

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA
DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

Mirtes Rosa da Silva

Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA
DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL**

Mirtes Rosa da Silva

Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2015

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Da Silva, Mirtes Rosa

Si381m

Marcadores de estresse oxidativo da saliva de cães com doença periodontal / Mirtes Rosa da Silva .

Araçatuba: [s.n], 2015

49f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2015

Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

1. Antioxidantes. 2. Cães. 3. Fluido salivar 4. Oxidantes.
5. Periodontite. I. T.

CDD 636.70896



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



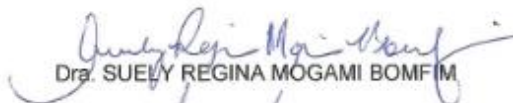
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Marcadores de estresse oxidativo da saliva de cães com doença periodontal.

AUTORA: MIRTES ROSA DA SILVA

ORIENTADOR: Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. SUELY REGINA MOGAMI BOMFIM


Dra. ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 29 de outubro de 2015.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MIRTES ROSA DA SILVA – Natural de São Martinho, Rio Grande do Sul, nascida em 05 de setembro de 1985, filha de Maria Susana da Silva e José Pedro da Silva. Em 2008, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Itapiranga – FAI em Itapiranga, Santa Catarina, onde se graduou como Médica Veterinária em fevereiro de 2013 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Criptococose em felinos” sob orientação da Prof.^a Dr.^a Marinês de Castro. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, Unesp, Campus de Araçatuba-SP, em março de 2014, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo sob auxílio financeiro da CAPES de onde também obteve bolsa de mestrado.

*O mundo está nas mãos daqueles que tem a coragem de sonhar
e correr o risco de viver seus sonhos..."*

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha maravilhosa mãe Maria Susana da Silva, por ser uma mãe tão batalhadora, guerreira, honesta e sempre ter passado os valores que realmente devem compor um ser humano. Mãe que sempre acreditou e apostou em mim, e me faz perceber que conseguimos superar os desafios que nos deparamos pelo caminho. O amor infinito da minha vida sempre será você minha mãezinha!

À minha irmã Diane Carla da Silva e sua família, minha irmã Angela Jussara da Silva e sua família, por estarem sempre torcendo e me ajudando a superar as dificuldades da vida.

Ao meu orientador de mestrado Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini por ter me aceito como sua orientada, por todo apoio, amizade e ensinamentos durante esse período. Um grande exemplo de honestidade, competência, ética e profissionalismo. Estou muito grata por ter sido sua orientada.

À minha orientadora de graduação Prof.^a Dr.^a Marinês de Castro por ter acreditado em mim, pelo apoio e estímulo durante o período de faculdade como também à nossa amizade.

Minha amiga e colega de projeto Daniela Matono pela ajuda desde o primeiro dia de estudos no mestrado.

Aos animais que participaram desse estudo e seus proprietários.

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Anelise Maria Bosco, Rafaela Pintor, Lillian Baptistiulli que participaram de forma mais intensa na elaboração dos meus trabalhos, Luciana de Moraes, Laine Gabas, Gabriela Quideroli Issa, Taiana Carvalho Valadares, Breno Fernando de Almeida, Priscila Preve Pereira e Luis Gustavo Narciso pelas orientações e ensinamentos que foram essenciais para meu crescimento e desenvolvimento.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado durante o primeiro ano do curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade oferecida para a realização do curso de Mestrado.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram na execução dessa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível!

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

| | Página |
|--|--------|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 20 |
| 1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA..... | 20 |
| 2. PESQUISA BIBLIOGRÁFICA..... | 22 |
| 3. ALTERAÇÕES DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA E FLUÍDO CREVICULAR GENGIVAL (FCG) NA DOENÇA PERIODONTAL (DP)..... | 23 |
| 4. CONCLUSÃO..... | 26 |
| REFERÊNCIAS..... | 27 |
| | |
| CAPÍTULO 2 – MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL | |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 34 |
| 2. MATERIAL E MÉTODO..... | 36 |
| 2.1 Delineamento experimental | 36 |
| 2.2 Avaliação dos tecidos periodontais e classificação da doença periodontal..... | 37 |
| 2.3 Colheita e acondicionamento das amostras..... | 39 |
| 2.4 Tratamento periodontal..... | 39 |
| 2.5 Análises laboratoriais..... | 40 |
| 2.6 Análise estatística..... | 41 |
| 3. RESULTADOS..... | 41 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 41 |
| 5. CONCLUSÃO..... | 50 |
| REFERÊNCIAS..... | 51 |

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DA SALIVA DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

RESUMO – A doença periodontal (DP) é a patologia mais comum da cavidade oral em cães. É uma enfermidade de caráter inflamatório, crônico e infeccioso. Quando há um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio, ocorre o estresse oxidativo que é um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Em humanos a saliva é considerada a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo nas doenças periodontais. Devido a carência de estudos em cães nesse assunto, neste trabalho foram investigadas as hipóteses de que a semelhança ao que é descrito em humanos, a DP em cães causa estresse oxidativo sistêmico associado à ativação dos neutrófilos e que a saliva pode ser utilizada para avaliar este estresse oxidativo. Foram selecionados 20 cães adultos de diferentes raças e sexo, agrupados conforme o grau de lesão (gingivite n-6, periodontites leve n-8 e avançada n-6). O grupo controle foi constituído pelos mesmos 20 cães, 30 dias após o tratamento periodontal, todos sem alterações no exame físico, perfil bioquímico plasmático e hemograma. Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes foi quantificada a produção de superóxido pelo teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) e concentração de oxidante total (TOC). A concentração de espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) no plasma foi utilizada para estimar a peroxidação lipídica. O estresse oxidativo local foi avaliado quantificando-se a TOC e a concentração dos principais antioxidantes da saliva (ácido úrico, albumina e bilirrubina). O estresse oxidativo sistêmico na DP ocorreu independentemente do grau de lesão e foi caracterizado pelo aumento de TOC, NBT e TBARS. As alterações dos biomarcadores de estresse oxidativo mensurados na saliva não foram significantes e não apresentaram correlação com os valores obtidos no plasma. Contrariando nossa hipótese, a análise da saliva de cães não expressou claramente o estresse oxidativo causado pela DP.

Palavras-chave: *antioxidantes, cães, fluido salivar, oxidantes, periodontites*

OXIDATIVE STRESS MARKERS IN DOGS WITH SALIVA PERIODONTAL DISEASE

ABSTRACT - Periodontal disease (PD) is the most common disease of the oral cavity in dogs with an inflammatory character disease, chronic and infectious. With an excessive production of reactive oxygen species, oxidative stress occurs which is an imbalance between oxidants and antioxidants. Human saliva is considered the first line of defense against oxidative stress in periodontal diseases. Due to lack of studies in dogs on this issue, this study hypotheses were investigated that the similarity to what is described in humans, the DP in dogs cause systemic oxidative stress associated with activation of neutrophils and that saliva can be used to assess this oxidative stress. We selected 20 adult dogs of different breeds and sex, grouped according to the degree of injury (n-6 gingivitis, periodontitis light n-8 and advanced n-6). The control group was made up of the same 20 dogs, 30 days after periodontal treatment, all without any changes on physical examination, serum chemistry profile and complete blood count. To assess oxidative metabolism of circulating neutrophils was measured superoxide production by cytochemical test nitroblue tetrazolium reduction (NBT), and total oxidant concentration (TOC). The concentration of the tiobartbitúrico reactive species (TBARS) in plasma was used to estimate the lipid peroxidation. The local oxidative stress was evaluated by quantifying the TOC and concentration of the main antioxidant in saliva (uric acid, albumin and bilirubin). The systemic oxidative stress in PD has occurred regardless of the degree of injury and is characterized by TOC increase, NBT and TBARS. Changes in oxidative stress biomarkers measured in saliva were not significant and did not show correlation with the values obtained in plasma. Contrary to our hypothesis, the dog saliva analysis does not clearly expressed oxidative stress caused by PD.

Keywords: antioxidants, canines, saliva, oxidants, periodontitis

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

A doença periodontal (gingivite e periodontite) é um distúrbio inflamatório do periodonto que afeta os cães atingindo mais de 80% da população canina (WEI et al., 2010). Respostas inflamatórias e imunológicas estimuladas pela presença de bactérias patogênicas no ambiente periodontal podem gerar um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em tecidos adjacentes (PAVLICA et al., 2004).

A produção de ERO é essencial no mecanismo de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos bacterianos (BALTACIOGLUTI et al., 2014a). O papel das ERO depende de sua concentração e níveis baixos podem ter funções fisiológicas (SILVA-BOGHOSSIAN et al., 2009). O aumento na produção de ERO pode contribuir para a ocorrência do estresse oxidativo (BALTACIOGLUTI et al., 2014a), ou seja, desequilíbrio entre oxidante e defesa antioxidante (KONOPKA et al., 2007). Quando não neutralizadas por sistemas antioxidantes, as ERO têm potencial para causar danos significativos e prejudicar uma grande variedade de moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e DNA (BALTACIOGLUTI et al., 2014a).

Em humanos com DP o estresse oxidativo sistêmico está bem caracterizado pelo aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (BHANSALI et al., 2013), maior concentração total de oxidante plasmático (WEI et al., 2010; BALTACIOGLU et al., 2014a), aumento da peroxidação lipídica plasmática (PANJAMURTHY et al., 2005; DALAI et al., 2013) e declínio da capacidade antioxidante total do plasma (D'AIUTO et al., 2010; THOMAS et al., 2014).

A saliva humana possui importante atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica (SCHENKELS et al., 1995). A capacidade antioxidante da saliva é considerada a primeira linha de defesa contra as ERO produzidas durante o processo de digestão dos alimentos e doenças periodontais (BATTINO et al.,

2002). A lesão periodontal se amplifica quando as ERO derivadas do superóxido superam a capacidade antioxidante da saliva (KONUGANTI et al., 2012), exercida predominantemente pelo ácido úrico (BATTINO et al., 2002). A concentração de urato salivar em humanos varia muito (40 e 240 μM) e representa mais de 85% da atividade antioxidante total da saliva de indivíduos saudáveis, enquanto que outros 5 a 10% dessa atividade é atribuída à albumina, glutathione, transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina (MOORE et al., 1994). Na defesa contra o estresse oxidativo, além do ácido úrico, destaca-se também a albumina como um dos principais antioxidantes salivares (GREABU et al., 2007).

Por ser de fácil obtenção e manter contato íntimo com as lesões bucais, a análise de marcadores de estresse oxidativo na saliva ganhou importância e passou a ser utilizada para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas DP em humanos (ZIMMERMANN; WONG, 2008). A diminuição do ácido úrico é o principal responsável pelo declínio da capacidade antioxidante salivar na DP humana (MIRICESCU et al., 2013). Entretanto a diminuição do urato salivar na DP não foi confirmada em todos estudos (MIRICESCU et al., 2011), provavelmente porque o urato varia com o sexo (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003) e a função renal (MEUCCI et al., 1998). Especula-se que a TAC salivar pode não diminuir na DP humana devido ao aumento de fluido gengival clevicular (FCG) durante os processos inflamatórios, uma vez que este aumenta a concentração de antioxidante na saliva (BATTINO et al., 2002).

O aumento da peroxidação lipídica da saliva também tem sido utilizado como um indicador de estresse oxidativo na periodontite humana (MIRICESCU et al., 2013). Entretanto até o momento não foi investigada se a maior peroxidação lipídica está associada à maior concentração total de oxidantes salivar e à ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

Nós investigamos a hipótese de que a semelhança ao que é descrito em humanos, o estresse oxidativo da DP canina pode ser detectado na saliva.

2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Para investigar nossa hipótese, foi realizada uma revisão no Portal de Pesquisa da Capes para localizar o banco de dados com maior número de publicação sobre o tema. Em seguida foi realizada uma revisão sistemática no banco de dado selecionado (Pubmed e Google Academic). Para tal, uma pergunta foi estruturada conforme preconizado por Castro (2001):

Pergunta 1: Na doença periodontal canina a saliva pode ser utilizada para avaliar o estresse oxidativo? *situação*: Doença periodontal; *intervenção*: saliva; *desfecho*: estresse oxidativo. Tal pergunta gerou duas estratégias de busca:

1: (((("periodontitis"[MeSH Terms] OR "periodontitis"[All Fields]) OR "periodontal diseases"[MeSH Major Topic]) AND ("saliva"[MeSH Terms] OR "saliva"[All Fields])) AND ("oxidative stress"[MeSH Terms] OR ("oxidative"[All Fields] AND "stress"[All Fields]) OR "oxidative stress"[All Fields]) AND ("animals"[MeSH Terms:noexp] OR "humans"[MeSH Terms])). A busca resultou em 46 artigos.

2: (((("periodontitis"[MeSH Terms] OR "periodontitis"[All Fields]) OR "periodontal diseases"[MeSH Major Topic]) AND ("saliva"[MeSH Terms] OR "saliva"[All Fields])) AND ("oxidative stress"[MeSH Terms] OR ("oxidative"[All Fields] AND "stress"[All Fields]) OR "oxidative stress"[All Fields]) AND "animals"[MeSH Terms:noexp]). A busca resultou duas publicações, sendo apenas um na espécie canina.

Devido à escassez de artigos relacionados a cães, a revisão incluiu a estratégia que contempla todas as espécies (estratégia 1). A revisão sistemática foi realizada no período de 02.01.2015 até 12.08.2015. Não houve limitação quanto ao idioma, data de publicação ou tipo de estudo. Levando-se em consideração a metodologia empregada e a pergunta investigativa, foram selecionados nove artigos que tenham mensurado pelo menos um dos marcadores de estresse oxidativo na saliva ou fluido crevicular gengival (albumina, ácido úrico, bilirrubina, concentração total de oxidante, capacidade antioxidante total) de interesse (Tabela 1).

3 ALTERAÇÕES DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SALIVA E FLUÍDO CREVICULAR GENGIVAL (FCG) NA DOENÇA PERIODONTAL (DP)

Dos nove estudos que investigaram os biomarcadores de estresse oxidativo na saliva e FCG, apenas um foi realizado na espécie canina e oito na DP humana (Tabela 1). A maioria das investigações são recentes, sendo a pioneira realizada em cães (PAVLICA et al., 2004).

Apenas dois estudos utilizaram grupo controle (DALAI et al., 2013; MIRICESCU et al., 2013). Os estudos que investigaram o estresse oxidativo na saliva não padronizaram a forma de classificação da DP, muito embora todos tenham incluído a forma crônica da periodontite (DPC). E esta foi sub-classificada como precoce, avançada, agressiva generalizada, estágio I e II, leve e severa (Tabela 1), trazendo dificuldade para confrontar os resultados obtidos por diferentes autores. Apenas um estudo realizado em cão investigou o estresse oxidativo na gengivite, entretanto este estudo se limitou a quantificar a TAC do FCG (PAVLICA et al., 2004).

Tabela 1 – Resumo de estudos que mensuraram biomarcadores de estresse oxidativo na saliva (S) ou fluido crevicular gengival (FCG) de cães e no homem portadores de doença periodontal. Caracterização por espécie, tamanho amostral (N) de acordo com a classificação da doença, biomarcador mensurado, metodologia e principais resultados.

| Referências | Espécie | N | Biomarcador | Método | Resultados |
|-------------------------------|---------|---|--|--|--|
| Pavlica et al. (2004) | Canina | 22 gengivite 40 periodontite precoce 22 periodontite avançada | TAC – FCG | Randox | ↓TAC- FCG |
| Sculley; Langley-Evans (2003) | Humano | 46 grave 37 moderada 46 leve e saudáveis | Albumina – S | Verde bromocresol | NS |
| Akalin et al. (2007) | Humano | 30 periodontite crônica | TOC-S TOC- FCG MDA-S MDA- FCG | Erel (2005) Erel (2005) HPLC HPLC | ↑TOC-S ↑TOC- FCG ↑MDA-S ↑MDA- FCG |
| Wei et al. (2010) | Humano | 48 periodontite crônica | TOC-S TOC- FCG MDA- FCG | Erel (2005) Erel (2005) HPLC | ↑TOC-S ↑TOC- FCG ↑MDA- FCG |
| Miricescu et al. (2011) | Humano | 20 periodontite crônica 20 Liken planus 20 controle | Ácido úrico - S Albumina - S TAC – S | Colorimétrico Verde bromocresol Randox | NS NS NS |
| Miricescu et al. (2013) | Humano | 20 periodontite crônica 20 controle | MDA – S Ácido úrico - S TAC – S | TBARS Colorimétrico Randox | NS |
| Dalai et al. (2013) | Humano | 16 periodontite estágio I 16 periodontite estágio II 15 controle sem restauração dentária | MDA - S | TBARS | ↓MDA – S Estágio II |
| Baltacioglu et al. (2014) a | Humano | 30 Periodontite crônica 30 Periodontite agressiva | TOC – FCG | Erel (2005) | ↑TOC- FCG |
| Baltacioglu et al. (2014) b | Humano | 33 periodontite crônica 35 agressiva | TOC – S MDA - S | Erel (2005) HPLC | NS ↑ MDA - S |

S- Saliva; FCG- Fluido crevicular gengival; ECL- Eletroquimioluminescência; HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho; TAC – Capacidade de antioxidante total; MDA – Malonaldeído; TBARS – Espécie reativa ao tiobarbitúrico; TOC – Concentração de oxidante total; ↑ aumento significativo; ↓ diminuição significativa; NS diferença não significativa.

O estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidante, entretanto os estudos realizados até o momento apenas avaliou parcialmente este estresse na saliva. A TAC e o ácido úrico salivar só foram mensurados em um único estudo, a albumina em dois, a TOC salivar e a

peroxidação (MDA) em quatro estudos. O confronto dos resultados é limitado também pelo fato das metodologias analíticas variarem entre os estudos (Tabela 1).

Em humanos a principal evidência de estresse oxidativo foi o aumento da peroxidação (MDA) salivar em três estudos, entretanto em um não houve alteração e em outro esse biomarcador diminuiu (Tabela 1). Já três estudos foram concordantes quanto ao aumento da TOC salivar e do FCG. Os dois estudos que mensuraram a albumina salivar não observaram alteração desse biomarcador na DP. Nenhum estudo mensurou a bilirrubina salivar em portadores de DP (Tabela 1).

No soro, na saliva e no FCG a TOC foi maior na DP humana, sugerindo que o estresse oxidativo pode ser local e sistêmico (AKALIN et al., 2007; WEI et al., 2010)

No único estudo realizado em cães foi observado que na periodontite avançada, porém não na gengivite, a TAC do FCG diminuiu. Neste estudo também foi observado que há correlação negativa entre a TAC sérica e o grau de inflamação gengival. A falta de um grupo controle realizado em cães não permite concluir se o estresse oxidativo de fato ocorre na DP (PAVLICA, et al., 2004).

Embora haja suficiente evidências em humanos, porém não em cães, de que a análise dos biomarcadores na saliva pode contribuir para o melhor entendimento do estresse oxidativo na DP, devemos considerar que a maioria dos estudos foram realizados sem controle e em parte são contraditórios.

4. CONCLUSÃO

Com base na revisão sistemática supracitada, concluímos que é necessário realizar investigações sobre biomarcadores oxidantes e antioxidantes na saliva.

REFERÊNCIAS

AKALIN, F. A.; BALTACIOGLU, E.; ALVER, A.; KARABULUT, E. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Journal Clinical Periodontol**, v.34, n.7, p.558-565, 2007.

BALTACIOĞLU, E.; KEHRIBAR, M. A.; YUVA, P.; ALVER, A.; ATAGÜN, Ö. S.; KARABULUT, E.; AKALIN, F. A. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.85, n.2, p.317-326, 2014a.

BALTACIOĞLU, E.; YUVA, P.; AYDIN, G.; ALVER, A.; KAHRAMAN, C.; KARABULUT, E.; AKALIN, F. A. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? **Journal of periodontology**, v. 85, n. 10, p. 1432-1441, 2014b.

BATTINO, M.; FERREIRO, M.S.; GALLARDO, I.; NEWMAN, H.N.; BULLON, P. The antioxidant capacity of saliva. **Journal Clinical Periodontol**, v.29, 189-194, 2002.

BHANSALI, R.S.; YELTIWAR, R.K.; BHAT, K.G. Assessment of peripheral neutrophil functions in patients with localized aggressive periodontitis in the Indian population. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.17, n.6, p.731, 2013.

D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; PARKAR, M.; PATEL, K.; SUVAN, J.; DONOS, N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. **Journal of Dental Research**, v.89, n.11, p.1241-1246, 2010.

DALAI, C.; IGNAT-ROMANUL, I.; ROȘCA, E.; MUSEȘAN, M.; MICLE, O.; BODOG, F. Correlation between histopathological aspects of periodontitis and biochemical changes of oxidative stress. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.54, n.3, p.817-822, 2013.

GREABU, M.; BATTINO, M.; MOHORA M.; TOTAN, A.; SPINU, T.; TOTAN, C.; DIDILESCU, A.; DUTA, C. Could constitute saliva the first line of defence against oxidative stress? **Romanian Journal of Internal Medicine**, v.45, p.209-213, 2007.

KONOPKA, T.; KRÓL, K.; KOPEĆ, W.; GERBER, H. Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Archivum Immunologiae et Therapia e Experimentalis**, v.55, n.6, p.417-425, 2007.

KONUGANTI, K.; SESHAN, H.; ZOPE, S.; SILVIA, W.D. A comparative evaluation of whole blood total antioxidant capacity using a novel nitrobluetetrazolium reduction test in patients with periodontitis and healthy subjects: A randomized, controlled trial. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.16, n.4, p.620, 2012.

MEUCCI, E.; LITTARRU, C.; DELI, G.; LUCIANI, G.; TAZZA, L.; LITTARRU, G.P. Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. **Free Radical Research**, n.29, p.367-376, 1998.

MIRICESCU, D.; GREABU, M.; TOTAN, A.; DIDILESCU, A.; RADULESCU, R. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. **Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology**, v.15, n.2, p.139-143, 2011.

MIRICESCU, D.; TOTAN, A.; CALENIC, B.; MOCANU, B.; DIDILESCU, A.; MOHORA, M.; SPINO, T.; GREABU, M. Salivary biomarkers: Relationship between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, p.1-6, 2013.

MOORE, S.; CALDER K.A.C.; MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant capacity of saliva and periodontal disease. **Free Radical Research**, v.21, p.417-425, 1994.

PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C.R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v.10, n.2, p.255-264, 2005.

PAVLICA, Z.; PETELIN, N.; NEMEC, A.; ERZEN, D.; SKALERIC, U. Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. **American Journal of veterinary research**, v.65, n.11, p.1584-1588, 2004.

SCHENKELS, L.C.P.M.; VEERMAN, E.C.I.; AMERONGEN, A.V.N. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.6, n.2, p.161-175, 1995.

SCULLEY, D. V.; LANGLEY-EVANS, S. C. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. **Clinical Science**, v.105, n.2, p.167-172, 2003.

SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; RAPOSO, S.; AMARAL, C. S.; GIOVANNETTI-MENEZES, N.; SOUSA, C. O.; TORRES, M. C. M.; FERES-FILHO, E. J. Relação entre o tratamento periodontal e o controle metabólico do diabetes mellitus– revisão de literatura. **Periodontia**, v.19, n.3, p.20-25, 2009.

THOMAS, B.; MANDANI, S. M.; PRASAD, B. R.; KUMARI, S. Comparative evaluation of serum antioxidant levels in periodontally diseased patients: an interventional study. **Contemporary clinical dentistry**, v.5, n.3, p.340, 2014.

WEI, D.; ZHANG, X. L.; WANG, Y. Z.; YANG, C. X.; CHEN, G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. **Australian Dental Journal**, v.55, n.1, p.70-78, 2010.

ZIMMERMANN, B.G.; WONG, D.T. Salivary mRNA targets for cancer diagnostics. **Oral Oncology**, v.44, n.5, p.425-429, 2008.

MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA SALIVA DE CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

RESUMO – A doença periodontal (DP) é a enfermidade inflamatória que mais acomete a cavidade oral dos cães. Foram investigadas as hipóteses de que a semelhança ao que é descrito em humanos, a DP em cães causa estresse oxidativo sistêmico associado à ativação dos neutrófilos e que a saliva pode ser utilizada para avaliar este estresse “in loco”. Para tal foram selecionados 20 cães adultos de diferentes raças e sexo, agrupados de acordo com o grau de lesão (gingivite n-6, periodontites leve n-8 e avançada n-6). O grupo controle foi constituído pelos mesmos 20 cães, 30 dias após o tratamento periodontal, todos sem quaisquer alterações no exame físico, perfil bioquímico plasmático e hemograma. Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes foi quantificada a produção de superóxido pelo teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) e a concentração de oxidante total (TOC). A concentração de espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) no plasma foi utilizada para estimar a peroxidação lipídica. O estresse oxidativo local foi avaliado quantificando-se a TOC e a concentração dos principais antioxidantes da saliva (albumina, ácido úrico e bilirrubina). O estresse oxidativo sistêmico na DP ocorreu independentemente do grau de lesão e foi caracterizado pelo aumento da TOC, NBT e TBARS. As alterações dos biomarcadores de estresses oxidativo mensurados na saliva não foram significantes e não apresentaram correlação com os valores obtidos no plasma. Contrariando nossa hipótese inicial, a análise da saliva de cães não expressou claramente o estresse oxidativo causado pela DP.

Palavras-chave: *canino, capacidade antioxidante, fluido salivar, gengivite oxidantes*

OXIDATIVE STRESS MARKERS IN DOGS SALIVA WITH PERIODONTAL DISEASE

ABSTRACT - Periodontal disease (DP) is the most frequent inflammatory illness of the canine oral cavity. We investigated the hypothesis that similar described in humans, dogs DP causes systemic oxidative stress associated with activation of neutrophils and also the saliva can be used to evaluate this stress "in situ". For this purpose we selected 20 adult dogs of different breeds and gender grouped according to the degree of injury (gingivitis, periodontitis light and advanced). The systemic stress was evaluated before and 30 days after periodontal treatment using the methods of quantification of neutrophil superoxide production, the total oxidant concentration (TOC) and plasma lipid peroxidation. The local oxidative stress was evaluated in saliva quantifying the TOC and the concentration of the main antioxidants (albumin, uric acid, bilirubin). The systemic oxidative stress in DP has occurred regardless of the degree of injury and is characterized by TOC increase neutrophil superoxide production and plasma lipid peroxidation. Changes in oxidative stress biomarkers measured in saliva were not significant and did not show correlation with the values obtained in plasma. Contradicting our initial hypothesis, the dog saliva analysis does not clearly expressed oxidative stress caused by DP.

Keywords: *antioxidants, canines, saliva, oxidants, periodontitis*

1 INTRODUÇÃO

A fase inicial da doença periodontal (DP) é caracterizada por inflamação da gengiva, dor, sangramento e halitose devido ao acúmulo de placa bacteriana nas superfícies dentárias (THOMAS et al., 2014). Em humanos as bactérias de lesões da cavidade oral podem migrar para a corrente sanguínea e afetar diversos órgãos vitais (MATTHEWS et al., 2006). Sem tratamento adequado ocorre a destruição do epitélio juncional e a bactéria invade as estruturas mais profundas de suporte, causando periodontite que é considerada a primeira fase irreversível da doença, a partir da qual passa a ser possível apenas estabilizá-la (PIERI; MOREIRA, 2010).

A DP é a enfermidade mais comum da cavidade oral de cães (GORREL, 1998; SANTOS et al., 2012), afeta 80% da população canina (HARVEY; EMILY, 1993). Esta alteração promove uma acentuada resposta inflamatória (AKPINAR et al., 2013), sendo o neutrófilo a célula mais abundante na resposta inicial aos microrganismos da placa bacteriana humana (TAKANE et al., 2005). Grande parte das espécies reativas de oxigênio (ERO) presentes na cavidade bucal do homem derivam do superóxido gerado durante a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e estas ERO exercem importante função de controlar o crescimento bacteriano (BHANSALI et al., 2013).

Um dos componentes da saliva é o fluido crevicular gengival (FCG), constituído de células inflamatórias e fatores derivados do soro bem como a partir de microrganismos na placa subgengival e supragengival (LAMSTER; AHLO, 2007)

Em humanos a saliva possui importante atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica (SCHENKELS et al., 1995). Este fluido exerce capacidade antioxidante e é considerado a primeira linha de defesa contra as ERO produzidas durante o processo de digestão dos alimentos e doenças periodontais (BATTINO et al., 2002). A lesão periodontal se amplifica quando as ERO derivadas do superóxido superam a capacidade antioxidante da saliva (KONUGANTI et al., 2012) que é exercida predominantemente pelo ácido úrico

(BATTINO et al., 2002). Na defesa contra o estresse oxidativo destaca-se também a albumina como um dos principais antioxidantes salivares (GREABU et al., 2007). Em humanos a concentração de urato salivar varia muito (40 e 240 $\mu\text{m/L}$) e representa mais de 85% da atividade antioxidante total da saliva de indivíduos saudáveis e com doenças periodontais, enquanto que outros 5 a 10% dessa atividade é atribuída à albumina, glutatona, transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina (MOORE et al., 1994).

Em humanos com DP o estresse oxidativo sistêmico está bem caracterizado pelo aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (BHANSALI et al., 2013), maior concentração total de oxidante plasmático (WEI et al., 2010; BALTACIOGLU et al., 2014), aumento da peroxidação lipídica plasmática (PANJAMURTHY et al., 2005; DALAI et al., 2013) e declínio da capacidade antioxidante total do plasma (D'AIUTO et al., 2010; THOMAS et al., 2014).

Por ser de fácil obtenção e manter contato íntimo com as lesões bucais, a análise de marcadores de estresse oxidativo na saliva ganhou importância e passou a ser utilizada para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas doenças periodontais crônicas (DPC) em humanos (ZIMMERMANN; WONG, 2008). O ácido úrico é o principal responsável pelo declínio da capacidade antioxidante salivar na DPC humana (MIRICESCU et al., 2013). Entretanto a diminuição de ácido úrico salivar na DPC não foi confirmada em todos estudos (MIRICESCU et al., 2011), provavelmente porque o urato varia com o sexo (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003) e função renal (MEUCCI et al., 1998). Especula-se que a não diferença entre TAC salivar em pacientes com DP e pacientes saudáveis decorre do aumento da quantidade de fluido crevicular gengival (FCG) durante os processos inflamatórios, uma vez que este aumenta a concentração de antioxidante salivar (BATTINO et al., 2002).

O aumento da peroxidação lipídica da saliva também tem sido utilizado como um indicador de estresse oxidativo na periodontite humana (MIRICESCU et al., 2013). Entretanto até o momento não foi mensurada a concentração total

de oxidantes salivar e não é conhecida qual sua relação com a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos já descrito por Bhansali et al. (2013).

Embora a periodontite seja a doença mais comum que acomete a cavidade oral dos cães, estudos semelhantes são escassos nesta espécie. A capacidade antioxidante total do FCG de cães com periodontite avançada diminuiu e no soro correlacionou-se negativamente com o grau de inflamação gengival (PAVLICA et al., 2004).

Nós investigamos a hipótese de que semelhante ao que é descrito em humanos, a DP em cães causa estresse oxidativo sistêmico associado à ativação dos neutrófilos e que a saliva pode ser utilizada para avaliar este estresse oxidativo “in loco”.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado um estudo clínico observacional controlado e não randomizado, de acordo com os princípios éticos em uso de animais do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista (Protocolo FOA-2013-01126).

2.1 Delineamento experimental

Foram selecionados 20 cães (10 machos e 10 fêmeas) adultos, de várias raças, com idade entre dois e 12 anos (Tabela 1), todos portadores de doenças periodontais, sem outras alterações no exame clínico, incluindo hemograma completo e perfil bioquímico plasmático: alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, ácido úrico, albumina, bilirrubina, creatinina, colesterol, fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase, proteína total plasmática, triglicerídeos e ureia. Foram excluídos do estudo animais tratados nas últimas 72 horas com qualquer medicação ou soro positivos para leishmaniose visceral pelo método ELISA (LIMA et al., 2003).

De acordo com os resultados clínicos-laboratoriais e o estado da saúde oral, os cães foram agrupados em três diferentes graus da DP (Tabela 1), sendo que os grupos controles foram constituídos pelos mesmos animais de cada grupo, 30 dias após serem submetidos ao tratamento periodontal.

2.2 Avaliação dos tecidos periodontais e classificação da doença periodontal

Os cães foram classificados de acordo com o grau de doença periodontal: gengivite, periodontite leve (P. Leve) e periodontite avançada (P. Avançada), tendo como base os critérios de Beard e Beard (1989) e Kyllar e Witter (2005). Como critério de classificação para gengivite considerando o aspecto granuloso granuloso à inflamação da gengiva com presença de edema e profundidade de sondagem entre 0,0-1,0mm. Para classificação da periodontite leve considerando a presença de cálculo dentário, edema acentuado, coloração vermelho à púrpura com enrolamento severo de margem; presença de bolsas gengivais de até 3,0mm, e 4,0mm para cães de grande porte. A classificação da periodontite avançada tem como base a presença de edema acentuado, coloração vermelho à púrpura com enrolamento severo de margem; profundidade de sondagem maior que 3,0mm; presença de pus, mobilidade e perda de fixação epitelial, retração gengival e lesão de furca.

A avaliação inicial foi feita com o animal anestesiado no mesmo dia do tratamento e com o auxílio de sonda periodontal milimetrada (Williams - Golgran®) para a realização da profundidade de sondagem, nível de inserção e sangramento. Cada animal passou por um exame específico da cavidade oral e o grau de severidade da doença periodontal registrado em um odontograma específico para espécie canina. As mensurações odontológicas foram feitas por um único profissional treinado com formação em odontologia e medicina veterinária.

A profundidade de sondagem (PS) e o nível de inserção (NI) em milímetros foram mensurados em três pontos na face vestibular de cada dente

analisado (terceiro incisivo, caninos, quarto pré-molares e primeiro molar maxilar e mandibular). Somente o sítio com bolsa mais profunda foi anotado. A PS foi determinada pela mensuração da distância entre margem gengival livre até o limite apical da bolsa. NI foi mensurado pela distância entre junção cimento esmalte até o fundo da bolsa (CANAKCI et al., 2007).

O índice de inflamação gengival (IG) foi determinado para quantificar a severidade da gengivite conforme critérios de Pavlica et al. (2004): sem gengivite (G0), margem gengival com edema e hiperemia (G1), edema mais acentuado com sangramento à sondagem (G2) e sangramento espontâneo (G3). A mensuração do cálculo foi feita por escore de 0 a 3, sendo que 0 ausência do mesmo e 3 cobrindo todo o dente (CORRÊA et al., 1998). A presença de sangramento gengival foi determinada apenas quando um dos dentes apresentou sangramento até 15 segundos pós-sondagem (CANAKCI et al., 2007).

TABELA 1- Valores médios e desvios padrão da profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção (NI), mediana do índice de inflamação gengival (IG), índice de cálculo e sangramento (%) de cães com doença periodontal e controle.

| Parâmetros Clínicos | Gengivite (n=6) | Controle (n=6) | Periodontite leve (n= 8) | Controle (n=8) | Periodontite avançada (n=6) | Controle (n=6) |
|--------------------------|-----------------|----------------|--------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| Peso | 6,39±3,49 | | 15,16±15,46 | | 4,52±2,62 | |
| ♂/♀ | 3/3 | | 4/4 | | 3/3 | |
| PS (mm) | 1,14±0,85a | 0,77±0,75b | 1,84±1,06a | 0,94±0,85b | 1,92±1,02a | 0,68±0,69b |
| NI (mm) | 1,13±0,82a | 0,77±0,75b | 1,85±1,08a | 0,94±0,85b | 1,95±1,07a | 0,72±0,71b |
| IG | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| Índice de Cálculo | 1 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Sangramento (%) | 16,67 | 0 | 50 | 0 | 66,67 | 0 |

Letras desiguais na mesma linha indicam diferença em relação ao controle ($p < 0,05$).

2.3 Colheita e acondicionamento das amostras

Após jejum alimentar (8h) e hídrico (1h) a salivacão foi induzida estimulando o olfato e a visão sempre com a mesma quantidade e marca de petiscos comerciais para cões. A saliva foi obtida introduzindo rolinhos de algodão odontológicos absorventes (Soft plus ®) esterilizados em toda a superfície gengival (superior e inferior) vestibular e lingual. Posteriormente os rolinhos contendo a saliva foram colocados em tubo de ensaio (10mL), sobre microtubo cônicos de polipropileno (1,5 mL) sem tampa e com o fundo vazado. Após 10 minutos de centrifugação (5000xg), o sobrenadante da saliva filtrado do algodão foi aspirado e acondicionado em microtubo de polipropileno protegido da luz. Todas as análises laboratoriais da saliva foram realizadas imediatamente após sua obtenção.

Utilizando-se agulhas hipodérmicas e seringas descartáveis, por punção da veia jugular, quatro mililitros foram acondicionados em tubos contendo heparina sódica (10 UI/mL de sangue) (Vacutainer plus plastic Heparin, Becton-Dickson, New Jersey, USA) para realização do perfil bioquímico e marcadores de estresse oxidativo. O plasma obtido foi armazenado a -20°C protegido da luz até o momento das análises (máximo dois meses) Para a realização do hemograma, meio mililitro de sangue total foi acondicionada em tubo plástico contendo anticoagulante na proporção de 1,8mg EDTA-sódico/mL de sangue.

2.4 Tratamento periodontal

Todos os cões foram medicados por sete dias com Espiramicina (750.000 UI) associado com Metronidazol (125 mg), sendo a primeira dose realizada três dias antes do tratamento periodontal. Todos os cões foram induzidos à anestesia com propofol e mantidos em anestesia geral inalatória (isofluorano 1,5%) a fim de realizar a terapia periodontal, conforme recomendações de Harvey e Emily (1993). A terapia foi realizada em uma única sessão e por um único profissional treinado. Para tal, foi utilizado ultrassom odontológico (Gnatus, Jet Sonic®) e

curetas (Perio Gracey Millennium - Goldran) para a remoção da placa bacteriana e do cálculo dentário sub e supragengival. Para o polimento e alisamento da superfície dentária foram utilizadas escovas de Robson (Micromotor Marathon M-3 Mighty®) e pasta profilática composta de pedra pomes e gel fluoreto de sódio a 2%.

2.5 Análises laboratoriais

A contagem de leucócitos, eritrócitos e a concentração de hemoglobina foram determinadas com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China). O volume globular foi obtido pelo método microcapilar de Strumia (56682g/5min). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos tingidos com corante hematológico panótico rápido comercial (Instant-Prov, NEWPROV, Pinhais- PR.), segundo as recomendações e critérios de Jain (1986).

Todas as análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em analisador bioquímico automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China), previamente ajustado com calibrador comercial controles níveis I e II (Biosystems, Barcelona, Spain). Utilizando conjunto de reativos comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain), foi mensurada a concentração plasmática de ácido úrico pelo método enzimático (uricase/peroxidase); albumina pelo método do verde de bromocresol; ALT e AST pelo método enzimático UV (glutamato desidrogenase); bilirrubina total pelo método sulfanílico diazotado; colesterol pelo método enzimático (colesterol oxidase/peroxidase); creatinina pelo método cinético (picrato alcalino); proteína total plasmática pelo método do biureto; triglicerídeos pelo método do glicerol fosfato oxidase/peroxidase e ureia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

Para avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos foi quantificada a produção neutrofílica de superóxido pelo teste citoquímico de redução espontânea do NBT descrito por Bosco et al. (2012) com tempo de incubação de 30 minutos à 37°C.

A concentração oxidante total (TOC) no plasma e na saliva foi determinada colorimetricamente usando Laranja de Xilenol, conforme Erel (2005) e os resultados foram expressos em μmol de peróxido de hidrogênio equivalente/L.

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pelo método de TBARS, conforme Hunter e Mohamed (1986), com auxílio de uma leitora ELISA automática (Robonik, Elisa Plate Analyser, Índia) e absorvância 540 nm.

2.6 Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto à normalidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) e homocedasticidade (Teste Bartlett). A significância das diferenças quanto ao sexo foram determinadas pelo teste de Mann Whitney. O teste T pareado foi utilizado para determinar a diferença entre as concentrações dos biomarcadores do plasma e saliva. A significância das diferenças dos biomarcadores das três formas de DP em relação aos seus respectivos grupos controles foi determinada teste de T pareado. A ANOVA com pós-teste de Tukey foi empregada para calcular a significância das diferenças dos biomarcadores mensurados nas três formas de DP. Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio de um programa computacional estatístico (Graphpad InStat software 3.0), sendo consideradas significantes as diferenças com $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

As alterações dos parâmetros clínicos dos 20 cães selecionados (Tabela 2) permitiram diferenciar os pacientes em três grupos de doenças periodontais. A profundidade de sondagem, nível de inserção e cálculos dentários foram inferiores

em cães com gengivite. O índice de gengivite foi maior na periodontite avançada e o sangramento aumentou conforme o avanço da doença periodontal (Tabela 1).

Os cães do grupo controle apresentaram valores de PS, NI e IG dentro da faixa de normalidade descritos para espécie (BEARD; BEARD, 1989; KYLLAR; WITTER, 2005) e não apresentaram sangramento e cálculos dentários (Tabela 1). Os demais parâmetros laboratoriais também corresponderam aos valores de normalidade da espécie considerados para o hemograma (JAIN, 1986) e perfil bioquímico (KANEKO et al., 1997).

Os marcadores de estresse oxidativo da saliva de cães não diferiram significativamente ($p>0,05$) quanto ao sexo (Tabela 2).

TABELA 2 – Médias, desvios padrão e intervalo de confiança 95% dos biomarcadores de estresse oxidativo da saliva de cães do grupo controle conforme o sexo.

| Marcadores | Fêmeas | Machos | p-value |
|-----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------|
| Ácido Úrico (mmol/L) | 0,02±0,01 (0,01-0,03) | 0,03±0,02 (0,01-0,04) | 0,3672 |
| Albumina (g/L) | 0,74±0,32 (0,50-0,99) | 0,75±0,29 (0,54-0,96) | 0,6242 |
| Bilirrubina (µmol/L) | 2,40±2,73 (0,44-4,34) | 3,48±3,71 (0,84-6,14) | 0,8497 |
| TOC (µmol/L) | 7,00±4,75 (2,02-11,99) | 14,05±10,77 (2,74-25,36) | 0,1736 |

TOC= concentração oxidante total.

Cães com DP apresentaram uma maior produção neutrofílica de superóxido, sendo que a porcentagem de neutrófilos redutores de NBT só foi significativa na periodontite leve (Figura 1).

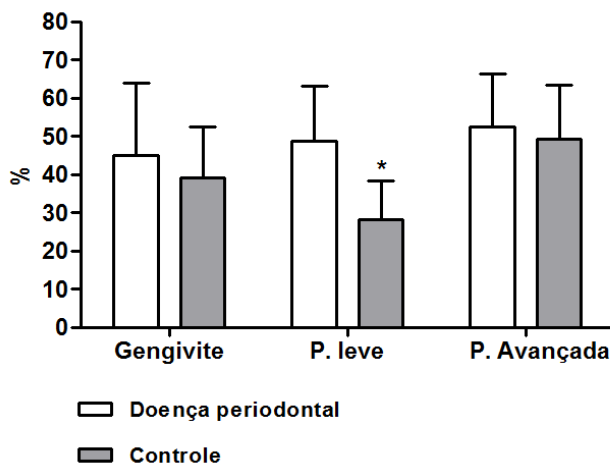


FIGURA 1 – Produção de superóxido estimado pela porcentagem (%) de neutrófilos redutores do tetrazólio nitroazul (NBT) de cães controle, com gengivite, periodontite leve (P. leve) e avançada (P. avançada).

A maioria dos cães com DP apresentaram valores plasmáticos de TBARS mais elevados (90%), entretanto tal diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

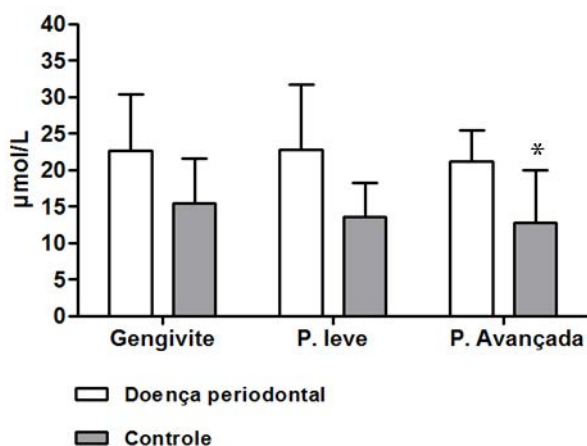


FIGURA 2 - Peroxidação lipídica plasmática quantificada pela concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em cães controle, com gengivite, periodontite leve (P. leve) e avançada (P. avançada).

Todos os biomarcadores de estresse oxidativo quantificados na saliva apresentaram grande variabilidade (Tabela 3). A albumina e a TOC do plasma foram maiores que os da saliva, enquanto que o ácido úrico e a bilirrubina salivar não diferiram das concentrações plasmáticas (Tabela 3). Entretanto, não houve

correlação significativa entre as concentrações salivares e plasmáticas ($p>0,05$) de nenhum dos marcadores de estresse oxidativo mensurados.

TABELA 3 - Médias, desvios padrão e intervalo de confiança a 95% dos biomarcadores de estresse oxidativo da saliva e do plasma de cães controle.

| Marcadores | Saliva (n=20) | Plasma (n=20) | p-value |
|-----------------------------|----------------------------|-------------------------------|----------------|
| Ácido Úrico (mmol/L) | 0,03±0,03 (0,02-0,05) | 0,03±0,02 (0,02-0,04) | 0,8906 |
| Albumina (g/L) | 0,74±0,29 (0,60-0,89) | 32,95±3,21 (31,40-34,50) | 0,0001 |
| Bilirrubina (µmol/L) | 2,94±3,22 (1,44-4,45) | 2,17±2,16 (1,16-3,18) | 0,2305 |
| TOC (µmol/L) | 10,53±8,74 (4,97-16,08) | 91,56±76,02 (54,91-128,21) | 0,0025 |

TOC= concentração oxidante total.

Os dois principais antioxidantes salivares (ácido úrico e albumina) não diferiram nas três DP (Figura 3). Comparada à gengivite, a concentração de bilirrubina salivar de cães com periodontite foi menor. Já a TOC na saliva de cães com periodontite leve foi maior, entretanto nenhuma dessas diferenças foram significativas (Figura 3).

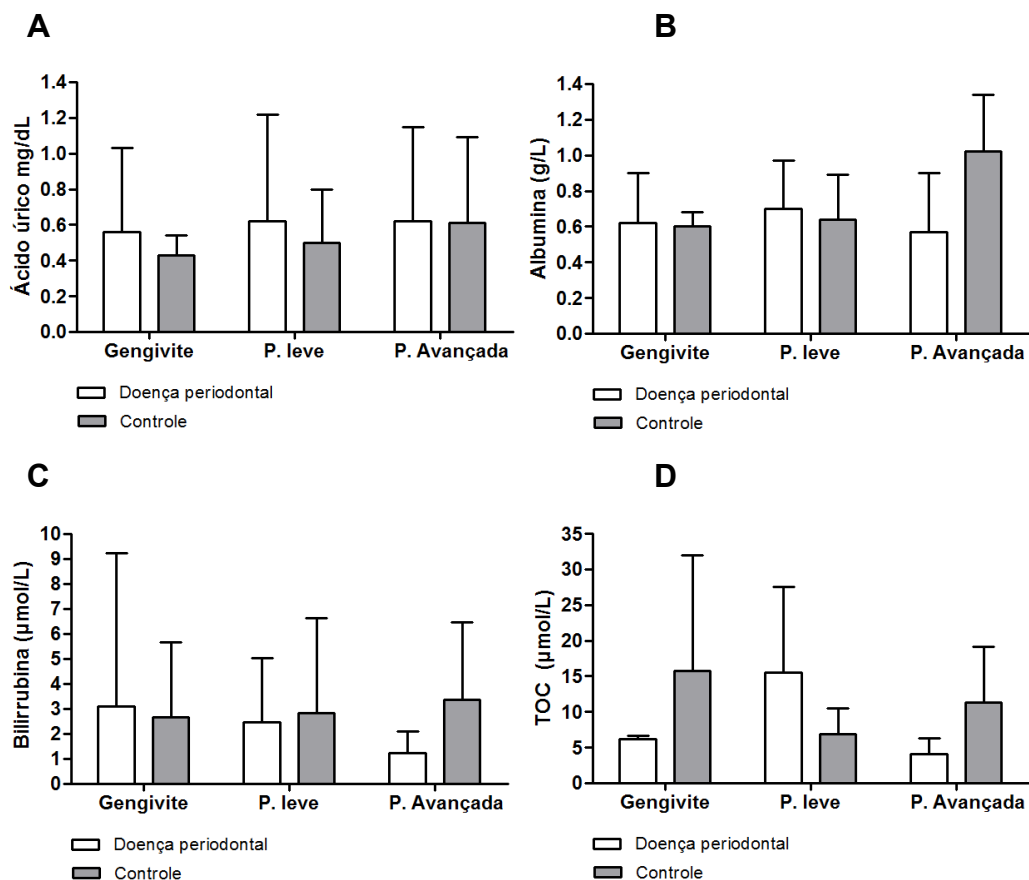


FIGURA 3 - Marcadores de estresse oxidativo salivar: ácido úrico (A), albumina (B), bilirrubina (C) e TOC (D) de cães com gengivite, periodontite leve e avançada, na doença periodontal e controle.

4. DISCUSSÃO

Os valores plasmáticos dos antioxidantes albumina, bilirrubina e ácido úrico do grupo controle ficaram dentro da faixa de normalidade descrita para espécie (KANEKO et al., 1997) e a TOC plasmática foi similar aos de cães saudáveis (ALMEIDA et al., 2013). Os valores de PS, NI e IG estavam dentro dos valores de referência da espécie, associado à ausência de sangramento e cálculos dentários. O conjunto desses resultados confirmam a eficiência do tratamento e a boa saúde bucal do Grupo controle.

Para fins de comparação, não encontramos qualquer outro estudo sobre marcadores de estresse oxidativo na saliva de cães com DP, sendo

provavelmente este o primeiro registro de valores de albumina, bilirrubina, ácido úrico e TOC salivar em cães.

A saliva tem sido utilizada para avaliar o estresse oxidativo de doenças periodontais em humanos (MIRICESCU et al., 2011; MIRICESCU et al., 2013), sendo que a composição da saliva em humano varia com o sexo (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003) e com a forma de colheita (NAGLER et al., 2002). Embora a DP canina seja muito comum, nesta espécie até o momento a saliva não foi utilizada para avaliar o estresse oxidativo e não se sabe quais os fatores que interferem na composição salivar. Diferentemente do que é relatado em humanos, os biomarcadores salivares avaliados não diferiram quanto ao sexo em cães.

O neutrófilo é a primeira linha de defesa contra infecções e nos processos inflamatórios seu metabolismo oxidativo é ativado, gerando grandes quantidades de superóxidos e outras ERO que exercem importante função bactericida (BABIOR et al., 2000). Não há consenso sobre o papel do metabolismo dos neutrófilos nas doenças periodontais. Há relato de que na periodontite humana o metabolismo oxidativo dos neutrófilos aumenta (MATTHEWS et al., 2006). Diferentemente, noutro estudo não foi observado alteração da capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT sob estímulo em paciente humanos com periodontite (TAPASHETTI et al., 2013). Nós observamos que em cães a produção neutrofílica de superóxido foi maior em todas as doenças periodontais. Esta é provavelmente a primeira evidência de que os neutrófilos são importantes fontes de oxidantes nas DP dos cães, especialmente na periodontite leve.

O excesso de oxidante tem sido associado ao aumento da peroxidação lipídica plasmática em DP em humanos (GUENTSCH et al., 2008), porém até o momento não se conhece qual a contribuição do metabolismo oxidativo dos neutrófilos no aumento de TBARS plasmático nos cães. O tratamento periodontal utilizado para constituir o grupo controle promoveu uma diminuição na produção neutrofílica de superóxido e TBARS na grande maioria dos cães. Estes resultados fortalecem a hipótese de que em cães a peroxidação lipídica

plasmática nas DP é resultante, pelo menos em parte, do aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos.

O aumento de TBARS plasmático e da produção neutrofílica de superóxido no sangue caracterizam um quadro de estresse oxidativo sistêmico ainda não descrito na DP canina. Devido a facilidade de obtenção e seu contato direto com as lesões bucais, a análise de marcadores de estresse oxidativo na saliva vem sendo preconizada para melhor compreender a fisiopatogenia das DP em humanos (MIRICESCU et al., 2011; MIRICESCU et al., 2013), porém não foram encontrados estudos em cães com periodontite. A concentração de albumina na saliva de cães é muito menor do que a do plasma. Já as concentrações de ácido úrico e de bilirrubina salivar foram similares às do plasma, porém não apresentaram correlação entre si. Esta ausência de correlação sugere que a síntese e ou o consumo desses biomarcadores diferem nestes dois fluidos.

Estudos em humanos, porém não em cães, tem utilizado o ácido úrico e a albumina salivar como marcadores de estresse oxidativo (SCULLEY.; LANGLEY-EVANS, 2003; MIRICESCU et al., 2011). Embora os resultados desses estudos sejam contraditórios, há consenso sobre a importância da análise dos antioxidantes na saliva para melhor avaliar o estresse oxidativo da DP. O ácido úrico, porém não a albumina salivar aumenta de acordo com o grau da DP em humanos (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003), de modo contrário, Miricescu et al. (2011) relataram diminuição de ambos antioxidantes na saliva. Até o momento o papel da bilirrubina salivar da DP não foi investigada em nenhuma espécie. Nós observamos uma grande variabilidade desse biomarcador em cães, de modo que não foi possível detectar diferenças significativas desses antioxidantes em relação ao grau da DP. Entendemos que não é possível excluir o potencial valor da quantificação dos antioxidantes na saliva de cães para avaliar as DP, uma vez que é sabido que estes marcadores variam de acordo com o estímulo empregado para obtenção da amostra salivar (NAGLER et al., 2002), com o sexo e a contaminação da amostra com sangue (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003). A grande variabilidade dos resultados é

um fator que limita o uso desses antioxidantes salivares como biomarcadores de estresse oxidativo na DP canina. Uma limitação observada foi que os cães respondem de modo bastante variado à um mesmo estímulo empregado para induzir a salivação.

A TOC plasmática foi maior que a salivar em cães do grupo controle, provavelmente devido ao plasma refletir a produção de oxidantes de todos os tecidos corpóreos, enquanto que a saliva expressa a produção do tecido periodontal. Diferentemente dos antioxidantes mensurados (albumina, ácido úrico e bilirrubina) que são sintetizados no fígado (ROWLANDS, 1980), os oxidantes são continuamente produzidos nas glândulas salivares e principalmente nos tecidos periodontais lesionados (LOHINAI et al., 1998), o que torna a TOC salivar um biomarcador mais sensível para detectar o estresse oxidativo das DP. Fortalecendo esta hipótese, dentre todos os biomarcadores mensurados, a TOC foi o que melhor refletiu o estresse oxidativo na saliva. Os cães com gengivite apresentaram maior TOC salivar que os da periodontite leve e este menor que os da periodontite avançada. Portanto, é razoável supor que o aumento da TOC esteja melhor associado à extensão da lesão do que propriamente ao grau da lesão na DP canina.

Contrariando nossa hipótese inicial, a análise da saliva não expressou claramente este estresse oxidativo sistêmico observado nos cães com DP. Essa foi provavelmente a primeira investigação que comprovou ser possível quantificar os marcadores de estresse oxidativo na saliva de cães com DP. Assim como em humanos, acreditamos que o valor da saliva como marcador de estresse oxidativo na DP canina é promissora, para tal se faz necessários ampliar a investigação e melhor padronizar a forma de colheita da saliva, levando em consideração as diferenças raciais e alimentares. Uma vez comprovado que a DP causa estresse oxidativo em cães, torna-se necessário aprofundar as investigações no sentido de melhor entender seus mecanismos e prováveis complicações clínicas decorrentes desse desequilíbrio entre oxidante e antioxidante. Os resultados obtidos são um alerta para que os clínicos veterinários deem maior atenção à saúde oral, evitando dessa maneira

complicações que potencialmente podem ser ocasionadas pelo estresse oxidativo sistêmico da DP.

5 CONCLUSÃO

A DP em cães causa estresse oxidativo sistêmico e ativação dos neutrófilos. Diferentemente do plasma sanguíneo, a quantificação da concentração total de oxidante e dos principais antioxidante da saliva não foram capazes de detectar o estresse oxidativo que ocorre na DP canina.

REFERÊNCIAS

AKPINAR, A.; TOKER, H.; OZDEMIR, H.; BOSTANCI, V.; AYDIN, H. The effects of non-surgical periodontal therapy on oxidant and anti-oxidant status in smokers with chronic periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v.58, n.6, p.717-723, 2013.

ALMEIDA, B.F.M.; NARCISO, L.G.; MELO, L.M.; PREVE, P.P.; BOSCO, A.M.; LIMA, V.M.; CIARLINI, P.C. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v.198, n.3, p.599-605, 2013.

BABIOR, B.M. Phagocytes and oxidative stress. **American Journal of Medicine**, v.109, p.33-44, 2000.

BALTACIOĞLU, E.; KEHRIBAR, M.A.; YUVA, P.; ALVER, A.; ATAGÜN, Ö. S.; KARABULUT, E.; AKALIN, F. A. Total oxidant status and bone resorption biomarkers in serum and gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.85, n.2, p.317-326, 2014.

BATTINO, M.; FERREIRO, M.S.; GALLARDO, I.; NEWMAN, H.N.; BULLON, P. The antioxidant capacity of saliva. **Journal Clinical Periodontol**, v.29, p.189-194, 2002.

BEARD, G.B.; BEARD, D.M. Geriatric dentistry. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.19, n.1, p.49-74, 1989.

BHANSALI, R.S.; YELTIWAR, R.K.; BHAT, K.G. Assessment of peripheral neutrophil functions in patients with localized aggressive periodontitis in the Indian population. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.17, n.6, p.731, 2013.

BOSCO, A. M.; COUTO, R.; PEREIRA, P. P.; ALMEIDA, B. F. M.; CIARLINI, P. C. Clinical value of nitrobluetetrazolium test (NBT) in the diagnosis of canine inflammatory processes. **Ars Veterinaria**, v.28, n.3, p.161-168, 2012.

CANAKCI, V.; YILDIRIM, A.; CANAKCI, C.F.; ELTAS, A.; CICEK, Y; CANAKCI, H. Total antioxidant capacity and antioxidant enzymes in serum, saliva, and gingival crevicular fluid of preeclamptic women with and without periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.78, n.8, p.1602-1611, 2007.

CASTRO, A. A. **Revisão sistemática e meta-análise**. 2001. Disponível em: <<http://metodologia.org/wp-content/uploads/2010/08/meta1.PDF> > Acesso em: 31 de julho de 2015.

CORRÊA, H.L.; VENTURINI, M.; GIOSO, M. Cálculo dentário subgingival. **Clínica veterinária**, v.3, n.13, p.23-26, 1998.

D'AIUTO, F.; NIBALI, L.; PARKAR, M.; PATEL, K.; SUVAN, J.; DONOS, N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. **Journal of Dental Research**, v.89, n.11, p.1241-6, 2010.

DALAI, C.; IGNAT-ROMANUL, I.; ROȘCA, E.; MUSEȘAN, M.; MICLE, O.; BODOG, F. Correlation between histopathological aspects of periodontitis and biochemical changes of oxidative stress. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v.54, n.3, p.817-822, 2013.

EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v.38, n.12, p.1103-1111, 2005.

GOREL, C. Periodontal disease and diet in domestic Pets. **The Journal of Nutrition**, 128: 2712S–2714S, 1998.

GREABU, M.; BATTINO, M.; MOHORA M.; TOTAN, A.; SPINU, T.; TOTAN, C.; DIDILESCU, A.; DUTA, C. Could constitute saliva the first line of defence against oxidative stress? **Romanian Journal of Internal Medicine**, v.45, p.209-213, 2007.

GUENTSCH, A.; PRESHAW, P.M.; BREMER-STRECK, S.; KLINGER G.; GLOCKMANN E.; BERND W. Sigusch Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. **Clinical Oral Investigations**, n.12, p.345–352, 2008.

HARVEY, C.E.; EMILY, P.P. Small animal dentistry. In: _____ **Periodontal disease**. 1 ed. Sta Luis: Mosby, 1993. cap.4, p.89-144.

HUNTER, M.I.; MOHAMED, J.B. Plasma antioxidants and lipid peroxidation products in Duchenne muscular dystrophy. **Clinica Chimica Acta**, v.155, p.123-131, 1986.

JAIN, N. C. Hematologic techniques. In: JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.2, 1986. p.20-86.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. California: Academic Press, 1997.

KONUGANTI, K.; SESHAN, H.; ZOPE, S.; SILVIA, W.D. A comparative evaluation of whole blood total antioxidant capacity using a novel nitrobluetetrazolium reduction test in patients with periodontitis and healthy subjects: A randomized, controlled trial. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v.16, n.4, p.620, 2012.

KYLLAR, M.; WITTER, K. Prevalence of dental disorders in pet dogs. **Veterinarni Medicina-Praha**, v.50, n.11, p.496, 2005.

LAMSTER, I.B.; AHLO, J.K. Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. **Annals of New York Academy of Science**, v.1098, p.216-229, 2007.

LIMA, V.M.F.; GONÇALVES, M.E.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, n.4, p.485-489, 2003.

LOHINAI, Z.; BENEDEK, P.; FEHÉR, E.; GYÖRFI, A.; ROSIVALL, L.; FAZEKAS, A.; SALZAMAN, A.L.; SZABÓ, C. Protective effects of mercaptoethylguanidine, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase, in ligature-induced periodontitis in the rat. **British Journal of Pharmacology**, 123, p.353-360 1998.

MATTHEWS, J.B.; WRIGHT, H.J.; ROBERTS, A.; COOPER, P. R.; CHAPPLE, I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.147, n.2, p.255-264, 2006.

MEUCCI, E.; LITTARRU, C.; DELI, G.; DELI G.; LUCIANI G., TAZZA L.; LITTARRU G. P. Antioxidant status and dialysis: plasma and saliva antioxidant activity in patients with fluctuating urate levels. **Free Radical Research**, n.29, p.367–376, 1998.

MIRICESCU, D.; GREABU, M.; TOTAN, A.; DIDILESCU, A.; RADULESCU, R. The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. **Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology**, v.15, n.2, p.139-143, 2011.

MIRICESCU, D.; TOTAN, A.; CALENIC, B.; MOCANU, B.; DIDILESCU, A.; MOHORA, M.; SPINO, T.; GREABU, M. Salivary biomarkers: Relationship

between oxidative stress and alveolar bone loss in chronic periodontitis. **Acta Odontologica Scandinavica**, p.1-6, 2013.

MOORE, S.; CALDER K.A.C.; MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.A. Antioxidant capacity of saliva and periodontal disease. **Free Radical Research**, v.21, p.417-425, 1994.

NAGLER, R.M.; KLEIN, I.; ZARZHEVSKY, N.; DRIGUES, N.; REZNICK, A.Z. Characterization of the differentiated antioxidant profile of human saliva. **Free Radical Biology & Medicine**, v.32, n.3, p.268–277, 2002.

PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C.R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cellular e Molecular Biology Letters**, v.10, n.2, p.255-264, 2005.

PAVLICA, Z.; PETELIN, N.; NEMEC, A.; ERZEN, D.; SKALERIC, U. Measurement of total antioxidant capacity in gingival crevicular fluid and serum in dogs with periodontal disease. **American Journal of veterinary research**, v.65, n.11, p.1584-1588, 2004.

PIERI, F.A.; MOREIRA, M.A.S. Doença periodontal em cães e prevenção. **Clínica Veterinária**, v.15, n.89, p.42-52, 2010.

ROWLANDS, G.J. A review of variations in the concentrations of metabolites in the blood of beef and dairy cattle associated with pathology, nutrition and disease, with particular reference to the interpretation of metabolic profiles. **World Review Nutrition ad Dietetics**, v.35, p.172-235, 1980.

SANTOS, N.S.; CARLOS, R.S.A.; ALBUQUERQUE, G.R. Doença periodontal em cães e gatos - revisão de literatura. **Medvep - Revista de medicina**

veterinária - Pequenos animais e animais de estimação, v.10, n.32, p.30-41, 2012.

SCHENKELS, L.C.P.M.; VEERMAN, E.C.I.; AMERONGEN, A.V.N. Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.6, n.2, p.161-175, 1995.

SCULLEY, D.V.; LANGLEY-EVANS, S.C. Periodontal disease is associated with lower antioxidant capacity in whole saliva and evidence of increased protein oxidation. **Clinical Science (Lond)**, v.105, n.2, p.167-172, 2003.

TAKANE, M.; SUGANO, N.; EZAWA, T.; UCHIYAMA, T.; ITO, K. A marker of oxidative stress in saliva: association with periodontally-involved teeth of a hopeless prognosis. **Journal of Oral Science**, v.47, n.1, p.53-57, 2005.

TAPASHETTI, R.P.; SHARMA, S.; PATIL, S.R.; GUVVA, S. Potential effect of neutrophil functional disorders on pathogenesis of aggressive periodontitis. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v.14, n.3, p.387-393, 2013.

THOMAS, B.; MANDANI, S.M.; PRASAD, B.R.; KUMARI, S. Comparative evaluation of serum antioxidant levels in periodontally diseased patients: an interventional study. **Contemporary clinical dentistry**, v.5, n.3, p.340, 2014.

WEI, D.; ZHANG, X.L.; WANG, Y.Z.; YANG, C. X.; CHEN, G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. **Australian Dental Journal**, v.55, n.1, p.70-78, 2010.