



DOENÇA PERIODONTAL E BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO¹

Silviane Cunico Carneiro Fuchter², Daiane Manica³, Débora Tavares de Resende e Silva⁴, Sarah Franco Vieira de Oliveira Maciel⁵

¹ Projeto de pesquisa desenvolvido na UFFS Campus Chapecó; Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas,

² Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil. E-mail: silvianecarneiro@unochapeco.edu.br,

³ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil,

⁴ Professora Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil,

⁵ Professora Doutora no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Chapecó, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doença periodontal (DP) é caracterizada pela presença de um processo inflamatório crônico, devido ao acúmulo de biofilme bacteriano e a resposta do hospedeiro frente a esses patógenos, tendo como consequência a destruição dos tecidos de suporte das estruturas dentais. Estudos têm revelado que componentes do estresse oxidativo (EO) estão relacionados com o desenvolvimento e a progressão da DP. **OBJETIVO:** Avaliar a modulação do EO em indivíduos com e sem a DP. **MÉTODO:** Trata-se de um estudo transversal com análise quantitativa, com 82 participantes. **RESULTADOS:** análises do estresse oxidativo (EO), houve diminuição estatisticamente significativa das defesas antioxidantes dos indivíduos com DP nas análises de Vitamina C e Superóxido dismutase (SOD), e um aumento dos níveis séricos nas análises referentes a determinação de espécies reativas (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS e espécies reativas de oxigênio/EROs). **CONCLUSÃO:** Portanto, vemos indivíduos com DP estão sob a ação do EO.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica desencadeada por bactérias que compõe o biofilme dental, que causa destruição dos tecidos de suporte dentário (periodonto), com alta prevalência em todo o mundo. A DP estimula, por meio do sistema imune, localmente e em sítios distantes, concentrações elevadas de citocinas e proteínas pró-inflamatórias (PERES *et al.*, 2019). Embora a DP não seja fatal, os patógenos periodontais podem adentrar através da circulação sistêmica e se instalar em outros órgãos e sistemas, levando ao desenvolvimento de algumas doenças sistêmicas como as cardíacas, endócrinas, metabólicas, infecciosas, autoimunes e neoplásicas (MATSUSHITA *et al.*, 2020). A principal causa da destruição do periodonto é devido a resposta inadequada do hospedeiro aos microrganismos e seus produtos.



Os leucócitos polimorfonucleares, considerados a primeira linha de defesa, são responsáveis pela morte dos microrganismos através de processos oxidativos. Por sua vez, a morte oxidativa (superóxido, radicais hidroxila, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio e cloraminas) leva à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), enquanto a morte não oxidativa é mediada por várias enzimas lisossômicas, peptídeos e proteínas (ACQUIER *et al.*, 2016). Na presença de DP, os neutrófilos tornam-se hiperativos e causam EO excessivo e dano tecidual. Assim, um desequilíbrio entre enzimas proteolíticas e seus inibidores, EROs e sistemas de defesa antioxidante, leva à destruição do tecido periodontal (BARTOLD; VAN DYKE, 2013). Frente aos danos causados pela DP na cavidade bucal e sua associação com doenças sistêmicas, o interesse em compreender a DP e seu mecanismo de ação vem crescendo. Através desse estudo buscou-se compreender a atividade do EO e suas ações celulares durante o processo inflamatório na DP, a fim de melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes acometidos pela doença.

METODOLOGIA

Trata-se de estudo transversal, com análise quantitativa, onde foram avaliados parâmetros EO na DP. O estudo incluiu participantes com e sem o diagnóstico de DP, organizados em dois grupos: participantes saudáveis (N=25) e com DP (N= 57), previamente ao início do tratamento cirúrgico e/ou farmacológico. Todos os procedimentos realizados foram submetidos à avaliação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFFS, de acordo com as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde sobre Pesquisa envolvendo seres humanos, onde foi aprovado, sob o Número do Parecer: 4.662.702. Dos indivíduos que concordaram com os objetivos da pesquisa, foi coletado trinta mililitros (30 ml) de sangue periférico, divididos em tubos *vacutainer* com Ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA), (separação do plasma), com citrato de sódio (separação do ST) e em tubos sem anticoagulante (separação do soro). As análises do EO (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico/TBARS e Tióis Proteicos/PSH) foram avaliadas no soro dos participantes do estudo. No ST foi avaliada a atividade da Superóxido dismutase (SOD). No plasma foi avaliada a dosagem da Vitamina C. A separação de ST foi através da coleta em tubo com citrato de sódio, sendo levemente homogeneizado e separado em alíquotas com 300 ul. A separação do soro foi através da coleta de ST em tubo sem anticoagulante, centrifugado por 15 minutos a 3500 rpm. O soro fica no sobrenadante, foi retirado com uma pipeta e transferido para um eppendorf. A atividade da SOD foi efetuada pelo sistema de detecção adrenalina-adenocromo de acordo com o descrito por MC CORD e



FRIDOVICH (1969). A determinação dos grupamentos SH proteicos foi realizada segundo o método descrito por ELLMAN (1959). Os níveis de TBARS foram determinadas através do método de JENTZSCH (1996) modificado. A dosagem da Vitamina C foi realizada de acordo com a metodologia descrita por JACQUES-SILVA (2001). A quantificação de EROs foi realizada de acordo com o método de ALI, LEBEL e BONDY (1992). A análise estatística foi realizada com o *software GraphPad Prism 9.0* (San Diego, CA, EUA). O teste de Shapiro-Wilk testou a normalidade. *Outliers* foram excluídos usando o teste de Grubbs. Sobre as variáveis do estudo, as diferenças entre pacientes com DP e indivíduos controle foram avaliadas pelo teste *t* de *Student* e teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças em que a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

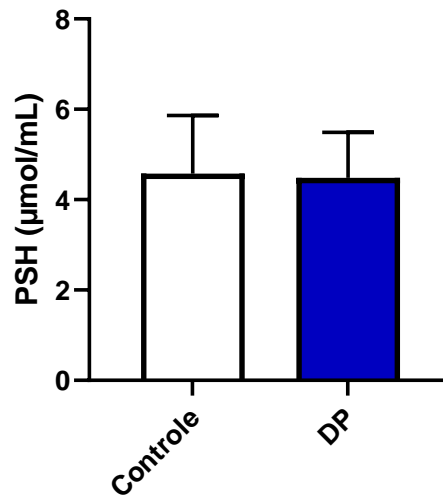
Um total de 82 participantes foram incluídos no estudo, sendo 25 participantes no grupo controle (sem DP) e 57 pacientes com DP, destes, 25 participantes com gengivite e 32 com periodontite. Quanto ao sexo: dos participantes no grupo controle, 17 eram do sexo feminino (68%) e 8 do sexo masculino (32%); no grupo com DP, 31 eram do sexo feminino (54%) e 26 do sexo masculino (45%).

Defesas antioxidantes:

A quantificação dos níveis plasmáticos de PSH não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e DP, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de: $4,579 \pm 1,282 \mu\text{mol/mL}$ no grupo controle e $4,482 \pm 1,006 \mu\text{mol/mL}$ no grupo com DP, com valor de $p < 0,7086$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 1. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.



Figura 1: Níveis séricos de PSH

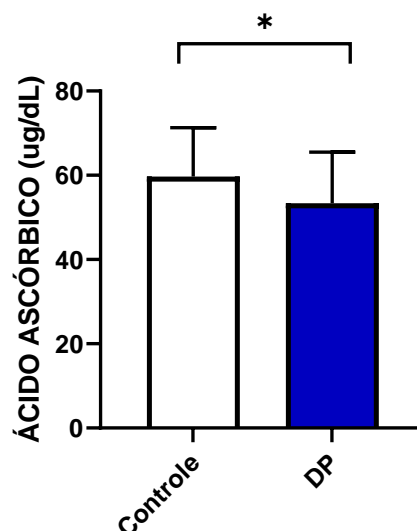


Níveis séricos de PSH. Os dados foram expressos em $\mu\text{mol/mL}$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Análise estatística: Teste *t* de Student. $p < 0,7086$. $N=82$.

* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

A concentração de Vitamina C no soro dos indivíduos do grupo com DP evidenciou uma diminuição significativa quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de: $59,67 \pm 11,66 \text{ ug/dL}$ no grupo controle e $53,39, \pm 12,11 \text{ ug/dL}$ no grupo com DP, com valor de $p < 0,05$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 2. $N= 75$ participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 50 participantes no grupo com DP.

Figura 2: Níveis séricos de Vitamina C



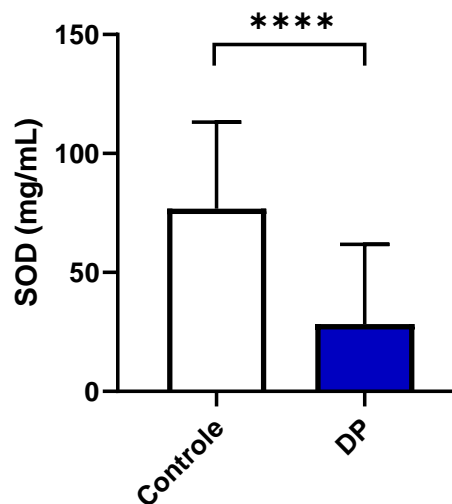


Níveis séricos de Vitamina C. Houve diminuição significativa de Vitamina C em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. $N=75$.

* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Referente a atividade da enzima SOD no ST dos indivíduos participantes do estudo, demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de: $76,77 \pm 36,45$ mg/mL no grupo controle e $28,31 \pm 12,47$ mg/mL no grupo com DP, com valor de $p < 0,0001$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão, e estes podem ser observados na Figura 3. $N= 82$ participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.

Figura 3: Atividade da SOD



Atividade da SOD. Os dados foram expressos em mg/mL. Houve diminuição da atividade da SOD em indivíduos com DP, quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. $N=82$.

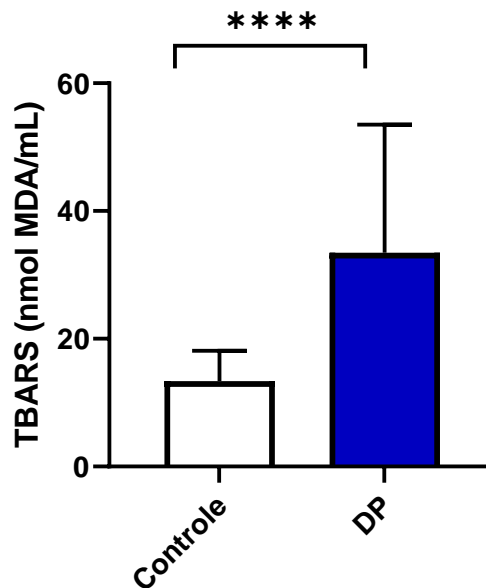
* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Marcadores de Danos Oxidativos:

Os níveis séricos de TBARS estão demonstrados na Figura 4, onde apresentou aumento estatisticamente significativo em indivíduos com DP em relação aos controles, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de $13,40 \pm 4,752$ nmol MDA/mL no grupo controle e $33,47 \pm 20,07$ nmol MDA/mL no grupo com DP, com valor de $p < 0,0001$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. $N= 82$ participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.



Figura 4: Níveis séricos de TBARS



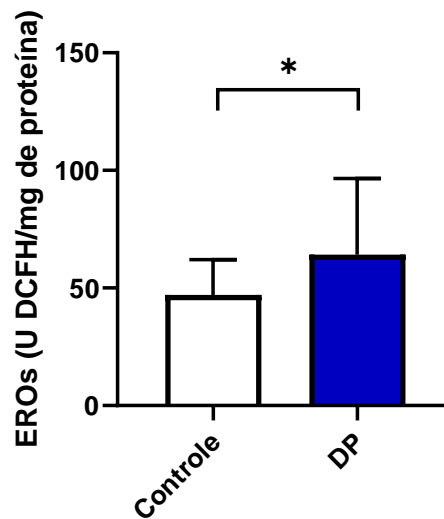
Níveis séricos de TBARS. Os dados foram expressos em nmol MDA/mL. Houve aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de TBARS em indivíduos com DP quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. N=82.

* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Os níveis séricos de EROs estão demonstrados na Figura 5, com aumento estatisticamente significativo em indivíduos com DP, sendo que os valores encontrados para cada grupo foram de: $47,05 \pm 15,01$ U DCFH/mg de proteína no grupo controle e $64,18 \pm 32,43$ U DCFH/mg de proteína no grupo com DP, com valor de $p < 0,05$. Os valores foram apresentados pela média e desvio padrão. N= 82 participantes, sendo 25 participantes no grupo controle e 57 participantes no grupo com DP.



Figura 5: Níveis séricos de EROs



Níveis séricos de EROs. Os dados foram expressos em U DCFH/mg. Houve aumento estatisticamente significativo nos níveis séricos de EROs em indivíduos com DP quando comparados com indivíduos do grupo controle. Análise estatística: Teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. $N=82$.

* ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$); **** ($p < 0,0001$).

Diante dos resultados do presente estudo, é importante salientar suas limitações e perspectivas futuras. A pesquisa supracitada é pioneira em algumas análises envolvendo o EO, sendo assim, primeiramente buscou desvendar se tal mecanismo pode ter ação na DP. A partir desse ponto, esse estudo abre espaço para futuras pesquisas com potenciais terapêuticos, envolvendo a análise de substâncias antioxidantes capazes de equilibrar a exacerbação dos radicais livres, a fim de controlar a inflamação local e sistêmica.

DISCUSSÃO

Até o momento há poucos estudos avaliando o efeito do desequilíbrio na atividade dos antioxidantes e oxidantes em indivíduos com DP e suas alterações sistêmicas. Embora a DP seja desencadeada por placa bacteriana (biofilme), a maior parte da destruição dos tecidos parece ser mediada pela resposta anormal do hospedeiro às bactérias específicas e seus produtos. Essa resposta é caracterizada por inflamação exagerada envolvendo a liberação de enzimas proteolíticas e por EROs (DURSUN *et al.*, 2016).

A validação de que uma doença bucal seria capaz de alterar níveis de marcadores séricos de um indivíduo demonstraria a repercussão sistêmica desta doença ou condição (NIBALI; DONOS, 2013), abrindo-se um grande e inexplorado campo de investigação (TAYLOR;



PRESHAW, 2016). Em nosso estudo foram avaliados os níveis séricos dos indivíduos controle e com DP de marcadores do EO, e os resultados mostram níveis de antioxidantes diminuídos (Vitamina C e SOD; Figuras 2 e 3, respectivamente) e de oxidantes aumentados (TBARS e EROs; Figuras 4 e 5, respectivamente) em indivíduos com DP, em relação aos indivíduos do grupo controle.

Estudos indicaram que o excesso de EROs e a depleção dos níveis de antioxidantes no fluido crevicular gengival (CHAPPLE *et al.*, 2007) são responsáveis pela ativação local crônica da inflamação periodontal e destruição tecidual. O recrutamento de neutrófilos no tecido gengival e a liberação de enzimas proteolíticas e EROs, são hoje considerados os dois principais aspectos da resposta do hospedeiro à estimulação do antígeno bacteriano em indivíduos susceptíveis à periodontite. Devido a percepção de que o EO está intimamente ligado aos danos ao periodonto, alguns autores iniciaram suas pesquisas para investigar se esse processo também pode resultar em uma resposta inflamatória sistêmica (CHAPPLE *et al.*, 2007). Evidências adicionais de modelos animais confirmam níveis mais altos de peroxidação lipídica, peróxidos de hidrogênio e dano oxidativo ao DNA com periodontite experimental (YAMAMOTO *et al.*, 2010).

Estudos anteriores também demonstraram que os níveis e o potencial antioxidante são reduzidos tanto na gengiva quanto no soro de indivíduos com periodontite (CHAPPLE *et al.*, 2007). Isso foi replicado em modelos experimentais de DP, demonstrando uma redução na Vitamina C (SANBE *et al.*, 2009) e diminuição geral das defesas oxidativas gengivais (TOMOFUJI *et al.*, 2006), corroborando com os achados do presente estudo, onde o nível sérico da Vitamina C, um importante antioxidante, está diminuído em indivíduos que apresentam DP (Figura 7).

Li e colaboradores (2019) avaliaram níveis de SOD e EROs em indivíduos saudáveis e com DP, onde encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, onde a SOD (Figura 3) estava diminuída nos indivíduos com DP, e as EROs (Figura 5) aumentadas, indicando que os indivíduos com DP estavam sob EO.

CONCLUSÕES

Nosso estudo fornece evidências de que, em indivíduos com DP ocorre a modulação do EO, onde em um ambiente pró-inflamatório, como o de indivíduos com DP, o EO desempenha sua ação, com a geração de radicais livres e diminuição das defesas antioxidantes, deixando os mesmos susceptíveis a inflamação sistêmica.



PALAVRAS-CHAVE: Radicais livres; Antioxidantes; Inflamação.

REFERÊNCIAS

- ACQUIER, A. B. *et al.* Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. **Redox Report : Communications in Free Radical Research**, v. 22, n. 3, p. 119–126, 20 jun. 2016.
- ALI, S. F., LEBEL, C. P., BONDY, S. C. Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. **Neurotoxicology**, v. 13, n. 3, 1992.
- BARTOLD, P. M.; VAN DYKE, T. E. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x, jun. 2013.
- 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, 1 mar. 2007.
- DURSUN, E. *et al.* Oxidative Stress and Periodontal Disease in Obesity. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. e3136, mar. 2016.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, maio 1959.
- JACQUES-SILVA, M. C. *et al.* Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacology & Toxicology**, v. 88, n. 3, p. 119–125, mar. 2001.
- JENTZSCH, A. M. *et al.* Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 2, p. 251–256, 1996.
- KONOPKA, T. *et al.* Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 6, p. 417–425, dez. 2007.
- LI, X. *et al.* Severe periodontitis may influence cementum and dental pulp through inflammation, oxidative stress, and apoptosis. **Journal of Periodontology**, v. 90, n. 11, p. 1297–1306, nov. 2019.
- MATSUSHITA, K. *et al.* Periodontal Disease and Periodontal Disease-Related Bacteria Involved in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. **Journal of Inflammation Research**, v. Volume 13, p. 275–283, jun. 2020.
- MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, 25 nov. 1969.



NIBALI, L.; DONOS, N. Periodontitis and Redox Status: A Review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 15, p. 2687–2697, 1 mar. 2013.

PERES, M. A. *et al.* Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet (London, England)**, v. 394, n. 10194, p. 249–260, 20 jul. 2019.

S ANBE, T. *et al.* Vitamin C intake inhibits serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone in rats fed on a high-cholesterol diet. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 3, p. 235–240, mar. 2009.

TAYLOR, J. J.; PRESHAW, P. M. Gingival crevicular fluid and saliva. **Periodontology 2000**, v. 70, n. 1, p. 7–10, fev. 2016.

TOMOFUJI, T. *et al.* Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: Effects of a high-cholesterol diet. **FEBS Letters**, v. 580, n. 15, p. 3601–3604, 26 jun. 2006.

YAMAMOTO, T. *et al.* Effects of topical application of lipopolysaccharide and proteases on hepatic injury induced by high-cholesterol diet in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 45, n. 1, p. 129–135, fev. 2010.