

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

LAURYELLEN APARECIDA PADILHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO PARAQUAT SOBRE A  
PERDA ÓSSEA ALVEOLAR. ESTUDO *IN VIVO*.

PONTA GROSSA

2018

LAURYELLEN APARECIDA PADILHA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO PARAQUAT SOBRE A  
PERDA ÓSSEA ALVEOLAR. ESTUDO *IN VIVO*.

Dissertação apresentada para obtenção do  
título de Mestre em Ciências Biomédicas na  
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área  
de Fisiopatologia do Metabolismo e do  
Sistema Imune.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre  
Franco.

PONTA GROSSA

2018

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

Padilha, Lauryellen Aparecida  
P123      Avaliação do efeito da exposição  
crônica ao Paraquat sobre a perda óssea  
alveolar: estudo in vivo/ Lauryellen  
Aparecida Padilha. Ponta Grossa, 2018.  
50f.

Dissertação (Mestrado em Ciências  
Biomédicas - Área de Concentração:  
Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade  
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Gilson Cesar  
Nobre Franco.

1.Doença Periodontal. 2.Saúde bucal.  
3.Paraquat. 4.Herbicidas. 5.Exposição  
ambiental. I.Franco, Gilson Cesar Nobre.  
II. Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Mestrado em Ciências Biomédicas. III. T.

CDD: 575.24



Universidade Estadual  
de Ponta Grossa

Programa de  
Pós Graduação  
em Ciências Biomédicas



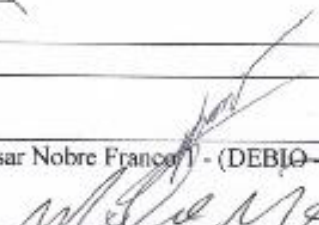
**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FISILOGIA E FISIOPATOLOGIA, NÚMERO DA ATA 07/2018, DA MESTRANDA LAURYELLEN APARECIDA PADILHA REALIZADO NO DIA 26 DE FEVEREIRO DE 2018, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.**

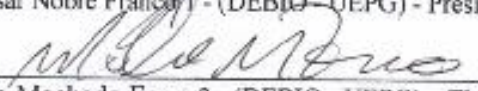
Aos vinte e seis dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 13hs30min, no Auditório de enfermagem, sala 86, bloco M, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do **Professor Dr. Gilson Cesar Nobre Franco** reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda **Lauryellen Aparecida Padilha** na linha de pesquisa; Fisiopatologia do Metabolismo e do Sistema Imune, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): **Professor Dr. Marcelo Machado Ferro (UEPG/Pr)** e **Professor Dr. Alessandro Hyczy Lisbôa (Faculdades Ponta Grossa)**. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e a candidata das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: **"AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO PARAQUAT SOBRE A PERDA ALVEOLAR. ESTUDO *IN VIVO*."** Encerrado a defesa, e após reunião, a comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como - APROVADO considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em - Ciências Biomédicas. A aluna deverá entregar, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação do programa com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

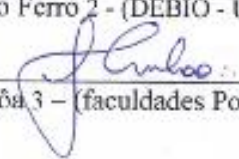
Observações (se necessário):

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título:

  
Gilson Cesar Nobre Franco 1 - (DEBIO - UEPG) - Presidente

  
Marcelo Machado Ferro 2 - (DEBIO - UEPG) - Titular

  
Alessandro Hyczy Lisbôa 3 - (faculdades Ponta Grossa) - Titular

Ponta Grossa, 23 de fevereiro de 2018.

Dedico a Deus, autor do meu destino, que me abriu à possibilidade para a melhor escolha profissional e me guiou pelos caminhos certos até chegar ao alcance dos meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, principalmente pai e mãe, que sempre com muito amor me incentivaram nesta jornada e me deram os maiores ensinamentos que eu poderia ter na vida.

Ao meu marido que sempre esteve ao meu lado, me proporcionando apoio emocional, mesmo quando o desânimo tomava conta de mim.

Ao meu professor orientador Gilson pela contribuição com seus conhecimentos, pelo incentivo em sempre superar os meus limites e pelo seu comprometimento.

Aos meus colegas do mestrado e alunos de iniciação científica (Dyenily, Leomar, Lillian, Millena e Raphael) pela amizade e colaboração na realização do desenvolvimento deste trabalho compartilhando suas experiências e estando sempre dispostos a me ajudar com o melhor para a realização do mesmo.

## RESUMO

PADILHA, Lauryellen Aparecida. **Avaliação do efeito da exposição crônica ao paraquat sobre a perda óssea alveolar.** Estudo *in vivo*. 2018. 50 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

A Doença Periodontal (DP) é uma inflamação crônica que atinge os tecidos de revestimento e suporte dos dentes, induzida pela presença de um biofilme dental. A resposta imune do hospedeiro é um fator determinante para a progressão desta doença e a produção de Espécies Reativas do Oxigênio (ROS) é um importante mecanismo causador dos danos teciduais observados. Atualmente a DP representa a maior causa da perda dos dentes nos indivíduos maiores que 40 anos e acomete cerca de 538 milhões de pessoas no mundo. Esta patogenia é influenciada por vários fatores endógenos e exógenos da vida do hospedeiro, sendo que residir em zona rural pode ser considerado um fator de risco para esta doença. Os moradores de áreas rurais possuem uma importante exposição à pesticidas utilizados na agricultura. Atualmente muito tem se estudado sobre os efeitos da exposição a pesticidas na saúde humana, e sabe-se que a exposição à determinados agrotóxicos pode representar um fator de risco, inclusive para a DP. O Paraquat, um herbicida amplamente utilizado na agricultura, tem seu principal mecanismo de ação baseado na liberação de ROS, que levam à peroxidação lipídica e o estresse oxidativo, causando danos teciduais. Deste modo, sugere-se que o Paraquat pode ter influência na maior prevalência da DP dos indivíduos moradores da zona rural. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar os efeitos da exposição crônica ao Paraquat, sobre a perda óssea alveolar (POA) induzida pelo método de ligadura em ratos. Para isso, um total de 40 ratos foram divididos em quatro grupos: Grupo Sem Ligadura / Sem Paraquat (SL/SP); Grupo Com Ligadura / Sem Paraquat (CL/SP); Grupo Sem Ligadura / Com Paraquat (SL/CP); e Grupo Com Ligadura / Com Paraquat (CL/CP). A indução da POA foi realizada através do método de ligadura durante 30 dias e a exposição ao Paraquat por gavagem intragástrica durante 60 dias na dose de 0,1mg/Kg. Os dados obtidos foram analisados através do software *GraphPad Prism* 6.0, utilizando-se o teste estatístico *two-way* ANOVA e adotando um nível de significância de 5%. Foram avaliadas a POA através da análise macroscópica, a quantidade de leucócitos totais no sangue, a quantidade de glutathione reduzida sérica e alguns parâmetros clínicos, os quais foram mobilidade dentária, edema e sangramento gengival nestes animais. Nos resultados obtidos pode-se observar que o Paraquat teve uma influência significativa sobre o aumento da quantidade de leucócitos e dos sinais clínicos avaliados, porém apresentou apenas uma tendência em diminuir os níveis de glutathione reduzida e aumentar a POA nos ratos que tiveram a indução com ligadura. Deste modo, este estudo concluiu que o Paraquat na dose de 0,1 mg/Kg não foi capaz de aumentar a POA e nem diminuir a quantidade de glutathione reduzida sérica nestes animais significativamente, mas sim de aumentar a quantidade de leucócitos no sangue e os sinais clínicos da DP avaliados.

**Palavras-chave:** Doença Periodontal. Saúde Bucal. Paraquat. Herbicidas. Exposição Ambiental.

## ABSTRACT

PADILHA, Lauryellen Aparecida. **Evaluation of effect of Paraquat chronic exposure on alveolar bone loss.** In vivo study. 2018. 50 pages. Dissertation (Masters in Biomedical Sciences) – State University of Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2018.

Periodontal disease (PD) is a chronic inflammation that affects the tissues of coating and support of the teeth, induced by the presence of a dental biofilm. The host's immune response a determinant factor for the progression of this disease and the production of reactive oxygen species (ROS) is an important mechanism causing tissue damages. Currently, this is the main cause of tooth loss in individuals over 40 years of age and affects approximately 538 million of people worldwide. This pathogenesis is influenced by several endogenous and exogenous factors in the host's life, and living in rural area can be considered a risk factor for this disease. Residents of the rural areas have significant exposure to pesticides used in agriculture. Currently, much has been studied about the exposure effects of pesticides on human health, and is known that exposure to determined pesticides may represent a risk factor, including for PD. Paraquat, herbicide widely used in agriculture, also has its main mechanism of action based on liberation of ROS, which lead to lipid peroxidation and oxidative stress, causing tissue damage. Therefore, is suggested that the Paraquat may have influence about the high prevalence of PD in individuals residents in rural areas. Thus, the present study had as main objective evaluate the effects of Paraquat chronic exposure on alveolar bone loss (POA) induced by ligature method in rats. For this, a total of 40 rats were divided into four groups: Without Ligature / Without Paraquat Group (SL / SP); Group With Ligature / Without Paraquat (CL / SP); Without Ligature / With Paraquat Group (SL / CP); and Group With Ligature / With Paraquat (CL / CP). POA induction was realized by ligature method during 30 days and Paraquat exposure via intragastric gavage with dose of 0,1 mg/Kg during 60 days. The data obtained were analyzed using GraphPad Prism 6.0 software, using the two-way ANOVA statistical test and accepting significance level of 5%. Was evaluated the POA through the macroscopic analysis, the levels total of the leukocytes in the blood, the levels of the serum reduced glutathione and clinical parameters, what were dental mobility, gingival edema and gingival bleeding in these animals. On results obtained can be indicate that the Paraquat had a significant influence on the increase of the leucocytes and of the clinical signs evaluated, but only showed a tendency to decrease the levels of reduced glutathione and to increase the POA in the rats that had induction with ligature. Wherefore, this study concluded that Paraquat at dose of 0.1 mg / kg was not able to increase POA and neither decrease the levels of serum reduced glutathione in these animals significantly, but increase the levels of the leukocytes in the blood and the clinical signs of PD.

**Keywords:** Periodontal diseases. Oral health. Paraquat. Herbicides. Environmental Exposure.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1</b> - Visão esquemática geral dos processos patogênicos na doença periodontal.....                                                                                                                                                                                           | 16 |
| <b>FIGURA 2</b> - Diagrama da relação entre periodontite e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....                                                                                                                                                                                      | 18 |
| <b>FIGURA 3</b> - Mecanismo de ação principal do Paraquat.....                                                                                                                                                                                                                           | 23 |
| <b>FIGURA 4</b> - Ilustração representativa do método de ligadura em ratos .....                                                                                                                                                                                                         | 28 |
| <b>FIGURA 5</b> - Medida linear da Perda Óssea Alveolar em ratos.....                                                                                                                                                                                                                    | 30 |
| <b>FIGURA 6</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a perda óssea alveolar (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0 .....                   | 33 |
| <b>FIGURA 7</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a contagem sérica de leucócitos (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6. ....            | 34 |
| <b>FIGURA 8</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a dosagem sérica de glutatona (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0. ....            | 35 |
| <b>FIGURA 9</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico edema gengival (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0.....        | 37 |
| <b>FIGURA 10</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico mobilidade dentária (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0.....  | 38 |
| <b>FIGURA 11</b> - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico sangramento gengival (post-hoc Tukey, $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média $\pm$ EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0..... | 39 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 1</b> - Divisão dos grupos e respectivos tratamentos utilizados para avaliação da exposição crônica ao Paraquat na perda óssea alveolar .....                                                      | 26 |
| <b>TABELA 2</b> - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a perda óssea alveolar (Two-way ANOVA).....                                                                       | 32 |
| <b>TABELA 3</b> - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a contagem sérica de leucócitos (Two-way ANOVA).....                                                              | 34 |
| <b>TABELA 4</b> - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a dosagem sérica de glutathione (Two-way ANOVA) .....                                                             | 35 |
| <b>TABELA 5</b> - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre os parâmetros edema gengival, mobilidade dentária e sangramento gengival da análise clínica (Two-way ANOVA) ..... | 36 |

## LISTA DE SIGLAS

|                               |                                                                             |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| CEUA                          | Comitê de Ética do Uso de Animal                                            |
| CL/CP                         | Grupo Com Ligadura / Com Paraquat                                           |
| CL/SP                         | Grupo Com Ligadura / Sem Paraquat                                           |
| COBEA                         | Colégio Brasileiro de Experimentação Animal                                 |
| DP                            | Doença Periodontal                                                          |
| DPOC                          | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica                                          |
| ECM                           | Matriz Extracellular                                                        |
| EP x L                        | Exposição ao Paraquat x Ligadura                                            |
| GSH                           | Glutathione Reduzida                                                        |
| GSSG                          | Glutathione Oxidada                                                         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peróxido de Hidrogênio                                                      |
| ICTP                          | Tetrapéptido Carboxiterminal Reticulado Com Piridinolina De Colágeno Tipo I |
| IL 4                          | Interleucina 4                                                              |
| IL 6                          | Interleucina 6                                                              |
| IL-1 $\beta$                  | Interleucina 1 $\beta$                                                      |
| LPS                           | Lipopolissacarídeos                                                         |
| MMPs                          | Metaloproteinases De Matriz                                                 |
| MRH                           | Moduladores da Resposta do Hospedeiro                                       |
| NADP                          | Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Oxidada                     |
| NADPH                         | Fosfato De Dinucleótido De Nicotinamida Adenina                             |
| OH $\cdot$                    | Radical Hidroxila                                                           |
| ONOO $^-$                     | Peroxinitrito                                                               |
| OPG                           | Osteoprotegina                                                              |
| PGE2                          | Prostaglandina E2                                                           |
| PMN                           | Leucócitos Polimorfonucleares                                               |
| POA                           | Perda Óssea Alveolar                                                        |
| PQ                            | Paraquat                                                                    |

|               |                                            |
|---------------|--------------------------------------------|
| RANKL         | Ligante Ativador do Receptor Nuclear Kappa |
| ROS           | Espécies Reativas de Oxigênio              |
| SH-T          | Grupos Sulfidrílicos Totais                |
| SL/CP         | Grupo Sem Ligadura / Com Paraquat          |
| SL/SP         | Grupo Sem ligadura / Sem Paraquat          |
| TIMPs         | Inibidores Das Metaloproteinases De Matriz |
| TNF           | Fator de Necrose Tumoral                   |
| TNF- $\alpha$ | Fator De Necrose Tumoral Alfa              |
| TPP           | Trabalho de Parto Prematuro                |
| UEPG          | Universidade Estadual de Ponta Grossa      |

## SUMÁRIO

|          |                                                       |           |
|----------|-------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                     | <b>12</b> |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b>                          | <b>14</b> |
| 2.1      | DOENÇA PERIODONTAL                                    | 14        |
| 2.1.1    | Definição e epidemiologia                             | 14        |
| 2.1.2    | Patogênese                                            | 15        |
| 2.1.3    | Diagnóstico da Doença Periodontal                     | 18        |
| 2.1.4    | Modalidades terapêuticas para a Doença Periodontal    | 18        |
| 2.1.5    | Fatores de risco e relação com Doenças Sistêmicas     | 19        |
| 2.1.6    | Fatores de risco para Doença Periodontal              | 21        |
| 2.2      | USO DE PESTICIDAS E SEUS IMPACTOS PARA A SAÚDE HUMANA | 22        |
| 2.2.1    | Paraquat                                              | 22        |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                      | <b>25</b> |
| 3.1      | OBJETIVO PRIMÁRIO                                     | 25        |
| 3.2      | OBJETIVOS SECUNDÁRIOS                                 | 25        |
| <b>4</b> | <b>METODOLOGIA</b>                                    | <b>26</b> |
| 4.1      | DIVISÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTOS                      | 26        |
| 4.2      | OBTENÇÃO DO PARAQUAT                                  | 27        |
| 4.3      | INDUÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR                       | 27        |
| 4.4      | AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA PERIODONTAL               | 28        |
| 4.5      | COLETA E PREPARO DO SANGUE                            | 29        |
| 4.6      | CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS NO SANGUE                     | 29        |

|                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS NO SORO .....           | 29        |
| 4.8 AVALIAÇÃO MACROSÓPICA DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR .....                   | 30        |
| 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....                                   | 30        |
| <b>5 RESULTADOS .....</b>                                                 | <b>32</b> |
| 5.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR .....                                            | 32        |
| 5.2 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO SANGUE .....                                | 33        |
| 5.3 QUANTIDADE DE GRUPOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS (GLUTATIONA<br>SÉRICA)..... | 34        |
| 5.4 PARÂMETROS CLÍNICOS .....                                             | 36        |
| <b>6 DISCUSSÕES .....</b>                                                 | <b>40</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO .....</b>                                                  | <b>45</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                  | <b>46</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal (DP) trata-se de uma inflamação de caráter crônico que atinge os tecidos de revestimento e suporte do dente, induzida pela presença de um biofilme dental (DENTINO et al., 2013). Este biofilme causa uma inflamação exacerbada no local, a qual estimula a liberação de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos, sendo este um dos mecanismos responsáveis por causar o dano tecidual nesta doença (HIROYUKI et al., 2017).

A periodontite crônica é uma condição que representa atualmente a maior causa de perda dos dentes entre os indivíduos maiores de 40 anos e estudos epidemiológicos mostram que a sua forma mais grave atinge cerca de 7,4% da população mundial, o que equivale à aproximadamente 538 milhões de pessoas (HOUSHMAND et al., 2012; KASSEBAUM et al., 2017).

A DP está relacionada à várias condições que afetam a saúde dos indivíduos, como doenças cardiovasculares (YU et al., 2015), artrite reumatóide (FARQUHARSON et al., 2012), doença pulmonar obstrutiva crônica (LEDIC et al., 2013) e trabalho de parto prematuro (HORTON; BOGGESE, 2012). Esta patogenia é influenciada por vários fatores endógenos e exógenos da vida do hospedeiro (DENTINO et al., 2013). Por exemplo, estudos sugerem que a chance dos residentes em zonas rurais apresentarem a DP é 2,1 vezes maior quando comparado aos moradores da zona urbana (ZHANG et al., 2014a).

Estudos atuais mostram que uso de agrotóxicos afetam drasticamente a saúde dos indivíduos estando relacionado com neoplasias, doenças neurodegenerativas, respiratórias e reprodutivas, por exemplo (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017). A exposição à determinados pesticidas pode representar um fator de risco, inclusive para a DP (LEE et al., 2008). O dicloreto de paraquat é um pesticida de amônio quaternário, que atua como herbicida amplamente utilizado nas áreas rurais que tem como principal mecanismo de ação a disfunção mitocondrial. Este composto é altamente tóxico, sendo o estresse oxidativo considerado o maior causador da morte celular causada por ele (BLANCO et al., 2014).

Deste modo, levanta-se a hipótese de que a doença periodontal pode ser mais prevalente na zona rural devido ao estresse oxidativo causado pela exposição

crônica dessas famílias ao Paraquat. Porém não foram encontrados artigos na literatura que correlacionam esses fatos, se tornando importante a realização de um estudo que avalie a relação entre eles.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DOENÇA PERIODONTAL

#### 2.1.1 Definição e epidemiologia

A doença periodontal é definida como uma condição inflamatória crônica que afeta os tecidos de suporte do dente, podendo levar a perda óssea alveolar e a perda do elemento dentário. Esta inflamação é resultado da resposta exacerbada do hospedeiro frente à uma infecção causada pela presença de bactérias, predominantemente Gram-negativas, formando um biofilme dental no local (VAN DYKE; SERHAN, 2003).

Esta condição patogênica pode ser dividida em dois grupos de doenças inflamatórias, sendo elas a gengivite e a periodontite. A gengivite é uma inflamação que atinge apenas o tecido gengival, enquanto que a periodontite alcança os tecidos de suporte do dente. Esta última ainda pode ser dividida como: A) agressiva quando se apresenta de uma forma aguda e de evolução rápida, ou B) crônica quando possui uma progressão lenta (SLOTS, 2013).

Uma revisão sistemática da literatura que mostra dados epidemiológicos mundiais sobre a periodontite crônica severa em 2014, abrangeu 72 artigos publicados em 37 países diferentes entre os anos de 1990 a 2010, os quais incluíram 291.170 pessoas com 15 anos ou mais. Este trabalho mostra que o Brasil está entre os seis países com maior prevalência da doença, junto com o Chile, Quênia, Indonésia, Austrália e Grécia (KASSEBAUM et al., 2014).

Este mesmo estudo indicou que a incidência da doença aumenta a partir dos 20 anos de idade, atingindo um pico perto dos 38 anos, que passa a diminuir a partir da quarta década de vida e se estabiliza a partir dos 60 anos. Enquanto isso, a sua prevalência começa a aumentar próximo aos 20 anos, sendo que atinge seu pico entre a terceira década de vida, e torna-se estável a partir dos 40 anos (KASSEBAUM et al., 2014).

Estudos mostram um perfil epidemiológico semelhante para os brasileiros. Um trabalho que avaliou 265 pacientes com doença periodontal atendidos numa clínica

de periodontia no Espírito Santo, demonstrou que a maior prevalência era da periodontite crônica, e grande parte dos pacientes (66,3%) se encontravam entre a terceira e quarta década de vida, indicando que a faixa etária é determinante no processo desta doença, visto que trata-se de um processo patogênico lento e progressivo (MEDEIROS; ROCHA, 2006).

Do mesmo modo, um estudo epidemiológico realizado por Vettore e seus colaboradores em 2013, abrangendo 4.594 pacientes de todas as regiões do Brasil, mostrou que a taxa de prevalência da doença periodontal "moderada a grave" no país é de 15,3% nos adultos entre 35 e 44 anos. O estudo abrangeu condições socioeconômicas e avaliações clínicas da saúde bucal da população, mostrando que a prevalência da doença é maior nos indivíduos do sexo masculino, negros, com menor escolaridade e menor condição socioeconômica.

### 2.1.2 Patogênese

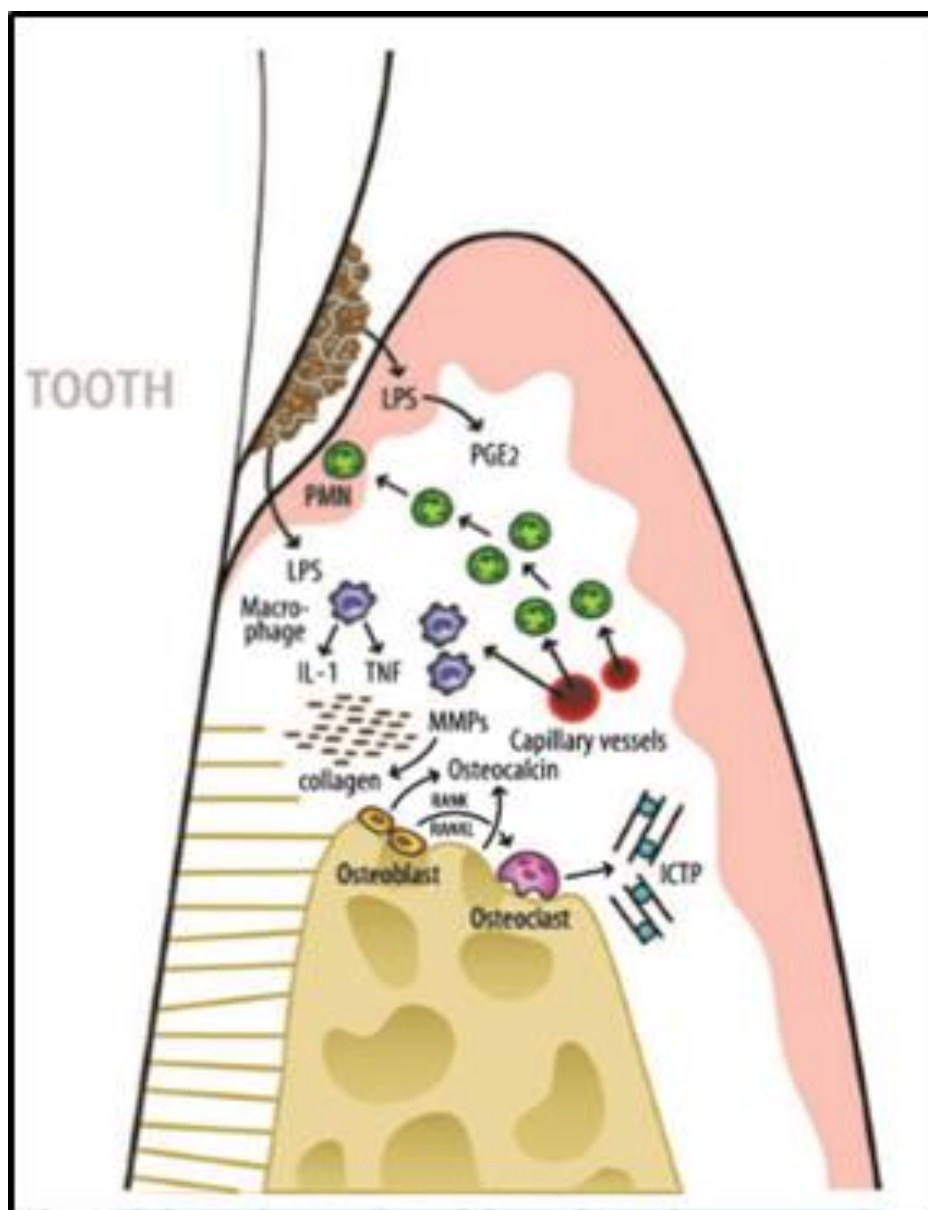
Apesar da etiologia da DP ser considerada multifatorial, a formação de um biofilme dental é essencial para o desenvolvimento da doença. Em sua maioria, este biofilme é composto por bactérias Gram-negativas e anaeróbicas, sendo que comprovadamente as espécies *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* estão presentes no mesmo. Além disso, esse estudo indica que outras espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Campylobacter rectus* também representam um fator de risco para a doença (HARVEY, 2017).

A carga bacteriana apresentada no biofilme está diretamente relacionada com a profundidade de sondagem na periodontite crônica (GATTO et al., 2014). A presença deste biofilme induz a liberação de citocinas inflamatórias pelas células do hospedeiro, que em nível elevado ativam as metaloproteinases de matriz (MMPs) e os osteoclastos causando a perda dos tecidos de suporte dos dentes e a reabsorção óssea alveolar. Esse processo resulta na formação de bolsas periodontais, o que favorece ainda mais o aumento da carga bacteriana (TAYLOR, 2010).

Como mostrado na Figura 1, as bactérias Gram-negativas presentes no biofilme dental liberam endotoxinas chamadas lipopolissacarídeos (LPS), que

estimulam a migração de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local. Deste modo, ocorre uma liberação aumentada das MMP, que são produzidas por estas células e são responsáveis pela destruição da matriz extracelular (ECM). Na DP as MMPs ficam em desequilíbrio com os Inibidores das MMPs (TIMPs), os quais em condições saudáveis conseguem inibir a sua ação, evitando a destruição das fibras de colágeno exacerbada nos tecidos de suporte dos dentes (GARLET, 2010; GIANNOBILE et al., 2009).

**FIGURA 1** - Visão esquemática geral dos processos patogênicos na doença periodontal.



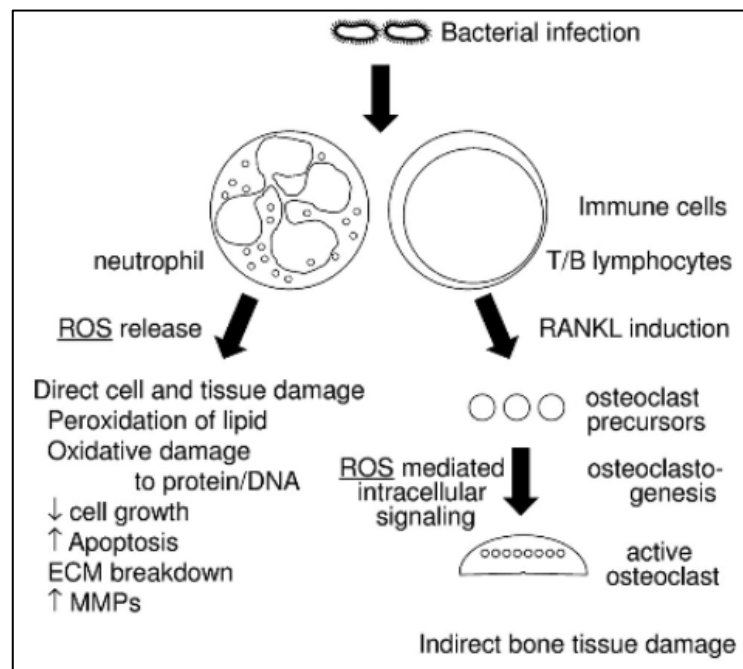
**Fonte:** GIANNOBILE, W. V. et al. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology** 2000, v. 50, p. 52–64, 2009.

Em acréscimo, ocorre a ativação de monócitos e macrófagos no local, os quais liberam prostaglandina E2 (PGE2), fatores de necrose tumoral (TNF) e interleucinas, que são citocinas inflamatórias. A PGE2 causa vasodilatação e aumenta a permeabilidade dos capilares, auxiliando no recrutamento, além de estimular ainda mais a produção das MMPs pelos PMN. Assim, alguns marcadores como o tetrapéptido carboxiterminal reticulado com piridinolina de colágeno tipo I (ICTP) são liberados no local e usados para detecção da DP (GIANNOBILE et al., 2009).

Na família de citocinas do TNF, está o ligante ativador do receptor nuclear kappa (RANKL), que tem um papel importante para a função dos osteoclastos, através da ativação da maturação completa das suas células precursoras (CHEN et al., 2014). Em condições normais, os níveis de RANKL estão em equilíbrio com a osteoprotegina (OPG), um antagonista do receptor de RANKL nos osteoclastos, mas na patogênese da DP esta balança fica desequilibrada e os níveis aumentados de RANKL em relação à OPG causam a destruição óssea (GARLET, 2010).

A produção de RANKL também pode ser estimulada pela liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que indiretamente causam a destruição óssea através deste papel como sinalizador intracelular. As ROS possuem efeito antibacteriano, sendo liberadas principalmente pelos neutrófilos e como mostrado na Figura 2, são produzidas como uma defesa do hospedeiro contra a presença de bactérias. Quando há uma formação exagerada destas substâncias, elas também causam danos teciduais e celulares no organismo, obtendo deste modo um papel importantíssimo na DP. De maneira direta atingindo as células, as ROS causam a peroxidação de lipídios, danos oxidativos à proteínas, diminuição do crescimento celular, aumento da apoptose, degradação da ECM e aumento na ativação das MMPs, assim causando a destruição celular e da matriz extracelular (HIROYUKI et al., 2017).

**FIGURA 2** – Diagrama da relação entre periodontite e Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).



**Fonte:** KANZAKI, H. et al. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 351, p. 1-8, 2017.

### 2.1.3 Diagnóstico da Doença Periodontal

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, para o diagnóstico da DP, primeiramente deve-se medir a profundidade de sondagem, definida pelo “Índice Periodontal Comunitário” que é medido através da inserção de uma sonda graduada e com ponta esférica nos “bolsões periodontais”. Deste modo, também consegue-se observar outros parâmetros relevantes que indicam o grau de inflamação no local, como a presença de sangramento nos tecidos gengivais, lesões e mobilidade dentária. Para finalizar, indivíduos com uma análise clínica indicativa de periodontite, devem fazer exames radiográficos com o objetivo de observar a extensão da perda óssea alveolar (PRESHAW, 2015).

### 2.1.4 Modalidades terapêuticas para a Doença Periodontal

O tratamento da DP baseia-se na raspagem e alisamento radicular, podendo ser associado ao uso de antimicrobianos. Além disso, pode-se utilizar “Moduladores da Resposta do Hospedeiro” (MRH) como auxiliares no tratamento dos indivíduos

que não respondem a este tratamento convencional. Os MRH controlam a resposta inflamatória do hospedeiro, para que a mesma não seja exacerbada e cause maior destruição tecidual. O único fármaco aprovado para tal uso pela “Food and Drug Administration” é a doxiciclina, na sua dose sub-antimicrobiana (20mg/2x ao dia), a qual possui o mecanismo de inativar as MMPs (DENTINO et al. 2013).

Já o tratamento cirúrgico tem o objetivo de alcançar às lesões periodontais mais profundas para corrigir os contornos ósseos e gengivais, obtendo uma formação mais adequada que favoreça a higiene bucal e proteja os tecidos periodontais (DENTINO et al., 2013). Seja cirúrgico ou não, o tratamento da DP é de importância fundamental, já que estudos mostram que tanto um quanto outro, são capazes de causar uma melhora da qualidade de vida relacionada a saúde nos indivíduos (BAIJU et al., 2017).

#### 2.1.5 Doença Periodontal e relação com Doenças Sistêmicas

Estudos demonstram que diversas doenças sistêmicas estão relacionadas à DP. A diabetes e hipertensão por exemplo, podem ser fatores prédisponentes para a DP, assim como a presença da DP também aumenta o risco associado para estas doenças. A DP pode aumentar em 14% o risco dos indivíduos maiores de 65 anos desenvolverem doenças cardiovasculares e pode aumentar 3,2 vezes a mortalidade em pacientes diabéticos (NAZIR, 2017).

O epitélio fino e ulcerado atingido na periodontite crônica severa pode ter os mesmos malefícios para a saúde do que uma ferida aberta de 72 cm<sup>2</sup>. Deste modo, mediadores inflamatórios como citocinas, prostaglandinas e produtos bacterianos presentes nas bolsas periodontais, atingem a corrente sanguínea através de processos como mastigar e escovar os dentes, devido a fragilidade do epitélio no local. A IL-1  $\beta$  induz a coagulação sanguínea e retarda a fibrinólise, já a IL-1 e o fator de necrose tumoral – alfa (TNF-  $\alpha$ ) favorecem a adesão e agregação plaquetária e induzem a deposição de colesterol nos vasos sanguíneos, explicando assim o favorecimento da aterogênese e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares relacionadas a esta doença (PAGE, 1998).

Em acréscimo, Nibali e seus colaboradores realizaram uma revisão sistemática de literatura com o estudo de 20 artigos no ano de 2013 e concluíram

que existe uma relação evidente entre a periodontite e a síndrome metabólica, a qual abrange indivíduos com dislipidemias, obesidade, hipertensão e resistência insulínica, e que podem levar ao desenvolvimento de diabetes mellitus e doenças cardiovasculares. Este estudo destaca a importância de um controle diagnóstico rigoroso para periodontite nestes pacientes, mesmo que o mecanismo desta relação ainda não tenha sido bem elucidado.

Além disso, existe uma clara relação entre a DP e a obesidade ou sobrepeso. Apesar do mecanismo desta relação ainda não ser bem esclarecido, estudos indicam que a inflamação crônica e o estresse oxidativo nos tecidos periodontais podem favorecer o desenvolvimento de uma resistência insulínica, levando assim a obesidade. Deste modo, como indicado neste artigo, o tratamento não cirúrgico da DP pode diminuir os níveis séricos do TNF-  $\alpha$  e a resistência insulínica nos obesos. Por outro lado, o estudo também indica que a obesidade influencia na DP, porém seus mecanismos ainda não são conhecidos (MARTINEZ et al., 2017).

Dentre outras doenças, a periodontite pode também estar relacionada com o trabalho de parto prematuro (TPP), desta maneira levando à prematuridade e baixo peso ao nascer. Uma revisão sistemática da literatura que incluiu 10 artigos abrangendo 2.423 mulheres, concluiu que as gestantes que possuem a DP apresentam um alto risco de terem filhos prematuros e com baixo peso ao nascer. Isto acontece porquê a inflamação e infecção presente na periodontite podem atingir a corrente sanguínea e se disseminar até o útero, estimulando o TPP. De outro modo, a resposta inflamatória sofre alterações durante a gestação devido ao aumento da progesterona e estrogênio, assim as gestantes possuem uma maior suscetibilidade de desenvolver a DP (TESHOME; YITAYEH, 2016).

Nos dias atuais, muito tem se estudado sobre a DP como fator de risco também para a artrite reumatóide. Existem indícios de que a perda do elemento dentário é maior naqueles indivíduos que possuem artrite reumatóide associada, bem como o tratamento da DP favorece a diminuição dos sintomas da artrite. Mesmo havendo necessidade de mais estudos sobre o tema, há indícios de que a presença de anticorpos da bactéria *P. Gingivalis* em ambas as doenças e o aumento

de algumas citocinas inflamatórias como a IL-1 $\beta$  podem estar relacionados com esta associação (KAUR et al., 2013).

E para finalizar, alguns estudos também demonstram a ligação da DP com a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), sendo que a DP pode aumentar em até 2,08 vezes o risco para um indivíduo desenvolver a DPOC. Isso acontece porque o biofilme dental pode alojar agentes patogênicos respiratórios, que através de uma broncoaspiração causam infecções pulmonares repetitivas. Desta maneira, Zeng e seus colaboradores apontam que a escovação efetiva dos dentes, o uso de fio dental e controle da DP podem diminuir os sintomas da DPOC, tornando de extrema importância o trabalho multidisciplinar da equipe de saúde (ZENG et al., 2012).

#### 2.1.6 Fatores de risco para Doença Periodontal

Devido a ligação da DP com a resposta inflamatória do hospedeiro, estudos indicam que determinados polimorfismos genéticos na regulação de citocinas inflamatórias podem representar um fator de suscetibilidade para o hospedeiro desenvolver esta doença. Um estudo realizado que revisou 8 artigos publicados até o ano de 2015, conclui que o polimorfismo da IL-1 $\beta$  representa um fator de risco para a doença (WANG et al., 2017a). Em acréscimo, outros estudos mostraram que o polimorfismo da interleucina 6 (IL-6) e da interleucina 4 (IL-4) também representam tais fatores de risco (ZHU et al., 2016; JIA et al., 2017).

Além da pré-disposição genética, a DP possui vários fatores de risco relacionados à vida do hospedeiro, sendo eles endógenos e exógenos. Alguns deles são: tabagismo, má higiene bucal, stresse, idade e uso de determinadas medicações (NAZIR, 2017). Um trabalho realizado na China teve como objetivo principal determinar a prevalência e os preditores da periodontite crônica severa neste país, através da associação desta doença com dados sociodemográficos, como nível de escolaridade, renda, sexo e idade. Neste artigo concluiu-se que a escolaridade baixa (menor que 6 anos), sexo masculino e diabetes são fatores de risco elevados para a periodontite crônica severa. Mesmo que o motivo para tal ainda não seja totalmente esclarecido, este mesmo estudo sugere que os moradores de zonas rurais possuem 2,1 vezes maior chance de desenvolverem a DP do que os moradores de zona urbana (ZHANG et al., 2014a).

Lee e seus colaboradores (2008) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar o efeito da exposição a poluentes orgânicos, que são utilizados amplamente nas áreas rurais, na DP com a população em geral. Este estudo abrangeu 1.234 indivíduos e concluiu que a exposição à determinados pesticidas está relacionada com o desenvolvimento da DP, podendo representar um risco aumentado para esta condição patogênica.

## 2.2 USO DE PESTICIDAS E SEUS IMPACTOS PARA A SAÚDE HUMANA

Os pesticidas são um grupo de substâncias amplamente utilizadas em todo mundo, que trazem benefícios para agricultura e indústria através do controle de pragas e doenças infecciosas. Todavia, esses compostos químicos tem ganhado importância nos artigos científicos devido a possível associação da sua exposição crônica e o aparecimento de doenças nos humanos como obesidade, diabetes, infertilidade, asma, bronquite, déficit de atenção e hiperatividade, anomalias congênitas, Alzheimer, Parkinson e diversos tipos de câncer (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017).

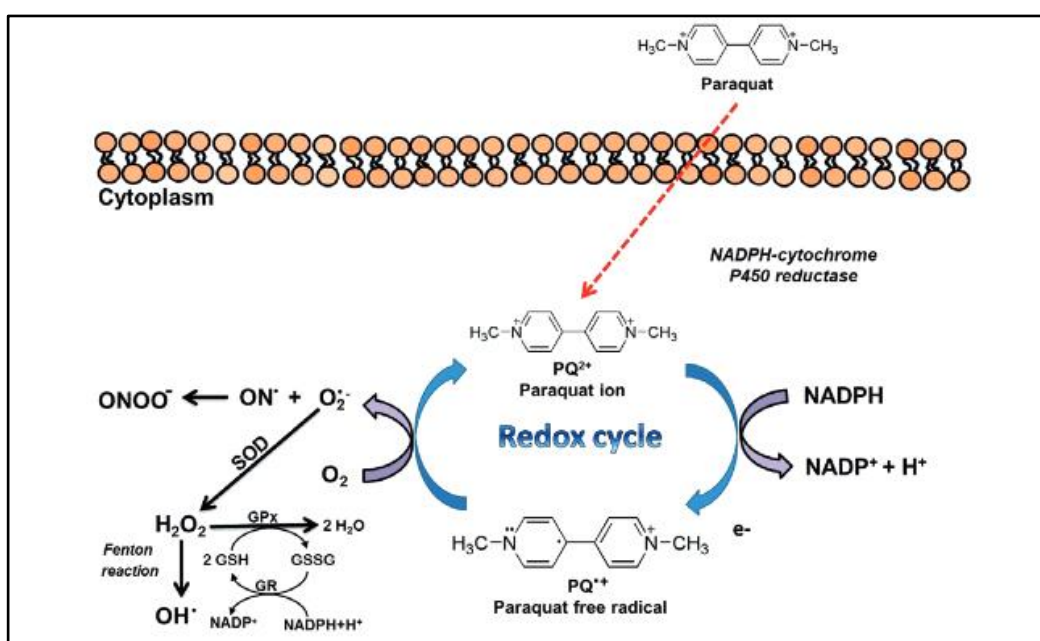
Conforme indicado na literatura, indivíduos que pertencem às famílias de agricultores possuem uma maior exposição aos pesticidas do que os que não estão inseridos nestas famílias e deste modo apresentam maior risco de desenvolverem problemas de saúde relacionados ao uso dos mesmos. Além disso, o estudo relata que a falta de higiene das mãos e o consumo de alimentos sem a lavagem adequada resultam na ingestão de grande quantidade de agrotóxicos, principalmente para as crianças dessas famílias, tornando importante a criação de estratégias para diminuir esta exposição (HYLAND; LARIBI, 2017).

### 2.2.1 Paraquat

O dicloreto de Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto) é um pesticida, que atua como herbicida, o qual possui ação rápida e não seletiva, amplamente utilizado na agricultura e que causa danos teciduais nas plantas verdes. Como mostrado na figura 3, seu mecanismo de ação principal está na sua atuação como inibidor da transformação do fosfato dinucleótido de nicotinamida adenina oxidada (NADP) em fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH), durante a fotossíntese. Em vez disso, o íon Paraquat (PQ) é reduzido na sua forma mono

cátion, o qual reage com moléculas de oxigênio e libera radicais livres na célula, como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ). Os radicais livres (ou ROS) por sua vez levam a peroxidação lipídica, que contribui para o estresse oxidativo, diminuição da glutathiona reduzida (GSH) e do NADPH, assim causando a morte celular (BLANCO et al., 2014).

**FIGURA 3** – Mecanismo de ação principal do Paraquat.



**Fonte:** BLANCO, A. T.; ANDÉRICA, R. A. C.; PEDRAZA, C. J. New insights into antioxidante strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res.*, v. 48, n. 6, p. 623-640, 2014.

**Legenda:** NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate;  $\text{PQ}^{2+}$ : paraquat ion; PQ: paraquat free radical; GPx: glutathione peroxidase; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione; GSSG: glutathione disulfide; SOD: superoxide dismutase;  $\text{ON}^\cdot$ : nitric oxide.

Em acréscimo, as ROS também ativam o  $\text{TNF-}\alpha$ , que induz a transcrição de citocinas e quimiocinas, aumentando ainda mais a inflamação. Devido a todos os efeitos intracelulares, a intoxicação pelo Paraquat pode levar a danos teciduais em vários órgãos, entre eles, os pulmões e rins, tornando-se um grande problema de saúde pública. Estudos mostram que uma pequena ingestão acumulativa do produto causa danos principalmente nos pulmões e que a sua toxicidade possui uma elevada taxa de mortalidade após tentativa de suicídio com a ingestão de grande

quantidade desta substância, visto que poucos tratamentos efetivos são encontrados (GAWARAMMANA; BUCKLEY, 2011).

A injúria pulmonar causada pela ingestão oral do Paraquat causa fibrose nos tecidos do pulmão, levando à uma depressão respiratória e resultando na falência de múltiplos órgãos e morte em 90% dos casos. Conforme a revisão de literatura realizada por Sun e Chen em 2016, a dose letal é de aproximadamente 1-3g do produto e os mecanismos que levam a lesão ainda não são bem esclarecidos, mas acredita-se que a destruição das células alveolares e ruptura dos capilares pulmonares favorecem o aparecimento de infecções e hemorragia, o que causa a fibrose na matriz extra-celular do alvéolo podendo ocorrer até 2 semanas após a ingestão (SUN; CHEN, 2016). A intoxicação pelo Paraquat também leva a uma lesão renal aguda em 46,4% dos casos, que algumas vezes precisam inclusive de hemodiálise (CHENG et al., 2017).

Além destas, fortes evidências científicas mostram que a exposição crônica ao Paraquat está diretamente relacionada com problemas neurodegenerativos como a doença de parkinson. Este assunto tem sido muito estudado nos dias de hoje e uma revisão sistemática de literatura, realizada através da pesquisa em 5 bases de dados que abrangeu artigos desde o ano de 1966, concluiu que a neurotoxicidade do Paraquat é claramente conhecida e que este produto é um fator de risco para o desenvolvimento da doença (VACCARI et al., 2017). Cheng e seus colaboradores indicam que em Taiwan a exposição crônica ao Paraquat contribui com 21% a 24% da taxa de prevalência para a doença de Parkinson, entre os indivíduos maiores que 70 anos, indicando assim a importância do controle de uso deste herbicida (CHENG et al., 2017).

Visto todos os malefícios que o Paraquat traz para a saúde humana pelo seu principal mecanismo de ação que está relacionado com a produção de ROS, que os indivíduos da zona rural possuem maior prevalência da DP e a exposição aos pesticidas podem representar um fator de risco para tal doença, propõem-se a hipótese de que este herbicida atue como um fator amplificador da doença periodontal nas famílias expostas ao seu uso. Não foram encontrados artigos que tenham verificado o efeito da exposição crônica do Paraquat na doença periodontal, tornando-se necessários estudos sobre esse tema.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRIMÁRIO**

O objetivo primário do presente estudo foi avaliar os efeitos da exposição crônica ao Paraquat sobre a perda óssea alveolar induzida pelo método de ligadura em ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS**

Os objetivos secundários deste estudo foram avaliar a influência da exposição crônica ao Paraquat associada à perda óssea alveolar:

- nos sinais clínicos da doença periodontal, sendo eles mobilidade dentária, edema e sangramento gengivais;
- nos níveis de glutathione reduzida sérica;
- e na quantidade de leucócitos totais circulantes na corrente sanguínea dos animais.

## 4 METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa experimental de abordagem quantitativa, a qual foi aprovada pelo Comitê de Ética do Uso de Animal (CEUA) da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) sob o parecer CEUA 009/2017. Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus albinus* (Wistar machos), provenientes do biotério da UEPG (Ponta Grossa/Paraná – Brasil), com idade de aproximadamente 6 a 8 semanas e peso inicial entre 250 e 300g. A manipulação dos animais seguiu o recomendado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e a lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Os animais foram tratados com ração balanceada e água *ad libitum*. A sala foi mantida com temperatura de 25°C e sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas.

### 4.1 DIVISÃO DOS GRUPOS E TRATAMENTOS

Um total de 40 animais foram randomicamente divididos em quatro grupos de 10 animais cada, como mostrado na tabela 1, sendo eles: Grupo Sem Ligadura / Sem Paraquat (SL/SP) que não teve indução da Perda Óssea Alveolar e nem exposição ao Paraquat; Grupo Com Ligadura / Sem Paraquat (CL/SP) que teve a indução da POA através da ligadura, mas não recebeu gavagem com Paraquat; Grupo Sem Ligadura / Com Paraquat (SL/CP), o qual não teve a indução da POA, mas recebeu Paraquat por gavagem intragástrica na dose de 0,1mg/Kg diariamente; e Grupo Com Ligadura / Com Paraquat (CL/CP) que teve a indução da POA através da ligadura e também recebeu Paraquat por gavagem intragástrica na dose de 0,1mg/Kg diariamente.

**TABELA 1** – Divisão dos grupos e respectivos tratamentos utilizados para avaliação da exposição crônica ao Paraquat na perda óssea alveolar.

| Grupos (n=10)                     | Ligadura | Paraquat | Água |
|-----------------------------------|----------|----------|------|
| Grupo Sem Ligadura / Sem Paraquat | Não      | Não      | Sim  |
| Grupo Com Ligadura / Sem Paraquat | Sim      | Não      | Sim  |
| Grupo Sem Ligadura / Com Paraquat | Não      | Sim      | Não  |
| Grupo Com Ligadura / Com Paraquat | Sim      | Sim      | Não  |

**Fonte:** a autora, 2018.

As gavagens foram realizadas diariamente, no mesmo período, durante 60 dias, para todos os animais. Aqueles que não foram expostos ao Paraquat, receberam a gavagem intragástrica com água, para simular o estresse gerado pelo procedimento nos animais e diminuir o viés da pesquisa. Além disso, as ligaduras foram realizadas após 30 dias de gavagem e permaneceram nos 30 dias seguintes, até completar os 60 dias para todos os animais.

O cálculo amostral para a determinação do número de animais foi baseado na média e desvio padrão de uma análise macroscópica para perda óssea alveolar de dados não publicados provenientes do próprio grupo de pesquisa. Com base nestes dados, assumindo como diferença significativa uma alteração na perda óssea alveolar de 15%, um poder estatístico de 80%, um nível de significância de 5% e utilizando o Software GPower 3.1 ([http://www.3rs-reduction.co.uk/html/6\\_\\_power\\_and\\_sample\\_size.html](http://www.3rs-reduction.co.uk/html/6__power_and_sample_size.html)) para o cálculo, foi obtido uma amostra mínima de 9 animais por grupo. Deste modo, considerando possíveis perdas, foram utilizados 10 animais em cada grupo.

#### 4.2 OBTENÇÃO DO PARAQUAT

Para a realização da gavagem intragástrica nos animais foi utilizado o Paraquat da marca Syngenta®, que possui a concentração de 200g de Paraquat por litro. Para obter a dose desejada na gavagem em cada grupo, o produto foi diluído em água diariamente antes de cada procedimento.

#### 4.3 INDUÇÃO DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Para a indução da POA foi inserido um fio de algodão no espaço interproximal, ao nível do sulco gengival dos dois primeiros molares inferiores de cada animal, como ilustrado na figura 4. Esta técnica gera a retenção mecânica e acúmulo de bactérias no fio de algodão, simulando a formação do biofilme da DP (OZ; PULEO, 2011). Para isso, os ratos foram anestesiados através de uma solução com 90 mg/Kg de quetamina (anestésico) e 10 mg/Kg de xilazina (relaxante muscular), via intraperitoneal. Duas pessoas devidamente treinadas realizaram a inserção da ligadura nos animais, seguindo um padrão de qualidade. E para o sacrifício e retirada das amostras do tecido gengival, sangue e hemimandíbulas, os animais receberam uma sobredose anestésica, seguida do deslocamento cervical.

**FIGURA 4** - Ilustração representativa do método de ligadura em ratos.



**Fonte:** adaptado de VARGAS-SANCHEZ, P.K. et al., Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *J Appl Oral Sci.*, v. 25, n. 5, p. 490-497, 2017.

#### 4.4 AVALIAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA PERIODONTAL

Para análise clínica, os animais foram avaliados macroscopicamente por um único examinador devidamente treinado alguns minutos antes do sacrifício, sob efeito da anestesia, de acordo com alguns parâmetros pré-estabelecidos, que foram: 1) presença de edema gengival; 2) sangramento gengival após o toque com uma sonda de ponta esférica; e 3) mobilidade dentária. Para cada medida foi estabelecido um *score* de 0 a 5, sendo que 0 correspondeu a ausência dos parâmetros indicados, 1 indicou sua presença discreta, 2 a presença levemente moderada, 3 a presença moderada, 4 a presença intensa e 5 a presença muito intensa do determinado sinal. Para esta análise foram utilizados os primeiros molares de cada animal, após retirada da ligadura quando necessário. Todos os animais tiveram os primeiros molares inferiores direito e esquerdo avaliados, deste modo, o dado utilizado para a análise estatística foi a média entre esses dois *scores*. E ainda, para avaliar o edema gengival três medidas foram realizadas, sendo elas as da face lingual, vestibular e mesial do mesmo, sendo que para a análise estatística foi utilizada a média destes três *scores* obtidos em cada lado (RODINI, 2008).

#### 4.5 COLETA E PREPARO DO SANGUE

Para coleta do sangue, foi realizada a abertura do hemitórax de cada rato sob o efeito da anestesia, seguida por punção cardíaca. Para realização do leucograma, cada mililitro de sangue foi armazenado com 40 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) de anticoagulante. Já para quantificação dos grupos sulfidrílicos totais não foi utilizado anticoagulante e as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos para separação do soro, que foi utilizado para as análises.

#### 4.6 CONTAGEM DOS LEUCÓCITOS TOTAIS NO SANGUE

A contagem do número de leucócitos na amostra de sangue obtida através da punção cardíaca foi realizada no Laboratório Escola da UEPG, utilizando-se o contador hematológico Hemacounter 60-RT 7600<sup>®</sup> (*Hemogram*, Brasil), que utiliza o princípio da impedância elétrica para avaliação quantitativa das células. Um segundo método, sendo este qualitativo, foi utilizado para avaliar o tamanho e formato dos leucócitos, através da realização de um esfregaço sanguíneo de cada amostra. Após secarem, os esfregaços foram corados pelo método de *May Grunwald – Giemsa*, para a qual foram utilizados os dois corantes da marca Bioclin<sup>®</sup>. Após a coloração, as leituras das lâminas foram realizadas através da microscopia óptica utilizando a objetiva no aumento de 100x e óleo de cedro para imersão.

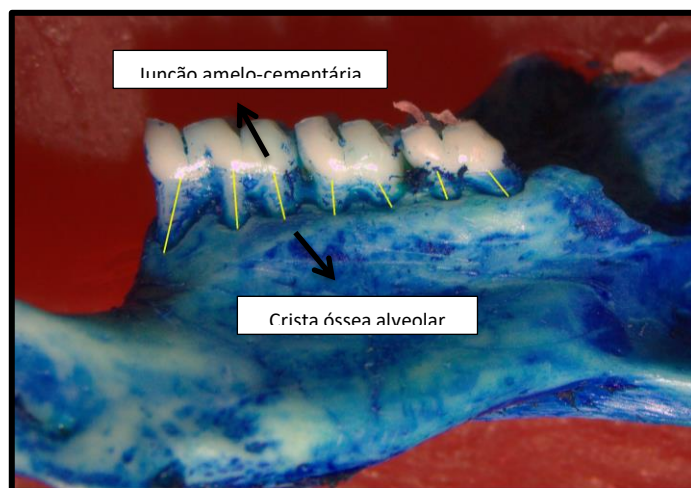
#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DOS GRUPOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS NO SORO

Para quantificação dos grupos sulfidrílicos totais (SH-T), que se refere a quantidade de glutatona reduzida no sangue, foi utilizado 50  $\mu\text{L}$  do soro de cada rato com a adição de 625  $\mu\text{L}$  de solução tampão TRIS/HCL (0,1 M pH 8,2) e 25  $\mu\text{L}$  de DTNB (*5,5"-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)* - 0,124 mM). Esta solução foi agitada, incubada ao abrigo da luz por 15 minutos e posteriormente lida em triplicata no espectrofotômetro, adotando um comprimento de onda  $\lambda = 412 \text{ nm}$  (nanômetros). Os resultados obtidos foram comparados com a "curva padrão" realizada juntamente com o experimento através do uso da glutatona reduzida, e os dados expressos em micromol de SH-T por mililitro de soro ( $\mu\text{mol SH-T/ml soro}$ ) (ELLMAN, 1959).

#### 4.8 AVALIAÇÃO MACROSÓPICA DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

A avaliação da perda óssea alveolar foi realizada através da análise macroscópica das hemimandíbulas, que para isso foram primeiramente fervidas por aproximadamente 30 minutos e deixadas em água oxigenada 10 volumes por 24 horas para que permanecesse intacto apenas o tecido ósseo e os demais fossem retirados das mesmas. Após a limpeza utilizando o auxílio de gaze e sonda, as hemimandíbulas foram coradas com azul de metileno 1% para marcação da junção amelo-cementária e por fim foram digitalizadas utilizando uma lupa estereoscópica com aumento de 20x. Para a obtenção das imagens, as hemimandíbulas foram posicionadas com a face lingual para cima e o maior paralelismo possível entre as cúspides e raízes linguais e vestibulares de cada dente, através do auxílio de uma cera utilidade. Para a mensuração da POA foi realizada a medida linear entre a junção amelo-cementária e a crista óssea alveolar de cada raiz dos três molares inferiores, utilizando o software ImageJ 5.0, como mostrado na figura abaixo (VARGAS-SANCHEZ et al., 2017).

**FIGURA 5** - Medida linear da Perda Óssea Alveolar em ratos.



**Fonte:** a autora, 2018.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do *software GraphPad Prism 6.0*, adotando um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Para determinação do melhor teste estatístico, os dados foram submetidos ao teste de normalidade Lilliefors que avaliou a distribuição dos mesmos através do *software*

*Bioestat 5.0*. Para análise das variáveis paramétricas, foi aplicado o teste *two-way ANOVA* para determinar o efeito da exposição aos fatores independentes: 1) “Exposição ao Paraquat” e 2) “Ligadura”, sobre as seguintes variáveis dependentes: perda óssea alveolar, contagem de leucócitos, dosagem de glutathione e avaliação clínica. Quando se obteve significância estatística, o teste *post hoc Tukey* foi empregado para as comparações múltiplas entre os diferentes grupos. Para análise estatística dos *scores* obtidos na avaliação clínica, que são dados não-paramétricos, estes foram substituídos pela raiz quadrada, mas para melhor interpretação dos resultados, serão apresentados os dados reais no presente estudo.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

A avaliação (*two-way ANOVA*) do efeito de cada fator sobre a POA revelou que o fator “Ligadura” foi responsável por 61,72% ( $p < 0,0001$ ) do total da variância observada no experimento, enquanto o fator “Exposição ao Paraquat”, de forma isolada, não exerceu efeito sobre esta variável ( $p = 0,7583$ ). A análise do efeito da interação entre os fatores (Exposição ao Paraquat x Ligadura – EP x L) demonstrou um efeito significativo sobre a POA (5,766%,  $p = 0,0159$ ) conforme mostrado na tabela 2.

**TABELA 2** - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a perda óssea alveolar (*Two-way ANOVA*).

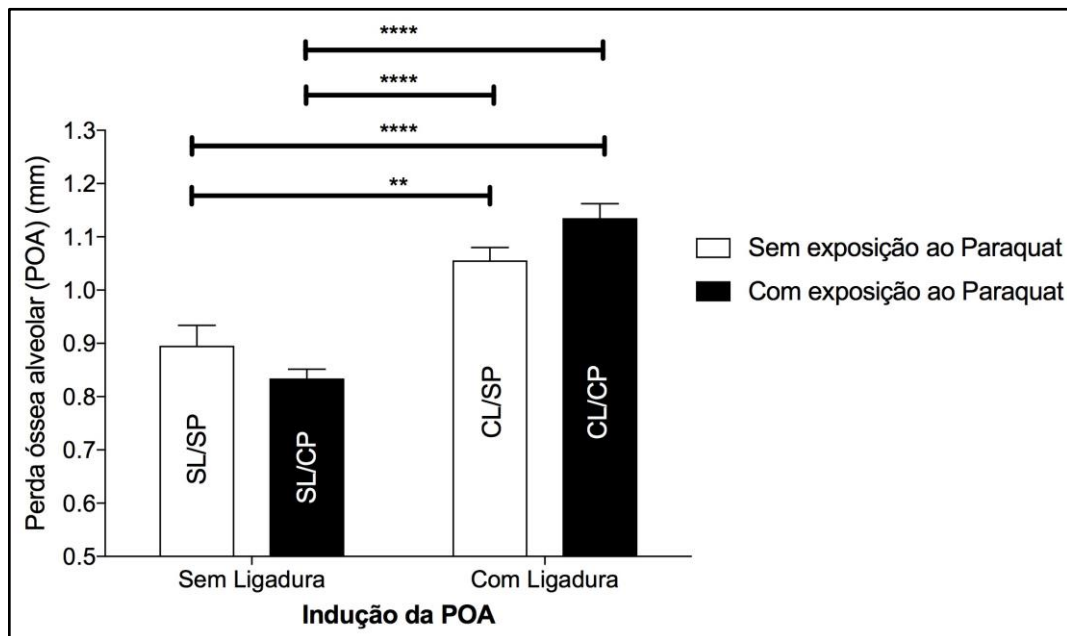
| Fonte de variação     | GL | SQ       | QM       | F      | % VT    | P       |
|-----------------------|----|----------|----------|--------|---------|---------|
| Exposição ao Paraquat | 1  | 0.000747 | 0.000747 | 0,0917 | 0,08663 | 0,7583  |
| Ligadura              | 1  | 0.5319   | 0.5319   | 68,51  | 61,72   | <0,0001 |
| Interação (EP x L)    | 1  | 0.04969  | 0.04969  | 6,401  | 5,766   | 0,0159  |
| Resíduo               | 36 | 0.2795   | 0.007763 |        |         |         |
| Total                 | 39 | 0.8617   |          |        |         |         |

**Legenda:** GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; F: Valor estatístico; % VT: Porcentagem da variação total; p: valor de significância.

**Fonte:** a autora, 2018.

Conforme mostrado na figura 6, a avaliação inter-grupos (*post hoc Tukey*) revelou diferenças significativas entre: SL/SP x CL/SP, SL/SP x CL/CP, com aumento da perda óssea alveolar para os grupos contendo ligadura.

**FIGURA 6** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a perda óssea alveolar (*post-hoc Tukey*,  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo). *Software GraphPad Prism 6.0*.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

## 5.2 CONTAGEM DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

Em relação a contagem de leucócitos totais no sangue, observou-se um importante efeito significativo do fator “Exposição ao Paraquat” (31,22%,  $p=0,0002$ ) como mostrado na tabela 3. Já as comparações múltiplas indicaram uma diferença estatística entre os grupos CL/SP x CL/CP, representada por um aumento de leucócitos séricos no grupo exposto ao paraquat (Figura 7).

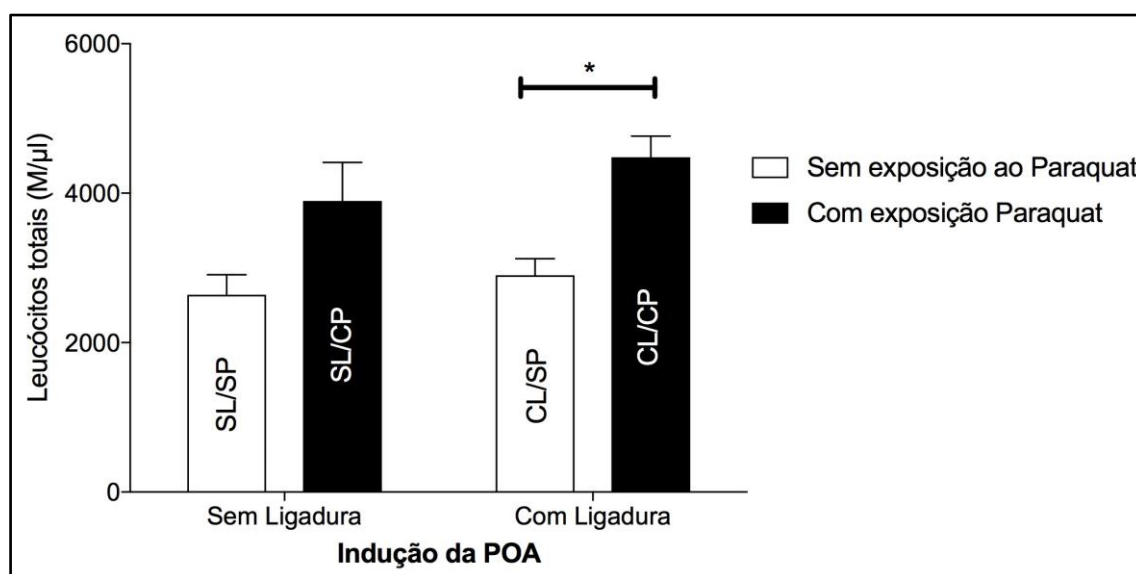
**TABELA 3** - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a contagem sérica de leucócitos (*Two-way ANOVA*).

| Fonte de variação     | GL | SQ      | QM      | F      | % VT   | P      |
|-----------------------|----|---------|---------|--------|--------|--------|
| Exposição ao Paraquat | 1  | 2003357 | 2003357 | 17,14  | 31,22  | 0,0002 |
| Ligadura              | 1  | 1792676 | 1792676 | 1,533  | 2,793  | 0,2236 |
| Interação (EP x L)    | 1  | 261146  | 261146  | 0,2234 | 0,4069 | 0,6393 |
| Resíduo               | 36 | 4208571 | 1169047 |        |        |        |
| Total                 | 39 | 8265750 |         |        |        |        |

**Legenda:** GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; F: Valor estatístico; % VT: Porcentagem da variação total; p: valor de significância.

**Fonte:** a autora, 2018.

**FIGURA 7** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a contagem sérica de leucócitos (*post-hoc Tukey*,  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo). *Software GraphPad Prism 6.0*.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos ( $*p \leq 0,05$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

### 5.3 QUANTIDADE DE GRUPOS SULFIDRÍLICOS TOTAIS (GLUTATIONA SÉRICA)

Os níveis de glutathiona sérica foram afetados pelo fator “Ligadura” (31,74%,  $p=0,0002$ ), porém não foram observados efeitos do fator “exposição ao paraquat” e da interação (EP x L) sobre as concentrações de glutathiona (Tabela 4). Diferenças

estatísticas, com redução das concentrações séricas de glutathiona, foram observadas nos grupos SL/SP x CL/CP, CL/SP x SL/SP e CL/CP x SL/CP (Figura 8).

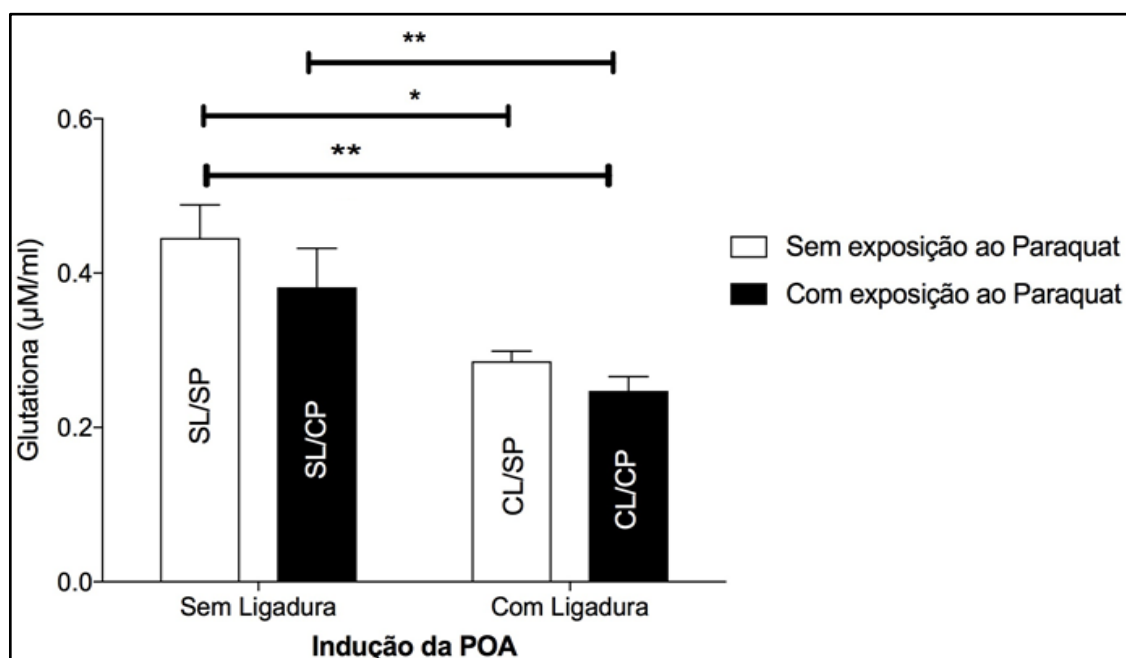
**TABELA 4** - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre a dosagem sérica de glutathiona reduzida (*Two-way ANOVA*).

| Fonte de variação     | GL | SQ       | QM       | F      | % VT   | p      |
|-----------------------|----|----------|----------|--------|--------|--------|
| Exposição ao Paraquat | 1  | 0.0262   | 0.0262   | 2,154  | 0,2401 | 0,7158 |
| Ligadura              | 1  | 0.2166   | 0.2166   | 17,81  | 31,74  | 0,0002 |
| Interação (EP x L)    | 1  | 0.001638 | 0.001638 | 0,1347 | 0,2401 | 0,1509 |
| Resíduo               | 36 | 0.438    | 0.01217  |        |        |        |
| Total                 | 39 | 0.6825   |          |        |        |        |

**Legenda:** GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; F: Valor estatístico; % VT: Porcentagem da variação total; p: valor de significância.

**Fonte:** a autora, 2018.

**FIGURA 8** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre a dosagem sérica de glutathiona reduzida (*post-hoc Tukey*,  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo). *Software GraphPad Prism 6.0*.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

#### 5.4 PARÂMETROS CLÍNICOS

Em todos os parâmetros clínicos observados, os fatores “Exposição ao Paraquat” (edema gengival 21,25%, mobilidade dentária 11,82% e sangramento gengival 17,09%) e “Ligadura” (edema gengival 69,69%, mobilidade dentária 76,53% e sangramento gengival 72,12%) exerceram uma influência nos resultados ( $p < 0,0001$ ). Apenas o parâmetro sangramento gengival não teve a influência da interação entre os dois (EP x L), sendo que o edema gengival (4,956%,  $p < 0,0001$ ) e mobilidade dentária (3,920%,  $p = 0,0001$ ) sofreram esta influência (tabela 5).

**TABELA 5** - Avaliação do efeito da exposição ao paraquat, ligadura e interação sobre os parâmetros edema gengival, mobilidade dentária e sangramento gengival da análise clínica (*Two-way ANOVA*).

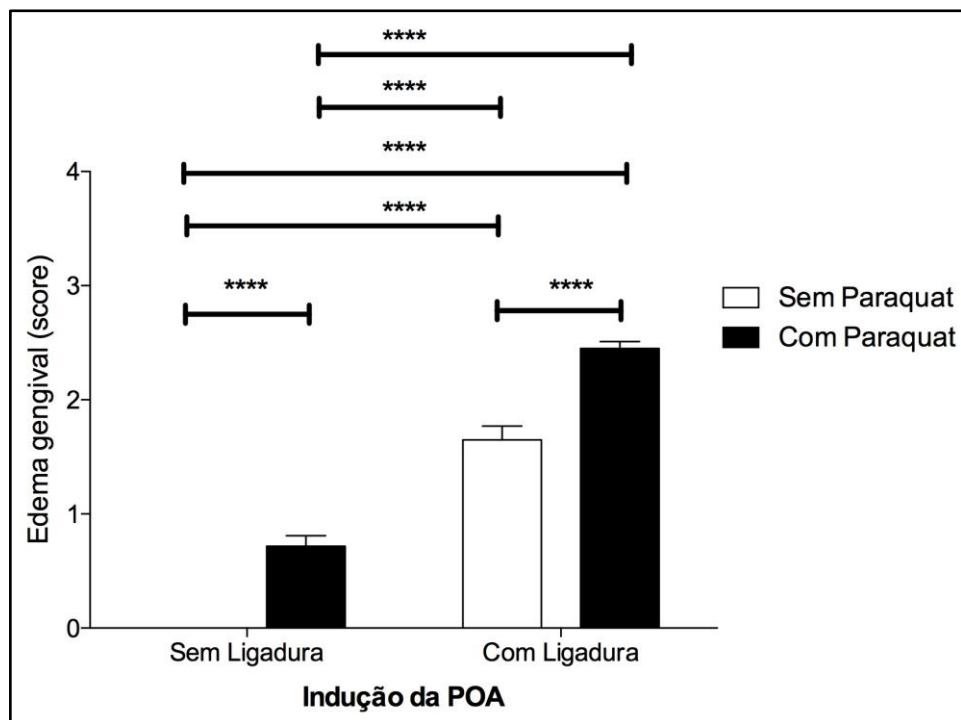
| Fonte de variação           | GL | SQ      | QM      | F     | % VT   | P       |
|-----------------------------|----|---------|---------|-------|--------|---------|
| <b>Edema gengival</b>       |    |         |         |       |        |         |
| Exposição ao Paraquat       | 1  | 3.096   | 3.096   | 186,3 | 21,25  | <0,0001 |
| Ligadura                    | 1  | 10.16   | 10,16   | 611,1 | 69,69  | <0,0001 |
| Interação (EP x L)          | 1  | 0,7221  | 0,7221  | 43,46 | 4,956  | <0,0001 |
| Resíduo                     | 36 | 0,5982  | 0,01662 |       |        |         |
| Total                       | 39 | 14,5763 |         |       |        |         |
| <b>Mobilidade dentária</b>  |    |         |         |       |        |         |
| Exposição ao Paraquat       | 1  | 3,241   | 3,241   | 55,03 | 11,82  | <0,0001 |
| Ligadura                    | 1  | 20,99   | 20,99   | 356,4 | 76,53  | <0,0001 |
| Interação (EP x L)          | 1  | 1,075   | 1,075   | 18,25 | 3,920  | 0,0001  |
| Resíduo                     | 36 | 2,120   | 0,05890 |       |        |         |
| Total                       | 39 | 27,426  |         |       |        |         |
| <b>Sangramento gengival</b> |    |         |         |       |        |         |
| Exposição ao Paraquat       | 1  | 4,703   | 4,703   | 59,69 | 17,09  | <0,0001 |
| Ligadura                    | 1  | 19,85   | 19,85   | 251,9 | 72,12  | <0,0001 |
| Interação (EP x L)          | 1  | 0,1324  | 0,1324  | 1,680 | 0,4811 | 0,2031  |
| Resíduo                     | 36 | 2,836   | 0,07878 |       |        |         |
| Total                       | 39 | 27,5244 |         |       |        |         |

**Legenda:** GL: Graus de liberdade; SQ: Soma dos quadrados; QM: Quadrado médio; F: Valor estatístico; % VT: Porcentagem da variação total; p: valor de significância.

**Fonte:** a autora, 2018.

Em relação as comparações múltiplas (*post-hoc Tukey*), os parâmetros edema gengival (Figura 9) e sangramento gengival (Figura 11) mostraram diferenças significativas entre todos os grupos. Já para o parâmetro mobilidade dentária observou-se diferença entre os grupos com e sem ligadura, e também entre os grupos CL/SP x CL/CP.

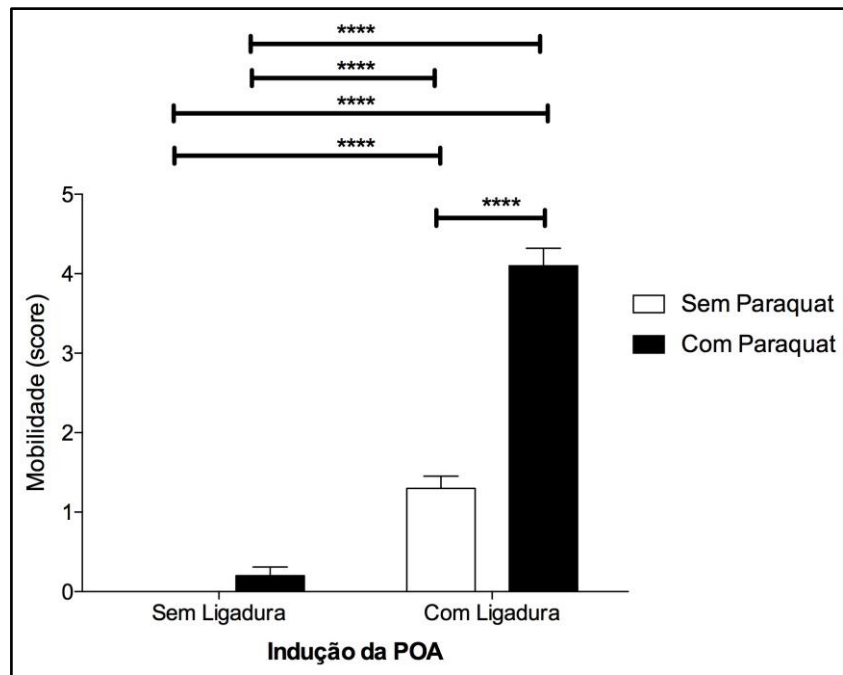
**FIGURA 9** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico edema gengival (*post-hoc Tukey*,  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM (n=10 animais/grupo). Software GraphPad Prism 6.0.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

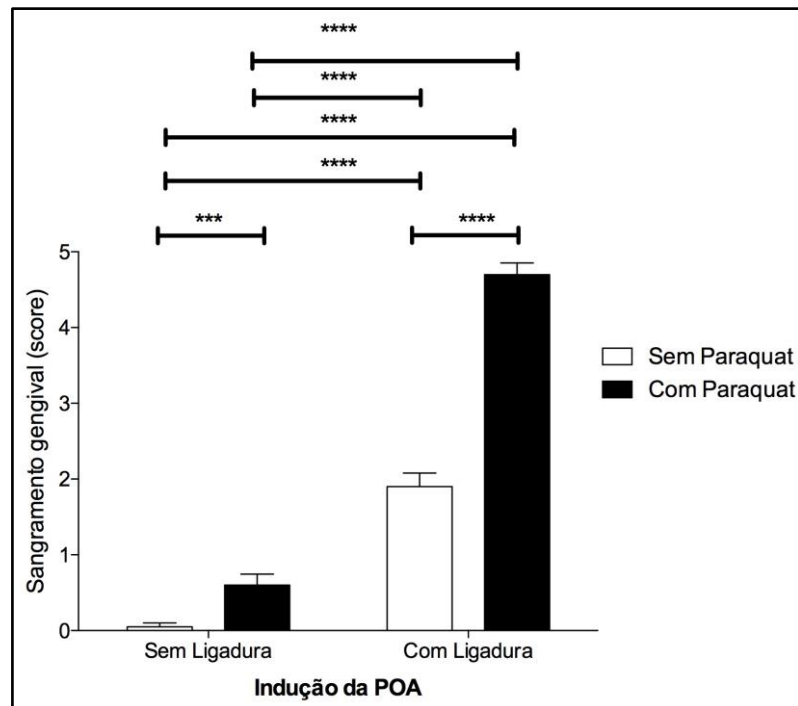
**FIGURA 10** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico mobilidade dentária (*post-hoc Tukey,  $p \leq 0,05$* ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=10$  animais/grupo). *Software GraphPad Prism 6.0*.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos (\* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  e \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

**FIGURA 11** - Comparações inter-grupos para a avaliação da exposição crônica ao paraquat e da ligadura sobre o parâmetro clínico sangramento gengival (*post-hoc Tukey*,  $p \leq 0,05$ ). Valores expressos em média  $\pm$  EPM ( $n=10$  animais/grupo). *Software GraphPad Prism 6.0*.



**Legenda:** \* indica diferença significativa entre grupos ( $*p \leq 0,05$ ;  $**p \leq 0,01$ ;  $***p \leq 0,001$  e  $****p \leq 0,0001$ ).

**Fonte:** a autora, 2018.

## 6 DISCUSSÕES

Avaliando os resultados obtidos neste estudo é possível observar a eficácia da metodologia utilizada, visto que em todas as análises realizadas, exceto leucócitos totais, observou-se uma grande influência do fator “Ligadura” sobre os parâmetros dependentes. O modelo animal para indução da Doença Periodontal é muito utilizado e bem aceito pelos pesquisadores nos dias de hoje, por se tratar de uma metodologia de baixo custo e fácil manuseio, que permite realizar avaliações clínicas, histológicas e imunológicas da doença, pois possuem um desenvolvimento muito parecido com o que acontece nos humanos (PASUPULETI et al., 2016).

O método de ligadura consiste na inserção de um fio de algodão ao redor dos dentes dos animais (GALVÃO et al., 2003). Este método, trata-se de um dos mais utilizados atualmente, devido a sua semelhança com o que ocorre no organismo humano. A inserção do fio de algodão promove o acúmulo de periodontopatógenos no local, formando um biofilme dental e assim estimulando a resposta imunoinflamatória do hospedeiro, que por fim, causa a reabsorção óssea alveolar como acontece nos humanos (HOLZHASEN et al., 2005). Deste modo, pode-se observar que no presente estudo, a ligadura correspondeu a este mecanismo, aumentando a perda óssea alveolar naqueles animais que tiveram a sua colocação.

Para ser considerada crônica, a DP nos humanos segue uma série de características imuno-histológicas, além de possuir fases de estabilização e progressão, na qual a reabsorção óssea alveolar ocorre em períodos intermitentes e de maneira mais lenta que na forma aguda (SMITH et al., 2010). O objetivo da metodologia do presente estudo foi reproduzir as características crônicas da doença. Deste modo, conforme indicado na revisão de literatura realizada por Molon e seus colaboradores em 2013, que avaliou diferentes tipos de indução da DP em modelos animais, o fio de algodão deveria permanecer um tempo maior que 2 semanas para alcançar a cronicidade da doença no rato, período no qual a destruição dos tecidos periodontais é diminuída. Isso indica que o período escolhido para permanência da ligadura neste trabalho foi adequado, pois foi de 30 dias.

Quanto à dose escolhida para a administração diária do Paraquat, o objetivo deste trabalho era de uma exposição contínua à pequena quantidade do produto, que não causasse maiores danos aos órgãos vitais do rato, levando a morte dos mesmos ou interferindo nos resultados das análises realizadas. Desta maneira, pretendia-se alcançar o máximo possível de similaridade com o que acontece nos humanos que moram nas áreas rurais e estão expostos a este herbicida. Porém, a maioria dos artigos presentes na literatura avaliam o efeito do envenenamento com o Paraquat e utilizam uma dose de no mínimo 10 mg/Kg, sendo que a maioria utiliza 20 mg/Kg e mostra que esta dose é capaz de causar lesões cerebrais, pulmonares e renais com apenas algumas administrações (ZHANG et al., 2014b; PRASAD et al., 2009; PREDIGER et al., 2012; SILFELER et al., 2017). Isso indica que a dose utilizada no presente estudo deveria ser menor do que esta citada, como foi utilizada.

Enquanto isso, um estudo que submeteu os ratos a uma exposição mais prolongada ao Paraquat, durando 14 dias com administrações diárias do herbicida, mostrou que a dose de 2 mg/Kg foi capaz de gerar lesões hepáticas nestes animais (ATASHPOUR et al., 2017). Outro estudo que submeteu os animais a esta exposição crônica utilizou uma dose 10 mg/Kg de Paraquat, porém o produto era administrado apenas uma vez por semana nos animais (SONGIN et al., 2011).

Apesar dos trabalhos mostrarem uma ampla variedade de doses para o tratamento crônico e este método ainda não ser bem estabelecido, a pequena dose utilizada pode ter contribuído para que não houvesse uma influência significativa diretamente na POA, como observado neste estudo. Porém, foi observado que o fator “Exposição ao Paraquat” interagindo com o “Ligadura” foi capaz de influenciar o aumento da perda óssea e diminuir a quantidade da glutatona reduzida sérica, além de sozinho influenciar significativamente os parâmetros clínicos e no aumento da quantidade de leucócitos no sangue destes animais. Deste modo, pode-se indicar que uma dose maior do herbicida deve ser estudada para avaliar se realmente o fator isolado “Exposição ao Paraquat” não possui influência sobre a POA.

A via de administração do Paraquat neste estudo também pode ter influenciado nos resultados encontrados, pois a maioria dos trabalhos que utilizam a administração por via gavagem intragástrica são estudos que avaliam as injúrias

causadas pelo envenenamento com este herbicida, ou seja, exposição aguda ao mesmo (WANG et al., 2017; LI et al., 2017; YAN et al., 2017) e além disso, a grande maioria dos trabalhos observados aplicam o Paraquat via intraperitoneal (ATASHPOUR et al., 2017; SU et al., 2017; ZHANG et al., 2017). Apesar disso, como não foram encontrados estudos que avaliam este produto como amplificador da perda óssea alveolar, deste modo não foram encontradas evidências que comprovem qual é a melhor via de administração para avaliar a associação desta doença com o Paraquat.

Como apresentado também no presente estudo, o trabalho realizado por Kumar e seus colaboradores (2015) apresentou um aumento significativo dos leucócitos no sangue dos ratos que foram expostos ao Paraquat, mas ao contrário dos achados deste trabalho, o qual indicou apenas uma tendência, este estudo mostrou que a quantidade de GSH foi diminuída significativamente nos grupos que tiveram esta exposição. Porém a dose utilizada foi de 5mg/Kg do Paraquat duas vezes por semana durante duas semanas nos ratos, dose consideravelmente maior do que a utilizada neste trabalho. Outro estudo, realizado pela equipe de Ahmad em 2014, também mostrou que os níveis de GSH de ratos expostos ao uso do Paraquat foram atenuados significativamente no sangue. Porém, este trabalho também utilizou uma dose maior, sendo esta de 10mg/Kg de Paraquat duas vezes por semana durante 3 semanas nos ratos e a utilizada no presente estudo foi de 0,1 mg/Kg diariamente.

O Paraquat tem seu principal mecanismo de ação baseado na liberação de ROS, que diretamente causam a morte celular por estresse oxidativo. Porém, as ROS levam ao aumento na adesão e infiltração de leucócitos no local, sendo que a liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias através destas células desempenham um papel fundamental na lesão tecidual devido o aumento da sua condição inflamatória (TOYGAR et al., 2015). Os leucócitos caracterizam a primeira linha de defesa do organismo na presença de infecções, protegendo-o contra microorganismos patogênicos e toxinas, mas a sua ativação exacerbada aumenta ainda mais a liberação de ROS (KUMAR et al., 2015).

A liberação das espécies ROS é ocasionada pela ativação de várias enzimas presentes nos leucócitos, recebendo um papel importante na sinalização

intracelular e mediação dos processos inflamatórios. Entretanto, se ocorre a ativação exacerbada dos leucócitos, as ROS ficam em desproporção com os antioxidantes do organismo, podendo causar danos teciduais através do estresse oxidativo. Neste sentido, os antioxidantes oferecem uma proteção contra a perda óssea e injúrias nos tecidos. O principal composto que possui esta função nos animais é a glutathione reduzida, sendo este o mais importante determinante do ambiente redox intracelular. A diminuição da GSH devido a sua oxidação para GSSG (glutathione oxidada) através de enzimas que a utilizam como substrato, é um claro indicador de estresse oxidativo na célula (DOMAZETOVIC et al., 2017).

Em relação à Doença Periodontal, os achados da literatura correspondem aos do presente trabalho. Lima e seus colaboradores (2017) quantificaram os níveis de GSH em animais para avaliar a ação anti-inflamatória e antioxidante da *Calendula officinalis* na Doença Periodontal e mostraram que os níveis da glutathione ficaram significativamente reduzidos nos animais que tiveram a indução da doença, porém esta avaliação foi realizada através de amostras do tecido gengival dos ratos. Do mesmo modo, outro trabalho que avaliou uma terapia antimicrobiana na DP, mostrou que os níveis de GSH no sangue dos ratos foram significativamente menores após 30 dias da indução da doença quando comparados ao grupo controle (BARIN et al., 2017).

Segundo a revisão de literatura realizada por Naiff e seus colaboradores em 2012, a resposta primária da DP ocorre através da liberação de quimiocinas e citocinas inflamatórias pelo tecido gengival, que causam a formação de um infiltrado de células no local, através do estímulo para o aumento da expressão de moléculas de adesão, permeabilidade capilar e quimiotaxia dos neutrófilos. Isso explica a causa do edema e sangramento gengival observados na análise clínica e aumento da quantidade de leucócitos na presença do Paraquat amplificando esta resposta inflamatória. Entretanto, a ativação de quimiocinas e citocinas pode ainda não estar tão exacerbada com a presença do Paraquat, a ponto de ativar os osteoclastos, causando uma perda óssea significativamente maior que poderia ser observada na análise macroscópica (TAYLOR, 2010).

Para finalizar, os achados deste trabalho sugerem a realização de maiores estudos sobre o tema, utilizando maiores doses do Paraquat para realmente concluir

se este possui ou não influência sobre a perda óssea alveolar induzida pela ligadura nos ratos. Análises do tecido do local da inserção da ligadura também podem ser realizadas para se obter maiores explicações sobre esta influência, visto que possivelmente o Paraquat potencializa a POA em indivíduos que já possuem a DP.

## **7 CONCLUSÃO**

Com os resultados obtidos, podemos concluir que apesar de haver uma tendência, a exposição crônica ao Paraquat na dose de 0,1 mg/Kg não aumentou a perda óssea alveolar induzida pelo método de ligadura em ratos e nem diminuiu a quantidade de glutathione reduzida sérica nestes animais, significativamente. Porém, esta mesma dose foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de leucócitos no sangue e os sinais clínicos de mobilidade dentária, edema e sangramento gengivais observados nos ratos.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, I. et al. CYP2E1-mediated oxidative stress regulates HO-1 and GST expression in maneb- and paraquat-treated rat polymorphonuclear leukocytes. **Mol Cell Biochem.**, v. 393, n. 1, p. 209-22, 2014.
- ATASHPOUR, S. et al. Antioxidant effects of aqueous extract of Salep on Paraquat-induced rat liver injury. **World Hepatol**, v. 9, n. 4, p. 209-216, 2017.
- BAIJU, R.M. et al. Patient Reported Outcome Assessment of Periodontal Therapy: A Systematic Review. **J Clin Diagn Res.**, v. 11, n.8, p. 14-19, 2017.
- BARIN, L. M. et al. Role of the adjunctive antimicrobial photodynamic therapy to periodontal treatment at plasmatic oxidative stress and vascular behavior. **J Photochem Photobiol B.**, v. 173, p. 538-544, 2017.
- BLANCO, A. T.; ANDÉRICA, R. A. C.; PEDRAZA, C. J. New insights into antioxidant strategies against paraquat toxicity. *Free Radic Res.*, v. 48, n. 6, p. 623-640, 2014.
- CHEN, B. et al. RANKL expression in periodontal disease: where does RANKL come from? *Biomed Res Int*, 2014.
- CHENG, Y. H. et al. PBPK/PD assessment for Parkinson's disease risk posed by airborne pesticide paraquat exposure. **Environ Sci Pollut Res Int.**, 2017
- DENTINO, A. et al. Principles of periodontology. **Periodontology 2000**, v. 61, p. 16-53, 2013
- DOMAZETOVIC, V. et al. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clin Cases Miner Bone Metab.**, v. 14, n. 2, p. 209–216, 2017.
- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys.**, v.82, n. 1, p. 70-7, 1959.
- FARQUHARSON, D.; BUTCHER, J.P.; CULSHAW, S. Periodontitis, Porphyromonas, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Mucosal Immunol.**, v. 5, n. 2, p. 112-120, 2012.
- GALVÃO, M.P.A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesq Odontol Bras**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003.
- GARLET, G.P. Destructive and Protective Roles of Cytokines in Periodontitis: A Re-appraisal from Host Defense and Tissue Destruction Viewpoints. **J Dent Res**, v. 89, n. 12, p. 1349-1363, 2010.
- GATTO, M.R. et al. Prevalence of six periodontal pathogens in subgingival samples of Italian patients with chronic periodontitis. **New Microbiol.**, v. 37, n. 4, p. 517-24, 2014.
- GAWARAMMANA, I. B.; BUCKLEY, N. A. Medical management of paraquat ingestion. **Br J Clin Pharmacol.**, v. 72, n. 5, p. 745-757, 2011.

GIANNOBILE, W. V. et al. Saliva as a diagnostic tool for periodontal disease: current state and future directions. **Periodontology 2000**, v. 50, p. 52–64, 2009.

HARVEY, J. D. Periodontal Microbiology. **Dent Clin N Am.**, v. 61, n. 2, p. 253–269, 2017.

HIROYUKI, K. et al. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 351, 2017.

HOLZHAUSEN, M. J. et al. Protective effects of etoricoxib, a selective inhibitor of cyclooxygenase-2, in experimental periodontitis in rats. **Periodontal Res.**, v. 40, n. 3, p. 208-211, jun. 2005.

HORTON, A.L.; BOGGESE, K.A. Periodontal disease and preterm birth. **Obstet Gynecol Clin North Am.**, v. 39, n. 1, p. 17-23, mar. 2012.

HOUSHMAND M. et al. Refining definitions of periodontal disease and caries for prediction models of incident tooth loss. **J Clin Periodontol**, v. 39, p. 635-644, 2012.

HYLAND, C.; LARIBI, O. Review of take-home pesticide exposure pathway in children living in agricultural areas. **Environ Res.**, v.156, p. 559-570, 2017.

JIA, X. W. et al. Association between IL-4 and IL-4R Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. **Dis Markers**, 2017.

KANZAKI, H. et al. Pathways that Regulate ROS Scavenging Enzymes, and Their Role in Defense Against Tissue Destruction in Periodontitis. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. 351, p. 1-8, 2017.

KASSEBAUM, N. J. et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. **J Dent Res.**, v. 96, n. 4, p. 380-387, 2017.

KASSEBAUN, N.J. et al. Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Metaregression. **J Dent Res**, v. 93, n. 11, p. 1045-1053, 2014.

KAUR, S. et al. Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis: a systematic review. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 5, p. 399-408, 2013.

KUMAR, A. et al. The manganese-salen compound EUK-134 and N-acetyl cysteine rescue from zinc- and paraquat-induced toxicity in rat polymorphonuclear leukocytes. **Chem Biol Interact.**, v. 231, p. 18-26, 2015.

LEDIC, K. et al. Periodontal disease increases risk for chronic obstructive pulmonary disease. **Coll Antropol.**, v. 37, n. 3, p. 937-42, 2013.

LEE, D. H.; JACOBS, D. R.; KOCHER, T. Associations of serum concentrations of persistent organic pollutants with the prevalence of periodontal disease and

subpopulations of white blood cells. **Environ Health Perspect.**, v. 116, n. 11, p. 1558-62, 2008.

LI, Q. L. et al. The study of using cordyceps-astragalus-salvia miltiorrhiza to treat acute lung injury induced by paraquat poisoning in rats. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v. 35, n. 4, p. 251-256, 2017.

LIMA, M. D. R. The Effect of Calendula officinalis on Oxidative Stress and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **Front Physiol.**, v. 8, n. 440, p. 1-9, 2017.

MARTINEZ, H. M.; SILVESTRE, R. J.; SILVESTRE, F. J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 22, n. 6, p. 708-715, 2017.

MEDEIROS, U. V. DE; ROCHA, D. S. Estudo epidemiológico da doença periodontal em pacientes adolescentes e adultos. **Rev. Odontol.**, v.8, n.2, p.19-28, 2006.

MOLON, R. S.; AVILA, E D; CIRELLI, J. A. HOST responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review. **J Investig Clin Dent.**, v.4, n. 4, p. 211-218, 2013.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch Toxicol.**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.

NAIFF, P. F.; ORLANDI, P. P.; SANTOS, M. C. dos. Imunologia da periodontite crônica: uma revisão de literatura. **Scientia Amazonia**, v. 1, n. 2, p. 28-36, 2012.

NIBALI, L. et al. Association Between Metabolic Syndrome and Periodontitis: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 98, n. 3, p. 913–920, 2013.

NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its associations with systemic diseases and prevention. **International Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 2, p. 72-80, 2017.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal Models for Periodontal Disease. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2011, n. 2011, p. 1-8, 2011.

PAGE, R. C. The Pathobiology of Periodontal Diseases May Affect Systemic Diseases: Inversion of a Paradigm Pathobiology of Periodontal Diseases, **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, 1998.

PASUPULETI, M. K.; MOLAHALLY, S. S.; SALWAJI, S. Ethical guidelines, animal profile, various animal models used in periodontal research with alternatives and future perspectives. **J Indian Soc Periodontol.**, v. 20, n. 4, p. 360–368, 2016.

PRASAD, K. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of paraquat accumulation in mouse brain. **Experimental Neurology**, v. 215, n. 2, p. 358-367, 2009.

PREDIGER, R. D. S. et al. Intranasal Administration of Neurotoxicants in Animals: Support for the Olfactory Vector Hypothesis of Parkinson's Disease. **Neurotox Res**, v. 21, p. 90–116, 2012.

PRESHAW, P. M. Detection and diagnosis of periodontal conditions amenable to prevention. **BMC Oral Health**, v. 15, n. 1, p. 1-11, 2015.

RODINI, C. O. et al. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. **J Mol Histol.**, v. 39, n. 3, p. 275-82, 2008.

SILFELER, I. Protective Effect of Ellagic Acid on Paraquat-induced Kidney Hazards in Rats. **Iran J Kidney Dis.**, v. 11, n. 1, p. 23-28, 2017.

SLOTS, J. Periodontology: past, present, perspectives. **Periodontology 2000**, v. 62, p. 7–19, 2013.

SMITH, M.; SEYMOUR, G. J.; CULLINAN, M. P. Histopathological features of chronic and aggressive periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 53, p. 45–54, 2010.

SONGIN, M. et al. Alteration of GSK-3 $\beta$   $\beta$ in the hippocampus and other brain structures after chronic paraquat administration in rats. **Folia Neuropathol**, v. 49, n. 4, p. 319-327, 2011.

SU, Y. W. et al. Changes of integrin-linked kinase expression on rats' pulmonary fibrosis induced by paraquat. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v. 35, n. 5, p. 362-365, 2017.

SUN, B.; CHEN, Y. G. Advances in the mechanism of paraquat-induced pulmonary injury. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 20, n. 8, p. 1597-1602, 2016.

TAYLOR, J. J. Cytokine regulation of immune responses to *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology 2000**, v. 54, p. 160–194, 2010.

TESHOME, A.; YITAYEH, A. Relationship between periodontal disease and preterm low birth weight: systematic review. **Pan Afr Med J.**, v. 24, n. 215, p. 1-10 2016.

TOYGAR, M. et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity. **Hum Exp Toxicol.**,v. 34, n. 2, p. 198-204, 2015.

VACCARI, C.; EL DIB, R.; CAMARGO, J. L. V. Paraquat and Parkinson's disease: a systematic review protocol according to the OHAT approach for hazard identification. **Systematic Reviews**, v. 6, n.9, p. 1-8, 2017.

VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **J Den Res.**, v. 82, n. 2, p. 82-90, 2003.

VARGAS–SANCHEZ, P.K. et al., Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. **J Appl Oral Sci.**, v. 25, n. 5, p. 490-497, 2017.

VETTORE, M. V. et al. Desigualdades sociais e doença periodontal no estudo SBBrazil 2010: abordagem multinível. **Rev Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 29-39, 2013.

WANG, H. F. et al. Association between the interleukin-1 $\beta$  C-511T polymorphism and periodontitis: a meta-analysis in the Chinese population. **Genet Mol Res.**, v. 16, n. 1, 2017a.

WANG, Z. W. et al. The study of using salvianolate treat acute lung injury in rats induced by paraquat. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v.35, n. 5, p. 342-347, 2017b.

YAN, B. et al. HMGB1-TLR4-IL23-IL17A axis promotes paraquat-induced acute lung injury by mediating neutrophil infiltration in mice. **Sci Rep.**, v. 7, n. 597, p. 1-11, 2017.

YU, Y. H., et al. Cardiovascular risks associated with incident and prevalent periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 42, n. 1, p. 21-28, 2015.

ZENG, X.T. et al. Periodontal disease and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis of observational studies. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 46508-517, 2012.

ZHANG, Q. et al. Prevalence and Predictors for Periodontitis among adults in China, 2010. **Global Health Action**, v. 7, n. 0, p. 1-7, 2014a.

ZHANG, S. Intervention of edaravone against renal injury induced by acute paraquat poisoning in rats. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v. 35, n. 6, p. 408-413, 2017.

ZHANG, Z. et al. Salidroside alleviates paraquat-induced rat acute lung injury by repressing TGF- $\beta$ 1 expression. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 7, n. 12, p. 8841-8847, 2014b.

ZHU, J. et al. Interleukin-6-174G/C Polymorphism Contributes to Periodontitis Susceptibility: An Updated Meta-Analysis of 21 Case-Control Studies. **Dis Markers**, 2016.