

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – PERIODONTIA**

**EFEITO DA VITAMINA C SOBRE A PERIODONTITE EXPERIMENTAL E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR**

VAGNER JONATAN SOSTER

Orientador: Prof. Dr. JULIANO CAVAGNI

Porto Alegre
2017

VAGNER JONATAN SOSTER

**EFEITO DA VITAMINA C SOBRE A PERIODONTITE EXPERIMENTAL E
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Clínica Odontológica/Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Cavagni

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Soster, Vagner Jonatan
EFEITO DA VITAMINA C SOBRE A PERIODONTITE
EXPERIMENTAL E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
RATOS WISTAR / Vagner Jonatan Soster. -- 2017.
41 f.
Orientador: Juliano Cavagni.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Doença Periodontal. 2. Estresse Oxidativo. 3.
Vitamina C. 4. Ratos Wistar. 5. Perda Óssea Alveolar.
I. Cavagni, Juliano, orient. II. Título.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A mesma foi financiada pela Fundação de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) e envolveu a participação de docentes e pesquisadores de ambas instituições. Trata-se de um estudo amplo realizado nas dependências da Faculdade de Odontologia, da Unidade de Experimentação Animal e da Unidade de Análises Moleculares e de proteína, ambas vinculadas ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Como objetivos acadêmicos está prevista a publicação de pelo menos um artigo em revista de circulação internacional Qualis A1. Esta dissertação foi redigida de acordo com as normas mais contemporâneas e subdivide-se em 3 grandes sessões: uma introdução ampla que objetiva nortear o leitor acerca da temática em questão, o artigo científico e, por fim, as considerações finais que incluem uma avaliação atual sobre a perspectiva que o presente trabalho contribui com a literatura da área.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer profundamente aos meus pais Rosmari Zanotto Soster e Valdecir José Soster, aos quais eu tenho total admiração pelo esforço e carinho que tiveram na minha criação. Os quais não mediram esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade desde os primeiros instantes da minha vida educacional. Com o término desse trabalho de mestrado, gostaria de agradecer profundamente por sempre terem acreditado em mim e por sempre terem me incentivado a correr atrás dos meus sonhos.

A minha namorada Kerol Heinz, a qual sempre se preocupou em tentar fazer com que o caminho traçado durante o mestrado fosse de certa forma mais ameno. Inclusive me ajudando no período experimental durante as mensurações que ocorreram aos finais de semana. Só tenho a agradecer por te ter em minha vida. Gostaria de agradecer a minha sogra, Márcia Heinz a qual me ajudou durante a marcação dos enppendorfs e esteve sempre me mandando forças mesmo que a distância.

Ao professor Francisco Wiker Mustafa Muniz o qual me ajudou durante o período experimental, e após durante a mensuração da perda óssea alveolar. Aos alunos de graduação e pós graduação, Milena Mendes, Gerson Langa e Sarah Martins. Os quais me ajudaram muito durante todo o período experimental e não mediram esforços para que essa pesquisa conclui-se o seu objetivo.

Gostaria de agradecer profundamente ao professor Cassiano Kuchenbecker Rösing, o qual me abriu as portas da periodontia no ano de 2012 através de uma bolsa de iniciação científica. Com isso tive contato com várias linhas de pesquisa durante toda a minha graduação, o que foi fundamental para que despertasse em mim a vontade de realizar o mestrado.

Ao meu orientador professor Juliano Cavagni, o qual tive contato desde a minha graduação, e quem já me ajudou diversas vezes nos salões de iniciação científica (SIC) tanto na correção da apresentações, como em dúvidas sobre os temas abordados, tive a oportunidade de por dois anos consecutivos ganhar o prêmio de destaque da sessão do SIC e com toda a certeza ele teve papel fundamental. Com o caminho traçado durante o mestrado a admiração ao pesquisador aumentou pois pude ter mais contato com o meu orientador e ver o quanto é um profissional dedicado ao meio científico, e como o mesmo é um pesquisador extremamente correto. Sempre se preocupou e muito para que a pesquisa traçada tivesse êxito, sem medir esforços e horas de trabalho no auxílio e suporte mesmo que a distância. Quero agradecer toda a paciência e dedicação durante o caminho traçado durante o mestrado, principalmente no ensinamento de

que as pequenas coisas fazem grandes diferenças no trabalho final, o meu muito obrigado.

RESUMO

Antecedentes: Estudos em animais têm observado a existência de uma relação entre a ingestão de vitamina C e melhores resultados do reparo periodontal. Entretanto, estudos avaliando os efeitos da vitamina C sobre a patogênese da doença periodontal são escassos.

Objetivos: Verificar o efeito da utilização de vitamina C sobre a periodontite experimental e parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar.

Metodologia: Sessenta e oito (68) ratos Wistar machos foram randomicamente divididos em 4 grupos: controle, periodontite (Perio), Vitamina C (VitC) e Vitamina C com doença periodontal (VitC+Perio). Doença periodontal foi induzida nos grupos PERIO e PERIO+VitC por meio de ligaduras posicionadas no segundo molar superior direito. O dente contralateral foi considerado controle intragrupo. Nos grupos que receberam VitC, o mesmo foi feito na concentração de 1g/L. Peso corporal, consumo de sólidos e líquidos foram avaliados, além da perda óssea alveolar em fotografias padronizadas e níveis plasmáticos de FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*) e Sulfidril por examinador treinado e calibrado. O nível de significância estabelecido foi de 95%

Resultados: Observou-se um significativo ganho de peso, consumo de líquidos e sólidos ao longo do tempo, sem diferenças significativas entre os grupos experimentais. Considerando o desfecho principal de perda óssea alveolar, os animais que receberam VitC e indução de doença periodontal exibiram menores graus de perda óssea alveolar quando comparados aos animais que receberam indução de periodontite, apenas. Não foram observadas diferenças significativas na perda óssea entre os grupos nos lados contralaterais. Considerando os marcadores de estresse oxidativo, concentrações plasmáticas mais elevadas de sulfidril nos grupos Perio e VitC+Perio, e nas análises de FRAP os grupos Perio e VitC+Perio apresentaram volumes plasmáticos menores em relação ao grupo Controle.

Conclusão: A exposição à vitamina C potencialmente reduz a perda óssea alveolar, modulando parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar.

Palavras-chave: doença periodontal; perda óssea alveolar; vitamina c; ácido ascórbico; antioxidantes; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Background: Animal studies have observed the existence of a relationship between vitamin C intake and better periodontal repair results. However, studies evaluating the effects of vitamin C on the pathogenesis of periodontal disease are scarce.

Aim: To verify the effect of vitamin C on experimental periodontitis and parameters of oxidative stress in Wistar rats.

Methods: Sixty eight (68) male Wistar rats were randomly divided into four groups: Control, periodontitis (Perio), Vitamin C (VitC) and Vitamin C plus periodontal disease (VitC+Perio). Periodontal disease was induced in the PERIO and PERIO+VitC groups by ligatures placed in the upper right second molar. The contralateral tooth was considered intragroup control. Rats were exposed to 1 g/L of VitC. Body weight, chow and fluid consumption were evaluated as well as alveolar bone loss in standardized photographs and plasma levels of FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) and Sulfidril by trained and calibrated examiner. The level of significance was 95%

Results: Significant weight gain, fluid and solid consumption were observed over time, with no significant differences between the experimental groups. Considering the main outcome of alveolar bone loss, animals receiving VitC and induction of periodontal disease exhibited lower degrees of alveolar bone loss when compared to animals exposed to ligature. There were no significant differences in bone loss between groups on the contralateral sides. Considering the markers of oxidative stress, higher sulphhydryl plasma concentrations in the Perio and VitC + Perio groups, and in the FRAP analyzes the Perio and VitC + Perio groups had lower plasma volumes in relation to the Control group.

Conclusion: Vitamin C potentially reduces alveolar bone loss by modulating oxidative stress parameters in Wistar Rats.

Keywords: periodontal disease; alveolar bone loss; vitamin c; ascorbic acid; antioxidants; oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma detalhado do estudo.....	19
Figura 2. O peso (em g) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak)....	25
Figura 3. Consumo de ração (em g) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak).....	26
Figura 4. Consumo de líquidos (em mL) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak).....	26
Tabela 1. Média (\pm DP) da POA (em mm) para os lados direito e esquerdo de acordo com os grupos experimentais.	27
Figura 5. Níveis plasmáticos médios de FRAP (\pm DP) ao final do período experimental de acordo com os grupos experimentais.	28
Figura 6. Níveis plasmáticos médios de Sulfidril (\pm DP) ao final do período experimental de acordo com os grupos experimentais.	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVO.....	16
3	ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
	REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são desordens infecto-inflamatórias que afetam os tecidos de proteção e sustentação dos dentes. Incluem uma vasta gama de doenças, sendo que as formas mais comuns e prevalentes são a gengivite e a periodontite. A gengivite, considerada a forma mais leve da doença periodontal, não afeta as estruturas de suporte dos dentes e não deixa sequelas, sendo extremamente prevalente na população mundial (LINDHE; HAMP; LÖE, 1973; HART, 1997). A periodontite, por sua vez, resulta na perda de tecido conjuntivo e de suporte ósseo, podendo acarretar perdas dentárias (GRAVES, 1999; PAGE; KORNMAN, 2000).

Embora a presença das bactérias seja necessária para o estabelecimento do processo inflamatório na doença periodontal, esta parece não ser suficiente para a quebra da homeostase tecidual, sendo a resposta imunológica e a suscetibilidade do hospedeiro importantes na modulação da condição periodontal. Com o processo inflamatório estabelecido no sulco gengival os periodontopatogenos do biofilme subgengival estimulam com que as células epiteliais e dendríticas comecem a liberar mediadores químicos, tendo como principais as citocinas pró-inflamatórias as quais recrutam neutrófilos no tecido conjuntivo como a primeira linha de defesa, denominada como defesa inata. Com o processo inflamatório estabelecido acaba se formando uma resposta imune mais organizada, chamada de defesa adaptativa a qual libera leucócitos polimorfonucleares entre os quais estão as células de defesa, macrófagos, eosinófilos e linfócitos. Dentre as principais funções destas células está a defesa frente a agressão causada pelas bactérias da bolsa periodontal e a fagocitose das mesmas (CHAPPLE; MATTHEWS, 2000).

No entanto, como reação do metabolismo dos leucócitos polimorfonucleares está a formação de radicais livres que ocorre na mitocôndria dessas células através da cadeia transportadora de elétrons a qual faz a formação de energia em forma de ATP. Os radicais livres também são produzidos de forma fisiológica natural e tem importante papel em várias reações químicas intra e extracelulares, desde mediadores químicos em inflamações, a fecundação de óvulos (GENESTRA, 2007). Contudo, quando se ocorre a liberação demasiada destes radicais livres, os mesmos podem sofrer oxidação através de metais como o ferro e o cobre formando espécies

reativas de oxigênio as quais causam estresse oxidativo, que pode gerar danos as células circundantes. O estresse oxidativo é ocasionado por um desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a oxidação gerada pelas espécies reativas de oxigênio, com a formação excessiva de radicais livres. Assim, é ativada a linha de defesa antioxidante enzimática que tem por função remover e converter em álcool e água o excesso de radicais livres e assim impedir que os mesmos sofram oxidação formando espécies reativas de oxigênio e assim causando o estresse oxidativo (KIYOSHIMA *et al.*, 2012). Dentre os antioxidantes enzimáticos encontram-se a catalase a superóxido-dismutase e a glutatona-peroxidase (BATTINO *et al.*, 1999; CHAPPLE; MATTHEWS, 2007; KAKLAMANOS; TSALIKIS, 2002). Dentro dos marcadores enzimáticos que podem ser encontrados no plasma está o sulfidril, o qual é um composto organosulfurado tiol com grande importância no sistema antioxidante enzimático, pois o mesmo oferece suas ligações (S-H) para a glutatona reduzida (GSH) (CHAPPLE; MATTHEWS, 2007). Ao reagir com praticamente todos os oxidantes fisiológicos, os tióis são antioxidantes-chave na manutenção da homeostase intra e extracelular. Eles indicam padrão redox, supondo-se que, frente a maior quantidade de (S-H), o meio está neutralizando ou reduzindo oxidantes e, frente a menor quantidade, o meio está oxidante (FAURE; LAFOND, 1995).

Em contrapartida, os agentes antioxidantes não-enzimáticos, são tidos como agentes secundários no combate ao estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio. Geralmente eles são obtidos de maneira exógena, por meio de uma dieta balanceada contendo uma série de frutas e vegetais importantes, tais como cenoura (PLATEL; SRINIVASAN, 2015), espinafre (BOHLOOLI *et al.*, 2015), tomate (CHANDRA *et al.*, 2012), abacate (KOPEC *et al.*, 2014), uva, morango (ZHAO *et al.*, 2015), goiaba e laranja (ALAGL; BHAT, 2015). Dessa forma, entre os agentes antioxidantes não-enzimáticos encontram-se vitaminas lipossolúveis – vitamina A, vitamina E e betacaroteno –, vitaminas hidrossolúveis – vitamina C e vitaminas do complexo B –, oligoelementos – zinco e magnésio – e biflavonóides (MUNIZ *et al.*, 2015).

No intuito de encontrar medidas terapêuticas capazes de amenizar os danos causados pela doença periodontal, um antioxidante não-enzimático que tem sido estudado é a vitamina C (KOSE *et al.* 2015; EBERHARDT *et al.* 2017). A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel associada à síntese do colágeno, onde promove a

formação da hidroxiprolina. A hidroxilação da prolina requer vitamina C, na ausência de ácido ascórbico resulta em uma deficiente hidroxilação de resíduos de prolina no colágeno. Como resultante desse processo, gera-se uma instabilidade química desta molécula a qual é considerada essencial para a correta constituição dos elementos dentários e dos tecidos conjuntivo, cartilaginoso e ósseo (BSOUL; TEREZHALMY, 2004). Além de possuir um poderoso efeito sobre as espécies reativas de oxigênio, esta vitamina também apresenta ações imunomodulatórias e anticarcinogênicas (FREI; STOCKER; AMES, 1998; VILLACORTA; AZZI; ZINGG, 2007).

São conhecidas várias formas de como a vitamina C pode ser obtida. Dentre elas estão legumes, vegetais, como pimentão, brócolis, couve-flor, repolho e folhas verdes, e frutas. Embora a laranja seja considerada uma fonte rica em vitamina C, outras frutas apresentam maiores concentrações desta vitamina, tais como goiaba, kiwi, melancia, mamão e frutas vermelhas (ALAGL; BHAT, 2015). Enquanto uma quantidade reduzida da vitamina no organismo parece estar associada com uma pobre função imunológica (SCHWAGER; SCHULZE, 1998), altas concentrações podem permitir a ocorrência de resistência antiviral, de melhora nas funções de fagocitose e de diminuição na quantidade de peróxidos lipídicos (CAMPBELL *et al.*, 1999; DE LA FUENTE *et al.*, 1998; FIELD; JOHNSON; SCHLEY, 2002; GEESIN *et al.*, 1998). Sendo assim, através de uma dieta balanceada e diversificada, é possível obter níveis plasmáticos de vitamina C compatíveis com saúde (MUNIZ *et al.*, 2015).

A grande maioria dos estudos publicados até o presente momento abordando o efeito da vitamina C sobre a patogênese da doença periodontal é realizada em seres humanos e, em sua maioria, de natureza epidemiológica com delineamento transversal, com resultados por vezes contraditórios (KUZMANOVA *et al.* 2012; EBERHARDT *et al.* 2017).

Estudos publicados em modelo animal têm sugerido uma possível associação entre ingestão de vitamina C e menores graus de perda óssea alveolar em modelos com doença periodontal. Em estudo realizado por (AKMAN *et al.* 2013), uma amostra de 36 ratos Wistar, adultos, machos foi utilizada. Foram avaliados os efeitos da combinação de ácido alfa-lipóico e de ácido alfa-lipóico juntamente a vitamina C associados a periodontite experimental. Ao analisar os resultados do grupo com periodontite experimental e aos grupos com periodontite e associação de ácido alfa-lipóico isolado ou associado a vitamina C, obteve-se uma diminuição nos níveis de

fosfatase alcalina plasmática e de mieloperoxidase no tecido gengival. Também se observou uma diminuição de células ativadoras do fator nuclear kappa B, ouve uma menor perda óssea alveolar nos animais que receberam ácido alfa-lipóico e vitamina C em relação aos animais que não receberam antioxidantes. Sugere-se, a partir destes resultados, que estes antioxidantes não-enzimáticos tiveram capacidade de modular a patogênese da doença periodontal.

No trabalho realizado por (EKUNI *et al* 2009) foi utilizada uma amostra de 18 ratos Wistar, machos, adultos. Os animais receberam vitamina C, 1g/L de água por 2 semanas e indução de doença periodontal por ligadura por 4 semanas. Ao final do período experimental os resultados obtidos pelos pesquisadores demonstraram que a ingestão de vitamina C aumentou significativamente o índice desta no plasma e a relação glutathiona reduzida e oxidada, e diminuíram dos níveis séricos de nitrotirosina, 8-hidroxideoxiguanosina. Sugere-se, assim, que a vitamina C diminui os índices plasmáticos e teciduais de oxidação.

Em trabalho realizado por (KOSE *et al* 2015), uma amostra de 36 ratos Wistar, machos, adultos foi utilizada. Para indução de doença periodontal ligaduras nos primeiros molares mandibulares, por 5 semanas, foram instaladas. Após a remoção das ligaduras, os grupos começaram a receber ácido alfa-lipóico e Vitamina C com dosagem média de 50mg/kg durante 15 dias. Foram observados os resultados bioquímicos de estresse oxidativo e a perda óssea alveolar. Enquanto as análises bioquímicas mostraram níveis semelhantes de glutathiona reduzida e de malondialdeído na presença ou ausência de ácido ascórbico, as análises histológicas encontraram uma destruição periodontal similar em ambos os grupos, com ou sem o uso de antioxidantes não-enzimáticos. Este estudo revelou que ácido alfa-lipóico regulou os danos oxidativos e os parâmetros antioxidantes nos tecidos com periodontite. No entanto, a vitamina C não forneceu nenhum efeito terapêutico de apoio adicional ao ácido alfa-lipóico.

Tendo em vista o exposto, verifica-se que estudos publicados até o presente momento considerando a relação entre a suplementação com vitamina C como modulador antioxidante não-enzimático em modelos de periodontite experimental são escassos. Portanto, estudos adicionais são necessários. Além disso, destaca-se que a já escassa literatura sobre o tema apresenta resultados conflitantes. Enquanto alguns autores encontram efeitos positivos sobre a cicatrização

periodontal (AKMAN *et al.*, 2015; TOMOFUJI *et al.*, 2008), outros autores não observam os mesmos resultados (KOSE *et al.*, 2015; EBERHARDT *et al* 1991).

2 OBJETIVO

O objetivo desta dissertação é verificar o efeito da utilização de vitamina C sobre a periodontite experimental e parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

EFEITO DA VITAMINA C SOBRE A PERIODONTITE EXPERIMENTAL E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS WISTAR

Vagner Jonatan Soster,* Júlia Christ da Silva,* Michael Everton Andrade,[‡] Vinicius Coelho Carrard,** Cassiano Kuchenbecker Rösing,* Juliano Cavagni*

* Departamento de Periodontia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

** Departamento de Patologia Bucal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil;

[‡] Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brasil;

Palavras chave: doença periodontal; perda óssea alveolar; vitamina C; antioxidantes; estresse oxidativo.

Endereço para correspondência:

Juliano Cavagni

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Ramiro Barcelos, 2492, Porto Alegre/RS, Brazil, ZIP Code: 90035-003

Phone/Fax: +55 51 3308 5318

Email: jcavagni@ufrgs.br (email pode ser publicado)

INTRODUÇÃO

Estudos publicados recentemente têm sugerido uma possível interação entre antioxidantes não enzimáticos e doença periodontal, tendo como principal desfecho a diminuição da perda óssea alveolar (TOMOFUJI 2006; SANBE, 2008; TOMOFUJI, 2009). A doença periodontal é uma doença infecto inflamatória que acomete os tecidos de proteção e inserção dos dentes. Ocorre a partir de um processo inflamatório complexo, no qual os leucócitos polimorfonucleares, além de gerar a linha de defesa frente aos periodontopatógenos, também acabam gerando a formação de radicais livres, os quais podem sofrer oxidação gerando espécies reativas de oxigênio e causar estresse oxidativo, o qual pode causar danos teciduais

através de vários mecanismos. Entre estes, encontram-se danos às proteínas, danos ao ácido desoxirribonucleico (DNA), peroxidação lipídica, oxidação enzimática e estimulação de citocinas pró-inflamatórias (CHAPPLE, 1997; CHAPPLE; MATTHEWS, 2007).

Como linha de defesa frente ao estresse oxidativo, existem defesas não-enzimáticas as quais têm capacidade de eliminar estas espécies reativas de oxigênio, dentre os antioxidantes não-enzimáticos bastante estudados na doença periodontal está a vitamina C (VitC) (GRAVES, 1999; PAGE; KORNMAN, 2000). Estudos realizados em modelo animal e em seres humanos, encontraram resultados que sugerem que uma maior ingestão de vitamina C pode mitigar a perda óssea alveolar. Uma relação inversamente proporcional entre a ingestão de vitamina C e o números de dentes que apresentaram progressão de doença periodontal e a perda óssea alveolar foi demonstrada (AKMAN, 2013; IWASAKI, 2013).

Tendo em vista estes aspectos, o objetivo deste estudo é verificar o efeito da utilização de vitamina C sobre a periodontite experimental e parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar.

METODOLOGIA

Delineamento e Considerações Éticas

O presente estudo seguiu um modelo randomizado, prospectivo em modelo animal. A **Figura 1** descreve o fluxograma do estudo em detalhes. O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Animais do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (protocolo 170115). O mesmo protocolo seguiu as normas da Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978), assim como das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS).

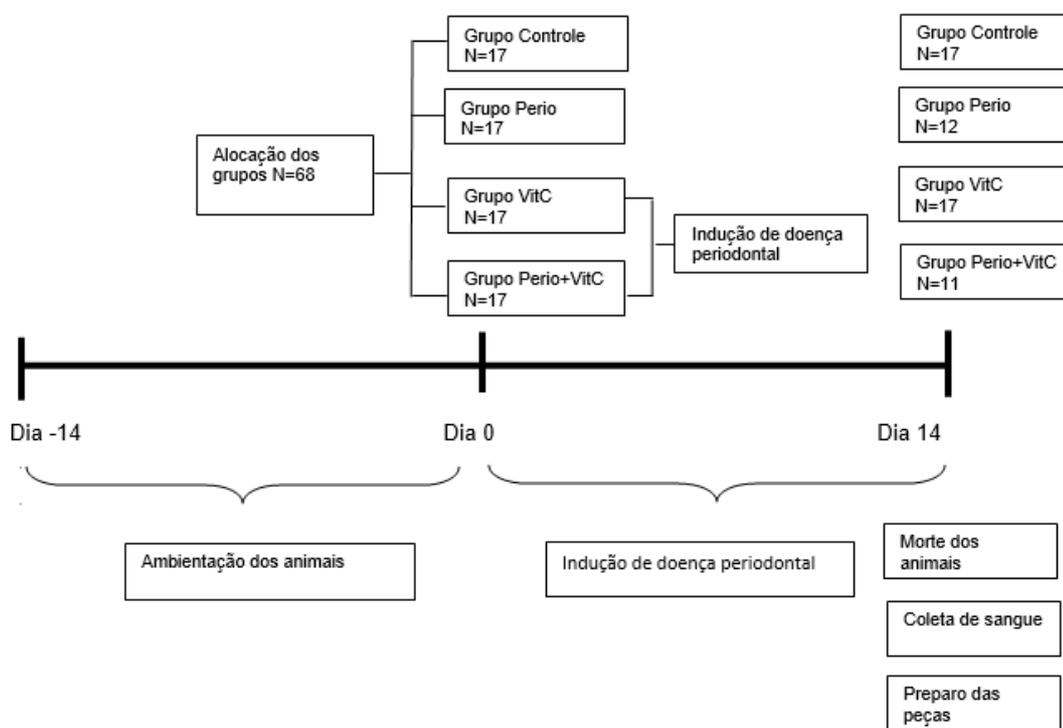


Figura 1. Fluxograma detalhado do estudo.
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

Animais

Para o presente estudo, foram utilizados 68 ratos Wistar machos com 60 dias de idade. Os animais ficaram armazenados em caixas-moradia de polipropileno, medindo 65 x 25 x 15 cm, com o fundo coberto por maravalha, com uma distribuição de 3 a 4 animais, todas as caixas foram mantidas na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Durante todo o período experimental foram tomadas medidas necessárias para minimizar a dor, o estresse e o desconforto dos animais. Para isso, foi utilizado ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade de 65-75% e sistema de exaustão de ar, além de livre acesso à ração-padrão para a espécie e líquido de acordo com o grupo experimental.

Quanto ao consumo de líquido, os animais tiveram acesso apenas ao líquido destinado ao grupo experimental.

RANDOMIZAÇÃO

Após o período de adaptação, os animais foram distribuídos randomicamente por sorteio para seus respectivos grupos experimentais considerando o peso ponderal a partir de extratos representados por quartis de peso. Cada grupo experimental foi inicialmente constituído por 17 animais e os mesmos foram distribuídos em quatro grupos, da seguinte maneira: Grupo Controle (Controle): não foi induzida doença periodontal e não foram expostos ao ácido ascórbico, portanto os animais receberam ração *ad libitum* e água; Grupo Vitamina C (VitC): não foi induzida doença periodontal e sua alimentação conteve ração e água destilada contendo ácido ascórbico na diluição de 1g/L *ad libitum*. Grupo Doença Periodontal (Perio): foi induzida doença periodontal por meio de ligaduras por um período de 2 semanas e, assim como os demais grupos, foi fornecido ração e água *ad libitum*; Grupo Doença Periodontal + Vitamina C (Perio+VitC): foi induzida doença periodontal da mesma maneira que no grupo Perio e, concomitantemente, foi oferecido ração e água destilada contendo Vitamina C na diluição de 1g/L *ad libitum*.

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Peso corporal (g)

A pesagem corpórea dos animais ocorreu em 3 ocasiões; a primeira, após os 14 dias de ambientação e randomização dos grupos; a segunda ocorreu decorridos 7 dias do início do período experimental; a terceira pesagem ocorreu no último dia do período experimental. A pesagem foi realizada em balança eletrônica Metler, modelo AS-F1, com precisão de 0,01g. Cada animal foi pesado 10 vezes e a média dessas aferições foi considerado o peso no momento avaliado.

Mensuração do consumo dos líquidos e dietas empregadas

A mensuração do consumo e a substituição dos líquidos e sólidos foi realizada diariamente em todos os grupos experimentais. Os valores médios de

consumo líquido e sólido consideraram o número de animais em cada caixa tendo sido gerada a média de consumo para cada uma delas.

Indução de Doença Periodontal

Após um período de duas semanas de ambientação, os animais receberam a indução de doença periodontal, de acordo com o grupo experimental, por meio da colocação de ligadura no segundo molar superior de uma hemiarcada do rato. Esse procedimento foi realizado mediante anestesia geral, sob supervisão de um médico veterinário, e os grupos controle e vitamina C também foram anestesiados para que fossem submetidos a estresse semelhante aos demais. Dessa forma, todos os animais receberam anestésico inalatório (Isoflurano 5%). Para a ligadura utilizou-se um fio de seda (4-0) - Ethicon® que foi colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais e realizado um nó na face vestibular. As ligaduras foram posicionadas nos segundos molares maxilares direitos, sendo que a região contralateral considerada controle intra-grupo (GRAVES 1999; CHAPPLE 2000; CAVAGNI 2016).

Administração de Vitamina C

No presente estudo, a administração de vitamina C ocorreu por via oral, através da adição da mesma em água destilada na concentração de 1g/L. Esta água foi preparada diariamente e disponibilizada aos animais dos grupos experimentais VitC e Perio+VitC por 14 dias, concomitantemente à indução de doença periodontal. Com o objetivo de manter as propriedades da vitamina, todas os recipientes para ingesta líquida foram protegidas da luz do ambiente do alojamento dos animais.

Morte dos animais e preparação dos espécimes

Após 14 dias do início do período experimental, os animais foram mortos por exsanguinação através de punção cardíaca após o animal estar devidamente anestesiado com isoflurano 5%. A coleta sanguínea ocorreu no momento da punção cardíaca tendo sido coletado um volume de aproximadamente 5 mL, para assim,

possibilitar a realização dos ensaios de estresse oxidativo. Imediatamente após a coleta, o sangue foi centrifugado em centrífuga refrigerada, da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Para a centrifugação foram utilizados tubos plásticos por 15 minutos em 3000 X g, à temperatura de 4°C. Em seguida, o plasma sobrenadante foi pipetado e aliqotado em frascos do tipo eppendorf, sobre uma rack congelada para manter a temperatura da centrífuga até o término da coleta daquele determinado grupo e após eram transferidos para um freezer à -20°C até completar a coleta dos grupos experimentais, para assim serem armazenados em temperatura de -80°C. As maxilas foram removidas com auxílio de cinzéis e tesouras e, após, foram armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%. Os tecidos moles foram química e mecanicamente removidos, com hipoclorito de sódio (Mazzarolo Química Ltda) em concentração de 10% e cinzéis, respectivamente.

ENSAIOS LABORATORIAIS

Análise Morfométrica da Perda Óssea

Para a tomada das fotografias, foi utilizada uma câmera fotográfica digital de 18.1 megapixels modelo T5i, com lente macro 100 (Canon® EOS Rebel T5i, Japão), acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que o cone ficou o mais paralelo possível em relação ao solo. Neste momento foi utilizado um aparato previamente confeccionado com pasta pesada de silicóna de adição para promover fixação a uma régua endodôntica em uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal ficou paralelo ao solo.

Em cada uma das hemimaxilas, foram realizadas fotografias das faces vestibular e palatina, sendo que a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea foi feita através programa Image J 3.0, por um examinador calibrado e que desconhecia a que grupo experimental pertenciam os espécimes. As medidas foram realizadas em pixels e convertidas para milímetros utilizando a régua endodôntica. Para calibração, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos para

serem duplamente mensuradas, com uma semana de intervalo, tendo como resultado do Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) o valor de 0,96.

Para fins de comparação da perda óssea que ocorreu tanto nos dentes do grupo controle quanto dos grupos teste, foram feitas dez medidas lineares da distância da junção amelo-cementária à crista óssea, sendo cinco por vestibular e cinco por palatino. Para cada face, foram feitas duas medidas na raiz mesial, duas na distal e uma na região de furca. A perda óssea dos dentes foi gerada a partir da média dessas dez medidas lineares.

Tanto os procedimentos de preparo das peças maxilares bem como de análise morfométrica da perda óssea foram realizados no Setor de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seguiram a metodologia proposta por (FERNANDES *et al.*,2007).

Análise do Sulfidril Plasmático Total

Com o objetivo de analisar o sulfidril plasmático total, o plasma (45uL) foi misturado com 120 mL de PBS e 35 mL de tampão Tris (30mM)/EDTA 3 mM (pH 8) em microplaca. Após a leitura da absorvância basal (412nm), as amostras foram regidas com 10 mL de 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (10 mM em etanol) por uma hora. Então, as amostras foram lidas novamente e a leitura basal foi descontada. Esses valores foram comparados com os valores obtidos em uma curva padrão, feita a partir de concentrações conhecidas de sulfidril. Os resultados foram expressos em nmol –SH/mg de proteína, conforme anteriormente descrito (RIENER; KADA; GRUBER, 2002).

Análise de FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Para detectar a capacidade antioxidante total não-enzimática do plasma, utilizou-se uma técnica capaz de avaliar a habilidade plasmática em reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} por meio da geração de cor. Para tanto, foram utilizados 7 uL do plasma diluídos com 18 uL de H_2O destilada e posteriormente reagidos com 175 uL do reagente de trabalho do FRAP. Este reagente é constituído de 10 partes de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), uma parte de 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (10 mM em

40 mM HCl), e uma parte de FeCl₃ (20 mM). Uma curva padrão de FeSO₄ foi feita em paralelo e as absorbâncias foram lidas após 10 minutos de reação (593 nm). Por fim, as absorbâncias das amostras foram comparadas com aquelas da curva padrão e os resultados foram expressos em mmol/litro de plasma, conforme descrito anteriormente (BENZIE; STRAIN, 1996).

Análise Estatística

A verificação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Shapiro-Wilk. Foram geradas curvas de distribuição para avaliação da simetria e curtose. Ressalte-se que todas apresentaram distribuição normal, sendo utilizados testes paramétricos. Os dados de peso corporal dos animais, consumo de alimentos e líquidos foram avaliados por ANOVA de medidas repetidas com Post-Hoc de Sidak. Média e desvio padrão da perda óssea alveolar convertida para milímetros (desfecho principal) e dos marcadores de estresse oxidativo foram avaliados por ANOVA de uma via seguida do teste de múltiplas comparações de Bonferroni. O rato foi considerado a unidade de análise e o nível de significância estabelecido para o presente estudo foi de 95%.

RESULTADOS

Os resultados apresentados a seguir referem-se a um número amostral de **57** animais. Foram excluídos **5** animais do grupo Perio e **6** animais do grupo VitC+Perio. Tal procedimento se deu em virtude de que nestes animais houve perda da ligadura impedindo a padronização do modelo de indução de doença periodontal. Nenhum animal foi perdido ao longo do estudo por razões relacionadas ao protocolo de uso da VitC.

A **Figura 2** demonstra a evolução do peso dos animais ao longo do período experimental. Observa-se um aumento do peso dos animais durante as 3 semanas em todos os grupos experimentais. Quando estes tempos são analisados separadamente, houve uma diferença significativa apenas entre a primeira a terceira semanas, bem como entre a segunda e a terceira semanas quando todos os grupos experimentais são considerados. Em relação à interação tempo-grupo, a análise de

ANOVA de medidas repetidas não apontou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Isso significa que todos os grupos ganharam peso, no entanto diferenças entre eles não puderam ser identificadas em nenhuma das 3 semanas de avaliação.

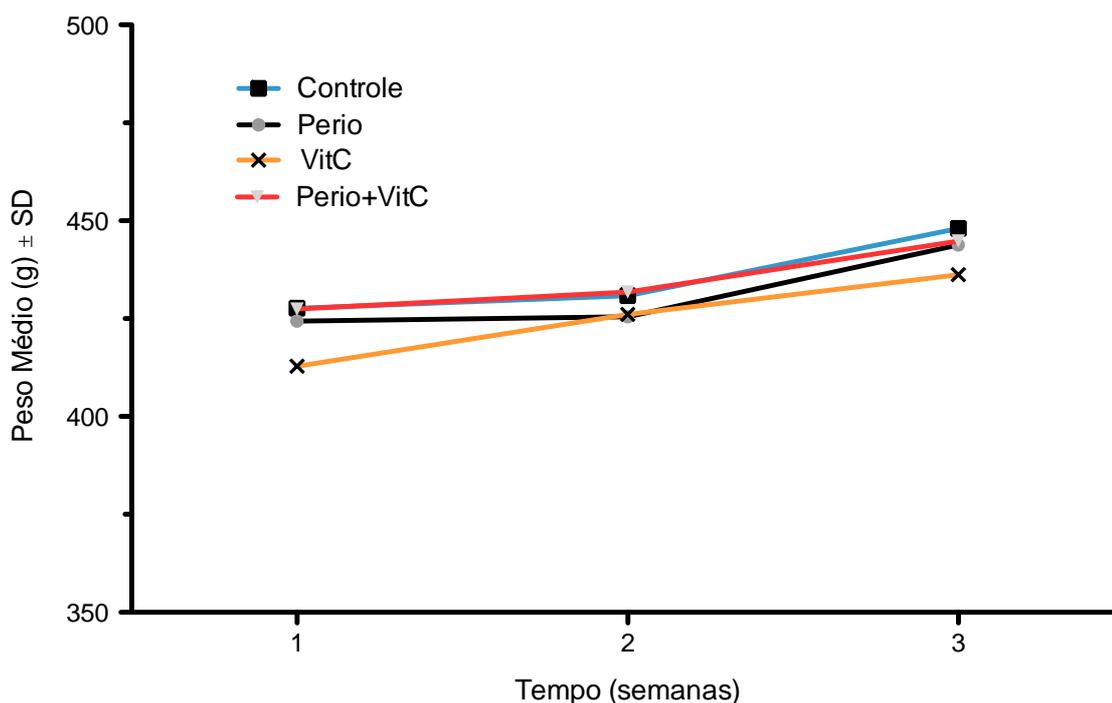


Figura 2. O peso (em g) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak)
Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

Os dados de consumo de ração e dos líquidos são apresentados nos gráficos abaixo (**Figuras 3 e 4**), respectivamente. A ANOVA de medidas repetidas revelou uma interação significativa entre consumo de ração e o tempo de acompanhamento dos animais. A análise do gráfico não permite uma distinção no padrão de consumo, sendo os valores variáveis ao longo do estudo. Entretanto, não pode ser observada interação entre o tempo-grupo para o consumo de ração. Isso significa que quando os grupos experimentais são comparados nos diferentes tempos experimentais não se observou diferenças significativas no consumo de ração. Considerando o consumo de líquidos a análise não revelou interação entre o consumo de líquidos e o tempo de acompanhamento dos animais, tampouco uma interação tempo-grupo, demonstrando que o consumo de líquidos foi semelhante entre os grupos experimentais ao longo do tempo.

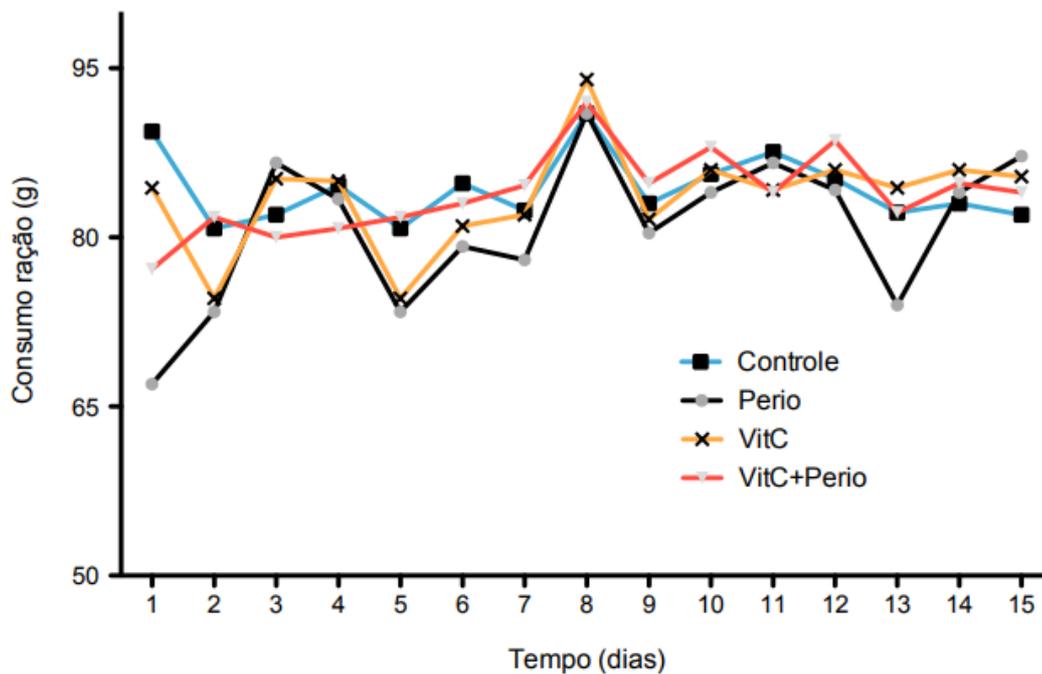


Figura 3. Consumo de ração (em g) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak)
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

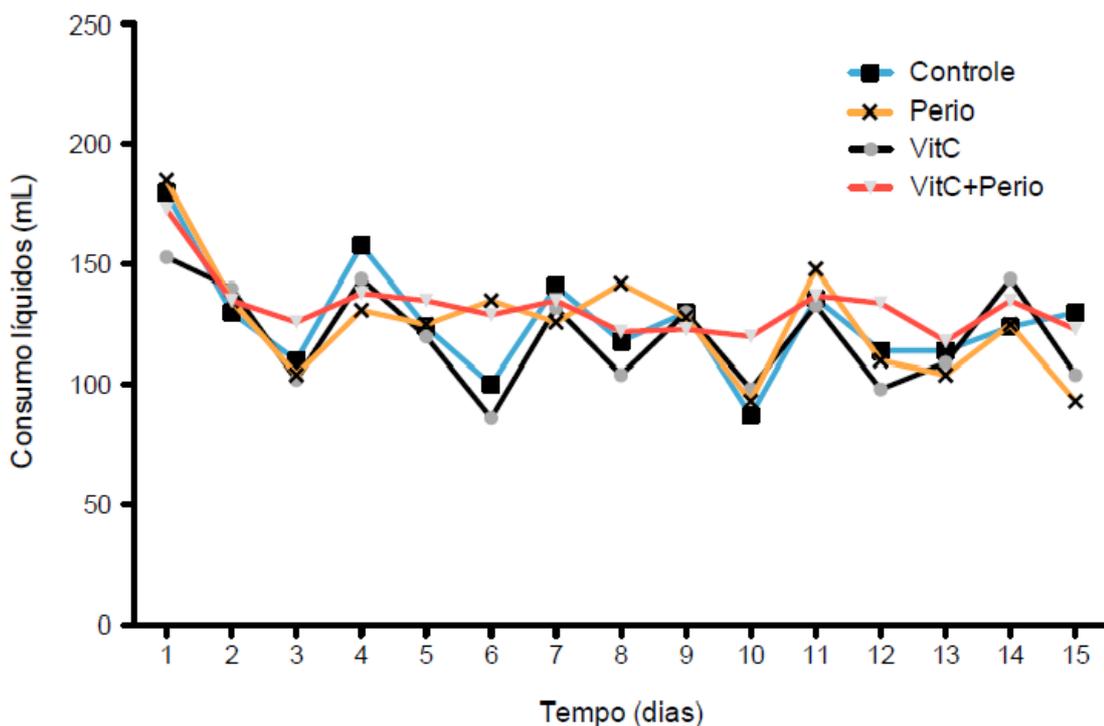


Figura 4. Consumo de líquidos (em mL) ao longo do período experimental de acordo com os diferentes grupos experimentais - ANOVA Medidas Repetidas (Sidak)
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

O desfecho principal do presente estudo foi avaliado separadamente entre os lados direito e esquerdo de acordo com a presença de ligadura para os grupos Perio

e VitC+Perio. A **Tabela 1** demonstra a média de perda óssea alveolar (em mm) para os diferentes grupos experimentais nos lados direito e esquerdo. É possível observar que todos os animais incluídos na análise exibiram algum grau de perda óssea alveolar. Considerando o lado esquerdo, em que nenhum dos animais de nenhum dos grupos experimentais recebeu a indução de periodontite, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles ao final do período experimental. Isso significa que a exposição dos animais à VitC não produziu efeitos significativos quando é avaliada a perda óssea alveolar espontânea.

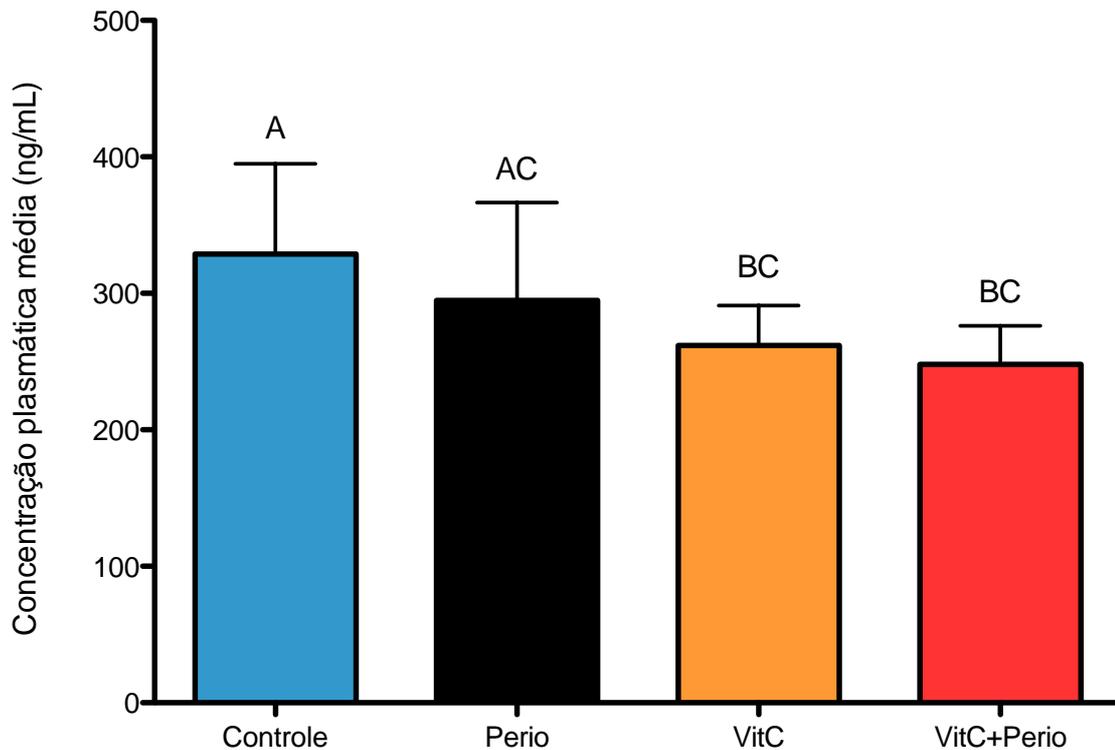
Por outro lado, nos sítios que houve indução de periodontite os animais exibiram uma perda óssea alveolar bastante acentuada ($0,715 \pm 0,13$ e $0,609 \pm 0,12$, para os grupos Perio e VitC+Perio, respectivamente) e estatisticamente significativa quando comparado aos grupos que não se induziu periodontite ($0,243 \pm 0,27$ e $0,254 \pm 0,22$ para os grupos Controle e VitC, respectivamente). Adicionalmente, a exposição à VitC reduziu de maneira significativa e relevante a perda óssea alveolar induzida por ligadura em aproximadamente 15% com médias de $0,715 \pm 0,13$ e $0,609 \pm 0,12$ para os grupos Perio e VitC+Perio, respectivamente.

Tabela 1. Média (\pm DP) da POA (em mm) para os lados direito e esquerdo de acordo com os grupos experimentais.

	Lado Direito (com ligadura em Perio e VitC+Perio)	Lado esquerdo (todos os grupos sem ligaduras)
Controle	$0,243 \pm 0,27$ A	$0,242 \pm 0,02$ A
Perio	$0,715 \pm 0,13$ B	$0,245 \pm 0,04$ A
VitC	$0,254 \pm 0,22$ AC	$0,253 \pm 0,03$ A
VitC+Perio	$0,609 \pm 0,12$ D	$0,257 \pm 0,02$ A

Médias seguidas de letras diferentes demonstram diferenças estatisticamente significativas ANOVA de uma via seguida de Bonferroni

Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.



Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas

Figura 5. Níveis plasmáticos médios de FRAP (\pm DP) ao final do período experimental de acordo com os grupos experimentais.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

A **figura 5** demonstra os níveis plasmáticos de FRAP ao final do período experimental nos grupos Controle, Perio, VitC e VitC+Perio. Observa-se que os grupos que receberam a VitC e a indução de periodontite exibiram menores valores quando comparados ao grupo Controle. Isso significa que a presença tanto da VitC quanto da doença periodontal foi capaz de interferir sobre os níveis séricos do FRAP. Entretanto, quando se avalia o efeito da VitC sobre os níveis plasmáticos de FRAP em ratos com doença periodontal induzida, a mesma parece afetar negativamente os resultados.

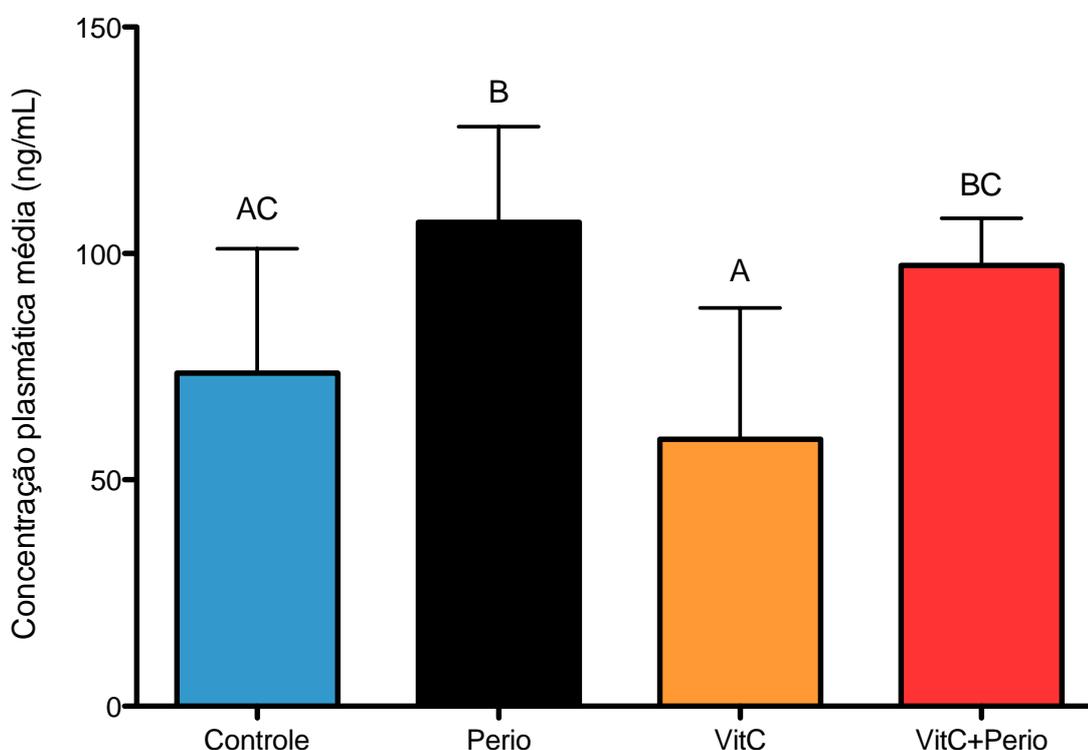


Figura 6. Níveis plasmáticos médios de Sulfidril (\pm DP) ao final do período experimental de acordo com os grupos experimentais.
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2017.

A **figura 6** demonstra os níveis plasmáticos de Sulfidril ao final do período experimental nos grupos experimentais. Observa-se que os grupos Perio e VitC+Perio exibiram maiores valores quando comparados ao grupo Controle e ao grupo VitC. Isso demonstra que os animais com doença periodontal apresentaram uma concentração plasmática maior de sulfidril em relação aos animais aos quais não receberam indução de doença periodontal. Neste sentido nota-se que a defesa antioxidante enzimática esteve alterada e com concentrações mais elevadas nos animais que foram submetidos à doença periodontal.

DISCUSSÃO

O presente estudo objetivou avaliar o efeito da exposição à vitamina C sobre parâmetros de destruição periodontal e de estresse oxidativo em ratos Wistar. Observou-se que a vitamina C apresentou potencial de redução da perda óssea alveolar, assim como modulou os parâmetros de estresse oxidativo.

Os resultados encontrados neste estudo devem ser analisados em perspectiva da construção do conhecimento e da capacidade de evidência que os

mesmos têm. Nesse sentido, é importante ressaltar que o estudo foi realizado em modelo animal, por ser a melhor forma de compreender alguns dos mecanismos circunjacentes ao processo etiopatogênico das doenças periodontais. Não é possível realizar esse tipo de monitoramento em seres humanos, sem que aspectos éticos sejam infringidos. (COSTA; GARRAFA; OSELKA, 1998) Por essas razões o uso de animais permite o controle de diferentes variáveis, com modificações específicas para cada grupo. Por exemplo, as diferenças básicas encontradas nos grupos experimentais deste estudo são a exposição à indução de doença periodontal e a exposição à vitamina C. Todas as demais variáveis individuais e ambientais, em teoria, são controladas pela utilização de animais.

Ratos Wistar têm sido frequentemente utilizados em estudos relacionados à etiopatogenia das doenças periodontais com sucesso. A utilização de modelo de periodontite induzida por ligadura, da mesma forma, é capaz de mimetizar o que ocorre nos seres humanos. (DE MOLON *et al.* 2016) Apesar de os resultados encontrados em estudos com tais modelos apresentarem maiores controles de vieses, sua extrapolação direta para seres humanos deve ser cuidadosa (ALMON *et al.* 1971).

No âmbito dos aspectos metodológicos, todos os cuidados foram tomados para ampliar a validade do estudo, incluindo randomização, cegamento dos avaliadores, controle do ambiente de pesquisa, além de mensuração de aspectos vinculados a ingestão de alimentos e líquidos, assim como peso corporal ao longo do estudo. Um aspecto importante a ser relatado é que o número de animais analisados no presente estudo varia de 11 a 17. Essa situação é devida à perda de ligadura em alguns animais. Estudos com esses modelos utilizaram a verificação periódica da presença de ligaduras e eventual reposição quando são perdidas (TOMOFUJI, 2009). Entretanto, esse fato poderia gerar estresse nos animais, que poderia afetar os resultados de forma negativa. Ademais, como o período de tempo de indução de doença periodontal é de 14 dias, a perda de ligadura por período curto poderia gerar um viés. Nesse sentido, optou-se por excluir os animais que perderam as ligaduras de todas as análises (tanto de destruição periodontal como dos marcadores de estresse oxidativo) por não saber-se o exato momento em que ocorreu a perda da mesma. Assim, os resultados apresentados dizem respeito sempre ao mesmo grupo de animais. É importante ressaltar que estudos relativos a etiopatogenia das

doenças periodontais normalmente têm utilizado número de animais semelhantes ou até mesmo inferior ao do presente estudo (DUNDAR, 2016; LEVINE, 1986; JÚNIOR, 2017; ÖZDEN, 2017; TOMOFUJI, 2009; VARGAS-SANCHES, 2016)

No que se refere a saúde sistêmica dos animais participantes do estudo, o monitoramento do peso corporal tem sido utilizado para inferir que os procedimentos experimentais não influenciam aspectos de saúde sistêmica (WAGNER, 2016). No presente estudo os animais de todos os grupos ganharam peso, fruto do seu desenvolvimento e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Assim, pode-se sugerir que os procedimentos experimentais (tanto a colocação de ligaduras quanto a exposição a vitamina C) não prejudicaram a saúde sistêmica dos animais. Assim, os resultados obtidos podem ser creditados aos procedimentos experimentais *per se* e não a prejuízos de saúde sistêmica (CHAPPLE, 1997). Também é importante ressaltar que a faixa de peso encontrada nos animais participantes deste estudo assemelha-se a outros estudos publicados (AKMAN, 2013).

A ingestão sólida e líquida também pode ser afetada por procedimentos experimentais, tanto por presença eventual de dor devido às manipulações como por dificuldades de adaptação ao gosto das soluções para beber (WAGNER, 2016). No que se refere a ingesta sólida, essa adaptação não é necessária tendo em vista que a ração utilizada no estudo é a mesma que os animais são expostos desde o nascimento. Os resultados encontrados nas análises de ingesta sólida e líquida também apontam por padrões similares de alimentação nos diferentes grupos experimentais, o que também facilita o isolamento das variáveis exposição à ligadura e/ou à vitamina C nos achados principais do estudo.

A vitamina C, principal variável independente do presente estudo, foi administrada na água em concentração 1g/L. A utilização da via oral apresenta vantagens e desvantagens. Como ponto positivo, destaca-se que o efeito tópico da presença da vitamina C pode ser também obtido. No plano das desvantagens, somente é possível avaliar o consumo médio por caixa moradia, o que pode não refletir exatamente o consumo individual. Entretanto, essa é uma prática laboratorial corrente em estudos similares e parece não mascarar ou interferir negativamente nos resultados encontrados (CAVAGNI, 2013).

O desfecho principal do presente estudo é a perda óssea alveolar encontrada ao final do período experimental. O processo etiopatogênico periodontal tem como consequência a perda óssea alveolar. Essa é uma das poucas oportunidades que se tem na pesquisa em saúde de quantificar em medidas métricas o efeito do processo inflamatório. Os resultados obtidos comparando os lados com e sem ligaduras claramente demonstram que a presença de ligaduras foi capaz de gerar inflamação que resultou em destruição do periodonto, o que suporta a efetividade do método, semelhantemente a outros estudos (DUNDAR, 2016; KOSE, 2015).

No que se refere à comparação entre os grupos propriamente dita, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na avaliação dos lados sem ligadura. Isso infere que o protocolo experimental não interferiu na perda óssea alveolar espontânea. Estudos têm analisado tanto a perda óssea espontânea quanto a induzida, com resultados conflitantes. (LIBERMAN, 2011; VERZELETTI, 2012).

A comparação entre os grupos nos lados em que foi instalada a ligadura nos grupos Perio e Perio+VitC com os grupos VitC e Controle demonstrou que a presença de ligaduras gerou perda óssea alveolar adicional. Um resultado bastante interessante é que a presença de vitamina C gerou menores graus de perda óssea do que quando a mesma não esteve presente nos grupos em que periodontite foi induzida. Por outro lado, a simples presença da vitamina C não diferiu do grupo controle. Assim, o que se pode sugerir é que a vitamina C, na presença de um desafio microbiano consistente, como a ligadura, minimiza os danos periodontais.

Os estudos publicados até o momento na temática demonstram resultados em sua grande maioria positivos frente à relação ao uso de vitamina C de modo complementar ao tratamento periodontal convencional e também em relação a perda óssea alveolar em estudos em modelo animal.

Os mecanismos subjacentes ao efeito positivo da vitamina C no processo etiopatogênico periodontal ainda são objeto de estudos. Uma das possibilidades reside nos efeitos que a vitamina C tem sobre o estresse oxidativo. Estudos epidemiológicos indicam associação negativa entre o nível plasmático de vitamina C e a gravidade da periodontite (TIMMERMAM, 2007). O aumento do nível plasmático de vitamina C teria um efeito benéfico sobre a periodontite. No entanto, não está claro como a ingestão de vitamina C afeta o estresse oxidativo gengival, expressão gênica que codifica inflamação e comportamento celular em lesões periodontais,

embora alguns estudos sugerem que a vitamina C aumenta o número de feixes de colágeno regenerando tecido periodontal e desintoxicando histamina na inflamação gengival (NAKOMOTO, 1984; VAN DER VELDEN, 2011; ALAGL, 2015).

Neste estudo, desafios são encontrados em busca da explicação para os achados. A análise do FRAP não esteve em linha com as primeiras hipóteses levantadas, uma vez que o mesmo apresentou-se reduzido quando da exposição à vitamina C. A literatura aponta que níveis aumentados deste marcador seriam esperados frente aos desafios provocados pela suplementação com agentes antioxidantes. Uma possível explicação para isso está na complexidade das relações entre os agentes antioxidantes no processo inflamatório na doença periodontal. Estudos têm demonstrado níveis plasmáticos diferentes para antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, indicando um possível predomínio da resposta antioxidante enzimática sobre a não enzimática no período experimental de 2 semanas (GHISELLI, 2000; CHAPPLE, 2007; BASER, 2015).

A concentração plasmática de sulfidril foi objeto de estudo nesta pesquisa. Os resultados obtidos vão ao encontro da hipótese de que a vitamina C participa da modulação desse processo. Observou-se que a exposição à vitamina C no grupo que recebeu indução de doença periodontal expressa-se de forma semelhante ao grupo controle, o que não é o caso quando se compara somente a presença de ligadura com o grupo controle. Este achado demonstra diminuição na capacidade antioxidante não-enzimática nos biomarcadores plasmáticos (BALTACIOĞLU, 2014). Considerando a resposta inflamatória local e sistêmica durante a doença periodontal, esta patologia pode esgotar os níveis plasmáticos de vitamina C, sendo o principal antioxidante hidrófilo presente no sangue, e que age principalmente com a limpeza de espécies reativas de oxigênio, tem papel importante na peroxidação lipídica (CHAPPLE, 2002). Estudos têm verificado que, os níveis plasmáticos de vitamina C elevaram-se em casos aonde ocorreu tratamento periodontal através de raspagem e alisamento subgengival concomitantemente ao uso de vitamina C. Em contrapartida, nos casos aonde não foram realizados o tratamento periodontal, os níveis plasmáticos apresentaram concentrações menores. Isto mostra uma relação inversamente proporcional entre a gravidade da doença periodontal e os níveis plasmáticos de vitamina C (TIMMERMAN, 2007; ISMAIL, 2015; BARIN, 2017).

O presente estudo apresenta fortalezas e limitações. As vantagens estão na utilização de princípios básicos de pesquisa contemporânea, com cegamento, calibragem, randomização, utilização de grupos controle tanto intra como intergrupos, permitindo que os resultados isolem os efeitos da presença da ligadura e da exposição da vitamina C. Também é digno de nota que a concentração de vitamina C ingerida guarda relação com recomendações para suplementação em humanos (LEVINE, 1986) As limitações estão relacionadas à impossibilidade de extrapolação direta dos resultados para humanos. A perda de ligaduras de alguns animais também pode ser considerada uma limitação. Entretanto a observação de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos sugere que a perda de animais não interferiu nos achados.

A interpretação dos resultados do presente estudo é de interesse do conhecimento da etiopatogênese periodontal, sugerindo que a exposição à vitamina C tem potencial de modular tanto a destruição periodontal como o estresse oxidativo, o que deve ser objeto de contínua investigação.

CONCLUSÃO

A exposição à vitamina C potencialmente reduz a perda óssea alveolar, modulando parâmetros de estresse oxidativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente dissertação objetivou verificar o efeito da utilização de vitamina C sobre a periodontite experimental induzida e parâmetros de estresse oxidativo em ratos Wistar. O interesse para tal, se deu pelo crescente número de evidências, vindas principalmente de estudos observacionais. Nesse sentido, após cuidadosa análise da literatura dos dados disponíveis, especialmente no Pubmed, e assim construir um melhor entendimento sobre o assunto abordado, foram encontrados 6 estudos seguindo o mesmo modelo utilizado pelo presente trabalho (MIYAJIMA, 1995; EKUNI, 2009; TOMOFUJI, 2009; AKMAN, 2015; BARIN, 2015; KOSE, 2015). Destes, três estudos avaliaram a relação de perda óssea alveolar através de doença periodontal induzida com o uso de VitC, sendo que dois mostraram resultados benéficos do uso de VitC. O restante dos estudos avaliou somente volume de antioxidantes plasmáticos. Com isso, fica claramente evidenciado que o tema tem potencial para ser explorado.

O principal achado foi que nos animais que receberam VitC e indução de doença periodontal menores graus de perda óssea alveolar foram detectados quando comparados aos animais que receberam indução de periodontite, apenas. Isso poderia ser explicado pela ação antioxidante que ocorre frente ao estresse oxidativo, durante a doença periodontal quando se utiliza antioxidante não-enzimático (AKMAN, 2015).

Os níveis plasmáticos de vitamina C os quais foram mensurados através da técnica de FRAP, mostraram menores concentrações nos grupos testes quando comparados ao grupo Controle. Este fato pode ser explicado pela resposta inflamatória local e sistêmica da doença periodontal, aonde a mesma através de atividades pró-oxidantes poderiam esgotar os níveis plasmáticos de antioxidantes não-enzimáticos (BARIN, 2017). Os níveis plasmáticos de sulfidril, o qual não analisa a oxidação causada pela vitamina C, mas sim a oxidação protéica causada pelo estresse oxidativo, apresentaram concentrações mais elevadas nos grupos que foram submetidos a indução de doença periodontal quando comparados ao grupos Controle e VitC, o que sugere uma maior oxidação dos lipídios das paredes celulares (DAHIYA, 2013) .

Os resultados colocam a vitamina C em foco para novas pesquisas futuras, com abordagens em mais marcadores plasmáticos antioxidantes, e de análises locais ao sítio afetado além da perda óssea alveolar. Assim como abrir os horizontes de estudos epidemiológicos além dos estudos transversais em humanos e casos e controle em modelo animal.

Com estes achados pode-se concluir que a vitamina C exerce capacidade interativa na modulação da perda óssea alveolar em ratos Wistar com periodontite induzida. No entanto, estes achados não anulam a busca por maiores informações frente ao tema abordado na presente dissertação e a possível tendência do uso de antioxidantes não-enzimáticos utilizados como coadjuvantes no tratamento periodontal.

REFERÊNCIAS

- AKMAN, Sumeyra 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. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 5, p. 666-674, 2013.
- ALAGL, Adel S.; BHAT, Subraya Giliyar. Ascorbic acid: New role of an age - old micronutrient in the management of periodontal disease in older adults. **Geriatrics & gerontology international**, v. 15, n. 3, p. 241-254, 2015.
- ALLMON, H. Bernard. Man is not a giant rat. **Journal of public health dentistry**, v. 31, n. 4, p. 218-224, 1971.
- AL-MOUSAWI, A. M. et al. Impact of anesthesia, analgesia, and euthanasia technique on the inflammatory cytokine profile in a rodent model of severe burn injury. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 261-8, Sep 2010.
- AMARASENA, N. et al. Serum vitamin C – periodontal relationship in community-dwelling elderly japanese. **J Clin Periodontol**, United States, v. 32, n. 1, p. 93-7, Jan. 2005.
- BALTACIOĞLU, Esra et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease?. **Journal of periodontology**, v. 85, n. 10, p. 1432-1441, 2014.
- BASER, Ulku et al. Plasma and salivary total antioxidant capacity in healthy controls compared with aggressive and chronic periodontitis patients. **Saudi medical journal**, v. 36, n. 7, p. 856, 2015.
- 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**, United States, v. 10, n. 4, p. 458-76, 1999.
- BARIN, L. M. et al. Role of the adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to periodontal treatment at plasmatic oxidative stress and vascular behavior. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 538-544, 2017.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, p. 70-6, 1996.
- BRASIL. **Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008 – Lei Arouca**. Presidência da República, C. C., Subchefia para assuntos jurídicos, 2008.
- BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA**. 50 p. 2016.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA**. Brasília, 54 p. 2013.

BRASIL. **Resolução normativa número 13, de 20 de setembro de 2013**. ANIMAL, C. N. D. E. Diário Oficial da União, Brasília, 2013.

BRASIL. **Resolução normativa número 30, de 02 de fevereiro de 2016**. ANIMAL, C. N. D. E. Diário Oficial da União, Brasília, 2016.

BOHLOOLI, S. *et al.* The effect of spinach supplementation on exercise-induced oxidative stress. **J Sports Med Phys Fit**, Italy, v. 55, n. 6, p. 609-14, Jun. 2015.

BSOUL, S. A.; TEREZHALMY, G. T. Vitamin C in health and disease. **J Contemp Dent Pract**, India, v. 5, n. 2, p. 1-13, May 2004.

BUETTNER, Garry R.; JURKIEWICZ, Beth Anne. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. **Radiation research**, v. 145, n. 5, p. 532-541, 1996.

CAMPBELL, J. D. *et al.* Ascorbic acid is a potent inhibitor of various forms of T- cell apoptosis. **Cell Immunol**, Netherlands, v. 194, n. 1, p. 1-5, May 1999.

CAVAGNI, J. *et al.* Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. **Arch Oral Biol**, England, v. 58, n. 8, p. 1034-9, Aug. 2013.

CHANDRA, H. M. *et al.* Influence of genotypic variations on antioxidante properties in different fractions of tomato. **J Food Sci**, United States, v. 77, n. 11, C1174-8, Nov 2012.

CHAPPLE, I. L. C. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. **J Clin Periodontol**, United States, v. 24, n. 5, p. 287-96, June 1997.

CHAPPLE, I. L. C. *et al.* Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. **Molecular Pathology**, v. 55, n. 6, p. 367, 2002.

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

CLASSEN, W. Behavioral, neurology and electrophysiology, Chapter 21, p-419-435. In: The laboratory rat. Editor: Georg J. Krinke, 2000.

COSTA, S. I. F; GARrafa, VOLNEI; OSELKA, G. Apresentando a bioética. **Iniciação à Bioética, Brasília: Conselho Federal de Medicina**, 1998.
DAHIYA, Parveen *et al.* Reactive oxygen species in periodontitis. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 4, p. 411, 2013.

DE LA FUENTE, M. *et al.* Immune function in aged women is improved by ingestion of vitamins C and E. **Can J Physiol Pharmacol**, Canada, v. 76, n. 4, p. 373-80, Apr. 1998.

DE MOLON, Rafael Scaf *et al.* Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice. **Clinical oral investigations**, v. 20, n. 6, p. 1203-1216, 2016.

DUNDAR, S. *et al.* Dietary arginine silicate inositol complex inhibits periodontal tissue loss in rats with ligature-induced periodontitis. **Drug design, development and therapy**, v. 10, p. 3771, 2016.

EBERHARDT, Marian V.; LEE, Chang Yong; LIU, Rui Hai. Nutrition: Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 903-904, 2000.

EKUNI, D. *et al.* Periodontitis - induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *Journal of periodontal research*, v. 44, n. 4, p. 434-442, 2009.

FAURE, P.; LAFOND, J.-L. Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. In: **Analysis of free radicals in biological systems**. Birkhäuser Basel, 1995. p. 237-248.

FERNANDES, M. I. *et al.* Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**, v. 21, n. 3, p. 216-21, Sep. 2007.

FIELD, C. J.; JOHNSON, I. R.; SCHLEY, P.D. Nutrients and their role in hosts resistance infection. **J Leukoc Biol**, United States, v. 71, n. 1, p. 16-32, Jan. 2002.

FREI, B.; STOCKER, R.; AMES, B. N. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. **Proc Natl Acad Sci USA**, United States, v. 85, n. 24, p. 9748-52, Dec. 1988.

CAVAGNI, J. *et al.* Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in Wistar rats. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 2, p. e9-e17, 2016.

GEESIN, J. C. *et al.* Ascorbic acid specifically increases type I and type III procollagen messenger RNA levels in human skin fibroblast. **J Invest Dermatol**, United States, v. 90, n. 4, p. 420-4, Apr. 1988.

GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal**, England, v. 19, p. 1807-19, May 2007.

GHISELLI, Andrea *et al.* Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.

GRAVES, D. T. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in periodontal disease progression. **Clin Infect Dis**, United States, v. 28, n. 3, p. 482-90, Mar. 1999.

HALLIWELL, B. How to characterize an antioxidant: an update. **Biochem Soc Symp**, England, v. 61, p. 73-101, 1995.

HALLIWELL, B. Mechanisms involved in the generation of free radicals. **Pathol Biol (Paris)**, France, v. 44, p. 6-13, 1996.

HART, Thomas C.; KORNMAN, Kenneth S. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 202-215, 1997.

HENSLEY, K. *et al.* Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radic Biol Med**, United States, v. 28, n. 10, p. 1456-62, May 2000.

ISMAIL, Md *et al.* Effect of spirulina intervention on oxidative stress, antioxidant status, and lipid profile in chronic obstructive pulmonary disease patients. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

IWASAKI, Kengo *et al.* Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. **Journal of periodontology**, v. 84, n. 10, p. 1425-1433, 2013.

KAKLAMANOS, E. G.; TSALIKIS, L. A review on peri-implant crevicular fluid assays potential in monitoring and predicting peri-implant tissue responses. **J Int Acad Periodontol**, England, v. 4, n. 2, p. 49-59, Apr. 2002.

KILKENNY, Carol *et al.* Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 2010.

KIYOSHIMA, T. *et al.* Oxidative stress caused by a low concentration of hydrogen peroxide induces senescence-like changes in mouse gingival fibroblasts. **Int J Mol Med**, Greece, v. 30, n. 5, p. 1007-12, Nov. 2012.

KOPEC, R. E. *et al.* Avocado consumption enhances human postprandial provitamin A absorption and conversion from a novel high- β -carotene tomato sauce and from carrots. **J Nutr**, United States, v. 144, n. 8, p. 1158-66, Aug. 2014.

KOSE, O. *et al.* Effects of alpha-lipoic acid and its combined use with vitamin C on periodontal tissues and markers of oxidative stress in rats with experimental periodontitis. **Oxid Antioxid Med Sci**. Turkey, v. 4, p. 91-6, Oct. 2015.

KUZMANOVA, Denica *et al.* Vitamin C in plasma and leucocytes in relation to periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 39, n. 10, p. 905-912, 2012.

LEVINE, M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. **N Engl J Med**, United States, v. 314, n. 14, p. 892-902, Apr. 1986.

LEVINE, R. I. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994.

LIBERMAN, Diego Nique *et al.* Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **archives of oral biology**, v. 56, n. 2, p. 109-113, 2011.

LINDHE, J.; HAMP, S.; LÖE, H. Experimental periodontitis in the beagle dog. **J Periodont Res**, United States, v. 8, p. 1-10, 1973.

JÚNIOR, José Carlos Elias Mouchrek et al. Simvastatin modulates gingival cytokine and MMP production in a rat model of ligature-induced periodontitis. **Clinical, cosmetic and investigational dentistry**, v. 9, p. 33, 2017..

MIYAJIMA, Kuniaki et al. Morphological differences in the skull of ascorbic acid-deficient ODS rats. **Archives of oral biology**, v. 40, n. 4, p. 293-297, 1995.

MUNIZ, F. W. M. G. *et al.* The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: a systematic review. **Arch Oral Biol**, England, v. 60, n. 9, p. 1203-14, May 2015.

NAKAMOTO, Tetsuo; MCCROSKEY, Mark; MALLEK, Henry M. The role of ascorbic acid deficiency in human gingivitis—a new hypothesis. **Journal of theoretical biology**, v. 108, n. 2, p. 163-171, 1984.

VERZELETTI, G.N; GAIO, E.J; RÖSING, C.K. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 65, n. 6, p. 348-351, 2007.

NISHIDA, M. *et al.* Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. **J Periodontol**, United States, v. 71, n. 8, p. 1215-23, Aug. 2000.

Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 754857.

ÖZDEN, Feyza Otan et al. Effects of grape seed extract on periodontal disease: an experimental study in rats. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 2, p. 121-129, 2017.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**, Denmark, v. 14, p. 9-11, 1997.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Bioavailability of micronutrients from plant foods: an update. **Crit Rev Food Sci Nutr**, England, v. 56, n. 10, p. 1608-19, Jul. 2016.

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am J Clin Nutr**, United States, v. 78, suppl., 570S-578S, 2003.

RIENER, C. K.; KADA, G.; GRUBER, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. **Anal Bioanal Chem**, v. 373, p. 266-76, 2002.

SANBE, T; TOMOFUJI, T. Vitamin C intake inhibits serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone in rats fed on a high-cholesterol diet. **Archives of oral biology**. England, v. 54, n.8, p. 235-240, Nov. 2008.

SCHWAGER, J.; SCHULZE, J. Modulation of interleukin production by ascorbic acid. **Vet Immunol Immunopathol**, Netherlands, v. 64, n. 1, p. 45-57, Jun. 1998.

STAUDTE, H.; SIGUSCH, B. W.; GLOCKMANN, E. Grapefruit consumption improves vitamin C status in periodontitis patients. **Br Dent J**, England, v. 199, n.4, p. 213-17, Aug. 2005.

TIMMERMAN, M. F. et al. Java project on periodontal diseases: the relationship between vitamin C and the severity of periodontitis. **Journal of clinical periodontology**, v. 34, n. 4, p. 299-304, 2007.

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

TOMOFUJI, T. *et al.* Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. **Free Rad Biol Med**, United States, v. 46, n. 2, p. 163-8, Jan. 2009.

VAN DER VELDEN, U.; KUZMANOVA, D.; CHAPPLE, I. L. C. Micronutritional approaches to periodontal therapy. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. s11, p. 142-158, 2011.

VARGAS-SANCHEZ, Paula Katherine et al. Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. **Journal of Applied Oral Science**, v. 25, n. 5, p. 490-497, 2017.

VILLACORTA, L.; AZZI, A.; ZINGG, J. M. Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. **Mol Aspects Med**, England, v. 28, n. 5-6, p. 507-37, 2007.

WEINBERG MA, et al. Laboratory animal models in periodontology. **J Clin Periodontol**; 26: 335-340, Jun, 1999.

WAGNER, Marcius Comparsi et al. Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats. **Brazilian dental journal**, v. 27, n. 2, p. 135-140, 2016.

ZHAO, M. *et al.* Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice. **J Food Sci**, United States, v. 80, n. 4, p. H869-74, Apr. 2015.