

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

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM
DOENÇA PERIODONTAL**

Daniela Matono
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2015

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

**ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM
DOENÇA PERIODONTAL**

Daniela Matono

Orientador: Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini

Co-orientador: Luciano Tavares Angelo Cintra

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

Matono, Daniela

M427e

Estresse oxidativo sistêmico em cães com doença periodontal /
Daniela Matono.

Araçatuba: [s.n], 2015
44f. il.; CD-ROM

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

Orientador: Prof Adj. Pauli César Ciarlini
Co-orientador: Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Espécie reativa de oxigênio. 2. Odontologia - veterinária, 3.
Periodontite 4. Oxidantes. 5. Antioxidantes. I. T.

CDD 571.94

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Estresse oxidativo sistêmico em cães com doença periodontal.

AUTORA: DANIELA MATONO

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.


Dr. JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA


Dr. WAGNER LUIS FERREIRA


Dr. PAULO CÉSAR CIARLINI

DATA DA REALIZAÇÃO: 30 de julho de 2015.



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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DANIELA MATONO – Natural de Bauru, São Paulo, nascida em 02 de abril de 1985, filha de Nelson Yoshiaki Matono e Marlene de Fátima Michelin Matono. Em 2003, ingressou no curso de Odontologia na Faculdade de odontologia, UNESP - FOA, *Campus* Araçatuba- SP, onde se graduou como cirurgiã dentista em 2007. No mesmo ano ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Paulista - UNIP, *Campus* Bauru- SP, onde se graduou como Médica Veterinária em 2012 com Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Aspectos relacionados à saúde bucal de cães atendidos na Clínica Veterinária da UNIP - Bauru” sob orientação do Prof. Dr. Fernando Toledo de Oliveira. Ingressou no curso de Pós-graduação em Ciência Animal, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, na Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP - FMVA, *Campus* de Araçatuba – SP, em março de 2013, sob orientação do Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini, obtendo bolsa de mestrado vinculada à CAPES. Desde então tem participado dos Projetos de Pesquisa do grupo com os temas relacionados a estresse oxidativo e metabolismo oxidativo.

“Se não podemos controlar o vento, controle o veleiro”.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Marlene e Nelson Matono, por acreditarem e apoiarem as minhas escolhas. Graças a vocês realizei o meu sonho de ser médica veterinária e seguir a carreira como professora, tendo sempre como referência meu querido professor chamado pai;

A minha irmã, Andréa Matono, sempre ao meu lado. E meu querido irmão Rafael Matono, meu eterno irmãozinho no coração, porém “irmãozão” de tamanho. Amo vocês;

A toda minha família, meu eterno amor e gratidão por todos os momentos compartilhados e conhecimentos adquiridos. Em especial minha tia Nanci Matono e minha falecida avó Kaoro Matono que não me viu realizar o sonho de ser médica veterinária;

Ao meu amigo, namorado e noivo Arthur Malaspina, não por ser meu amigo mais antigo, mas por ser o melhor. Sorrímos, gargalhamos, choramos e brigamos. Juntos e sempre no meu coração. Mesmo não entendendo nada sobre o assunto me auxiliou na parte gramatical deste trabalho e me fez encontrar um novo “eu”: escritora de texto literário;

Aos meus cachorros Biscoito e o falecido Bam-Bam por serem os meus primeiros pacientes. E o novo membro da família, Doce, cachorra que minha mãe pegou na rua;

Aos animais que participaram desse estudo e seus proprietários;

Aos meus amigos de Bauru: obrigada por estarem sempre comigo e não deixarem que a distância física entre nós seja motivo para que exista uma distância real;

Ao meu orientador de mestrado Prof. Adjunto Paulo César Ciarlini pela confiança, apoio, orientação e ensinamentos emitidos. Pelo seu exemplo de dedicação, de amor à profissão, pela sua ética e comprometimento com o ensino. Ao meu co-orientador Luciano Tavares Angelo Cintra por me aceitar nessa nova jornada.

Aos amigos do Laboratório Clínico Veterinário do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal: Anelise Bosco, Lillian Baptistioli, Rafaela Torrecilha, Mirtes Rosa da Silva, Luciana de Moraes, Gabriela Quideroli, Priscila Preve e Laine Gabas.

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	
1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	12
2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA.....	13
3 O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃO E HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL.....	14
4 O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃO E HUMANOS ANTES E APÓS O TRATAMENTO PERIODONTAL.....	19
5 CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL	
1 INTRODUÇÃO.....	26
2 MATERIAL E MÉTODO.....	27
2.1 Seleção dos animais.....	27
2.2 Delineamento experimental.....	27
2.3 Avaliação dos tecidos periodontais e classificação da doença periodontal.....	28
2.4 Tratamento periodontal.....	30
2.5 Colheita e acondicionamento das amostras.....	30
2.6 Análises laboratoriais.....	31
2.7 Análise estatística.....	32
3 RESULTADOS.....	33
3.1 Perfil clínico-laboratorial das doenças periodontais.....	33

3.2 O estresse oxidativo nas doenças periodontais	33
4 DISCUSSÃO.....	36
5 CONCLUSÃO.....	37
6 REFERÊNCIAS.....	38

ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

RESUMO - A doença periodontal (DP) é a patologia mais comum da cavidade oral em cães é inflamatória, crônica e infecciosa, sendo responsável pela produção de espécie reativa de oxigênio (ERO). O excesso de ERO pode levar à situação denominada estresse oxidativo, ou seja, desequilíbrio dos oxidantes e antioxidantes. Foi realizada revisão sistemática sobre DP e estresse oxidativo para investigar a hipótese de que na DP canina há estresse oxidativo e que este varia com o grau da doença. Para tal, foram selecionados 22 cães com DP, todos adultos, de diferentes raças e sexos. O grupo controle foi constituído pelos mesmos cães, 30 dias após o tratamento periodontal, todos sem quaisquer alterações no exame físico e laboratorial. Para avaliar o estresse oxidativo foi quantificada a capacidade antioxidante total do sangue (TAC), antioxidantes plasmáticos, a concentração total de oxidante plasmático (TOC), o índice de estresse oxidativo, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos circulantes (produção de superóxido pelo teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul- NBT) e a peroxidação lipídica plasmática (concentração de espécies reativas ao tiobarbitúrico – TBARS). Estudos relacionando o estresse oxidativo e DP ainda são escassos na espécie canina, sendo que humanos com periodontite apresentavam maior estresse oxidativo comparado ao grupo controle. O estresse oxidativo na DP canina foi confirmado nas periodontites (decréscimo de TAC e maior produção neutrofílica de superóxido), porém tais alterações não diferiram quanto ao grau da lesão e não foram significativas nas gengivites. Esta é provavelmente a primeira evidência de que o estresse oxidativo sistêmico ocorre na periodontite canina e que os neutrófilos podem contribuir para o desequilíbrio entre antioxidante e oxidante nesta doença.

Palavras chaves: espécie reativa de oxigênio, odontologia – veterinária, periodontite, oxidantes, antioxidantes.

SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN DOGS WITH PERIODONTAL DISEASE

SUMMARY - Periodontal disease (PD) is the most common disease of the oral cavity in dogs is inflammatory, chronic and infectious and is responsible for the production of reactive species of oxygen (ROS). Excessive ROS can lead to the situation known as oxidative stress, or imbalance of oxidants and antioxidants. Systematic review was performed on PD and oxidative stress to investigate the hypothesis that the canine PD suffers oxidative stress and this varies with the degree of the disease. To this end, we selected 22 dogs with PD, all adults, of different races and genders. The control group was made up of the same dogs, 30 days after periodontal treatment, all without any changes in physical and laboratorial examination. To evaluate oxidative stress was measured the full blood antioxidant capacity (TAC), plasma antioxidant, the total concentration of plasma oxidant (OCD), oxidative stress index, oxidative metabolism of circulating neutrophils (superoxide production by cytochemical test of reduction of nitroblue tetrazolium - NBT) and plasma lipid peroxidation (concentration of thiobarbituric reactive species - TBARS). Studies linking oxidative stress and PD are still rare in dogs, and humans with periodontitis has more oxidative stress compared to the control group. Oxidative stress in dogs PD was confirmed in peridontites (TAC decrease and increased neutrophil superoxide production), but these changes did not differ as to the degree of injury and were not significant in gingivitis. This is probably the first evidence that systemic oxidative stress occurs in canine periodontitis and that neutrophils may contribute to imbalance between antioxidant and oxidant in this disease.

Key words: reactive oxygen species, veterinary dentistry, periodontitis, oxidants, antioxidants.

CAPITULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

A doença periodontal (gingivite e periodontite) é um distúrbio inflamatório do periodonto que afeta 80% da população canina (RIGGIO et al., 2011). 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 (BALTACIOGLU et al., 2014a). O papel das ERO depende de sua concentração e níveis baixos podem ter funções fisiológicas (SILVA-BOGHOSSIAN et al., 2009). Quando não neutralizada por sistemas antioxidantes, as ERO têm potencial para causar danos significativos e prejudicar uma grande variedade de moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e DNA, contribuindo também para o estresse oxidativo (BALTACIOGLU et al., 2014a).

O aumento na produção de ERO pode contribuir para a ocorrência do estresse oxidativo (BALTACIOGLU et al., 2014a), ou seja, desequilíbrio entre oxidante e defesa antioxidante (KONOPKA et al., 2007). O soro, plasma, saliva e fluido crevicular gengival (FCG) podem ser utilizados para quantificar o estresse oxidativo na doença periodontal.

Embora a periodontite seja a doença mais comum em cães, há poucos estudos nesta espécie que relacionem esta patologia com o estresse oxidativo. A fim de esclarecer esta dúvida, este trabalho objetivou-se confirmar as hipóteses que cães portadores de doença periodontal apresentam maior estresse oxidativo e se este estresse diminui depois do tratamento periodontal, além de comparar estes dados com o de humanos.

2 PESQUISA BIBLIOGRÁFICA

Em busca de evidências para avaliar o efeito do estresse oxidativo na doença periodontal canina foi realizada uma revisão sistemática em dois bancos de dados: Pubmed e Portal de Pesquisa da Capes. As perguntas para a realização da revisão foram estruturadas com três elementos conceituados na medicina baseada em evidências, conforme preconizado por Castro (2001):

Pergunta 1: Existe estresse oxidativo em cão com doença periodontal? Utilizando pra isso a *situação*: dog; *intervenção*: periodontitis; *desfecho*: oxidative stress. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca de dados no Pubmed: (((periodontal disease OR periodontitis) AND antioxidant [Title] OR oxidative stress [Title]) AND dog [MeShTerms]). A busca resultou em três trabalhos, sendo apenas um deles selecionado por atender aos objetivos propostos.

Pergunta 2: O tratamento periodontal altera o estresse oxidativo na doença periodontal em cães? Utilizando para isso a *situação*: dog; *intervenção*: periodontal treatment; *desfecho*: oxidative stress. Tal pergunta gerou a seguinte estratégia para busca na base de dados: (((periodontal treatment) AND oxidative stress) AND dog). A busca resultou em dois trabalhos, sendo que apenas um deles foi utilizado por também atender aos objetivos propostos. As duas estratégias de busca tiveram limites estipulados para artigos publicados nos últimos dez anos na língua inglesa.

Devido à escassez de artigos relacionados a cães a revisão foi expandida para os humanos e a pergunta gerou três estratégias de busca:

- a) (periodontitis[Title] OR periodontal disease [Title]) AND oxidative stress[Title]
- b) (periodontitis[Title] OR periodontal disease [Title]) AND antioxidant[Title]
- c) ((periodontitis) OR periodontal disease) AND nbt

Foram utilizados os mesmos limites, sendo que a busca resultou em 13, 18 e quatro trabalhos respectivamente, destes somente nove foram selecionados.

A revisão foi expandida para outros bancos de dados: Portal de Pesquisa da Capes gerando a seguinte estratégia: periodontitis OR periodontal disease AND oxidative stress OR antioxidant OR oxidant considerando os artigos publicados nos últimos dez anos e foram selecionados cinco artigos que atenderam os critérios.

Foram utilizados para esta revisão um total de 12 artigos, sendo incluídos na revisão todos os artigos em cães e apenas os estudos em humanos que tenham quantificado: capacidade antioxidante total (TAC), concentração de oxidante total (TOC) e peroxidação lipídica plasmática (TBARS). Foram excluídos todos os trabalhos em que a doença periodontal estava relacionada a outras doenças/alterações, como diabetes, artrite, obesidade, síndrome metabólica, aterosclerose, fumantes, menopausa e gravidez. Além de artigos de revisão de literatura não sistematizada e relato de casos. O período da pesquisa bibliográfica se estendeu até o dia 11/05/15.

3 O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃO E HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL

Os agentes patogênicos bacterianos presentes na placa bacteriana são os principais causadores da doença periodontal, sua presença estimula neutrófilos a produzirem maiores quantidades de ERO (THOMAS et al., 2014). Por sua vez, estas substâncias têm a capacidade de destruir o agente patogênico, mas em excesso também danificam o tecido adjacente (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003). O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes (BULLON et al., 2009).

O estresse oxidativo em pacientes humanos com doença periodontal tem sido objeto de várias investigações (Tabela 1), porém até o momento um único estudo foi encontrado em cães avaliando apenas um biomarcador de estresse oxidativo: TAC. Neste estudo a TAC do FCG de cães com

periodontite avançada diminuiu e no soro correlacionou-se negativamente com o grau de inflamação gengival (PAVLICA et al., 2004). Mesmo trabalhos em humanos mensuraram apenas antioxidantes (CHAPPLE et al., 2007; KONOPKA et al., 2007; KONUGANTI et al., 2012; ZILINSKAS et al., 2007), enquanto que outros, somente as substâncias oxidantes (AKALIN et al., 2007, BALTACIOGLU et al., 2014a; DALAI et al., 2013; WEI et al., 2010).

O sistema de defesa antioxidante é muito dinâmico e sensível a quaisquer alterações, ocorrendo em equilíbrio redução-oxidação, sendo assim os principais reguladores e neutralizadores de ERO no organismo. (PENDYALA et al., 2008). Mesmo com metodologias variadas, houve diminuição na TAC em humanos com periodontite (Tabela 1). Estes dados estão de acordo com a literatura, pois estas substâncias são responsáveis pela proteção contra os radicais livres através da remoção dos oxidantes ou reparando os danos causados pelas ERO (ABOU SULAIMAN; SHEHADEH, 2010). A diminuição do TAC não foi observada no estudo em cão, onde somente no GCF se encontrava diminuído (PAVLICA et al., 2004). A diferença encontrada pode ser divergente devido à espécie e pelo tipo de classificação da doença periodontal, pois em um trabalho em humano foi utilizado a mesma metodologia mensurando a TAC (randox) e uso de soro (KONOPKA et al., 2007).

Quanto à mensuração de TOC na periodontite, nenhum artigo foi encontrado na espécie canina, sendo que em humanos todos apresentaram aumento no grupo periodontite na análise em soro (Tabela 1). Em três variáveis estudadas (soro, saliva e FCG) verificou-se que a TOC foi maior na periodontite humana (AKALIN et al., 2007; WEI et al., 2010), pode sugerir que há aumento de oxidantes tanto no local afetado quanto de forma sistêmica.

Quando as ERO interagem com ácidos graxos poliinsaturados da membrana ou lipoproteínas induzem o processo de peroxidação lipídica plasmática. Um aumento na quantidade de radical hidroxila, um derivado de radicais livres, faz com que ocorra um excesso de produção de malondialdeído (MDA) que é um produto final da peroxidação lipídica. O MDA é o principal e o

produto mais estudado da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados que pode ser utilizado no estudo do estresse oxidativo (AKALIN et al., 2007). Porém não há trabalhos em cães, já em humanos há um número limitado de estudos investigando os níveis de TBARS plasmático, sendo que foram divergentes nos seus achados: alguns observaram ausência de alterações (AKALIN et al., 2007, BALTACIOGLU et al., 2014b; WEI et al., 2010) outros com aumento na periodontite (DALAI et al., 2013). A diferença encontrada na revisão pode ser devido à metodologia, pois os que não encontraram alteração utilizaram alto desempenho do método de cromatografia líquida (HPLC), enquanto o único que teve aumento no grupo periodontite utilizou o método do ácido tiobarbitúrico, sendo que todos utilizaram soro (Tabela 1).

Observou-se que há diversas metodologias para verificar o estresse oxidativo, sendo que o método mais fiel é utilizar um conjunto de exames e relacioná-los. A alteração de um marcador isoladamente pode não ter um resultado fidedigno de estresse oxidativo, pois pode mascarar o resultado do outro parâmetro. Desta forma o índice de estresse oxidativo é um novo parâmetro sugerido para mostrar o nível de estresse nas doenças sistêmicas, considerado mais vantajoso na determinação do estresse oxidativo em comparação a outros parâmetros (BALTACIOGLU et al., 2014b). Este marcador proposto por Aycicek et al. (2005) é mensurado com a relação TOC/TAC, sendo um marcador mais sensível, porém apenas um estudo em humanos na periodontite foi encontrado. Neste estudo verificou o aumento do índice de estresse oxidativo demonstrando que a relação TOC/TAC pode ser utilizada como um parâmetro de diagnóstico para determinar a gravidade e a atividade da doença periodontal (BALTACIOGLU et al., 2014b).

Em relação à classificação da doença periodontal, verificou-se que apenas o trabalho em cães utilizou um grupo gengivite, porém não teve grupo controle (PAVLICA et al., 2004) e a maioria da literatura em humanos empregou a periodontite crônica (AKALIN et al., 2007; BALTACIOGLU et al., 2014a; BALTACIOGLU et al., 2014b; CHAPPLE et al., 2007; KONOPKA et al., 2007; KONUGANTI et al., 2012; WEI et al., 2010; ZILINSKAS et al., 2007). A

falta de um grupo controle no estudo de Pavlica et al. (2014) e de um oxidante não permite concluir se tal diminuição da TAC seja ou não resultante de uma diminuição do consumo de antioxidante devido ao declínio da TOC plasmático após o tratamento periodontal.

Portanto maiores estudos com o tema proposto mostram-se necessários para comprovar a relação do estresse oxidativo com a doença periodontal em cães, já que estudos nesta espécie se mostraram escassos. Entretanto em seres humanos observou-se que a periodontite está diretamente ligada ao estresse oxidativo, porém faltam trabalhos mais completos.

Com o intuito de verificar o desenvolvimento de estresse oxidativo decorrentes da DP e estabelecer uma correlação com a importância para a clínica de pequenos animais, objetivou-se a realização desta revisão sistemática. Assim, sendo foi possível verificar que a DP humana está relacionado com maior risco de desenvolver outras doenças inflamatórias sistêmicas crônicas, como doenças cardiovasculares e diabetes (D'AIUTO et al., 2010). Porém, faz-se necessárias mais pesquisas na espécie canina, a fim de elucidar a importância e o mecanismo de ação destes achados na medicina veterinária.

Tabela 1 – Resumo dos estudos sobre o estresse oxidativo na doença periodontal de cães e humanos

Referências	Espécie	N	Parâmetros	Metodologia	Outros parâmetros
Pavlica et al. (2004)	Cão (poodle toy e miniatura)	22 gengivite 40 periodontite precoce 22 periodontite avançada	TAC sem diferença estatística (soro)	Randox	↓TAC (FCG)
Baltacioglu et al. (2014) a	Humano	30 Periodontite crônica e 30 agressiva generalizada	↑TOC (soro)	Erel (2005)	↑TOC (FCG) Reabsorção
Baltacioglu et al. (2014) b	Humano	33 periodontite crônica e 35 agressiva generalizada	↑TOC (soro) ↓TAC (soro) ↑TOC /TAC TBARS sem diferença estatística (soro)	Erel (2004 e 2005) HPLC	↑TOC (saliva) ↑TBARS (saliva)
Dalai et al. (2013)	Humano	16 periodontite estágio I 16 periodontite estágio II	↑TBARS (soro) estágio I em relação ao controle ↓TBARS (soro) no estágio II que I	método do ácido tiobarbitúrico	↓TBARS (saliva) no estágio II que I histopatologia
Konuganti et al. (2012)	Humano	15 periodontite crônica	↓TAC (sangue total)	NBT	
D'Aiuto et al. (2010)	Humano	145 periodontite severa	↑ TOC (soro) ↓TAC (soro)	D-ROM BAP	
Wei et al. (2010)	Humano	48 periodontite crônica	↑TOC (soro) TBARS sem diferença estatística (soro)	Erel (2005) HPLC	↑SOD (soro, saliva e FCG) e TOC (FCG e saliva) ↑TBARS (FCG)
Akalin et al. (2007)	Humano	30 periodontite crônica	↑ TOC (soro) TBARS sem diferença estatística (soro)	Erel (2005) HPLC	↑TBARS (FCG e saliva) e TOC (saliva e FCG)
Chapple et al. (2007)	Humano	Periodontite crônica (1567 leve e 609 severa)	↓TAC (soro)	ECL	↓Vitamina C e bilirrubina
Zilinskas et al. (2007)	Humano	16 periodontite crônica	↓TAC (sangue total)	NBT	
Konopka et al. (2007)	Humano	56 periodontite (26 agressiva e 30 crônica)	↓TAC (soro)	Randox	↑8-OHdG

BAP - Potencial antioxidante e biológico; D-ROM (Diacron) – Metabolitos reativos de oxigênio; FCG- Fluido crevicular gengival; ECL- Quimioluminescência aumentada; HPLC – Alto desempenho do método de cromatografia líquida ;NBT- Teste de redução do nitroazul de tetrazólio; TAC – Capacidade de antioxidante total; TBARS - Peroxidação lipídica plasmática; TOC – Concentração de oxidante total ; 8-OHdG- 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

4 O ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃO E HUMANOS ANTES E APÓS O TRATAMENTO PERIODONTAL.

Há poucos estudos sobre a eficácia do tratamento periodontal em cães e humanos a literatura é escassa e os mesmos são divergentes em relação ao tempo preconizado na avaliação após o tratamento (Tabela 2). No único trabalho em cães, os autores verificaram que não houve correlação entre a severidade da doença e o marcador de estresse (óxido nítrico), utilizando como delineamento a análise de dois meses após o tratamento periodontal. Não houve diferença significativa nos níveis plasmáticos de nitritos/nitratos no plasma (NOx) no interior de cada grupo ou entre os grupos antes e após o tratamento, mas um aumento significativo nos níveis plasmáticos de NOx foi observado no grupo da periodontite avançada, depois do tratamento. Como não há outros estudos similares sobre a eficácia da terapia periodontal em cães e tampouco valores de referências para os marcadores de estresse oxidativo para fins de comparação, outras investigações são necessárias para melhor avaliar o estresse oxidativo.

Em seres humanos, uma única sessão de tratamento periodontal pode desencadear uma resposta inflamatória aguda e níveis de estresse oxidativo transitórios (D'AIUTO et al., 2004; NEMEC et al., 2013), tal característica pode ser verificado no trabalho de D'Aiuto et al. (2010) em que houve aumento do TOC no primeiro, terceiro e sétimo dia pós tratamento e diminuição do TAC no primeiro dia. Há evidência em humanos que há alteração nos marcadores do estresse oxidativo depois do tratamento periodontal com a diminuição de TOC no soro 16 semanas após o tratamento (WEI et al., 2010).

Tabela 2 – Resumo dos estudos sobre os biomarcadores de estresse oxidativo em relação ao tempo de avaliação após o tratamento periodontal

Referências	Espécie	N	Avaliação do tratamento periodontal	Parâmetros	Outros parâmetros
Nemec et al. (2012)	Cão	8 gengivite 14 periodontite moderada 10 periodontite avançada	2 semanas		↑NOx (plasma) no grupo periodontite avançada, depois do tratamento
D'Aiuto et al. (2010)	Humano	141 periodontite severa	1, 3, 5, 7 e 30 dias	↑TOC (D-ROM – soro) no dia 1, 3 e 5 ↓TAC (BAP – soro) no dia 1	
Wei et al. (2010)	Humano	48 periodontite crônica	16 semanas	↓TOC (soro-Erel, 2005)	↓SOD (soro, saliva e GCF) e TOC (GCF e saliva) ↓TBARS (GCF)

BAP - Potencial antioxidante e biológico; CGF- Fluido crevicular gengival ;D-ROM (Diacron) – Metabolitos reativos de oxigênio; NOx- nitritos/nitrato no plasma; SOD- superóxido dismutase; TAC – Capacidade de antioxidante total; TBARS - Peroxidação lipídica plasmática; TOC – Concentração de oxidante total

5 CONCLUSÃO

Na doença periodontal humana, porém não na espécie canina, o estresse oxidativo está bem caracterizado. Porém não podemos confirmar a hipótese em cães, devido à falta de estudos. Há necessidade de estudos experimentais que comprovem o estresse oxidativo na doença periodontal em cães, levando em consideração ao grau da doença.

REFERÊNCIAS

ABOU SULAIMAN, A. E.; SHEHADEH, R. M. H. Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the treatment of non-smokers with chronic periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 81, n. 11, p. 1547-1554, 2010.

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.

AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics international**, v. 47, n. 6, p. 635-639, 2005.

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.

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.

BULLON, P.; MORILLO, J. M.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; QUILES, J. L. NEWMAN, H. N.; BATTINO, M. Metabolic syndrome and periodontitis: is oxidative stress a common link? **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 6, p. 503-518, 2009.

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.

CHAPPLE, I. L. C; MILWARD, M. R.; DIETRICH, T. The prevalence of inflammatory periodontitis is negatively associated with serum antioxidant concentrations. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3, p. 657-664, 2007.

D'AIUTO, F.; PARKAR, M.; ANDREOU, G.; SUVAN, J.; BRETT, P. M.; READY, D.; TONETTI, M. S. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers. **Journal of Dental Research**, v. 83, n. 2, p. 156-160, 2004.

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= Revue Roumaine de Morphologie et Embryologie**, 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.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical biochemistry**, v. 37, n. 4, p. 277-285, 2004.

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, n4, p. 620, 2012.

MASI, S.; SALPEA, K. D.; LI, K.; PARKAR, M.; NIBALI, L.; DONOS, N.; PATEL, K.; TADDEI, S.; DEANFIELD, J. E.; D'AIUTO, F.; HUMPHRIES, S. E. Oxidative stress, chronic inflammation, and telomere length in patients with periodontitis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 6, p. 730-735, 2011.

NEMEC, A.; VERSTRAETE, F.J.M.; JERIN, A.; SENTJURC, M.; KASS, P.H.; PETELIN, M.; PAVLICA, Z. Periodontal disease, periodontal treatment and systemic nitric oxide in dogs. **Veterinary Science**, v.94, p.542-544, 2013.

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.

PENDYALA, G.; THOMAS, B.; KUMARI, S. The challenge of antioxidants to free radicals in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 12, n. 3, p. 79, 2008.

RIGGIO, M. P.; LENNON, A.; TAYLOR, D. J.; BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 394-400, 2011.

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.

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.

ZILINSKAS, J.; ZEKONIS, J.; ZEKONIS, G.; VALANTIEJIENE, A.; PERIOKAITE, R. The reduction of nitrobluetetrazolium by total blood in periodontitis patients and the aged. **Stomatologija**, v. 9, n. 4, p. 105-108, 2007.

CAPÍTULO 2 - ESTRESSE OXIDATIVO SISTÊMICO EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

RESUMO - A doença periodontal (DP) é a inflamação crônica de origem bacteriana mais comum da cavidade oral de cães. Na DP humana, porém não na canina, está bem caracterizado que os neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio com importante função bactericida, que em excesso causam danos ao tecido periodontal e estresse oxidativo. Nós investigamos a hipótese de que na DP canina o aumento do estresse oxidativo e ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e que estas alterações são proporcionais ao grau da doença. Para tal, foram selecionados 22 cães com DP (7 gengivite, 8 periodontite leve, 7 periodontite avançada), todos adultos, de diferentes raças e sexo. O grupo controle foi constituído pelos mesmos 22 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). Para avaliar o estresse oxidativo foi quantificada a capacidade antioxidante total do sangue (TAC), os antioxidantes principais plasmáticos (bilirrubina total, ácido úrico e albumina), a concentração total de oxidante plasmático (TOC) e o índice de estresse oxidativo. A concentração de espécies reativas ao tiobarbitúrico (TBARS) no plasma foi utilizada para estimar a peroxidação lipídica. O estresse oxidativo na DP canina foi confirmada nas periodontites (decréscimo de TAC e maior produção neutrofílica de superóxido), porém tais alterações não diferiram quanto ao grau da lesão e não foram significativas nas gengivites. Esta é provavelmente a primeira evidência de que o estresse oxidativo sistêmico ocorre na periodontite canina e que os neutrófilos podem contribuir para o desequilíbrio entre antioxidante e oxidante nesta doença.

Palavras chaves: periodontites, gengivites, índice de estresse oxidativo, antioxidantes.

SYSTEMIC OXIDATIVE STRESS IN DOGS WITH PERIODONTAL DISEASE

SUMMARY – Periodontal disease (PD) is the most common chronic inflammation of bacterial origin of the oral cavity in dogs. PD in humans, but not in dogs, is well characterized that neutrophils produce reactive oxygen species with important bactericidal function, which in excess causes damage to periodontal tissue and oxidative stress. We investigated the hypothesis that the canine PD increased oxidative stress is associated with the activation of neutrophil oxidative metabolism and that these changes are proportional to the degree of the disease. To this end, we selected 22 dogs with PD (7 gingivitis, 8 mild periodontitis, 7 advanced periodontitis), all adults, of different races and gender. The control group was made up of the same 22 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 the superoxide production by cytochemical test nitroblue tetrazolium reduction (NBT). To evaluate the oxidative stress was measured the full blood antioxidant capacity (TAC), the main antioxidants, plasmatic antioxidants (total bilirubin, uric acid, and albumin), the plasma total concentration of oxidant (OCD) and oxidative stress index. The concentration of thiobarbituric reactive species (TBARS) in plasma was used to estimate the lipid peroxidation. Oxidative stress in dogs PD was confirmed in periodontitis (TAC decrease and increased neutrophil superoxide production), but these changes did not differ as to the degree of injury and were not significant in gingivitis. There was no any significant association between increased oxidative metabolism of neutrophils and the measured oxidative stress markers. This is probably the first evidence that systemic oxidative stress occurs in canine periodontitis and that neutrophils may contribute to imbalance between antioxidant and oxidant in this disease.

Key words: periodontitis, gingivitis, oxidative stress index, antioxidants.

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é a enfermidade mais comum da cavidade oral de cães (GORREL, 1998) podendo atingir 80% da população canina (RIGGIO et al., 2011). A DP é causada por um acúmulo de placa bacteriana nas superfícies dentárias (THOMAS et al., 2014) que origina uma acentuada resposta inflamatória (AKPINAR et al., 2013).

No local da lesão periodontal os neutrófilos sofrem ativação do metabolismo oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (ERO) bactericidas, que em excesso danificam o tecido infectado (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003). Em humanos, na DP ocorre estresse oxidativo devido ao desequilíbrio entre ERO e antioxidantes (KONUGANTI et al., 2012).

O estresse oxidativo na DP humana é caracterizado pelo aumento sérico da peroxidação lipídica (PANJAMURTHY et al., 2005), concentração total de oxidante plasmático – TOC (BALTACIOGLU et al., 2014a), diminuição da capacidade antioxidante total – TAC (THOMAS et al., 2014) e aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (BHANSALI et al., 2013). O estresse oxidativo na DP tem sido associado ao maior risco de doença cardiovascular e diabetes em humanos (D'AIUTO et al., 2010). Já na DP canina, o estresse oxidativo foi pouco investigado e não está bem caracterizado. Em cães com periodontite avançada foi observada uma diminuição da TAC do fluido crevicular gengival e uma correlação negativa entre o grau de inflamação gengival e a TAC sérica (PAVLICA et al., 2004). Ao contrário do esperado, o óxido nítrico plasmático, um indicador de estresse oxidativo, aumentou dois meses após o tratamento de cães com lesão periodontal avançada (NEMEC et al., 2013).

Para melhor entender a fisiopatologia da DP canina é necessário avaliar o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e comprovar o estresse oxidativo sistêmico. Tais alterações na DP potencialmente podem promover complicações sistêmicas capazes de afetar a saúde do cão, assim como já relatado em humanos (D'AIUTO et al., 2010). O melhor conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no estresse oxidativo na DP tem contribuído para estabelecimento de novas estratégias de prevenção e tratamento dessa doença em humanos (DAIYA et al., 2014).

Neste sentido foi investigada a hipótese de que na DP canina ocorre estresse oxidativo sistêmico e ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e que estas alterações são proporcionais ao grau da doença.

2 MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado um estudo clínico controlado 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 Seleção dos animais

Foram utilizados 22 cães (11 machos e 11 fêmeas), de várias raças, com idade entre dois a 12 anos, todos portadores de doenças periodontais em diferentes graus (Tabela 1), sem outras alterações na anamnese, exame físico geral, hemograma completo e perfil bioquímico plasmático (ALT, AST, ácido úrico, albumina, bilirrubina, creatinina, colesterol, FA, GGT, proteína total plasmática, triglicerídeos e uréia). Foram excluídos do estudo animais tratados nas últimas 72 horas com qualquer medicação ou soro positivo para leishmaniose visceral pelo método ELISA (LIMA et al., 2003).

Tabela 1 - Características dos grupos de acordo com a doença periodontal

Grau da doença	Número de cães	♀ / ♂	Idade (anos)	Peso (kg)
Gengivite	7	4 / 3	4,57±2,23	6,55±2,23
Periodontite leve	8	4 / 4	4,88±3,40	14,54±14,63
Periodontite avançada	7	3 / 4	6,29±2,06	5,20±3,00

2.2. Delineamento experimental

De acordo com os resultados clínicos-laboratoriais, os cães foram agrupados em três diferentes graus da DP (tabela 2), sendo que o grupo controle constituído pelos

mesmos 22 cães, 30 dias após o tratamento periodontal (Figura 1), todos sem quaisquer alterações no exame físico, perfil bioquímico plasmático e hemograma.

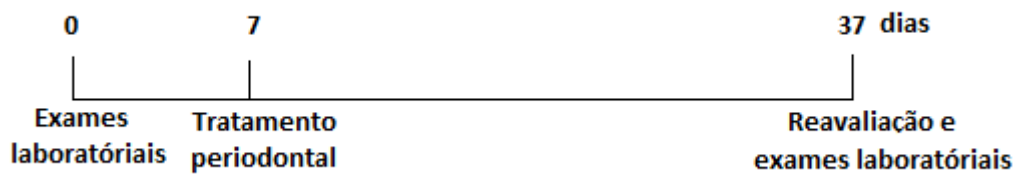


FIGURA 1- Delineamento experimental do estudo de cães com doença periodontal.

Tabela 2- Caracterização dos grupos experimentais. Médias e desvios padrão da profundidade de sondagem (PS) e nível de inserção (NI), medianas do índice de inflamação gengival (IG), do escore do cálculo dentário (CD) e da porcentagem de sangramento dos cães do grupo controle e com doença periodontal

Parâmetros clínicos	Gengivite (n=7)	Controle (n=7)	Periodontite leve (n=8)	Controle (n=8)	Periodontite avançada (n=7)	Controle (n=7)
PS(mm)	1,21±0,86Aa	0,74±0,75A	1,84±1,06Bb	0,94±0,85B	1,85±0,97Cb	0,77±0,76C
NI(mm)	1,21±0,86Aa	0,74±0,75A	1,85±1,08Bb	0,94±0,85B	1,88±1,02Cb	0,79±0,77C
IG	0	0	1	0	2	0
CD	1	0	2	0	2	0
Sangramento (%)	12,5	0	50	0	71,43	0

*Letras diferentes minúsculas na mesma linha indica diferença significativa em relação aos diversos graus da doença periodontal (gengivite, periodontite leve e avançada) ($p < 0,05$).

*Letras iguais maiúsculas na mesma linha indica diferença significativa em relação aos graus da doença periodontal e seus respectivos grupos controle ($p < 0,05$).

2.3 Avaliação dos tecidos periodontais e classificação da doença periodontal

Os cães foram classificados de acordo com o grau de DP: gengivite, periodontite leve e periodontite avançada, conforme critérios de Beard; Beard (1989) e Kyllar; Witter (2005). Animais com gengivite apresentaram aspecto granuloso à inflamação da gengiva com edema e profundidade de sondagem entre 0,0-1,0mm. Na periodontite

leve verificou-se a presença de cálculo dentário, edema acentuado, coloração de vermelho à púrpura com enrolamento severo de margem; presença de bolsa periodontal de até 3,0 mm, podendo chegar até 4,0 mm para cães de grande porte. Na periodontite avançada o edema foi acentuado, coloração de vermelho à púrpura com enrolamento severo de margem; profundidade de sondagem mais de 3,0 mm; presença ou não de pus, mobilidade e perda de fixação epitelial, retração gengival, podendo ter lesão de furca.

A avaliação inicial foi feita com o animal anestesiado e com o auxílio de sonda periodontal milimetrada (Sonda Milimetrada Williams - Golgran) para a realização da profundidade de sondagem, nível de inserção e sangramento. Em todos os animais realizou-se um exame específico da cavidade oral e o grau de severidade da DP registrado em um odontograma específico da espécie canina. Todas 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 a 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 15 segundos pós-sondagem (CANAKCI et al., 2007).

2.4 Tratamento periodontal

Todos os cães foram medicados por sete dias com Espiramicina 750.000 UI+ Metronidazol 125 mg, sendo a primeira dose realizada três dias antes do tratamento periodontal (Figura 1). O tratamento periodontal foi feito com jejum alimentar (oito horas) e hídrico (duas horas). Para tal, os animais foram submetidos à anestesia geral inalatória (isofluorano 1,5%) a fim de realizar a terapia periodontal, conforme recomendações de Harvey; Emily (1993).

A terapia periodontal foi realizada em uma única sessão e por um único profissional capacitado. Para tal, foi utilizando ultrassom odontológico (Gnatus, Jet Sonic®) e curetas (PerioGracey Millennium - Goldran) para a remoção do cálculo dentário sub e subragengival e a placa bacteriana. No uso das curetas utilizou movimento de tração disto-medial sobre as superfícies bucal e lingual de todos os dentes. A área interproximal e bifurcação foram raspadas com movimentos de tração cervico-oclusal com as mesmas curetas. Para o polimento e alisamento da superfície dentária foram utilizadas com escovas de Robson (Micromotor Marathon M-3 Mighty®) e pasta profilática composta de pedra pomes e gel fluoreto de sódio a 2%.

2.5 Colheita e acondicionamento das amostras sanguíneas

Utilizando-se agulhas hipodérmicas e seringas descartáveis, por flebocentese da veia jugular, de todos os cães foram colhidos um total de 4,5 mL de sangue total, sendo que 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 (TAC, TOC e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico -TBARS). O plasma obtido foi armazenado a -20°C protegido da luz até o momento das análises (máximo dois meses). Outros meio mililitros de sangue total foram acondicionados em tubos plásticos contendo EDTA a 10% para realização do hemograma.

2.6 Análises laboratoriais

As taxas totais de leucócitos, eritrócitos e hemoglobina foram realizadas com auxílio de contador eletrônico de células sanguíneas (BC-2800 Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co., Nanshan, China) e o volume globular foi obtido pelo método microcapilar de Strumia (56682 G por cinco minutos). 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 e 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; alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (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 uréia pelo método enzimático UV (urease/glutamato desidrogenase). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37°C conforme orientações dos fabricantes.

Além de determinar o nível plasmático dos antioxidantes albumina, bilirrubina total e ácido úrico, foi quantificada a TAC do sangue total por meio da técnica de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) de acordo com Demehin et al. (2001), com pequenas modificações. Resumidamente, 100 µL de sangue heparinizado foram adicionados com a mesma quantidade de NBT (Sigma, Aldrich, Germany), os quais foram mantidos durante 30 minutos à temperatura de 37°C. Foi retirado 50 µL da amostra colocando no tubo de vidro junto com um mL de N,N dimetilformamida (Sigma, Aldrich, Germany). Os tubos foram centrifugados durante cinco minutos a 3000 G a

leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em 570 nm em fotocolorímetro (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em mmol de ácido úrico equivalente/L.

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

A concentração total oxidante (TOC) no plasma foi determinada colorimetricamente usando Laranja de Xilenol, conforme Erel (2005) e os resultados foram expressos em μmol de peróxido de hidrogênio equivalente/L. O índice de estresse oxidativo (IEO) foi obtido seguindo a fórmula: $\text{IEO} = 100 \times (\text{TOC}, \mu\text{mol de peróxido de hidrogênio equivalente/L} / \text{TAC}, \mu\text{mol de ácido úrico equivalente/L})$.

A peroxidação lipídica plasmática foi determinada pelo método de TBARS, conforme Hunter (1985), com auxílio de uma leitora ELISA automática (Robonik, Elisa Plate Analyser, India) e absorbância 540 nm.

2.7 Análise estatística

Após análise das distribuições das variáveis quanto à normalidade (Teste KS) e homocedasticidade (teste Bartlett), para as comparações entre os três grupos experimentais das variáveis não paramétricas e paramétricas, foram utilizadas as provas de Wilcoxon e teste T pareado, respectivamente. Foram consideradas significantes as diferenças entre os grupos quando $p < 0,05$. As análises estatísticas supracitadas foram realizadas com auxílio de um programa computacional estatístico (Graphpad InStat software 3.0).

3 RESULTADOS

3.1 Perfil clínico-laboratorial das doenças periodontais

Os cães do grupo controle apresentaram valores de PS, NI e IG dentro faixa de normalidade descrito 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 considerados para o hemograma (JAIN, 1986) e perfil bioquímico (KANEKO, 1997) da espécie canina. Os marcadores de estresse oxidativo no plasma de cães do grupo controle não diferiram significativamente ($p>0,05$) quanto ao sexo.

As alterações dos parâmetros clínicos dos 22 cães selecionados (Tabela 2) permitiram diferenciar os pacientes em três grupos de doenças periodontais. A PS, NI e cálculos dentários foram inferiores em cães com gengivite. O IG foi maior na periodontite avançada e o sangramento aumentou conforme o avanço da DP (Tabela 2).

3.2 O estresse oxidativo nas doenças periodontais.

Uma grande variabilidade do IEO foi observada em todos os grupos e embora os valores de cães com DP tenham sido maiores, tal diferença não foi significativa (Tabela 3). Nenhum marcador de estresse oxidativo analisado diferiu significativamente quanto ao grau da lesão periodontal (Tabela 3). Embora não significante, os valores de TOC e TBARS foram maiores em 68,18% (15/22) e 90,91% (20/22) dos cães com DP, respectivamente.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos marcadores do estresse oxidativo conforme a doença periodontal

	Gengivite	Controle	Periodontite leve	Controle	Periodontite avançada	Controle
IEO (%)	91,85 ±69,42Aa	55,12 ± 41,05a	90,56 ± 95,41Ab	35,19 ± 43,33b	112,12 ±106,39Ac	36,02 ±29,20c
TOC (µmol/L)	131,27±68,67a	113,47 ± 76,03a	114,96 ± 42,98b	88,13 ± 86,11b	91,16 ± 37,01c	73,20 ± 55,02c
TBARS (µmol/L)	22,17 ± 7,19a	15,01 ± 5,73a	22,85±8,82b	13,56±4,73b	21,24±4,24c	12,81±7,19c
Ácido úrico (mmol/L)	0,03 ± 0,02a	0,04 ± 0,03a	0,04 ± 0,03b	0,02 ± 0,01b	0,03 ± 0,01c	0,02 ± 0,01c
Albumina (g/L)	31,30 ± 2,49a	30,84 ± 4,01a	33,78 ± 2,17b	35,35 ± 2,62b	30,13± 1,82c	30,93 ± 2,55c
Bilirrubina (µmol/L)	3,93 ± 2,97a	4,19 ± 2,28a	6,71 ± 3,92a	4,19 ± 1,57a	6,09± 6,89a	3,28 ± 1,94a

IEO= Índice de estresse oxidativo, TOC= capacidade oxidante total do sangue, TBARS= Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

*Letras iguais maiúscula na mesma linha indica que não há diferença significativa em relação à doença periodontal e seu respectivo controle ($p < 0.05$).

A TAC do sangue de cães com periodontite leve e avançada foi significativamente menor (Figura 2), apesar de os antioxidantes endógenos mensurados (ácido úrico, albumina e bilirrubina) não terem diminuído (Tabela 3).

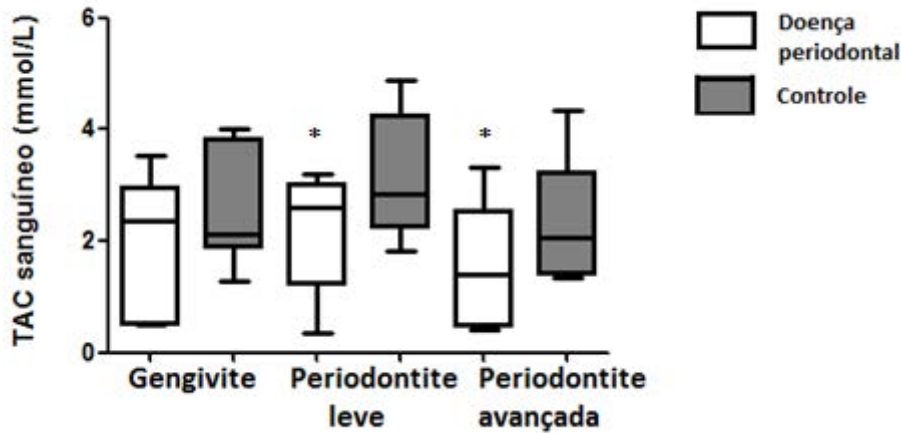


FIGURA 2 – Boxplot da capacidade antioxidante total do sangue total (TAC) em cães com diferentes estágios de doença periodontal e no grupo controle. Os valores para o primeiro quartil, mediana e terceiro quartil são indicados em cada caixa, e as barras fora da caixa indicam valores mínimos e máximos. * indicam diferença ($p < 0,05$) significativa em relação ao controle.

A produção neutrofílica do oxidante superóxido foi maior na DP, sendo porém este aumento significativo apenas na periodontite leve (Figura 3).

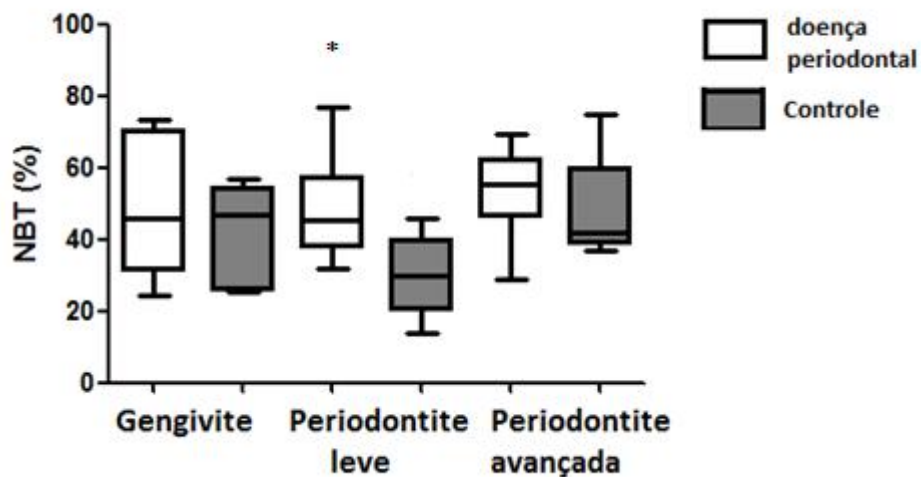


FIGURA 3 – Boxplot da produção de superóxido estimada pela porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em cães com diferentes estágios de doença periodontal e no grupo controle. Os valores para o primeiro quartil, mediana e terceiro quartil são indicados em cada caixa, e as barras fora da caixa indicam valores mínimos e máximos. * indicam diferença ($p < 0,05$) significativa em relação ao controle.

4 DISCUSSÃO

O IEO é considerado o marcador mais sensível quando comparado à análise individual de outros marcadores de estresse. Porém este índice de estresse só foi empregado em um único estudo, sendo observado um aumento do IEO na periodontite humana (BALTACIOGLU et al., 2014b). Diferentemente, no presente estudo o IEO não se alterou significativamente nas doenças periodontais. Além da diferença quanto à espécie, pelo menos três outros fatores podem justificar tal divergência. Há de se considerar que no estudo de Baltacioglu et al. (2014b) foi utilizado soro e empregada outra metodologia para quantificação da TAC.

Embora não significante um aumento do IEO, TOC e TBARS ocorreu na maioria dos cães com DP. Em humanos também foi observado aumento de oxidantes e da peroxidação lipídica na DP (AKALIN et al., 2007). Tem sido postulado que o excesso de oxidantes na DP humana pode ao longo do tempo favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (D' AIUTO et al., 2010; MATTHEWS et al., 2007).

Os neutrófilos produzem grandes quantidades de superóxido quando o seu metabolismo oxidativo é ativado, especialmente nas infecções bacterianas (SCULLEY; LANGLEY-EVANS, 2003). Não obstante, a contribuição dos neutrófilos como fonte de oxidantes na periodontite não foi investigada em cães e os estudos em humanos são contraditórios. A produção neutrofílica de superóxido na forma agressiva da periodontite humana aumentou (BHANSALI et al., 2013), porém há relatos que a capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT sob estímulo não se altera em pacientes com periodontite (TAPASHETTI et al., 2013). No presente estudo a produção neutrofílica de superóxido foi maior na DP, sendo este aumento maior e mais significativo na periodontite leve. Este resultado confirma que os neutrófilos contribuíram para o aumento de oxidantes plasmático na DP, aumentando a produção de superóxido, o que explica em parte os maiores valores de TOC plasmático. A maior produção neutrofílica de superóxido em cães com DP reflete a ativação do metabolismo oxidativo causado pela infecção bacteriana. Esta é a provável razão pela qual a produção de superóxido foi mais elevada nas fases iniciais da lesão periodontal, quando a flora bacteriana e a extensão da lesão tecidual é maior.

O estresse oxidativo não está apenas associado ao aumento de oxidante, mas também à diminuição de antioxidantes (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Na DP humana a TAC diminui (KONOGANTI et al., 2012; ZILINSKAS et al. 2007; ZOPE et al., 2011). Em cães, um único estudo verificou uma diminuição da TAC sérica na periodontite avançada, porém não formas menos avançadas da DP (PAVLICA et al., 2004). O diminuição de TAC do sangue total foi observada em cães com periodontite leve e avançada, sendo esta a primeira evidência de que os antioxidantes exercem um papel importante no estresse oxidativo da DP canina. A diminuição da TAC do sangue total ocorreu apesar de os antioxidantes endógenos mensurados (ácido úrico, albumina e bilirrubina) não terem diminuído significativamente, sugerindo que outros antioxidantes não mensurados (superóxido dismutase, catalase e glutathionperoxidase) tenham contribuído para tal alteração.

Um fator limitante no presente estudo foi a grande variabilidade dos marcadores de estresse oxidativo mensurados (Tabela 3), o que pode ser explicado pela heterogeneidade das raças e da flora bacteriana que não foi determinada. Estudos mais amplos, incluindo outros biomarcadores são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos com o estresse oxidativo da DP canina.

O aumento da TOC, da produção neutrofílica de superóxido, a maior TBARS e a diminuição da TAC sanguínea em conjunto confirmam que o estresse oxidativo sistêmico ocorre independente do grau da DP em cães. Esta é uma das primeiras evidências que o estado antioxidante fica comprometido na DP canina e que os neutrófilos contribuem para o estabelecimento de um estresse oxidativo sistêmico que potencialmente pode afetar outros tecidos.

5 CONCLUSÃO

O estresse oxidativo sistêmico ocorre em cães portadores de DP independentemente do grau da lesão. A ativação do metabolismo dos neutrófilos pode contribuir para o estresse oxidativo sistêmico na DP canina.

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.
- 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.
- AYCICEK, A.; EREL, O.; KOCYIGIT, A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. **Pediatrics International**,v. 47, n. 6, p. 635–639, 2005.
- 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.
- 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. 731-736, 2013.
- BOSCO, A. M.; COUTO, R.; PEREIRA, P. P.; ALMEIDA, B. F. M.; CIARLINI, P. C. Clinical value of nitroblue tetrazolium 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.
- 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. 1241-1246, 2010.
- DAIYA, S.; SHARMA, R. K.; TEWARI, S.; NARULA, S. C.; SEHGAL, P. K. Micronutrients and superoxide dismutase in postmenopausal women with chronic periodontitis: a pilot interventional study. **Journal of periodontal & implant science**, v. 44, n. 4, p. 207-213, 2014.
- DEMEHIN, A. A.; ABUGO, O. O.; RIFKIND, J. M. The reduction of nitroblue tetrazolium by red blood cells: a measure of red cell membrane antioxidant capacity and hemoglobin-membrane binding sites. **Free Radical Research**, v. 34, n. 6, p. 605-620, 2001.
- EREL, O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. **Clinical Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1103-1111, 2005.
- GORREL, C. Periodontal disease and diet in domestic pets. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2712S-2714S, 1998.
- HARVEY C. E.; EMILY, P. P. Small animal dentistry. In: ____ **Periodontal Disease**. 1 ed. Sta Lluís, Mosby, 1993, Cap 4, p. 89- 144.
- HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- 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, 1986. Cap. 2, p.20-86.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. USA, 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

- 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.
- 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, 2007.
- NEMEC, A.; VERSTRAETE, F.J.M.; JERIN, A.; SENTJURC, M.; KASS, P.H.; PETELIN, M.; PAVLICA, Z. **Veterinary Science**, v.94, p.542-544, 2013.
- 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.
- PETELIN, M.; PAVLICA, Z.; IVANUSA, T.; SENTJURC, M.; SKALERIC, U. Local delivery of liposome-encapsulated superoxide dismutase and catalase suppress periodontal inflammation in beagles. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 27, n. 12, p. 918-925, 2000.
- RIGGIO, M. P.; LENNON, A.; TAYLOR D. J.; BENNETT, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 394-400, 2011.
- 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.
- 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.
- ZILINSKAS, J. ZEKONIS, J.; ZEKONIS, G.; VALANTIEJIENE, A., PERIOKAITE, R. The reduction of nitrobluetetrazolium by total blood in periodontitis patients and the aged. **Stomatologija**, v. 9, n. 4, p. 105-108, 2007.

ZOPE, S. A.; Silvia CR, W. D.; K, K. Estimation of the total antioxidant capacity of whole blood in patients with chronic periodontites using the Nitroblue Tetrazolium reduction test. **International Journal of Contemporary Dentistry**, v. 2, n. 2, p. 91-95, 2011