

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SIMONE RIBEIRO BRUZADELLI FRANCO DE CARVALHO

**MODULAÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL POR
ANTIOXIDANTE NITRÓXIDO**

**ALFENAS/MG
2014**

SIMONE RIBEIRO BRUZADELLI FRANCO DE CARVALHO

**MODULAÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL POR
ANTIOXIDANTE NITRÓXIDO**

Defesa de Dissertação apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.

Orientadora: Prof^a. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.

Coorientador: Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes.

**ALFENAS/MG
2014**

Carvalho, Simone Ribeiro Bruzadelli Franco de.

Modulação da periodontite experimental por antioxidante nitróxido
/ Simone Ribeiro Bruzadelli Franco de Carvalho - Alfenas, 2014.
61 f. -

Orientadora: Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade
Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Periodontite. 2. Estresse oxidativo. 3. Reabsorção alveolar. 4.
Antioxidantes. I. Brigagão, Maísa Ribeiro Pereira Lima. II. Título.

CDD: 617.643



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas-Unifal-MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 Alfenas/MG, CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1392 Fax: (35) 3299-1067



SIMONE RIBEIRO BRUZADELLI FRANCO DE CARVALHO

**“MODULAÇÃO DA PERIODONTITE EXPERIMENTAL POR ANTIOXIDANTE
NITRÓXIDO”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ciências Odontológicas pela Universidade
Federal de Alfenas. Área de concentração:
Odontologia.

Aprovado em: 18/02/2014

Profa. Dra. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

Prof. Dr. Marcelo Paes de Barros
Instituição: Universidade Cruzeiro do Sul –
UNICSUL

Assinatura: _____

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
– UNIFAL-MG

Assinatura: _____

À Deus, pela vida.....

Ao Leandro pelo incentivo e apoio em todas as horas;

À Luíza e Laís, “luzes da minha vida”, pela compreensão e estímulo para realizar esse trabalho;

À minha mãe, Maria, pelo eterno amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^a. Dra. Máisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão, sua dedicação e entusiasmo são contagiantes, sem seu auxílio a realização desse trabalho seria impossível. Nem tenho como agradecê-la...

À Andressa Araújo Swerts, de aluna exemplar à uma grande amiga que tornou essa jornada bem mais suave e prazerosa. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes pela colaboração.

Ao Prof. Wilson da Silveira Oliveira grande mestre e incentivador da docência.

Ao Prof. José Ronaldo Miranda por incentivar e facilitar essa jornada.

Aos meus irmãos, Renata e Allan pela preocupação e tolerância.

À Neide por estar presente nas minhas ausências.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa do Prof. João Adolfo Costa Hanemman, por sua dedicação ao Curso e gosto pela pesquisa.

A todos os demais professores e funcionários da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL, pela ajuda e atenção.

À todos aqueles que de alguma maneira colaboraram para a execução deste trabalho.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxil (Tempol), um antioxidante sintético da classe dos nitróxidos, como coadjuvante ao tratamento mecânico de raspagem e alisamento radicular (RAR) da doença periodontal (DP) experimentalmente induzida em ratos. Sessenta ratos (machos, linhagem Wistar) foram divididos em três grupos de dezoito animais: Grupo T recebeu administração do nitróxido (1mg/Kg de peso corpóreo, via oral) realizada uma vez ao dia, iniciada um dia antes da indução da DP até os respectivos períodos de eutanásia, o Grupo C recebeu administração do veículo e o Grupo T1 começou a receber Tempol somente após o tratamento de RAR até os respectivos períodos de eutanásia. A doença periodontal (DP) foi induzida por meio de ligadura com fio de algodão na região dento-gengival do primeiro molar inferior esquerdo. Decorridos 7 dias, a ligadura foi removida e todos os animais foram tratados com raspagem e alisamento radicular (RAR) seguida de irrigação local com soro fisiológico. Após 7, 15 ou 30 dias, os animais foram eutanasiados e amostras de biópsias gengivais da região com ligadura foram processadas para mensuração dos danos oxidativos teciduais. Os marcadores deste processo, teor do tripeptídeo glutationa em sua forma reduzida (GSH), os níveis de malondialdeído (MDA), um produto final de lipoperoxidação e a ocorrência de proteínas carboniladas (CPO) foram quantificadas através de cromatografia líquida de alta eficiência e espectrofotometricamente (CLAE). As mandíbulas foram seccionadas para análise radiográfica. O modelo experimental induziu danos oxidativos significativos associados à indução de DP, causando queda de GSH e aumento de CPO e MDA ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle e ao índice basal destes metabólitos. O tratamento com Tempol foi eficaz na prevenção e tratamento dessas lesões oxidativas, de forma tempo-dependente, notoriamente na diminuição de CPO e na preservação de GSH tissular. Na análise radiográfica pode-se observar que Tempol administrado antes da indução da DP foi capaz de diminuir a reabsorção óssea em relação ao grupo C e ao grupo T1, principalmente aos 30 dias ($p < 0,05$). Os resultados indicam que a administração oral de Tempol pode ser uma estratégia farmacológica a ser utilizada como adjuvante ao tratamento de periodontite, aumentando a eficácia de procedimentos terapêuticos por meio do controle do estresse oxidativo.

Palavras chave: Periodontite, Estresse Oxidativo, Perda de Massa Óssea Alveolar, Antioxidante, Tempol.

ABSTRACT

This study focused the effect of oral nitroxide administration on gingival oxidative stress markers and alveolar bone loss associated to periodontitis. Two different strategies of oral treatment with the nitroxide: preventive or therapeutic, were employed to establish the efficiency of the piperidine compound as an adjuvant to scaling and root planing mechanical treatment. Cotton ligatures were placed around the cervical area of the left mandibular first molars of male rats. Nitroxide Tempol (1 mg/kg/daily) or vehicle alone was orally administered to animals before or post ligature-induced periodontitis. The animals were subject to mechanical treatment simultaneously to ligature removal. At different experimental periods (7, 15 or 30 days), gingival oxidative markers (reduced glutathione, malondialdehyde and protein carbonyl content) were measured in sample homogenates from animals. Bone loss was assessed by radiographic assay. There was a greater increase in gingival oxidative markers and alveolar bone loss due to induced periodontitis. Nitroxide treatment in a preventive manner was more efficient to partially prevent both periodontitis-associated events than that therapeutic nitroxide administration after induction of experimental periodontitis. Oral nitroxide administration showed beneficial effects on periodontal structures during and after induction of experimental periodontitis. Within the limits of this study, it can be concluded that piperidine nitroxide, which is proposed for different inflammatory processes treatment, can also be used as a protective and therapeutic agent for periodontal disease in an adjunctive manner to mechanical non-surgical treatment.

Key words: Periodontitis, Oxidative stress, Alveolar bone loss, Antioxidant, Tempol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química dos nitróxidos cíclicos	22
Figura 2 -	Estrutura química do nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidine-1-oxil (Tempol)	22
Figura 3 -	O processo redox de metabolização de nitróxidos	23
Figura 4 -	Delineamento do estudo Grupos C (n=18), Grupo T (n=18) e Grupo T1(n=18)	30
Figura 5 -	Animal posicionado na mesa operatória	31
Figura 6 -	Pinça modificada utilizada para a passagem do fio	31
Figura 7 -	Posicionamento do fio	31
Figura 8 -	Fio posicionado ao redor do primeiro molar inferior esquerdo	31
Figura 9 -	Doença periodontal após 7 dias de indução	32
Figura 10 -	Raspagem e alisamento radicular	32
Figura 11 -	Cromatograma característico de detecção de GSH, no padrão, após derivatização com mBBr	36
Figura 12 -	Cromatograma característico de detecção de GSH, na amostra, após derivatização com mBBr	37
Figura 13 -	Cromatograma característico de detecção de MDA no padrão, após derivatização com TBA	39
Figura 14 -	Cromatograma característico de detecção de MDA na amostra, após derivatização com TBA	39
Figura 15 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C que receberam o tratamento de RAR	42
Figura 16 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo T que receberam o tratamento de RAR	42
Figura 17 -	Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo T1 que receberam o tratamento de RAR	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da administração oral de tempol sobre o conteúdo de glutathione reduzida em amostras gengivais. Periodontite foi induzida por ligadura e GSH foi doseada através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=394nm$; $\lambda_{emi}=490nm$) após reação com monobromobimano	38
Tabela 2 -	Efeito do Tempol sobre lipoperoxidação decorrente de periodontite induzida. A ocorrência de danos oxidativos em lipídeos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=515nm$; $\lambda_{emi}=553nm$) para detecção do aduto MDA-ácido tiobarbitúrico	40
Tabela 3 -	Efeito do tempol em danos oxidativos em proteínas induzidos por periodontite experimental. O conteúdo de carbonilas proteicas foi determinado em amostras gengivais através de análise espectrofotométrica ($\lambda=370\text{ nm}$; $\epsilon=22.000\text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)	41
Tabela 4 -	Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) das distâncias entre a união cimento–esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	-	Adenosina Trifosfato.
BSA	-	Albumina Sérica Bovina.
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais.
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.
CPO	-	Proteínas Carboniladas.
DNPH	-	2,4-dinitrofenilhidrazina.
DP	-	Doença Periodontal.
ERO/ERN	-	Espécies Reativas de Oxigênio e/ou Nitrogênio.
GSH	-	Tripeptídeo Glutathiona.
mBBr	-	Monobromobimanió - 3,7-dimetil-4bromometil-6-metil-1,5-diazobícclo [3.3.0] octa-3,6-dieno-2,8-diona.
MDA	-	Malondialdeído.
MPO	-	Mieloperoxidase.
NADPH	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido.
Nox2	-	Isoforma 2 de NADPH Oxidase.
PO	-	Perda Óssea.
RAR	-	Raspagem e Alisamento Radicular.
SOD	-	Superóxido dismutase.
T	-	Tempol.
TBA	-	Ácido Tiobarbitúrico.
TCA	-	Àcido Tricloracético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL	15
2.2	DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL	16
2.3	DOENÇA PERIODONTAL E ESTRESSE OXIDATIVO	18
2.4	TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL	20
2.5	NITRÓXIDOS CÍCLICOS	21
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	ANIMAIS	29
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	29
4.3	INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL	31
4.4	TRATAMENTO LOCAL	32
4.5	PERÍODOS EXPERIMENTAIS	33
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS GENGIVAIS	33
4.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA TOTAL	33
4.8	DETERMINAÇÃO DO TRIPEPTÍDEO GLUTATIONA	34
4.9	DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO	34
4.10	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS	35
4.11	RADIOGRAFIAS E ANÁLISE DIGITAL	35
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS	37
5.1	CONTEUDO DO TRIPETÍDEO DE GSH EM AMOSTRAS GENGIVAIS ...	37
5.2	TEOR DE MDA EM TECIDOS GENGIVAIS COMO INDICADOR DE LIPOPEROXIDAÇÃO	39
5.3	OCORRÊNCIA DE DANOS OXIDATIVOS EM PROTEÍNAS	42
5.4	RESULTADOS DA ANÁLISE RADIOGRÁFICA	43
6	DISCUSSÃO	45

7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	60

1 INTRODUÇÃO*

O periodonto é dividido em tecido de proteção (gengiva) e tecidos de suporte/sustentação (osso alveolar, cemento radicular e ligamento periodontal) cuja principal função é inserir os dentes no alvéolo e suportar as forças de oclusão.

A doença periodontal (DP) é uma alteração imuno-inflamatória resultante da destruição dos tecidos periodontais de suporte dental decorrente da ação local de microorganismos periodontopatogênicos presentes no biofilme dental subgengival que, quando não tratada, pode levar à perda dos dentes (KAMMA; SLOTS, 2003). Fatores sistêmicos, como *diabetes mellitus* e estresse também podem estar associados a doença periodontal induzindo alterações severas nos tecidos de suporte dos dentes (BREIVK et al., 2006).

Nos processos inflamatórios e/ou infecciosos como as doenças periodontais, os neutrófilos formam a primeira linha de defesa do organismo juntamente com os macrófagos, que são atraídos quimiotaxicamente para o local inflamado. Neste sítio, os neutrófilos fagocitam os microrganismos que são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) produzidas pelos fagócitos, como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^{\bullet}) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Entretanto, por apresentarem grande reatividade com macromoléculas, estes metabólitos são potencialmente capazes de desencadear efeitos lesivos teciduais no próprio hospedeiro.

O ânion superóxido foi apontado, na literatura, como envolvido na sinalização da indução de reabsorção óssea, o que foi confirmado por estudos que demonstraram a presença do mesmo em zonas adjacentes à reabsorção promovida pelos osteoclastos.

A raspagem e alisamento radicular (RAR) é a terapia periodontal mecânica mais eficiente para a eliminação da microbiota subgengival patogênica mas, muitas vezes, somente a RAR não é eficiente, pois que microrganismos e seus produtos podem estar presentes no interior dos tecidos moles, duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais como áreas de furca e depressões radiculares (ADRIAENS et al., 1988; MATIA et al., 1986).

* Normas segundo o Manual de normatização para elaboração de trabalhos acadêmicos, dissertações e teses da UNIFAL-MG.

Devido a estas limitações, o uso de métodos coadjuvantes de tratamento que promovam a eliminação de patógenos periodontais têm despertado o interesse de muitos pesquisadores (RAMS; SLOTS, 1996).

Este estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do antioxidante sintético 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol), um composto da classe dos nitroxídeos, como protetor dos danos causados por oxidantes na doença periodontal experimentalmente induzida em ratos, através de análises bioquímicas e radiográficas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura serão abordados tópicos referentes ao assunto em estudo.

2.1 ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DA DOENÇA PERIODONTAL

A doença periodontal (DP) é o resultado da destruição dos tecidos de suporte do elemento dental, resultante do acúmulo de biofilme dental. A sua evolução está ligada ao acúmulo do biofilme dental e à ação do sistema imunológico sobre os tecidos periodontais (KAMMA; SLOTS, 2003). Além disso, fatores sistêmicos podem influenciar no desenvolvimento de doenças periodontais mais agressivas (BREIVK et al., 2006).

Patógenos periodontais e seus produtos, bem como mediadores inflamatórios produzidos nos tecidos periodontais, podem entrar na corrente sanguínea, provocando efeitos sistêmicos e/ou contribuindo para o agravamento de doenças sistêmicas. Assim, a periodontite crônica tem sido sugerida como um fator de risco para doenças como a aterosclerose, endocardite bacteriana, *diabetes mellitus*, doenças respiratórias, artrite reumatóide e, mais recentemente, a osteoporose, o câncer de pâncreas, doenças renais e neurodegenerativas, e a doença de Alzheimer. Várias hipóteses tentam explicar essas relações, como: a susceptibilidade do indivíduo, processos inflamatórios, infecção sistêmica bacteriana direta e reatividade cruzada, mimetismo molecular entre antígenos bacterianos e autoantígenos. A introdução do conceito da medicina periodontal foi baseada na associação da doença periodontal com doenças sistêmicas (PIZZO et al., 2010).

A principal causa da DP são os microrganismos periodontopatógenos, principalmente bactérias gram-negativas (PETERSEN; OGAWA, 2005) que compõem o biofilme dental. Essas bactérias liberam substâncias, como toxinas, enzimas e vários outros metabólitos que agredem diretamente os tecidos periodontais, e apresentam papel importante na iniciação do processo inflamatório presente na doença periodontal (LISTGARTEN, 1975). A reação inflamatória associada à DP pode danificar as estruturas conjuntivas, incluindo o osso alveolar, levando à perda dental (LINDHE; NYMAN, 1987). Múltiplas espécies microbianas contribuem para o início e progressão da DP (SCHENKEIN, 1999), entretanto apenas uma minoria pode ser associado como agente etiológico da mesma, com relação à perda óssea

alveolar, dentre as quais destacam-se *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* (MACHTEI et al., 1999).

A primeira barreira de proteção do hospedeiro que os microrganismos encontram nos tecidos periodontais são os neutrófilos. Eles são os responsáveis pela eliminação, através da fagocitose, dos microrganismos que conseguiram penetrar a barreira do epitélio juncional. No entanto, estes fagócitos são capazes de produzir uma variedade de substâncias que, direta ou indiretamente agredem os tecidos periodontais, como algumas proteases que hidrolisam colágeno, elastina, e outras proteínas dos tecidos epiteliais e conjuntivo. Destacam-se, dentre estas proteases, a Arg-1 produzida pela *Porphyromonas gingivalis* que degrada anticorpos e componentes do complemento (CUTLER et al., 1993; ADUSE-OPOKU et al., 1995) e a leucotoxina produzida pelo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a qual tem um papel central na destruição de leucócitos (GILLESPIE et al., 1993). Contudo, o efeito mais acentuado destes metabólitos parece ser a própria resposta inata, inflamatória e imune do hospedeiro a estas moléculas estranhas e aos antígenos das bactérias (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

2.2 DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL

O estudo da DP em humanos tem suas limitações devido à grande variação que pode ocorrer de um indivíduo para outro, ou até mesmo no próprio indivíduo, já que a gravidade desta lesão pode variar de dente para dente, e, em um mesmo dente, de uma superfície para outra (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). Dessa forma, muitos trabalhos têm utilizado animais, para avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à DP (LISTGARTEN, 1975), como o modelo em primatas (HEIJL et al., 1976), cães (SCHROEDER; LINDHE, 1975) e roedores (JOHNSON, 1975; GALVÃO et al., 2003).

As principais vantagens da utilização do rato (*Rattus norvegicus*) como modelo para a DP experimental são: custo reduzido para sua obtenção, fácil manuseio, podendo ser criados em condições *germ-free*, bem como podem ser utilizadas linhagens procriadas em condições de imunodeficiência (KLAUSEN, 1991). Além disso, neste modelo de estudo os resultados são mais previsíveis no sentido de que a doença a ser estudada é reproduzida com um alto grau de confiabilidade (FRENKEL, 1969), pois existe muita semelhança com o homem em

relação à anatomia periodontal, ao desenvolvimento e composição do biofilme bacteriano, a histopatologia das lesões periodontais e à imunologia básica.

Os ratos possuem um incisivo e três molares por hemiarcada. No entanto os incisivos apresentam crescimento contínuo, sendo os molares os de escolha para utilização em periodontite experimental por apresentarem estrutura e organização dos tecidos periodontais semelhantes aos humanos. A única diferença é o epitélio sulcular gengival que apresenta-se queratinizado nestes animais (PAGE; SCHROEDER, 1982). Segundo Takata et al. (1988) os metabólitos do biofilme dento-bacteriano colocados no sulco gengival, penetram no tecido conjuntivo via epitélio juncional, descartando a importância da queratinização do epitélio sulcular nestes animais.

Os ratos apresentam a característica de erupção passiva dos dentes para compensar a atrição das superfícies oclusais com aumento da idade dos animais, além de haver uma migração distal desses dentes, e com isso uma contínua remodelação óssea alveolar. No entanto a distância entre a junção cimento-esmalte e a crista óssea alveolar permanece constante em ratos livres de doença periodontal (KLAUSEN, 1991).

O método de indução de periodontite nestes animais pode ser por meio de manipulação dietética (SALLAY et al., 1984; KLAUSEN, 1991), da inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos (FIEHN; KLAUSEN; EVANS, 1992) e, ainda, a mais utilizada, que consiste na colocação de ligaduras de fio de algodão ou seda ao redor da região cervical dos molares, na margem gengival e dentro do sulco gengival, permitindo o acúmulo de biofilme bacteriano, provocando conseqüentemente, a inflamação gengival (JOHNSON, 1975; KARA et al., 2012) (FIGURAS 5 a 8).

O tempo de indução da doença tem variado entre diferentes relatos encontrados na literatura. Johnson (1975) observou histologicamente um pico de reabsorção da crista óssea alveolar aos 17 dias após a colocação de ligaduras nos primeiros molares inferiores. Sallay et al. (1982), demonstraram que com 9 dias observava-se inflamação aguda, sequestro ósseo e destruição da crista óssea, com etiologia de origem bacteriana.

Em 2000, Bezerra et al. observaram que a perda óssea alveolar em modelo de periodontite experimental em ratos mostrava-se evidente após o 4º dia de indução da doença, alcançando pico máximo no 7º dia, persistindo inalterado até o 11º dia. Samejima et al. (1990) demonstraram que a ligadura é um meio de implantação da *Eikenlla corrodens* na cavidade bucal dos ratos e que a mesma causa reabsorção óssea neste modelo animal.

Neste modelo animal, os dentes que não recebem ligadura apresentam um quadro de inflamação subclínica, o que é normal, pois não é possível eliminar todos os agentes irritantes da cavidade bucal (SAMEJIMA et al., 1990; GALVÃO et al., 2003).

Os aspectos clínicos e histológicos da periodontite experimental em ratos também são semelhantes aos humanos, onde se observa acúmulo de placa, achatamento e deslocamento da margem gengival, aumento da proliferação do epitélio para o tecido conjuntivo subjacente, infiltrado inflamatório celular, principalmente de mononucleares, migração apical do epitélio juncional, reabsorção da crista óssea alveolar e região inter-radicular, reabsorção de cimento e dentina (KLAUSEN, 1991, BEZERRA et al., 2000).

Assim, estudos em ratos têm contribuído enormemente em varias áreas da periodontia, incluindo estrutura tecidual, regeneração, reações a drogas, bem como podem ser utilizados em estudos de patogenicidade, estudos imunológicos e de imunização (PAGE; SCHROEDER, 1982; MATTIA et al., 1986; KLAUSEN, 1991).

2.3 DOENÇA PERIODONTAL E ESTRESSE OXIDATIVO

A descrição de espécies químicas na forma de radicais livres ocorreu no ano de 1900. Entretanto, reações envolvendo radicais livres no meio biológico foram consideradas de importância após 1940, com a introdução de técnicas que permitiam a detecção destes e os estudos da cinética das reações envolvendo espécies químicas de meia-vida curta (BERGENDI et al., 1999).

As espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (ERO/ERN), por apresentarem, em sua maioria, alta reatividade, apresentam potencialidade deletéria ao organismo quando presentes em grandes concentrações. Entretanto, quando produzidas, em pequenas quantidades e em locais específicos das células, são toleradas e estão envolvidas em inúmeros processos de sinalização que regulam o crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular. Assim, o equilíbrio entre a formação e remoção destas espécies reativas no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (CADENAS, 1989; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Na existência de um desequilíbrio, as ERO/ERN promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde do

organismo. Esses danos teciduais podem ser por meios diretos, como através da peroxidação lipídica, modificação de proteínas celulares e ácidos nucleicos, ou por meio indiretos, nos quais os oxidantes afetam diferentes cascatas de sinalização bioquímica induzindo, por exemplo, a produção e a liberação de citocinas inflamatórias (RIBEIRO, et al., 2005; NAKAJIMA et al., 2010).

Para evitar esta ação prejudicial das ERO/ERN, as células possuem mecanismos de defesa antioxidantes que incluem a ação de enzimas, entre elas, as superóxido dismutases (SOD), glutathiona peroxidase (Gpx), catalase (CAT) e tioredoxinas, ou ação não enzimática, pelas reações de vitaminas A, C, E, glutathiona (GSH), melatonina e ácido úrico, entre outros compostos. Através destas ações de defesa, o organismo mantém a concentração de ERO/ERN dentro dos limites fisiológicos, regulando, assim, o nível de alvos moleculares oxidados (RIBEIRO et al., 2005).

O desequilíbrio entre ERO/ERN e antioxidantes é definido como estresse oxidativo. Esse desequilíbrio pode ser decorrente do aumento da produção das ERO/ERN, redução da defesa antioxidante ou de ambos os eventos simultâneos (NAKAJIMA et al., 2010). Alguns autores demonstram que o estresse oxidativo está associado com a patogênese de uma série de condições deletérias, como câncer, artrite reumatoide, aterosclerose, doença de Parkinson, e, mais recentemente, tem sido investigado seu papel na periodontite (KARA et al., 2012).

Em um processo inflamatório e/ou infeccioso, como na periodontite, os leucócitos polimorfonucleares, principalmente os neutrófilos, são as primeiras células a serem ativadas na defesa do organismo junto com os macrófagos. Essas células apresentam a função de eliminar microrganismos invasores e em seguida morrem espontaneamente. São atraídos quimiotaxicamente por células secretoras (mastócitos e basófilos), bactérias e outros corpos estranhos para áreas de inflamação. Nestes sítios, os neutrófilos fagocitam os microrganismos, recobertos ou não com complemento ou anticorpos específicos, os quais são mortos por proteínas citotóxicas derivadas dos grânulos citoplasmáticos e por ERO/ERN produzidas sob estímulos específicos (MARUYAMA et al., 2011; KARIM et al., 2012).

Na inflamação, a produção de ERO/ERN é um processo vital na defesa do organismo contra agentes estranhos ao organismo, e se inicia quando o fagócito recebe estímulos para o englobamento do microrganismo, originando uma série de alterações metabólicas coordenadas, as quais geram um aumento abrupto do consumo de oxigênio aproximadamente 30 segundos após a estimulação. A ativação do processo de fagocitose estimula no fagócito um abrupto aumento da taxa metabólica, referido, na literatura, como *burst* oxidativo ou respiratório, o qual é caracterizado pelo aumento do consumo de oxigênio, aumento da

glicólise anaeróbica e geração de oxidantes derivados do oxigênio e do nitrogênio (BABIOR, 2004).

O *burst* respiratório é o evento central da fagocitose. Esse mecanismo microbicida oxidante dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, que, quando ativado, se posiciona na membrana do fagolisossomo. Este complexo enzimático, chamado de NADPH oxidase, foi redenominado sistema Nox2, por constituir-se uma isoforma específica de ocorrência em fagócitos (ARNHOLD, 2004).

O *burst* respiratório não utiliza o O₂ para a síntese de ATP, através da respiração mitocondrial; esse é transformado em metabólitos muito reativos, como ânions superóxido, peróxidos e outras espécies oxidantes, que por apresentar grande reatividade com macromoléculas, são potencialmente capazes de desencadear efeitos lesivos (BABIOR, 2004; BRASILEIRO FILHO, 2004).

A evidência da ligação de estresse oxidativo com a destruição patológica do tecido conjuntivo durante a DP repousa sobre a presença e infiltração de neutrófilos como o evento principal na resposta do hospedeiro à invasão bacteriana. Dentre os oxidantes produzidos no fagossoma de neutrófilos, o ânion superóxido, pode estar envolvido na sinalização de indução de reabsorção óssea nos tecidos periodontais (KATSURAGI et al., 2003); o radical hidroxila é extremamente reativo e capaz de danificar biomoléculas importantes, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, enquanto que o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar membranas, danificando células adjacentes e ampliando a cascata oxidativa. Com isso, a maioria dos artigos sobre o tema demonstra que a periodontite está associada ao aumento da peroxidação lipídica (TONGUC et al., 2011; PANJAMURTHY; MANOHARAN; RAMACHANDRAN, 2005) e de proteínas carboniladas (CANACKI et al., 2006; KONOPKA et al., 2007), além da diminuição dos antioxidantes, como glutathione reduzida (GSH) (TONGUC et al., 2011; KARA et al., 2012). Ainda, existem evidências da diminuição de injúrias oxidativas e de alterações no sistema antioxidantes após tratamento periodontal (KIM et al., 2010; KARA et al., 2012).

Frente às evidências da possível associação do estresse oxidativo com a progressão da periodontite, apesar do assunto ainda ser pouco abordado na literatura especializada, forma poderia ser interessante a associação de antioxidantes no tratamento dessa patologia.

2.4 TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

A avaliação do sucesso da terapia periodontal é feita por sondagem clínica e análises radiográficas, que permitem analisar e quantificar o tecido ósseo, visto que a periodontite crônica tem uma progressão lenta (HAUSMANN, 2000; GOES et al., 2010).

O tratamento da DP baseia-se na eliminação da microbiota subgingival patogênica pelos procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) (KALDAHL et al. 1993; LISTGARTEN, 1975). Entretanto, a terapia mecânica utilizada isoladamente pode ser falha na eliminação de bactérias patogênicas por estas localizarem-se no interior dos tecidos moles, duros ou em áreas inacessíveis aos instrumentos periodontais, como áreas de furca e depressões radiculares (ADRIAENS et al., 1988; MATIA et al., 1986).

Em decorrência destas limitações, métodos coadjuvantes que promovam a eliminação de patógenos periodontais, como o uso de antibióticos ou antissépticos, são efetivos no tratamento periodontal (RAMS E SLOTS, 1996). Porém, o uso indiscriminado desses medicamentos pode levar à ocorrência de resistência bacteriana, dificultando a resposta do indivíduo ao tratamento (GAD et al., 2004; KLEINFELDER et al., 1999; KÖMERIK, 2003; USACHEVA et al., 2001).

2.5 NITRÓXIDOS CÍCLICOS

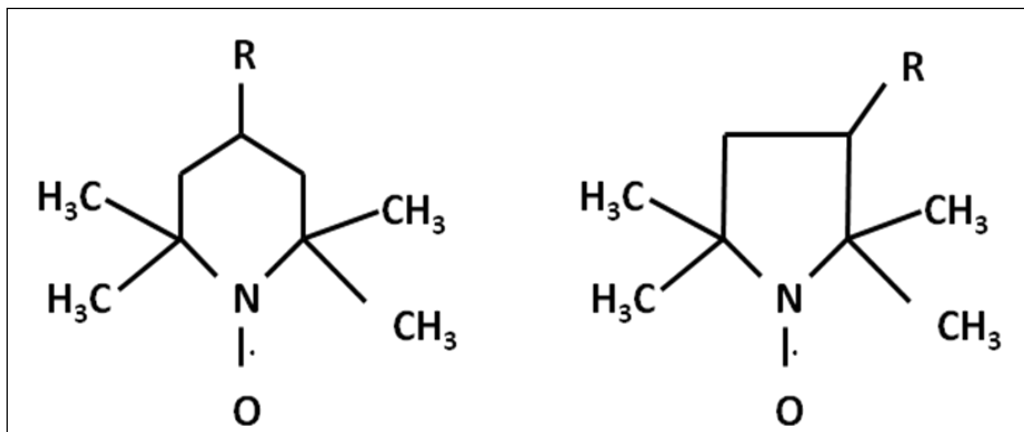
Durante os últimos anos, os nitróxidos têm sido amplamente investigados por sua capacidade antioxidante, mostrando-se capazes de defender células, tecidos, órgãos e animais de laboratório de danos induzidos por oxidantes. Diversos estudos os apontam como candidatos eficientes para atuar contra os danos tissulares causados pelas ações deletérias de células inflamatórias, cuja produção de ERO/ERN fuja ao controle da homeostase orgânica (HAHN et al., 1997; LAIGNIER et al., 2008; TIMONER et al., 2008).

Definidos como aminóxils ou nitroxils, os nitróxidos podem ser conceituados como radicais livres sintéticos e estáveis, capazes de proteger células, tecidos e órgãos animais contra danos oxidativos (GOLDSTEIN, et al., 2008).

Os compostos representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) ou seis átomos (piperidina), sendo que um desses

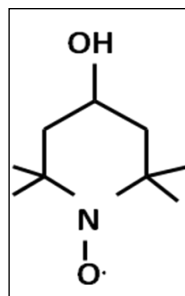
é de nitrogênio e os demais de carbono (SOULE et al., 2007). Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui um par de elétrons livres, fornecendo natureza radicalar a tais compostos. Ligados à posição alfa do anel existem grupamentos metil, os quais conferem estabilidade ao prevenir a dismutação radical-radical e limitar o acesso de substâncias reativas que poderiam quelatar as espécies radicalares. O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos substituintes que podem estar presentes no anel (SAMUNI; BARENHOLZ, 2003; SOULE et al., 2007) (FIGURAS 1 e 2).

FIGURA 1- Estrutura química dos nitróxidos cíclicos. O composto à esquerda pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. Já a estrutura à direita integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. Adaptado de HAHN et al., 1994; SOULE et al., 2007



Nota: Adaptado de ISRAELI et al., 2005.

FIGURA 2- Estrutura química do nitróxido 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (Tempol)



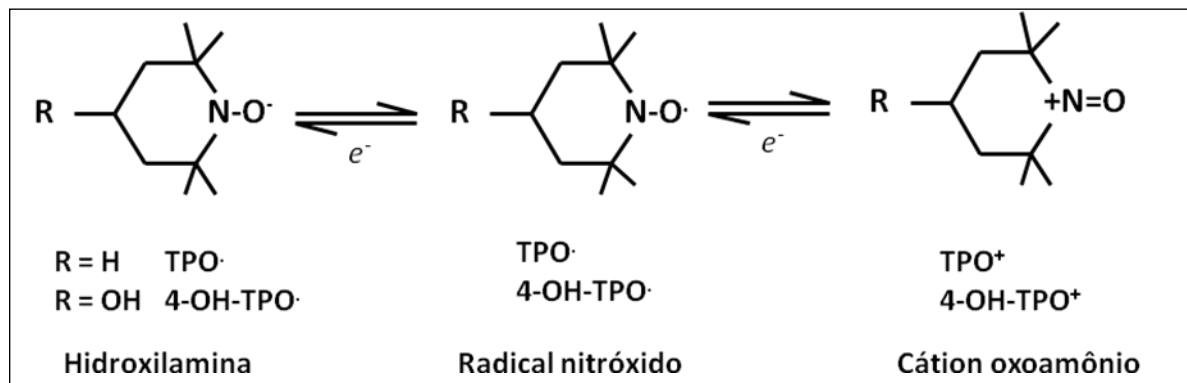
Nota: Adaptado de ISRAELI et al., 2005.

Os diferentes tipos de anéis e substituintes produzem diferentes nitróxidos com propriedades físico-químicas distintas (KROLL et al., 1999). Por apresentarem estabilidade química e propriedades paramagnéticas permanentes, os nitróxidos são empregados como sondas em estudos envolvendo Ressonância Paraleletromagnética (EPR) e são usados como agentes de contraste para imagem de ressonância magnética (MRI) (SOULE et al., 2007). Estudos apontam os primeiros usos dos nitróxidos como sondas biofísicas e marcadores para estudos de membranas e proteínas (FEDELI et al., 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar como os nitróxidos são capazes de atenuar danos oxidativos, o que os difere consideravelmente dos antioxidantes monofuncionais, que desempenham a sua atividade através de uma única maneira de atuação. Ao contrário desses, os nitróxidos apresentam características que devem estar presentes em antioxidantes realmente efetivos, pois podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos, detoxificam uma ampla gama de espécies reativas oxidantes, impedindo o início e a propagação da cadeia oxidativa, além de atuarem de modo que o nitróxido utilizado nessa função pode ser, ao menos parcialmente, reciclado à sua estrutura original. Especificando os meios pelos quais essa classe de compostos atua, são relatados (i) dismutação de radicais superóxido, por meio de uma atividade mimética à da SOD, (ii) aumento da atividade semelhante à da CAT e de outras heme-proteínas, (iii) detoxificação de espécies reativas formadas por xenobióticos, (iv) capacidade de interagir com radicais inativando-os e (v) modulação da sinalização redox da célula (KRISHNA et al. 1994; SAMUNI et al. 2002; TIMONER et al. 2008).

Por meio de processos metabólicos celulares ou reações não enzimáticas, nitróxidos são metabolizados produzindo hidroxilaminas ou cátion oxoamônio. A atividade antioxidante dos nitróxidos está associada com a troca de um elétron envolvendo sua forma reduzida (hidroxilamina) e oxidada (cátion oxoamônio) (ISRAELI et al., 2005; SOULE et al., 2007) (FIGURA 3).

FIGURA 3- Processo redox de metabolização de nitróxidos. Os nitróxidos passam por uma seqüência de reações bioquímicas, formando hidroxilamina ou cátion oxoamônio



Nota: Adaptado de ISRAELI et al., 2005.

O cátion oxoamônio, altamente oxidante, é responsável pelas atividades pró-oxidantes dos nitróxidos e seus efeitos colaterais (ISRAELI et al., 2005). Por outro lado, a hidroxilamina pode doar um átomo de hidrogênio funcionando como defesa antioxidante (SOULE et al., 2007).

A redução celular dos nitróxidos é influenciada pela estrutura química. *In vitro*, nitróxidos pirrolidínicos se mostraram mais resistentes à redução produzindo hidroxilamina em comparação com nitróxidos piperidínicos. *In vivo*, nitróxidos pirrolidínicos são mais estáveis que nitróxidos piperidínicos, e esta estabilidade depende dos diferentes grupos funcionais (KOMAROV et al., 1994).

Uma das primeiras propriedades que despertou interesse foi a capacidade que os nitróxidos possuem de mimetizar as enzimas superóxido dismutase. O mecanismo dessa atividade mimética é compreendido atualmente como fruto da atuação do par redox cátion oxoamônio/nitróxido, o qual forma um ciclo que tende a regenerar o nitróxido. Sendo assim, a forma radicalar é oxidada através da doação de um elétron do ânion superóxido, originando um cátion oxoamônio, o qual sofre redução através da doação de um elétron de outro ânion superóxido, restaurando o nitróxido e originando oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio. De maneira similar à da SOD endógena, os nitróxidos atuam como catalisadores, e não são consumidos durante o processo de dismutação (SAMUNI et al. 2002; SOULE et al. 2007). Apesar de o mecanismo permanecer obscuro, os nitróxidos são capazes de proteger a células de danos que possam ser induzidos pela presença do peróxido de hidrogênio (SAMUNI et al. 2002).

Krishna et al. (1994), demonstraram que nitróxidos eles aumentam o comportamento semelhante ao da CAT apresentado por algumas heme-proteínas. Adicionalmente, a interação

entre nitróxidos e metais de transição se mostra importante, uma vez que eles são capazes de oxidar os metais que se encontram na forma reduzida, tais como Fe^{2+} e Cu^+ , tornando-os indisponíveis para a reação de Fenton, evitando a produção de espécies muito oxidantes, como o radical hidroxila. (ARONOVITCH et al. 2007; SOULE et al. 2007).

A atividade antioxidante dos nitróxidos deve-se à sua capacidade de atuarem como *scavengers* de radicais livres realizando reações rápidas que produzem espécies não tóxicas evitando os efeitos deletérios desses no organismo, podendo encerrar reações em cadeia, como a peroxidação lipídica (SAMUNI et al., 2002; GLEBSKA et al. 2003; SOULE et al., 2007).

A possibilidade dos nitróxidos atuarem diminuindo os danos causados por oxidantes produzidos por células efetoras da imunidade os coloca como possíveis anti-inflamatórios. Hahn et al. (1997) propuseram que os nitróxidos poderiam atuar sobre as condições inflamatórias, exercendo uma ação protetora em células de plasmacitoma, impedindo danos ao DNA causados pelas espécies reativas produzidas por neutrófilos estimulados com forbol. FERNANDES et al. (2004) demonstraram que a inibição da nitratação de proteínas, a qual ocorre por mecanismos radicalares, pode ser responsável pela proteção que o Tempol fornece a tecidos e células em modelos de inflamação.

Uma hipótese que desperta atenção é a de que nitróxidos possam atuar como *scavengers* de radicais tiila, especialmente glutationila, impedindo modificações pós-traducionais de diferentes proteínas. O fato, a princípio, reduziria a atividade de quinases, diminuindo a permanência do estado de fosforilação das proteínas responsáveis pela sustentação da atividade do complexo Nox2 de fagócitos, levando a uma redução da produção de oxidantes formadas durante o processo inflamatório.

Quando administrados de forma sistêmica, os nitróxidos, em muitos casos, desencadeiam respostas acompanhadas de alterações da hemodinâmica, as quais envolvem o desenvolvimento de hipotensão e a inibição da agregação plaquetária. Contudo, existem nitróxidos que não causam essas manifestações, sendo ainda benéficas as atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e radioprotetoras apresentadas por esses (RAIKOV; RAIKOVA; ATANASOV, 2001).

A capacidade antioxidante de nitróxidos já se mostrou eficiente em auxiliar na recuperação e na redução de danos causados pela isquemia e reperfusão em corações de ratos. Esses resultados podem ter sido atingidos, não só combatendo os danos causados por radicais formados sob essa circunstância, mas também potencializando os efeitos positivos

ocasionados pela administração de L-arginina e posterior produção de óxido nítrico, o qual pode atuar sem que os efeitos deletérios do peroxinitrito e derivados estivessem presentes (HOFFMAN et al. 2003).

Como fora mencionado, a atividade anti-inflamatória dos nitróxidos pode oferecer novas alternativas terapêuticas no tratamento de inúmeras doenças, principalmente aquelas que envolvem a participação de células fagocitárias e a produção de ERO/ERN. Dentre essas, pode-se citar a uveoretinite de origem autoimune, que quando induzida em ratos de linhagem Lewis e tratada com Tempol, obteve redução de danos causados a nível clínico, bioquímico e histopatológico (ZAMIR et al. 1999).

Alguns nitróxidos, como Tempo (2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) e Tempamina (4-amino-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil), além de Tempol, também foram capazes de proteger o cérebro, em modelos experimentais de injúria causada por trauma, sendo esse efeito anti-inflamatório atribuído à atividade mimética à da SOD, à inibição da reação de Fenton e à capacidade de atuar neutralizando radicais (ZHANG; GOLDSTEIN; SAMUNI, 1999).

A maioria dos textos encontrados não descreve ou cita nenhuma evidência que a classe dos nitróxidos possua ação mutagênica, carcinogênica ou teratogênica (SOULE et al. 2007). No entanto, Wang et al. (1996) apontam o fato de que existem informações conflitantes a respeito da mutagenicidade dos nitróxidos, tendo sido observados tanto efeitos citotóxicos, como mutagênicos em células de *S. typhimurium* sensíveis a danos oxidativos e expostas a doses elevadas.

Ao contrário do esperado, os nitróxidos também demonstraram baixa capacidade de proteger células mutantes de *Escherichia coli* deficientes em genes de reparo do DNA, podendo potencializar a citotoxicidade do peróxido de hidrogênio e a ocorrência de danos oxidativos no material genético. Contudo, os resultados sugerem que a atividade observada não resulta da ação dos nitróxidos, mas sim da deficiência das células em questão. Também é conveniente lembrar que existe a possibilidade de que o metabolismo de nitróxidos ocorra de maneira distinta, dependendo do tipo celular, sendo necessário conhecer as vias que ditam esse processo e como obter proveito dessas descobertas visando, por exemplo, diminuir a metabolização, o que repercutiria na duração e intensidade dos efeitos (NISHIMURA; SWARTZ, 1994).

A atividade antioxidante e protetora dos nitróxidos foi comprovada em diferentes células, sob condições de estresse oxidativo/nitrosativo diversas. Estudos recentes envolvendo o nitróxido Tempol e fibroblastos humanos apontaram que este composto oferece proteção

contra raios UVA 1 e, se comparado a vitamina C (1mg/mL), tem atividade fotoprotetora igual ou superior. Esses resultados sugerem uma perspectiva de uso para o Tempol como agente anti-foto-envelhecimento na medicina e em cosméticos (YAN et al., 2005; KRISHNA et al., 1994).

Em geral, os nitróxidos apresentam grandes perspectivas em relação ao seu uso. Relatos recentes mostraram que Tempol foi eficiente em inibir a atividade clorinante da enzima mieloperoxidase (MPO) (QUEIROZ et al., 2011), bem como em reduzir a migração neutrofílica e danos tissulares decorrente de MPO (QUEIROZ et al., 2012) em focos inflamatórios. Entretanto, existem estudos que mostraram que o este nitróxido, devido à mesma ação química, inibiu o mecanismo de defesa de macrófagos contra *Leishmania amazonensis* em modelo animal (LINARES et al., 2008). Em concordância com este último resultado, nosso grupo de pesquisa relatou, recentemente que o Tempol administrado por via oral, causou perda significativa da capacidade fungicida de neutrófilos em um modelo animal (LIMA et al., 2011), bem como produziu o mesmo efeito em neutrófilos humanos tratados *in vitro* com o nitróxido e expostos a *Candida albicans* (RESENDE et al., 2013).

Frente aos relatos expostos, fica clara a necessidade de que mais pesquisas sejam realizadas, a fim de que as propriedades dos compostos da classe de nitróxidos sejam aplicadas de modo conveniente e seguro em processos inflamatórios, quando esses ocorrem associados a infecções

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do antioxidante nitróxido Tempol como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar os marcadores de estresse oxidativo gengival na doença periodontal e sua modulação pelo Tempol;
- b) Mensurar, radiograficamente, a área de reabsorção óssea na mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos de ratos, onde houve indução de doença periodontal e o efeito do Tempol sobre este processo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, seguindo as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sob protocolo 472/2012 (ANEXO 1).

4.1 ANIMAIS

No estudo, utilizou-se 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 200 a 250g, com 2 a 3 meses de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com seis animais cada uma, separados de acordo com os grupos e períodos experimentais, e foram alimentados com ração e água *ad libitum*. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: C, T e T1, com dezoito animais cada um. Seis animais foram mantidos como controle basal, ou seja, nenhum tratamento local ou sistêmico foi realizado.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Os animais do Grupo C (n=18) receberam por via oral 1,0 mg/kg de peso corpóreo de polietilenoglicol 400 (veículo) e os do grupo T (n=18) e T1 (n=18) 1,0 mg/kg de peso corpóreo de Tempol (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO) (QUEIROZ et al . , 2012) .

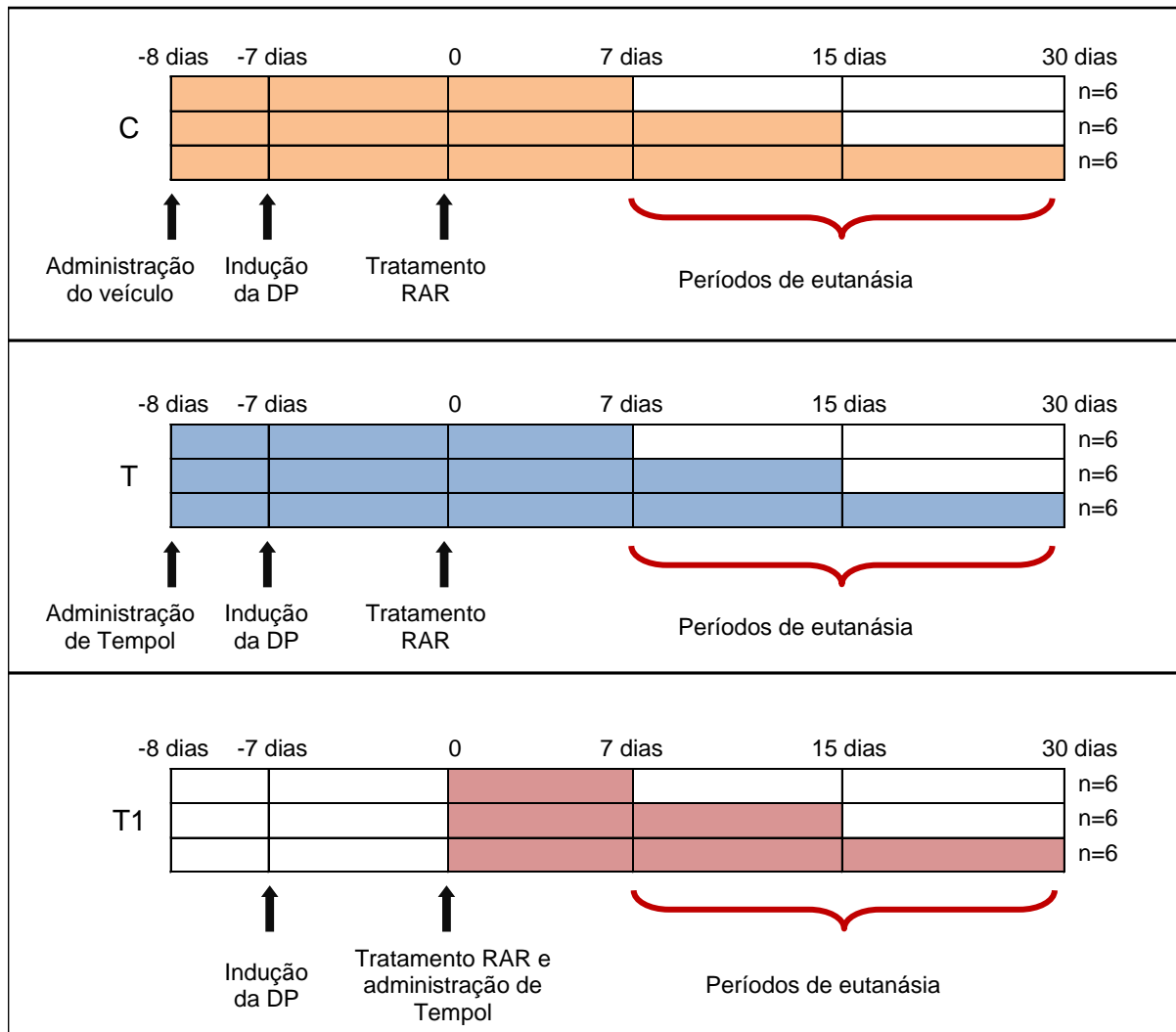
. As administrações foram realizadas uma vez ao dia durante todo o período experimental, até o final dos respectivos períodos de eutanásia (7, 15 e 30 dias).

Os animais do grupo T começaram a receber Tempol e os animais do grupo C, o veículo 24 horas antes da indução da DP (FIGURA 4).

A administração de Tempol para os animais do grupo T1 foi iniciada após o tratamento de RAR (FIGURA 4).

Todos os animais foram pesados semanalmente durante o período experimental para possível adequação das doses. O Tempol foi diluído em veículo, no momento da administração, obtendo-se concentração final de 1,0 mg/mL.

FIGURA 4- Delineamento do estudo Grupo C (n=18), Grupo T (n=18) e Grupo T1 (n=18)



Fonte: Da autora

4.3 INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL

Realizou-se a anestesia dos animais por meio de injeção intramuscular associando 0,4 mL/kg de Cloridrato de Quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA) e 0,02 mL/kg de Cloridrato de Xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil).

Com o auxílio de uma pinça modificada um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão n° 10; Coats Corrente, SP, Brasil) foi adaptado ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, mantidos em posição por meio de nós cirúrgicos (FIGURAS 6 a 9) (JOHNSON, 1975). O lado contralateral (direito) foi tido como controle negativo.

FIGURA 5 - Animal posicionado na mesa operatória



Fonte: Da autora.

FIGURA 6 - Pinça modificada utilizada para passagem do fio



Fonte: Da autora.

FIGURA 7 - Posicionamento do fio



Fonte: Da autora.

FIGURA 8 - Fio Posicionado



Fonte: Da autora.

4.4 TRATAMENTO LOCAL

Decorridos 7 dias da indução da DP, a ligadura foi removida de todos os animais do experimento e estes foram tratados com RAR e irrigação com 1,0 mL de soro fisiológico.

Os procedimentos de RAR foram realizados utilizando Cureta de Mc Call (Hu-Friedy MFG. Corporation. Inc. Chicago, USA). As soluções de soro fisiológico foram depositadas no interior da bolsa periodontal lentamente, utilizando seringa e agulha para insulina (13,0 mmx 0,04 mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil) sem bisel (FIGURAS 9 e 10).

FIGURA 9 - Doença periodontal após 7 dias de indução



Fonte: Da autora.

FIGURA 10 - Raspagem e alisamento radicular



Fonte: Da autora.

4.5 PERÍODOS EXPERIMENTAIS

Seis animais de cada subgrupo experimental foram eutanasiados por exanguinação aos 7, 15 e 30 dias após o tratamento de RAR para posterior análise dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo. As mandíbulas foram removidas para coleta do tecido gengival dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, do lado vestibular, para análise bioquímica. A seguir foram seccionadas ao meio e fixadas em formol tamponado a 10% por um período de no mínimo 48 horas.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS GENGIVAIS

Amostras de tecido gengival foram homogeneizadas com tampão fosfato (3,0 mL, pH=6,5). O homogenato foi centrifugado (1.500xg) durante 10 minutos, o sobrenadante foi separado em alíquotas para posteriores análises bioquímicas.

4.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTEICA TOTAL

As concentrações proteicas foram determinadas em todas as amostras de homogenato gengival pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão da curva de calibração.

4.8 DETERMINAÇÃO DO TRIPEPTÍDEO GLUTATIONA (GSH)

Para o doseamento de GSH no tecido gengival de ratos os derivados alquilados do monobromobimano (mBBr, Life Technologies, Carlsbad, CA) dos tecidos foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna C-18 (Shim-pack VP-ODS, 4,6mm x 25cm, 5 μ m, conectada em série com pré-coluna C18 modelo Shim-pack GVP-ODS, 4,6mm x 10mm), equilibrada com tampão A (etanol 14,2% e ácido acético 0,25% m/v, 1 mL/minuto).

Amostras das suspensões teciduais, derivatizadas com mBBr, foram injetadas e a eluição (tampão A) foi realizada durante 30 minutos. Em seguida, a coluna foi lavada com tampão B (metanol 90% e ácido acético 0,25%) por 8 minutos e reequilibrada com o tampão A. A determinação de ácido sulfossilicílico (padrão interno de referência) e GSH foi realizada pela comparação com o tempo de retenção de padrões autênticos (10-200 nmol) por meio de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se $\lambda_{exc}=394\text{nm}$ e $\lambda_{emi}=490\text{nm}$ ($\epsilon=20\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) e a quantificação foi feita por análise da integral das respectivas áreas (Software "LC-Solution Multi") (PUNCHARD; KELLY, 1996).

Para padronização do método foi feita uma curva de calibração usando padrões de GSH. Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente que tem mBBr como agente derivatizante. Os resultados foram expressos em nmol GSH/mg de proteína.

4.9 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA)

A quantificação de lipoperoxidação nas amostras gengivais foi realizada pela determinação de MDA. Para cada 50 μ L de homogeneizados gengivais em tampão fosfato pH 7,2, adiciona-se 250 μ L de ácido fosfórico 1,22 M, 450 μ L de Água Mili-Q e 250 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) e butilhidroxitolueno 1 mM (BHT) Após isso, agita-se as alíquotas por 30 segundos e incuba a reação por 1 h em banho-maria a 95°C e resfria em banho de gelo a 4°C. Após este processo adiciona 360 μ L de metanol (grau CLAE) e 40 μ L de NAOH 1M para 200 μ L de amostra, para neutralizar os solutos e precipitar as proteínas. A separação de MAD foi feita por injeções em colunas C18 em equipamento de CLAE, com uso de detector de fluorescência (modelo RF-10AXL) utilizando-se $\lambda_{exc}=515\text{nm}$ e $\lambda_{emi}=553\text{nm}$. (PUNCHARD; KELLY, 1996). Os resultados foram calculados e expressos como μg MDA/mg de proteína.

Para padronização do método foi construída uma curva de calibração com padrões de MDA produzidos a partir de 1,1,3,3-tetraetoxipropano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Estes padrões foram preparados conforme o protocolo descrito anteriormente que tem TBA como agente derivatizante para produção do aduto TBA-MDA.

4.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS CARBONILADAS (CPO)

Para a determinação das proteínas carboniladas utiliza-se 500 μ L das alíquotas em tampão fosfato pH 7,2, acrescentando 500 μ L da solução 2,4-dinitrofenilhidrazina.

Após isso, incubar por 1 h e, depois gotejar 500 μ L da solução de ácido tricloroacético (TCA) 20%, até a precipitação completa. Acrescentar 500 μ L da solução Etanol/Acetato de Etila e centrifugar a 2000 rpm, por 10 minutos. Descartar o sobrenadante e adicionar

novamente 500 µL da solução Etanol/Acetato de Etila e centrifugar. A seguir, descartar o sobrenadante e dissolver o precipitado com 1000 µL de Guanidina 6 M, que deverá ser homogeneizada. A taxa de variação em absorvância foi medida espectrofotometricamente a 370 nm e a concentração calculada utilizando $\epsilon=22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ e expressa como nmol CPO/mg de proteína. (PUNCHARD E KELLY, 1996).

.11 RADIOGRAFIAS E ANÁLISE DIGITAL

Após a fixação das peças em solução de formol a 10% por 48 horas, os lados direito e esquerdo da mandíbula foram divididos e radiografados.

Sobre uma mesa, as hemimandíbulas foram posicionadas com as superfícies vestibulares voltadas para a película radiográfica (Dental Intraoral E-Speed Film - Kodak), de tal forma que o lado direito ficasse na parte inferior, e a parte esquerda na superior.

A padronização das tomadas radiográficas foi obtida da seguinte forma:

- a) uso de um aparelho de raios X Pampas - E (General Electric, Milwaukee, EUA), com regime elétrico de 65 kvp, 10 mA;
- b) feixe central de raio X incidindo perpendicular ao plano do filme-objeto, em um ângulo de 90° com a superfície da placa óptica;
- c) distância focal de 30 cm;
- d) tempo de exposição 0,8 segundos;

As radiografias foram reveladas utilizando soluções de revelador e fixador Kodak, pelo método de revelação clima – tempo.

As radiografias foram escaneadas e as imagens foram analisadas no programa Imagelab (Softium, Brasil) com o uso da ferramenta distância e ângulo de mensuração. Com este recurso, mediu-se a distância da união cimento-esmalte à crista óssea alveolar na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos pelo traçado de uma linha, sendo essas medidas registradas em milímetros (mm). O mouse foi posicionado na região correspondente a união cimento-esmalte. O botão esquerdo foi acionado e arrastado até o nível da crista óssea alveolar e o programa mensurou a distância automaticamente.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados radiográficos e bioquímicos foi realizada por meio do programa BioEstat 5.0 (Bioestat Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil - 2007). A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa na taxa de perda óssea na região mesial entre os diferentes grupos/subgrupos e períodos nos dentes com periodontite induzida foi testada.

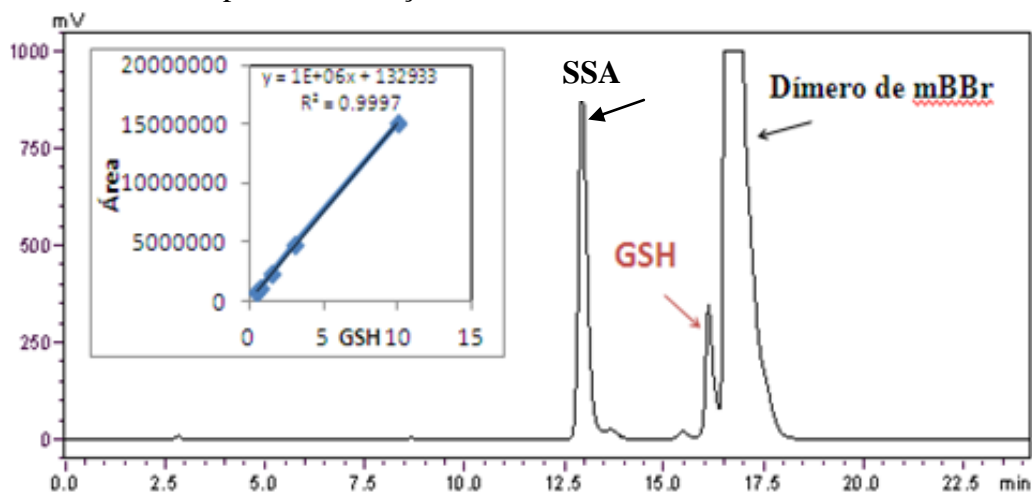
Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk, a análise intragrupo/subgrupos e intergrupos foram realizadas pela análise de variância a dois critérios ANOVA ($p < 0,05$) com complementação de Tukey com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CONTEÚDO DO TRIPEPTÍDEO GSH EM TECIDOS GENGIVAIS

A padronização do método cromatográfico para doseamento de GSH está mostrada na Figura 11, na qual estão mostrados os picos característicos obtidos com o padrão de GSH, o padrão interno SSA e o dímero de mBBr. A Figura 12 mostra um cromatograma característico obtido pela eluição de amostra homogenato de gengivas de ratos, após derivatização com mBBr,

FIGURA 11 – Cromatograma característico de detecção de GSH, no padrão, após derivatização com mBBr

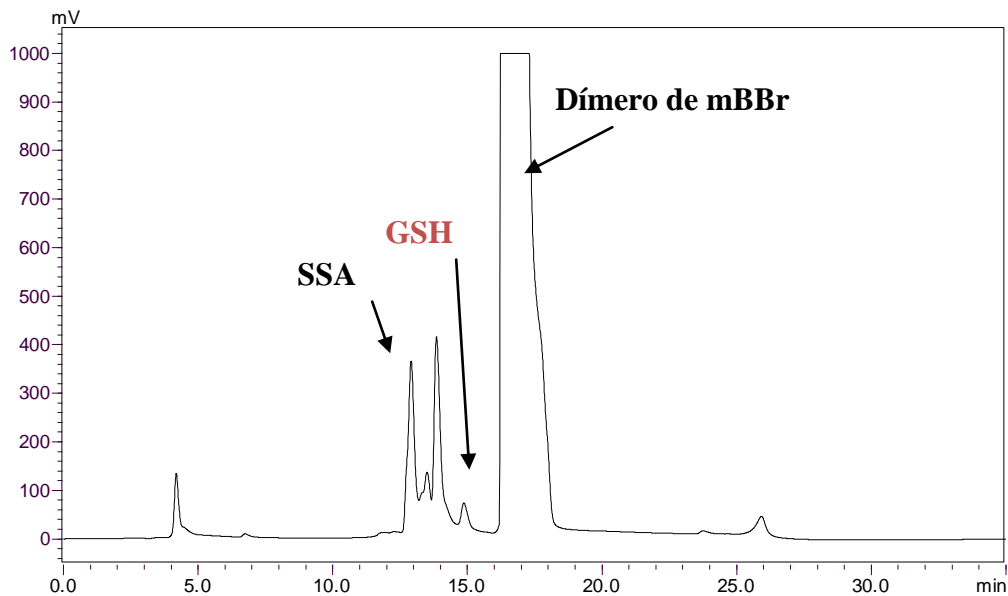


Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) de GSH foi de 15,5 minutos.

Inserido curva de calibração de GSH.

Fonte: Da autora

FIGURA 12 – Cromatograma característico de detecção de GSH, em amostra de homogenato gengival de ratos, após derivatização com mBBr



Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi de 15,5 minutos.

Fonte: Da autora.

A análise do conteúdo tissular de GSH explicitou que em todos os grupos e períodos experimentais os níveis deste tripeptídeo foram significativamente inferiores ($p < 0,05$) ao basal, sugerindo a ocorrência de danos oxidativos no modelo experimental proposto.

Na análise comparativa entre o grupo T e os demais grupos, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), exceto no tempo de 7 dias do grupo entre os animais deste grupo e aqueles do grupo T1.

Na comparação intragrupos, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nos valores de GSH, entre os períodos de 7, 15 e 30 dias, em todos os grupos estudados.

Entre os grupos C e T1 detectou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os períodos experimentais (TABELA 1).

Entretanto, destaca-se que o tratamento prévio à indução de DP com Tempol alterou significativamente o conteúdo tissular de GSH no trigésimo dia, quando os dados foram analisados em comparação com os dados correspondentes do grupo que recebeu o tratamento com o nitróxido 7 dias após a indução de DP. Este dado sugere que a recuperação dos tecidos gengivais foi acelerada pela administração prévia do composto antioxidante, o que pode ter favorecido a redução de formas oxidadas da glutathiona ao estado reduzido.

TABELA 1- Efeito da administração oral de Tempol sobre o conteúdo de glutatona reduzida (nmol GSH/mg proteína) em amostras gengivais. Periodontite foi induzida por ligadura e GSH foi doseada através de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{exc}=394nm$; $\lambda_{emi}=490nm$)

Grupo		C		
Basal		59,30±8,10		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		8,90±3,10 ^{+##*}	15,30±3,30 ^{+##*}	41,90±4,30 ^{+##*}
Grupo		T		
Basal		59,30±8,10		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		14,40±3,00 ⁺⁺	27,80±2,00 ⁺⁺	52,80±2,20 ⁺⁺
Grupo		T1		
Basal		59,30±8,10		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		14,75±3,7 ^{+##*}	29,21±1,8 ^{+##*}	32,25±4,1 ^{+##*}

Nota: Os resultados estão expressos como média ± d.p; n=6; R=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico

⁺ Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey com p<0,05)

- Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey com p<0,05)

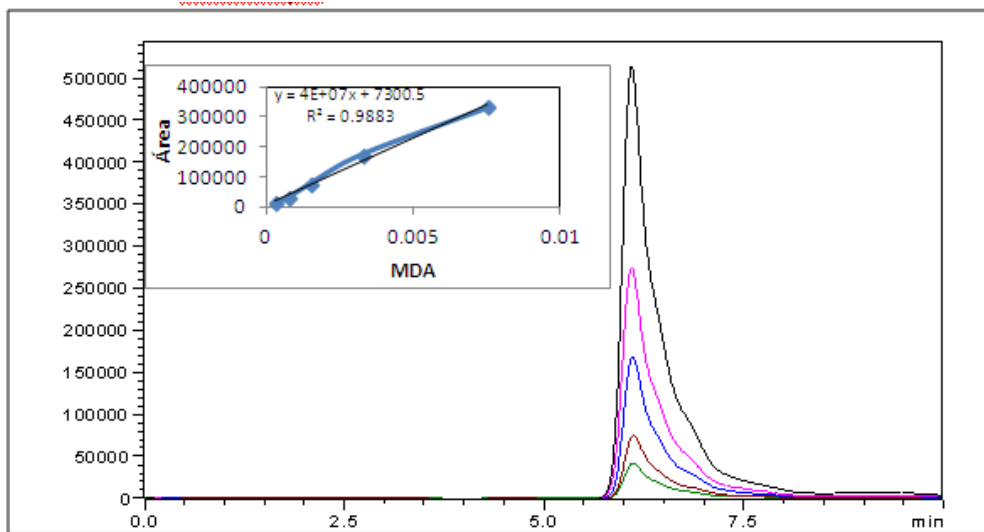
Diferença com o grupo T, mesmos períodos (ANOVA e Tukey com p<0,05)

* Diferença entre o grupo C e T1, mesmos períodos (ANOVA E Tukey, com p<0,05)

5.2 TEOR DE MDA EM TECIDOS GENGIVAIS COMO INDICADOR DE LIPOPEROXIDAÇÃO

No método utilizado para dosear MDA, os resultados obtidos estão representados abaixo, cujos cromatogramas representativos dos padrões foram sobrepostos para construção da curva de calibração (FIGURA 13). Um cromatograma obtido com injeção de uma das amostras de homogenato de tecidos gengivais está mostrado na Figura 14.

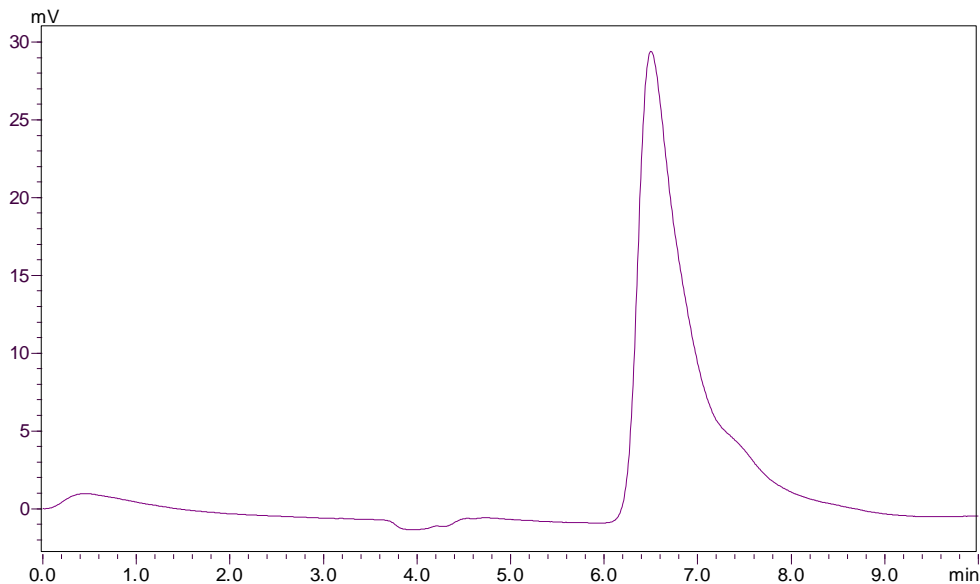
FIGURA 13 – Cromatograma característico de detecção de MDA no padrão, após derivatização com TBA



Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito (MDA-TBA) foi 6,5 minutos. Inserido curva de calibração de MDA.

Fonte: Da autora.

FIGURA 14 – Cromatograma característico de detecção de MDA em amostra de tecido gengival, após derivatização com TBA



Nota: Nessas condições, o tempo de retenção (RT) deste analito foi 6,5 minutos.

Fonte: Da autora.

Quando os dados obtidos foram comparados ao teor basal de MDA, verificou-se que no grupo que não recebeu Tempol (C) e foi submetido apenas ao tratamento não cirúrgico RAR, apresentou aumento temporal do conteúdo deste aldeído indicativo de lesões por

lipoperoxidação.

De forma inesperada, a administração de Tempol provocou aumento do teor de MDA detectado nos tecidos gengivais ($p < 0,05$), tanto em relação ao conteúdo basal quanto àqueles teores detectados no grupo C, exceto quando comparados os resultados 30 dias do grupo C e do T em relação ao grupo Basal.

Na análise comparativa do grupo T com os demais grupos, houve diferença ($p < 0,05$) em apenas alguns períodos experimentais, como mostrado na Tabela 2. Na comparação intragrupos, evidenciou-se diferença ($p < 0,05$) apenas entre os períodos de 7 e 30 dias no grupo T.

Entre os grupos C e T1 detectou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre todos os períodos experimentais (TABELA 2).

TABELA 2- Efeito do Tempol sobre lipoperoxidação ($\mu\text{g MDA/MG}$ proteína) decorrente de periodontite induzida. A ocorrência de danos oxidativos em lipídeos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}=515\text{nm}$; $\lambda_{\text{emi}}=553\text{nm}$) para detecção do aduto MDA-ácido tiobarbitúrico

Grupo		C		
Basal		0,33 \pm 0,02		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		0,30 \pm 0,20 ^{##*}	0,40 \pm 0,1 ^{##*}	0,60 \pm 0,1 [*]
Grupo		T		
Basal		0,33 \pm 0,02		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		1,30 \pm 0,10 ⁺⁻	1,10 \pm 0,20 ⁻	0,70 \pm 0,20 ⁺
Grupo		T1		
Basal		0,33 \pm 0,02		
Períodos		7 dias	15 dias	30 dias
Tratamento RAR		1,53 \pm 0,09 ^{-*}	1,95 \pm 0,4 ^{##*}	2,20 \pm 0,43 ^{##*}

Nota: Os resultados estão expressos como média \pm d.; n=6; R=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico

⁺ Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey com $p < 0,05$)

⁻ Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey com $p < 0,05$)

[#] Diferença com o grupo T, mesmos períodos (ANOVA e Tukey com $p < 0,05$)

^{*} Diferença entre o grupo C e T1, mesmos períodos (ANOVA E Tukey, com $p < 0,05$)

5.3 OCORRÊNCIA DE DANOS OXIDATIVOS EM PROTEÍNAS

A detecção de danos oxidativos em estruturas proteicas foi realizada pela quantificação de proteínas carboniladas. Analisando-se os níveis de CPO, verificou-se que nos três grupos experimentais houve aumento significativo ($p<0,05$) em relação ao basal.

Na análise comparativa do grupo T com os demais grupos, observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), exceto aos 15 dias do grupo T1.

Na comparação intragrupos observou-se diferença ($p<0,05$) em todos os períodos dos grupos experimentais.

Entre os grupos C e T1 detectou-se diferença significativa ($p<0,05$) apenas aos 15 dias (TABELA 3).

TABELA 3- Efeito do Tempol em danos oxidativos em proteínas (nmol CPO/mg proteína) induzidos por periodontite experimental. O conteúdo de carbonilas proteicas foi determinado em amostras gengivais através de análise espectrofotométrica ($\lambda=370$ nm; $\epsilon=22.000$ M⁻¹.cm¹)

Grupo		C		
Basal	6,43±1,22			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamento RAR	71,0±4,3 ⁺⁺	23,1±11,3 ^{++*}	38,7±4,3 ⁺⁺	
Grupo		T		
Basal	6,43±1,22			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamento RAR	66,4±8,0 ⁺⁻	53,4±10,0 ⁺⁻	23,7±7,0 ⁺⁻	
Grupo		T1		
Basal	6,43±1,22			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamento RAR	72,0±14,0 ⁺⁺	55,0±7,0 ^{++*}	39,0±6,0 ⁺⁺	

Nota: Os resultados estão expressos como média±d.p; n=6; R=raspagem, alisamento radicular e irrigação com soro fisiológico.

⁺ Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey com $p<0,05$)

- Diferença entre basal e grupos (ANOVA e Tukey com $p<0,05$)

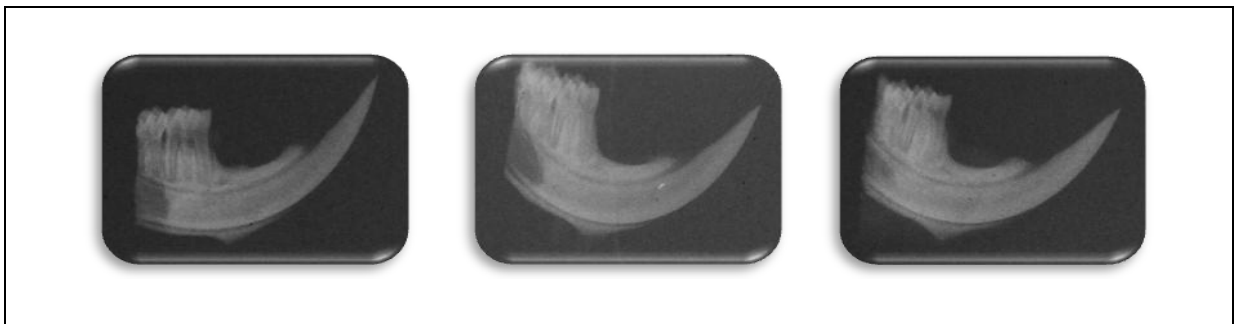
Diferença com o grupo T, mesmos períodos (ANOVA e Tukey com $p<0,05$)

* Diferença entre o grupo C e T1, mesmos períodos (ANOVA E Tukey, com $p<0,05$)

5.4 RESULTADOS DA ANÁLISE RADIOGRÁFICA

Os animais do grupo C não apresentaram diferença estatisticamente significativa no tratamento RAR ($1,20\pm 0,16\text{mm}$; $1,29\pm 0,26\text{mm}$; $1,18\pm 0,21\text{mm}$), entre os períodos de 7, 15 e 30 dias (FIGURA 15; TABELA 4).

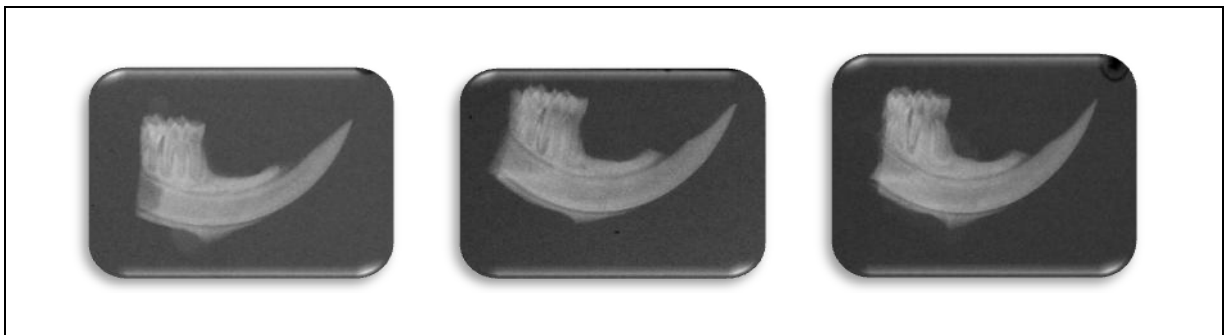
FIGURA 15 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo C. Períodos de 7, 15 e 30 dias, respectivamente



Nota: Da Autora

Nos animais do grupo T, ocorreu perda óssea significativamente maior ($p < 0,05$) no tratamento RAR ($0,98\pm 0,21\text{mm}$; $0,78\pm 0,22\text{mm}$; $0,52\pm 0,13\text{mm}$) quando comparados os períodos de 7 e 30 dias (FIGURA 16; Tabela4).

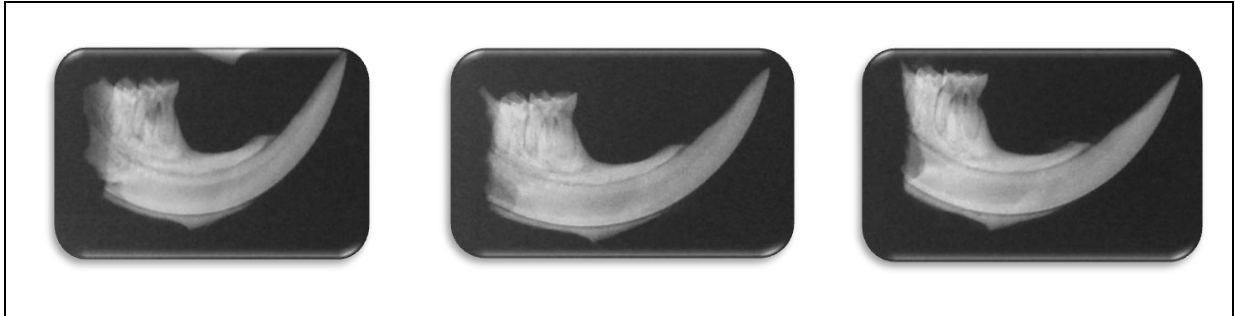
FIGURA 16 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo T. Períodos de 7, 15 e 30 dias, respectivamente



Nota: Da Autora

Os animais do grupo T1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 7, 15 e 30 dias ($1,06\pm 0,04\text{mm}$; $1,02\pm 0,02\text{mm}$; $0,89\pm 0,05\text{mm}$), (FIGURA 17; TABELA 4).

FIGURA 17 - Imagens radiográficas das hemimandíbulas dos animais do grupo T1. Períodos de 7, 15 e 30 dias, respectivamente



Nota: Da Autora

Na análise do grupo T com os demais grupos houve diferença em relação ao grupo C ($1,29\pm 0,26$; $1,18\pm 0,21$) apenas aos 15 e 30 dias e no grupo T1 ($0,89\pm 0,05$) aos 30 dias.

Não houve diferença no nível de perda óssea significativa entre os grupos C e T1.

TABELA 4- Médias e desvios padrões ($M \pm DP$) das distâncias entre a união cimento-esmalte e a crista óssea alveolar (mm) na superfície mesial dos primeiros molares inferiores esquerdos, de acordo com cada grupo, tratamento e período

Grupo		C		
Basal	0,3 / 0,5mm			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamentos				
RAR	$1,20\pm 0,16$	$1,29\pm 0,26^{\#}$	$1,18\pm 0,21^{\#}$	
Grupo		T		
Basal	0,3 / 0,5mm			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamentos				
RAR	$0,98\pm 0,21^{+}$	$0,78\pm 0,22$	$0,52\pm 0,13^{+}$	
Grupo		T1		
Basal	0,3 / 0,5 mm			
Períodos	7 dias	15 dias	30 dias	
Tratamentos				
RAR	$1,06\pm 0,04$	$1,02\pm 0,02$	$0,89\pm 0,05^{\#}$	
N	18	18	18	

⁺Diferença entre os períodos, mesmos grupos e tratamentos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$).

[#]Diferença do grupo T com os demais grupos, mesmos períodos (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$)

*Diferença entre os grupos C e T1 (ANOVA e Tukey, com $p<0,05$)

6 DISCUSSÃO

A doença periodontal é um processo inflamatório crônico, caracterizado por sangramento gengival, formação de bolsas periodontais e destruição dos tecidos periodontais de sustentação, através da ação de lipopolissacarídeos e proteases (YAGAN et al., 2013) das bactérias presentes no biofilme dental, fator etiológico determinante desta alteração. Esta inflamação tecidual é relacionada ao aumento da liberação de oxidantes pelos neutrófilos, e também com a ativação de vários mediadores inflamatórios, tais como interleucinas (IL-1 β , 6 e 8) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (KARA et al., 2012), o que favorece o desequilíbrio da homeostase óssea, resultando na destruição de tecido ósseo alveolar, no aumento da atividade de metaloproteinases de matriz e na degradação dos tecidos conectivos (CHAPPLE e MATTHEWS, 2007), devido à reação imunológica exacerbada e osteoclastogênese localizada (KUHR et al., 2004).

O tratamento periodontal é direcionado para deter a progressão da destruição dos tecidos de sustentação dos dentes, a fim de evitar perda dentária. Entretanto, a terapia periodontal mecânica pode ser demorada ou ineficaz, o que aponta para a hipótese de que fatores sistêmicos possam interferir na progressão da doença. Assim, uma possível suplementação com antioxidantes, pode ser uma terapia periodontal adjuvante eficiente.

Neste contexto, a escolha do Tempol como coadjuvante ao tratamento periodontal mecânico se deve ao fato de que este antioxidante tem ação direta sobre os radicais livres formados durante o processo inflamatório, diminuindo os danos tissulares.

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não possuem correspondentes em outras espécies, a doença periodontal inflamatória é comum no reino animal. Diferentes modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou até mesmo as modalidades terapêuticas possíveis com relação à doença periodontal inflamatória. O rato (*Rattus norvegicus*) é o animal mais utilizado nesses estudos (LISTGARTEN, 1975), devido a semelhança do seu periodonto com o do homem, tendo como divergência apenas a presença da queratinização do epitélio sulcular (KLAUSEN, 1991).

O presente estudo apoiou-se no modelo de indução da doença periodontal proposto por Johnson (1975), através da colocação de um fio de algodão, ao redor da cervical dos molares, geralmente no primeiro molar superior ou inferior. Segundo este modelo, a ligadura funciona como sítio para a colonização bacteriana desenvolvendo dessa forma, a doença periodontal, sendo este um método amplamente utilizado (ROVIN et al., 1966; SALLAY et al., 1982; NEEDLEMAN et al., 2004; ALMEIDA et al., 2007; DANNAN E ALKATTAN,

2008; AKMAN et al., 2013; YAGAN et al., 2013). Observou-se neste estudo que este modelo foi eficiente na indução da doença periodontal experimental, pois a ligadura induziu a formação de placa bacteriana e resposta inflamatória local. DP foi caracterizada pelos sinais clínicos de inflamação gengival como o edema, a vermelhidão e a perda da aderência do tecido gengival ao dente.

Na perda óssea alveolar induzida pela ligadura ocorre ativação anormal do sistema imunológico do hospedeiro (TAKAYANAGI, 2005); como resultado entre o desequilíbrio de oxidantes e antioxidantes, em favor de oxidantes; excesso de oxidantes ou ainda; diminuição de antioxidantes, que ocasionarão o estresse oxidativo (KARA et al., 2012). Este pode ser avaliado de várias formas: pela mensuração dos níveis de ERO/ERN; danos em ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e pela detecção dos níveis de antioxidantes (YAGAN et al., 2013; NIKI, 2012).

A associação do estresse oxidativo sistêmico e DP em humanos e animais experimentais foi explorada em uma revisão de literatura por Tomofuji et al., (2009), que cita relatos ligando diretamente a produção de oxidantes nos sítios com lesões inflamatórias periodontais e injúrias em vários órgãos vitais.

Em animais, a associação entre produção de ERO/ERN em sítios de periodontite induzida está bem estabelecida. Com o uso de um modelo experimental induzido por aplicação tópica de lipopolisacarídeo e de proteases específicas na gengiva, Tomofuji et al. (2007) mostraram clara correlação entre a gravidade da doença periodontal e as lesões oxidativas nos tecidos hepáticos e na aorta descendente.

GSH é um tripeptídeo, formado por L-ácido glutâmico, L-cisteína e L-glicina (γ Glut-Cys-Gli) e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular. A manutenção de níveis adequados de GSH é feita às custas da atividade da glutathiona redutase, a qual utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter glutathiona na forma reduzida, como substrato para glutathiona peroxidase. GSH é um antioxidante e participa de muitos processos biológicos, como na proteção contra radicais livres e compostos tóxicos (SIES, 1999).

Diante disso, no modelo experimental proposto, avaliou-se o efeito de administração de Tempol na concentração de GSH em tecidos gengivais, comparando-se a indução de DP em relação ao controle basal. Nesta análise verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os períodos experimentais, principalmente aos 7 e 15 dias (Tabela 1) do teor tissular de GSH. Estes resultados são indicativos de presença de danos oxidativos no tecido gengival avaliado no modelo experimental, dados que concordam com aqueles previamente relatados na literatura (BATTINO et al., 1999; KARA et al., 2012). Além do

mais, é importante salientar o destino metabólico desta GSH diante da exposição de ERO/ERN, que poderá ter sido oxidada formando GSSG, ou ter ocorrido S-glutinação proteica, ou seja, ligação da GSH em estruturas proteicas.

Os aldeídos são produzidos quando lipídeos são metabolizados no sistema biológico, através de reações de óxido-redução. A determinação e quantificação destes compostos fornece a relação indireta com injúrias oxidativas como resultado da peroxidação lipídica.

Um método bastante utilizado para determinar a ocorrência de danos oxidativos mediados por ERO/ERN nos tecidos é a mensuração de um dos principais produtos finais da peroxidação de lipídeos, MDA (YAGAN et al., 2013). Diversos estudos anteriores, demonstraram uma associação entre a periodontite e o aumento da peroxidação de lipídeos no fluido gengival crevicular, saliva e amostras de tecido gengival (WEI et al., 2010; TOMOFUJI et al., 2009; AKALIN et al., 2007; KARA et al., 2012). Neste estudo, foi encontrado valores de MDA que tendem a estar aumentados em relação ao basal, mas houve diferença significativa ($p < 0.05$) apenas nos grupos Controle com DP aos 7 e 15 dias e no grupo tratado com Tempol, independentemente da instalação de DP. Estes resultados divergem de muitos estudos (YAGAN et al., 2013; KARA et al., 2012; CARVALHO et al., 2013) que relatam que a peroxidação lipídica, é um evento muito frequente de estresse oxidativo na periodontite induzida e, o aumento desta tem um papel importante na progressão da destruição periodontal (KARA et al., 2012).

Estas diferenças podem ser atribuídas ao fato de que, na maioria dos relatos encontrados na literatura, MDA é doseado após reação com TBA através de técnicas espectrofotométricas ou espectrofluorimétricas, sem prévia separação cromatográfica. Como é amplamente relatado na literatura (HALIWELL; GUTTERIDGE, 2007), a ausência de separação cromatográfica de MDA produz resultados que, muitas vezes, não são precisos, em decorrência da produção de aldeídos durante a manipulação das amostras, da presença de cromógenos não específicos que absorvem luz ou emitem fluorescência nas condições de análise, ou ainda, de analitos outros, além de MDA, que reagem com o agente derivatizante TBA.

A análise de proteínas carboniladas é outra forma de avaliar danos oxidativos nos tecidos com alterações mediadas por processos inflamatórios. No presente trabalho, constatou-se um aumento significativo de ocorrência de CPO ($p < 0,05$) nos grupos em que a DP foi induzida. A escolha deste método como marcador biológico de estresse oxidativo justifica-se pela composição do tecido gengival ser 80% de colágeno, uma proteína estrutural que diante de ERO/ERN sofre oxidação (LINDHE et al., 2010).

Nos grupos que os animais receberam tratamento com Tempol como adjuvante ao tratamento convencional de RAR, tanto antes quanto após a indução de DP, não foi detectada proteção contra oxidação proteica (Tabela 3).

Em humanos, alguns trabalhos estabeleceram que a periodontite crônica está diretamente correlacionada à alta ocorrência de danos oxidativos em proteínas, determinados pela medida de CPO sérica, bem como o aumento do estado oxidativo total e de produtos de lipoperoxidação, quantificados como MDA (PANJAMURTHY et al., 2005; AKALIN et al., 2007; BALTACIOGLU et al., 2008). Por outro lado, existem estudos que indicam que não há relação entre o nível de peroxidação lipídica sérica e danos em DNA de sangue venoso de sujeitos com doença periodontal, quando comparadas estas variáveis com os dados de indivíduos com gengiva clinicamente saudável (KONOPKA et al., 2007). Estas diferenças podem ser atribuídas, ao menos em parte, às diferenças de conteúdo de compostos antioxidantes na alimentação e/ou possíveis suplementações nutricionais dos sujeitos selecionados para os citados estudos, o que vem confirmar a necessidade de estudos mais controlados para esclarecer os dados conflitantes encontrados na literatura.

Com uso de modelo experimental similar ao usado neste trabalho, Demirer et al. (2012), mostraram que a administração oral de ácido bórico (3mg/kg peso, 11 dias) foi capaz de prevenir infiltrado celular inflamatório, o número de osteoclastos e perda de massa óssea alveolar nos sítios onde houve indução de periodontite.

Produtos fitoterápicos, como extratos fluidos de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham. Verbenaceae) e de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*, Engl.), incorporados em formulações farmacêuticas na forma de gel, foram testados no tratamento de periodontite induzida por ligadura. Os resultados mostraram que as formulações mostraram efeito microbicida e anti-inflamatório, diminuindo a infiltração neutrofílica local, inibição da produção de TNF-alfa e IL-1 no tecido gengival e prevenção da perda de osso alveolar (BOTELHO et al., 2007).

Por outro lado, relato recente mostrou que o tratamento com vitamina E, um antioxidante lipossolúvel, na dose de 500mg/kg de peso, por via oral, durante nove dias, mostrou um significativo decréscimo no processo inflamatório, diminuição de formação de MDA e de imunoreatividade à enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS), sem, entretanto, alterar a perda de massa óssea alveolar nos sítios de indução de periodontite por ligadura. De forma interessante, este trabalho relata que o tratamento com vitamina E induziu aumento na ansiedade nos animais, efeito atribuído à modulação de expressão gênica exercida por este composto, explicitando a necessidade de estudos mais aprofundados do uso de

antioxidantes, uma vez que estes compostos podem elicitar respostas deletérias se usados indiscriminadamente (CARVALHO et al., 2013).

Na análise radiográfica, constatou-se que os níveis de perda óssea aos 30 dias no grupo tempol, tratado com RAR, foi significativamente ($p < 0,05$) menor do que aos 7 dias sugerindo que o tempol como tratamento adjuvante favorece a atividade osteoblástica. Clinicamente, é provado que a RAR com instrumentos manuais fornece os melhores resultados para o tratamento da doença periodontal (LINDHE et al., 2010). No entanto, diversos fatores podem limitar o sucesso da RAR, tais como, concavidades radiculares, apinhamento dentário, áreas profundas e zonas de bifurcação que dificultam o acesso dos instrumentos manuais na bolsa periodontal. Devidos a estes fatores anatômicos limitantes, terapias coadjuvantes ao tratamento convencional têm sido propostas (ALMEIDA et al., 2008).

Na análise intergrupos, o grupo controle apresentou uma perda óssea significativamente maior ($p < 0,05$) do que o grupo tempol aos 15 e 30 dias sugerindo que este método adjuvante protegeu a perda óssea na superfície mesial dos primeiros molares inferiores.

O estudo de Di Paola, 2005 demonstrou que o Tempol foi capaz de atenuar a reabsorção óssea decorrente de periodontite induzida. Neste trabalho utilizou-se a administração intraperitoneal de nitróxido pré-tratamento e, embora a minimização dos parâmetros inflamatórios e a perda óssea preventiva tenham sido descritos, sem o uso de marcadores séricos, isso sugere que as terapias antioxidantes que interfiram com ERO/ERN, podem ser benéficas no tratamento da periodontite. Entretanto, deve ser levado em consideração o fato de que a via de administração do nitróxido não é comum para utilização clínica. Assim, neste trabalho nós propusemos testar o mesmo composto por via oral.

Em relato mais recente, Wolle et al., 2013, mostraram que, em ratos com diabetes tipo 2, a administração oral de Tempol em lesões periapicais induzidas por exposição pulpar, não foi eficiente para minimizar os danos às estruturas dos dentes e periodonto, apesar de que o tratamento reduziu os parâmetros oxidativos relacionados a diabetes. A diferença de resultados com estes que aqui mostramos pode ser decorrente do fato de que as lesões odontológicas estudadas são diferentes em etiologia e localização. Além disso, a instalação de diabetes pode ter exacerbado a gravidade destas lesões, levando à pouca atividade modulatória do antioxidante testado.

No presente estudo, o efeito da Tempol foi avaliado por meio de duas estratégias diferentes de tratamento oral com o nitróxido: preventiva e terapêutica, com foco em

marcadores de estresse oxidativo e marcadores séricos gengivais associadas à remodelação óssea .

Para investigar a hipótese de que o Tempol possa prevenir e / ou atenuar danos oxidativos gengivais e causar alterações na remodelação óssea, duas abordagens experimentais foram empregadas neste estudo : um tratamento preventivo , em que foram realizadas administrações orais diárias de 2 mmol / kg Tempol um dia antes da indução de periodontite e o tratamento terapêutico , em que as administrações orais diárias de 2 mmol / kg Tempol foram iniciadas a partir de sete dias após a indução de periodontite , coincidente com o tratamento de RAR. Ambas as estratégias se mantiveram até o final de cada período experimental (7, 15 e 30 dias) , tal concepção experimental encontra-se resumida na figura 1 .

A dose de Tempol utilizada neste trabalho foi baseada em estudos anteriores (QUEIROZ et al., 2012) .

Em uma análise global, os resultados aqui mostrados apontam para a possibilidade do uso de nitróxidos como moduladores do processo inflamatório associado à doença periodontal. Esta patologia é considerada uma enfermidade inflamatório-imunológica de natureza multifatorial, e os dados aqui apresentados reforçam o conceito de que danos teciduais resultam de uma complexa interação entre micro-organismos e respostas do hospedeiro.

A Odontologia atualmente almeja que, além de dentes saudáveis, a população tenha melhor qualidade de vida. Assim, estudos que visam controlar com maior eficiência a doença periodontal são essenciais para manter a saúde oral e sistêmica dos indivíduos. O uso adequado de compostos adjuvantes que acelerem e incrementem a eficiência dos tratamentos clínicos já estabelecidos, é, conseqüentemente, fundamental na manutenção da saúde periodontal.

7 CONCLUSÃO

Nesse estudo observou-se que a doença periodontal induzida em ratos provocou um estresse oxidativo, caracterizado pela diminuição dos níveis de glutathione reduzida e, uma tendência ao aumento dos valores de malondialdeído e proteínas carboniladas.

O Tempol foi efetivo como tratamento coadjuvante à raspagem e alisamento radicular, favorecendo a redução dos níveis de proteínas carboniladas, além de evitar o decréscimo de glutathione reduzida nos tecidos gengivais.

Os resultados radiográficos reforçaram os dados bioquímicos e evidenciaram que os animais do grupo que receberam Tempol antes da indução da doença periodontal apresentaram uma redução significativa da perda óssea.

Em conjunto, os dados sugerem que o Tempol pode ser utilizado como um fármaco como tratamento preventivo e/ou associado à terapia mecânica não cirúrgica na doença periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIAENS, P. A. et al. Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. **J Periodontol**, v. 59, n. 8, p. 493-503, 1988.
- ADUSE-OPOKU, J. et al. Characterisation, genetic analysis, and expression of a protease antigen (PrpPI) of *Porphyromonas gingivalis* W50. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4744-4754, 1995.
- AKALIN, F. A. et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v. 34, p. 558-565, 2007.
- AKMAN, S. et al. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. **J Periodontol**, v. 84, n. 5, p. 666-674, 2013.
- ALMEIDA, J. M. et al. Radiographic evaluation of the alveolar bone tissue after induction of periodontal disease in rats. **R Periodontia**, v. 17, n. 4, p. 24-30, 2007.
- ALMEIDA, J. M. et al. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. **J Periodontol**, v. 79, n. 11, p. 2156-2165, 2008.
- ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2004.
- ARONOVITCH, Y. et al. Dual activity of nitroxidos as pro- and antioxidants: Catalysis of copper-mediated DNA breakage and H₂O₂ dismutation. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 42, p. 1317-1325, 2007.
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004.
- BALTACIOGLU, E. et al. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Arch Oral Biol.**, v. 53, n. 8, p. 716-722, 2008.
- BATTINO, M. et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 10, n. 4, p. 458-476, 1999.
- BERGENDI, L. et al. **Chemistry, physiology and pathology of free radicals**. Life Sciences, Elmsford, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.
- BEZERRA, M.M. et al. Selective Cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.

BOTELHO, M. A. et al. Lippia sidoides and Myradruon urundeuva gel prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Ethnopharmacol.*, v. 113, n. 3, p. 471-478, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteins-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASILEIRO FILHO, G. *Bogliolo Patologia Geral*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BREIVIK, T. et al. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibit ligature-induced periodontitis in adult rats. *J Periodontal Res.* v. 41, n. 1, p. 23-32, 2006.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, v. 58, p. 79-110.1989.

CANACKI, C.F., CICEK, Y., CANACKI, V. Reactive oxygen species and human inflammatory periodontal diseases. *Biochemistry (Mosc)*, v. 70, p. 619-628, 2006.

CARVALHO, R. S. et al. Vitamin E does not prevent bone loss and induced anxiety in rats with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol.*, v. 58, n. 1, p. 50-58, 2013.

CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J. B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000.*, v. 43, p. 160-232, 2007.

CUTLER, C. N.; ARNOLD, R. R.; SCHENKEIN, H. A. Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol.*, v. 151, n. 12; p. 7016-7029, 1993.

DANNAN, A.; ALKATTAN, F. Animal Models in Periodontal Research: A Mini-Review of the Literature. *The Internet Journal of Veterinary Medicine*. v. 5, n. 1, 2008. DOI: 10.5580/c8.

DEMIRER, S. et al. Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats. *Arch Oral Biol.*, v. 57, n. 1, p. 60-65, 2012.

DI PAOLA, R. et al. Effects of Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model periodontitis, *J Clin Periodontol*; v. 32, p. 1062–1068, 2005.

FEDELI, D. et al. Nitroxide radicals protect against DNA damage in rat epithelial cells induced by nitric oxide, nitroxyl anion and peroxynitrite. *Mutation Research*, v. 535, p. 117-125, 2003.

FIEHN, N. E.; KLAUSEN, B.; EVANS, R. T. Periodontal bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected specific pathogen-free rats after preinoculation with endogenous *Streptococcus sanguis*. *J Periodontal Res*, v. 27, n. 6, p. 609-614, 1992.

FRENKEL, J. K. Pathology society symposium on choice of animal models for the study of disease processes in man. Introduction. *Fed Proc.* v. 28, p. 160-215, 1969.

GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrobial Agents Chemother.** v. 48, n. 6, p. 2173-2178, 2004.

GALVÃO, M. P. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras.**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003.

GILLESPIE, M. J. et al. Isolation and partial characterization of the *Campylobacter rectus* cytotoxin. **Microb Pathog.**, v. 14, n. 3, p. 203-215, 1993.

GLEBSKA, J. et al. Pro oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 35, p. 310-316, 2003.

GOES, P. et al. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. **Braz Dent J**, v. 21, n. 3, p. 193-198, 2010.

GOLDSTEIN, S. et al. Kinetics of the Reaction between Nitroxide and Thiyl Radicals: Nitroxides as Antioxidants in the Presence of Thiols. **J. Phys. Chem. A**, v. 112, p. 8600-8605, 2008.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDG, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press., 2007.

HANH, S. M.; MITCHELL, J. B.; SHACTER, E. Tempol inhibits neutrophil and hydrogen peroxide-mediated DNA damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 38, p. 879-884, 1997.

HAUSMANN, E. Radiographic and digital imaging in periodontal practice. **J Periodontol**, v. 71, n. 3, p. 497-503, 2000.

HEIJLL, L.; RIFKIN, B. R.; ZANDER, H. A. Conversion of chronic gingivitis to periodontitis in squirrel monkeys. **J Periodontol.**, v. 47, n. 12, p. 710-716, 1976.

HOFFMAN, A. et al. Effect of nitric oxide and nitroxide SOD-mimic on the recovery of isolated rat heart following ischemia and reperfusion. **Biochem. Pharmacol.**, v. 66, p. 1279-1286, 2003.

ISRAELI, A., et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and the hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 38, p. 317-324, 2005.

JOHNSON, J. H. Effects of local irritation and dextran and sufnat administration on the periodontium of the rat. **J Periodontal Res.** v. 10, n. 6, p. 332-345, 1975.

KALDAHL, W. B.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. **J Periodontol.** v. 64, n. 4, p. 243-253, 1993.

KAMMA, J. J.; SLOTS, J. Herpes virus bacterial interaction in aggressive periodontitis. **J Clin Periodontol.** v. 30, n. 5, p. 420-426, 2003.

KARA, A. et al. Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. **Free Radic Biol Med.**, v. 55, p. 21-26, 2012.

KARIM, S. et al. Superoxide dismutase enzyme and thiol antioxidants in gingival crevicular fluid and saliva. **Dent Res J (Isfahan)**, v. 9, n. 3, p. 266-272, 2012.

KATSURAGI, H.; OHTAKE, M.; KURASAWA, I.; SAITO, K. Intracellular production and extracellular release of oxygen radicals by PMNs and oxidative stress on PMNs during phagocytosis of periodontopathic bacteria. **Odontology.**; v. 91, p. 13-18, 2003.

KIM, S. C. et al. Antioxidant profile of whole saliva after scaling and root planing in periodontal disease. **J Periodontal Implant Sci.** v. 40, n. 4, p. 164-171, 2010.

KLAUSEN B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol.** , v. 62, n. 1, p. 59-73, 1991.

KLEINFELDER, J. W.; MULLER, R. F.; LANGE, D. E. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. **J Clin Periodontol.** v. 26, n. 6, p. 347-351, 1999.

KOMAROV, A.M.; JOSEPH, J.; LAI, C.S. In vivo pharmacokinetics of nitroxides in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 02, p. 1035-1042, 1994

KÖMERIK, N. In vitro killing of Porphyromonas gingivalis by Toluidine blue mediated photosensitization in an animal model. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 3, p. 932-940, 2003.

KONOPKA, T. et al. Total antioxidant status and 8-hydroxy-20-deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. *Arch Immunol Ther Exp (Watsz).*, v. 55, n. 6, p. 1-7, 2007.

KRISHNA, M. C. et al. Modulation of streptonigrin cytotoxicity by nitroxide sod mimics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 379-388, 1994.

KROLL, C., LANGNER, A., BORCHERT, H. H. Nitroxide metabolism in the human keratinocyte cell line HaCaT. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, p. 850-857, 1999.

KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**, v. 39, n. 2, p. 101-106, 2004.

LAIGNIER, E. P. et al. Thiyl Radicals Trapp Correlates with Macrophage Respiratory Burst Inhibition. In: V MEETING OF SOCIETY FOR FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE – SOUTH AMERICAN GROUP AND V INTERNATIONAL CONFERENCE ON PEROXYNITRITE AND REACTIVE NITROGEN SPECIES, 2007, Montevideo. **Anais**. Montevideo: V Meeting of Society for Free Radical Biology and Medicine – South American Group and V International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species – Book of Abstracts: Imprenta Gega s.r.l., v. único, p. 19-19, 2008.

LIMA, A. T. et al. Effect of nitroxides on the fungicidal oxidant mechanism of neutrophils. In: 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2011, Ribeirão Preto. **Annals of the 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences**, 2011. v. único.

LINARES, E. ; GIORGIO, S. ; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 44, p. 1668-1676, 2008.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5 ed. Guanabara Koogan, 2010, cap. 11, p. 271-291.

LINDHE, J.; NYMAN, S. Clinical trials in periodontal therapy. **J Periodontal Res**, v. 22, n. 3, p. 217-221, 1987.

LISTGARTEN, M. A. Similarity of epithelial relationship in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**. v. 46, n. 11, p. 677-680, 1975.

MACHTEI, E. E. et al. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **J Clin Periodontol.**, v. 26, n. 6, p. 374-380, 1999.

MARUYAMA T. et al. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 1, p. 48-53, 2011.

MATIA, J. I. et al. Efficiency of scaling of the molar furcation area with and without surgical access. **Int J Periodontics Restorative Dent**. v. 38, n. 6, p. 24-35, 1986.

NAKAJIMA, T. et al. Periodontitis associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. **J Periodontol Res**, v. 45, n. 1, p. 116-122, 2010.

NEEDLEMAN, I. et al. Impact of oral health on the life quality of periodontal patients. **J Clin Periodontol**, v. 31, n. 6, p. 454-457, 2004.

NIKI, E. Do antioxidants impair signaling by reactive oxygen species and lipid oxidation products? **FEBS Lett.**, v. 586, p. 3767-3770, 2012

NISHIMURA, T. S., SWARTZ, H. M. Reduction of lipid-soluble nitroxides in CHO cells and macrophage tumor cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 17, p. 473-479, 1994.

PAGE, R.C.; SCHROEDER, H.E. Periodontitis in man and other animals. A comparative review. **Basel: Karger**, p. 71-106, 1982

PANJAMURTHY, K.; MANOHARAN, S.; RAMACHANDRAN, C. R. Lipid peroxidation and antioxidant status in patients with periodontitis. **Cell Mol Biol Lett.**, v. 10, n. 2, p. 255-264, 2005.

PETERSEN, P. E., OGAWA, H. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. **J Periodontol**, v. 76, n. 12, p. 2187-2193, 2005.

PIZZO, G. et al. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, p. 496-502, 2010

PUNCHARD, N. A.; KELLY, F. J. **Free Radicals: A practical Approach**. New York: Oxford Press. 1996.

QUEIROZ, R. F. et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 53, p. 1942-1953, 2012.

QUEIROZ, R. F. ; VAZ, S. M. ; AUGUSTO, O . Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: revisiting the kinetics and mechanisms. **Biochemical Journal**, v. 439, p. 423-431, 2011.

RAIKOV, Z. D., RAIKOVA, E. T., ATANASOV, A.T. Nitric oxide and free stable nitroxyl radicals in the mechanism of biological action of the spin-labeled compounds. **Medical Hypotheses**, v. 57, p. 302-305, 2001.

RAMS, T. E.; SLOTS, J. Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. **Periodontol 2000**, v. 10, n. 1, p. 139 - 159, 1996.

RESENDE, D.B. et al. Involvement of antioxidant defense of fungi in biofilm formation. In: 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2013, Ribeirão Preto. Annals of the 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences, 2013. v. único.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Journal of Biosciences**, v. 21, p. 133-149, 2005.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germe free and conventional rats. **J Periodontal Research**, v. 1, n. 3, p. 193-203, 1966.

SALLAY, K. et al. Bacterial invasion of oral tissues of immunosuppressed rats. **Infect Immun.**, v. 43, n. 3, p. 1091-1093, 1984.

SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J Periodont Res**, v. 17, n. 3, p. 263-274, 1982.

SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. Effects of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. **J Periodontal Res.**, v. 25, n. 5, p. 308-315, 1990

SAMUNI, A. et al. Kinetics and Mechanism of Hydroxyl Radical and OH-Adduct Radical Reactions with Nitroxides and with Their Hydroxylamine's. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, p. 8719-8724, 2002.

SAMUNI, A. M.; BARENHOLZ, Y.; SAMUNI, A. Site-activity relationship of nitroxide radical's antioxidative effect. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p. 117-185, 2003.

SCHENKEIN, H. A. The pathogenesis of periodontal diseases. **J Periodontol.**, v. 70, n. 4, p. 457-470, 1999.

SCHROEDER, H. E.; LINDHE, J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. **Arch Oral Biol.**, v. 20, n. 12, p. 775-782, 1975.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, p. 916-921, 1999

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 42, p. 1632-1650, 2007.

TAKATA, T. et al. Penetration and uptake of colloidal goldlabeled concanavalin A in the junctional epithelium of the rat. **J Periodontol.** v. 59, n. 12, p.823-829, 1988.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J Periodont Res**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TIMONER, B.E. et al. Efeito do nitróxido Ac-Tempo sobre o burst respiratório e S-glutonação de proteínas de macrófagos. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE ESTRESSE OXIDATIVO, 1, 2008, Alfenas. **CD-ROM**.

TOMOFUJI, T. et al. Chronic administration of lipopolysaccharide and proteases induces periodontal inflammation and hepatic steatosis in rats. *J Periodontol.*, v. 78, n. 10, p. 1999-2006, 2007.

TOMOFUJI, T. et al. Periodontitis and increase in circulating oxidative stress. *Japanese Dental Science Review.*, v. 45, n. 1, p. 46-51, 2009.

TOMOFUJI, T. et al. Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontol.*, v. 80, p. 1799-17808, 2009.

TONGUC, M. O. et al. The impact of smoking status on antioxidant enzyme activity and malondialdehyde levels in chronic periodontitis. *J Periodontol.*, v. 82, n. 9, p. 1320-1328, 2011.

USACHEVA, M.; TEICHER, T. M. C.; BIEL, M. A. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* v. 29, n. 2, p. 165 - 173, 2001.

WANG, G. et al. Opposing effects of nitroxide free radicals in Escherichia coli mutants deficient in DNA repair. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1305, p. 71-78, 1996.

WEI, D. et al. 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. *Aust Dent J.*, v. 55, p. 70-78, 2010.

WOLLE, C. F. B. et al. Outcome of Periapical Lesions in a Rat Model of Type 2 Diabetes: Refractoriness to Systemic Antioxidant Therapy. *J Endodontics* v. 3, p., 2013

YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of Low-Dose Doxycycline on Serum Oxidative Status, Gingival Antioxidant Levels and Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J Periodontol.* 2013 Jun 20. doi:10.1902.




YAN, S. et al. Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*, v. 37, p. 137-143, 2005.

ZAMIR, E. et al. Nitroxide stable radical suppresses autoimmune uveitis in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 27, p. 7-15, 1999.

ZHANG, R.; GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A. Kinetics of superoxide-induced exchange among nitroxide antioxidants and their oxidized and reduced forms. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 1245-1252, 1999.

ANEXOS**Anexo A**

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 - Alfenas/MG - CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000 - Fax: (35) 3299-1063</p>	
<p>Alfenas, 23 de agosto de 2013.</p>		
<p>DECLARAÇÃO</p>		
<p>Prof. Maísa Ribeiro Pereira Lima Brigagão</p>		
<p>Prezada Professora;</p>		
<p>Declaro que a Comissão de Ética no Uso de Animais foi comunicada e está ciente, que o projeto "Efeito do nitróxido tempol sobre o estresse oxidativo associado à periodontite experimental", relativo ao registro 472/2012, foi executado sob a orientação da Professora Maísa Ribeiro Pereira Brigagão.</p>		
<p>Por ser verdade, firmo o presente.</p>		
		
<p>Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento Presidente do CEUA - Unifal-MG</p>		