

DETERMINAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL

TAVARES, Maurício de Oliveira ¹;
RIGOTTI, Marina ²;
LOPES, Wesley Renosto ³;
DOS REIS, Lucas Dornelles ³;
SCARIOTT, Fernando Joel ⁴;
ECHEVERRIGARAY, Sérgio ⁵;
DELAMARE, Ana Paula Longaray ⁵;
SALVADOR, Miriam ⁵.

Recebido: 05/04/2021

Aceito: 18/08/2021

¹Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul; ²Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul; ³Médico Veterinário; ⁴Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul; ⁵Professor(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é consequência da atividade bacteriana e deposição de cálculo dentário, causando danos teciduais e processo inflamatório na cavidade oral. É uma enfermidade que atinge mais de 80% dos cães adultos e comumente está ligada ao aparecimento de doenças sistêmicas. A análise do estresse oxidativo sérico gerado na doença periodontal pode ser um biomarcador de lesão tecidual e agravamento da enfermidade. Este trabalho teve como objetivo a quantificação da peroxidação lipídica (TBARS) e da capacidade antioxidante total (TEAC) sérica de cães com periodontite. Os testes foram realizados em um grupo de cães saudáveis (n = 9) e um grupo de cães com DP severa (n = 8). Após a realização dos ensaios de metabolismo redox nos cães com DP, estes animais passaram por procedimento cirúrgico, remoção de cálculo dentário e medicação pós-cirúrgica de 10 dias, que incluía antibioticoterapia com amoxicilina e clavulanato de potássio e meloxicam como medicação anti-inflamatória. Após 30 dias da cirurgia, os animais foram novamente avaliados. Os resultados mostraram que houve um aumento significativo da peroxidação lipídica (43,81%) e uma diminuição da capacidade antioxidante total (8%) nos cães com DP. Após o tratamento, não houve redução dos níveis de estresse oxidativo, mas observou-se um aumento (8%) da capacidade antioxidante total. Estes dados colaboram para o melhor entendimento do metabolismo redox decorrente dos processos infecciosos e inflamatórios característicos da DP. O estudo demonstrou que o estresse oxidativo está presente na doença periodontal em cães, e apesar da não redução do dano oxidativo em 30 dias, a capacidade antioxidante total sérica, que estava diminuída, foi restaurada.

Palavras-chave: Metabolismo redox. TBARS. TEAC. Periodontite.

INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) está entre as doenças mais comuns relatadas em caninos, afetando, em graus variados, mais de 80% dos cães (STELLA et al., 2018). Ela está relacionada com idade, raça, porte, dieta alimentar, predisposição genética, comportamento mastigatório e saúde geral (RIGGIO et al., 2011; STEPHAN et al., 2008).

A resposta inflamatória contra a agressão bacteriana contribui para a evolução da DP (ALBUQUERQUE et al., 2015). Alterações inflamatórias, imunológicas e a presença de bactérias patogênicas geram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em tecidos bucais (PAVLICA et al., 2004).

O aumento na produção de ERO contribui para a ocorrência do estresse oxidativo, causando um desequilíbrio entre oxidantes e defesas antioxidantes. As ERO têm potencial para causar danos significativos e oxidar uma grande variedade de moléculas biológicas, incluindo lipídios, proteínas e DNA (BALTACIOGLU et al., 2014).

Em humanos com doença periodontal, o estresse oxidativo sistêmico está caracterizado pelo aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (BHANSALI et al., 2013), que causa aumento da peroxidação lipídica e diminuição da capacidade antioxidante total do plasma (DALAI et al., 2013; PANJAMURTHY et al., 2005).

Em cães, até o momento, foram encontrados apenas dois estudos referentes ao estresse oxidativo na doença periodontal. Pavlica et al. (2004) demonstraram que quanto maior a taxa de inflamação periodontal, menor a capacidade antioxidante total a nível sérico. Silva et al. (2018) mostraram a presença de estresse oxidativo na doença periodontal, pelo aumento da produção de superóxido dos neutrófilos circulantes. Desta forma, ainda são necessários estudos a fim de caracterizar a modulação do metabolismo redox na DP. O presente estudo teve o objetivo de quantificar os níveis de peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante total em cães com DP antes e 30 dias após o tratamento da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade de Caxias do Sul sob o número 013/2018. Foram selecionados 17 cães da rotina clínica de uma clínica veterinária da cidade de Caxias do Sul, que ao exame clínico não apresentavam alterações patológicas além da doença periodontal e ainda não tinham alterações bioquímicas e hematológicas nos exames realizados. Estes cães foram avaliados clinicamente e distribuídos em dois grupos: saudáveis (GS) e com doença periodontal severa (GP). Para compor o grupo com doença periodontal, foram selecionados apenas cães com doença em estágio severo, que apresentavam retração gengival, exposição de furca, mobilidade dentária, cálculo dentário e sondagem periodontal acima de 3 mm (HARVEY; EMILY, 1993). Foi realizada coleta de sangue de todos os animais em tubos sem anticoagulante e centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos, para separação do soro, antes e 30 dias após o tratamento da DP. O tratamento consistiu na remoção de cálculos dentários conforme recomendações de Bellows et al. (2019). Para isso, foi utilizado como medicação pré-anestésica: midazolam 0,3 mg/kg, morfina 0,5 mg/kg e cetamina 4 mg/kg. Após, os cães foram induzidos à anestesia com propofol 4 mg/kg e mantidos em anestesia geral inalatória com isoflurano 1,5%. Foi utilizado ultrassom odontológico para a remoção do cálculo dentário sub e supra gengival, e micromotor para realizar polimento dentário com pasta profilática composta de pedra-pomes e gel fluoreto de sódio a 2%. Dentes com comprometimento de raiz, fraturas ou mobilidade dentária foram extraídos. Foi prescrito amoxicilina com clavulanato de potássio na dose de 15 mg/kg por 10 dias de 12 em 12 horas, meloxicam 0,1 mg/kg a cada 24 horas por 10 dias e dipirona 20 mg/kg a cada 12 horas por 3 dias.

A peroxidação lipídica foi medida pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) durante uma reação de aquecimento ácido, na qual amostras contendo 125 µL de soro foram combinadas com 500 µL de ácido tricloroacético a 5% (WILLS, 1966). A mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi misturado com 500 µL de ácido sulfúrico (3M) e com 500 µL de reagente colorido (ácido tiobarbitúrico, bicarbonato de sódio, sulfato de sódio). A mistura foi agitada no vórtex e aquecida a 100 °C durante 15 min. Após serem resfriadas à temperatura ambiente,

as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. A fração sobrenadante foi isolada e sua absorbância foi medida a 530 nm. A concentração de TBARS foi calculada empregando uma curva padrão de tetrametoxipropano (TMP), um equivalente do malondialdeído. O TMP foi utilizado como padrão, e os resultados foram expressos em μM de TMP por mg de proteína (BRADFORD, 1976).

A capacidade antioxidante do soro foi avaliada por meio da capacidade antioxidante de equivalentes de Trolox, do inglês *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC), um análogo solúvel em água da vitamina E (RE et al., 1999). Para a realização do ensaio, primeiramente foi realizado o preparo do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS) 12 horas antes, em proporção de 1 ABTS para 0,5 de persulfato de potássio. A mistura foi mantida em temperatura ambiente. No momento do teste, o radical foi diluído em PBS até a obtenção da absorbância de 700 nm a 734 nm. Pronto o radical e dado o tempo do ensaio, o radical ABTS foi misturado a amostra de soro, homogeneizado, e as amostras lidas após 6 minutos de reação, em absorbância de 700 nm a 734 nm. Para o cálculo dos resultados, a quantificação de proteína de cada amostra foi considerada (BRADFORD, 1976). Os resultados foram expressos em mM de TEAC. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS, versão 21.0) para Windows (Illinois, EUA). A significância estatística foi avaliada por meio do teste t-pareado. Os resultados foram considerados significativos se o valor p for $\leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cães foram distribuídos em dois grupos, saudáveis e com doença periodontal, conforme descrito na Tabela 1. Os valores obtidos no estudo demonstraram que os cães com DP apresentaram níveis de TBARS 43,81% superiores aos níveis encontrados no grupo controle (Figura 1). Os valores obtidos para TBARS corroboram com o estudo de Silva et al. (2018) que encontraram valores menores em 90% dos cães usados como controle, entretanto, o grupo controle foi formado pelos cães após tratamento periodontal e, apesar da diminuição de TBARS, este resultado foi significativo apenas em cães com DP avançada, o que não foi observado no presente estudo, em que os níveis de TBARS, avaliados 30 dias após tratamento,

permaneceram aumentados nos cães com DP. Embora estudos com uma amostragem maior sejam necessários, presume-se que possa ter ocorrido uma mudança temporária da microbiota oral, devido a remoção de tártaro e antibioticoterapia de amplo espectro por 10 dias. É possível que a alteração da microbiota não tenha se mantido até os 30 dias pós-tratamento, conforme demonstrado por Flancman et al. (2018). Nesse estudo, foi analisada a microbiota oral de cães e observou-se uma rápida volta à microbiota pré-remoção de cálculo dentário, cinco semanas após o tratamento, sugerindo que a microbiota oral canina é resiliente, (FLANCMAN et al., 2018). Em cães com doença periodontal grave, a resolução do problema seria possível somente através da extração total dos dentes, pois somente desta forma o processo de lesões ósseas e vasculares cessaria, conforme descritas por Gioso (2003). Mesmo com o uso mais prolongado de antibióticos, sabe-se que as lesões ósseas e vasculares causadas pela DP são irreversíveis (GIOSO, 2003), e podem gerar um aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (BHANSALI et al., 2013), o que explicaria a manutenção do estresse oxidativo observado após o tratamento.

Tabela 1 - Pacientes selecionados por grupo de estudo e suas características individuais.

Grupo Saudável					Grupo Periodontite				
Cão	Sexo	Peso (Kg)	Raça	Idade(anos)	Cão	Sexo	Peso (Kg)	Raça	Idade(anos)
C1	F	5	Shih Tzu	5	P1	F	8	Bichon Frisé	10
C3	F	2	Chiuaua	1	P2	F	3,5	Chiuaua	6
C4	F	4	Shih Tzu	8	P4	F	6,5	Shih Tzu	7
C5	F	4	SRD	2	P5	F	4,7	Poodle	9
C7	F	4	Shih Tzu	2	P7	F	10	SRD	7
C9	F	7	Shih Tzu	6	P3	M	4,5	Yorkshire	4
C2	M	6	Shih Tzu	7	P6	M	2,4	Yorkshire	10
C6	M	6	Poodle	2	P8	M	9	Poodle	9
C8	M	7,5	Yorkshire	5					

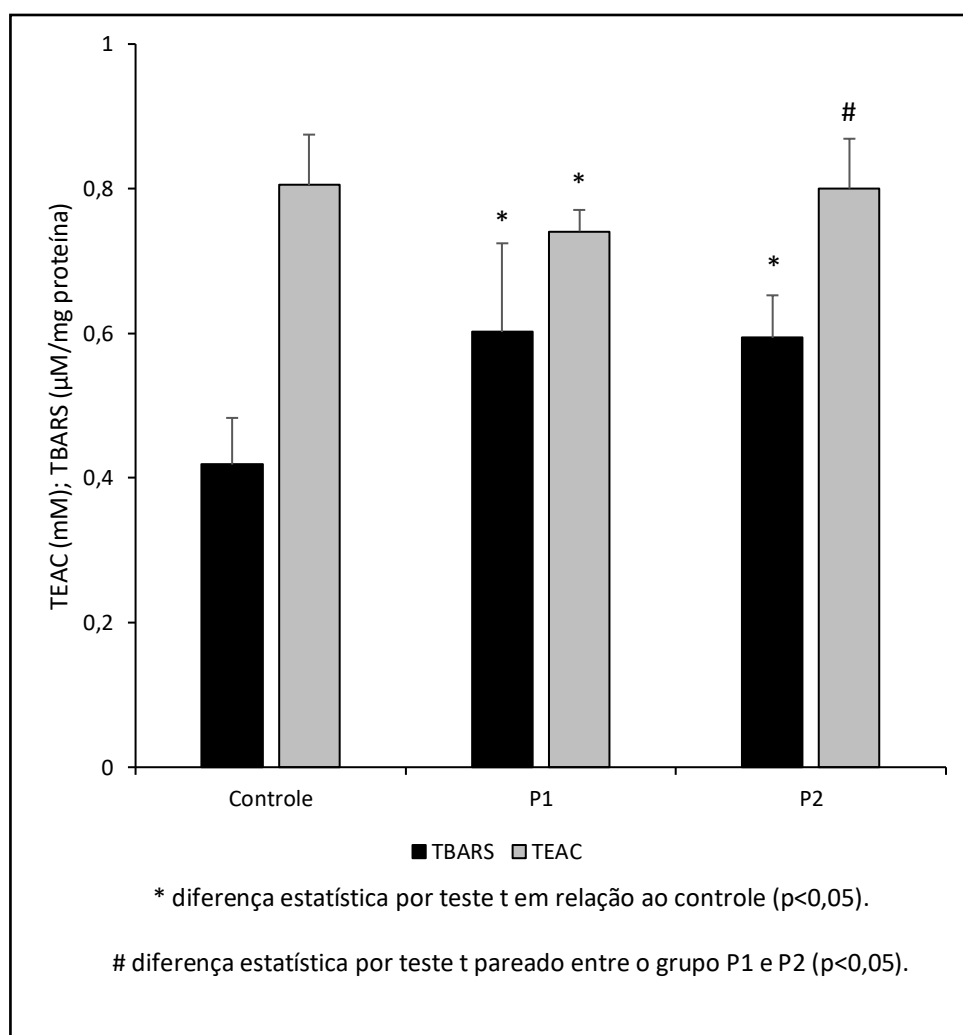


Figura 1 - Valores obtidos para capacidade antioxidativa total (TEAC) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no grupo controle, grupo com periodontite pré-tratamento (P1) e pós-tratamento (P2).

O grupo com periodontite mostrou uma menor (8%) capacidade antioxidante total sérica quando comparado com o grupo saudável, valor que retornou aos níveis do grupo controle após o tratamento. Estes dados refletem, provavelmente, uma resposta compensatória no sentido de evitar o estresse oxidativo. Em nosso estudo, a avaliação dos danos oxidativos foi realizada 30 dias após a intervenção cirúrgica e o tratamento, com o intuito de observar se haveria retorno ao nível redox normal depois de cessada a antibioticoterapia. No estudo realizado por Pavlica et al. (2004), a capacidade antioxidante total também se mostrou diminuída em 54,4% nos cães com DP avançada em comparação a cães apenas com gengivite,

entretanto não foram realizados estudos pós-tratamento. Não foram observadas diferenças nos marcadores de estresse oxidativo entre machos e fêmeas (dados não apresentados), da mesma forma que Silva et al. (2018).

Para confirmar estes dados prévios, seria importante aumentar o número de cães testados e incluir mais marcadores de estresse oxidativo para ter uma visão melhor da modulação do metabolismo redox na DP, assim como levar em conta características individuais como raça, idade e porte dos cães. Este trabalho demonstrou que o estresse oxidativo está presente na doença periodontal em cães. Os dados coletados podem nortear trabalhos futuros na busca de novos marcadores para uma melhor compreensão e tratamento da DP.

CONCLUSÃO

Os níveis elevados de TBARS demonstraram a presença de estresse oxidativo sistêmico nos cães com doença periodontal. A capacidade antioxidante total sérica, que estava diminuída, foi restaurada 30 dias pós o tratamento. Os resultados obtidos são importantes para o melhor entendimento do metabolismo redox, e esses parâmetros poderão ser utilizados como biomarcadores para o prognóstico, avaliação de novos tratamentos e determinação da severidade da DP em cães.

DETERMINATION OF OXIDATIVE STRESS IN DOGS WITH PERIODONTAL DISEASE

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a consequence of bacterial activity and deposition of dental calculus, causing tissue damage and an inflammatory process in the oral cavity. It is a disease that affects more than 80% of adult dogs and is commonly linked to the appearance of systemic diseases. The analysis of serum oxidative stress generated in periodontal disease can be a biomarker of tissue damage and disease aggravation. This work aimed to quantify lipid peroxidation (TBARS) and serum total antioxidant capacity (TEAC) in dogs with periodontitis. Tests were performed in a group of healthy dogs (n = 9) and a group of dogs with severe PD (n = 8). After performing the redox metabolism tests in dogs with PD,

these animals underwent a surgical procedure, tartarectomy, and post-surgical medication for 10 days, which included antibiotic therapy with amoxicillin and potassium clavulanate and meloxicam as anti-inflammatory medication. 30 days after surgery, the animals were again sampled. The results show that there was a significant increase in lipid peroxidation (43.81%) and a decrease in total antioxidant capacity (8%) in dogs with PD. After treatment, there was no reduction in oxidative stress levels, but an increase (8%) in total antioxidant capacity was observed. These data contribute to a better understanding of the redox metabolism resulting from the infectious and inflammatory processes characteristic of PD. The study demonstrated that oxidative stress is present in periodontal disease in dogs, and despite the non-reduction of oxidative damage at 30 days, the serum total antioxidant capacity, which was decreased, was restored.

Keywords: Redox metabolism. TBARS. TEAC. Periodontitis.

DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN PERROS CON ENFERMEDAD PERIODONTAL

RESUMEN

La enfermedad periodontal (EP) es una consecuencia de la actividad bacteriana y el depósito de cálculos dentales que provocan daño tisular y un proceso inflamatorio en la cavidad bucal. Es una enfermedad que afecta a más del 80% de los perros adultos y comúnmente está relacionada con la aparición de enfermedades sistémicas. El análisis del estrés oxidativo sérico generado en la enfermedad periodontal (EP) puede ser un biomarcador de daño tisular y agravamiento de la enfermedad. Este trabajo tuvo como objetivo cuantificar la peroxidación lipídica (TBARS) y la capacidad antioxidante total sérica (TEAC) en perros con periodontitis. Las pruebas se realizaron en un grupo de perros sanos (n = 9) y un grupo de perros con EP grave (n = 8). Luego de realizar las pruebas de metabolismo redox en perros con EP, estos animales fueron sometidos a un procedimiento quirúrgico, tartarectomía y medicación posquirúrgica durante 10 días, que incluyó terapia antibiótica con amoxicilina y clavulanato de potasio y meloxicam como medicación antiinflamatoria. Después de 30 días de cirugía se tomaron nuevamente muestras de los animales. Los resultados muestran que hubo un aumento significativo de la peroxidación lipídica (43,81%) y una disminución de la capacidad antioxidante total (8%) en perros con EP. Después del tratamiento no hubo reducción en los niveles de estrés oxidativo, pero se observó un aumento (8%) en la capacidad antioxidante total. Estos datos contribuyen a una mejor comprensión del metabolismo redox resultante de los procesos infecciosos e inflamatorios característicos de la EP. El estudio demostró que el estrés oxidativo está presente en la enfermedad periodontal en perros y, a pesar de que no se redujo el daño oxidativo a los 30 días, se restableció la capacidad antioxidante total del suero que estaba disminuida.

Palabras clave: Metabolismo redox. TBARS. TEAC. Periodontitis.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C.; MORINHA, F.; MAGALHÃES, J.; et al. Variants in the interleukin-1 alpha and beta genes, and the risk for periodontal disease in dogs. **Journal of Genetics**, v. 94, n. 4, p. 651-659, 2015.
- BALTACIOGLU, E.; KEHRIBAR, M. A.; YUVA, P.; et al. 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.
- 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.
- BELLOWS, J.; BERG, M. L.; DENNIS, S.; et al. 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 55, n. 2, p. 49-69, 2019.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- DALAI, C.; IGNAT-ROMANUL, I.; ROSCA, E.; et al. 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.
- FLANCMAN, R.; SINGH, A.; WEESE, J. S. Evaluation of the impact of dental prophylaxis on the oral microbiota of dogs. **Plos One**, v. 13, n. 6, p. 1-18, 2018.
- GIOSSO, M. A. **Odontologia Veterinária para o Clínico de Pequenos Animais**. 5. ed. São Paulo: FMVZ/USP, 2003. 202p.
- HARVEY, C. E.; EMILY, P. P. **Small Animal dentistry**. St. Louis: Mosby - Year Book, 1993. 408p.
- PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 10, n. 2, p. 255-264, 2005.
- PAVLICA, Z.; PETELIN, M.; NEMEC, A.; et al. 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.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RIGGIO, M. P.; LENNON, A.; TAYLOR, D. J.; et al. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 394-400, 2011.

SILVA, M. R.; MATONO, D.; BOSCO, A. M.; et al. Estresse oxidativo em cães com doença periodontal: comparação dos biomarcadores plasmáticos e salivares. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 5, p. 1369-1377, 2018.

STELLA, J. L.; BAUER, A. E.; CRONEY, C. C. A cross-sectional study to estimate prevalence of periodontal disease in a population of dogs (*Canis familiaris*) in commercial breeding facilities in Indiana and Illinois. **Plos One**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2018.

STEPHAN, B.; GREIFE, H. A.; PRIDMORE, A.; et al. Activity of pradofloxacin against porphyromonas and prevotella spp. implicated in periodontal disease in dogs: susceptibility test data from a European multicenter study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2149-2155, 2008.

WILLS, E. Mechanisms of lipid peroxide formation in animal tissues. **Biochemical Journal**, v. 99, n. 3, p. 667-676, 1966.

Autor para correspondência:

Marina Rigotti.

Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, RS.

CEP: 95070-560, Brasil.

mrigotti1@ucs.br