento periodontal e no osso alveolar (Figs. 31 e 32).

No que diz respeito ao colagénio V, observou-se um significativo aumento da imunomarcção do gC para o g1 (Figs. 33 e 34). A observação das lâminas do g1, g3, g4 e g5 (Fig. 35), apresentam uma marcação superior ao gC no ligamento periodontal e no osso alveolar.

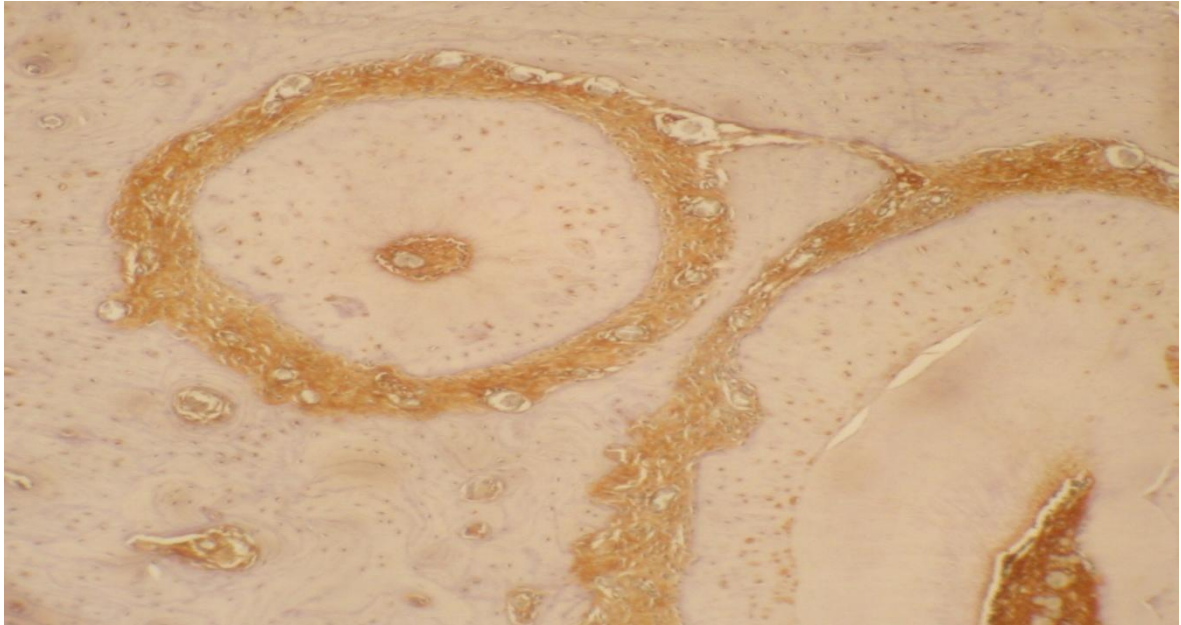


Figura 27 - Estruturas periodontais do grupo de controle com coloração de imunohistoquímica para o colagénio I, no ligamento periodontal e no osso alveolar (colagénio I x 200).

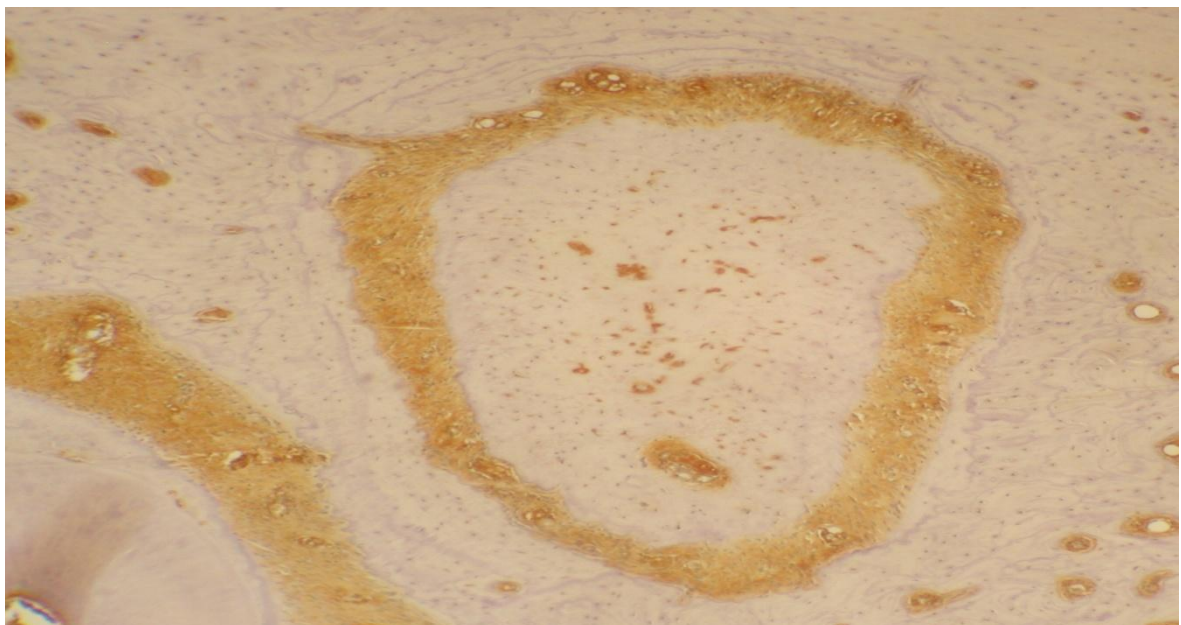


Figura 28 – Ligamento periodontal e osso alveolar do grupo 1 com coloração de imunohistoquímica para o colagénio I. Observa-se imunomarcação idêntica ao grupo de controlo (colagénio I x 200).

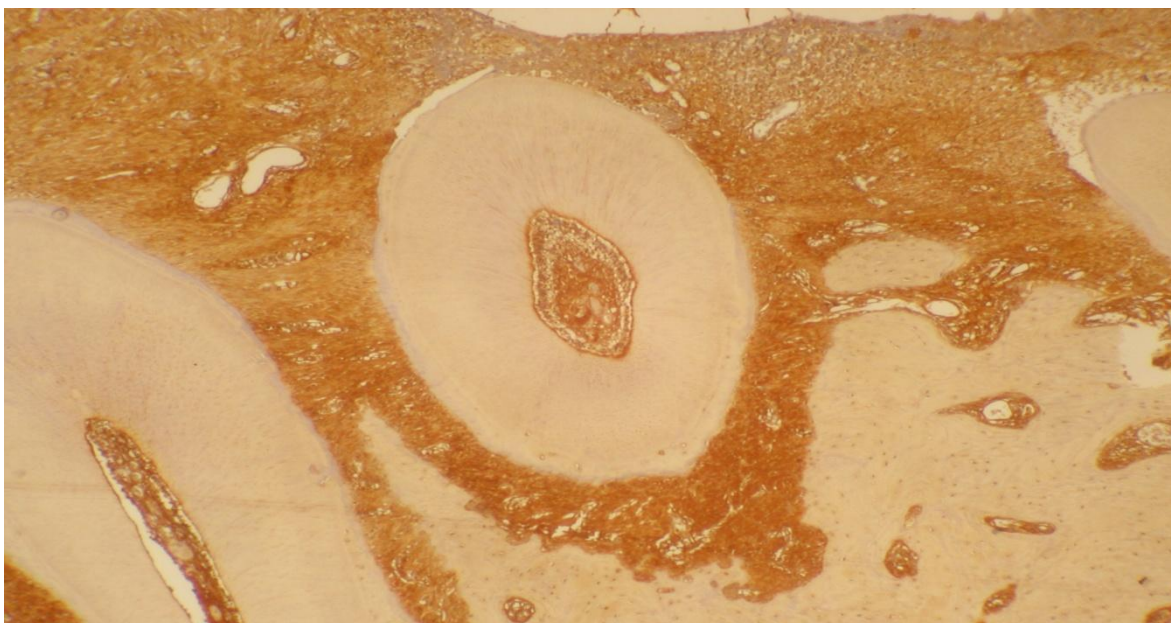


Figura 29 – Ligamento periodontal e osso alveolar do grupo 3 com coloração de imunohistoquímica para o colagénio I. Observa-se imunomarcação acentuada comparativamente com o grupo de controlo (colagénio I x 200).

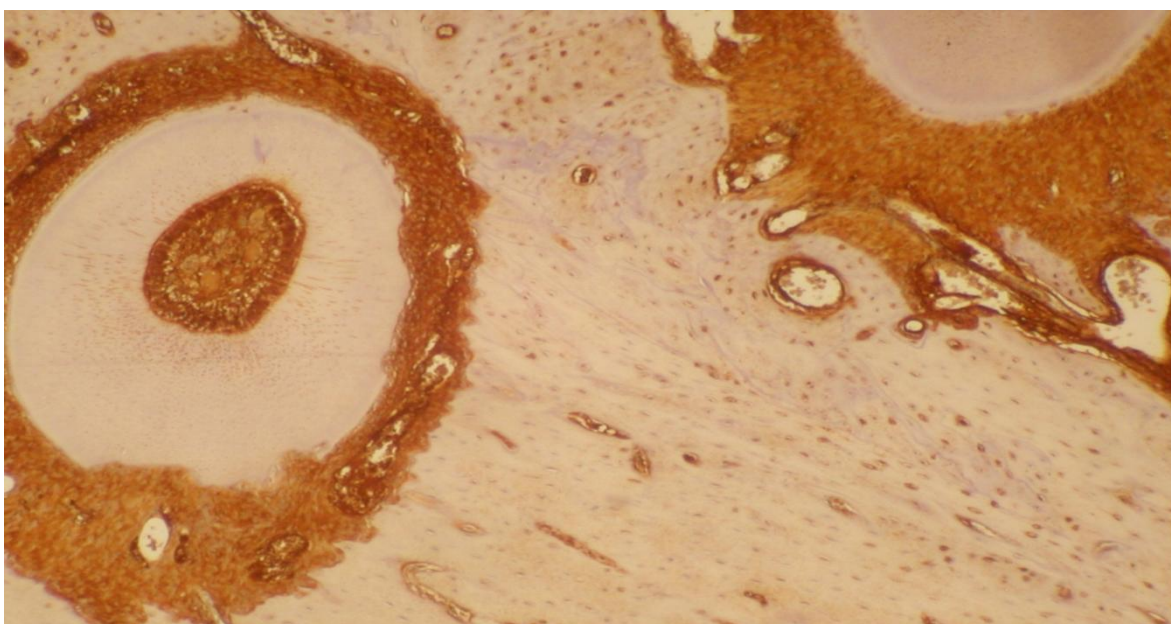


Figura 30 - Estruturas periodontais do grupo 5 com coloração de imunohistoquímica para o colagénio I. Observa-se uma imunomarcação mais intensa quer no ligamento periodontal, quer no osso alveolar comparativamente com o grupo de controlo (colagénio I x 200).

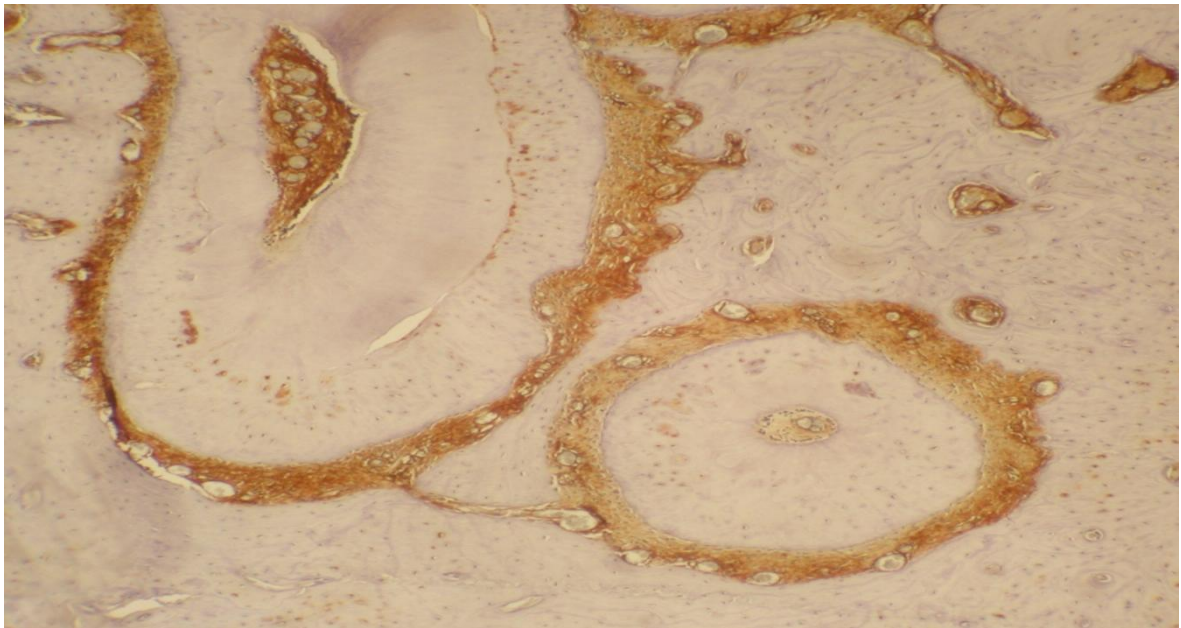


Figura 31 - Estruturas periodontais do grupo de controle com coloração de imunohistoquímica para o colagénio IV (colagénio IV x 200).

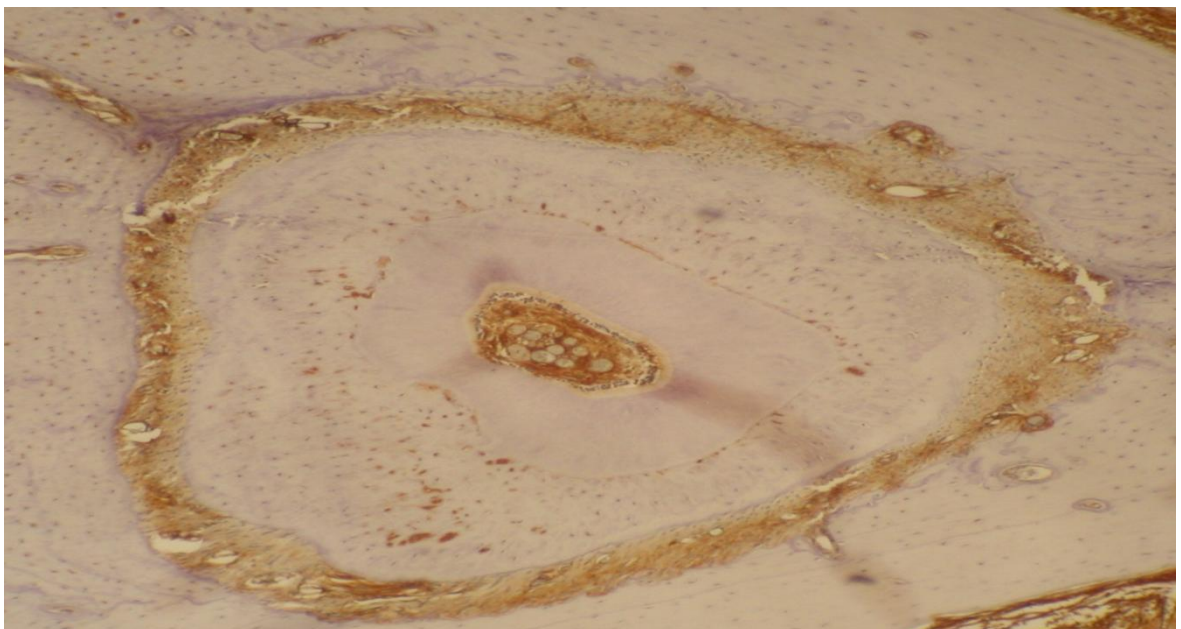


Figura 32 - Estruturas periodontais do grupo 5 com coloração de imunohistoquímica para o colagénio IV. Imunomarcacão sem diferenças significativas com a imagem do grupo de controle (colagénio IV x 200).

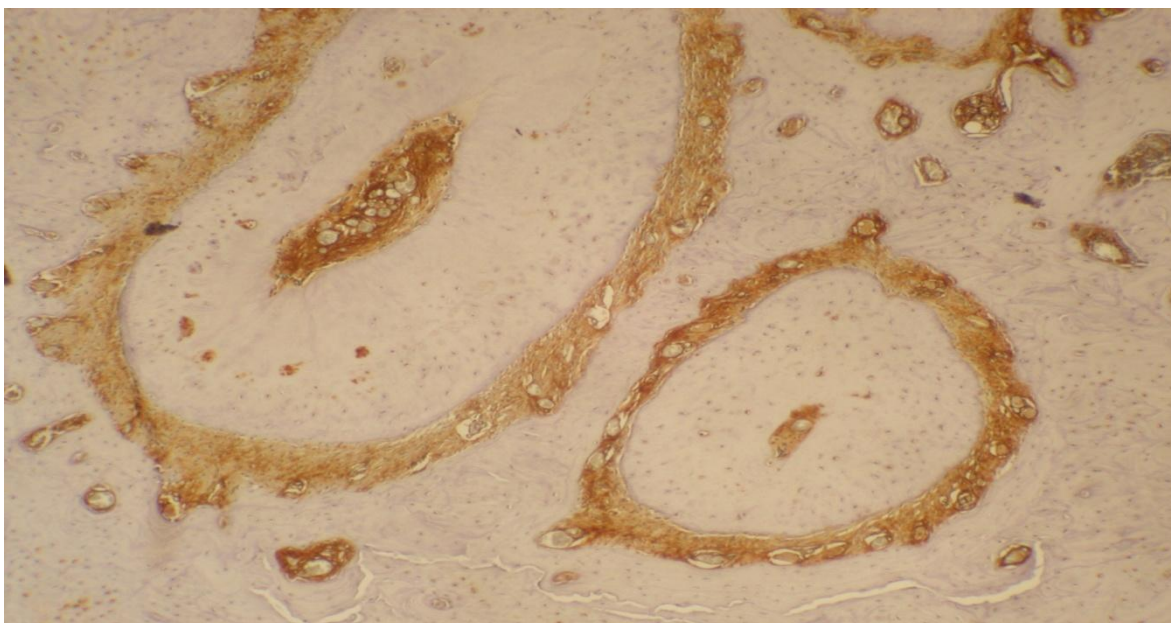


Figura 33 - Estruturas periodontais do grupo de controlo com coloração de imunohistoquímica para o colagénio V. Observa-se marcação nos espaços medulares (colagénio V x 200).

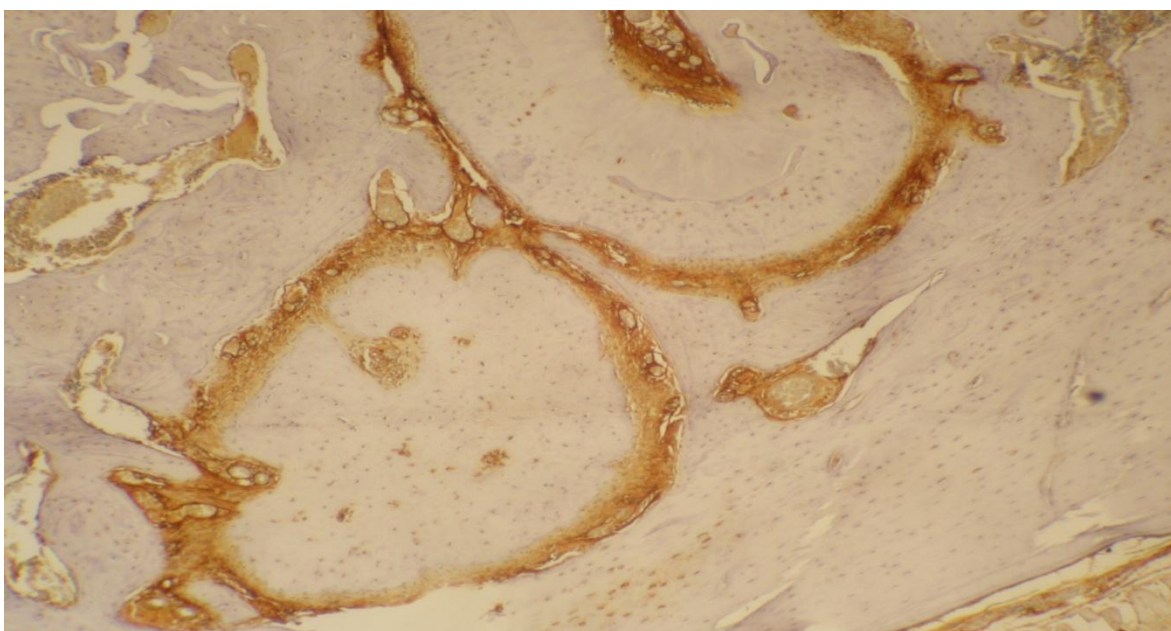


Figura 34 - Estruturas periodontais do grupo 1 com coloração de imunohistoquímica para o colagénio V. Observa-se uma maior marcação no ligamento periodontal comparativamente com o grupo de controlo (colagénio V x 200).

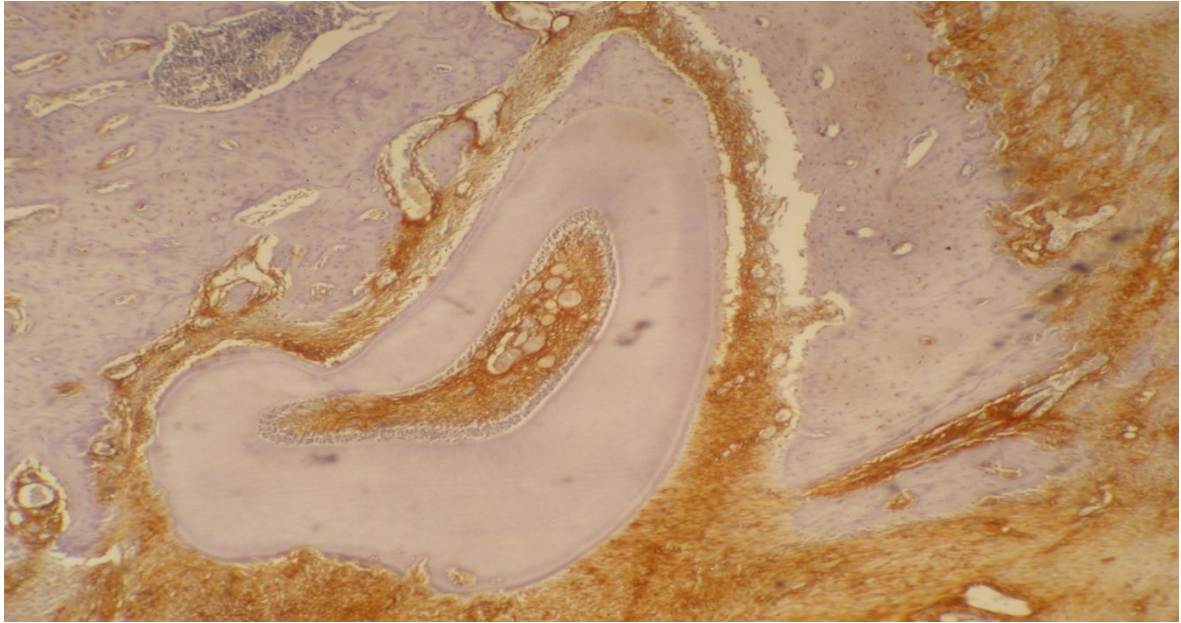


Figura 35 - Estruturas periodontais do grupo 5 com coloração para o colagénio V. Observa-se uma imunomarcção mais evidente do ligamento periodontal, neste grupo (colagénio V x 200).

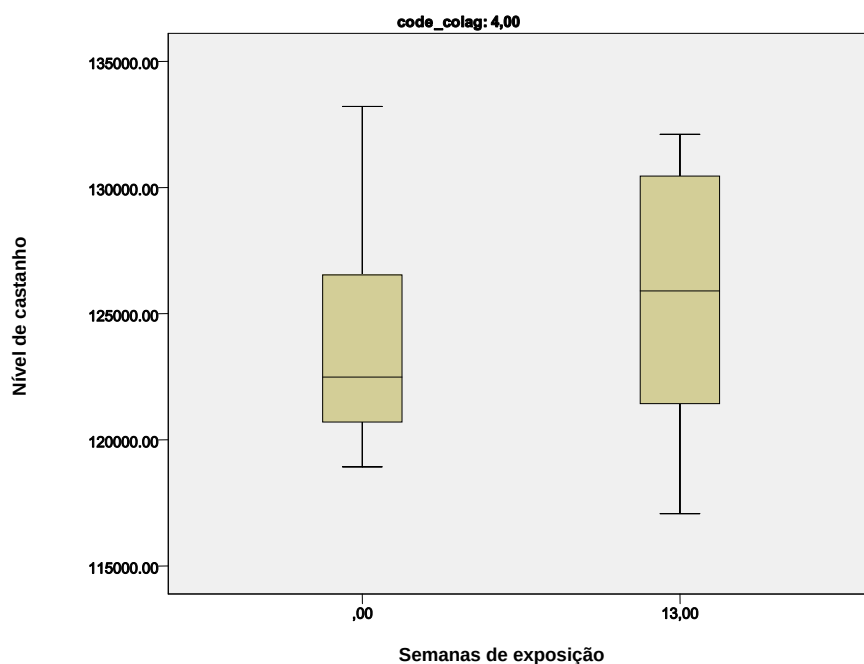
IMUNOHISTOQUÍMICA – ANÁLISE ESTATÍSTICA

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES AO NÍVEL DE IMUNOMARCAÇÃO POR TIPO DE COLAGÉNIO

Os resultados obtidos com a ANOVA one-way (técnica paramétrica), pressupunham a normalidade da distribuição dos dados referentes ao nível de castanho, em cada um dos grupos experimentais, assim como a sua homocedasticidade ou seja, uniformidade de variâncias.

Excepto para o caso do colagénio de tipo IV, verificam-se violações grosseiras dos pressupostos para o uso de estatísticas paramétricas nas comparações múltiplas do nível de colagénio, as quais são exacerbadas pela assimetria na composição dos grupos (nos casos dos colagénios de tipo I e V). Nestas condições, aplicou-se o teste t para amostras independentes aos colagénios de tipo IV e o teste de Kruskal-Wallis (K-W) aos colagénios de tipo I e V, seguido do teste de Mann-Whitney com correcção de Bonferroni nas comparações 2 a 2, nos casos em que a análise de variância não paramétrica (Teste de Kruskal-Wallis) detectou diferenças significativas entre os grupos.

No que diz respeito ao colagénio do tipo IV, como foi anteriormente referido, o teste t para amostras independentes aplicado ao nível de 5% não detectou diferenças significativas entre o grupo de controlo e o grupo das 13 semanas de exposição, no que respeita ao nível de coloração do colagénio em questão ($p = 0,410$) (Quadro 1).



Quadro 1 – Gráfico representativo da variação da imunomarcacão para o colagénio tipo IV

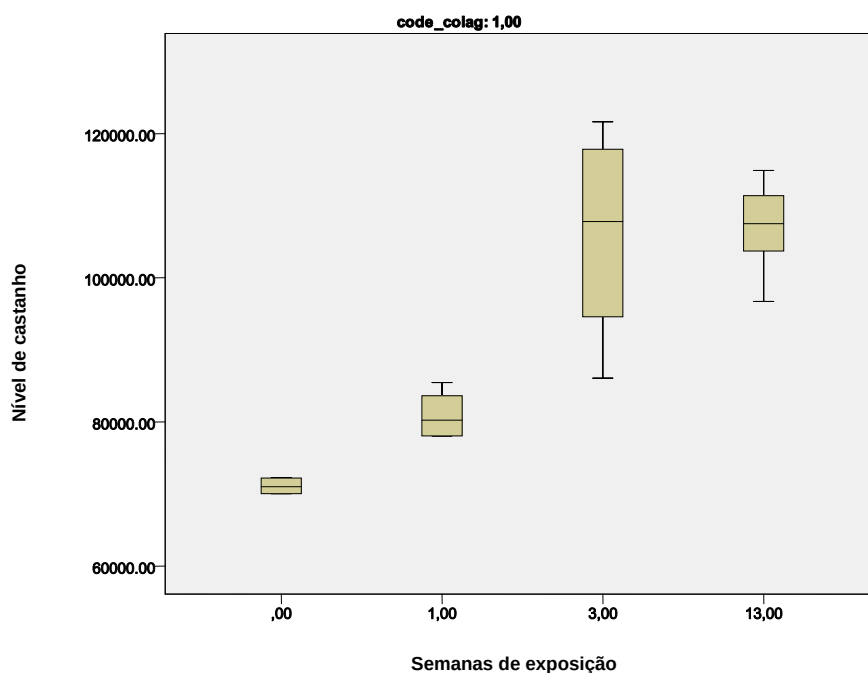
O comportamento do colagénio do tipo I foi diferente do colagénio tipo IV. De acordo com as considerações acima descritas, a violação grosseira dos pressupostos de homocedasticidade associada à assimetria na composição dos grupos, determinou o uso da técnica de análise de variância não paramétrica para verificar se existiam diferenças significativas entre os 4 grupos de exposição (gC, g1, g2 e g5), no que respeita ao nível de coloração do colagénio.

O teste de K-W permite concluir que essas diferenças existem entre os grupos considerados, com $p < 0,001$. Nestas condições, e para determinar as diferenças entre cada par de grupos envolvidos, foi necessário aplicar o teste de Mann-Whitney com uma correcção de Bonferroni, o qual permite concluir que o nível de coloração do colagénio aumenta significativamente com o tempo de exposição. Comparando directamente os grupos 2 a 2, verifica-se o seguinte:

- 1) Não existem diferenças significativas entre o grupo de controlo e o grupo de 1 semana de exposição, quanto à coloração do colagénio ($p = 0,068$);
- 2) Contudo, o grupo de controlo apresenta níveis de coloração do colagénio significativamente mais baixos que os apresentados pelos grupos de 3 semanas ($p < 0,001$) e de 13 semanas de exposição ($p < 0,001$);

3) Como seria de esperar, o grupo de 1 semana de exposição apresenta resultados semelhantes aos do grupo de controlo, sendo assim evidente nestes resultados que o nível de coloração do colagénio no grupo 1 é significativamente mais baixo que o observado no grupo das 3 semanas ($p = 0,002$) e das 13 semanas ($p = 0,002$);

4) Finalmente, os grupos com 3 e 13 semanas de exposição não se distinguem no que respeita à coloração do colagénio ($p = 0,940$) (Quadro 2).

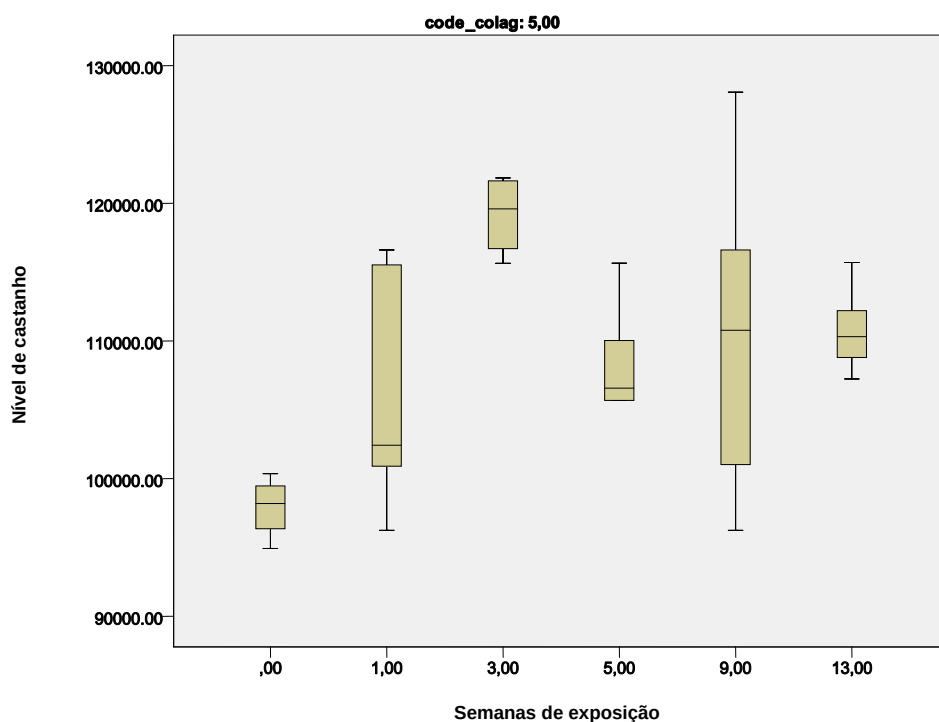


Quadro 2 – Gráfico representativo da variação da imunomarcacção para o colagénio tipo I

Em relação ao colagénio de tipo V, a aplicação do teste de K-W permitiu concluir que existem pelo menos dois grupos de exposição que apresentam diferenças significativas entre si no que respeita ao nível de coloração do colagénio ($p = 0,005$). Para determinar esses grupos, aplicou-se o teste de Mann-Whitney com a correcção de Bonferroni aludida atrás, o qual apenas detectou diferenças significativas no nível de coloração do colagénio entre o grupo de controlo e o grupo das 13 semanas de exposição ($p = 0,004$) (Quadro 3).

Embora o gráfico sugira a existência de diferenças entre outros grupos (nomeadamente, entre o grupo 3 e os grupos de controlo, das 5 e 13 semanas) a reduzida dimensão do

grupo 3 faz-se sentir sobre a significância do resultado do teste de Mann-Whitney, em associação com a necessária correcção de Bonferroni.



Quadro 3 – Gráfico representativo da variação da imunomarcção para o colagénio tipo V.

MORFOMETRIA DO LIGAMENTO PERIODONTAL

ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS REFERENTES ÀS RAZÕES DE ÁREAS E PERÍMETROS DO LIMITE INTERNO E EXTERNO DO LIGAMENTO PERIODONTAL

Pressupostos para a ANOVA

Tendo em conta o objectivo do trabalho, nomeadamente saber se o tempo de exposição ao ruído tem um efeito sobre as razões de áreas e sobre as razões de perímetros, analisaram-se os pressupostos para a aplicação da Análise de Variância a um factor (ANOVA one-way), para cada caso separadamente.

Em ambos os casos, o factor experimental considerado foi o tempo de exposição, em semanas, sendo a variável dependente a razão de áreas ou a razão de perímetros. Os pressupostos para a ANOVA one-way, nomeadamente, a normalidade da distribuição dos dados referentes às razões em cada um dos grupos experimentais e sua homocedasticidade, foram verificados através da aplicação do teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de uniformidade de variâncias de Levene, respectivamente.

No que respeita à normalidade, foram observadas violações deste pressuposto e assimetria generalizada quer para a razão entre áreas quer para a razão de perímetros, tal como se infere do quadro seguinte:

t_exp	Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	
Áreas	0	.891	25	.012
	1	.867	25	.004
	3	.940	25	.148
	9	.930	25	.085
	13	.930	25	.085
Perímetros	0	.858	25	.003
	1	.923	25	.062
	3	.954	25	.306
	9	.891	25	.012
	13	.925	25	.066

Quadro 4 – Teste de Normalidade (Shapiro-Wilk)

Contudo, esta situação não é impeditiva da aplicação da ANOVA one-way, uma vez que os grupos têm dimensões exactamente iguais. Já no que respeita à uniformidade de variâncias, o teste de Levene detectou uma violação desse pressuposto, tal como se infere do quadro seguinte:

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Área	Based on Mean	5.871	4	120	.000
	Based on Median	4.278	4	120	.003
	Based on Median and with adjusted df	4.278	4	95.180	.003
	Based on trimmed mean	5.537	4	120	.000
Perímetro	Based on Mean	3.720	4	120	.007
	Based on Median	2.380	4	120	.055
	Based on Median and with adjusted df	2.380	4	94.722	.057
	Based on trimmed mean	3.376	4	120	.012

Quadro 5 – Teste de homogeneidade das variâncias (Levene)

Nestas condições, e como os grupos experimentais têm exactamente o mesmo efectivo, a violação dos pressupostos para a ANOVA não é impeditiva da sua aplicação. Assim, procedeu-se à análise, interpretando os resultados com base na estatística de Brown-Forsythe em vez da tradicional razão F.

Preferiu-se a utilização da estatística de Brown-Forsythe, em vez da estatística de Welch, devido à reduzida dimensão da amostra e às grandes flutuações, face a diferentes hipóteses alternativas, que a potência deste teste apresenta para amostras desta dimensão.

Em todo o caso, para estes dados, o efeito é tão marcado que os dois testes conduzem exactamente à mesma conclusão, isto é, à existência de diferenças significativas entre os diferentes grupos de exposição ao ruído no que respeita à razão de áreas e à razão de perímetros, tal como se verifica no quadro seguinte:

Robust Tests of Equality of Means					
		Statistic ^a	df1	df2	Sig.
Áreas	Welch	3.898	4	56.452	.007
	Brown-Forsythe	3.468	4	97.442	.011
Perímetros	Welch	4.598	4	57.873	.003
	Brown-Forsythe	3.371	4	95.012	.013

a. Asymptotically F distributed.

Quadro 6 - Teste de Welch e Teste de Brown-Forsythe

Meramente como termo de comparação, uma vez que pelas razões atrás mencionadas seria incorrecto usar a razão F para interpretar estes dados, o quadro seguinte apresenta os resultados que seriam obtidos caso a ANOVA one-way baseada nessa razão F fosse aplicada, com clara indicação do mesmo efeito detectado usando a estatística de Brown-Forsythe (Quadro 7):

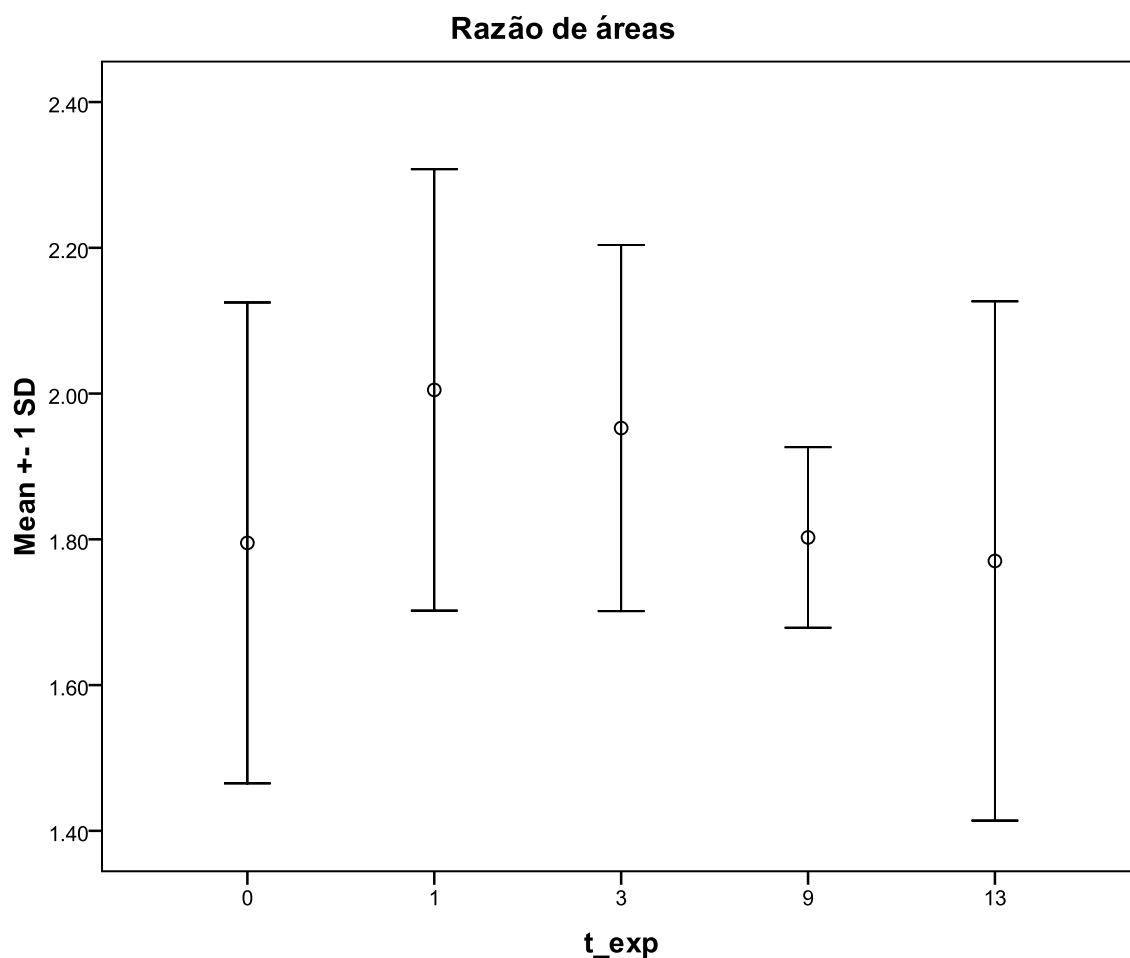
ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Áreas	Between Groups	1.126	4	.282	3.468	.010
	Within Groups	9.742	120	.081		
	Total	10.868	124			
Perímetros	Between Groups	.407	4	.102	3.371	.012
	Within Groups	3.621	120	.030		
	Total	4.028	124			

Quadro 7 – ANOVA

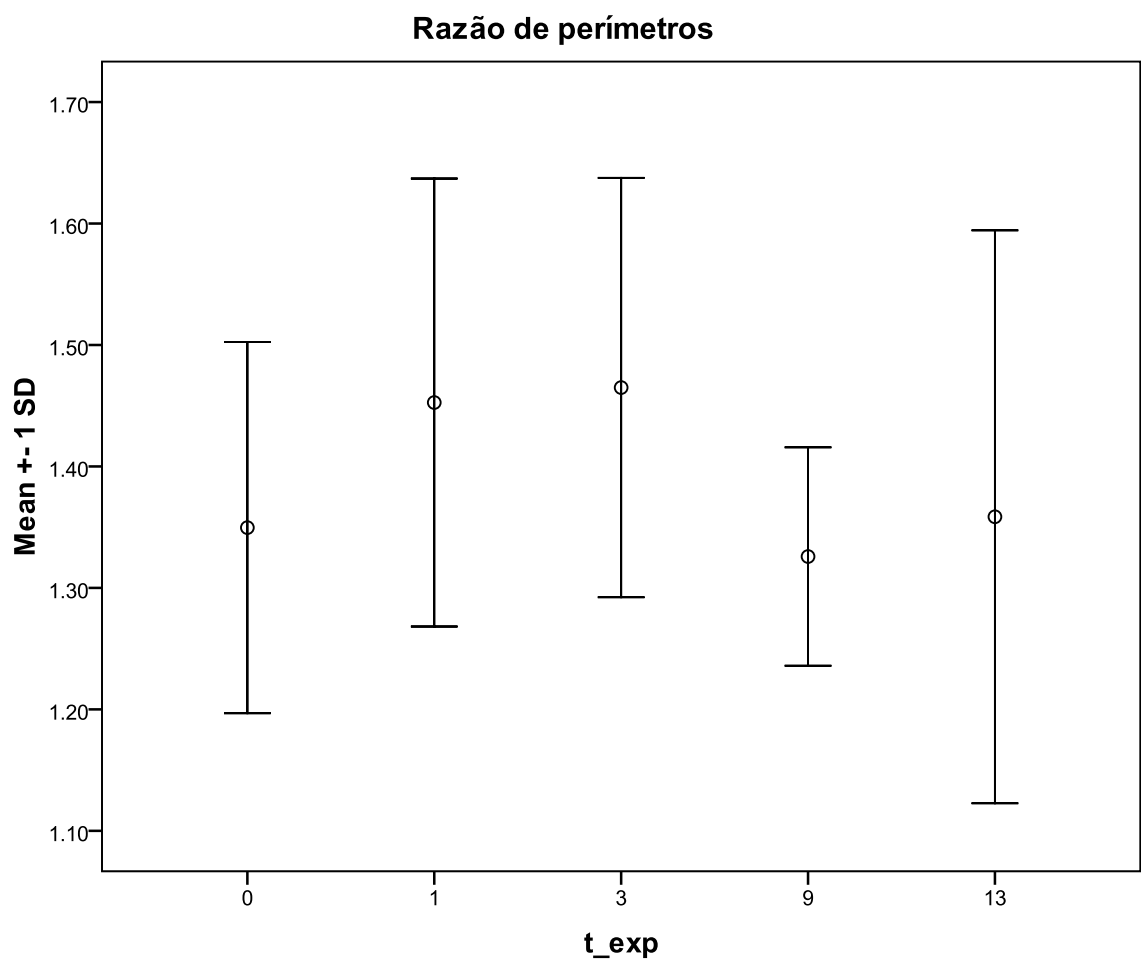
Uma vez que existem diferenças entre grupos, quer para as razões de áreas quer para as razões de perímetros, foi necessário identificar os grupos de exposição entre os quais essas razões eram diferentes. Uma vez que não existe homogeneidade de variâncias, estas comparações *post-hoc* foram efectuadas usando o teste de Tamhane.

No que respeita à razão de áreas, verifica-se que os valores mais elevados são observados à 1ª semana de exposição ao ruído, sendo que essa razão é significativamente mais elevada do que a observada à 9ª semana de exposição ($p = 0,040$). Para os demais tempos de exposição, as razões de áreas não se distinguem significativamente (Quadro 8).



Quadro 8 – Gráfico representativo da evolução da razão das áreas

Quanto à razão de perímetros, os valores mais elevados verificam-se à 3^a semana e os mais baixos à 9^a semana. Para além disso, é possível concluir que a razão de perímetros à 9^a semana é significativamente mais baixa que a observada à 1^a semana ($p = 0,041$) e à 3^a semana ($p = 0,010$). Os demais grupos de exposição, não apresentam diferenças significativas entre si, para este parâmetro (Quadro 9).



Quadro 9 – Gráfico representativo da evolução da razão dos perímetros

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

CONTROLO

Na observação com microscopia electrónica de transmissão, encontrámos no grupo de controlo (gC) o ligamento periodontal com fibroblastos típicos rodeados de matriz extracelular, consistindo essencialmente de fibras de colagénio. Os fibroblastos apresentam uma orientação paralela entre si, ou seja coordenada e equidistante (Fig. 38 e 43).

Na Fig. 43 e 44, podemos verificar que os núcleos se encontram a uma curta distância entre si, sendo visível a presença de colagénio intracelular e extracelular de acordo com o normal funcionamento deste tecido.

As fibras apresentam também uma correcta orientação. Observam-se fibras de colagénio paralelas, que formam fascículos densamente agrupados. A inserção das fibras no osso alveolar não apresenta alterações, sendo a sua ancoragem bem visível (Fig. 39 e 40).

As células apresentam o retículo endoplasmático rugoso (RER), o aparelho de Golgi e as mitocôndrias com uma expressão de normalidade funcional (Fig. 38).

As estruturas vasculares e nervosas não apresentam alterações (Fig. 41 e 42). Os vasos sanguíneos do ligamento periodontal, apresentam uma parede contínua formada por células endoteliais achatadas.

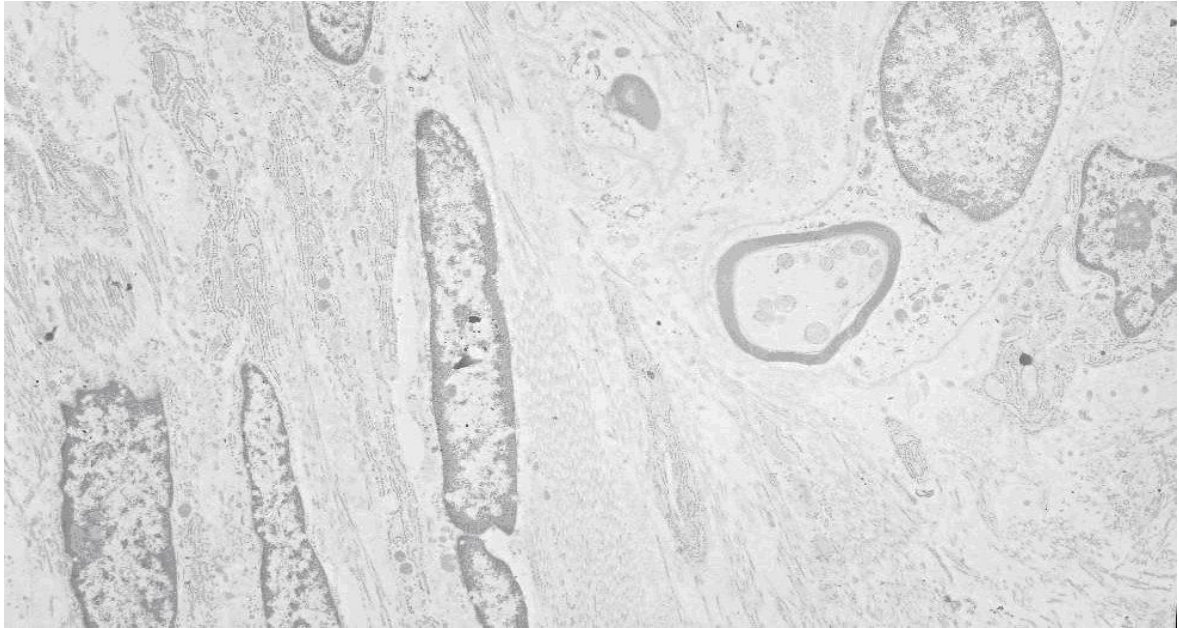


Figura 36 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Nesta imagem observam-se os fibroblastos bem orientados. As fibras apresentam também uma correcta orientação. O retículo endoplasmático rugoso (RER) apresenta actividade normal (METx 2800).

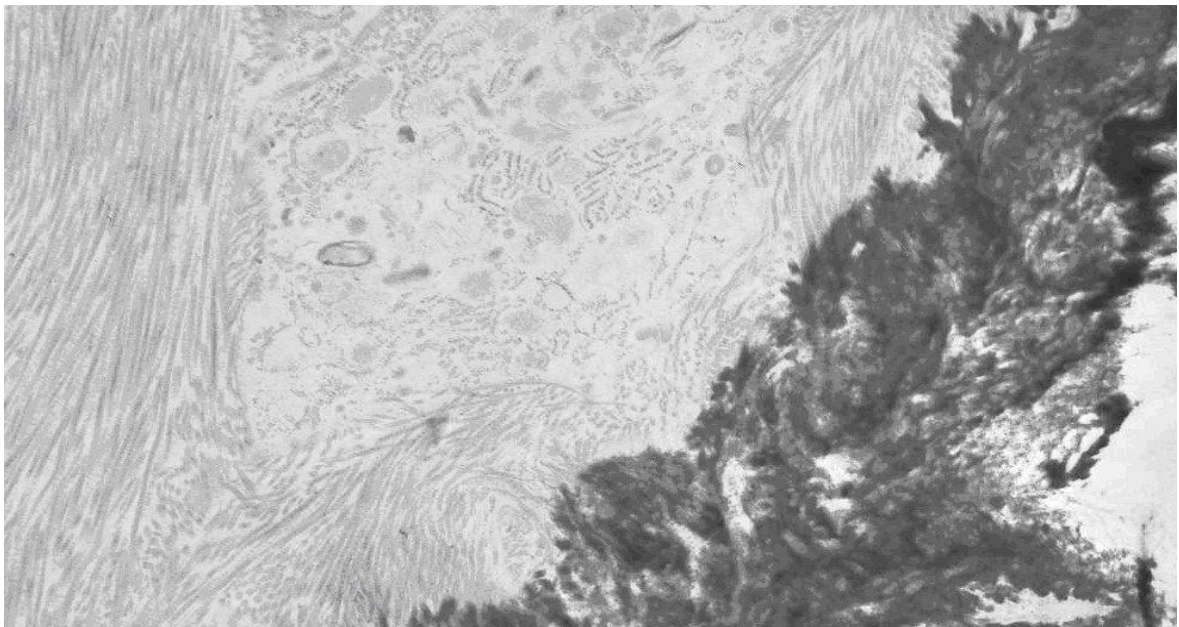


Figura 37 - Ligamento periodontal do grupo do controlo. Nesta imagem observam-se as fibras formando um feixe e fibras inseridas correctamente no osso alveolar (METx 8000).

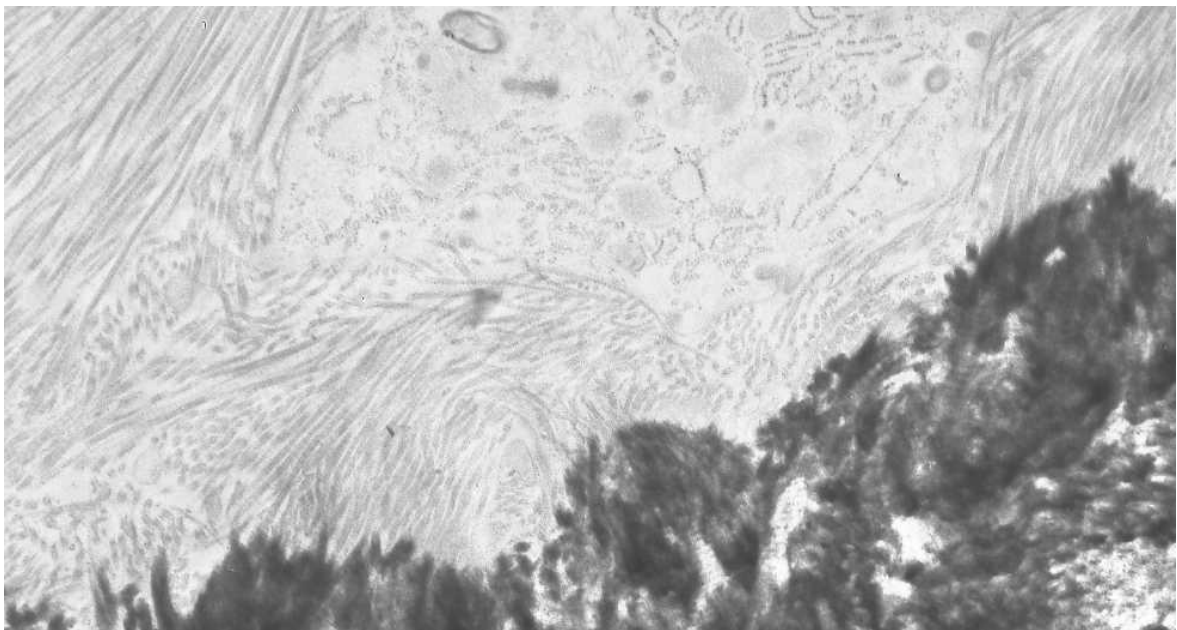


Figura 38 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Nesta imagem de maior ampliação observam-se as fibras do ligamento com uma correcta inserção no osso alveolar (MET x 10000).

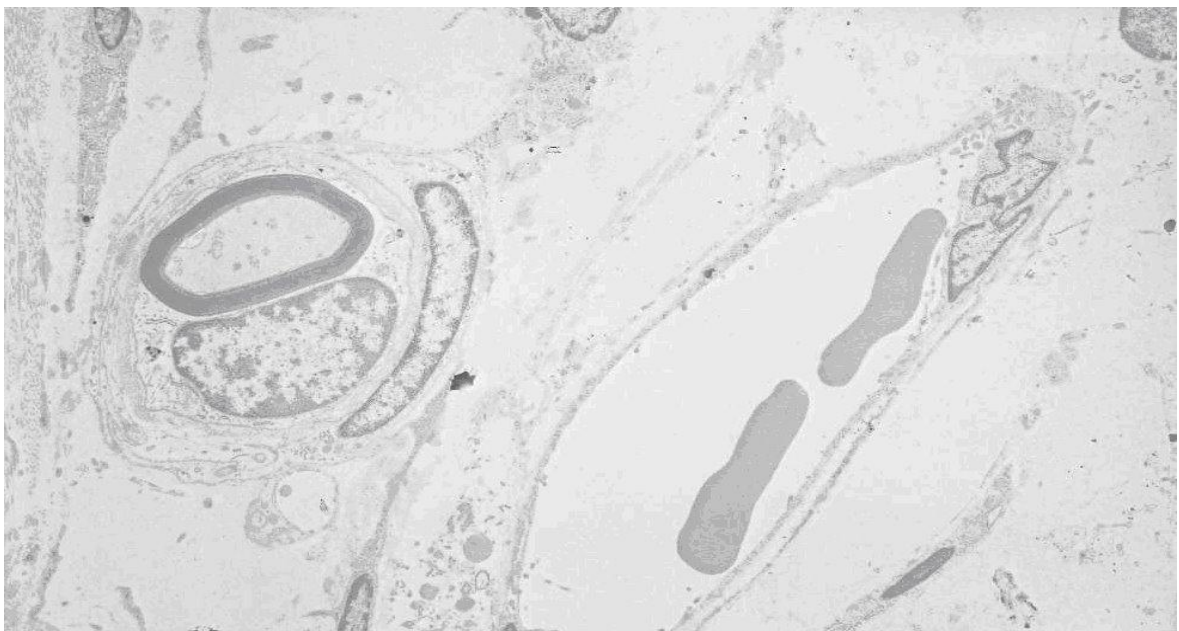


Figura 39 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Observa-se um nervo e um vaso sem alterações no ligamento normal (MET x 2800).

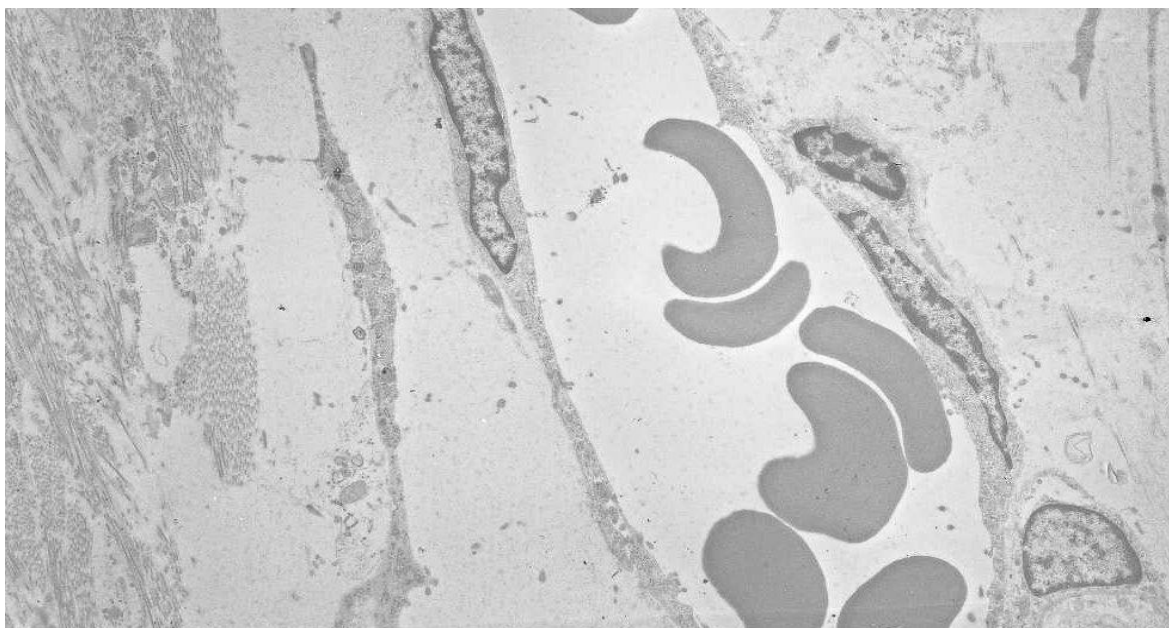


Figura 40 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Nesta imagem observa-se um vaso do ligamento periodontal, com parede contínua de células endoteliais achatadas, contendo no seu lume células sanguíneas. Ligamento periodontal com aspecto normal (MET x 5300).

GRUPOS EXPOSTOS AO RBF

Na imagem do g3 (3 semanas de exposição ao RBF) visualizam-se núcleos com uma ligeira desorientação (Fig. 42) comparativamente ao gC (Fig. 41). Observa-se uma maior quantidade de colagénio intracelular e extracelular, o que provoca afastamento dos núcleos.

Nas imagens do g5 (13 semanas de exposição ao RBF) encontram-se fibroblastos em grande actividade de síntese proteica de fibras e proteínas da matriz (Fig. 43, 44 e 48).

Observámos no g5 que os fibroblastos junto ao osso alveolar estão em grande actividade metabólica com remodelação do tecido conjuntivo, encontrando-se no entanto, fibroblastos em sofrimento celular (Fig.49). Os fibroblastos em sofrimento são menores e mais ovóides, possuindo um citoplasma homogéneo e acidófilo bem como um núcleo menor, mais alongado e intensamente corado.

Os fibroblastos activos, estão a sintetizar a matriz celular do tecido conjuntivo. Podemos observar estas células activadas associadas a feixes de fibras colagénias. São células alongadas de formato fusiforme e com citoplasma pálido. O núcleo é ovóide e bem

destacado, sendo grande, granular e fortemente corado. Além de possuírem um nucléolo bem evidente, possuem um RER e aparelho de Golgi bem desenvolvido, traduzindo a sua exuberante actividade metabólica de produção de proteínas para a matriz conjuntiva (Fig. 46).

Observámos imagens de fibroblastos activados, apresentando cisternas dilatadas de RER cheias de material floculento e alguns lisosomas (Fig.48).

Estas células estão separadas por uma abundante quantidade de colagénio rodeado de fibras de colagénio e de fibras elaunínicas e oxitalâmicas do sistema elástico o que está de acordo e espelha a sua grande actividade metabólica (Fig. 45).

A inserção das fibras no osso alveolar aparenta ser mais desorganizada no g5 (Fig. 44) do que no gC (Fig. 37).

Encontrámos ainda aspectos sugestivos de uma possível divisão celular em preparação (Fig. 47).

Neste grupo também identificámos a presença de estruturas vasculares e nervosas (neurónio) no ligamento periodontal. Nas Figs. 50, 51 e 52 observa-se um neurónio rodeado de tecido conjuntivo rico em fibras de colagénio.

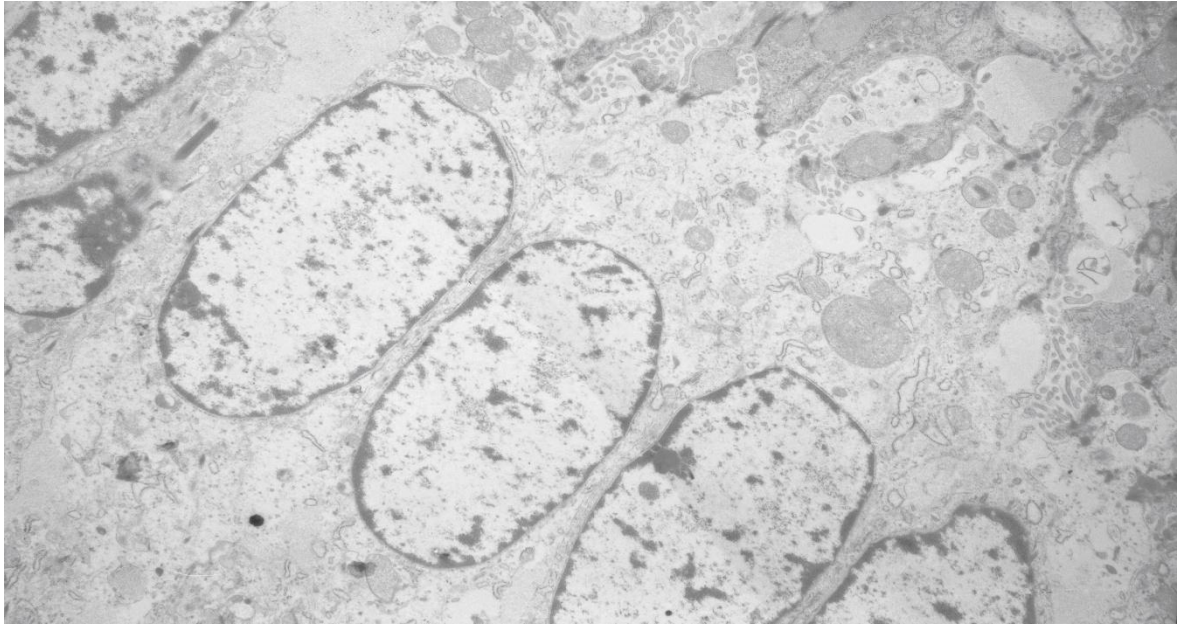


Figura 41 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Observamos núcleos com uma orientação regular, com pouco colagénio entre si (MET x 2800).

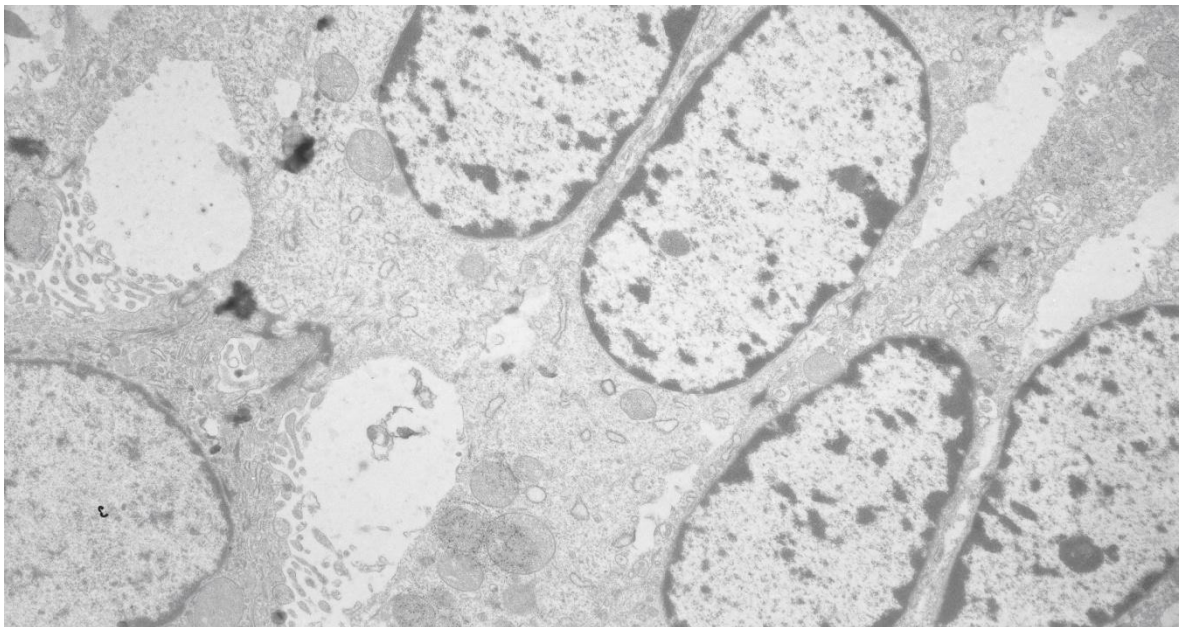


Figura 42 - Ligamento periodontal do grupo de controlo. Observamos núcleos de fibroblastos regularmente justapostos e orientados (MET x 2800).

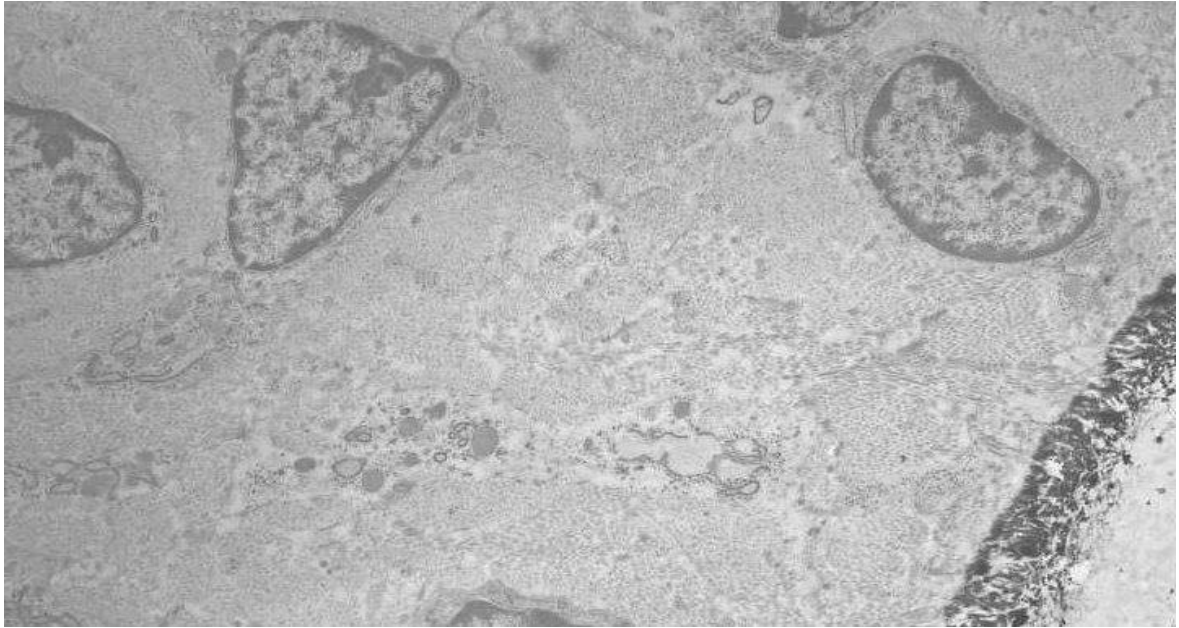


Figura 43 - Ligamento periodontal do g5. Observamos osso alveolar, tecido conjuntivo com fibroblastos em grande actividade de síntese proteica de fibras e matriz. Fibroblasto contendo cisternas de RER dilatadas e cheias de material floculento (METx 2800).



Figura 44 - Ligamento periodontal do g5. Observam-se fibroblastos separados por abundante quantidade de colagénio. Junto ao osso alveolar, os fibroblastos estão em intensa actividade metabólica. Alguns fibroblastos apresentam sinais de sofrimento celular. A inserção das fibras no osso alveolar é menor e desgarrada (MET x 5500).

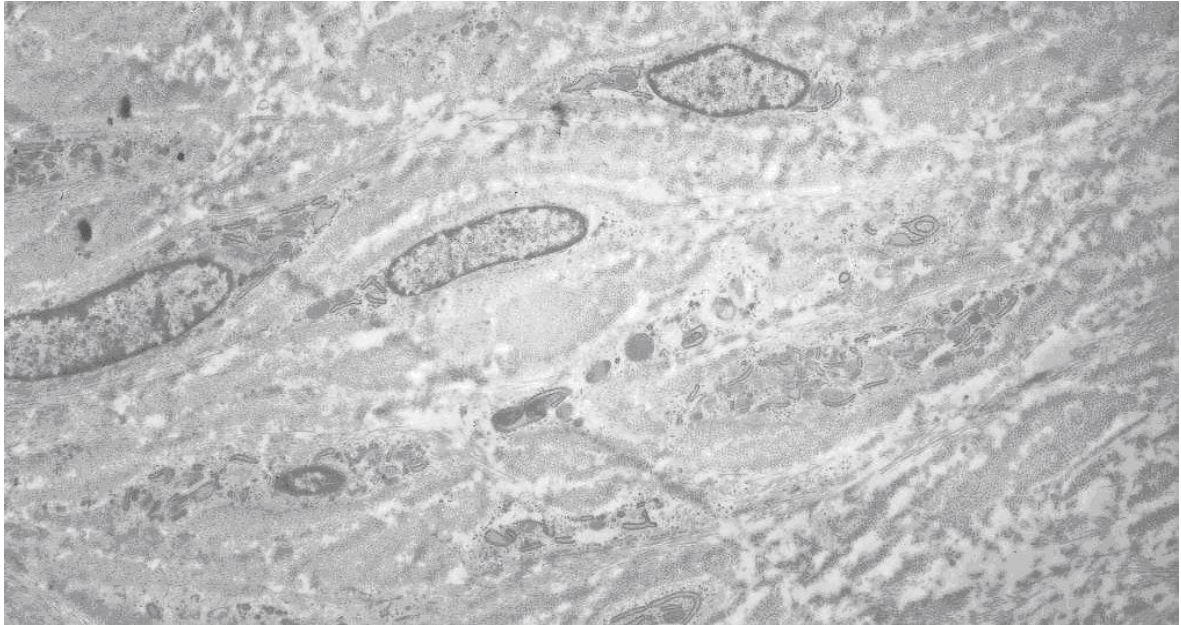


Figura 45 - Ligamento periodontal do g5. Observam-se fibroblastos com RER dilatado e elevada quantidade de fibras de colagénio e fibras elásticas (METx 2800).

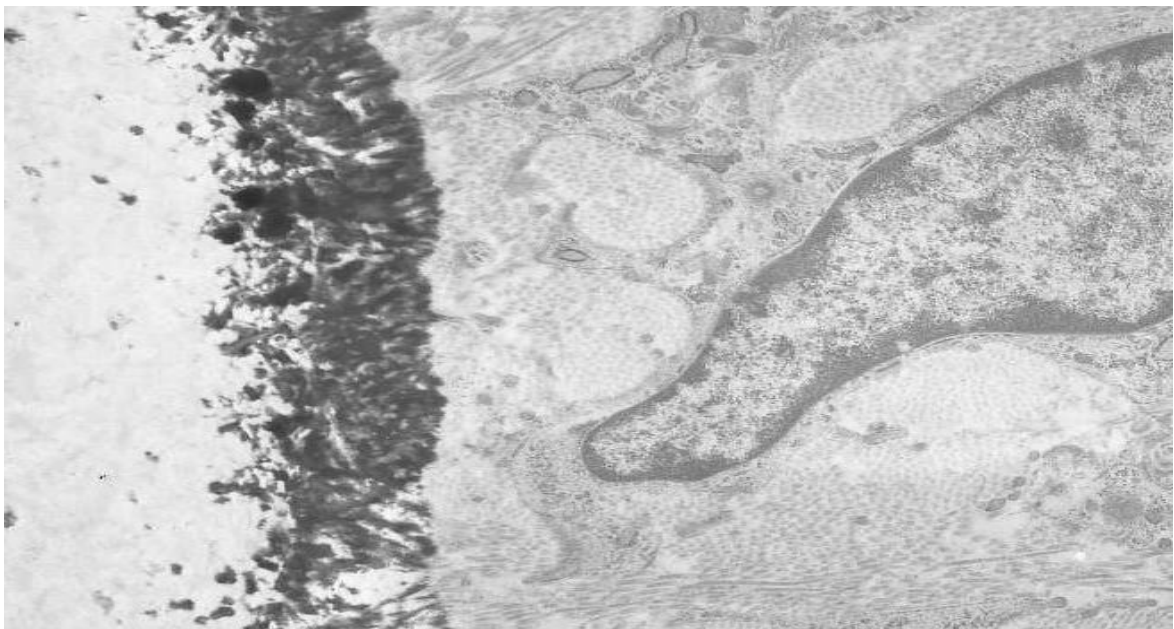


Figura 46 - Ligamento periodontal do g5. Imagem de fibroblasto contendo cisternas de RER dilatadas e em produção activa de proteínas. As fibras encontram-se inseridas no cimento (MET x 5300).

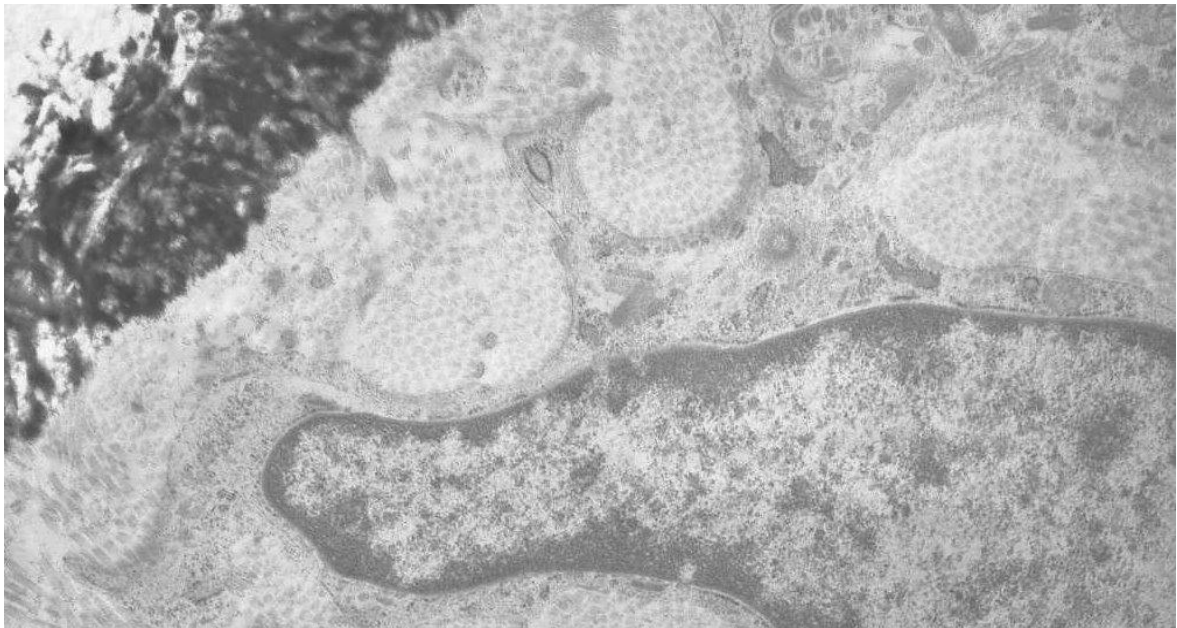


Figura 47 - Ligamento periodontal do g5. Imagem em que se observa porção de um fibroblasto localizado junto ao cimento. No fibroblasto vê-se um centríolo (pode ser sinal de divisão celular em preparação). Célula rodeada por abundantes bolsas de matriz, densas em colagénio (MET x 10000).

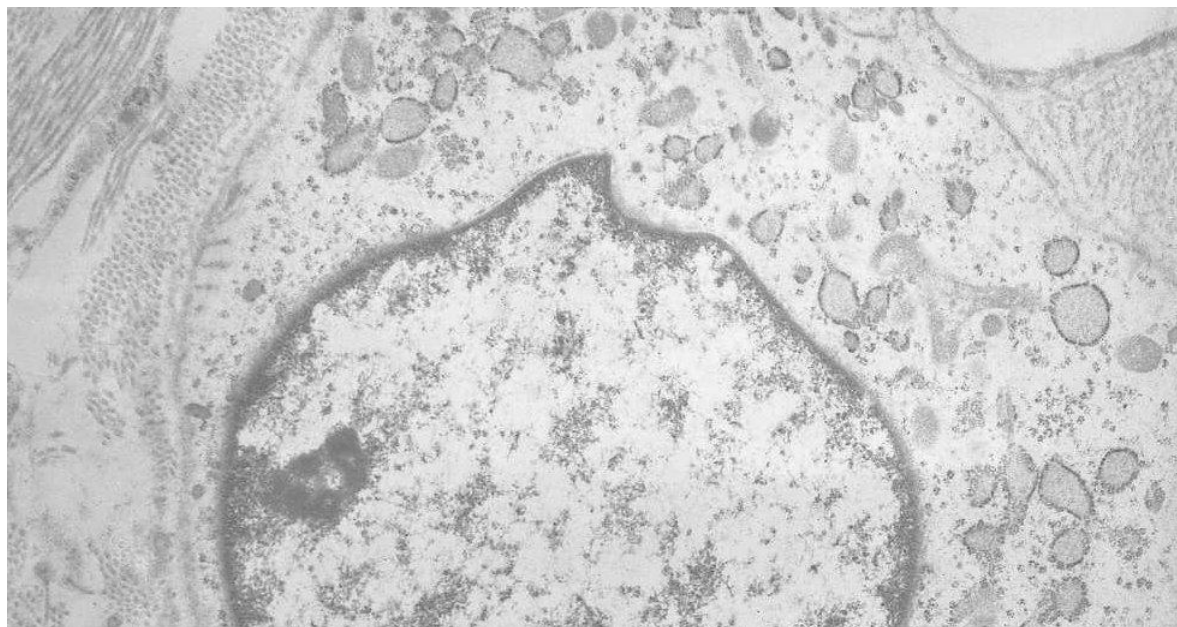


Figura 48 - Ligamento periodontal do g5. Imagem de fibroblasto que apresenta cisternas dilatadas de RER contendo material floculento e alguns lisosomas. Fibroblasto rodeado de fibras de colagénio, de fibras elaunínicas e oxitalânicas do sistema elástico (MET x 8000).

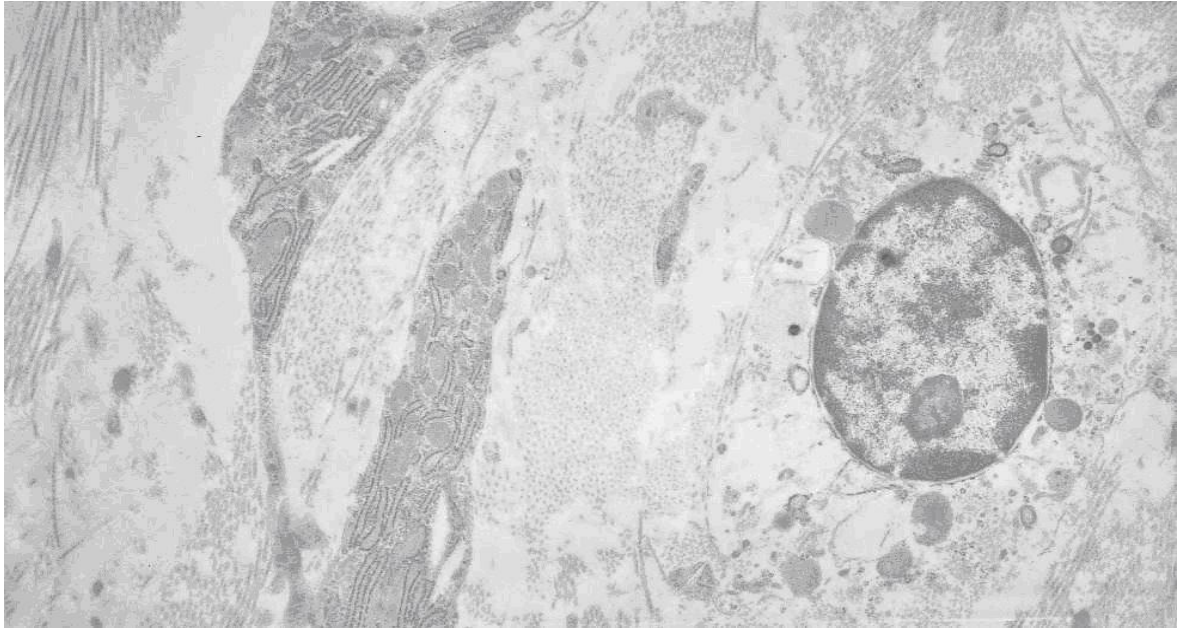


Figura 49 - Ligamento periodontal do g5. Fibroblasto em morte celular. Intensa actividade metabólica com evidente remodelação do tecido conjuntivo. RER dilatado e muito denso (MET x 55000).

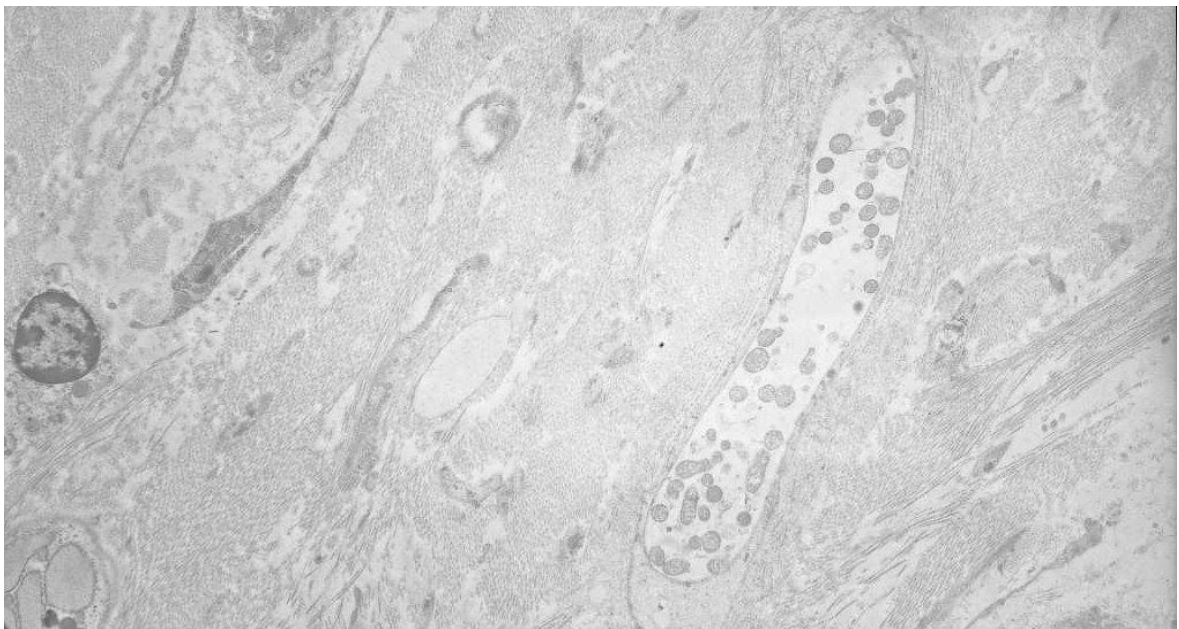


Figura 50 – Ligamento periodontal do g5, com colagénio abundante. Fibrose intensa (MET x 2800).

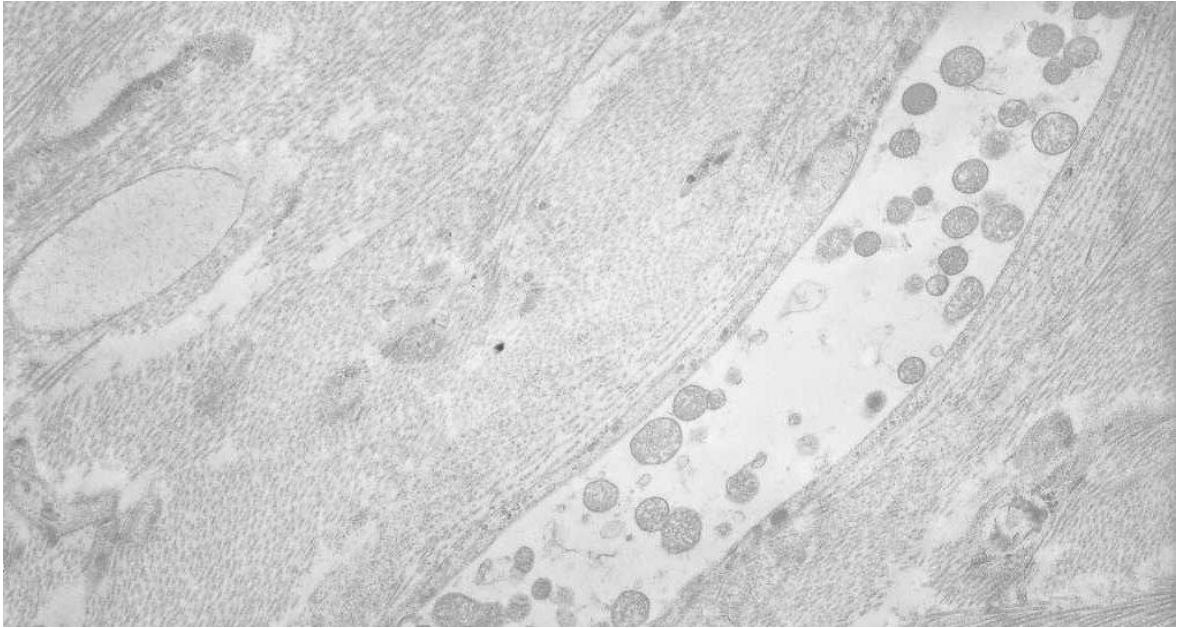


Figura 51 – Ligamento periodontal do g5. Corte do neurónio com evidente presença de abundante colagénio extracelular (MET x 5300).

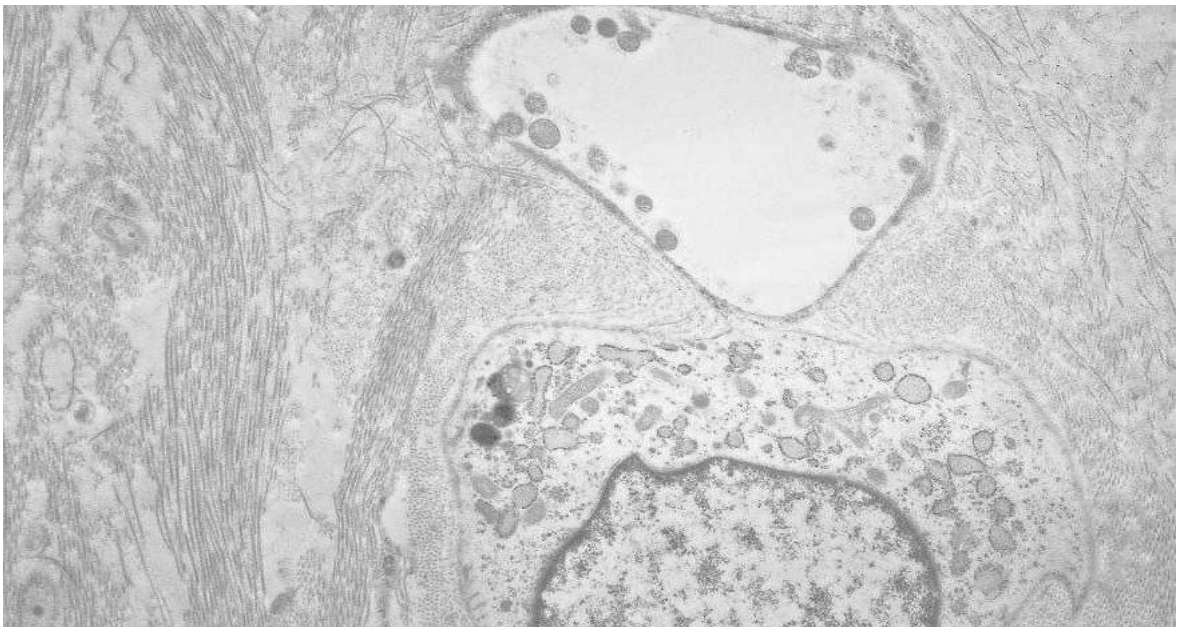


Figura 52 – Ligamento periodontal do g5. Observamos corte de neurónio em cima e em baixo um fibroblasto em exuberante actividade metabólica de produção de proteínas para excreção para a matriz extracelular (MET X 4000).

MACROSCOPIA - ESTUDO VASCULAR

A observação macroscópica, permitiu verificar a presença de alterações a nível vascular traduzindo as observações da microscopia óptica.

CONTROLO

Nas imagens obtidas neste grupo observamos que não há alterações do preenchimento vascular com o contraste e os vasos apresentam aspecto normal (Fig. 53).

GRUPOS EXPOSTOS AO RBF

Nos grupos expostos ao RBF, as peças diafanizadas e injectadas mostram vasos periodontais de pequeno calibre com interrupções do fluxo, com lesões de carácter obstrutivo e ainda a presença de vasos com um trajecto sinuoso (Fig. 54). Encontrámos também a presença de vasos que parecem ter recanalizado, numa resposta à possível diminuição do fluxo, fruto da obstrução a montante (Fig. 55).

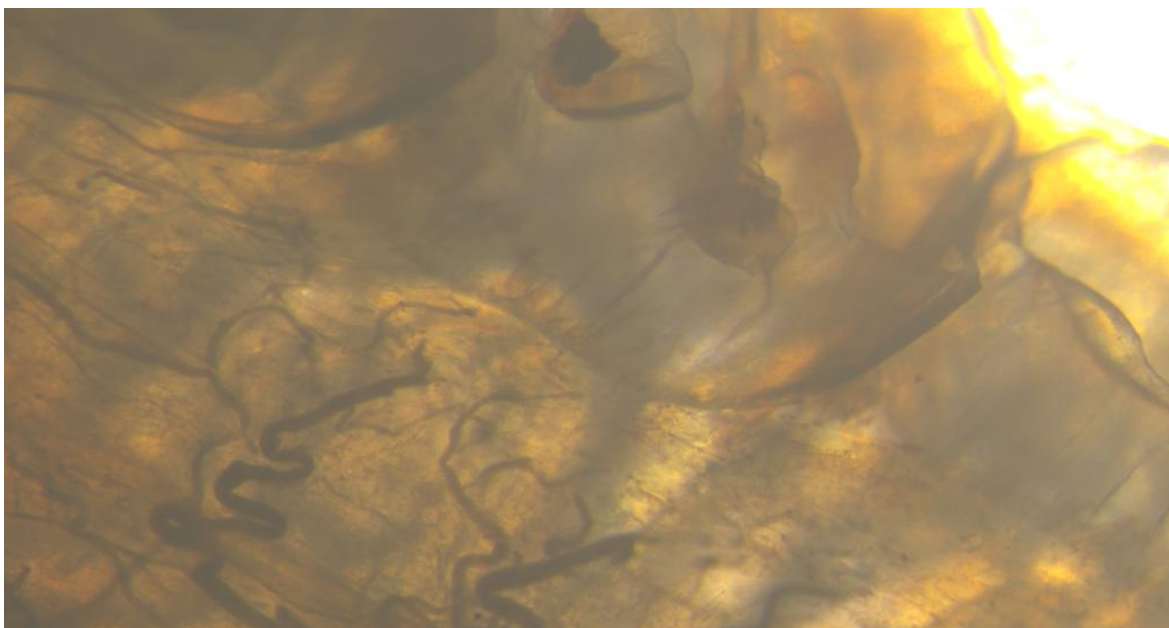


Figura 53 - Estruturas vasculares do periodonto do grupo de controlo após injeção de contraste seguida de diafanização (injecção vascular com micropaque x 25). As estruturas vasculares não apresentam alterações.

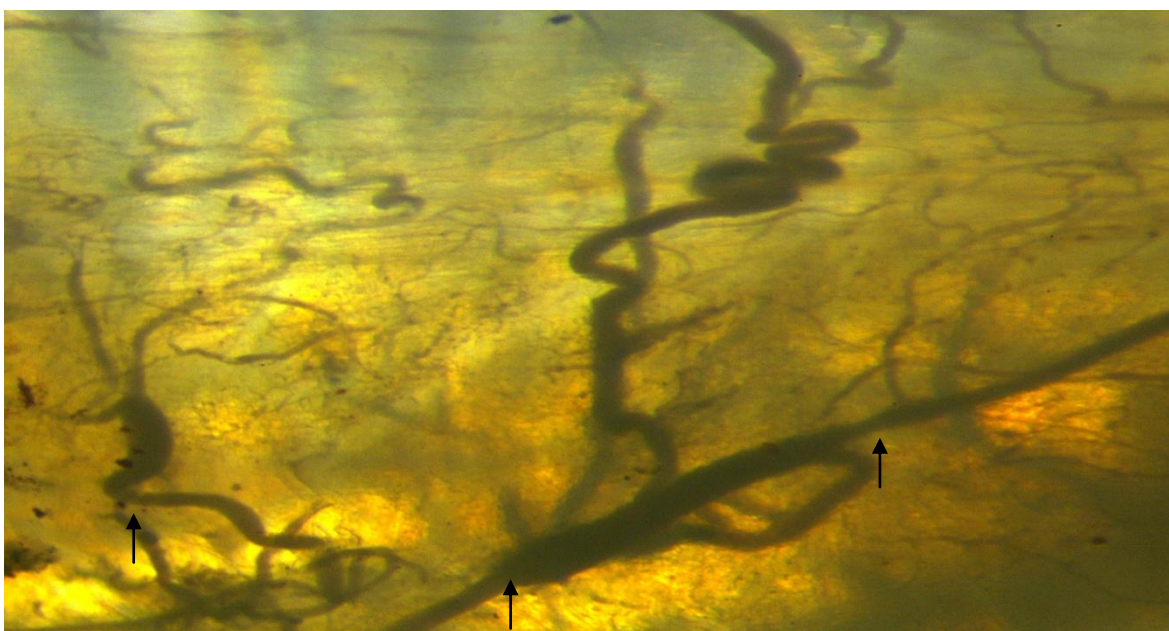


Figura 54 - Estruturas vasculares do periodonto do g5 (injecção vascular com micropaque x 40). Observamos a presença de lesões de carácter obstrutivo (↑) e ainda a presença de vasos com um trajecto sinuoso.



Figura 55 - Estruturas vasculares do periodonto do g5 (injecção vascular com micropaque x 40). Observamos um mau preenchimento dos vasos e interrupções do fluxo (→).

IV. DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

O tema da dissertação que apresentamos inclui, nesta discussão, dois grandes objectivos que poderão ultrapassar as suas linhas orientadoras, sem as esquecer, antes completando-as, e que são: por um lado dar continuidade aos estudos que estabelecem uma relação entre lesões nos tecidos periodontais e exposição a ruído de baixa frequência (RBF) e vibração; por outro, ser mais um contributo para o estudo da problemática da exposição dos tecidos biológicos ao RBF.

O interesse da comunidade científica pelos efeitos do ruído – ainda que não caracterizado sob ponto de vista de espectro – e vibração sobre os tecidos periodontais existe desde a década de 70. Em estudos, fundamentalmente macroscópicos, investigadores verificaram, em militares, cuja actividade profissional envolvia o contacto directo e permanente com o ruído e vibração, pilotos, tripulação e pessoal de manutenção dos aviões a hélice e de aviões a jacto, que existia perda da altura do osso alveolar, quando comparados com outros grupos de militares não expostos ao ruído e à vibração, considerados de controlo. Investigadores, como Haskell, em 1975, comprovaram este facto, tendo verificado que, ao longo dos anos, a perda de altura óssea alveolar era mais evidente nos grupos expostos a ruído e vibração. Estudos de “follow-up”, como o realizado em 1977 por Olof, por dez anos nos militares de voo da Força Aérea Sueca, verificaram, através de exames radiológicos, que a perda do osso alveolar era incomparavelmente maior no pessoal de voo.

Também em Portugal, Cortez-Pimentel (1988), na sequência dos estudos clínicos e radiológicos efectuados por um grupo de médicos das Oficinas Gerais de Material Aeronáutico, verificou, em indivíduos que tinham estado sob o efeito de ruído/vibrações, uma relação directa com a perda de osso alveolar e processos de osteólise (Cortez-Pimentel, 1988).

Na literatura não encontrámos referências relacionadas com o estudo microscópico (óptico ou electrónico) dos efeitos do RBF sobre o periodonto. Assim, justificou-se um estudo mais aprofundado dos efeitos do RBF sobre esta estrutura.

O ligamento periodontal constitui a importante interface dente/osso alveolar, que tem como principal função a de “amortecer” as forças a que os dentes estão sujeitos na mastigação, atenuando os traumas sobre o osso alveolar, uma estrutura que também se

revelou afectada nos estudos que efectuámos. Nos nossos resultados reportamos alterações, ao nível do osso alveolar, que poderão traduzir as acima descritas, nomeadamente: presença de sequestros ósseos e sinais de necrose óssea.

O comportamento do complexo dento-alveolar submetido a *stress* mecânico tem sido extensivamente estudado, nomeadamente no que diz respeito à compreensão da resposta biológica do osso alveolar. A interacção de estímulos exteriores como a estimulação mecânica fisiológica parece ser a chave para a compreensão dos factores de regulação envolvidos na homeostasia deste compartimento ósseo – osso alveolar – tanto em condições fisiológicas como na doença (ex. doença periodontal). Grande parte do conhecimento da resposta biológica dos tecidos periodontais e das células ao *stress* mecânico tem sido acumulado a partir dos estudos “in vivo” e mais recentemente “in vitro” sobre a movimentação ortodôntica, dos quais Sandstedt, em 1904, foi pioneiro com estudos em animais e Oppenheim, em 1911, com o seu trabalho, em humanos, de observação morfológica das alterações nos tecidos periodontais, particularmente do osso alveolar, submetido a forças ortodônticas.

As alterações encontradas no osso alveolar em microscopia óptica (MO) e em microscopia electrónica de transmissão (MET), são semelhantes às descritas como resultado da acção de forças mecânicas utilizadas para correcção da “má posição” dentária, sendo por isso importante perceber de que forma a estrutura periodontal se comporta quando estas forças mecânicas são aplicadas, com fins terapêuticos, sobre o periodonto.

Foram propostas muitas teorias sobre a movimentação dentária induzida tendo, todas elas, a remodelação óssea como um dos efeitos biológicos (Kuftinec, 1968; Heller, 1979). A combinação de duas teorias, a da pressão/tensão, em que as fibras de colagénio e o sistema vascular teriam importância fundamental, e a da distorção do osso alveolar mediada pelas fibras do ligamento periodontal (Baumrind *et al.*, 1970; Grimm, 1972) parecem estar de acordo com o facto do periodonto não ser um tecido homogéneo e isotrópico, mas sim um sistema complexo de células, fibras, matriz e componentes neurovasculares; responsável pela manutenção da posição dentária e pela distribuição das forças mastigatórias ao osso alveolar (Cho *et al.*, 2000). Assim, postulamos que a aplicação de um estímulo mecânico directo ou indirecto sobre as estruturas dentárias – como acontece com o RBF – produzirá reacções nos tecidos que dependem também de factores locais, como os dentes, a oclusão e naturalmente, de factores sistémicos relacionados com o metabolismo ósseo (Verna, 2003).

O stress mecânico é um importante factor regulador da morfologia óssea (Pavlin *et al.*, 2000). O osteoclasto é a célula efectora da reabsorção óssea (Alvarez *et al.*, 1992; Chenu *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2003). Estas células apresentam contornos irregulares no local de reabsorção, áreas claras, abundantes mitocôndrias, numerosas projecções citoplasmáticas, retículo endoplasmático rugoso disperso e muito activo (Grigoriadis *et al.*, 1994; Kimura *et al.*, 2003). Na reabsorção óssea existe proliferação e desenvolvimento dos osteoclastos. Quando os osteoclastos se polarizam, cria-se uma adesão entre a membrana celular e a superfície óssea, ocorrendo desta forma o isolamento da área onde irá decorrer a reabsorção (Chenu *et al.*, 1994). A associação entre a força mecânica aplicada e a reabsorção óssea sugere, que o tipo de reabsorção esteja directamente relacionado com a integridade do ligamento periodontal, que por sua vez depende da integridade vascular (Yokoya *et al.*, 1997). Estudos efectuados por Hamaya e colaboradores em 2002, reportam que após dois dias de aplicação de uma força mecânica, os osteócitos do lado da pressão exibem características ultra-estruturais de necrose apresentando um aumento do número de mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático, dando início ao processo de hialinização dos tecidos, constituindo a primeira etapa da reabsorção (Hamaya *et al.*, 2002).

A saúde periodontal depende de um equilíbrio entre o meio interno e externo. O meio interno é controlado organicamente, conforme o metabolismo tecidual, sendo a oclusão um dos componentes mais importantes do meio externo. É da interacção entre os estímulos externos e a capacidade de resposta do periodonto que vai resultar o estado de saúde ou doença periodontal. Quando os estímulos funcionais são insuficientes para dar resposta às forças oclusais excessivas (bruxismo) há alteração na largura do ligamento periodontal, espessamento do cimento e necrose óssea. Os nossos resultados demonstraram que ocorreram alterações estatisticamente significativas na espessura do ligamento periodontal nomeadamente entre a 1ª e a 9ª semana de exposição ao RBF ($p \leq 0,040$) na razão das áreas, com uma evidente destruição do osso alveolar e um espessamento do cimento. Apesar de ocorrerem estes dois fenómenos, o espessamento do cimento ocorre mais acentuadamente que a destruição do osso alveolar, levando a uma diminuição da espessura do ligamento periodontal. No nosso trabalho, as razões de áreas são significativamente mais baixas à 9ª semana que à 1ª semana, isto é, ocorrem concomitantemente aumentos expressivos e mais significativos da área interna do que da área externa, levando a uma diminuição do ligamento periodontal. O estímulo mecânico que ocorre sobre os dentes no bruxismo traduz-se biologicamente, na libertação de proteínas livres para o ligamento periodontal que, em média, possui a espessura de 0,25mm (Reitan *et al.*, 1994). As proteínas são produzidas em resposta à compressão e

pelo *stress* mecânico das células ou pela destruição celular e desorganização das fibras de colagénio, em virtude da hipoxia que ocorre após a lesão dos vasos sanguíneos (Davidovitch, 1991).

No caso da ortodontia, a remodelação do tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado é essencial à movimentação dentária (Su *et al.*, 1997). As forças mecânicas exercidas sobre o dente são transmitidas ao periodonto, iniciando a actividade de remodelação que é indispensável à movimentação dentária. Este fenómeno é explicado pela teoria da pressão – tensão (Sandy *et al.*, 1993; Yokoya, 1997). O complexo vascular periodontal tem uma função preponderante na remodelação dos tecidos periodontais durante a movimentação dentária induzida (El-Agroudi, 1998; Attal *et al.*, 2001). A pressão exercida indirectamente sobre o ligamento periodontal não é suficiente para ocluir a rede vascular, no entanto desencadeia a libertação de neuropéptidos vasoactivos através de estímulos nervosos (Kvinnslund, 1989; Attal *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2006). As modificações parecem ocorrer continuamente até que a força indutora se dissipe ou cesse. Microscopicamente, do lado onde se exerce a força ortodôntica de compressão, são descritos diversos eventos biológicos: alteração do fluxo sanguíneo, necrose, morte celular, fagocitose dos restos celulares, hialinização tecidular, alteração da estrutura do ligamento periodontal, reabsorção óssea nas proximidades das áreas hialinizadas por osteoclastos multinucleados associados a pequenas lacunas de Howship (Kobayashi *et al.*, 1998; Hamaya *et al.*, 2002; Talic *et al.*, 2003). Já no lado “tensionado”, o espaço periodontal fica mais ampliado, com figuras de mitose e aumento do número de células, resultando em actividade osteoblástica, com deposição de tecido osteóide e sua posterior mineralização, além da remodelação das fibras colagénias (Hamaya *et al.*, 2002; Mabuchi *et al.*, 2002). A maioria destas alterações, são também visíveis no periodonto do rato exposto ao RBF.

Na movimentação dentária induzida pelas forças ortodônticas, o *stress* mecânico evoca respostas bioquímicas dos diferentes tipos celulares periodontais por via da activação de mediadores químicos e factores de crescimento (Nagai *et al.*, 1999; Perinetti *et al.*, 2002). Os estímulos mecânicos, actuam como primeiro mensageiro para promover a produção intracelular do segundo mensageiro como o Ca^{2+} , GMP ou o AMPc (Hiruma *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 1999; Shirazi *et al.*, 2002).

Alguns autores, estudaram a reconstrução do osso alveolar e a reorganização do ligamento periodontal, tendo descrito um aumento da síntese de colagénio, remodelação e reorientação das fibras periodontais (Tenshin *et al.*, 1995). A remodelação e o “rearranjo” do tecido supra-alveolar são indispensáveis para a estabilização dos dentes

após a movimentação dentária. As fibras transeptais necessitam de um longo período de retenção para concluir a sua remodelação e reorganização (Tenshin *et al.*, 1995). É de referir que o ligamento periodontal tem uma importante função na remodelação óssea da interface osso – ligamento durante a movimentação dentária induzida por forças mecânicas (Kyomen *et al.*, 1997).

Vários estudos foram efectuados em modelo animal, acerca das alterações vasculares associadas ao movimento dentário por acção de uma força mecânica (Attal *et al.*, 2001; Shirazi *et al.*, 2002). Os vasos sanguíneos constituem 11% do ligamento periodontal e sofrem alteração do fluxo sanguíneo devido às reacções vasculares causadas por estímulos induzidos pelas forças de pressão-tensão (Toms *et al.*, 2000). As reacções vasculares às forças mecânicas têm sido identificadas, através da análise morfológica do sistema vascular, medição do fluxo sanguíneo ou ambas. O ligamento periodontal apresenta um sistema microvascular composto por canais tecidulares ultra-estruturais que aumentam na presença da movimentação dentária (Turner *et al.*, 1969; Tang *et al.*, 1993; Attal *et al.*, 2001). Como já foi referido a micro-vascularização é composta por vasos de parede fina, de calibre variado que se assemelham a capilares, além de apresentarem estruturas suspensas que funcionam como amortecedores e nutrem as células que estão constantemente a remodelar o osso alveolar e formando o cimento (El-Agroudi *et al.*, 1999; Tsukada *et al.*, 2000). Durante a movimentação dentária induzida, a circulação sanguínea periodontal é modificada, provocando alterações na amplitude da tensão vascular (Lew *et al.*, 1989; Lew, 1989; Imamura *et al.*, 2002). As alterações vasculares sequenciais, na zona onde ocorre a compressão do ligamento periodontal, estão bem documentadas, nomeadamente: estase, isquémia, diminuição gradual de capilares, presença de trombos, completa obliteração dos vasos sanguíneos e degeneração vascular (Rygh, 1972; 1973). Estas alterações foram também encontradas por nós, o que pode indiciar um mecanismo semelhante provocado pelo RBF nos tecidos periodontais.

As alterações que encontrámos são ainda compatíveis, sob o ponto de vista anatomo-patológico às descritas na doença periodontal, em que há uma destruição progressiva dos tecidos de suporte do dente.

A doença periodontal afecta os tecidos que circundam o dente – gengiva e mucosa – e os que o sustentam no alvéolo – cimento dentário, ligamento periodontal e osso alveolar. Esta doença não é uma descoberta recente. Enquanto a cárie dentária se desenvolveu, historicamente, como resultado de civilizações emergentes, estudos em paleontologia indicam-nos que as doenças periodontais são tão antigas quanto a própria humanidade e

continuam a ser uma das doenças mais comuns a afectar a dentição humana (Loe, 1993b).

O tecido periodontal, perante uma agressão constante do meio envolvente, tem uma boa capacidade de recuperação (cicatrização). No periodonto, utilizamos o termo regeneração, quando ocorre a completa restauração dos tecidos danificados através da proliferação e diferenciação dos elementos do parênquima original. Este processo passa por uma nova inserção, com formação de novo cimento, osso alveolar, ligamento periodontal e epitélio juncional, restabelecendo a orientação das fibras gengivais (Wikesjö *et al.*, 1999).

A “reparação” é uma forma de regeneração incompleta, porque substitui os tecidos perdidos, por tecido conjuntivo não especializado, fibrótico, constituindo uma “cicatriz”. Deste modo, os tecidos danificados são substituídos por tecidos que nem sempre conseguem desempenhar as funções dos tecidos originais. Em periodontologia, o termo reparação tem sido descrito como adesão colagenosa (Wikesjö *et al.*, 1991; 1991; Trombelli, 1999), ou uma nova inserção das fibras de colagénio à raiz (Wikesjö *et al.*, 1999).

O periodonto exposto ao RBF evidencia uma fibrose muito intensa do ligamento periodontal. Este resultado parece-nos particularmente importante pois poderá ocorrer nos nossos animais um mecanismo de reparação semelhante ao que ocorre na doença periodontal.

No processo de cicatrização do tecido periodontal, ressaltam algumas particularidades, pois os tecidos periodontais representam um sistema único do corpo humano onde o tecido epitelial e o tecido conjuntivo mineralizado e não mineralizado se unem para formar uma junção denominada dentogengival. No auge da progressão da doença periodontal, a integridade desta junção é perdida, podendo ser restabelecida de forma progressiva com a terapêutica. Para a recuperação do periodonto é necessário o envolvimento de células do epitélio gengival, células do conjuntivo gengival, células do tecido ósseo e células do ligamento periodontal (Aukhil, 2000).

Estudos “in vitro”, demonstraram que células derivadas do ligamento periodontal podem apresentar fenótipos de células do tecido ósseo e do cimento (“osteoblast-like” e “cementoblast-like”) que são capazes de formar nódulos de mineralização. A proliferação, migração e diferenciação das células do ligamento periodontal são reguladas por diversos factores de crescimento, proteoglicanos e outros factores biológicos derivados

da dentina ou do cimento (Karring *et al.*, 1993; Gestrelus *et al.*, 1997). Os processos de adaptação funcional da “cicatrização”, requerem um mecanismo pelo qual as fibras de colagénio fiquem inseridas no cimento. Para que isto aconteça, é necessário que as fibrilhas de colagénio formem bandas paralelas na superfície radicular, com orientação vertical. Este tipo de adesão é referida como “adesão do colagénio” (Stahl *et al.*, 1977). Dados ultra-estruturais mais recentes, sugerem, entretanto, que apesar das novas fibras de colagénio não estarem visivelmente inseridas no interior do cimento, a íntima associação das fibrilhas de colagénio jovens na matriz dentária resulta numa inserção fisiologicamente válida, resistente às forças mecânicas aplicadas no local (Selvig *et al.*, 1995). Após a raiz do dente ficar menos “protegida”, ocorre a diferenciação dos cimentoblastos, que irão depositar matriz, sobre a qual, novas fibras de colagénio serão ancoradas. Muitos estudos demonstraram que, o cimento não aparece antes da terceira semana de “cicatrização” em humanos, cães e macacos (Nyman *et al.*, 1982), apesar de outros autores terem relatado deposição de novo cimento após duas semanas de “cicatrização” (Araújo *et al.*, 1997). A interface entre o novo cimento e o tecido duro subjacente, pode consistir de tecido de granulação, livre de fibras, possivelmente fibronectina (Selvig *et al.*, 1988). As alterações encontradas por nós no cimento ocorrem a partir da terceira semana de exposição ao RBF e podem também constituir um mecanismo de adaptação ou de “cicatrização”.

O aumento da espessura do cimento ocorre também nos idosos, coadjuvado com um aumento da fibrose e diminuição celular do ligamento periodontal (Grant *et al.*, 1972; Berglundh *et al.*, 1991).

Pode aparecer uma actividade de reabsorção de natureza superficial e transitória que, normalmente é acompanhada por deposição de cimento (Selvig *et al.*, 1988; 1995). Os osteoclastos, removem inicialmente constituintes minerais do tecido através de componentes ácidos desmineralizadores e, em seguida, degradam e removem a matriz orgânica. O processo de reabsorção cria uma superfície em que as fibrilhas de colagénio da matriz ficam sem suporte, estabelecendo um substrato adequado para a ancoragem de novas fibrilhas de colagénio.

Nos nossos resultados encontrámos alterações estatisticamente significativas na razão das áreas e dos perímetros, com os valores mais elevados à 3ª semana e os mais baixos à 9ª semana, levando-nos a constatar que existe uma destruição do osso alveolar e uma maior deposição de cimento. A hipercimentose é caracterizada pela formação excessiva de cimento além do limite necessário para cumprir as suas normais funções, resultando no espessamento anormal com alteração gradual da forma da raiz. A etiopatogenia da

hipercimentose está ligada a diversos factores como: *stress* funcional (Corruccini *et al.*, 1987; Comuzzie *et al.*, 1989), trauma oclusal, compensação funcional e apical, erupção dentária contínua, cimentículos periodontais, reparação periodontal decorrente de agressão ao periodonto, lesões periapicais inflamatórias, factores sistémicos (acromegália, artrite, doenças da tiróide e arteriosclerose) manifestações da doença de Paget, factores raciais (Weinberger, 1954).

Segundo Israel (1984) a hipercimentose precoce está associada à redução do espaço periodontal e anquilose alveolo-dentária nos dentes com dificuldade na erupção. Sendo o ligamento periodontal uma estrutura que está entre o osso alveolar e o cimento é compreensível que qualquer alteração nestas estruturas tenha consequência na espessura do ligamento periodontal. Para se restabelecer a espessura do ligamento periodontal, após uma sobrecarga oclusal, as estratificações (aumento) do cimento seriam acompanhadas pela reabsorção do osso alveolar. Quando a osteólise circunscrita é provocada por estímulo funcional de carácter crónico, ocorre a libertação local de iões de cálcio, que se depositam no cimento saudável, contribuindo para a formação de cimento excessivo levando a uma hipercimentose.

No nosso trabalho também encontrámos a presença de cimentículos no ligamento periodontal. A união dos cimentículos periodontais à superfície dentária, levaria a uma hipercimentose localizada. Os cimentículos apresentam dimensões reduzidas e estão relacionados com a deposição de cimento em redor de um núcleo de células necrosadas provenientes dos restos epiteliais de Malassez. Os pequenos trombos no ligamento periodontal também podem sofrer calcificação distrófica, iniciando a formação de cimentículos (Mikola *et al.*, 1949).

McCulloch (1993) resume a reconstituição dos tecidos periodontais perdidos nos seguintes passos:

- a) Os elementos teciduais lesados são eliminados;
- b) Células progenitoras surgem da região adjacente ao local lesado e ocorrem mitoses em resposta aos factores solúveis da matriz, onde tais células se diferenciam e inicia-se a síntese da matriz;
- c) A região lesada fica repleta de células, matriz e componentes de adesão para estabelecer um conjunto estável (fibras de Sharpey);

d) As células que repovoam a área lesada sintetizam factores de crescimento e restauram a homeostasia dos tecidos periodontais.

Em situações patológicas, como a periodontite, ou trauma oclusal agudo ou crónico (bruxismo), ocorrem alterações ao nível do tecido conjuntivo do ligamento periodontal que estão associadas a um processo inflamatório. Embora este último facto não esteja descrito nas nossas observações, parece-nos essencial uma breve referência a estes processos, dada a exposição constante destes tecidos a microorganismos da cavidade oral.

Assim, a doença periodontal provoca a degradação dos tecidos e, conseqüentemente, as proteases, tanto do hospedeiro como dos microorganismos, são fundamentais para o processo destrutivo. É provável que muitas enzimas microbianas e do hospedeiro se encontrem presentes no sulco gengival. A libertação destas enzimas na área do sulco promove reacções de defesa e contribui para que ocorram danos no tecido conjuntivo por diversas vias. Ao contrário, os inibidores das proteases, servem como moduladores da função da protease e minimizam o processo inflamatório.

As doenças periodontais em 1993, passaram a ser consideradas um grupo de condições patológicas do periodonto marginal, sendo consideradas como infecciosas quanto à causa e inflamatórias na natureza (Clark *et al.*, 1993). A classificação clínica destes processos está baseada no envolvimento topográfico da resposta à superfície gengival (gengivite) ou nas estruturas de inserção mais profundas (periodontite), sendo que nesta situação haveria destruição do osso alveolar, alterações na organização da rede fibrilar do ligamento periodontal e até alteração na morfologia do cimento.

A importância da descrição das alterações patológicas associadas com as doenças periodontais há muito tempo tem sido reconhecida, sendo que algumas características estão solidamente estabelecidas tais como: presença e eventual migração apical de uma inserção epitelial; presença e eventual aprofundamento de um infiltrado inflamatório subjacente ao epitélio juncional; presença e eventual colapso das fibras do tecido conjuntivo ancoradas no cimento radicular; presença e eventual reabsorção da porção marginal do osso alveolar (Moskowitz *et al.*, 1991).

Um conceito clínico e patológico foi desenvolvido, que indicia que a gengivite e a periodontite são duas entidades patológicas, sendo uma a extensão da outra (Buckley *et al.*, 1984). As evidências experimentais recentes sobre a etiologia e a patogénese da doença periodontal indicam tratar-se de uma doença complexa, multifactorial,

reconhecida como doença “eco-genética”, cuja etiologia não está somente associada ao efeito das bactérias nos tecidos, mas também à presença de genes polimórficos (Takashiba *et al.*, 2006), resposta inflamatória e imunológica ineficaz (Schenkein *et al.*, 2006) bem como efeitos adversos de medicamentos (Seymour, 2006). Os processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos periodontais para os proteger contra o ataque microbiano e impedir que os microorganismos se disseminem ou invadam os tecidos. Há algumas situações, em que as reacções de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais, pois também são passíveis de danificar as células e as estruturas circundantes do tecido conjuntivo, alcançando até o osso alveolar neste processo destrutivo. Portanto, tais processos “defensivos” podem, paradoxalmente, responder pela maior parte da lesão tecidular observada na gengivite e na periodontite. As reacções inflamatórias no periodonto têm diferenças significativas de outros tecidos, devido à sua anatomia, ou seja, a permeabilidade característica do epitélio juncional resulta num processo notavelmente dinâmico que envolve células e fluidos, preservando no entanto a integridade epitelial através da interface tecido duro/tecido mole. Para além disso, os processos imunológicos nos tecidos periodontais são a resposta não a uma espécie microbiana, mas a um grande número de microorganismos.

A destruição periodontal pode ser o resultado da combinação de factores bacterianos que variam no tempo, sendo esta situação contrastante com a maioria das outras doenças infecciosas (p. ex: tuberculose, sífilis), nas quais o hospedeiro enfrenta apenas um microorganismo. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que, mesmo no próprio indivíduo, a gravidade da lesão do tecido periodontal frequentemente varia de dente para dente e de uma superfície dentária para outra. Assim, enquanto muitos dentes de um mesmo indivíduo podem exibir perda avançada de inserção do tecido conjuntivo e do osso alveolar, outros dentes ou superfícies dentárias, podem quase não ser afectados e apresentar um periodonto normal. Por conseguinte, um paciente que é susceptível e apresenta a doença periodontal não tem uma condição homogénea. Embora as bactérias, principalmente Gram-negativas anaeróbias sejam responsáveis pelo início do processo, estes microorganismos são insuficientes para causar a doença, sendo essencial a presença de um hospedeiro susceptível (Page e Kornman, 1997).

No contexto do nosso trabalho, estas considerações são passíveis de justificar a variação de resultados em indivíduos expostos ao RBF.

Da mesma forma que condições ulcerativas do tracto gastrointestinal têm origem psicogénica, o *stress* psicológico tem sido frequentemente, e por muitos anos, mencionado como factor predisponente da doença periodontal. Os mecanismos pelos

quais o *stress* pode afectar a saúde periodontal são complexos (Borrell *et al.*, 2005). De acordo com alguns autores, a placa dentária (microbiana) existente no biofilme é o factor etiológico principal da periodontite, apesar de outros factores sistémicos e locais terem também um papel importante na patogénese da periodontite tais como o *stress* (Genco *et al.*, 1996; 1998; Albandar, 2002).

O *stress* tem sido definido quer como estímulo, quer como resposta. As definições de estímulo centram-se em eventos do ambiente. Definições de resposta, prevalentes na biologia e na medicina, referem-se ao estado de *stress*. Contudo esta definição, teve alguns recuos, e uma definição mais recente enfatiza a relação entre a pessoa e o ambiente, tendo em conta as características da pessoa e o evento *stressante* (Hilgert *et al.*, 2006).

A gravidade da periodontite baseia-se na interacção neuro-imuno-endócrina pela acção de hormonas e mediadores químicos produzidos pelo organismo em situações de *stress* ou ansiedade para coordenar a resposta "fuga ou luta" (Genco *et al.*, 1998; Rabin *et al.*, 1999).

Hilgert *et al.* formularam uma hipótese em que advogam que o *stress* estimula a hiperactivação do eixo hipotálamo-hipofisiário-adrenal levando à periodontite (Hilgert *et al.*, 2006). As respostas fisiológicas aos agentes *stressantes* modulam o sistema imunitário através do sistema nervoso e endócrino, existindo três possíveis vias de reacção fisiológicas ao *stress* no organismo (inflamatório, traumático ou psicológico).

A primeira via de resposta induzida pelo *stress* é a activação do eixo hipotálamo-hipofisiário-córtex suprarenal (HHCS), que promove a libertação da hormona libertadora da corticotropina (CRH) do hipotálamo. A CRH induzirá a adenohipófise à libertação da hormona adrenocorticotrópica (ACTH) e esta, por sua vez, estimula a libertação das hormonas glucocorticóides do córtex da suprarenal. Os glucocorticóides libertados via activação do eixo HHS, desempenham um papel importante na regulação do recrutamento de células imunitárias para os tecidos inflamados, bem como na alteração do equilíbrio de linfócitos T Helper 1 e 2 em direcção a uma resposta T Helper 2 dominante (Breivik *et al.*, 2001).

Os níveis de glucocorticóides na urina têm sido utilizados como medida fisiológica do *stress*. Cohen-Cole *et al.* dosearam os níveis de cortisol livre na urina de pacientes com doença periodontal necrosante e verificaram que estes estavam aumentados, quando comparados com os controlos. Neste estudo, verificou-se também que os pacientes com

doença periodontal demonstraram níveis significativamente maiores do traço de ansiedade, depressão e distúrbios emocionais do que os controlos (Cohen-Cole *et al.*, 1983). Também um “feedback” negativo, com a activação do sistema imunitário associado ao aumento das citocinas circulantes, aumenta a actividade da hormona corticotropina, activando o eixo HHS, causando uma elevação dos níveis de cortisol. Quando a acção inflamatória é suficientemente longa e profunda, manifestações sistémicas da doença podem tornar-se evidentes, como pode acontecer com a periodontite (LeResche e Dworkin, 2002). No princípio dos anos 90, passou a ser consensual que as citocinas bem como outros mediadores humorais da inflamação, são activadores potentes da resposta central ao *stress* (Tsigos *et al.*, 1997).

A segunda via de resposta induzida pelo *stress* é a do sistema nervoso simpático. A informação (*stress*), é transmitida ao sistema nervoso para promover a libertação de adrenalina e noradrenalina a partir da medula supra-renal em resposta à estimulação simpática (Anisman *et al.*, 1996; Seiffert *et al.*, 2002). O organismo, ao receber um estímulo *stressante*, reage imediatamente, disparando uma série de reacções via sistema nervoso, sistema endócrino e sistema imunológico, através da estimulação do hipotálamo e do sistema límbico. Genco *et al.* desenvolveram vários trabalhos de investigação onde concluíram que os glucocorticóides libertados do córtex da supra-renal poderiam induzir a redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias (interleuquinas, prostaglandinas e TNF). Por outro lado as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) têm o efeito oposto, estimulando a formação e actividade de prostaglandinas e enzimas proteolíticas, as quais podem, indirectamente, provocar a destruição tecidual periodontal (Genco *et al.*, 1998; Breivik *et al.*, 2001).

A terceira via é a via “da inflamação neurogénica”, a qual liberta neuropéptidos a partir das fibras dos nervos sensitivos, quando estimulados por factores extrínsecos (Bartold *et al.*, 1994). A libertação periférica de neuropéptidos tem sido implicada como um promotor neurogénico em vários processos inflamatórios (Bartold *et al.*, 1994). Os neuropéptidos modulam também a actividade do sistema imunitário e a libertação de citocinas. Assim, o impacto do *stress* no sistema imunitário, está bem estabelecido e tem uma possível influência na doença periodontal inflamatória crónica.

Há muitos estudos que têm demonstrado a relação entre o *stress* psicológico e as doenças como a artrite reumatóide (Davis *et al.*, 2008) e a periodontite (da Silva *et al.*, 1995; Breivik *et al.*, 1996; 2001; Genco *et al.*, 1999). Contudo, todos os investigadores advogam que mais trabalhos devem ser desenvolvidos nesta área, no sentido de

esclarecer como é que estes factores estão associados a um aumento da susceptibilidade à doença periodontal.

Genco *et al.* afirmaram que um dos mecanismos possíveis da influência do *stress* e factores psicossociais nas condições periodontais é uma alteração de estilos de vida e comportamentos de saúde dos pacientes. Indivíduos com elevados níveis de *stress* tendem a adoptar hábitos prejudiciais para a saúde periodontal, tais como, higiene oral insuficiente, aumento dos hábitos tabágicos ou alterações alimentares com reflexos negativos para as funções do sistema imunológico (Genco *et al.*, 1998a). Verificou-se, em indivíduos sujeitos a *stress*, o aparecimento de osteoporose do osso alveolar (Gupta *et al.*, 1960), epitélio com textura irregular, degeneração do ligamento periodontal e redução da actividade osteoblástica (Ratcliff, 1956). Durante o *stress* crónico, observou-se osteoporose do osso alveolar, migração apical do epitélio de união e formação de bolsas periodontais (Shklar, 1966). Por outro lado, o *stress* tem a capacidade de atrasar a cicatrização do tecido conjuntivo e do osso, não afectando o epitélio (Genco *et al.*, 1999; Vettore *et al.*, 2003).

O sono inadequado, frequentemente como resultado de um estilo de vida sujeito ao RBF pode ser mencionado como causa do *stress* e conduzir a alterações morfológicas no periodonto similares à periodontite, mas na ausência de sinais inflamatórios. Actualmente, existem dados consistentes na literatura que sugerem que o tabaco, o padrão de higiene oral, a idade, a presença de algumas espécies patogénicas, a diabetes, determinadas condições sistémicas e outros sejam factores de risco para a doença periodontal (Genco *et al.*, 1996). Contudo, a combinação desses factores ainda não consegue explicar a variação ocorrida na progressão e na prevalência da doença. Essa variação talvez possa ser explicada por factores desencadeadores do *stress* que têm sido associados à diminuição da função imunológica e ao aumento da susceptibilidade a infecções, tal como ocorre na síndrome depressiva (Thase *et al.*, 1996). A literatura tem apresentado uma série de trabalhos que se propõem investigar o impacto de agentes do *stress* no periodonto, principalmente, na prevalência e gravidade das periodontites. Alguns factores psicossociais como, separação de casal, ajuste conjugal e *stress* de guerra, são correlacionados com maior extensão e severidade da periodontite (Baker *et al.*, 1961; De Marco, 1976). Deinzer *et al.* (1999) mostraram que indivíduos submetidos a *stress* académico apresentam maiores concentrações da citocina IL-1, beta no fluido gengival em locais saudáveis e com gengivites, do que os controlos. Esses resultados indicaram também, que essa forma de *stress*, poderia afectar a saúde periodontal, principalmente quando os hábitos de higiene bucais eram

negligenciados, já que a citoquina pró-inflamatória está relacionada com a perda de inserção periodontal (Deinzer *et al.*, 1999). As formas necrosantes da doença periodontal, a gengivite ulcerativa necrosante aguda (GUNA) e a periodontite ulcerativa necrosante estão frequentemente associadas ao *stress* emocional, mal nutrição e tabaco, e alguns autores sugerem um padrão sazonal da doença que é desencadeada em períodos de *stress*, como exames académicos e períodos de férias (Giddon *et al.*, 1963). Mecanismos endócrinos e imunológicos estão relacionados com a patogénese e, embora esses achados não sejam conclusivos, em alguns trabalhos, parece existir actividade adrenocortical quando a GUNA está presente (Shannon *et al.*, 1969; Cogen, 1983).

Algumas observações têm mostrado que a GUNA está associada à infecção por HIV (Horning e Cohen, 1995) e também a determinados perfis de personalidade (Formicola *et al.*, 1970; Freeman e Goss, 1993).

Em relação à interligação ruído-*stress*, encontramos vários trabalhos relevantes. O trabalho publicado por Barret *et al.* em 1963, em que afirmaram existir muitos factores que podem estar na origem do *stress* em animais de laboratório, nomeadamente: o acasalamento, a idade ou simplesmente o facto de estarem restritos a um espaço confinado. Em outro trabalho é reconhecida a relação entre o RBF e o *stress* (Pawlaczyk-Luszczynska *et al.*, 2004b). Diversos estudos distinguem claramente o *stress* por exposição a um estímulo agudo ou crónico em animais de laboratório, referindo inclusivamente, uma situação que se pensa ser de adaptação. A exposição de animais de laboratório, de forma continuada, a um agente stressante, pode dar origem a fenómenos de adaptação e habituação (Jones *et al.*, 1988; Pitman *et al.*, 1988). Em outro trabalho, desenvolvido por Kant *et al.* em 1987 conclui-se que animais expostos a choques eléctricos nos pés, de modo contínuo, mantinham comportamentos regulares de alimentação e de fuga, prosseguindo inclusive a reprodução. Também foram efectuados estudos onde foi abordada a co-relação entre o *stress* e a resposta imune. Castro *et al.* (1999) e Águas *et al.* (1999a) verificaram a existência de um aumento dos linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ e um incremento das doenças autoimunes em indivíduos expostos de uma forma crónica ao RBF. Estes resultados, vão de encontro os resultados de Oliveira *et al.* (2007), no estudo do efeito do RBF sobre a parótida. Em ambos os estudos concluiu-se que o aparecimento de lesões nos corpos biológicos, estava interligado ao RBF de forma crónica, ao *stress* ou a outros mecanismos neuro-endócrinos. Outros estudos, sobre a resposta imune e o status oxidativo induzido por *stress* sonoro em ratos, de modo agudo e crónico, comprovaram a existência de alterações proliferativas nos animais expostos de forma aguda e diminuição das células esplénicas CD4⁺ e da IgG sérica nos animais

expostos ao ruído de modo crónico (Kui-Cheng *et al.*, 2007). Em patologias auto-imunes, como a artrite reumatóide, a citocina RANKL (ligando do receptor activador do factor nuclear κB) encontra-se expressa pelos linfócitos $CD4^+$, participando directamente nos processos de estimulação da diferenciação osteoclástica e na activação dos osteoclastos maduros e consequentemente na destruição óssea e articular. Na periodontite, foi descrita a existência de um desequilíbrio local nos níveis de RANKL induzido pela actividade das células locais, tais como os osteoblastos e linfócitos T $CD4^+$, predominantes nos tecidos afectados (Hofbauer *et al.*, 2001). Vernal *et al.* em 2006, realizaram um estudo em dois grupos, um com trinta e três pacientes com mais de trinta e cinco anos de idade com periodontite crónica e um grupo de controlo com vinte indivíduos saudáveis onde pretendiam verificar o papel dos linfócitos T $CD4^+$ e do RANKL nos pacientes com periodontite crónica. Neste trabalho, os resultados demonstraram que os linfócitos T $CD4^+$ encontrados nos pacientes com periodontite crónica, apresentavam a citocina RANKL unida à membrana com valores alterados e, como tinha sido referido por outros autores, contribuiria para o desequilíbrio nos processos celulares envolvidos na remodelação óssea através de uma alteração significativa dos níveis fisiológicos locais de RANKL, o que provocaria uma alteração na actividade dos osteoclastos e resultaria numa inapropriada alta taxa de reabsorção óssea, que excedia a capacidade compensatória dos osteoblastos (Schwartz *et al.*, 1997; Taubman *et al.*, 2001).

Oliveira *et al.*, (2009) realizaram um trabalho de investigação que tinha por objectivo avaliar o efeito da exposição ocupacional ao ruído de elevada intensidade na indústria têxtil sobre a morfologia adrenal. O ruído ambiental desta indústria foi recolhido e reproduzido no modelo animal. Após a exposição dos animais por um período semanal similar ao dos funcionários da indústria referida, os animais foram sacrificados ao primeiro, ao terceiro, ao quinto e ao sétimo mês de exposição. Neste trabalho conclui-se que a exposição crónica dos ratos Wistar ao ruído da indústria têxtil desencadeou alterações citológicas no córtex adrenal, sugerindo a existência de uma resposta sustentada à exposição ao *stress*.

Naturalmente que, os nossos animais, sujeitos a RBF, estiveram também sujeitos a um *stress* significativo e este factor pode contribuir para explicar as lesões encontradas, que se assemelham às lesões da doença periodontal. Conforme referimos, um dos factores etiológicos da doença periodontal é o *stress*.

O periodonto é estruturalmente composto por elementos fibrosos, incluindo colagénio e outras proteínas, elastina, fibronectina, laminina, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína do osso, osteonectina e tenascina, minerais, lípidos, água e factores de crescimento

ligados ao tecido. Além disso, existe uma grande variedade de componentes da matriz extracelular, incluindo tropocolagénio e proteoglicanos. Todos estes componentes da matriz são constantemente renovados e, portanto, existe uma grande actividade enzimática na matriz, tanto no tecido saudável como no tecido doente (Kinane, 2001). As metaloproteinases da matriz (MMP) são responsáveis pela remodelação e pela degradação dos componentes. As MMP também degradam o colagénio da membrana basal e intersticial, a fibronectina, a elastina, a laminina e os proteoglicanos. São produzidas sob a forma de pró-enzima, e a sua activação é extracelular. Nas MMP, a collagenase do polimorfonuclear (PMN) e dos fibroblastos possui a capacidade singular de dividir a tripla hélice dos colagénios tipo I, II, III, iniciando assim a degradação da matriz extracelular. Quando ocorre uma agressão crónica, dá-se a destruição das fibras de colagénio do ligamento periodontal juntamente com o osso alveolar de suporte.

Um dos objectivos do nosso trabalho foi identificar as alterações no colagénio de forma a perceber de que forma ocorria a remodelação da matriz extracelular, ao longo do tempo, nos animais expostos ao ruído de baixa frequência.

O comportamento dos colagénios estudados: I, IV e V não foi uniforme, verificando, globalmente, uma tendência estatisticamente comprovada de aumento com o tempo de exposição ao RBF do colagénio I e V, não tendo no entanto ocorrido alterações no colagénio IV com a exposição ao RBF.

No colagénio fibrillar de tipo I verificaram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente ao grupo de controlo, nomeadamente a partir da 3ª semana de exposição, sendo de referir que entre a 3ª semana e a 13ª semana não ocorreram alterações.

No que respeita ao colagénio de tipo V, os padrões de variação da imunomarcacão foram também expressivos, nomeadamente entre o grupo de controlo e o grupo de 13 semanas de exposição ao RBF. Resultados sobreponíveis foram encontrados por Oliveira em estudo com protocolo similar que estudou o efeito do RBF sobre a glândula parótida. Nesse trabalho verificou-se também um aumento progressivo e significativo de colagénio I do grupo de controlo para o exposto ao RBF por 13 semanas no tecido conjuntivo perilobular, interlobular da parótida. Sendo a matriz extracelular constituída principalmente por colagénio I (Verrecchia *et al.*, 2007) e estando a proliferação da matriz extracelular associada à exposição crónica ao RBF podemos afirmar que este resultado era expectável, partindo do pressuposto que não ocorreram alterações estruturais no colagénio e na imunomarcacão.

Estão descritas diversas patologias sistêmicas, onde se observa um aumento significativo do colagénio I. Em patologias como a esclerodermia ou na osteogénese *imperfecta* o nível elevado de colagénio tipo I tem como causa primária o aumento da taxa de transcrição das moléculas de colagénio, que é regulada por inúmeros mecanismos, nomeadamente factores de crescimento e citoquinas (Ghosh, 2002; Verrecchia *et al.*, 2007). Na fibrose pulmonar idiopática, processo ainda não totalmente compreendido, crê-se que a proliferação fibrótica está relacionada com a proliferação fibroblástica - miofibroblástica, diminuição da apoptose miofibroblástica e aumento da actividade e da resposta a citoquinas fibrogénicas como (TGF- β , platelet derived growth factor – PDGF, insulin growth factor – IGF ou tumor necrosis factor- α – TNF- α) (Selman *et al.*, 2001).

O *transforming growth factor- β* (TGF- β), de origem plaquetária mas também mesenquimal ou epitelial (Verrecchia *et al.*, 2002), está relacionado com a produção fibroblástica de *connective tissue growth factor* (CTGF) que promove a acumulação de matriz extracelular (colagénio I) (Chaqour *et al.*, 2006), principal marca das doenças fibróticas (Ghosh, 2002).

Também no intestino ocorre um processo fibrótico associado com a irradiação, a expressão de CTGF está aumentada (Vozenin-Brotons *et al.*, 2003) e no isolamento *in vitro* de células musculares intestinais também expostas a irradiação Bourgier *et al.* (2005) puderam comprovar uma concentração constitutiva de CTGF elevada e uma capacidade secretória de colagénio aumentada. Os mesmos autores puderam verificar que a via Rho/Rho kinase está relacionada com a activação da CTGF, e que o seu bloqueio diminuía a diferenciação fibrogénica (Bourgier *et al.*, 2005).

Os importantes progressos na área de engenharia tecidual podem ajudar a compreender os mecanismos de lesão atribuídos ao RBF, e formas possíveis de diminuir os seus efeitos, na medida em que o *stress* mecânico tem sido estudado como estímulo para a diferenciação celular e para a estimulação de células produtoras de componentes da matriz extracelular, nomeadamente colagénio (Altman *et al.*, 2001). As matrizes tridimensionais de colagénio I são, neste campo, um modelo comum para investigar a influência do *stress* mecânico sobre os fibroblastos (Grinnell, 2003). As experiências *in vitro* com *stress* mecânico ajudam a perceber como é que, por exemplo, forças que são impostas exteriormente na célula levam a alterações na expressão genética das células (Chaqour *et al.*, 2006). Este tipo de estudo tem relevante interesse para a percepção do fenómeno que ocorre no efeito do RBF sobre o ligamento periodontal e restantes estruturas do periodonto.

O efeito no colagénio V, tem especial relevância, visto estar descrito que com a doença periodontal, poder ocorrer uma alteração na natureza do colagénio (com especial evidência para a presença de fibras de colagénio V) e no diâmetro das fibras (Berkovitz, 2004).

O outro colagénio estudado foi o colagénio tipo IV tendo-se verificado que o tempo de exposição ao RBF não exerce efeito significativo sobre a imunomarcação.

O colagénio IV é essencial para manter a integridade estrutural da matriz extracelular, a nível da membrana basal, mas não fundamental para o desenvolvimento destas matrizes (Pöschl *et al.*, 2004). As lamininas parecem ter a este nível, um papel importante (Smyth *et al.*, 1999). No modelo do embrião - onde a expressão do colagénio IV é feita na ausência de resposta inflamatória - uma deficiência de colagénio IV não afecta o desenvolvimento do sistema vascular, embora provoque uma organização anormal da rede capilar (Pöschl *et al.*, 2004).

O nosso estudo não é, neste resultado, coincidente com o de da Fonseca *et al.* (2006a) que, com um protocolo semelhante teve um aumento do colagénio IV associado aos vasos no duodeno.

Estes autores consideraram que os estímulos inflamatórios e da angiogénese teriam um efeito sobre a expressão do colagénio IV.

Diversos estudos sobre a aplicação de forças ortodônticas sobre os dentes levaram a um tipo particular de resultados com alterações a nível dos colagénios na área sujeita às forças. Os colagénios I, III, V e VI aumentam de forma significativa nas zonas de compressão.

Tem sido sugerido que o mecanismo de remodelação induzida ortodonticamente no ligamento periodontal, leva a um aumento no metabolismo do colagénio, assemelhando-se aos processos de cicatrização de feridas (Clore *et al.*, 1979, Scharffetter *et al.*, 1989).

A caracterização dos tipos de colagénio parecia indicar que o aumento dos níveis de colagénio reflectia um aumento na síntese de colagénio e não um aumento da actividade da collagenase na zona de compressão. No entanto, um possível aumento da actividade da collagenase nas células da zona de tensão resultaria num aumento global da síntese de colagénio na zona de compressão. Estes resultados correspondem a uma correlação entre a actividade da collagenase e um aumento dos processos proliferativos, normalmente observados nas zonas de tensão no ligamento periodontal após a

estimulação ortodôntica (Green *et al.*, 1999).

Neste estudo de Green *et al.*, todos os dentes do grupo de controlo não apresentaram diferenças significativas na síntese de colagénio tipos I, III, V e VI entre os fibroblastos da área do vestibulo (controlo correspondente à zona de compressão nos dentes experimentais) e na área palatina / lingual das superfícies dentárias.

A proliferação da matriz extracelular foi bem documentada quer em microscopia óptica, quer em microscopia electrónica, com o aumento do colagénio I e V.

A matriz extracelular do tecido conjuntivo é, como já referimos, constituída por colagénios, proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas elásticas. Estes componentes têm a capacidade de reagir entre si e com as células da matriz, desempenhando as funções celulares e condicionando as características dos tecidos (Fichard *et al.*, 2003). O colagénio é sintetizado intracelularmente e exportado para fora da célula onde é terminada a sua síntese através da actuação de enzimas polimerizantes. A estrutura final do colagénio, a “tripla hélice”, é formada por três cadeias polipeptídicas enroladas entre si. Em termos bioquímicos, esta tripla hélice resulta da repetição sequencial de aminoácidos, Gly-Xaa-yaa, onde a Gly corresponde à Glicina, Xaa corresponde à prolina e Yaa corresponde à hidroxiprolina (Van der Rest *et al.*, 1991). Existem no homem pelo menos 28 tipos de colagénio, possuindo diferentes funções. Os mais bem estudados são os colagénios I, II, III, V e XI, que têm tendência a agrupar-se em fibrilhas. O colagénio IV integra a constituição das membranas basais dos vasos sanguíneos e tem sido usado como marcador da hemangiogénese (Teles-Grilo *et al.*, 2005). Ushiki em 2002, desenvolveu um trabalho, que se tornou numa referência para a correcta percepção na análise dos colagénios sob o ponto de vista morfológico. Em microscopia electrónica, as fibras de colagénio apresentam-se em feixes de fibrilhas estreitamente ligadas, paralelas entre si, ou em forma de cordão ou fita podendo formar uma malha com aspecto tridimensional; em microscopia óptica, estas fibras coram de rosa pela eosina e de verde pelo tricrómico de Masson (Ushiki, 2002). Existem doenças hereditárias que configuram alterações da estrutura do colagénio, como a síndrome de Ehlers-Danlos (Fichard *et al.*, 2003), a osteogénese imperfeita (Roughley *et al.*, 2003), condrodisplasias, a síndrome de Alport, a epidermólise bolhosa (Kivirikko, 1993). Para além destas doenças hereditárias que se relacionam com alterações da estrutura do colagénio, existem outras doenças que têm origem em mutações em alguns subgrupos, como é exemplo a osteoporose (colagénio I), a osteoartrose (colagénio II) ou o aneurisma aórtico (colagénio III) (Kivirikko, 1993). Sabe-se também que a síntese do colagénio está directamente ligada ao processo inflamatório. O colagénio é uma molécula vital em qualquer situação de cicatrização,

sendo um dos factores que mais contribuem na força e na integridade de todos os tecidos, agindo como base de sustentação dos mesmos. Distúrbios na matriz extracelular e na textura do colagénio desempenham um papel importante na patogénese da deiscência anastomótica das cirurgias colo-rectais, sendo um dado consensual que a inflamação e a agressão prolongadas induzem a síntese de colagénio pelos fibroblastos.

No nosso trabalho, à semelhança de outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo do ICBAS, também encontrámos alterações vasculares, nomeadamente vacuolização da parede dos vasos, proliferação da íntima (“thrombosis like”), hialinização e congestão vascular, ectasia e hemorragia. Martins dos Santos *et al.* (2002), com o mesmo protocolo experimental em ratos Wistar, confirmaram a existência de espessamento da camada íntima das artérias, acompanhada da rotura da membrana limitante elástica interna. As lesões encontradas não se limitaram ao sistema arterial tendo também sido encontradas pelos mesmos autores nos vasos linfáticos, encontrando-se estes dilatados, com paredes espessadas e rotura valvular. Krivolesova *et al.* (2001), comprovaram experimentalmente a inibição da contractibilidade dos linfáticos expostos ao infra-som, concluindo que as paredes dos vasos são estruturas alvo das alterações induzidas pelo RBF.

As alterações vasculares no periodonto, para além das já referidas na movimentação ortodôntica, estão também descritas na periodontite, na diabetes e na arteriosclerose. Apesar de haver informação sobre as alterações na vascularização na inflamação gengival, há pouca informação no que respeita às alterações vasculares que ocorrem nos tecidos moles da bolsa periodontal, quando a periodontite está em evolução. Os estudos disponíveis sobre as alterações vasculares periodontais na gengivite e periodontite sugerem que o desenvolvimento da inflamação crónica leva a uma expansão da rede vascular (Dorman *et al.*, 1962; Nuki *et al.*, 1974a; 1974b). Kindlova utilizando um modelo experimental da periodontite, relatou que aquando da periodontite, as formações da rede capilar junto à camada epitelial desapareciam e uma densa e larga rede de capilares surgia no seu lugar (Kindlova, 1965; Lindhe *et al.*, 1978). Hock *et al.*, afirmaram que, quando uma inflamação aguda ocorria na gengiva, o padrão capilar permanecia em rede. No entanto, se a quantidade de placa aumentasse, a inflamação tornava-se crónica e a morfologia capilar transformava-se numa enrolada e retorcida rede de vasos, conseguida com um aumento do diâmetro e comprimento dos capilares e vénulas (Hock *et al.*, 1975; Zoellner *et al.*, 1991). Estas alterações eram devidas a um aumento do diâmetro e do comprimento dos capilares e vénulas que se tornavam muito sinuosas com espirais e “enrolamentos”. Bergstrom reportou que a gengivite crónica, provocava alterações

vasculares devido ao aumento do diâmetro dos vasos; à alteração do lume dos vasos e à formação de novos vasos (Bergstrom, 1992).

Zoellner e Hunter estudaram as alterações vasculares na gengivite crónica e na periodontite crónica, tendo observado também um aumento no diâmetro dos vasos. Concluíram, portanto, que há uma considerável remodelação na vascularização periodontal na evolução da periodontite (Zoellner *et al.*, 1991). Em 1997, Bonakdar *et al.* chegaram a conclusões similares quando efectuaram um estudo comparativo entre a vascularização do periodonto saudável e com periodontite. Estes estudos indicaram que o desenvolvimento da periodontite era acompanhado por uma considerável remodelação e expansão da rede vascular. A verdadeira angiogénese deve ser definida como formação de novos vasos sanguíneos, contudo no entendimento de Zoellner e Hunter, a expansão da microcirculação através de um aumento do diâmetro vascular e da tortuosidade pode ser classificada como uma forma de angiogénese. O papel desempenhado pelos factores angiogénicos na periodontite continua a ser discutido.

Os nossos resultados mostram aquilo que pensamos ser uma interrupção do fluxo dos vasos, de lesões de carácter obstrutivo e ainda a presença de vasos com um trajecto sinuoso na observação macroscópica. Foi também, observada a presença de vasos que parecem ter reaberto numa resposta à possível diminuição do fluxo, fruto da obstrução a montante e que pode também traduzir, ou ser parte, destes fenómenos angiogénicos.

As opiniões divergem no que respeita à relação directa entre a diabetes e a doença periodontal. Apesar de alguma controvérsia, a relação entre a diabetes e a doença periodontal foi demonstrada por alguns autores (Genco *et al.*, 1998b; Salvi *et al.*, 2005).

Loe considerou, inclusivé, que a periodontite seria a sexta maior complicação comum da diabetes mellitus (Loe, 1993a). A diabetes parece interferir no metabolismo da matriz extracelular do periodonto, reduzindo a síntese de colagénio (Ramamurthy *et al.*, 1974) e aumentando a actividade colagénica (Golub *et al.*, 1978). Estudos histológicos, demonstraram que as paredes dos vasos gengivais se tornavam mais espessas nos doentes diabéticos (Seppala *et al.*, 1997). Complementarmente foram efectuados outros estudos, que sugeriam perda de “eficácia” do mecanismo de defesa, nomeadamente na quimiotaxia, fagocitose e apoptose contribuindo também desta forma para a destruição tecidual (Alpagot *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2006).

Shlossman e colaboradores estudaram o estado da saúde oral de uma tribo de índios, onde cerca de 40% tem diabetes não insulino-dependente. Neste estudo, na comparação

entre os diabéticos e os não diabéticos, concluiu-se que havia um aumento da prevalência da periodontite destrutiva nos indivíduos diabéticos, bem como uma incidência de 15% de diabéticos edêntulos (Shlossman *et al.*, 1990). Mais recentemente, em 2007, Lalla *et al.*, realizaram um trabalho de investigação onde compararam o estado periodontal de 350 crianças diabéticas controladas com idades entre os 6 e os 18 anos, com uma população semelhante mas saudável. Neste trabalho conclui-se que existe uma evidente interligação entre a diabetes e um maior risco de destruição periodontal. Estas alterações periodontais tornavam-se inicialmente evidentes na gengiva e em caso de não tratamento poderiam evoluir rapidamente para a destruição alveolar (Lalla *et al.*, 2007). As alterações nos vasos arteriais consistem no espessamento das paredes, degeneração da média e vacuolização. Tais alterações surgem nos tecidos periodontais dos doentes diabéticos, dos doentes com doença cardiovascular hipertensiva ou em ambos (Keene, 1975).

Das alterações microscópicas descritas, o espessamento da membrana basal, justifica uma atenção especial, porque esta alteração na parede dos vasos pode impedir o transporte de nutrientes necessários para a manutenção dos tecidos periodontais.

Sugere-se que as biópsias aos tecidos periodontais nomeadamente à gengiva pudessem ser uma ajuda importante na detecção de estados pré-diabéticos e diabéticos. Este procedimento também se utiliza embora actualmente seja uma situação em desuso (Carranza, 1997). A hiperglicémia induz inúmeras alterações no tecido vascular, que podem promover ou acelerar a arteriosclerose. As alterações são consequência de alterações patológicas observadas em doentes e/ou animais diabéticos: não degradação (glicosilação) das proteínas e lípidos; *stress* oxidativo; activação da proteína quinase C.

Estes três mecanismos encontram-se interligados. Por exemplo a hiperglicémia induz o *stress* oxidativo, promovendo tanto a formação de produtos finais da glicosilação como a activação da proteína quinase C (Aronson *et al.*, 2002).

As alterações microvasculares na diabetes merecem-nos alguma atenção. A hiperglicémia modifica o balanço metabólico promovendo diversas alterações nos tecidos vasculares. Dentro destas alterações destacam-se: glicosilação das apoproteínas (responsáveis pela captação de lípidos potencialmente aterogénicos), glicosilação do colagénio da parede dos vasos, aumento da agregação plaquetária com maior risco de tromboembolismo, aumento da permeabilidade vascular, alteração da actividade da proteína quinase. Estas mudanças vão provocar insuficiência vascular periférica, gerada

pela proliferação das células musculares e excesso subendotelial de proteínas do plasma, como a albumina, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e IgG.

Essas alterações que ocorrem no tecido vascular do diabético, alteram a difusão do oxigénio, transporte de nutrientes, migração de polimorfonucleares e monócitos/macrófagos e a difusão de anticorpos, desencadeando desequilíbrio fisiológico que aumenta a susceptibilidade dos tecidos à doença periodontal.

Nos indivíduos de idade avançada, são frequentes as alterações arterioscleróticas que se caracterizam pelo espessamento da íntima, estreitamento do lume, espessamento da média e hialinização da média e da adventícia, com ou sem calcificação, também em vasos responsáveis pela irrigação mandibular e maxilar (Quintarelli, 1957; Grant *et al.*, 1970; Sims *et al.*, 1996; D'Aiuto *et al.*, 2004; Mattila *et al.*, 2005).

A doença periodontal e a arteriosclerose aumentam com a idade (Bernick *et al.*, 1967, 1983), tendo-se formulado a hipótese de as alterações da circulação produzidas pelas mudanças vasculares poderem aumentar a susceptibilidade à doença periodontal (Barret, 1984).

Em animais de laboratório, a isquémia parcial durante mais de 10 horas, provocada pela oclusão arteriolar, produz alterações nas enzimas oxidativas e na actividade da fosfatase ácida e no conteúdo de glicogénio e lípidos do epitélio gengival (Itoiz *et al.*, 1969). No epitélio, surge necrose local, que evolui para ulceração, sendo o epitélio de união o mais afectado (Kennedy *et al.*, 1969). A duplicação do DNA fica notoriamente afectada, numa fase inicial, evoluindo, numa fase subsequente, a isquémia com hiperémia, acompanhada de alterações metabólicas e aumentando a síntese do DNA, proliferação do epitélio com aumento da sua espessura.

No nosso trabalho, a proliferação maciça da matriz extracelular é evidente na observação em MET, à custa da proliferação de quantidades muito significativas de colagénio, por parte dos fibroblastos do ligamento periodontal, que se encontram com características morfológicas de grande actividade (aumento do RER e das mitocôndrias) com abundante quantidade de fibras de colagénio intra e extracelular. Este aumento da quantidade da matriz extracelular pode explicar a aparente diminuição do número de núcleos de fibroblastos, encontrada no ligamento periodontal, em MO. Efectivamente tal aparente diminuição poderá dever-se apenas a um maior afastamento entre as células, provocado pelo aumento da matriz. De igual modo, também a tendência, significativa estatisticamente, para a diminuição da espessura do ligamento periodontal, que foi

encontrado, pode dever-se a este facto, aliado à destruição, também encontrada no tecido ósseo alveolar e a uma maior deposição de cimento.

Observámos em MET, no grupo de exposição a 13 semanas de RBF, fibroblastos com uma evidente actividade de síntese proteica de fibras e proteínas da matriz, bem como fibroblastos que apresentavam as cisternas do retículo dilatadas e cheias de material floculento. Estas células estão separadas por uma abundante quantidade de colagénio e fibras elásticas evidenciando a sua actividade. A proliferação anormal do tecido conjuntivo tem sido apontada, por muitos autores como uma consequência do RBF sobre os tecidos biológicos (Alves-Pereira *et al.*, 2004b; 2007; Castelo Branco *et al.*, 2004a). Marciniak *et al.*, descreveram fenómenos de proliferação da matriz extra-celular que levavam ao espessamento das estruturas cardíacas (fibrose) em indivíduos expostos ao RBF. Este espessamento, confirmado através de uma avaliação ecocardiográfica, ocorria em todas as válvulas cardíacas, no endocárdio e no pericárdio (Marciniak *et al.*, 1999). Mais recentemente, em 2005, Araújo *et al.*, confirmaram estas alterações também através de estudos ecocardiográficos. A fibrose também foi encontrada no parênquima pulmonar de indivíduos expostos ao RBF, tendo sido confirmada por tomografia computadorizada (Reis Ferreira *et al.*, 1999, 2004b, 2005b).

Os processos de fibrose são complexos, caracterizando-se por uma deposição anormal e abundante de componentes da matriz extracelular (Verrecchia *et al.*, 2004). Na sequência de estímulos crónicos ou inflamatórios (Samuel, 2005), ocorre a estimulação dos fibroblastos nos órgãos afectados (Verrecchia *et al.*, 2002). Esta estimulação fibroblástica também pode ocorrer na resposta a alterações neuro-endócrinas, na resposta a uma situação de isquémia ou até na senescência (Swynghedauw, 1999).

No caso do periodonto e à semelhança de outros órgãos estudados expostos a RBF, estamos perante um processo de proliferação fibrótica, na ausência de sinais inflamatórios (Oliveira *et al.*, 2005; Castelo Branco *et al.*, 2005a; da Fonseca *et al.*, 2006a; Oliveira *et al.*, 2007). A ausência de sinais inflamatórios torna esta situação clinicamente atípica e de diagnóstico complexo, pois todas as alterações ocorrem de uma forma “silenciosa”, sem sinais evidentes de alerta (Alves-Pereira *et al.*, 2007). Não sendo uma situação frequente a existência de fibrose na ausência de sinais inflamatórios, existe na literatura a descrição de processos patológicos semelhantes, como a fibrose pulmonar idiopática. Neste caso, existe proliferação dos fibroblastos e remodelação da matriz extracelular que conduz a alterações irreversíveis da arquitectura do pulmão (Selman *et al.*, 2001).

Castelo Branco (1999a), numa autópsia realizada a um doente com exposição profissional ao RBF, descreveu espessamento do pericárdio por formação de uma camada de tecido conjuntivo laxo dividindo a camada habitual de pericárdio fibroso. Este espessamento do pericárdio foi também encontrado, num estudo anatómico realizado primeiro em quatro doentes (Castelo Branco, 1999a) expostos a este tipo de ruído, submetidos a cirurgia de “bypass” coronário e mais tarde num grupo de doze doentes, que apresentaram a mesma alteração (Castelo Branco *et al.*, 2005a). Reis Ferreira *et al.* (1999) também encontraram fibrose no parênquima pulmonar de trabalhadores expostos ao RBF, tendo confirmado as lesões com Tomografia Computorizada.

Oliveira *et al.*, (2002b) adoptaram um protocolo diferente, recorrendo à gravação do ambiente sonoro de uma sala de trabalho de fiação de algodão. Este ambiente foi reproduzido em ratos Wistar de um e até aos sete meses, com uma média de quarenta horas semanais. Neste trabalho observou-se que a exposição ao ruído, causou a perda significativa de células ciliadas da traqueia, um aumento da densidade das células serosas, no sentido de equilibrar a perda referida.

No nosso grupo, a fibrose também foi encontrada em outros órgãos, em modelo animal, por exposição a um ambiente rico em RBF de alta intensidade em condições controladas, nomeadamente espessamento da submucosa gástrica com proliferação fibrótica em ratos expostos ao RBF (da Fonseca *et al.*, 2006b) e fibrose intensa, perilobular e intraparenquimatosa, na glândula parótida de ratos expostos ao RBF (Oliveira *et al.*, 2007).

Em síntese, podemos afirmar que as alterações que encontrámos nos animais sujeitos ao RBF, se assemelham às alterações provocadas pela terapêutica ortodôntica, às alterações induzidas pela doença periodontal/*stress*/diabetes e às alterações fibróticas provocadas em outros órgãos pelo RBF.

Podemos, em conclusão, afirmar que o RBF provocou alterações significativas no periodonto do rato Wistar.

V. CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O nosso estudo propôs-se caracterizar, sob o ponto de vista morfológico, as alterações do periodonto, nomeadamente do ligamento periodontal e osso alveolar em animais expostos ao RBF.

Confirmámos microscopicamente, ultra-estruturalmente e em imunohistoquímica a presença de alterações no osso alveolar e ligamento periodontal induzidas pelo RBF. As lesões são mais exuberantes nos grupos mais expostos ao RBF e parecem aumentar com o tempo de exposição.

O ligamento periodontal apresentou uma desorganização da sua rede fibrilar com fibras “desgarradas” principalmente do lado do osso alveolar e com espaços entre elas. O ligamento periodontal evidenciou um processo de fibrose progressiva e significativa, à custa da estimulação dos fibroblastos e da produção de grandes quantidades de colagénio. As lâminas de imunohistoquímica revelaram que esta fibrose ocorre com um evidente aumento de colagénio I e V. Esta alteração do colagénio I e V ficou demonstrada estatisticamente para o colagénio I, entre o grupo de controlo e os grupos de 3 semanas e 13 semanas de exposição ($p < 0,001$) e, no colagénio V, entre o grupo de controlo e o grupo de 13 semanas de exposição ($p < 0,004$).

Verificou-se não ocorrer alteração do colagénio IV.

O estímulo mecânico provocado pelo RBF, provocou necrose do osso alveolar, aumento da actividade osteoclástica e o aparecimento de um contorno irregular da superfície óssea. O cimento sofreu remodelação, com zonas de reabsorção, desmineralização e hipermineralização.

Ocorreu uma alteração na espessura do ligamento periodontal com significado estatístico na razão das áreas e na razão dos perímetros. Observou-se uma diminuição da espessura do ligamento periodontal entre a 3ª semana e a 9ª semana de exposição, à custa de destruição do osso alveolar por um lado e à custa de uma maior deposição de cimento (hipercimentose) por outro.

Em microscopia óptica, documentámos lesões nos vasos periodontais, designadamente proliferação focal da íntima com lesões do tipo obstrutivo e hialinização progressiva dos

vasos. Estas lesões têm tradução macroscópica com o aparecimento de imagens de obstrução, mau preenchimento dos vasos e interrupção do fluxo.

Podemos afirmar que as alterações acima descritas tendem a aumentar a sua intensidade com o tempo de exposição dos animais ao RBF e que o ligamento periodontal e o osso alveolar sofrem importantes alterações degenerativas com a exposição crónica ao RBF.

RESUMO

Os efeitos não auditivos do ruído são referidos há muito na literatura por numerosos investigadores.

Em Portugal, Castelo Branco foi o precursor na investigação sobre os efeitos sistémicos da exposição continuada ao ruído de baixa frequência (RBF) de alta intensidade. Estes estudos resultaram na publicação de inúmeros artigos onde se estabelecia a interligação entre o RBF e os efeitos não auditivos do ruído.

Recentemente outros investigadores interessaram-se pelas manifestações clínicas do RBF, cada vez mais presente na actual sociedade urbana. Os estudos destes investigadores conjugados com os de Castelo Branco levaram à definição da doença vibroacústica (DVA).

A DVA é uma patologia de natureza sistémica, causada por uma exposição prolongada (> 10 anos) a ruído de baixa frequência (RBF) ($\leq 500\text{Hz}$).

A DVA é considerada “não específica de órgão”, pelo que, todos os órgãos e sistemas são alvo potencial dos efeitos nocivos do RBF.

Também o periodonto, nomeadamente o ligamento periodontal, osso alveolar e o cimento, pela sua constituição anatómica, são um potencial alvo do RBF, como foi documentado por Haskell em 1975, por Olof *et al.* em 1977 e por Cortez-Pimentel em 1988.

Mais recentemente, o grupo de Nuno Grande do Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) e o nosso grupo do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), deram continuidade ao estudo da doença vibro-acústica, tendo encontrado resultados similares em diversos órgãos: fibrose dos vários tecidos, proliferação das matrizes extracelulares e alterações dos epitélios na ausência de processo inflamatório.

Os sons que estão habitualmente presentes nos ambientes que frequentamos são fenómenos complexos com variações de intensidade ao longo do espectro. Os instrumentos utilizados na maioria das avaliações para o ruído ambiental exprimem o som em valor numérico linear (dB), ou seja, exprimem o som sob a forma de intensidade. Estes aparelhos de medida, utilizam um filtro que filtra as frequências de forma a

mimetizar o ouvido humano. Os filtros utilizados podem ser de malha A, C, G ou outras, sendo os valores obtidos designados em, dB (A), dB (C), dB (G), dependendo do tipo.

A maioria das avaliações do ruído efectua-se com o filtro de malha A, porque a prioridade na protecção contra o ruído está centrada na patologia auditiva. Ao filtro “A-Weighting” corresponde uma curva de atenuação que cai rapidamente nas frequências inferiores a 500Hz e, consequentemente, desvaloriza a intensidade do som nesta faixa.

Os objectivos deste estudo foram caracterizar, sob o ponto de vista morfológico, as alterações do periodonto, em animais expostos ao RBF, nomeadamente:

- Confirmar microscopicamente, ultra-estruturalmente e por imunohistoquímica a presença de alterações no osso alveolar e ligamento periodontal induzidas pelo RBF.
- Caracterizar a evolução das alterações morfológicas do osso alveolar e do ligamento periodontal com o tempo de exposição ao RBF.
- Estudar macroscopicamente as alterações vasculares no osso alveolar e ligamento periodontal induzidas pelo RBF.

Foram utilizados 70 ratos albinos (*Mus norvegicus albinus*), linhagem Wistar, adultos, em semelhante número de género, com idades entre oito meses e um ano, divididos em 6 grupos:

Grupo	Número de Animais	Horas de exposição ao RBF (em contínuo)
gC	15	Em silêncio, para efeitos de controlo (0 horas)
g1	10	168h (1 semana)
g2	10	504h (3 semanas)
g3	10	840h (5 semanas)
g4	10	1512h (9 semanas)
g5	15	2184h (13 semanas)

Após os tempos de exposição os animais foram sacrificados com uma injeção intraperitoneal de ketamina. A remoção cirúrgica das mandíbulas foi efectuada de acordo com o protocolo cirúrgico para dissecação de estruturas cervicais, tendo sido utilizado procedimento semelhante para o grupo de controlo.

Efectuámos o estudo vascular em 5 animais nos grupos gC e g5. Observámos com lupa esterioscópica após injeção de contraste seguida de diafanização pela técnica de Spalteholz. Após observação macroscópica, fixaram-se as hemimandíbulas em formol tamponado a 10%, para observação em microscopia óptica. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e com tricrómico de Masson. Efectuámos, ainda, nas mandíbulas de animais dos grupos gC, g1, g2, g3, g4 e g5, imunomarcação para os colagénios IV e V e dos gC, g1, g2 e g5 imunomarcação para o colagénio I.

As outras hemimandíbulas foram fixadas em gluteraldeído e preparadas para observação por microscopia electrónica de transmissão.

Para o estudo morfométrico procedemos a uma análise de variância com um factor ordinal para averiguar se o tempo de exposição ao RBF (horas de exposição) tinha um efeito significativo sobre a variável dependente – área de conjuntivo do ligamento periodontal. Efectuámos, para esse efeito, medições para um valor ordinal absoluto, medindo a área do dente, mais concretamente o valor do área, perímetro e circularidade da porção mais externa da raiz do dente (consequentemente, corresponde ao limite do ligamento periodontal do lado dentário) e o valor da área, perímetro e circularidade da porção do ligamento periodontal que estava em contacto com o osso alveolar. Estas medições foram efectuadas no gC, g1, g2, g4 e g5. As medições foram efectuadas com um software de análise morfométrica.

O estudo morfométrico foi suplementado com medições nas lâminas de imunomarcação para o colagénio I no gC, g1, g2 e g5 e colagénios IV e V no gC, g1, g2, g3, g4 e g5. Procedemos à captação das imagens com microscópio óptico, que foram posteriormente analisadas no programa – Image J, para quantificar a variação de imunomarcação para os colagénios I, IV e V em função do tempo de exposição ao RBF.

No nosso estudo, verificámos por observação macroscópica vascular em grupos expostos ao RBF, a presença de interrupções do fluxo vascular resultantes de lesões de tipo obstrutivo e ainda a presença de vasos com um trajecto sinuoso. Encontrámos também a presença de vasos que parecem ter-se reaberto numa resposta à possível diminuição do fluxo, fruto da obstrução a montante.

Nas observações por microscopia óptica encontrámos uma destruição progressiva do ligamento periodontal com desorientação espacial das fibras, que aumenta com a exposição ao RBF, alterações no cimento, no osso alveolar e alterações vasculares.

Nas mandíbulas dos ratos Wistar expostos ao RFB, observámos uma progressiva desorientação espacial das fibras do ligamento periodontal, com o aparecimento de espaços entre as fibras. A desorientação espacial das fibras do ligamento periodontal ocorre desde o g1, tornando-se progressivamente mais evidente nos grupos com mais tempo de exposição ao RBF. A desorganização das fibras do ligamento periodontal, evidencia-se também na deficiente ancoragem que estas apresentam nomeadamente do lado do osso alveolar. As fibras do ligamento periodontal apresentam-se desgarradas da porção óssea, o que torna a articulação dente-osso menos eficaz. O ligamento periodontal apresenta ainda espaços vazios, com menor quantidade de fibras inseridas no osso alveolar. No grupo das fibras principais identificámos alterações na orientação e ancoragem nos grupos das fibras horizontais, das fibras oblíquas e das fibras inter-radiculares. As fibras oxitalâmicas (componentes das fibras elásticas) apresentavam-se mais alongadas e com menor diâmetro num trajecto longitudinal cruzando os feixes das fibras oblíquas de uma forma perpendicular. A desorganização e desorientação das fibras colagénias e elásticas foram bem visíveis. Parecia haver uma diminuição do número de núcleos de fibroblastos no ligamento periodontal nos grupos expostos ao RBF.

O cimento dos dentes dos animais expostos ao RBF também apresentava alterações em todos os grupos. Estas alterações traduziram-se por uma irregularidade do cimento, apresentando-se irregular em algumas zonas, com aumento da actividade dos cimentoclastos e mais espesso em outras. A presença de áreas de reabsorção, de desmineralização e hipermineralização foram uma constante nos grupos expostos ao RBF. Observámos frequentemente uma camada mais espessa e uniforme de novo cimento depositada sobre o cimento preexistente. Em contraste, nos casos onde não existia cimento preexistente, a camada de novo cimento apresentava-se mais fina e irregular, depositada directamente sobre a superfície da dentina. Nas zonas onde ainda não teria ocorrido a deposição de novo cimento, encontrámos lacunas de reabsorção associadas às irregularidades radiculares. Observámos ainda a presença de cimentículos (pequenas massas globulosas de cimento) dispersos no ligamento periodontal. Os cimentículos surgem a partir dos restos epiteliais calcificados devido a traumatismos, de fibras de Sharpey calcificadas, ou de vasos trombóticos calcificados dentro do ligamento periodontal.

A irregularidade do contorno do osso alveolar surge logo no g1 (1 semana de exposição ao RBF) e é também observada em todos os grupos expostos ao RBF. Observaram-se também fragmentos ósseos dispersos no ligamento periodontal. Estes fragmentos ósseos, que só foram visíveis nos grupos expostos ao RBF, foram sendo mais

numerosos à medida que o tempo de exposição aumentava e apareceram mais distantes do osso alveolar.

Houve um aparente aumento da actividade osteoclástica, visível pela presença de inúmeros osteoclastos em actividade nas lâminas com coloração de Tricrómico de Masson do g5. O tecido ósseo apresentava-se perifericamente irregular com osteoblastos e osteoclastos alojados em várias lacunas e a matriz óssea rica em osteócitos. Observaram-se também algumas linhas delimitando novas formações ósseas no g5, com um intenso processo de remodelação (linhas incrementais).

Encontrámos alterações nas paredes dos vasos periodontais, nomeadamente, vacuolização da parede, proliferação da íntima do tipo trombótico, hialinização dos vasos e congestão vascular, ectasia e hemorragia. Estas alterações surgem em todos os grupos expostos ao RBF, tornando-se mais frequentes e exuberantes no g5.

Nas observações por microscopia electrónica de transmissão (MET), encontrámos no g5 evidentes alterações, das quais salientamos, fibroblastos em grande actividade de síntese proteica de fibras e proteínas da matriz.

Observámos que os fibroblastos junto ao osso alveolar estão em grande actividade metabólica com remodelação do tecido conjuntivo encontrando-se no entanto também fibroblastos em sofrimento celular.

Os fibroblastos activos aparentavam aumento da actividade metabólica, o que corresponderia a um aumento da síntese da matriz extracelular do tecido conjuntivo. Observámos que estas células associadas a feixes de fibras colagénias, possuíam um nucléolo bem evidente e um RER e aparelho de Golgi bem desenvolvidos. Estas células estavam rodeadas de fibras de colagénio e de fibras elaunínicas e oxitalânicas do sistema elástico, o que está de acordo e espelha a sua notória actividade. Este facto pode justificar a aparente diminuição do número de núcleos observado por microscopia óptica, visto que as células se encontravam mais afastadas entre si pela abundante quantidade de colagénio extracelular.

A análise estatística dos dados referentes a razões de áreas e perímetros do limite interno e externo do ligamento periodontal sugere que o tempo de exposição ao ruído tem um efeito significativo sobre a razão de áreas. Verificou-se que os valores mais elevados foram observados à 1ª semana de exposição ao ruído, sendo que essa razão é

significativamente mais elevada do que a observada à 9ª semana de exposição ($p \leq 0,040$).

No que respeita aos efeitos da exposição sobre a razão de perímetros, os mesmos dados sugerem que, os valores mais elevados verificam-se à 3ª semana e os mais baixos à 9ª semana. É possível concluir que a razão de perímetros à 9ª semana é significativamente mais baixa que a observada à 1ª semana ($p \leq 0,041$) e à 3ª semana ($p \leq 0,010$).

No que diz respeito ao colagénio de tipo I, a análise morfométrica dos dados referentes ao nível de castanho não encontrou diferenças significativas no nível de castanhos entre o grupo de controlo e o grupo exposto a 1 semana de ruído ($p = 0,068$). Contudo, o grupo controlo apresentou níveis de coloração significativamente inferiores aos apresentados pelos grupos de 3 semanas ($p < 0,001$) e às 13 semanas ($p < 0,001$).

O colagénio de tipo IV não sofreu alteração em função do tempo de exposição.

Foram detectadas diferenças significativas no que respeita ao colagénio do tipo V, entre o grupo de controlo e o grupo de 13 semanas de exposição ao RBF ($p \leq 0,004$).

Este estudo comprovou que existe um conjunto de alterações morfológicas idênticas às que surgem noutros tecidos biológicos sujeitos ao RBF, nomeadamente a proliferação da matriz extracelular e alterações vasculares.

As alterações morfológicas encontradas são sugestivas de um processo patológico semelhante à periodontite, que se caracteriza por destruição, desorganização e desorientação das fibras do ligamento periodontal, um desequilíbrio a favor do processo osteoclástico e consequente presença de necrose óssea, a alteração do cimento e uma significativa presença de alterações vasculares. Pensamos que a interligação RBF-stress poderá ter um papel preponderante, já que também na periodontite este factor tem uma intervenção decisiva e comprovada.

Não foi possível identificar qual ou quais as lesões que surgem em primeiro lugar após a exposição ao RBF, subsistindo a dúvida se as alterações vasculares serão as primeiras a surgir e serem estas as responsáveis pelo surgimento das restantes, tal como acontece nas alterações vasculares no periodonto dos diabéticos, consequente aparecimento da periodontite ou quando o periodonto é sujeito a forças ortodônticas, provocando também estas alterações vasculares com consequentes repercussões no periodonto.

A proliferação da matriz extracelular foi bem documentada quer por microscopia óptica, quer por microscopia electrónica. O tipo de colagénio que prolifera é objectivamente o colagénio I e V .

ABSTRACT

The non-auditory effects of noise are long referred in the literature by many researchers.

In Portugal, Castelo Branco was the research pioneer on the systemic effects of continued exposure to low frequency noise (LFN). These studies resulted in the publication of numerous papers which established the interconnection between LFN and the non-auditory noise effects.

Recently, other researchers became concerned with the clinical effects of LFN, increasingly present in today's urban society. Studies from these researchers combined with those of Castelo Branco led to the definition of the vibroacoustic disease (VAD).

VAD is a condition of a systemic nature, caused by prolonged exposure (> 10 years) to low frequency noise (LFN) ($\leq 500\text{Hz}$).

VAD is considered "organ non-specific", so all organs and systems may suffer from the adverse effects of LFN.

Also the periodontium, including the periodontal ligament, alveolar bone and cement, by their anatomical composition, are a potential target of LFN, as documented by Haskell in 1975, by Olof *et al.* in 1977, and by Pimentel in 1988.

More recently, the group of Professor Nuno Grande from the Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar (ICBAS) and our group of the Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), have continued the study of vibroacoustic disease, and found similar results in several organs: tissue fibrosis, proliferation of extracellular matrix and changes in the epithelia, in the absence of inflammatory processes.

The sounds usually present in environments are complex phenomena with variations in intensity along the spectrum. The devices used in most environmental noise evaluations express noise through a linear numerical value (dB), i.e. describe the sound in the form of intensity. These measuring devices use a filter that filters the frequencies in order to mimic the human ear. The filters used can be of mesh A, C, G or others, with the values obtained designated as dB(A), dB(C), dB(G), depending on the type.

Most noise assessments are made with the mesh filter A, because the priority in the protection against noise is centered on auditory pathology. The filter "A-Weighting" corresponds to an attenuation curve that falls quickly in the frequencies below 500Hz, therefore devaluating the intensity of sound in this range.

The objectives of this study were to characterize, from a morphological point of view, the changes of the periodontium in animals exposed to the LFN, including:

- Microscopical confirm, ultrastructurally and immunohistochemically, the presence of changes in the alveolar bone and periodontal ligament induced by LFN.
- Characterize the evolution of morphological changes of alveolar bone and periodontal ligament with time exposure to LFN.
- Characterize macroscopically, the vascular changes in alveolar bone and periodontal ligament induced by LFN.

We used 70 albino rats (*Mus norvegicus albinos*), Wistar strain, adults, in similar number of gender, aged between eight months and one year, divided into 6 groups:

Group	Number of Animals	Hours of exposure to the LFN (continuous)
gC	15	0 hours, in silence, for control purposes
g1	10	168h (1 week)
g2	10	504h (3 weeks)
g3	10	840h (5 weeks)
g4	10	1512h (9 weeks)
g5	15	2184h (13 weeks)

After the exposure times the animals were sacrificed with an intraperitoneal injection of ketamine. Surgical removal of the jaw was performed according to the surgical protocol for dissection of cervical structures, with a similar procedure for the control group.

A vascular study was conducted in 5 animals from groups gC and g5. An observation was conducted with a stereomicroscope after injection of contrast followed by diaphanization with the Spalteholz technique. After macroscopic observation, the hemimandibles were

fixed in 10% buffered formalin for observation by light microscopy. Sections were stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stain. We also performed, in the specimens of groups gC, g1, g2, g3, g4 and g5, immunolabeling for collagen IV and V and in gC, g1, g2 and g5, immunolabeling for collagen I.

The other hemimandibles were fixed in glutaraldehyde and prepared for observation in transmission electron microscopy (TEM).

For the morphometric study, we undertook an analysis of variance with an ordinal factor to determine whether the time of exposure to LFN (hours of exposure) had a significant effect on the dependent variable - the conjunctive area of periodontal ligament. Within this purpose, measurements for a full ordinal value, measuring the area of the tooth, specifically the value of the area, perimeter and circularity of the most external portion of the root of the tooth (corresponding to the limits of the periodontal ligament) and the value of the area, perimeter and circularity of the portion of the periodontal ligament that was in contact with the alveolar bone. These measurements were made in gC, g1, g2, g4 and g5. Measurements were taken with a morphometric analysis software.

The morphometric study was supplemented with measurements of the sections immunolabeled for collagen I in gC, g1, g2 and g5 and collagen IV and V in gC, g1, g2, g3, g4 and g5. We captured the images with a light microscope, that were analyzed with the Image J software, to quantify the changes in immunolabeling for collagen I, IV and V as a function of time of exposure to LFN.

In our study, we found, while doing the vascular macroscopic observation in groups exposed to LFN, the presence of vascular flow interruption, resulting from obstructive lesions and the presence of tortuous vessels. We also found vessels that appeared to have reopened in response to the possible decrease in blood flow, resulting from the upstream obstruction.

In light microscopy observations we found a progressive destruction of the periodontal ligament with spatial disorientation of the fibers, which increased with exposure time to LFN, changes in cement, in the alveolar bone and vascular changes.

In the jaws of the rats exposed to LFN, we observed a progressive spatial disorientation of the fibers of the periodontal ligament, with the appearance of spaces between the fibers. This spatial disorientation occurs since g1, becoming progressively more evident in groups with longer exposure to LFN. The disorganization of the periodontal ligament fibers

is also evident in the deficient anchoring to the alveolar bone. The fibers of the periodontal ligament are detached from the bone portion, which makes the tooth-bone articulation less effective. The periodontal ligament also presents empty spaces, with less fibers inserted into the alveolar bone. In the main fibers group we identified changes in fiber orientation and anchoring for the horizontal, oblique and inter-root fiber groups. The disorganization and disorientation of collagen and elastic fibers were clearly visible. There seems to be a decrease in the number of fibroblast nuclei in the periodontal ligament in the groups exposed to LFN.

The cement of the animals exposed to LFN also showed changes in all groups. These changes included cement irregularities, with crumbling present in some areas, and with increased activity of cementoclasts and thickening in other areas. The presence of areas of reabsorption, of demineralization and hipermineralization, are a constant in the groups exposed to LFN. We often observed a thick and uniform layer of new cement deposited on the existing cement. In contrast, in cases where there was no existing cement the new layer of cement was more thin and irregular, deposited directly on the dentin's surface. In areas where still no new cement was deposited, we found gaps associated with radicular irregularities. It was also noted the presence of cementicles (small globulous masses of cement) scattered in the periodontal ligament. The cementicles develop from calcified epithelial remnants due to trauma, from calcified Sharpey fibers or calcified thrombotic vessels within the periodontal ligament.

The irregularity of the alveolar bone contour appears immediately in g1 (1 week of exposure to LFN) and was also observed in all groups exposed to LFN.

There were also fragments of dead or diseased bone scattered in the periodontal ligament. These were only visible in groups exposed to LFN, being more numerous as time of exposure increased and were more distant from the alveolar bone.

There is an apparent increase in osteoclast activity, visible by the presence of numerous osteoclasts in activity in the sections stained with Masson trichrome of g5.

The surface of bone tissue appears to be irregular, peripherally with osteoblasts and osteoclasts housed in various gaps and the bone matrix rich in osteocytes.

There were also some lines delimiting new bone formation in g5, with an intense remodeling process (incremental lines).

We found changes in periodontal vessel walls, including vacuolization of the wall, intimal proliferation of thrombotic type, hyalinization of blood vessels, vascular congestion, hemorrhage and ectasia. These changes occur in all groups exposed to LFN, becoming more frequent and exuberant in g5.

In TEM, we found obvious changes in g5 animals, specially, high fibroblast activity with increased matrix protein synthesis.

We found that fibroblasts near the alveolar bone were very active, remodeling connective tissue, but we also found fibroblasts in cellular suffering.

The active fibroblasts showed an increased metabolic activity, which should correspond to an increased synthesis of extracellular matrix from the connective tissue. We could see that these cells, associated with bundles of collagen fibers, have a clear nucleolus and a well developed RER and Golgi apparatus. These cells are surrounded by large quantities of collagen fibers and oxitalan fibers from the elastic system, which reflects the remarkable activity. This may explain the apparent decrease in the number of nuclei observed by optical microscopy since cells are more distant from each other by the increased amount of extracellular collagen.

Statistical analysis of data for areas ratios and perimeters of inner and outer limit of the periodontal ligament suggests that the time of noise exposure has a significant effect on the areas ratio. It was found that the highest values were observed after the first week of exposure to noise, and this ratio is significantly higher than the one observed after 9 weeks of exposure ($p = 0,040$).

With regard to the effects of exposure on the ratio of perimeters, the same data suggest that the highest figures occur at the 3rd week and the lowest at the 9th weeks. It is possible to conclude that the ratio of perimeters at the 9th week is significantly lower than that observed at 1st week ($p = 0.041$) and at the 3rd week ($p = 0.010$). With regard to collagen type I, the morphometric data related to the level of brown did not find significant differences in this level between the control group and the group exposed to 1 week of noise ($p = 0.068$). However, the control group had levels of stain color of collagen significantly lower than those presented by groups with 3 weeks ($p < 0.001$) and with 13 weeks ($p < 0.001$).

Collagen type IV did not change with exposure. With regard to collagen type V, the patterns of variation in the level of brown are somewhat different from those observed for

collagen type IV. Significant differences were detected between the staining of collagen in the control group and the group of 13 weeks of exposure to LFN ($p \leq 0.004$).

This study has showed that there are a number of morphological changes similar to the ones that appear in other biological tissues subjected to LFN, including the proliferation of extracellular matrix and vascular changes.

The morphological changes found are suggestive of a pathological process similar to periodontitis, characterized by destruction, disorganization and disorientation of the periodontal ligament fibers, an imbalance in favor of the osteoclastic process and the consequent presence of bone necrosis, alterations of cement and a significant presence of vascular changes. We believe the interconnection LFN-*stress* may have a role, since in periodontitis this factor has a decisive and proven intervention.

Unable to identify which lesions appear first, the question remains whether the vascular changes are the first to emerge and are responsible for the appearance of others, as with the vascular changes in diabetes and the consequent periodontitis or when the periodontium is subjected to orthodontic forces, also causing vascular changes consistent with consequences in the periodontium.

RÉSUMÉ

Les effets non auditifs du bruit sont mentionnés il y a déjà longtemps dans la littérature par nombreux chercheurs.

Au Portugal, Castelo Branco a été le précurseur en ce qui concerne la recherche sur les effets systémiques du bruit de basse fréquence (BBF) de haute intensité. Ces études ont conduit à la publication de plusieurs articles où on peut établir une liaison proche entre le BBF et les effets non auditifs du bruit.

Plus récemment d'autres chercheurs se sont intéressés par les manifestations cliniques du BBF, de plus en plus présentes dans la société urbaine actuelle. Ces études combinées avec ceux de Castelo Branco ont amené à la définition de la maladie vibroacustique (MVA).

La MVA est une pathologie de nature systémique due à l'exposition prolongée (> 10 années) au bruit de basse fréquence (BBF) (≤ 500 Hz).

La MVA est considérée "organe non spécifique", ainsi tous les organes et systèmes sont exposés aux effets funestes du BBF.

Également le parodonte, y compris, le ligament periodontal, l'os alvéolaire et le ciment, par sa constitution anatomique, est une cible potentielle du BBF, comme a été documenté par Haskell en 1975, par Olof et al en 1977 et par Pimentel en 1988.

Plus récemment, le groupe du professeur Dr. Nuno Grande de l'Institut supérieur de Sciences Biomédicales de Abel Salazar (ICBAS) et notre groupe de l'Institut Supérieur de Sciences de la Santé Egas Moniz (ISCSEM) ont continué l'étude de la maladie Vibroacustique et résultats semblables ont été retrouvés en divers organes : fibrose des tissus, prolifération de les matrices extracellulaires et des modifications dans les épithéliums en l'absence de procédé inflammatoire en plusieurs tissus biologiques.

Les sons qui sont présents par habitude dans notre milieu se sont phénomènes complexes avec des changements de d'intensité au long du spectre. Les instruments utilisés dans la plupart des évaluations du bruit ambiant expriment le son en une valeur numérique linéaire (dB), c'est à dire, expriment le son sous la forme d'intensité. Ces appareils de mesure utilisent un filtre qui "dépure" les fréquences de façon à mimétiser

l'oreille humaine. Pour ceci on peut utiliser des filtres de maille A, C, G ou d'autres, étant les valeurs obtenues désignées en dB (A), dB (C), dB (G), en fonction du type.

La plupart des évaluations du bruit est fait avec le filtre de maille A, parce que la priorité dans la protection contre le bruit est centrée dans la pathologie auditive. Au filtre " A-Weighting" correspond une courbe d'atténuation qui tombe rapidement dans fréquences inférieures à 500 Hz et donc dévalorise l'intensité du son dans cette bande.

Les objectifs de l'étude ont été caractériser, sous le point de vue morphologique, les changements du parodonte, en animaux exposés au BBF, nommément :

- Confirmer au microscope, ultra structurellement et en immunohistochimie, la présence d'altérations de l'os alvéolaire et du ligament periodontal induites par le BBF.
- Caractériser l'évolution des changements morphologiques de l'os alvéolaire et du ligament periodontal selon le temps d'exposition au BBF.
- Étudier macroscopiquement les changements vasculaires à l'os alvéolaire et au ligament periodontal induites par le BBF.

On a utilisé 70 souris albinos, lignage Wistar, adultes, en égal quantité au niveau du genre, avec ages entre 8 mois e 1 année, divisés en 6 groupes :

Groupes	Nombre d'animaux	Heures d'exposition à la BBF
gC	15	0 h, en silence, pour contrôle
g1	10	168 h (1 semaine)
g2	10	504 h (3 semaines)
g3	10	840 h (5 semaines)
g4	10	1512 h (9 semaines)
g5	15	2184 h (13 semaines)

Après l'exposition, les animaux ont été sacrifiés, en leur administrant une piqûre intraperitoneal de kétamine. Le remuement chirurgical des mandibules a été réalisé selon le protocole chirurgical de la dissection des structures cervicales, on a utilisé procédé similaire pour le groupe contrôle.

On a réalisé une étude vasculaire en 5 animaux des groupes C et 5. On les a observé avec une loupe stereoscopique après piqûre de contraste suivi de diaphanization par la

technique de Spalteholz. Après l'observation macroscopique on a fixé, dans le formol tamponné à 10%, les hemimandibles, pour l'observation à microscopie optique. Les lames furent colorées avec Hematoxiline-éosine et avec Trichromique de Masson. On a encore fait dans les mandibules des animaux des groupes C, 1, 2, 3, 4 et 5 immunomarquage pour les collagènes IV et V et pour ceux des groupes C, 1, 2, 5 immunomarquage pour le collagène I.

Les autres hemimandibles ont été fixées en glutaraldehyde et préparés pour l'observation en microscopie Electronique de Transmission.

Pour l'étude morphométrique on a entrepris une analyse de variation avec un facteur ordinal pour déterminer si le temps d'exposition à la BBF (heures d'exposition) avait un effet significatif sur la variable dépendante – domaine de conjonctif du ligament periodontal. Dirigé par ce fin on a fait des mesures pour une valeur ordinale absolue, en mesurant la surface de la dent, en particulier la valeur de la surface, le périmètre et la circularité de la partie la plus externe de la racine de la dent (ce qui correspond à la limite du ligament periodontal du coté dentaire) et la valeur de la surface, le périmètre et la circularité de la partie du ligament periodontal qui a été en contact avec l'os alvéolaire. Ces mesures ont été effectuées dans les groupes C, 1, 2, 4 ET 5. Celles-ci ont été effectuées avec un programme informatique d'analyse morphométrique.

L'étude morphométrique a été complété par des mesures dans les lames d'immunomarquage pour le collagène I aux groupes C, 1, 2 et 5 et pour les collagènes IV et V aux groupes C, 1, 2, 3, 4 et 5. On a capturé les images avec le microscope optique et après ces images ont été analysées à l'aide du programme – Imaje J – qui a permit de quantifier la variation de l'immunomarquage pour les collagènes I, IV, V par rapport au temps d'exposition à la BBF.

Dans notre étude on a constaté pendant l'observation macroscopique vasculaire dans les groupes exposés à la BBF, l'existence, d'interruptions dans le flux vasculaire, résultant de lésions du type obstructives e aussi l'existence des vaisseaux avec un parcours sinueux. On a aussi trouvé quelques vaisseaux qui semblent être rouverts comme une possible réponse à la diminution du flux à cause de l'obstruction en amont.

Dans les observations en microscopie optique on a trouvé une destruction progressive du ligament periodontal avec désorientation spatiale des fibres qui augmentent avec l'exposition à la BBF et aussi des changements dans le ciment, dans l'os alvéolaire et des changements vasculaires.

Dans les mandibules des souris Wistar exposées au BBF on a constaté une progressive désorientation spatiale des fibres du ligament periodontal avec l'apparition de quelques espaces entre eux. Cela arrive depuis le groupe 1, étant de plus en plus évidente dans les groupes dont l'exposition aux BBF a été plus longue. La désorganisation spatiale des fibres du ligament periodontal est mise en évidence aussi dans le déficient ancrage que celles-ci présentent notamment du côté de l'os alvéolaire. Les fibres du ligament periodontal se présentent détournées de la partie osseuse ce qui rend l'articulation dents-os moins efficace. Le ligament periodontal présente encore espaces vides avec moins quantité de fibres insérées dans l'os alveolaire. Dans le groupe des fibres principales on identifie des changements au niveau de l'orientation et de l'ancrage dans les groupes de fibres horizontales, obliques et interradiculaire. Les fibres d'oxitalan (fibres élastiques) se présentent d'une façon plus allongée et avec un diamètre plus petit dans le parcours longitudinal croisant les faisceaux des fibres obliques d'une forme perpendiculaire. La désorganisation bien comme la désorientation des fibres de collagène et des fibres élastiques sont clairement visibles. Il semble y avoir une diminution du nombre de noyaux de fibroblastes dans le ligament periodontal dans les groupes exposés à la BBF.

Le ciment des dents des animaux exposés à la BBF présente également des changements dans tous les groupes analysés. Ces changements se traduisent par une irrégularité du ciment, ceci se présente effrité en certaines zones, avec l'augmentation de l'activité des cimentoclastes, et plus épais dans autres zones. La présence de surfaces de réabsorption, de déminéralisation et d'hyper minéralisation arrive beaucoup de fois dans les groupes exposés à la BBF. On a aussi observé une pellicule plus dense et uniforme de nouveau ciment qui s'est déposé sur le ciment préexistant. Par contre dans les cas où il n'existe aucun ciment la pellicule du nouveau ciment s'est présentée plus fine et irrégulière, déposée directement sur la surface de la dentine. Dans les zones où n'existait encore la déposition de nouveau ciment on a trouvé des lacunes de réabsorption associées aux irrégularités radiculaires. On a également remarqué l'existence de cimentícules (petites masses globuleuses de ciment) dispersés dans le ligament periodontal. Ces cimentícules arrivent à partir de restes épithéliaux calcifiés due à un traumatisme ; de fibres de Sharpey calcifiées ou de vaisseaux thrombotique calcifiées en dedans du ligament periodontal.

L'irrégularité du contour de l'os alvéolaire apparaît au groupe 1 (1 semaine d'exposition à la BBF) et peut être aussi observé en tous les groupes exposés à la BBF.

On a aussi observé séquestres osseux dans le ligament periodontal. Ceux-ci qui sont seulement visibles dans les groupes exposés à la BBF seront plus nombreux depuis

l'augmentation du temps d'exposition et ces séquestres osseux apparaissent plus éloignés de l'os alvéolaire.

Il y a un apparent accroissement de l'activité osteoclastique, visible par la présence de nombreux osteoclastes en activité dans les lames colorées avec Trichromique de Masson du groupe 5.

Le tissu osseux se présente périphériquement irrégulier avec osteoblastes et osteoclastos logés en plusieurs lacunes et la matrice osseuse riche en osteocytes.

On peut aussi observer quelques lignes délimitant des nouvelles formations osseuses dans le groupe 5 avec un intense procédé de remodelage (lignes d'accroissement).

On a constaté quelques modifications dans les parois des vaisseaux periodontaux, notamment une vacuolisation de la paroi, une prolifération de l'intime du type thrombotique, une hyalinisation des vaisseaux bien comme une congestion vasculaire, ectasie et hémorragie. Ces modifications arrivent en tous les groupes exposés à la BBF, de plus en plus fréquentes et exubérantes dans le groupe 5.

Dans l'observation de la microscopie électronique de transmission (MET) on a trouvé sur le groupe 5 évidents changements ainsi comme fibroblastes en grande activité de synthèse protéique des fibres et protéines de la matrice.

On a constaté que les fibroblastes à côté de l'os alvéolaire ont une grande activité métabolique avec un remodelage du tissu conjonctif mais on peut aussi trouver des fibroblastes en souffrance cellulaire.

Les fibroblastes actifs semblent avoir une augmentation de l'activité métabolique ce que correspondrait à un accroissement de la synthèse de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif. On peut voir que ces cellules, associées à des faisceaux de fibres de collagène, ont un nucléole bien évident et un RER et un appareil de Golgi bien développés. Ces cellules sont entourées par des fibres de collagène et de fibres élastiques et oxydables du système élastique, cela reflète sa remarquable activité. Cela peut aussi expliquer la diminution apparente du nombre de noyaux observés en microscopie optique une fois que les cellules se trouvent plus éloignées à cause de l'abondante quantité de collagène extracellulaire.

L'analyse statistique des données relatives à l'aire et des périmètres du limite interne et externe du ligament périodontal suggère que le temps d'exposition au bruit a un

effet significatif sur la raison des aires. On a constaté que les valeurs plus élevées ont été observées pendant la première semaine d'exposition au bruit, sachant que cette raison est significativement plus élevée que celle observée à la 9^{ème} semaine d'exposition ($p=0,040$). Quant aux effets de l'exposition sur la raison des périmètres, les mêmes données suggèrent que les valeurs plus élevées se sont vérifiées à la 3^{ème} semaine et les plus bas à la 9^{ème} semaine. Il est possible conclure que la raison des périmètres est nettement inférieure à celle observée soit à la 1^{ère} semaine ($p=0,041$) soit à la 3^{ème} semaine ($p=0,010$).

En ce qui concerne le collagène de type I, l'analyse morphométrique des données concernant au niveau des bruns on a constaté qu'il n'y a pas considérables différences entre le groupe de contrôle et le groupe exposé à 1 semaine de bruit ($p=0,068$). Toutefois, le groupe de contrôle a présenté des niveaux de coloration des couleurs du collagène sensiblement inférieurs à ceux présentés par les groupes de 3 semaines ($p<0,001$) et de 13 semaines ($p<0,001$).

Le collagène type IV n'a pas eu aucun changements en fonction du temps d'exposition.

En ce qui concerne le collagène type V, les modèles de la variation du niveau de brun sont un peu différents de ceux observés pour le collagène type IV.

Les différences essentielles ont été détectés parmi la coloration du collagène du groupe de contrôle et le groupe qui a été exposé au BBF pendant 13 semaines ($p\leq0,004$).

Cette étude a montré qu'il existe un certain nombre de modifications morphologiques similaires à celles qui arrivent dans d'autres tissus biologiques soumis à la BBF, y compris la prolifération de la matrice extracellulaire et les changements vasculaires.

Les changements morphologiques observés sont évocateurs d'un procédé pathologique semblable à la periodontie, caractérisée par la destruction, la désorganisation et la désorientation des fibres du ligament periodontal, un déséquilibre en profit du procédé osteoclastique et la conséquente existence d'une nécrose osseuse, le changement du ciment et une importante présence de changements vasculaires. On pense que la liaison réciproque BBF-stress pourrait avoir un rôle prépondérant, une fois qu'aussi dans la periodontie cette liaison a une intervention décisive et déjà confirmé.

Il n'était pas possible de déterminer quel est la liaison ou les liaisons qui peuvent apparaître en premier lieu après l'exposition à la BBF, reste encore la doute de savoir si les changements vasculaires seront les premiers à émerger et à être responsables par

l'apparition des autres, ainsi comme dans les modifications vasculaires dans le parodonte des diabétiques, consécutive apparition de la periodontie ou quand le parodonte est soumis à des forces orthodontiques, également à l'origine de modifications vasculaires avec répercussion dans le parodonte.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Águas AP, Grande NR, Carvalho E (1991) Inflammatory macrophages contain high amounts of intravesicular ferritin and are associated with pouches of connective tissue. *Am J Anat* 189: 89-96.

Águas AP, Esaguy N, Grande N, Castro AP, Castelo Branco NAA (1999a) Effect of low frequency noise exposure on BALB/c mice splenic lymphocytes. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A128-A131.

Águas AP, Esaguy N, Grande N, Castro AP, Castelo Branco NAA (1999b) Acceleration of lupus erythematosus-like processes by low frequency noise in the hybrid NZB/W mouse model. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A132-A136.

Albandar JM (2002) Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol* 2000 29: 177-206.

Albuquerque e Sousa J, Dinis da Gama A, Macedo M, Cássio I, Pimenta FM, Castelo Branco NAA (1991) Carotid angiodynographic studies in individuals with the whole-body vibration disease. *Rev Port Med Militar* 39: 63-65.

Alejandro AG, Maria AE, Maria BG, Máximo JG (2003) Mandibular bone remodeling under a choline-deficient diet: a histomorphometric study in rats. *J Periodontol* 74: 831-837.

Alpagot T, Silverman S, Lundergan W, Bell C, Chambers DW (2001) Crevicular fluid elastase levels in relation to periodontitis and metabolic control of diabetes. *J Periodontal Res* 36: 169-174.

Altman GH, Horan RL, Martin I, Kaplan DL (2002) Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*; 16: 270-272.

Alvarez JI, Ross FP, Athanasou NA, Blair HC, Greenfield EM, Teitelbaum SL (1992) Osteoclast precursors circulate in avian blood. *Calcif Tissue Int* 51: 48-53.

Alves-Pereira M (1999) Noise-Induced extra-aural pathology: a review and commentary. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A7-A21.

Alves-Pereira M, Joanaz de Melo J, Marques MC, Castelo Branco NAA (2004a) Vibroacoustic disease – the response of biological tissue to low frequency noise. Proceedings of the Eleventh International Meeting on Low Frequency Noise and Vibration and its Control: 295-308.

Alves-Pereira M, Joanaz de Melo J, Castelo Branco NAA (2004b) Public transportation and low frequency noise: a health hazard? Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration: 1761-1766.

Alves-Pereira M, Joanaz de Melo J, Motlyewski J, Kotlicka E, Castelo Branco NAA (2004c) Biomedical research, legislation and the low frequency noise contaminant. Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration: 1729-1736.

Alves-Pereira M (2005a) And again low frequency noise – a possible solution. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Alves-Pereira M, Marques MC, Castelo Branco NAA (2005b) Biological mechanisms and targets of low frequency noise. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Alves-Pereira M, Fragata J, Monteiro M, Silva DS, Castelo Branco NAA (2005c) The pericardium in vibroacoustic disease III – a new structure. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Alves-Pereira M, Motylewski J, Kotlicka E, Castelo Branco NAA (2005d) Low frequency noise legislation. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2007) Vibroacoustic Disease: biological effects of infrasound and low frequency noise explained by mechanotransduction cellular signaling. Prog Biophys Mol Biol 93: 256-279.

Anisman H, Baines MG, Berczi I (1996) Neuroimmune mechanisms in health and disease: 1 Health. Canadian Medic Association Journal 155: 867-874.

Anthony A, Harclerode JE (1959) Noise stress in laboratory rodents: effects of chronic noise exposures on sexual performance and reproductive function of guinea pigs. J Acoust Soc Am 31: 1437-1442.

Araújo MG, Berglundh T, Lindhe J (1997) On the dynamics of periodontal tissue formation in degree III furcation defects. An experimental study in dogs. J Clin Periodontol 24: 738-746.

Araújo A, Pais F, Lopo Tuna JMC, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2001) Echocardiography in noise-exposed flight crew. Internoise 2001, The Hague, Holland: 1007-1110

Araújo A, Alves-Pereira M, Joanaz de Melo J, Castelo Branco NAA (2004) Environmentally-induced vibroacoustic disease in a suburban family. Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration.

Araújo A, Carranca J, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Echocardiography in vibroacoustic disease. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Aronson D, Rayfield JE (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. Cardiovasc Diabetol 1: 1-10.

Attal U, Blaushild N, Brin I, Steigman S (2001) Histomorphometric study of the periodontal vasculature during and after experimental tipping of the rat incisor. Arch Oral Biol 46: 891-900.

Aukhil I (2000) Biology of wound healing. Periodontology 2000 22: 44-50.

Babisch W (2000) Traffic noise and cardiovascular disease: epidemiological review and synthesis. Noise & Health 2: 9-32.

Babisch W, Beule B, Schust M, Kersten N, Ising H (2005) Traffic noise and risk of myocardial infarction. Epidemiology 16: 25-32.

Baker E, Crook G, Schwabacher E (1961) Personality correlates of periodontal disease. J Dental Res 40: 396-403.

Bartold PM, Kylstra A, Lawson R (1994) Substance-P: An immunohistochemical and biochemical study in human gingival tissue. A role for neurogenic inflammation? J Periodontol 65: 1113-1121.

Barrett AM, Stockham MA (1963) The effect of housing conditions and simple experimental procedures upon the corticosterone level in the plasma of rats. J Endocrinol 26: 97-105.

Barret AP (1984) Gingival lesions in leukemia. A classification. J Periodontol 55: 585-588.

Batanov GV (1995) Characteristics of etiology of immediate hypersensitivity in conditions of exposure to infrasound. (abstract) Radiats Biol Radioecol 35: 78-82.

Baumrind S, Buck DI (1970) Rate changes in cell replication and protein synthesis in the periodontal ligament incident to tooth movement. Am J Orthod 57: 109-113.

Berglund B, Nilsson ME (1997) Empirical issues concerning annoyance models for combined community noise. Inter Noise 2: 1053-1058.

Berglund B, Lindvall T, Schwela D (Editors) (1999) WHO Guidelines for Community Noise- Chapter 4. WHO, Geneva.

Berglundh T, Lindhe J, Sterrett J (1991) Clinical and structural characteristics of periodontal tissues in young and old dogs. J Clin Periodontol 18: 616-623.

Bergstrom J (1992) Vascular reaction in plaque induced gingivitis: A quantitative approach. J Periodont Res 27: 604-608.

Berkovitz KBB (2004) Periodontal ligament: Structural and clinical correlates. Dental Anatomy Dental Update 31: 46-54.

Bernick S (1967) Age changes in the blood supply to human teeth. J Dent Res 46: 544-549.

Bernick S, Sobin SS, Paule WJ (1983) Changes in the microvasculature and interstitium of aged human mandibles and maxillae. Gerodontology 1: 9-14.

Bletkin NA, Postnov SS (2005) The infrasound influence on human organism and some proposals on infrasound disease therapy and new infrasound norms creation. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Bluhm LG, Berglind N, Nordling E, Rosenlund M (2007) Road traffic noise and hypertension. *Occup Environ Med* 64: 122-126.

Bohne BA, Harding GW (2000) Degeneration in the cochlea after noise damage. Primary versus secondary events. *Amer J Otology* 21: 505-509.

Bonakdar MPS, Barber PM, Newman HN (1997) The vasculature in chronic adult periodontitis: a qualitative and quantitative study. *J Periodontol* 68: 50-58.

Borghesio A (1955) Considerations on various histological aspects of hypercementosis. *Rass Odontotec* 36 (2): 96-101.

Borrell LN, Papapanou PN (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* (6, suppl): 132-158.

Bourgier C, Milliat F, Francois A, Vozenin-Brotons MC (2005) Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 54: 336-343.

Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P (1996) Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 104: 327-334.

Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK, Pabst R, Von Hoersten S (2001) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodont Res* 36: 295-300.

Broch J (1973) The application of the Bruel & Kjaer measuring systems to acoustic noise measurements. Bruel & Kjaer Edition, Soborg, Denmark.

Brown JE, Thompson RN, Folk ED (1975) Certain non-auditory physiological responses to noise. *Am Ind Hyg Assoc J* 36: 285-291.

Buckley LA, Crowley A (1984) Longitudinal study of untreated periodontal disease. *J Clin Periodont* 11: 523-530.

Busnel RG, Lehmann AG (1978) Infrasound and sound: differentiation of their psychophysiological effects through use of genetically deaf animals. *J Acoust Soc Am* 63: 974-977.

Carnicelli MVF (1994) Exposição ocupacional à vibração transmitida através das mãos: uma revisão sobre o distúrbio vascular periférico. Rev Bras Saúde Ocup 22: 35-44.

Carranza FA, Newman MG (1997) Periodontia Clínica. Guanabara, 7ª edição.

Castelo Branco NAA, Marvão J, Entrudo A (1984) As vibrações e o ruído na origem da hipo e da hipersensibilidade acústicas numa população fabril. Rev Port Med Militar 32: 17-20.

Castelo Branco NAA (1988a) Doença sistémica das vibrações. Considerações prévias. Rev Port Med Militar 36: 68-71.

Castelo Branco NAA (1988b) Doença sistémica das vibrações. Perspectivas. Rev Port Med Militar 36: 143-144.

Castelo Branco NAA (1988c) Doença sistémica das vibrações. Alguns aspectos médico-legais. Rev Port Med Militar 36: 128-133.

Castelo Branco NAA (1991) Whole body noise and vibration disease. Rev Port Med Militar 39: 49-62.

Castelo Branco NAA (1999a) A Unique case of vibroacoustic disease: A tribute to an extraordinary patient. Aviat Space Environ Med 70 (3, suppl): A27-A31.

Castelo Branco NAA (1999b) The clinical stages of vibroacoustic disease. Aviat Space Environ Med 70 (3, suppl): A32-A39.

Castelo Branco NAA (1999c) Echocardiographic evaluation in 485 aeronautical workers exposed to different noise environments. Aviat Space Environ Med 70 (3, suppl): A46-A53.

Castelo Branco NAA, Rodriguez E (1999) The vibroacoustic disease – An emerging pathology. Aviat. Space Environ Med 70 (3, suppl): A1-A6.

Castelo Branco NAA, Águas AP, Sousa Pereira A, Monteiro E, Fragata JIG, Tavares F, Grande NR (1999a) The human pericardium in vibroacoustic disease. Aviat Space Environ Med 70 (3, suppl): A54-A62.

Castelo Branco NAA, Rodriguez E, Alves Pereira M, Jones DR (1999b) Vibroacoustic disease: some forensic aspects. Aviat Space Environ Med 70 (3, suppl): A145-A151.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira MMS, Martins dos Santos J, Monteiro E (2003) SEM and TEM study of rat respiratory epithelia exposed to low frequency noise. In Mendez Vilas A (Ed) Science and Technology Education in Microscopy: An Overview. Formatex, Badajoz, Spain. Vol II 505-533.

Castelo Branco NAA, Fragata J, Martins AP, Monteiro E, Alves-Pereira M (2004a) The pericardial cellular death in vibroacoustic disease. Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration: 1753-1760.

Castelo Branco NAA, Monteiro E, Costa e Silva A, Martins dos Santos J, Reis Ferreira JM, Alves-Pereira M (2004b) The lung parenchyma in low frequency noise exposed Wistar rats. Rev Port Pneumol X: 77-85.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira M (2004a) Vibroacoustic Disease – What is known to date. Proceedings of the Eleventh International Meeting on Low Frequency Noise and Vibration and its Control: 269-284.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira M (2004b) Vibroacoustic Disease – Current Concepts. Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration: 1775-1782.

Castelo Branco NAA (2005a) The clinical stages of vibroacoustic disease for health professionals. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA (2005b) Mutagenesis and malignancy in vibroacoustic disease. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA, Fragata J, Martins AP, Monteiro M, Alves-Pereira M (2005a) The pericardium in vibroacoustic disease I – morphological features. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA, Fragata J, Marques MC, Monteiro M, Alves-Pereira M (2005b) The pericardium in vibroacoustic disease II – cellular death pathways. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA, Alves-Pereira M, Araújo A, Reis Ferreira J, Joanaz de Melo J (2005c) Environmental vibroacoustic disease – an example of environmental low frequency noise exposure. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA, Rodriguez E, Alves-Pereira M (2005d) Forensic features in vibroacoustic studies. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castelo Branco NAA, Reis Ferreira J, Marques MC, Alves-Pereira M (2005e) Auto-immune disorders in vibroacoustic disease. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Castro AP, Águas AP, Grande N, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999) Increase in CD8 + and CD4 + lymphocytes in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A141-A144.

Chaqour B, Goppelt-Struebe M (2006) Mechanical regulation of the Cyr61/Ccn 1 and Ctgf/Ccn 2 proteins. *Febs J*; 273: 3639-49.

Chantawiboonchai P, Warita H, Ohya K, Soma K (1998) Confocal laser scanning-microscopic observations on the three-dimensional distribution of oxytalan fibers in mouse periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 43: 811-817.

Chenu C, Colucci S, Grano M, Zigrino P, Barattolo R, Zambonin G, Baldini N, Vergnaud P, Delmas PD, Zallone AZ (1994) Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *J Cell Biol* 127: 1149-1158.

Cho MI (1995) Periodontal ligament and cementum. *Adv Dent Res* 9: 17-21.

Cho MI, Garant PR (2000) Development and general structure of the periodontium. *Periodontology* 2000 24: 9-27.

Clark WB, Loe H (1993) Mechanisms of initiation and progression of periodontal disease. *Periodontology* 2000 2: 72-82.

Clore JN, Cohen IK, Diegelmann RF (1979) Quantitation of collagen types I and III during wound healing in rat skin. *Proc Soc Exp Biol Med*; 161: 337-40.

Coelho BJL, Ferreira A, Serrano J, Castelo Branco NAA (1999) Noise assessment during aircraft run-up procedures. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A22-A26.

Cogen RB (1983) Leukocyte function in the etiology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 54: 402-407.

Cohen A (1976) The influence of a company hearing conservation program on extra-auditory problems in workers. *J Safety Res* 4: 146 -162.

Cohen DW, Friedman LA, Shapiro J, Kyle GC, Kyle S (1970) Diabetes mellitus and periodontal disease: Two year longitudinal observations. Part I. *J Periodontol* 41: 709-714.

Cohen-Cole SA, Cogen RB, Stevens A, Freeman A (1983) Psychiatric psychosocial and endocrine correlates of acute necrotizing ulcerative gingivitis (trench mouth): A preliminary report. *Psychiatric Medicine* 1: 215-225.

Cole JN, Mohr GC, Guild EG, von Gierke HE (1966) The effects of low frequency noise on man as related to the Apollo Space Program. *AMRL Memorandum B-66*.

Colin J, Gilbert A, Chikhani PM (1957) Les aerodontalgies. *Med Aeronaut* 12: 233-247.

Colleoni, N (1981) Ruídos industriais, perturbações auditivas e sua profilaxia. *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional* 36: 77-80.

Comuzzie AG, Steele DG (1989) Enlarged occlusal surfaces on first molars due to severe attrition and hypercementosis: examples from prehistoric coastal populations of Texas. *Am J Phys Anthropol* 78: 9-15.

Cooper LF (2000) Systemic effectors of alveolar bone mass and implications in dental therapy. *Periodontol* 2000 23: 103-109.

Corruccini RS, Jacobi KP, Handler JS, Aufderheide AC (1987) Implications of tooth root hypercementosis in a Barbados slave skeletal collection. *Am J Phys Anthropol* 74: 179-84.

Crespo F, Ferreira ACN, Castelo Branco MSNNA, Castelo Branco NAA (1988) Doença sistêmica das vibrações. Estudo da coagulação e hemostase em doentes com a DSV. *Rev Port Med Militar* 36: 86-89.

Davidovitch Z (1991) Tooth movement. *Crit Oral Biol Med* 2:411-50.

D'Aiuto F, Ready D, Tonetti MS (2004) Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk. *J Periodontal Res* 39: 236-241.

Davies HW, Teschke K, Kennedy SM, Hodgson MR, Demers PA (2005) Occupational exposure to noise and mortality from acute myocardial infarction. *Epidemiology* 16: 25-32.

Davis MC, Zautra AJ, Younger J, Motivala SJ, Attrep J, Irwin MR (2008) Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: implications for fatigue. *Brain Behav Immun* 22: 24-32.

Deinzer R (1999) Increase of crevicular interleukin 1b under academic stress at experimental gingivitis sites and at sites of perfect oral hygiene. *J Clin Periodontol* 26: 1-8.

De Marco TJ (1976) Periodontal emotional stress syndrome. *J Periodontol* 47: 67-68.

Deniz K, Roland M, Hamit B, Omer G, Ozay GO (2003) A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the biphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. *J Periodontol* 74: 1348-1354.

Dennis JP (1965) Some aspects of vibration on visual performance. *J Appl Psychol* 49: 145-152.

Dieckmann DH (1959) A study of the influence of vibration on man. *Ergonomics* 1: 347-355.

Diricks K, Hauglustaine S, van Zweienten KJ, Lippens PL, Schmidt KP, Zinkovsky AV (2004) Soft tissues possibly transducing low frequency vibrations in the human locomotor apparatus. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration*: 1787-1790.

Dorman HL, Bishop JG (1962) Changes in vascular resistance following induction of chronic unilateral periodontitis in dogs. *J Dent Res* 41: 453-458.

Duffner LR, Hamilton LH, Schmitz LA (1962) Effect of whole-body vertical vibration in human subjects. *J Appl Physiol* 17: 913-915.

El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Selvig KA (1998) Microvascular system of the rat incisor enamel organ. A scanning electron microscopic study of vascular corrosion casts. *European Journal of Oral Sciences* 106: 1013-1021.

Eskenazy JJ (1972) La syncope peripherique par vibrations. *Arch Mal Prof* 33: 31-44.

Everts V, Niehof A, Jansen D, Beertsen W (1998) Type VI collagen is associated with microfibrils and oxytalan fibers in the extracellular matrix of periodontium, mesenterium and periostium. *J Periodont* 33: 118-125.

Fernandes JC (2003) *Acústica e ruídos*. Apostila do curso de pós-graduação em engenharia mecânica da faculdade de engenharia da UNESP, Campos de Bauru, 2003.

Fichard A, Chanut-Delaland H, Ruggiero F (2003) Le syndrome d'Ehlers-Danlos: l'architecture matricielle en question. *Med Sci* 19: 443-452.

Fidell S, Barber, DS, Schultz TJ (1991) Updating a dosage-effect relationship for the prevalence of annoyance due to general transportation noise. *Journal of the Acoustical Society of America* 89: 221-233.

Fields JM, de Jong RG, Brown AL, Flindell IH, Gjestland T, Job RFS, Kurra S, Lercher P, Schuemer-Kors A, Vallet M, Yano M (1997) Guidelines for reporting core information from community noise reaction surveys. *Journal of Sound and Vibration* 206: 685-695.

da Fonseca J, Mirones J, Martins dos Santos J, Oliveira P, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Gastrointestinal problems in vibroacoustic disease. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

da Fonseca J, Martins dos Santos J, Castelo Branco N, Alves-Pereira M, Grande N, Oliveira P, Martins AP (2006a) Noise-induced gastric lesions: A light and scanning electron microscopy study of the alterations of the rat gastric mucosa induced by low frequency noise. *Cent Eur J Publ Health* 14: 35-38.

da Fonseca J, Martins dos Santos J, Castelo Branco N, Alves-Pereira M, Grande N, Oliveira P (2006b) Noise-induced duodenal lesions. *Eur J Anat* 9: 29-33.

Foreid P, Pimenta AJM, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005a) Behavioral and psychological changes in vibroacoustic disease. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Foreid P, Pimenta AJM, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005b) Neurological disorders in vibroacoustic disease I – current findings. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Foreid P, Pimenta AJM, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005c) Neurological disorders in vibroacoustic disease II – epilepsy. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Formicola AJ, Witte ET, Curran PM (1970) A Study of personality traits and acute necrotizing ulcerative gingivitis. J Periodontol 41: 36-38.

Frost HM (2001) From Wolff's law to the Utah paradigm: Insights about bone physiology and its clinical applications. Anat Rec 262: 398-419.

Freeman R, Goss S (1993) Stress measures as predictors of periodontal disease-a preliminary communication. Community Dent Oral Epidemiol 21: 176-177.

Fullmer HM, Lillie RD (1958) The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber. J Histochem Cytochem 6: 425-430.

Fullmer HM, Gibson W (1966) Collagenolytic activity in gingivae of man. Nature 209: 728-729.

Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ (1974) Oxytalan connective tissue fibers: a review. J Oral Pathol 3: 291-316.

Genco RJ (1996) Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol 67: 1041-1049.

Genco RJ, Ho AW, Kopman J, Grossi SG, Dunforf RG, Tedesco LA (1998a) Models to evaluate the role of stress in periodontal disease. Ann Periodont 3: 288-302.

Genco RJ, Glurich I, Haraszthy V, Zambom J, DeNardin E (1998b) Overview of risk factors for periodontal disease and implications for diabetes and cardiovascular disease. Compend Contin Educ Dent 19: 40-45.

Genco RJ (1999) Relationship of stress, distress and inadequate coping behaviors to periodontal disease. J Periodontol 70: 711-723.

Gestrelus S, Zetterstrom O, Andersson C (1997) In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. J Clin Periodontol 24: 685-692.

Ghosh AK (2002) Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: implication in fibrosis. Exp Biol Med; 227:301-314

Giddon DB, Goldhaber P, Dunning JM (1963) Prevalence of reported cases of acute necrotizing ulcerative gingivitis in a university population. *J Periodontol* 34: 366-371.

Golub LM, Schneir M, Ramamurthy NS (1978) Enhanced collagenase activity in diabetic rat gingiva: in vitro and in vivo evidence. *J Dent Res* 57: 520-525.

Gomes LMP, Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA (1999) Effects of occupational exposure to low frequency noise on cognition. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A115-A118.

Grande NR, Águas AP, de Sousa Pereira A, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999) Morphological changes in rat lung parenchyma exposed to low frequency noise. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A70-A77.

Grant D, Bernick S (1972) Arteriosclerosis in periodontal vessels of ageing humans. *J Periodontol* 41: 170-173.

Green HM, Green SE (1990) The interrelationship of wind instrument technic, orthodontic treatment, and orofacial myology. *Int J Orofacial Myology*; 25: 18-29.

Greenstein D, Kester RC (1997) The hemorheologic effects of hand-transmitted vibration. *Angiology* 48: 813-819.

Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF (1994) c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science* 266: 443-448.

Grimm FM (1972) Bone bending, a feature of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 62: 384-393.

Grinnell F (2003) Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol*; 13: 264-269.

Gue M, Fioramonti J, Frexinos J, Alvinerie M, Bueno L (1987) Influence of acoustic stress by noise on gastrointestinal motility in dogs. *Dig Dis Sci* 32: 1411-1417.

Gupta OP, Blechman H, Stahl SS (1960) Effects of stress on the periodontal tissues of young adult male rats and hamsters. *J Periodontol* 31: 413-417.

Hall FL, Taylor SM, Birnie SE (1985) Activity interference and noise annoyance. *Journal of Sound and Vibration* 103: 237-252.

Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T, Abiko Y (2002) Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. *Calcif Tissue Int* 70: 17-26.

Harris CS (1976) Review of the effects of infrasound on man. *Aviat Space Environ Med* 47: 430-434.

Harris CS, Johnson DL (1978) Effects of infrasound on cognitive performance. *Aviat Space Environ Med* 49: 582-586.

Haskell BS (1975) Association of aircraft noise stress to periodontal disease in aircrew members. *Aviat Space Environ Med* 46: 1041-1043.

Hassell TM (1993) Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology* 2000 3: 9-38.

Heller IJ, Nanda R (1979) Effect of metabolic alteration of periodontal fibers on orthodontic tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod* 75: 239-258.

Hellman R, Zwicker E (1987) Why can a decrease in dB (A) produce an increase in loudness? *J Acoust Soc Am* 82: 1700-1705.

Hempstock TI, O'Connor DE (1978) Assessment of hand transmitted vibration. *Ann Occup Hyg* 21: 57-67.

Hession JA, McCormack BA (2004) A study of the acoustic properties of biological tissue. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration*: 1699-1706.

Hilgert JB, Hugo FN, Bandeira DR, Bozzetti MC (2006) Stress, cortisol and periodontitis in a population aged 50 years and over. *J Dent Res* 85: 324-328.

Hiruma Y, Inoue A, Shiohama A, Otsuka E, Hirose S, Yamaguchi A, Hagiwara H (1998) Endothelins inhibit the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through the A-type endothelin receptor. *Am J Phys* 275: 1099-1105.

Hock J, Nuki K (1975) Microvascular response to chronic inflammation in gingiva. *Bibl Anat* 13: 186-187.

Hofbauer LC, Heufelder AE, Erben RG (2001) Osteoprotegerin, RANK and RANK ligand: the good, the bad, and the ugly in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28: 685-687.

Hoffman R (1966) Bone formation and resorption around developing teeth transplanted into the femur. *Am J Anat* 118: 91-102.

Horning GM, Cohen ME (1995) Necrotizing ulcerative gingivitis, periodontitis, and stomatitis: clinical staging and predisposing factors. *J Periodontol* 66: 990-998.

Imamura N, Nakata S, Nakasima A (2002) Changes in periodontal pulsation in relation to increasing loads on rat molars and to blood pressure. *Arch Oral Biol* 47: 599-606.

Inaba R, Furuno T, Okada A (1988) Effects of low and high frequency local vibration on the occurrence of intimal thickening of the peripheral arteries of rats. *Scand J Work Environ Health* 14: 312-316.

Inukai Y, Nakamura N, Taya H (2000) Unpleasantness and acceptable limits of low frequency noise. *Jnl Low Freq Noise Vibn* 19: 135-140.

Ishitake T, Kano M, Mivazaki Y, Ando H, Tsutsumi A, Matoba T (1998) Whole-body vibration suppresses gastric motility in healthy men. *Ind Health* 36: 93-97.

Ishitake T, Mivazaki Y, Ando H, Matoba T (1999) Suppressive mechanism of gastric motility by whole-body vibration. *Int Arch Occup Environ Health* 72: 469-474.

Ising H (1981) Interaction of noise-induced stress and Mg decrease. *Artery* 9: 205-211.

Ising H, Ising M (2002) Chronic cortisol increases in the first half of the night caused by road traffic noise. *Noise & Health* 4: 13-21.

Ising H, Lange-Asschenfeld H, Moriske HJ, Born J, Eilts M (2004) Low frequency noise and stress: bronchitis and cortisol in children exposed chronically to traffic noise and exhaust fumes. *Noise & Health* 6: 21-28.

Israel H (1984) Early hypercementosis and arrested dental eruption: heritable multiple ankylodontia. *J Craniofac Genet Dev Biol* 4: 243-6.

Itoiz ME, Litwack D, Kennedy JE, Zander HA (1969) Experimental ischemia in monkeys. Histochemical analysis of gingival epithelium. *J Dent Res* 48: 895-900.

Jagger RG, Jackson SJ, Jagger DC (1997) In at the deep – an insight into scuba diving and related dental problems for the GDP. *Br Dent J* 183: 380-382.

Job RFS (1993) Psychological factors of community reaction to noise. M. Vallet (Ed.) *Noise as a public health problem*, 3: 48-59.

Johnson RB, Pylypas SP (1992) A re-evaluation of the distribution of the elastic meshwork within the periodontal ligament of the mouse. *J Periodont Res* 27: 239-249.

Jones MT, Gilham B (1988) Factors involved in the regulation of adrenocorticotrophic hormone/beta-lipotrophic. *Physiol Rev* 68: 743-818.

Jones RN, Tumer-Warwick M, Ziskind M, Weill H (1976) High prevalence of antinuclear antibodies in sandblasters silicosis. *American Review of Respiratory Diseases* 113: 393-395.

Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH (1987) Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 40: 775-779.

Karpova NI, Alekseev SV, Erokhin VN, Kadyskina EN, Reutov OV (1970) Early response of the organism to low-frequency acoustic oscillations. *Noise Vib Bull* 11: 100-103.

Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L (1993) Development of the biological concept of guided tissue regeneration-animal and human studies. *Periodontol* 2000 1: 26-35.

Kivirikko KI (1993) Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. *Ann Med* 25: 113-126.

Keene JJ Jr (1972) An alteration in human diabetic arterioles. *J Dent Res* 41: 569-572.

Keene JJ Jr (1975) Arteriosclerotic changes within the diabetic oral vasculature. *J Dent Res* 54: 77-82.

Kennedy JE, Zander HA (1969) Experimental ischemia in monkeys: I. Effect of ischemia on gingival epithelium. *J Dent Res* 48: 696-701.

Kiec E, Grzelec T, Koscielny I, Milkowski A (1977) Secretory function of the stomach in workers employed at petroleum prospecting. (abstract) *Med Pr* 28: 349-356.

Kindlova M (1965) The blood supply of the marginal periodontium in *Macacus rhesus*. Arch Oral Biol 10: 869-874.

Kinane DF (2001) Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. Periodontology 2000 24: 215-225.

Kim CY, Ryu JS, Hong SS (1968) Effect of aircraft noise on gastric function. Yonsei Med J 9: 149-154.

Kimura R, Anan H, Matsumoto A, Noda D, Maeda K (2003) Dental root resorption and repair: histology and histometry during physiological drift of rat molars. J Periodont Res 38: 525-532.

Kjellberg A, Wikstrom BO (1987) Acute effects of whole body vibration. Stabilography and electrogastragraphy. Scand J Work Environ Health 13: 243-246.

Kobayashi Y, Takagi H, Sakai H, Hashimoto F, Mataki S, Kobayashi K, Kato Y (1998) Effects of local administration of osteocalcin on experimental tooth movement. Angle Orthod 68: 259-266.

Krinke, GJ (2000) The handbook of experimental animals. The laboratory rat. Academic Press.

Krishnan V, Davidovitch Z (2006) Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop 129: 1-32.

Krivolesova SA, Svidovyi VI, Dadali VA (2001) Effects of infrasound and noise on contractility of lymphatic vessels (an experimental study). (abstract) Med Tr Prom Ekol 2: 16-20.

Kryter KD, Poza F (1980) Effects of noise on some autonomic system activities. J Acoust Soc Am 67: 2036-2044.

Kuftinec, MM (1968) Vascular changes due to the application of force to the molar teeth in hamsters. J Dent Res 47: 916-918.

Kui-Cheng Z, Makoto A (2007) Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. J Occup Health 49: 32-38.

Kvinnsland S, Heyeraas K, ØFjord S (1989) Effect of experimental tooth movement on periodontal and pulp blood flow. *Eur J Orthod* 12: 320-329.

Kyomen S, Tanne K (1997) Influences of aging changes in proliferative rate of PDL cells during experimental tooth movement in rats. *Angle Orthod* 67: 67-72.

Kyriakides K, Leventhall, HG (1977) Some effects of infrasound on task performance. *J Sound and Vib* 50: 369-388.

Lalla E, Cheng B, Lal S, Kaplan S, Softness B, Greenberg E, Goland RS, Lamster IB (2007) Diabetes mellitus promotes periodontal destruction in children. *J Clin Periodontol* 34: 294-298.

Landstrom U, Bystrom M (1984) Infrasonic threshold levels of physiological effects. (abstract) *J Low Freq Noise Vibn* 3: 167-173.

Landstrom U, Kjellberg A, Soderberg L, Norstrom B (1991) The effects of broadband, tonal and masked ventilation noise on performance, wakefulness and annoyance. *Jnl Low Freq Noise Vibn* 10: 112-122.

Lee RA, King AI (1971) Visual vibration response. *J Appl Physiol* 30: 281-286.

Lehmann AG, Busnel RG (1979) Reduction of the swimming time in mice through interaction of infrasound and alcohol. *Psychopharmacology* 65: 79-84.

LeResche L, Dworkin SF (2002) The role of stress in inflammatory disease, including periodontal disease: review of concepts and current findings. *Periodontol 2000* 30: 91-103.

Lew KKK, Sims MR, Leppard PI (1989) Tooth extrusion effects on microvessel volumes, endothelial areas, and fenestrae in molar apical periodontal ligament. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 96: 221-231.

Lew KKK (1989) Orthodontically induced microvascular injuries in the tension zone of the periodontal ligament. *J Nihon Univ Sch Dent* 31: 493-501.

Lia RC, Lauand F, Marcantonio E, Neto CB (1978) A contribution to the histological study of hypercementosis using metal staining. *J Dent Res* 57: 146-52.

Lim DJ, Dunn DE, Johnson DL, Moore TJ (1982) Trauma of the ear from infrasound. *Acta Otolaryngol* 94: 213-231.

Lindhe J, Ericsson I (1978) Effect of ligature placement and dental plaque on periodontal tissue breakdown in the dog. *J Periodontol* 49: 343-350.

Lindvall T, Radford EP (1973) Measurement of annoyance due to exposure to environmental factors. *Environmental Research* 6: 1-36.

Lippmann M, Eckert HL, Hahon N, Morgan WKC (1973) Circulating antinuclear and rheumatoid factors in coal miners. A prevalence study in Pennsylvania and West Virginia. *Ann Intern Med* 79: 807-811.

Littleford RC, Khan F, Hindley MO, Ho M, Belch JJF (1997) Microvascular abnormalities in patients with vibration white finger. *Q J Med* 90: 525-529.

Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M (2006) Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 85: 510-514.

Loe H (1993a) Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 16: 329-334.

Loe H (1993b) Periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2: 7-12.

Lonsbury-Martin BL, Martin GK, Luebke AE (2003) Physiology of the auditory and vestibular systems. In: Ballenger's otorhinolaryngology - head and neck surgery. Snow Jr JB, Ballenger JJ (Eds) Formatex: BC Decker Inc, Hamilton, Ontario: 68-81.

Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M (2002) Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. *J Periodont Res* 37: 118-124.

Marciniak W, Rodriguez E, Olszowska K, Atkov O, Botvin I, Araújo A, Pais F, Loureiro J, Prazeres de Sá E, Ferreira D, Castelo Branco MSNA, Castelo Branco NAA (1999) Echocardiographic evaluation in 485 aeronautical workers exposed to different noise environments. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A46-A53.

Mariotti A (1993) The extracellular matrix of the periodontium: dynamic and interactive tissues. *Periodontol* 2000 3: 39-63.

Martins dos Santos J, Grande NR, Castelo Branco NAA, Zagalo C, Oliveira P (2002) Vascular lesions and vibroacoustic disease. *Eur J Anat* 6: 17-21.

Martins dos Santos J, Grande NR, Castelo Branco NAA, Zagalo C, Oliveira P (2004) Lymphatic lesions and vibroacoustic disease. *Eur J Lymphology* 12: 17-20.

Martins dos Santos J, Albuquerque e Sousa J, Marques MC, Monteiro E, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Urinary system in vibroacoustic disease – current findings and ongoing studies. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Maschke C (2004) Introduction to the special issue on low frequency noise. *Noise & Health* 23: 1-2.

Matoba T, Ishitake T (1990) Cardiovascular reflexes during vibration stress. *Kurume Med J* 37 (suppl): S61-S71.

Matoba T (1994) Pathophysiology and clinical picture of hand-arm vibration syndrome in Japanese workers. *Nagoya J Med Sci* 57 (suppl): 19-26.

Matsumoto Y, Kawabe M, Yasue T, Yuguchi M, Yoshida I (1989) Two cases of sclerodema associated with vibration syndrome. *Japanese Journal of Dermatology* 99: 155-161.

Matsumoto Y, Yasue T, Mizuno N, Yoshida I (1992) An immunoserological study of patients with vibration syndrome. *Occupational & Environmental Health* 63: 357-359.

Mattila KJ, Pussinen PJ, Paju S (2005) Dental infections and cardiovascular diseases: a review. *J Periodontol* 76 (11, suppl): 2085-2088.

Maurício JC, Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA (1988) Doença sistêmica das vibrações. Imagens do SNC por ressonância magnética. *Rev Port Med Militar* 36: 90-96.

Maurício JC, Branco G, Pimenta AJFM, Castelo Branco MSN, Castelo Branco NAA (1991) Noise and vibration exposure effects on C.N.S. - M.R.I. study. *Médecine Aéronautique et Spatiale – Tome XXX (119): 363-367*.

Maurício JC, Pimenta AJFM, Castelo Branco MS, Silva Simões JMC, Castelo Branco NAA (1999) ERP P300 and brain magnetic resonance imaging in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A107-A114.

McCulloch CA (1993) Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *Periodontol* 2000 1:16-25.

Mendes A, Alves-Pereira M, Castelo Branco N, Silva J, Pires F (2005) Vibroacoustic disease and voice acoustic analyses. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Mendes J, Martins dos Santos, Oliveira P, Castelo Branco NAA (2007) Low frequency noise effects on the periodontium of the Wistar rat – a light microscopy study. *Eur J Anat* 11: 27-30.

Miguel ASSR (1992) Protecção auditiva individual em ambientes industriais. Dissertação para doutoramento em Engenharia de Produção apresentada à Universidade do Minho.

Miedema HME, Vos H (1998) Exposure-response relationships for transportation noise. *J Acoust Soc Am* 104: 3432-3445.

Mikola OJ, Bauer WH (1949) Cementicles and fragments of cementum in the periodontal membrane. *Oral Surg* 2: 1063-74.

Mirowska M (2001) Evaluation of low-frequency noise in dwellings. New Polish recommendations. *J Low Freq Noise Vib* 20: 67-74.

Mohr GC, Cole JN, Guild E, Vongierke HE (1965) Effects of low frequency and infrasonic noise on man. *Aerospace Medicine* 36: 817-824.

Molins LN, Gorina AB (1980) Exploración clínica práctica. Editora científico-médica.

Moller H (1984) Physiological and psychological effects of infrasound in humans (abstract) *J Low Freq Noise Vib* 3: 1-17.

Moller H (1987) Annoyance of audible infrasound (abstract) *J Low Freq Noise Vib* 6: 1-17.

Moller H, Lyndolf M (2002) A questionnaire survey of complaints of infrasound and low-frequency noise (abstract) *J Low Freq Noise Vib* 21: 53-63.

Montalvão Silva J, Castelo Branco NAA (1988) Alguns elementos sobre a física das vibrações. *Rev Port Med Militar* 36: 134-142.

Mosskow BS, Polson AM (1991) Histologic studies on the extension of the inflammatory infiltrate in human periodontitis. *J Clin Periodontology* 18: 534-542.

Nagai M, Yoshida A, Sato N, Wong DT (1999) Messenger RNA level and protein localization of transforming growth factor-beta1 in experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci* 107: 475-481.

Nakamura H, Katoh A, Nohara S, Nakamura H, Okada A (1992) Experimental studies on the pathogenesis of the gastric mucosal lesions induced by whole-body vibration. *Environ Res* 58: 220-229.

Nekhoroshev AS (1985) Exposure to low frequency narrow band noise and reaction of the stria vascularis vessels. *Vestn Otolaringol* 6: 17-19.

Nekhoroshev AS (1990) Combined effects of noise and vibration on the cells of the hearing and vestibular organs. (Abstract) *Vestn Otorinolaringol* 6: 27-30.

Nekhoroshev AS, Glinchikov VV (1991) Reaction of hepatocytes to infrasound exposure. (Abstract) *Gig Sanit* 2: 45-47.

Nekhoroshev AS, Glinchikov VV (1992) Morphological research on the liver structures of experimental animals under the action of infrasound. (Abstract) *Aviakosm Ekolog Med* 26: 56-59.

Nuki K, Hock J (1974a) The formation of the vasculature of free gingiva in deciduous teeth of cats and dogs. *J Periodont Res* 9: 298-304.

Nuki K, Hock J (1974b) The organisation of the gingival vasculature. *J Periodont Res* 9: 305-313.

Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J (1982) The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 9: 257-265.

Okada A, Inaba R, Furuno T, Nohara S, Ariizumi M (1987) Usefulness of blood parameters, especially viscosity, for the diagnosis and elucidation of pathogenic mechanisms of the hand-arm vibration syndrome. *Scand J Work Environ Health* 13: 358-362.

Okada K (2005) Vibroacoustic disease under the low sound pressure level. Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration.

Oliveira MJR, Pereira AS, Águas AP, Grande NR, Monteiro E, Serrano I, Castelo Branco NAA (1999) Effects of low frequency noise upon the reaction of pleural milky spots to mycobacterial infection. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A137-A154.

Oliveira MJR, Castelo Branco NAA, Grande NR, Águas AP (2002a) In utero and postnatal exposure of wistar rats to low frequency/high intensity noise depletes the tracheal epithelium of ciliated cells. *Lung* 179: 225-232.

Oliveira MJR, Pereira AS, Guimarães L, Freitas D, Carvalho APO, Grande NR, Águas AP (2002b) Chronic exposure of rats to cotton-mill-room noise changes the cell composition of the tracheal epithelium. *J Occup Environ Med* 44: 1135-1142.

Oliveira MJR, Pereira AS, Ferreira PG, Cunha EM, Grande NR, Águas AP (2003a) Bulging mesothelial cells of the visceral pleura of the rat mimic the network of subpleural lymphatics. *Lymphology* 36: 144-148.

Oliveira MRJ, Pereira AS, Ferreira PG, Grande NR, Águas AP (2003b) Reduction of rat pleural microvilli caused by noise pollution. *Experimental Lung Research* 29: 445-454.

Oliveira MRJ, Pereira AS, Ferreira PG, Guimarães L, Freitas D, Carvalho AP, Grande NR, Águas AP (2005) Arrest in ciliated cell expansion on the bronchial lining of adult rats by chronic exposure to industrial noise. *Environ Res* 97: 282-286.

Oliveira MRJ, Monteiro MP, Ribeiro AM, Pignatelli D, Águas AP (2009) Chronic exposure of rats to occupational textil noise causes cytological changes in adrenal cortex. *Noise Health* 11: 118-123.

Oliveira P, Martins dos Santos J, Grande NR, Castelo Branco N, da Fonseca J, Alves-Pereira M (2005) Morphologic changes in the parotid gland induced by low frequency noise – an histology study. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Oliveira P, Mata A, Martins dos Santos J, Marques D, Castelo Branco N, Silvestre J, da Fonseca J (2007) Low frequency noise effects on the parotid gland of the Wistar rat. *Oral Dis* 13: 468-473.

Olof G, Kjell Z (1977) Marginal alveolar bone loss in flying personnel: a radiographical followup study. *Aviat Space and Environ Med* 48: 805-807.

Pacheco J, Albuquerque A, Soares C, Ferreira A, Martins AS, Santos I, Albuquerque C, Venido F, Gomes MR (1999) Análise neuropsicológica dos doentes com doença sistémica das vibrações. *Rev Port Med Militar* 39: 45-54.

Page RC e Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 14: 9-11.

Page RC e Beck JD (1997) Risk assessment for periodontal diseases. *Int Dent J* 47: 61-87.

Palmer RM, Lubbock MJ (1995) The soft connective tissues of the gingiva and periodontal ligament: are they unique? *Oral Dis* 4: 230-237.

Parfitt AM (2001) The bone remodeling compartment: A circulatory function for bone lining cells. *J Bone Miner Res* 16: 1583-1585.

Parfitt AM (2002) Targeted and nontargeted bone remodeling: Relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone* 30: 5-7.

Passchier-Vermeer W, Passchier WF (2000) Noise exposure and public health. *Environmental Health Perspectives* 108 (1, suppl): 123-131.

Paulsen R, Kastka J (1995) Effects of combined noise and vibration on annoyance. *Journal of Sound and Vibration* 181: 295-314.

Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J (2000) Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 67: 163-172.

Pawlaczyk-Luszczynska M, Dudarewicz A, Waszkowska M, Sliwinska-Kowalska M (2003) Assessment of annoyance from low frequency and broadband noises. *Int J Occup Environ Health* 16: 337-343.

Pawlaczyk-Luszczynska M, Dudarewicz A, Waszkowska M, Szymczak W, Sliwinska-Kowalska M (2004a) The impact of low frequency noise on the cognitive functions in humans. *Proceedings of the Eleventh International Meeting on Low Frequency Noise and Vibration and its Control*: 251-260.

Pawlaczyk-Luszczynska M, Dudarewicz A, Waszkowska M, Szymczak W, Sliwinska-Kowalska M (2004b) The impact of low frequency noise on mental performance. *Int J Occup Environ Health* 18: 185-198.

Pedersen CS, Moller H, Waye KP (2004) An investigation of low frequency noise complaints. *Proceedings of the Eleventh International Meeting on Low Frequency Noise and Vibration and its Control*: 261-268.

Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, D'Archivio D, Tripodi D, Femminella B, Festa F, Spoto G (2002) Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 122: 548-556.

Persson-Waye K, Rylander R, Benton S, Leventhall HG (1997) Effects on performance and work quality due to low frequency ventilation noise. *J Sound Vibration* 205: 467-474.

Persson-Waye K, Bengtsson J, Kjellberg A, Benton S (2001) Low frequency "noise pollution" interferes with performance. *Noise Health* 4: 33-49.

Persson Waye K (2004) Effects of low frequency noise on sleep. *Noise Health* 6: 87-91.

Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA, Manaças JE, Brito JLR, Martins AS (1988) Doença sistémica das vibrações. Elementos clínicos. *Rev Port Med Militar* 36: 72-85.

Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA, Manaças JE (1991) Étude neurologique chez 45 sujets exposés au bruit et vibrations industrielles. *Medicine Aéronautique et Spatiale Tome XXX* 119: 359-361.

Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA (1999a) Neurological aspects of vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A91-A99.

Pimenta AJFM, Castelo Branco NAA (1999b) Epilepsy in the vibroacoustic disease: a case report. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A122-A127.

Pimenta AJFM, Castelo Branco MSN, Castelo Branco NAA (1999a) Balance disturbances in individuals with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A96-A99.

Pimenta AJFM, Castelo Branco MSN, Castelo Branco NAA (1999b) The palmo-mental reflex in vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A100-A106.

Pimentel CJAB (1988) As vibrações e a estrutura dento-alveolar. *Revista Portuguesa de Medicina Militar* 6: 123-127.

Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav* 43: 47-55.

Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Mayer U (2004) Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development*; 131: 1619-28.

Poulsen T (2003) Annoyance of low frequency noise (LFN) in laboratory assessed by LFN-sufferers and non-sufferers. (abstract) *J Low Freq Noise Vib* 22: 191-201.

Pyykko I, Starch J, Farkkila M, Hoikkala M, Korhoonen O, Nurminen (1981) Hand arm vibration in the etiology of hearing loss in lumberjacks. *Br J Ind Med* 38: 281-289.

Pyykko I, Starck J (1982) Vibration syndrome in the etiology of occupational hearing-loss. *Acta Oto-Laryngologica* 5385: 296-300.

Quintarelli G (1957) Histopathology of the human mandibular artery and arterioles in periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 10: 1047-1059.

Quirk WS, Coleman JK, Hanesworth JM, Harding JW, Wright JW (1994) Noise-induced elevations of plasma endothelin (ET-3). *Hear Res* 80: 119-122.

Rabin BS (1999) Stress, immune function, and health. *The Connection*. Wiley-Liss Sons.

Ramamurthy NS, Zebrowski EJ, Golub LM (1974) Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. *J Periodontal Res* 9: 199-206.

Raspanti M, Cesari C, Pasquale V, Ottani V, Strocchi R, Zucchelli G, Ruggeri A (2000) A histological and electron-microscopic study of the architecture and ultrastructure of human periodontal tissues. *Arch Oral Biol* 45: 185-192.

Ratcliff PA (1956) The relationship of the general adaptation syndrome to the periodontal tissues in the rat. *J Periodontol* 27: 40-43.

Reitan K, Ryghi P (1994) Biomechanical principles and reactions. *Orthodontics* 2nd ed Mosby- Year Book Inc. St Louis, 96-102.

Reis Ferreira J, Couto AR, Jalles-Tavares N, Castelo Branco MS, Castelo Branco NAA (1999) Air flow limitation in patients with vibroacoustic disease. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A63-A69.

Reis Ferreira J, Albuquerque e Sousa J, Mendes CP, Antunes M, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2004a) Loss of the neurological control of breathing in vibroacoustic disease patients. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Sound and Vibration*: 1745-1752.

Reis Ferreira J, Mendes CP, Monteiro M, Marques MC, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2004b) Vibroacoustic disease – associated respiratory tract pathology. *Proceedings of the Eleventh International Congress on Low Frequency Noise and Vibration and its Control*: 284-294.

Reis Ferreira J, Mendes CP, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005a) Respiratory pathology in vibroacoustic disease I – current findings. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Reis Ferreira J, Albuquerque e Sousa J, Foreid P, Antunes M, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2005b) Neurological disorders in vibroacoustic disease III - respiratory control. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Ribeiro LC, Crespo FF, Freire I, Afonso I, Castelo Branco SN, Marques MC, Alves Pereira M, Castelo Branco NAA (2005) Haemostasis and coagulation changes in vibroacoustic disease. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Roughley PJ, Rauch F, Glorieux FH (2003) Osteogenesis imperfecta – clinical and molecular diversity. *Eur Cell Mat* 5: 41-47.

Rushforth I, Moorhouse A, Styles P (2002) A case study of low frequency noise assessed using DIN 45680 criteria. *J Low Freq Noise Vib* 21: 181-198.

Rygh P (1972) Ultrastructural vascular changes in pressure zones of rat molar periodontium incident to orthodontic movement (abstract). *Scand J Dent* 80: 307-321.

Rygh P (1973) Ultrastructural changes of the periodontal fibers and their attachment in rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Scand J Dent* 81: 467-480.

Salvi GE, Kandyaki M, Troendle A, Person GR, Lang NP (2005) Experimental gingivitis in type I diabetics: a controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol* 32: 310-316.

Samuel CS (2005) Relaxin: antifibrotic properties and effects in models of disease. *Clin Med Res* 3: 241-249.

Sandy JR, Farndale RW, Meikle MC (1993) Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103: 212-222.

Sanchez HH, Carrera GM (2006) Hipoacusia inducida por ruido: estado actual. *Rev Cuba Med Milit* 35: 41.

Schenkein HA (2006) Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol* 2000 40: 77-93.

Scharffetter K, Kulozik M, Stolz W, Lankat-Buttgereit B, Hatamochi A, Söhnchen R, Krieg T. (1989) Localization of collagen alpha 1(I) gene expression during wound healing by insitu hybridization. *J Invest Dermatol*; 93: 405-12.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD (1997) Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000 14: 158-172.

Scholz G, Hensel J, Janssen T (2005) Infra-low frequency tones and inner ear function. *Proceedings of the Twelfth International Congress on Sound and Vibration*.

Schoeder HE (1986) *Handbook of microscopic anatomy. The periodontium*. Berlin.

Schultz TJ (1978) Synthesis of social surveys on noise annoyance. *Journal of the Acoustical Society of America* 64: 377-405.

Sculean A, Karring T, Theilade J, Lioubavina N (1997) The regenerative potencial of oxytalan fibers: An experimental study in the monkey. *J Clin Periodontol* 24: 932-936.

Seiffert K, Hosoi J, Torii H (2002) Catecholamines inhibit the antigen-presenting capability of epidermal Langherans cells. *J Immunol* 168: 6128-6135.

Selman M, Talmedge E, Annie Pardo (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: Preveilling and evolving hypothesis about its pathogenesis and oral implicatpons for therapy. *Ann Intern Med* 134: 136-151.

Selvig KA, Bogle G, Claffey NM (1988) Collagen linkage in periodontal connective tissue reattachment. An ultrastructural study in beagle dogs. *J Periodontol* 59: 758-768.

Selvig KA, Sigurdsson TJ, Wikesjö UM (1995) "Collagen adhesion" revisited. *Int J Periodontics Restorative Dent* 15: 528-537.

Seppala B, Sorsa T, Ainamo J (1997) Morphometric analysis of cellular and vascular changes in gingival connective tissue in long-term insulin-dependent diabetes. *J Periodontol* 68: 1237-1245.

Seymour RA (2006) Effects of medications on the periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000 40: 120-129.

Shannon IL, Kilgore WG, O'Leary TJ (1969) Stress as a predisposing factor in necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 40: 240-242.

Shirazi M, Nilforoushan D, Alghasi H, Dehpour AR (2002) The role of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Angle Orthod* 72: 211-215.

Shklar G (1966) Periodontal disease in experimental animals subjected to chronic cold stress. *J Periodontol* 37: 377-383.

Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ (1990) Type II diabetes and periodontal disease. *J Am Dent Assoc* 121: 532-536.

Da Silva AM, Newman HN, Oakley DA (1995) Psychosocial factors in inflammatory periodontal diseases. A review. *J Clin Periodontol* 22: 516-526.

Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco N, Dias A, Boavida MG (1996) Sister chromatid exchange analysis in workers exposed to noise and vibration. *Mutat Res* 369: 113-121.

Silva MJ, Carothers A, Castelo Branco N, Dias A, Boavida MG (1999) Increased levels of sister chromatid exchange in military aircraft pilots. *Mutat Res* 441: 129-134.

Silva MJ, Dias A, Barreta A, Nogueira PJ, Castelo Branco N, Boavida MG (2002) Low frequency noise and whole-body vibration caused increased levels of sister chromatid exchange in splenocytes of exposed mice. *Teratog Carcinog Mutagen* 22: 195-203.

Sims MR, Leppard PI, Sampson WJ, Dreyer CW (1996) Microvascular liminal volume changes in aged mouse periodontal ligament. *J Per Res* 75: 1503-1511.

Skoglund A, Tronstad L, Wallenius K (1978) A microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surg* 45: 17-28.

Slarve RN, Johnson DL (1975) Human whole-body exposure to infrasound. *Aviat Space Environ Med* 46: 428-431.

Smith SD (2002) Characterizing the effects of airborne vibration on human body vibration response. *Aviat Space Environ Med* 73: 36-45.

Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Edgar D (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderme differentiation. *J Cell Biol*; 144: 151-60.

Sonnenberg A, Donga M, Erckenbrecht JF, Wienbeck M (1984) The effect of mental stress induced by noise on gastric acid secretion and mucosal blood flow. *Scand J Gastroenterol (suppl)* 89: 45-48.

Sousa Pereira A, Grande NR, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999a) Morphofunctional study of the rat pleural mesothelial cells exposed to low frequency noise. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A78-A85.

Sousa Pereira A, Águas AP, Grande NR, Mirones J, Monteiro E, Castelo Branco NAA (1999b) The effect of chronic exposure to low frequency noise on rat tracheal epithelia. *Aviat Space Environ Med* 70 (3, suppl): A86-A90.

Soutar CA, Turner-Warwick M, Parkes WR (1974) Circulating antinuclear antibody and rheumatoid factor in coal pneumoconiosis. *Br Med J* 3: 145-147.

Stahl SS (1977) Healing following simulated fiber retention procedures in rats. *J Periodontol* 48: 67-73.

Su M, Borke JL, Donahue HJ, Li Z, Warshawsky NM, Russell CM, Lewis JE (1997) Expression of connexin 43 in rat mandibular bone and periodontal ligament cells during experimental tooth movement. *J Dent Res* 76: 1357-1366.

Swynghedauw B (1999) Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79: 215-262.

Taenaka K (1989) A study on the effect of infrasound. (abstract) *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 92: 1399-1415.

Takagi M, Kazama T, Shimada K, Hosokawa Y, Hishikawa H (1989) Differential distribution and ultrastructural staining of oxytalan and elastic fibers in the periodontal ligament of *Alligator mississippiensis*. *Anat Rec* 225: 279-287.

Takahashi Y, Yonekawa Y, Kanada K, Maeda S (1999) A pilot study on the human body vibration induced by low frequency noise. *Ind Health* 27: 28-35.

Takahashi Y, Kanada K, Yonekawa Y (2002a) Some characteristics of human body surface vibration induced by low frequency noise. (abstract) *JLow Freq Noise Vib* 21: 9-19.

Takahashi Y, Kanada K, Yonekawa Y (2002b) The relationship between vibratory sensation and body surface vibration induced by low frequency noise. (abstract) *JLow Freq Noise Vib* 21: 87-100.

Takahashi Y, Maeda S (2003) Measurement of human body surface vibration induced by complex low frequency noise composed of two pure tones. (abstract) *JLow Freq Noise Vib* 22: 209-223.

Takahashi Y, Kanada K, Yonekawa Y, Harada N (2005) A study on the relationship between subjective unpleasantness and body surface vibrations induced by high-level low frequency pure tones. *Ind Health* 43: 580-587.

Takashiba S, Naruishi K (2006) Gene polymorphism in periodontal health and disease. *Periodontol* 2000 40: 94-106.

Takeuchi T, Imanishi H (1984) Histopathologic observations in finger biopsy from thirty patients with Raynaud's phenomenon of occupational origin. *J Kumamoto Med Soc* 58: 56-70.

Talic NF, Evans CA, Daniel JC, Zaki AE (2003) Proliferation of epithelial rests of Malassez during experimental tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 123: 527-533.

Tang MP, Sims MR, Sampson WJ, Dreyer CW (1993) Evidence for endothelial junctions acting as a fluid flux pathway in tensioned periodontal ligament. *Arch Oral Biol* 38: 273-276.

Tashiro K, Sawada T, Inoue S, Yanagisawa T (2002) Development of oxytalan fibers in the rat molar periodontal ligament. *J Periodont Res* 37: 345-352.

Taubmen MA, Kawai T (2001) Involvement of T lymphocytes in periodontal disease and direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Biol Med* 12: 125-135.

Ten Cate AR, Mills C (1972) The development of the periodontium: the origin of alveolar bone. *Anat Rec* 170: 365-380.

Ten Cate AR (1996) The role of epithelium in the development, structure and function of the tissues of tooth support. *Oral Dis* 1: 55-62.

Ten Cate AR (1997) The development of the periodontium-a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000 13: 9-19.

Tenshin S, Tuchihashi M, Sou K, Lew HS, Hayashi H, Tanimura I, Kawata T (1995) Remodeling mechanisms of transseptal fibers during and after tooth movement. *Angle Orthod* 65: 141-150.

Teles-Grilo ML, Leite-Almeida H, Martins dos Santos J, Oliveira C, Boaventura P, Grande NR (2005) Differential expression of collagens type I and type IV in lymphangiogenesis during the angiogenic process associated with bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat. *Lymphology* 38: 130-135.

Thase ME (1996) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical activity and response to cognitive behavior therapy in unmedicated hospitalized depressed patients. *Am J Psychiatry* 153: 886-891.

Thesleff I (2003) Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *Journal of Cell Science* 116: 1647-1648.

Toms A, Gannon B, Carati C (2000) The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *Aust Orthod J* 16: 61-68.

Torres R, Tirado G, Roman A, Ramirez R, Colon H, Araujo A, Pais F, Marciniak W, Nóbrega J, Bordalo e Sá A, Lopo Tuna JMC, Castelo Branco MSNAA, Alves-Pereira M, Castelo Branco NAA (2001) Vibroacoustic disease induced by long-term exposure to sonic booms. *Internoise 2001*, The Hague, Holland: 1095-1098.

Trombelli L (1999) Periodontal regeneration in gingival recession defects. *Periodontol* 2000 19: 138-150.

Tsigos C, Papanicolaou DA, Defensor R, Mitsiadis CS, Kyrou I, Chrousos GP (1997) Dose effects of recombinant human interleukin-6 on pituitary hormone secretion and energy expenditure. *Neuroendocrinology* 66: 54-62.

Tsukada H, Ishikawa H, Nakamura S, Yoshida S (2000) Developmental changes of the vasculature in the periodontal ligament of rat molars: a scanning electron microscopic study of microcorrosion casts. *J Periodont Res* 35: 201-207.

Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y, Yajima T (2002) Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodont Res* 37: 23-28.

Turner H, Ruben MP, Frankl SN, Sheff M, Silberstein S (1969) Visualization of the microcirculation of the periodontium. *J Periodontol* 40: 222-230.

Ushiki T (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histol Cytol* 65: 109-126.

Van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. *FASEB J* 5: 2814-2823.

Van Zeller P, Oliveira FC, Tavares C, Freitas AM, Castelo Branco NAA (1988) Doença sistêmica das vibrações. *Angiografia dos doentes com DSV. Rev Port Med Mil* 36: 116-122.

Van Zeller P, Tavares C, Freitas AM, Oliveira FC, Castelo Branco NAA (1991) Estudo fluorangiográfico do fundo ocular na doença sistêmica das vibrações (DSV). *Rev Port Med Mil* 39: 67-70.

Verna C, Melsen B (2003) Tissue reaction to orthodontic tooth movement in different bone turnover conditions. *Orthod Craniofacial Res* 3: 155-163.

Vernal R, Dezerega A, Dutzen N, Cheparro A, Leon R, Chandia S, Silva A, Gomonel J (2006) RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis* 12: 283-289.

Vettore MV, Leão AT, Monteiro Da Silva AM, Quintanilha RS, Lamarca GA (2003) The relationship of stress and anxiety with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 30: 394-402.

Verrecchia F, Mauviel A (2002) Control of connective tissue gene expression by TGF beta: role of smad proteins in fibrosis. *Curr Rheumatol Rep* 4: 143-149.

Verrecchia F, Mauviel A (2004) TGF-Beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression. *Cell Signal* 16: 873-880.

Von Gierke H, Mohler S (2002) Letter to the editor: "vibroacoustic disease". *Aviat Space Environ Med* 73: 828-830.

Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A (2003) Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56: 561-572.

Westin JB (1975) Infrasound: a short review of effects in man. *Aviat Space Environ Med* 46: 1135-1140.

Weinberger A (1954) The clinical significance of hypercementosis. *J Oral Surg* 7: 79-87.

Wikesjö UM, Nilveus R (1991) Periodontal repair in dogs. Healing patterns in large circumferential periodontal defects. *J Clin Periodontol* 18: 49-59.

Wikesjö UM, Claffey N, Nilveus R (1991) Periodontal repair in dogs: effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J Periodontol* 62: 180-184.

Wikesjö UM, Selvig KA (1999) Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000 19: 21-30.

WHO (1980). Glossary on air pollution. WHO Regional Office of Europe, Series No. 9, World Health Organization, Copenhagen, Denmark.

Yokoya K, Sasaki T, Shibasaki Y (1997) Distributional changes of osteoclasts and pre-osteoclastic cells in periodontal tissues during experimental tooth movement as revealed by quantitative immunohistochemistry of H (+) – ATPase. J Dent Res 76: 580-7.

Zoellner H, Hunter N (1991) Vascular expansion in chronic periodontitis. J Oral Pathol Med; 20: 433-7.

