

IVAN BORGES JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Florianópolis, SC, fevereiro de 2004

IVAN BORGES JUNIOR

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição / Área de Concentração em Metabolismo e Dietética, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de mestre em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Emília Addison Machado Moreira

Florianópolis, SC, fevereiro de 2004

Ivan Borges Junior

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO
EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de MESTRE EM NUTRIÇÃO – Área de Concentração em Metabolismo e Dietética – e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de dezembro de 2003.

Prof^a. Dr^a. Emília Addison Machado Moreira
Prof. Dr. *Coordenador do programa de Pós-Graduação em Nutrição*

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Emília Addison Machado Moreira
Presidente

Prof. Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo
Membro

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho
Membro

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes pesquisados, pois sem sua colaboração jamais poder-se-ia realizar a presente dissertação.

Ao Senhor Deus, que com Sua imensa misericórdia, onipotência, onipresença e onisciência, permitiu, em todos os aspectos, a concretização deste trabalho, ao longo destes dois anos.

À minha orientadora professora Emília Addison Machado Moreira, pelos ensinamentos, parcimônia, apoio, dinamismo e disposição em toda essa jornada.

Ao professor Danilo Wilhelm Filho, incontestável conhecedor do estresse oxidativo, pela importante contribuição dos seus conceitos na clínica odontológica.

À professora Tânia Fröde, pela disposição em compartilhar sua sabedoria e competência.

À professora Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, que me incentivou deveras nesta investida.

Aos amigos do mestrado Adriana, Cláudia, Bethânia, Neiva, Louise, Nilo, Paulinho.

A todos os colegas, especialmente a Fabíola, o Thiago, a Selma, que de alguma forma, estiveram presentes na confecção deste trabalho.

À minha família, especialmente meus pais, que sempre esteve me apoiando.

À minha amada esposa Josi e minha querida filha Joanna, pela compreensão nos momentos que estive ausente, principalmente pelo incentivo e por acreditar que valia a pena.

BORGES Jr, I. Avaliação do estresse oxidativo em humanos com doença periodontal

Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 76 p., 2003.

RESUMO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) estão continuamente relacionadas com o consumo de oxigênio nos organismos aeróbicos, incluindo os seres humanos. Sua produção é aumentada em eventos patológicos, como no processo inflamatório, dentre eles a doença periodontal. O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a incidência do estresse oxidativo no tecido gengival em indivíduos com doença periodontal crônica. Dezoito indivíduos participaram do estudo e foram divididos em dois grupos (n=9 em cada grupo): controle (pacientes saudáveis – média de idade $46,77 \pm 12,94$), com profundidade de sondagem de até 3mm; e grupo experimental (pacientes com periodontite – média de idade $55,5 \pm 11,32$), com profundidade de sondagem entre 6-9mm. A avaliação nutricional baseou-se no consumo alimentar e em medidas antropométricas. Fragmentos de tecido gengival foram coletados para análise enzimática de antioxidantes: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR); antioxidantes não enzimáticos: glutathione total (GT), glutathione reduzida (GSH); e biomarcadores do estresse oxidativo, tal como, glutathione oxidada (GSSG) e lipoperoxidação tecidual, avaliado como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico). A atividade da mieloperoxidase (MPO) também foi analisada. Em relação ao estado nutricional, foram obtidos os seguintes resultados no grupo controle: índice de massa corporal (IMC) = $24,88 \pm 3,72$; circunferência braquial (CB) = $30,30 \pm 3,86$; prega cutânea tricipital (PCT) = $14,55 \pm 5,56$; circunferência muscular do braço (CBM) = $24,23 \pm 3,86$. No grupo experimental índice de massa corporal (IMC) = $27,65 \pm 4,32$; circunferência braquial (CB) = $33,56 \pm 2,66$; prega cutânea tricipital (PCT) = $32,26 \pm 10,76$; circunferência muscular do braço (CBM) = $23,34 \pm 3,12$. O consumo alimentar do grupo controle (indivíduos considerados normais em relação ao estado nutricional) mostrou uma presença elevada de antioxidantes comparado ao grupo experimental (considerados indivíduos pré-obesos). Os indivíduos com doença periodontal mostraram um aumento da GSSG e concentrações de TBARS no tecido gengival, comparados ao pacientes saudáveis. Além disso, o grupo experimental, mostrou também um aumento da atividade da GPx, GST e MPO e concentrações de GT nos fragmentos gengivais analisados, quando comparado ao grupo controle. As atividades da CAT e da GR não apresentaram significância estatística entre os grupos. A análise das amostras obtidas em relação estado dos antioxidantes, atividade da MPO e o estado nutricional, sugere uma forte correlação entre biomarcadores do estresse oxidativo e doença periodontal, a qual provavelmente estava associada com o estado nutricional dos indivíduos pesquisados.

Palavras-chave: estresse oxidativo; dano oxidativo; doença periodontal.

BORGES Jr, I. Avaliação do estresse oxidativo em humanos com doença periodontal

Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 76 p., 2003.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are continuously related to oxygen consumption in aerobic organisms, including humans. Their generation is enhanced in pathological events such as inflammatory processes, among them, periodontitis. The main objective of the present study was to evaluate the incidence of oxidative stress in gingival tissue in subjects with chronic periodontal disease. Eighteen subjects were used, divided into two groups (n=9 each group): controls (healthy subjects - mean age $46,77 \pm 12,94$ years), with maximum probing depth of 3mm, and patients with periodontitis (mean age $55,5 \pm 11,32$ years), with maximum probing depth between 6 and 9mm. Nutritional evaluation was carried out through food consumption and anthropometric measurements. Small pieces from gingival tissue were removed for assays of enzymatic antioxidants: catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR); non-enzymatic antioxidants: total glutathione (GT), reduced glutathione (GSH); biomarkers of oxidative stress such as oxidized glutathione (GSSG) and lipoperoxidation, evaluated as TBARS (thiobarbituric reactive substances). Myeloperoxidase (MPO) activity was also measured. Regarding the nutritional status, the following results were obtained in the control group: body mass index (BMI) = $24,88 \pm 3,72$; mid upper arm circumference (MUAC) = $30,30 \pm 3,86$; triceps skin fold thickness (TSF) = $14,55 \pm 5,56$; arm muscle circumference (ACM) = $24,23 \pm 3,86$. In the experimental group body mass index (BMI) = $27,65 \pm 4,32$; mid upper arm circumference (MUAC) = $33,56 \pm 2,66$; triceps skin fold thickness (TSF) = $32,26 \pm 10,76$; arm muscle circumference (ACM) = $23,34 \pm 3,12$. The food consumption containing antioxidants was higher in the control group (subjects considered as normal, regarding the nutritional status) compared to experimental group (considered as pre-obese subjects). Subjects with periodontal disease showed enhanced GSSG and TBARS concentrations in gingival tissue compared to healthy subjects. Moreover, they showed enhanced GPx, GST, MPO activity, and GT concentrations in gingival tissue, compared to controls, while the CAT and GR activities showed no significant differences. Summing up the responses obtained regarding the antioxidants status, MPO activity, together with the nutritional status, suggest a strong correlation between biomarkers of oxidative stress and periodontitis, which in turn, are probably associated with the nutritional status of the subjects.

Key words: oxidative stress; oxidative damage; periodontal disease.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIACÇÕES	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
1 INTRODUÇÃO	12
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
4 OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo Geral	24
4.2 Objetivos específicos	24
5 Materiais e métodos	25
5.1 População do estudo	25
5.1.1 Amostra	25
5.2 Delineamento do estudo	28
5.2.1 Desenho experimental	29
5.2.2 Variáveis do estudo	29
5.3 Avaliação do estado nutricional	30
5.3.1 Avaliação antropométrica	30
5.3.1.1 Índice de massa corporal	30
5.3.1.2 Prega tricipital	31
5.3.1.3 Circunferência braquial	32
5.3.1.4 Circunferência muscular do braço	32
5.3.2 Caracterização dietética	32
5.4 Avaliação periodontal	33
5.5 Viabilização do estudo	33
5.6 Métodos laboratoriais	34
5.6.1 Preparo das amostras	34
5.6.1.1 Tecido gengival	34
5.6.1.1.1 Homogenato	35
5.6.1.1.2 Extrato ácido	35
5.6.2 Atividade dos antioxidantes enzimáticos	36
5.6.2.1 Atividade da catalase	36
5.6.2.2 Atividade da glutathiona peroxidase	37
5.6.2.3 Atividade da S-transferase.....	38
5.6.2.4 Atividade da glutathiona redutase.....	38
5.6.3 Análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas.....	39
5.6.3.1 Determinação da glutathiona reduzida.....	39
5.6.3.2 Determinação da glutathiona total.....	39
5.6.4 Atividade da mieloperoxidase.....	39
5.6.5 Determinação da lipoperoxidação tecidual.....	40
5.7 Análise estatística.....	40
5.8 Reagentes.....	41
6 Resultados.....	42
6.1 Análise descritiva.....	42
6.1.1 Características gerais da população.....	42
6.2 Análise estatística.....	45
6.2.1 Atividade dos antioxidantes enzimáticos.....	45
6.2.1.1 Atividade da catalase.....	45
6.2.1.2 Atividade da glutathiona peroxidase.....	46

6.2.1.3 Atividade da glutathione S-transferase.....	47
6.2.1.4 Atividade da glutathione reductase.....	48
6.2.2 Análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas.....	49
6.2.2.1 Glutathione reduzida.....	49
6.2.2.2 Glutathione total.....	50
6.2.2.3 Glutathione oxidada.....	51
6.2.3 Atividade da mieloperoxidase.....	52
6.2.4 Determinação da lipoperoxidação tecidual.....	53
7 DISCUSSÃO.....	54
8 CONCLUSÕES.....	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES.....	71
APÊNDICE A.....	71
APÊNDICE B.....	73
APÊNDICE C.....	74
APÊNDICE D.....	75
ANEXO.....	78

LISTA DE ABREVIACOES

ERO	Espécies reativas de oxigênio
RL	Radicais livres
$O_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
$\bullet OH$	Radical hidroxila
HO_2^{\bullet}	Hidroperóxido
NO^{\bullet}	óxido nítrico
NO_2^{\bullet}	Dióxido de nitrogênio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HOCl	cido hipocloroso
1O_2	Oxignio singlete
ONDO ⁻	Peroxinitrito
$\bullet OOL$	Radical peroxil
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
GT	Glutaciona total
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
MPO	Mieloperoxidase
IMC	ndice de massa corporal
CB	Circunferência braquial
CM	Circunferência muscular
PCT	Prega triciptal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Vista palatina da gengiva.....	26
Figura 2 - Vista palatina da incisão cirúrgica.....	26
Figura 3 - Vista vestibular da lesão óssea.....	27
Figura 4 - Vista palatina da sutura.....	27
Figura 5 - Tecido gengival removido.....	27
Figura 6 - Imersão das amostras em nitrogênio líquido.....	28
Figura 7 - Profundidade de sondagem utilizando sonda periodontal.....	33
Figura 8 - Remoção das amostras no laboratório.....	34
Figura 9 - Pesagem das amostras.....	34
Figura 10 - Utilização do homogeneizador.....	35
Figura 11 - Centrifugação das amostras.....	36
Figura 12 - Uso do espectrofotômetro.....	37

QUADROS

Quadro 1 - Defesas antioxidantes dos sistemas biológicos	21
Quadro 2 - Relação das variáveis independentes e dependentes estudadas	29
Quadro 3 - A classificação do IMC segundo a WHO, 1995 e 1998	31

TABELA

Tabela 1 - Características antropométricas dos pacientes.....	42
Tabela 2 - Frequência do consumo alimentar de alimentos fontes de antioxidantes dos pacientes do grupo controle	43
Tabela 3 - Frequência do consumo alimentar de alimentos fontes de antioxidantes dos pacientes do grupo experimental	44

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Concentração de catalase em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	45
Gráfico 2 – Concentração de glutathiona peroxidase em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	46
Gráfico 3 – Concentração de S-transferase em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	47
Gráfico 4 – Concentração de glutathiona redutase em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	48
Gráfico 5 – Concentração de glutathiona reduzida em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	49
Gráfico6– Concentração de glutathiona total em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	50
Gráfico 7 – Concentração de glutathiona oxidada em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	51
Gráfico 8 – Concentração de mieloperoxidase em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	52
Gráfico 9 – Concentração de TBARS em gengivas de pacientes controles e de pacientes experimentais	53

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	71
APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA.....	73
APÊNDICE C – FICHA PERIODONTAL.....	74
APÊNDICE D – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR.....	75
ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA.....	78

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo em um organismo é conhecido como um desequilíbrio em favor da geração excessiva de radicais livres, ou redução da capacidade de neutralização e remoção destas espécies, o que pode conduzir à oxidação maciça de substratos biológicos. A cronicidade desse estresse oxidativo, no ambiente celular, pode causar severos problemas metabólicos e estar envolvida na origem e no desenvolvimento de numerosas patologias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b; MACCORD, 2000).

Entende-se por radicais livres toda molécula ou átomo que tem um ou mais elétrons ímpares na sua órbita externa. Tal característica transforma-os em substâncias muito instáveis que reagem facilmente com outros compostos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a). Estes radicais originam-se desde o nascimento, sendo continuamente produzidos pelo organismo. Atualmente o crescente interesse sobre radicais livres e antioxidantes, tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas na tentativa de comprovar o papel dessas substâncias nas diversas doenças (BENZIE, 2003).

Na maioria das doenças humanas, o estresse oxidativo é um fenômeno secundário. Especialmente no processo de fagocitose, envolvendo inflamações crônicas, onde ocorre a produção excessiva dos radicais livres, sintetizados por meio da ativação de sistemas “naturais”, desenvolvidos pelo próprio organismo. Normalmente, as células toleram certo dano oxidativo, através da síntese e regulação dos sistemas antioxidantes de defesa, na tentativa de restaurar o equilíbrio. Contudo, o estresse oxidativo severo produz alterações em nível de DNA, destruição de proteínas e peroxidação lipídica, podendo levar a lesões irreversíveis, e até mesmo morte celular (HALLIWELL, 1994).

Fang, Yang & Wu (2002) relatam que os radicais livres estão envolvidos em aproximadamente 40 doenças, entre as quais o câncer e a aterosclerose, as duas principais causas de morte atualmente, além do próprio processo de envelhecimento. Outros autores afirmaram que, além do câncer e da aterosclerose, os efeitos tóxicos dos radicais livres estão relacionados com doenças como porfirias, cataratas, sobrecarga de ferro e cobre, doença de Alzheimer, *diabetes mellitus*, inflamações crônicas tais como as doenças periodontais (ASMAN *et al*, 1984; ASMAN, 1988; WHYTE *et al*, 1989; SHAPIRA *et al*, 1991;

ZAFIROPOULOUS et al, 1991; KIMURA; YONEMURA; KAYA, 1993), doenças auto-imunes e situações de injúria por isquemia. Citam ainda como causa da ação de radicais livres a ocorrência de doença de Parkinson, artrite reumatóide e doença intestinal inflamatória, elevando aquele número a mais de duas centenas de doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b).

A periodontite é considerada uma doença inflamatória que leva a lesões teciduais através de interações complexas entre bactérias periodontopatogênicas e os sistemas de defesa do hospedeiro (AAP, 1999).

A etiologia das doenças periodontais é multifatorial e inclui o hospedeiro como componente fundamental. A doença só ocorre quando existe um desequilíbrio entre agressão microbiana e a resposta do hospedeiro. Dessa forma, tanto o aumento da agressão microbiana, com a presença de microorganismos periodontopatogênicos (LÖESCHE, 1982), quanto a redução das defesas do hospedeiro, devido a doenças autoimunes e imunossupressivas, ou ambas, provocariam este desequilíbrio que resultaria, clinicamente, numa das formas de doença periodontal (GENCO, 1996; COHEN *et al*, 1998). Todo o tipo de alteração capaz de modificar o equilíbrio fisiológico do hospedeiro pode também modificar a etiologia, extensão, curso e resposta ao tratamento das doenças periodontais (LINDHE, 1999).

Nas últimas décadas, epidemiologistas têm avaliado os fatores de risco para progressão e susceptibilidade à doença periodontal. Fator de risco pode ser brevemente definido como um atributo ou exposição que aumenta a probabilidade de ocorrência da doença. Nos entendimentos atuais dos fatores de risco para as doenças periodontais podem ser categorizados em fatores inatos e adquiridos. Os fatores de risco inatos incluem a raça, sexo, genética, imunodeficiência congênita, disfunção fagocítica, síndromes como, por exemplo, a Síndrome de Down. Os fatores adquiridos incluem a deficiente higiene oral, idade, medicações do tipo fenitoína, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, fumo, deficiências imunes adquiridas, doenças endócrinas adquiridas como o *diabetes mellitus*, estresse e deficiências nutricionais (WILLIAMS; HILL, 1998).

Assim, a presente investigação busca avaliar o estresse oxidativo e sua relação com a doença periodontal, utilizando-se a investigação da liberação de sistemas enzimáticos envolvidos na oxidação e fatores não enzimáticos que participam da resposta inflamatória.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A avaliação da doença periodontal consiste de uma anamnese completa e precisa do paciente, além das avaliações clínicas e radiográficas (CRESPO, 1998). No entanto, a constatação de sítios que continuarão a perder inserção, requerendo intervenção terapêutica, é bastante complexa.

Dessa forma, espera-se que esta investigação possa avaliar o estresse oxidativo através do dano celular, dosagem de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos bem como, da determinação da mieloperoxidase, presente no tecido gengival de indivíduos com periodontite grave ou avançada. Ademais, pretende-se contemplar o estado nutricional, através da avaliação dietética e antropométrica, dos indivíduos participantes.

A hipótese do presente estudo é que a periodontite pode gerar o desenvolvimento de espécies reativas de oxigênio no tecido gengival, alterando o *status* antioxidante e biomarcadores de estresse oxidativo neste tecido.

3 REVISÃO DA LITERATURA

As reações inflamatórias e imunológicas induzidas pela placa bacteriana, representam as características predominantes da periodontite. Estas são visíveis, microscópica e clinicamente, no periodonto afetado, e reproduzem a reação do hospedeiro à microbiota da placa e seus produtos. Tais processos inflamatórios e imunológicos agem nos tecidos gengivais para proteger contra o ataque microbiano e impedem os microorganismos de se disseminarem ou invadirem os tecidos. Em alguns casos, essas reações de defesa do hospedeiro podem ser prejudiciais porque também são passíveis de danificar as células e estruturas vizinhas do tecido conjuntivo (LINDHE, 1999).

Embora as reações inflamatórias e imunológicas no periodonto possam parecer semelhantes às observadas em outras partes do organismo, há diferenças significantes. Isto ocorre, em parte, devido a uma consequência da anatomia do periodonto, ou seja, a permeabilidade característica do epitélio juncional resulta em um processo notavelmente dinâmico envolvendo células e fluidos, preservando continuamente a integridade epitelial através da interface entre tecido duro e tecido mole (WILLIAMS; HILL, 1998).

Segundo Lindhe (1999), a lesão periodontal pode ser diagnosticada em leve e grave ou avançada. Os critérios para tal diagnóstico são a profundidade de sondagem, as medições do nível de inserção e a análise radiográfica. A profundidade de sondagem é a distância da margem da gengiva ao fundo da bolsa periodontal, medida utilizando-se uma sonda graduada. O nível de inserção é expresso pela distância em milímetros da junção cimento-esmalte ao fundo da bolsa ou sulco gengival. Na periodontite leve a profundidade de sondagem, as medições do nível de inserção e a análise radiográfica indicam uma perda dos tecidos de suporte não excedendo a um terço do comprimento da raiz. A inflamação deve estar presente, sangramento à sondagem ocorrerá quando o sítio for sondado no fundo da bolsa. Na periodontite grave ou avançada, os critérios de diagnóstico indicam perda dos tecidos de suporte ultrapassando um terço do comprimento da raiz.

As bolsas periodontais podem conter mais de 400 espécies diferentes de microorganismos, cada uma apresentando potenciais diversos para a indução de doença, os

quais vão variar de acordo com o meio e o estágio de colonização (LINDHE, 1999).

A doença periodontal destrutiva afeta de 10 a 15% da população mundial, e representa a maior causa da perda dos dentes. Existe uma forte evidência de que a doença afeta um determinado grupo predisposto da população que possui uma resposta inflamatória/imunológica exacerbada, frente às bactérias periodontopatogênicas que são acumuladas nos dentes, em torno da gengiva. Esta resposta exagerada pode resultar em dano tecidual por parte do hospedeiro (BROWN; LÖE, 1993; ALBANDAR; BRUNELLE; KINGMAN, 1996).

No início dos anos 70, Løe *et al*, (1986), observaram, em um estudo longitudinal, a progressão da doença periodontal em um grupo de plantadores de chá que jamais em suas vidas tiveram seus dentes escovados. A idade deste grupo variou entre 14 e 46 anos, e foram avaliados por um período de quinze anos. Após a análise dos dados, Løe *et al* puderam verificar que 8% daquela população possuía uma rápida progressão da perda óssea periodontal e 81% possuía uma moderada progressão. No entanto, uma característica importante da pesquisa, observou que em 11% da população estudada não houve progressão da doença (além da gengivite), mesmo na presença abundante de cálculo e placa subgengival. Estes resultados sugerem que alguns indivíduos possuem diferentes níveis de susceptibilidade em relação à infecção periodontal.

As doenças periodontais humanas são desordens inflamatórias que levam à perda e destruição tecidual, como resultado de interações complexas entre bactérias (periodontopatogênicas) e a resposta inflamatória (AAP, 1999). É sabido que a periodontite manifesta-se por um fenômeno multifatorial, caracterizada pela presença de várias moléculas, dentre elas as espécies reativa de oxigênio (ERO) e os radicais livres (RL) (BARTOLD; WIEBKIN; THONARD, 1984). As espécies reativas de oxigênio são essenciais na via do metabolismo normal, no entanto, a sua produção excessiva pode resultar em dano celular. É provável que o papel das ERO seja comum para ambas as vias de destruição tecidual, a bacteriana e aquela mediada pelo hospedeiro (CHAPPLE, 1997).

A forte evidência, correlacionando ERO na destruição patológica do tecido conjuntivo durante a doença periodontal, está no fato de reputar o infiltrado de neutrófilos como a chave do evento modulador da resposta do hospedeiro contra a invasão microbiana. Segundo Miyasaki (1991), se esta infiltração é numericamente consistente, haverá um aumento dos níveis de ERO. Realmente, vários estudos demonstraram a capacidade dos periodontopatógenos e seus produtos de induzir a produção de ERO, através dos neutrófilos (PASSO; SYED; SILVA, 1982; MIYASAKI, 1991; SHAPIRA *et al*, 1991).

As ERO são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. As principais fontes de ERO são as organelas citoplasmáticas que metabolizam o oxigênio, o nitrogênio e o cloro, gerando grande quantidade de metabólicos (MÉNDEZ FILHO; RODRÍGUEZ, 1997; FRIDOVICH, 1998).

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados, nos orbitais externos. Isto determina uma atração para um campo magnético, o que pode torná-lo altamente reativo, capaz de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a).

Dentre os radicais livres estão incluídos o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), a hidroxila ($\bullet OH$), o hidroperóxido (HO_2^{\bullet}), o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2^{\bullet}) (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Destes, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares, e o peróxido de hidrogênio, apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA (ANDERSON, 2000).

Recentemente, o termo “espécies reativas de oxigênio” tem sido adotado para incluir moléculas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete (1O_2), os quais não são radicais livres, no entanto são capazes de formar radicais nos ambientes intra e extracelular e também certa reatividade deletéria. A geração de radicais livres constitui uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. Podem ceder o elétron solitário e serem oxidados, ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a).

A maior fonte de ERO endógenos ocorre durante o metabolismo oxidativo fisiológico na cadeia respiratória mitocondrial. Sob condições normais, 95-98% do oxigênio molecular consumido pelas células é reduzida a água pela adição de quatro elétrons. Os 2-5% restantes, porém, são reduzidos por uma via univalente, dando origem as ERO produzidas durante o processo oxidativo diário. Espécies reativas de oxigênio podem causar dano celular pelo ataque principalmente a lipídeos e proteínas de membrana, ou induzindo modificações do RNA e DNA (THOMPSON; GODIN, 1995; GRACY, *et al*, 1999).

São também gerados a partir de dois sistemas enzimáticos: o sistema oxidativo de $NADP^+/NADP^+H^+$ e o da mieloperoxidase. Sua fonte principal de produção é o aumento da

atividade oxidativa, e durante a ativação de glóbulos brancos como neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, entre outros. Podem também ser formados a partir do oxigênio e seus derivados, dos radicais alcoxil e peróxido, do ozônio, de metais de transição e da reação de Fenton (MÉNDEZ FILHO; RODRÍGUEZ, 1997; JENSEN, 2003). A geração de radicais livres pode ocorrer no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu sítio de formação (ANDERSON, 2000).

Mais especificamente, as ERO podem causar danos teciduais através de diferentes mecanismos, como por exemplo: 1. dano às moléculas de DNA; 2. peroxidação lipídica, através da ativação das ciclooxygenases e lipooxygenases; 3. danos protéicos, incluindo ácido hialurônico gengival e proteoglicanas; oxidação de importantes enzimas, como por exemplo, anti-proteases como α 1-antitripsina; 4. estimulação de citocinas pro-inflamatórias liberadas por monócitos e macrófagos (CHAPPLE, 1997; WADDINGTON; MOSELEY; EMBERY, 2000).

A maioria das ERO possui vida média extremamente curta, em torno de 10^{-9} a 10^{-6} segundos, no entanto, podem causar grande dano tecidual devido à formação de reações em cadeia junto às membranas celulares e de organelas (PRYOR, 1986).

Quantitativamente, a principal fonte do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e de ERO está na cadeia respiratória, no entanto, sua presença nos tecidos periodontais se dá principalmente pela ativação dos fagócitos (neutrófilos e macrófagos), como agente antibacteriano (MALY, 1990). Recentemente, têm-se sugerido que o superóxido esteja relacionado com a reabsorção óssea, pois estudos mostraram a presença deste ânion em zonas de reabsorção adjacentes a osteoclastos (KEY *et al*, 1993).

O radical hidroxila ($\bullet OH$), considerado um dos mais potentes, pode estimular uma reação em cadeia clássica denominada peroxidação lipídica, tendo o ácido araquidônico como principal alvo. Tal peroxidação pode desencadear produção de linfocinas, vasodilatação e reabsorção óssea em torno de elementos dentais (MORROW *et al*, 1990; MORROW; ROBERTS, 1991).

Óxido nítrico (NO^{\bullet}) pode ser produzido por macrófagos e pelo endotélio vascular. Reagindo com o ânion superóxido e gerando peroxinitrito ($ONDO^{\bullet-}$) pode produzir danos severos a moléculas biológicas (STUEHR; KWON; NATHAN, 1990). O cigarro contém vários oxidantes e avaliações em pulmão de fumantes mostraram a presença de grande quantidade da glutatona reduzida (GSH), comparado a não fumantes (CANTIN *et al*, 1987).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser produzido por bactérias periodontopatogênicas e também por fagócitos através de derivados de NADPH-oxidase. Possui várias funções fisiológicas, enquanto fraco agente oxidante, no entanto, possui elevado potencial destrutivo devido sua capacidade de se difundir livremente através das membranas celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b). Um exemplo de dano causado pelo peróxido de hidrogênio é a oxidação de uma importante proteína nuclear chamada NF- κ B, responsável pelo processo de transcrição de inúmeras citocinas pro-inflamatórias, de importância na patogênese da doença periodontal, incluindo a interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), β -interferon e fator de necrose tumoral- α (FNT- α) (LIBERMAN; BALTIMORE, 1990).

O ácido hipocloroso (HClO) é formado pela ação da mieloperoxidase de fagócitos (exceto macrófagos) e é liberado no meio extracelular. É considerado um potente antibacteriano, entretanto, é capaz de alterar a função de algumas proteínas, até mesmo em concentrações baixas. A lise celular ocorre em concentrações altas de ácido hipocloroso. Além disso, é capaz de oxidar a α 1-antitripsina e ativar colagenases neutrofilicas (SUOMALAINEN *et al*, 1991; WEISS, 1989). O ácido hipocloroso é removido principalmente pela reação dos antioxidantes albumina e ácido ascórbico (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b).

A mieloperoxidase é uma enzima que compõe um eficiente sistema antimicrobiano, presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Seu mecanismo de ação baseia-se na síntese do peróxido de hidrogênio, pelos neutrófilos, por ação da enzima superóxido dismutase, a partir de duas moléculas de superóxido. A mieloperoxidase converte o peróxido de hidrogênio, na presença de uma hialida (como o cloreto), em ácido hipocloroso que é um poderoso oxidante. Isto mata as bactérias por oxidar a sua membrana plasmática e criar ligações moleculares prejudiciais.(FRODE; MEDEIROS, 2001).

O oxigênio singlete (1O_2) é altamente reativo com lipídeos de membrana. Entretanto, informações sobre o seu papel na destruição tecidual são limitadas. Na doença periodontal, sua ação é desconhecida (CHAPPLE, 1997).

Como fontes exógenas de radicais livres encontramos as radiações gama e ultravioleta, os medicamentos, a dieta, o cigarro e os poluentes ambientais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999a).

Embora uma pequena quantidade de radicais livres seja necessária para manutenção da vida, sua produção excessiva, maior do que a sua velocidade de remoção pode conduzir a diversas formas de dano celular (GRACY, 1999). O ataque dos radicais sobre o DNA, RNA e

proteínas, pode gerar citotoxicidade, alergias, mutagênese e/ou carcinogênese, dependendo da proporção da exposição (MATÉS; PÉREZ-GÓMEZ; CASTRO, 1999).

Uma vez formados, os radicais livres podem ter vários destinos: unirem-se a outros radicais livres formando mais radicais livres; podem se unir a moléculas não-radicaais livres, iniciando uma reação em cadeia que forma novos radicais livres. O ataque dessas moléculas aos lipídeos das membranas inicia um processo chamado peroxidação lipídica, envolvido na gênese da aterosclerose. Podem ainda ser neutralizados, quer pelas defesas enzimáticas do organismo, quer pela presença de antioxidantes não enzimáticos, sejam minerais, glutathione, carotenóides, flavonóides, urato ou vitaminas (HALLIWELL, 1994).

A produção excessiva de radicais livres pode conduzir a diversas formas de dano celular e sua cronicidade pode estar envolvida com a etiogênese ou o desenvolvimento de numerosas patologias (SPEISKY; JIMÉNEZ, 2000). O envolvimento das ERO na patogenia de um grande número de moléstias é hoje um fato irrefutável. Igualmente, no curso do envelhecimento normal, avolumam-se provas de que o decréscimo da vitalidade celular, com o avançar da idade, seja resultado dos danos acumulados pela ação dos radicais livres, uma vez que estes são continuamente formados pelo próprio processo respiratório normal, por inevitáveis escapes de O_2 na intimidade dos tecidos (MONTERO, 1996).

Devido à produção inevitável dos radicais livres, existe em nosso organismo um sistema de defesa antioxidante. Entretanto, quando a homeostasia é rompida em favor dos radicais livres, cria-se uma situação de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1999b).

As defesas antioxidantes podem ser definidas como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c). Por meio de diferentes mecanismos, as ERO são inativadas de forma a impedir reações subseqüentes de propagação (SIES, 1993). As principais defesas antioxidantes presentes nos sistemas biológicos, podem ser verificadas no quadro abaixo.

Sistema	Função
<i>Não Enzimáticos</i>	
α-Tocoferol	Intercepta reação de lipoperoxidação
Beta-caroteno	Neutraliza 1O_2
Licopeno	Neutraliza 1O_2 e outros radicais
Ubiquinol 10	Seqüestrador de radicais
Ácido ascórbico	Inúmeras funções antioxidantes
Ácido úrico	Seqüestrador de radicais
Glutathiona	Inúmeras funções antioxidantes
Flavonóides	Seqüestrador de radicais
<i>Enzimáticos</i>	
Superóxido dismutase	Reações de dismutação de $O_2^{\cdot-}$
Catalase	Catalisa a reação sobre H_2O_2
Glutathiona peroxidase	Catalisa a reação sobre hidroperóxidos
<i>Enzimáticos Auxiliares</i>	
Glutathiona-S-Transferase	Reação de conjugação e excreção de xenobióticos
Glutathiona redutase	Colabora no ciclo da GSH

Quadro 1 – Defesas antioxidantes dos sistemas biológicos (SIES,1993)

As principais defesas antioxidantes enzimáticas celulares são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), e a glutathiona peroxidase (GPx), que constituem a primeira defesa endógena de neutralização das ERO. Através delas, as células conseguem manter baixas as quantidades de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio, evitando assim, a formação do radical hidroxil na reação de Haber Weiss (BOVERIS; CADENAS, 1997). A ação combinada do trinômio enzimático (SOD, CAT e GPx), mantém a célula com concentrações reduzidas de $O_2^{\cdot-}$ e peróxido de hidrogênio, evitando aumentos na geração de $\cdot OH$ (CHANCE; SIES; BOVERIS, 1979), constituindo uma estratégia comum a todos os organismos aeróbicos.

A SOD, presente em quase totalidade dos organismos eucarióticos, catalisa a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , (MACCORD; FRIDOVICH, 1969). Durante o processo de dismutação, duas moléculas de ânion superóxido reagem seqüencialmente, resultando na redução (ganho de elétrons) de uma e oxidação (perda de elétrons) de outra (FRIDOVICH, 1979).

As ações da catalase e da enzima glutathione peroxidase incidem sobre a metabolização/degradação do peróxido de hidrogênio. A catalase decompõe especificamente o peróxido de hidrogênio em água e O₂ (FARBER; KYLE; COLEMAN, 1990).

As peroxidases são enzimas que utilizam doadores de elétrons para reduzir, por exemplo, peróxido de hidrogênio em água (CRISTOPHERSEN, 1969). Talvez a mais importante das peroxidases seja a glutathione peroxidase (GPx), enzima que possui selênio em seu sítio catalítico, e utiliza o tripeptídeo tiólico glutathione reduzida (GSH) como doador de elétrons para a redução do peróxido de hidrogênio e outros peróxidos orgânicos, como os lipoperóxidos provenientes de lipoperoxidação lipídica. Durante o processo catalisado pela GPx, ocorre a oxidação da glutathione, formando-se uma ponte de dissulfeto entre duas moléculas de GSH, originando a forma oxidada (GSSG) (KELLING; SMITH, 1982).

Existem enzimas acessórias que participam no processo antioxidante auxiliando na manutenção do poder redutor intracelular, tais como a glutathione reductase (GR). Esta enzima catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG) através da oxidação do NADPH, permitindo assim, a contínua regeneração da GSH, da ação da GPx e da GST (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c).

Dos componentes não-enzimáticos da defesa antioxidante destacam-se alguns minerais (cobre, manganês, zinco, selênio e ferro), vitaminas (ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A), carotenóides (beta-caroteno, licopeno e luteína), bioflavonóides (genisteína, quercetina) e taninos (catequinas) (PAPAS, 1999).

O tripeptídeo glutathione (γ -L-glutamyl-L-cystenyl-glycine, GSH) age diretamente como sequestrador de radicais livres ou age como um co-substrato junto da glutathione peroxidase (GPx), catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (FORMAN *et al*, 1997). Importante também é a contribuição da GSH na recuperação da vitamina E e na reciclagem de dehidroascorbato a ascorbato, por uma via enzimática onde a GSH-dehidroascorbato-reductase é preponderante (MAY *et al*, 1997). A relação entre GSH/GSSG deve ser alta para a manutenção do poder redutor intracelular (KAPPUS, 1987).

A vitamina C, presente como ascorbato na maioria dos organismos biológicos, é considerada entre os mais importantes antioxidantes hidrossolúvel dos fluídos extracelulares (STOCKER; FREI, 1991). O ascorbato tem sido mostrado como um eficiente sequestrador de O₂^{•-}, H₂O₂, [•]OH e do radical peroxil ([•]OOL) (ROSE, 1987). O ascorbato age protegendo biomembranas contra a peroxidação, perpetuando, desta forma, a atividade do α -tocoferol, principal componente da vitamina E, um antioxidante não enzimático lipossolúvel,

considerado o mais importante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999b).

A reatividade da vitamina E com $\cdot\text{OOL}$, protegendo a membrana lipídica de ataques de ERO, ocorre por sua atividade antioxidante e, acredita-se, que seja a sua mais importante função bioquímica *in vivo*. Tal reatividade é de considerável importância, porque tocoferóis reagem com o $\cdot\text{OOL}$, produzindo um hidroperóxido relativamente estável (LOOH) e um radical tocoferil, interrompendo a cadeia de propagação de ERO (SIES, 1993).

Além da função de precursores de vitamina A, os carotenóides têm sido caracterizados por exibirem uma característica biológica adicional, atuando como eficientes seqüestradores de ERO (BURTON; INGOLD, 1984). Outros grupos têm descrito o β -caroteno como um agente inibidor da peroxidação lipídica, seqüestrando o $\cdot\text{OOL}$, desta forma interrompendo a cadeia de propagação das ERO (KRINSKY; DENEKE, 1982; BURTON; INGOLD, 1984).

Estas substâncias antioxidantes são capazes de capturar e neutralizar, de modo permanente, os radicais livres e as diversas formas ativas de oxigênio, favorecendo a formação de um ambiente benéfico para o organismo, inibindo o fator de lesão tecidual (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c).

A toxicidade das ERO é influenciada pela presença de diferentes tipos de antioxidantes presentes na dieta. O zinco e cobre têm sido reconhecidos como importantes cofatores da SOD. Esta enzima protege as células, controlando a produção de radicais livres, evitando os seus efeitos deletérios. A depleção dietética da vitamina E mostrou estar associada com o aumento da formação da peroxidação lipídica em um grande número de lesões bioquímicas e patológicas. Uma ingestão adequada de vitamina E parece proteger o organismo contra doença vascular, devido ao fato desta inibir a peroxidação lipídica (McCALL; FREI, 1999).

Assim, uma alimentação pode conter um grande número de antioxidantes e pró-oxidantes. A quantidade relativa dos mesmos pode influenciar a susceptibilidade de um indivíduo em desenvolver estresse oxidativo, devido ao desequilíbrio nutricional (CLARKSON; THOMPSON, 2000).

Desta forma, acredita-se que mesmo na presença de grande número de mecanismos potentes de defesas antioxidantes dentro das células, muitas vezes os fatores oxidantes podem superar estes sistemas de proteção endógenos e determinar lesões teciduais por meio das membranas lipídicas de células e organelas, desnaturação de proteínas estruturais, lesões mutagênicas ou letais dos ácidos nucleicos e a desnaturação de polissacarídeos (BENZIE, 2000).

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Estudar o estresse oxidativo no tecido gengival em indivíduos com doença periodontal.

4.2 Específicos

- Avaliar o estado nutricional por meio de medidas antropométricas e dietéticas;
- Avaliar a condição periodontal através da profundidade de sondagem;
- Determinar os níveis de antioxidantes enzimáticos tais como a catalase, a glutathione redutase, a glutathione peroxidase e a glutathione S-transferase;
- Determinar os níveis dos antioxidantes não enzimáticos como a glutathione total e reduzida;
- Determinar o dano celular por meio do TBARS e níveis de glutathione oxidada;
- Avaliar os níveis da mieloperoxidase no tecido gengival com e sem periodontite;
- Correlacionar os diferentes parâmetros analisados com a incidência de periodontite.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 População do estudo

A população deste estudo envolveu pacientes que se submeteram ao tratamento cirúrgico em consultório odontológico, situado na cidade de Florianópolis.

5.1.1 Amostra

Foram selecionados 18 indivíduos entre homens e mulheres, com idade variando entre 22 a 60 anos, divididos em dois grupos: Grupo Controle - A, formado por indivíduos saudáveis com os seguintes critérios de inclusão: ausência de sinais e sintomas de inflamação crônica ou aguda no tecido gengival (dor, rubor, calor, tumor e sangramento à sondagem periodontal). A profundidade de sondagem, neste grupo, não ultrapassou três milímetros. O grupo Experimental – B, composto por indivíduos com periodontite grave, com os seguintes critérios de inclusão: presença de inflamação crônica, diagnosticada de acordo com a profundidade de sondagem aumentada, que variou entre 6 e 9 milímetros.

A lesão periodontal pode ser diagnosticada em leve e grave ou avançada. Os critérios para tal determinação são a profundidade de sondagem, as medições do nível de inserção e a análise radiográfica. A profundidade de sondagem é a distância da margem da gengiva ao fundo da bolsa periodontal, medida utilizando-se uma sonda graduada. O nível de inserção é expresso pela distância em milímetros da junção cimento-esmalte ao fundo da bolsa ou sulco gengival. Na doença periodontal leve a profundidade de sondagem, as medições do nível de inserção e a análise radiográfica indicam uma perda dos tecidos de suporte não excedendo a um terço do comprimento da raiz. A inflamação deve estar presente, sangramento à sondagem ocorrerá quando o sítio for sondado no fundo da bolsa. Na periodontite grave ou avançada, os critérios de diagnóstico indicam perda dos tecidos de suporte ultrapassando um terço do comprimento da raiz (LINDHE, 1999).

Para ambos os grupos, foram observados como critério de exclusão presença de: 1) doenças clínicas infecciosas, cardiovasculares e neurológicas, insuficiência renal e diabetes; 2) gravidez; 3) uso do cigarro; 4) utilização de antibióticos e/ou antiinflamatórios hormonais e não-hormonais, seis meses previamente à análise dos dados (BUCHMAN *et al*, 2002).

As amostras foram coletadas dos pacientes através de cirurgia. Todos os procedimentos cirúrgicos foram avaliados e realizados por um periodontista, de acordo com a

necessidade de cada tratamento. Os pacientes normais (grupo controle - A) possuíam necessidade de exodontia dos terceiros molares inclusos e impactados, por recomendações ortodônticas ou indicação de reabertura para implantes dentários. No ato do procedimento cirúrgico, foram removidos fragmentos gengivais, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Já os pacientes com doença periodontal (grupo Experimental - B), submeteram-se à técnica da gengivectomia do bisel invertido (PONTORIERO; CARNEVALE, 2001), para redução da bolsa periodontal, sendo que o excesso de tecido gengival foi removido e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise laboratorial (Figuras 1-6).



Figura 1 – Vista palatina da gengiva.



Figura 2 – Vista palatina da incisão cirúrgica.



Figura 3 – Vista vestibular da lesão óssea.



Figura 4 – Vista palatina da sutura.



Figura 5 – Tecido gengival removido.



Figura 6 – Imersão das amostras em nitrogênio líquido.

A evolução e a atividade de periodontite foram detectadas após os pacientes com periodontite (Grupo Experimental - B) terem passado por sessões de terapia relacionada à causa, que constituíram de instruções de higiene oral, raspagem e alisamento radiculares. Neste grupo, houve persistência do sangramento à sondagem (BADERSTEN; NILVÉUS; EGELBERG, 1990).

Realizou-se um trabalho de esclarecimento e de repetidas explicações, para ambos os grupos, sobre o procedimento de avaliação bem como benefícios e precauções observadas, para evitar quaisquer malefícios à integridade dos participantes.

A casuística do estudo incluiu todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, após a leitura e assinatura do consentimento livre e esclarecido (apêndice A), exceto os que não apresentaram capacidade de entendimento, comunicação e portadores de deficiências físicas, ou ambos, que comprometeram a coleta dos dados.

5.2 Delineamento do estudo

O presente estudo caracterizou-se como sendo transversal, onde foi investigada, em um único momento, a relação entre periodontite, defesas antioxidantes, níveis de mieloperoxidase e lipoperoxidação tecidual de indivíduos sadios e com doença periodontal avançada.

A pesquisa foi realizada em dois momentos. Inicialmente foi realizada a avaliação do estado nutricional e da doença periodontal. A seguir foram coletadas amostras do tecido gengival e armazenadas em nitrogênio líquido, no período compreendido entre julho e agosto de 2003. O segundo momento, imediatamente após a coleta, caracterizou-se pela análise laboratorial dos fragmentos gengivais.

Foram coletados dos pacientes por meio de entrevista, exames bioquímicos e clínicos os

seguintes dados:

1) Identificação do paciente (apêndice B): sexo, idade, tipos de diagnósticos e a duração da doença periodontal; 2) Dados para a avaliação do estado nutricional (apêndice B); 3) Parâmetros clínicos periodontais (apêndice C); 4) Atividades de antioxidantes enzimáticos; 5) Níveis de antioxidantes não-enzimáticos; 6) Níveis de dano celular; 7) Atividade da mieloperoxidase;

5.2.1 Desenho experimental

Grupo Controle – A	Pacientes normais
Grupo Experimental – B	Pacientes com periodontite

5.2.2 Variáveis do estudo

As variáveis avaliadas no estudo (Quadro 2) foram: Independentes (sexo, idade, dados antropométricos) e dependentes (profundidade de sondagem, dosagem dos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, dano tecidual e atividade da mieloperoxidase).

Variável	Tipo	Mensuração
Sexo	Nominal	Masculino e Feminino
Idade	Intervalar	Em Anos
Dados antropométricos	Intervalar	Em metros, centímetros e milímetros
Catalase	Intervalar	Em $\text{mmol min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Glutathiona Peroxidase	Intervalar	Em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Glutathiona S-transferase	Intervalar	Em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Glutathiona Redutase	Intervalar	Em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$
Glutathiona Reduzida	Intervalar	Em mM
Glutathiona Total	Intervalar	Em mM
Glutathiona Oxidada	Intervalar	Em mM
Mieloperoxidase	Intervalar	Em Um mL^{-1}
TBARS	Intervalar	Em nmol g^{-1}
Profundidade de sondagem	Intervalar	Em milímetros

Quadro 2 – Relação das variáveis independentes e dependentes estudadas.

5.3 Avaliação do estado nutricional

O estado nutricional dos pacientes foi avaliado por meio de medidas antropométricas. Para tanto, foram considerados os seguintes parâmetros: idade, sexo, índice de massa corporal (IMC); circunferência braquial (CB); circunferência muscular (CM) e prega tricipital (PCT).

5.3.1 Avaliação antropométrica (apêndice B):

Os indivíduos do grupo controle experimental foram submetidos à avaliação da composição corporal, obtendo-se o Índice de Massa Corporal e de pregas cutâneas e circunferências.

5.3.1.1 Índice de Massa Corporal (IMC)

O IMC foi determinado segundo a WHO (1995). O IMC, ou índice de Quetelet, é um indicador do estado nutricional calculado por meio da fórmula: $IMC = P/(A)^2$, sendo P= peso, em quilogramas, e A= altura, em metro elevado ao quadrado (Kg/m^2).

O peso corporal foi obtido por meio de uma balança eletrônica da marca Tanita, tipo portátil, com plataforma e capacidade máxima de 136 Kg em escala de 100g. Na obtenção do peso foram utilizados os seguintes procedimentos: roupas leves e descalço, o indivíduo permaneceu de pé sobre a plataforma da balança, no centro da mesma, com o peso do corpo distribuído igualmente em ambos os pés e com os braços ao lado do corpo; a massa foi registrada em quilos (kg) e gramas (g) (WHO,1995).

A estatura foi verificada utilizando-se uma fita métrica graduada e inelástica, com escala de precisão de 0,1cm, conforme preconizado pela WHO (1995). O indivíduo permaneceu descalço, encostado na parede, de forma ereta, pés unidos, com membros superiores pendentes ao lado do corpo, com o peso distribuído igualmente em ambos os pés, colocando as superfícies posteriores dos calcanhares, as nádegas e a região occipital em contato com a escala de medida. A cabeça ficou orientada de modo que a linha de visão estivesse perpendicular ao corpo, ou seja, paralela ao solo. O avaliado foi orientado para inspirar profundamente e em apnéia respiratória foi tomada a medida de estatura com uma aproximação de 0,1 cm. A referência para a mensuração foi o ponto mais alto da cabeça com pressão suficiente para comprimir o cabelo (WHO, 1995).

O IMC determinado a partir do peso e da altura foi classificado de acordo com os pontos de corte recomendados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1995, 1998).

Classificação	Índice de Massa Corporal (IMC)
Magreza severa	< 16,0
Magreza moderada	16,00 – 16,99
Magreza leve	17,00 – 18,49
Adequado	18,50 – 24,99
Pré-obesidade	25,00 – 29,99
Obesidade classe I	30,00 – 34,99
Obesidade classe II	35,00 – 39,99
Obesidade classe III	≥ 40,0

Quadro 3 - A classificação do IMC segundo a WHO, 1995 e 1998.

5.3.1.2 Pregas cutânea tricipital

A medida da prega cutânea tricipital foi coletada com um compasso de pregas da marca Baseline, no hemicorpo direito do avaliado em repouso. Foi realizada em triplicata, sendo a média usada nos cálculos. A coleta da prega tricipital foi realizada na parte posterior do braço direito, sobre o tríceps, no ponto medial de uma linha imaginária paralela ao longo eixo do braço. Para localizar este ponto médio, o braço estava paralelo ao corpo e o cotovelo flexionado em 90°, com a palma da mão voltada para cima. O examinador localizou a projeção lateral acromial, no ombro, e uma pequena marca era feita no ponto identificado, e o ponto mais distal do processo olecranon da ulna, no cotovelo, foi também localizado e marcado. Uma fita métrica colocada sobre estes dois pontos de referência foi usada para achar o ponto médio entre eles, que foi então marcado (WHO, 1995).

O indivíduo avaliado permaneceu de pé com o braço paralelo ao tronco e relaxado. Agarrou-se uma prega vertical de pele e tecido subcutâneo com o polegar e o dedo indicador esquerdos, a cerca de 1 cm do ponto médio marcado, separando-se o tecido adiposo subcutâneo do tecido muscular abaixo. O compasso foi segurado na mão direita do

mensurador e suas ponteiros foram aplicadas perpendicularmente à prega cutânea no nível marcado. O observador curvou-se para baixo para ler o compasso, evitando assim, erros devido à paralaxe (WHO,1995).

5.3.1.3 Circunferência braquial

A circunferência braquial foi medida em triplicata, realizando-se uma média entre elas para obter-se a medida final. A medida foi tomada no ponto médio do braço direito, localizado da mesma forma como anteriormente citado para a prega tricipital, utilizando-se uma fita métrica graduada, flexível e inelástica, com precisão de 0,1cm, obedecendo a técnica preconizada pela WHO (1995). O indivíduo estava com uma roupa frouxa sem mangas para permitir total exposição do braço e da área do ombro. No momento da medição estava ereto, com o braço estendido ao longo do corpo e paralelo ao tronco, e a palma voltada para a coxa. A fita então foi colocada ao redor do braço, no ponto médio anteriormente marcado, sem compressão dos tecidos moles, registrando-se a medida da circunferência (WHO, 1995).

5.3.1.4 Circunferência Muscular do Braço

A circunferência muscular foi calculada segundo a WHO (1995), a partir da circunferência braquial (CB) e da prega cutânea tricipital, (PCT) pela seguinte fórmula:

$$\text{CBM (cm)} = \text{CB (cm)} - (3,14 \times \text{PCT})$$

5.3.2 Caracterização dietética

Para caracterização do consumo alimentar de antioxidantes foi utilizado o questionário de frequência (apêndice D) adaptado de Sachs (1997). No apêndice D, podem ser observados os alimentos avaliados por grupos.

5.4 Avaliação periodontal

Previamente às coletas do tecido gengivais, foram executadas avaliações periodontais. Resultados de pesquisas clínicas em humanos demonstraram que a forma de doença periodontal em adultos afeta diferentes partes da dentição e em graus variáveis. Dessa forma, foi utilizada a profundidade de sondagem para avaliar e selecionar os sítios considerados de moderados a profundos (entre 6 e 9 milímetros). A profundidade de sondagem é a distância da margem gengival ao fundo da bolsa periodontal, medida utilizando-se uma sonda graduada em milímetros (LINDHE, 1999).

A profundidade de sondagem foi executada por um periodontista previamente treinado, utilizando-se uma sonda periodontal Michigan, com marcações de 1 em 1 milímetro (Hu-Friedy Mfg. Co., Chicago, IL), tendo a margem gengival como ponto de referência. Os registros foram anotados em ficha periodontal própria (apêndice C) e valores intermediários arredondados para as marcações mais próximas da sonda (Figura 7).



Figura 7 – Profundidade de sondagem utilizando sonda periodontal.

5.5 Viabilização do estudo

O projeto do estudo passou por apreciação da Comissão de Ética em pesquisa com Seres Vivos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), onde foi aprovado na reunião do dia 24 de fevereiro de 2003. Foi entregue uma autorização de consentimento para cada paciente assinar. Desta forma, contemplava-se uma exigência da Comissão, onde os pacientes autorizaram a realização da coleta e futura publicação (Anexo).

5.6 Métodos laboratoriais

5.6.1 Preparo das amostras

5.6.1.1 Tecido Gengival

Após a coleta, os fragmentos gengivais foram armazenados em nitrogênio líquido e conduzidos ao laboratório. No laboratório, foram mantidos em gelo para avaliação do peso e preparação do homogenato e extrato ácido para as determinações bioquímicas (Figura 8 e 9).



Figura 8 – Remoção das amostras no laboratório.



Figura 9 – Pesagem das amostras.

5.6.1.1.1 Homogenato

Após os fragmentos gengivais terem sido lavados com solução salina, os homogenatos foram obtidos em tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7.4 contendo 0,1% de Triton X-100 e 150mM de cloreto de sódio (1:20 p/v). A homogeneização foi mantida a 4°C, com cerca de 20 impactos em homogeneizador Potter-Elvehjem (Figura 10), seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram mantidos a -20°C até a sua utilização para a dosagem da atividade da catalase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase, glutathiona S-transferase e mieloperoxidase. A avaliação do dano celular foi realizada em homogenato fresco, ou seja, logo após a sua preparação.



Figura 10 – Utilização do homogeneizador.

5.6.1.1.2 Extrato ácido

Porções gengivais foram imediatamente, após a retirada do nitrogênio líquido, precipitadas com ácido tricloroacético 12% (1:20p/v) e homogeneizadas com cerca de 20 impactos em homogeneizador, seguidos de centrifugação a 10000g durante 10 minutos (Figura 11). Imediatamente após a centrifugação, a determinação espectrofotométrica dos tióis não-protéicos (glutathiona reduzida e glutathiona total) foi realizada nos sobrenadantes (figura 12).



Figura 11 - Centrifugação das amostras.

5.6.2 Atividade dos antioxidantes enzimáticos

5.6.2.1 Atividade da catalase

A catalase foi determinada utilizando-se o método descrito por Aebi (1984). Este ensaio quantifica a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em 240 nm durante 20 segundos pela enzima presente na amostra. Nesta determinação, foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogênio 10mM em tampão fosfato 50mM, pH 7.0, preparada e titulada no dia da análise, à qual era adicionado 20 μ l da amostra e o valor da constante de velocidade da atividade da enzima (K) calculada nos 3 segundos iniciais. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os valores expressos em $\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$. Cálculo: CATALASE ($\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) = K x fatores de diluição (homogenato x cubeta) x 1,5 (corresponde à divisão de 60 segundos por 40 que é o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 em 240nm), onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para homogenato (0,1g de gengiva em 1,9ml de tampão) e 100x para a cubeta (20 μ l do homogenato em 2 ml de volume final).



Figura 12 – Uso do espectrofotômetro.

5.6.2.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

O método utilizado na determinação da glutathiona peroxidase foi o de Flohé & Gunzler, (1984), onde esta enzima catalisa a redução do peróxido de hidrogênio, bem como de outros hidroperóxidos, utilizando a glutathiona reduzida (GSH) como substrato para esta reação, produzindo glutathiona oxidada (GSSG). Nesta determinação, foi utilizado 10 μ l da amostra e 10 μ l de ter-butilhidroperóxido (t-BuOOH) colocados em 1ml de meio de reação composto por 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0, 8,6mg de NADPH, 10ml de ácido dietilenotriaminopentacético (DPTA) 5mM, pH 7.0, 15ml de água destilada, 24mg de glutathiona redutase (GR), e 5U de glutathiona reduzida (GSH), colocada momentos antes do ensaio. Este ensaio é baseado na medida do decréscimo da absorvância promovido durante a redução da GSSG catalisada na presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção da GSSG a partir da GSH em presença de t-BuOOH, catalisada pela GPx. Os valores da atividade da GPx foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Cálculo: $\text{GPx } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}) = (K - K_1) / 6,22) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{cubeta)}$, onde K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro, K_1 corresponde à absorvância do branco e 6,22 corresponde ao coeficiente de extinção molar do NADPH ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para homogenato (0,1g de gengiva em 1,9ml de tampão) e 102x para cubeta (10 μ l do homogenato em 1020 μ l de volume final).

5.6.2.3 Atividade da S-transferase (GST)

As determinações da enzima da glutathiona S-transferase foram medidas espectrofotometricamente em 340nm de acordo com Keen, Habig & Jakoby (1976) As glutathionas S-transferases são um grupo de enzimas que catalisam a formação de tioésteres, pela adição de GSH a um grande número de compostos que contém um carbono eletrofílico. O método consiste na adição de 10µl da amostra em um meio contendo 10µl de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno 0,1M (CDNB), 10µl de glutathiona reduzida (GSH) 0,1M e 970µl de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0 na cubeta da amostra. Na cubeta de referência os 10µl de amostra são substituídos por 10µl do tampão. As análises foram feitas em duplicatas e os valores de atividade da enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Cálculo: $\text{GST } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}) = (K / 9,6) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{cubeta)}$ onde 9,6 corresponde ao coeficiente de extinção molar do CDNB ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e K é a constante de velocidade da atividade da enzima calculada no programa (GBCUV-Kinetics) em um computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de gengiva em 1,9ml de tampão) e 100x para a cubeta (10µl do homogenato em 1ml de volume final).

5.6.2.4 Atividade da glutathiona redutase (GR)

A glutathiona redutase foi determinada pelo método proposto por Carlberg & Mannervick (1975). A amostra (50µl) foi adicionada a um meio de reação (950µl) contendo 25ml de tampão fosfato 0,1M, pH 7.0, 8,6mg de NADPH, 10ml de DPTA 5mM, pH 7.0, 30,6mg de glutathiona oxidada (GSSG) e 15ml de água destilada, e durante 30 segundos em 340nm, foi verificada a taxa de oxidação do NADPH, devido à redução da glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona redutase presente na amostra. Os valores foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}$. Cálculo: $\text{GR } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{g}^{-1}) = (K / 6,22) \times \text{fatores de diluição (homogenato} \times \text{cubeta)}$, onde 6,22 é o coeficiente de extinção molar do NADPH ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e K era a atividade da enzima calculada no programa (GBCUV – Kinetics) em computador acoplado ao espectrofotômetro. Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de gengiva em 1,9ml de tampão) e 20x para a cubeta (50µl do homogenato em 1ml de volume final).

5.6.3 Análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas

5.6.3.1 Glutathiona reduzida (GSH)

A concentração de glutathiona reduzida em precipitado ácido de gengiva foi determinada pelo método de Beutler, Duron & Kelly (1963). A adição de 0,2ml de ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) 2,5mM nas cubetas contendo 1,9ml de tampão fosfato 0,2M, pH 8.0 e 0,1ml do extrato ácido, permitia, após 3 minutos, a obtenção da formação máxima do ânion tiolato (TNB), de cor amarela, mensurável em 412nm. As concentrações foram expressas em mM de glutathiona reduzida. Cálculo: $GSH (mM) = (A_{412} / 14,1) \times \text{diluições (extrato ácido} \times \text{cubeta} \times \text{DTNB)}$, onde A_{412} corresponde à absorvância em 412nm e 14,1 ao coeficiente de extinção molar do ânion tiolato (TNB). Os fatores de diluição utilizados foram: 20x para o homogenato (0,1g de gengiva em 1,9ml de tampão), 20x para a cubeta (0,1ml do homogenato em 2ml de volume final) e 1,1x do DTNB (0,2ml do DTNB em 2,2ml de volume final).

5.6.3.2 Determinação da glutathiona total (GT)

O princípio da determinação da glutathiona total foi semelhante ao da glutathiona reduzida (GSH), baseada no método descrito por Tietze (1969), onde a velocidade de formação do ânion tiolato (TNB) é proporcional à formação de glutathiona reduzida (GSH). Os reagentes utilizados foram: tampão fosfato 0,1M pH 8.0; TCA 12%; DTNB 2,525mM (15mg em 15ml de citrato de sódio 1%); NADPH 1,5mM ($1,5\mu\text{mol ml}^{-1} \text{NaHCO}_3 = 2,5\text{mg para } 1\text{ml NaHCO}_3$ 0.5%); GR: 0,3U/ml (4,5 μl de GR para 1ml de tampão). Cálculo: $GLUTATIONA\ TOTAL (mM) = (k_1/k_2) \times \text{diluição} \times 2$.

5.6.4 Atividade da mieloperoxidase

As amostras do lavado gengival de pacientes normais e com doença periodontal foram processadas para a quantificação das concentrações de mieloperoxidase. Volumes de 40 μl do lavado ou do padrão mieloperoxidase de neutrófilos humanos (0,7-140 mU ml^{-1}) foram transferidos para cubetas e a reação bioquímica iniciada com a adição de 360 μl de meio tampão (0,167 mg/ml de o-dianisidina 2HCl e 0,0005% de H_2O_2 (RAO *et al*, 1993). Após 15 min de incubação, à temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida com a adição

de 30µl de azida sódica (1%). A seguir, as amostras foram centrifugadas (50g, 5 min) e o sobrenadante transferido em cubetas, para posterior leitura das densidades óticas (450 nm) em espectrofotômetro (Hitachi U-2001-modelo121-0031). Curvas-padrão com concentrações conhecidas da mieloperoxidase (0,7-140 mU ml⁻¹) também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores desconhecidos em mU m⁻¹, com o auxílio da equação da reta.

5.6.5 Determinação da lipoperoxidação tecidual

As substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram medidas na gengiva. O teste usado para avaliar o dano celular foi baseado no trabalho descrito por Ohkawa, Oshishi & Yagi (1979) e Bird & Draper (1984). Os homogenatos dos tecidos foram precipitados pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 12% e agitados vigorosamente por 5 segundos (1ml de TCA 12% para 100µl da amostra). Em seguida, foram incubados por 60 minutos a 100°C na presença de 0,9ml de tampão Tris-HCL 60mM, pH 7.4 (0,1mM DPTA) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,76%. Após a incubação, o material foi resfriado durante 30 minutos a 5°C, e posteriormente centrifugado por 5 minutos a 10000g. A leitura foi realizada em 535nm e a absorbância expressa em nmol g⁻¹. Cálculo: TBARS (nmol g⁻¹) = $A_{535}/153$ (representa o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($\epsilon_{535}=153M^{-1}cm^{-1}$) x fatores de diluição (homogenato x tubo de ensaio). Os fatores de diluição utilizados foram 20x para o homogenato (0,1 de gengiva em 1,9ml de tampão) e 30x para o tubo de ensaio (0,1ml do homogenato em 3ml de volume final).

5.7 Análise estatística

Na análise descritiva os dados referentes à caracterização dos pacientes foram representados pela média seguida do desvio padrão da média. Na análise estatística, os dados foram representados pela média seguida do erro padrão da média, obtido nos dois diferentes grupos, analisado quanto à normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Bartlett), tendo sido considerados paramétricos. Os dados foram então comparados utilizando o teste de t de “Student”, não pareado, considerando como significantes valores numéricos de $p < 0,05$.

5.8 Reagentes

Todos os reagentes envolvidos na análise bioquímica foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (Ohio, USA), enquanto que os utilizados para a obtenção de homogenatos e extratos ácidos (tampão fosfato e ácido tricloroacético) foram adquiridos da Reagen (Brasil).

6 RESULTADOS

6.1 Análise descritiva

6.1.1 Características gerais da população

Da população submetida ao tratamento odontológico, 18 pacientes foram selecionados, sendo no grupo controle 4 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, e no grupo experimental 4 mulheres e 5 homens. A idade e as características antropométricas estão na tabela 1.

Tabela 1 – Características antropométricas dos pacientes.

Parâmetros	Grupo controle – A	Grupo Experimental - B
Idade (anos)	46,77 ± 12,94	55,5 ± 11,32
IMC (Kg / m ²)	24,88 ± 3,72	27,65 ± 4,32
CB (cm)	30,30 ± 3,86	33,56 ± 2,66
PCT (mm)	14,55 ± 5,56	32,26 ± 10,76
CMB (cm)	24,23 ± 3,86	23,34 ± 3,12

*Média ± desvio padrão da média

IMC = Índice de massa corporal; CB = Circunferência braquial; PCT = Prega cutânea triptal; CMC = Circunferência muscular do braço.

As tabelas 2 e 3 mostram a frequência do consumo alimentar dos pacientes do grupo controle e experimental, respectivamente, referentes aos alimentos fontes de antioxidantes.

Tabela 2 - Frequência do consumo alimentar de alimentos fontes de antioxidantes dos pacientes do grupo controle.

Grupo / Alimento	Nunca/ Raro n (%)	Semanalmente			Diariamente			
		1 n (%)	2-3 n (%)	> 4 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	> 4 n (%)
Fruta, verduras e legumes	-	9 (100)	6 (67)	3 (33)	3 (33)	3 (33)	3 (33)	-
Leite / iogurte / queijo	1 (11)	3 (33)	4 (44)	1 (11)	8 (88)	1 (11)	-	-
Ovos / carnes	-	9 (100)	-	-	7 (77)	2 (22)	-	-
Peixe / frutos do mar	1 (11)	5 (55)	3 (33)	-	-	-	-	-
Tubérculo / massas	-	1 (11)	-	8 (88)	8 (88)	-	1 (11)	-
Grãos / oleaginosas	3 (33)	6 (67)	-	-	-	-	-	-
Gorduras	-	9 (100)	3 (33)	-	7 (77)	2 (22)	-	-

n = número de pacientes

Tabela 3 - Frequência do consumo alimentar de alimentos fontes de antioxidantes dos pacientes do grupo experimental.

Grupo / Alimento	Nunca / Raro n %	Semanalmente			Diariamente			
		1 n %	2-3 n %	> 4 n %	1 n %	2 n %	3 n %	> 4 n %
Fruta / verduras / legumes	-	-	4 (44)	5 (55)	9 (100)	-	-	-
Leite / iogurte / queijo	3 (33)	-	4 (44)	2 (22)	-	3 (33)	2 (22)	-
Ovos / carnes	-	6 (67)	3 (33)	-	-	-	-	-
Peixe / frutos do mar	-	6 (67)	2 (22)	1 (11)	9 (100)	-	-	-
Tubérculo / massas	-	2 (22)	6 (67)	1 (11)	6 (67)	3 (33)	-	-
Grãos / oleaginosas	6 (67)	3 (33)	-	-	3 (33)	-	-	-
Gorduras	-	9 (100)	-	-	9 (100)	-	-	-

n = número de pacientes

6.2. Análise estatística

6.2.1 Atividade dos antioxidantes enzimáticos

As defesas antioxidantes enzimáticas estudadas foram a catalase, a glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GTS) e glutathione reductase (GR).

6.2.1.1 Atividade da catalase

No gráfico 1 observou-se o nível da enzima catalase no grupo controle ($1,64 \pm 0,46$ $\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e no grupo experimental ($2,00 \pm 0,30$ $\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) apresentados pela média e erro padrão da média. Os dados apresentados para a catalase mostram um aumento desta enzima, porém esse não significativo.

Análise Bioquímica - Catalase

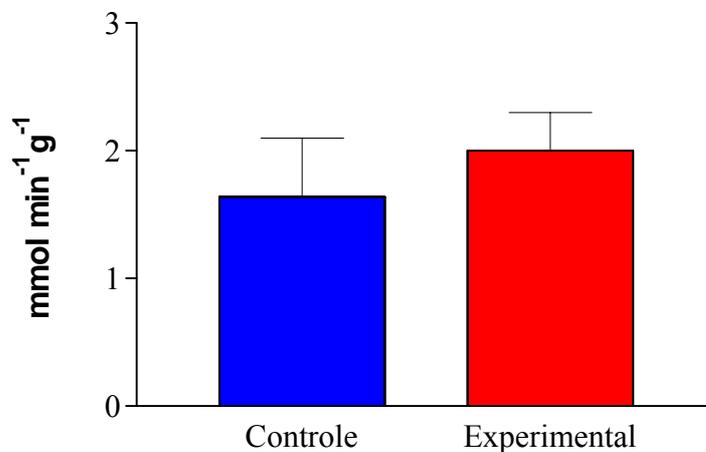


Gráfico 1. Concentração de Catalase ($\text{mmol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância mínimo de $p < 0,05$.

6.2.1.2 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

No gráfico 2, pode-se verificar os níveis da glutathiona peroxidase (GPx) no grupo controle ($0,80 \pm 0,11 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e no grupo experimental ($2,09 \pm 0,33 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) apresentados pela média e erro padrão da média. A análise estatística mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) da glutathiona peroxidase no grupo experimental, evidenciando a presença de estresse oxidativo nos pacientes com periodontite.

Análise Bioquímica - Glutathiona Peroxidase

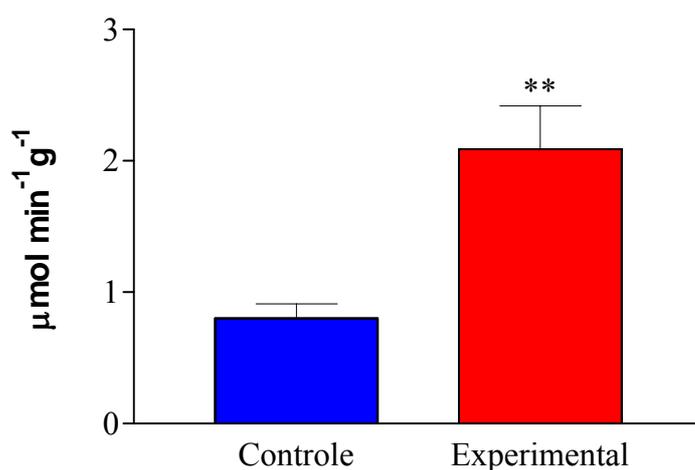


Gráfico 2. Concentração de GPx ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância $**p < 0,01$.

6.2.1.3 Atividade da S-transferase (GTS)

Os valores da S-transferase (GTS) observados no grupo controle foi $4,17 \pm 0,93 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e no grupo experimental $10,81 \pm 0,63 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, apresentados pela média e erro padrão da média estão apresentados no gráfico 3. Os dados mostram um aumento significativo ($p < 0,001$) no grupo com periodontite.

Análise Bioquímica - Glutathione Transferase

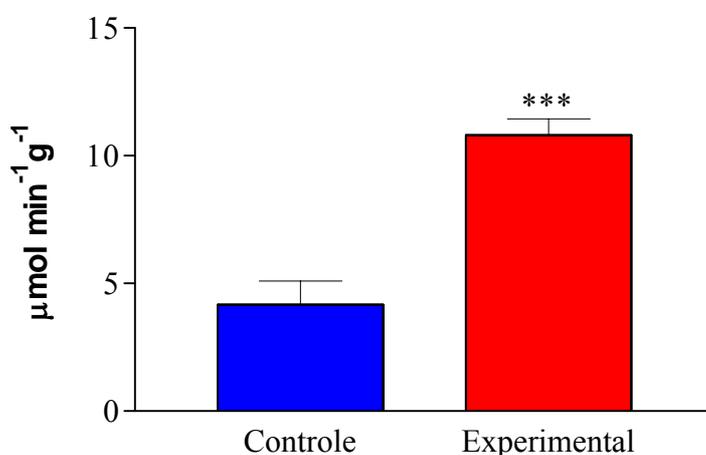


Gráfico 3. Concentração de GTS ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância *** $p < 0,001$.

6.2.1.4 Atividade da glutatona redutase (GR)

Na determinação da glutatona redutase (GR) encontrou-se os valores para o grupo controle de $0,28 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$ e no grupo experimental de $0,22 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$, apresentados pela média e erro padrão da média e estes podem ser observados no gráfico 4. Nesta análise verificou-se uma diminuição desta enzima no grupo experimental, porém não significativa.

Análise Bioquímica - Glutaciona Redutase

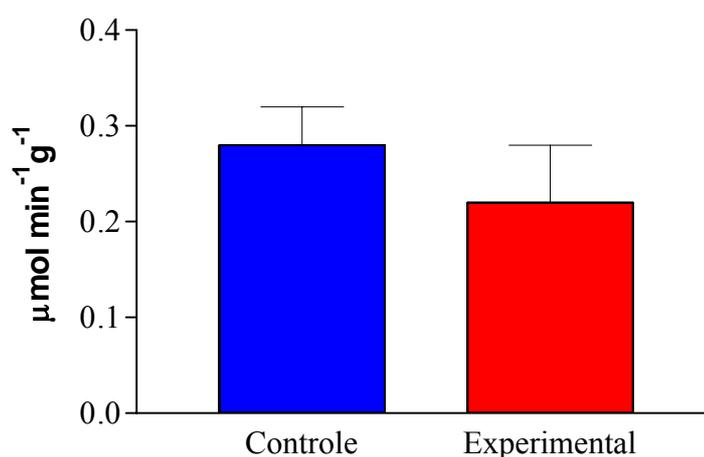


Gráfico 4. Concentração de GR ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{g}^{-1}$) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível mínimo de significância $p < 0,05$.

6.2.2 Análise das defesas antioxidantes não-enzimáticas

As defesas não enzimáticas analisadas foram a glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona total (GT), bem como outro biomarcador de estresse oxidativo, os níveis de Glutathiona oxidada (GSSG).

6.2.2.1 Glutathiona reduzida (GSH)

Observa-se no gráfico 5 os valores da média e erro padrão da média obtida da glutathiona reduzida (GSH) para o grupo controle ($0,38 \pm 0,08$ mM) e no grupo experimental ($0,46 \pm 0,06$ mM). Observou-se um aumento deste tripeptídeo no grupo experimental, porém não significativo.

Análise Bioquímica - Glutathiona Reduzida

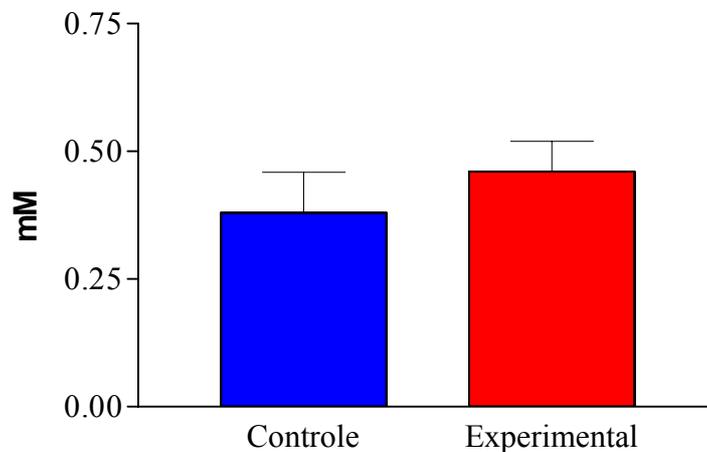


Gráfico 5. Concentração de GSH (mM) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível mínimo de significância $p < 0,05$.

6.2.2.2 Glutationa total (GT)

A glutaciona total (GT) apresentada em média e erro padrão da média do grupo controle ($0,51 \pm 0,11$ mM) e no grupo experimental ($0,63 \pm 0,09$ mM), pode ser observada no gráfico 6. Verificou-se neste gráfico um aumento significativo ($p < 0,05$) deste tripeptídeo no grupo experimental.

Análise Bioquímica - Glutationa Total

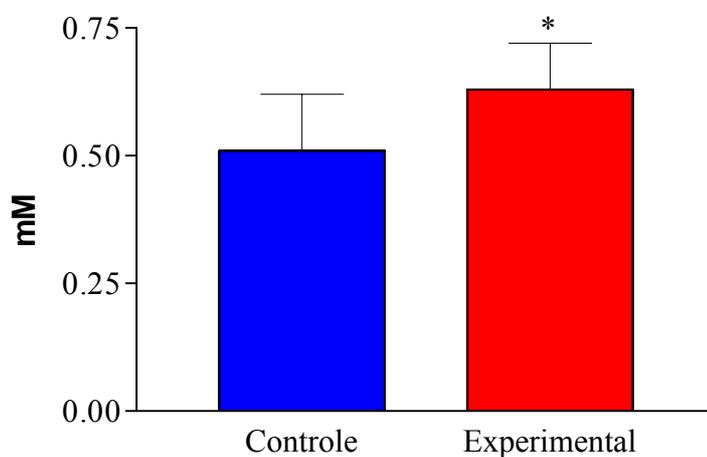


Gráfico 6. Concentração de GT (mM) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância $*p < 0,05$.

6.2.2.3 Glutationa oxidada (GSSG)

Os valores da glutathiona oxidada (GSSG) podem ser vistos no gráfico 7. Os dados estão apresentados pela média e erro padrão da média no grupo controle ($0,06 \pm 0,013$ mM) e no grupo experimental ($0,17 \pm 0,04$ mM). O resultado desta análise mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo experimental.

Análise Bioquímica - Glutationa Oxidada

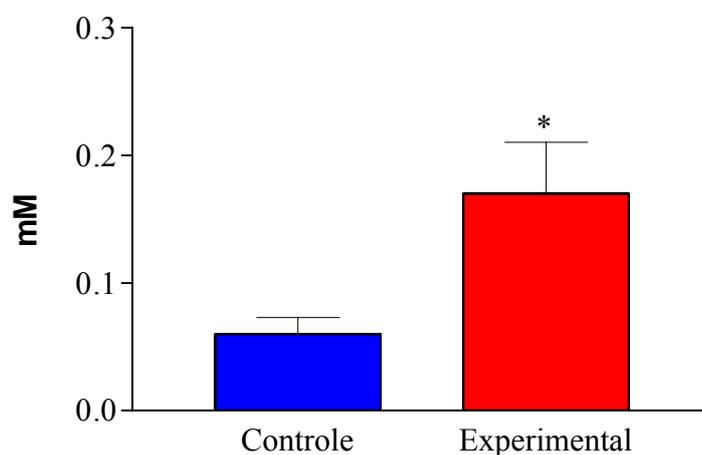


Gráfico 7. Concentração de GSSG (mM) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância $*p < 0,05$.

6.2.3. Atividade da Mieloperoxidase

Os valores da mieloperoxidase podem ser vistos no gráfico 8. Os dados estão apresentados pela média e erro padrão da média no grupo controle ($222,20 \pm 54,0$ mUmL) e no grupo experimental ($556,44 \pm 76,77$ mUmL). O resultado desta análise mostrou um aumento significativo ($p < 0,01$) no grupo experimental.

Análise bioquímica - Mieloperoxidase

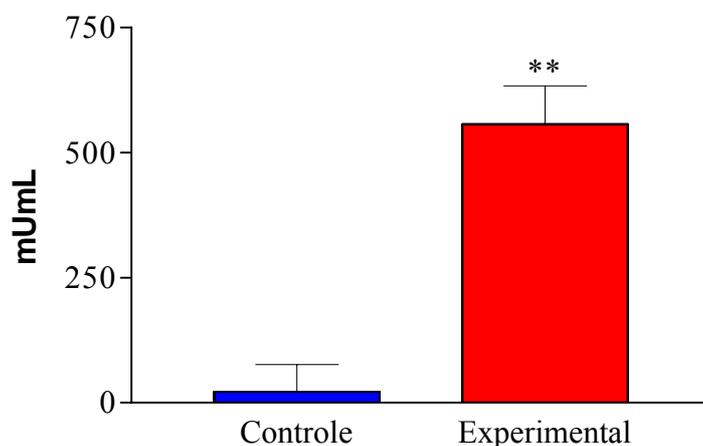


Gráfico 8. Concentração da Mieloperoxidase (mUmL) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância $**p < 0,01$.

6.2.4 Determinação da lipoperoxidação tecidual

A liperoxidação estudada através da determinação do TBARS pode ser observada no gráfico 9. Os dados estão apresentados pela média e erro padrão no grupo controle ($113,07 \pm 16,59 \text{ nmol g}^{-1}$) e no grupo experimental ($188,80 \pm 20,73 \text{ nmol g}^{-1}$). Verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no grupo experimental.

Análise Bioquímica - TBARS

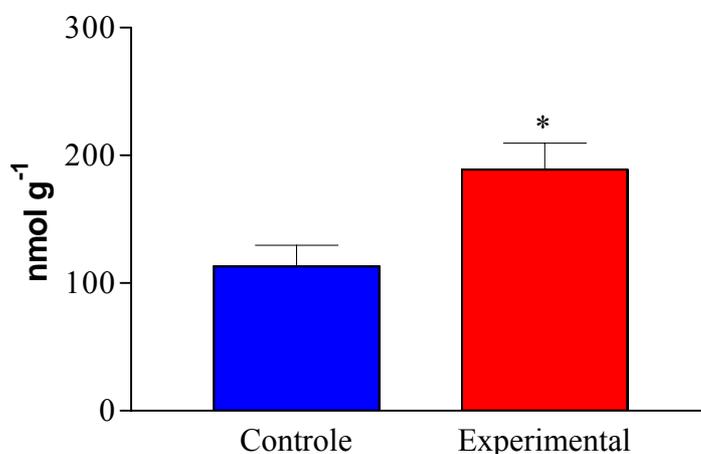


Gráfico 9. Concentração de TBARS (nmol g^{-1}) em gengiva de pacientes controles e de pacientes experimentais (com periodontite). As colunas representam as médias e as barras horizontais o erro padrão da média. Os grupos foram comparados por teste "t" de Student, com nível de significância $*p < 0,05$.

7 DISCUSSÃO

Poucos estudos têm considerado o efeito do desequilíbrio na atividade dos oxidantes/antioxidantes em pacientes com periodontite, predispondo tais indivíduos aos efeitos dos danos causados pelas ERO no periodonto. Se por um lado, Moore *et al* (1994) demonstraram que os níveis totais de antioxidantes na saliva de pacientes com doença periodontal eram iguais aos pacientes saudáveis, por outro lado, de acordo com Chapple (1997), os níveis de antioxidantes na saliva estavam diminuídos em pacientes com periodontite, comparados com o grupo controle. Ademais, Marton *et al* (1993) mostraram não haver qualquer alteração, quando comparados pacientes normais com aqueles caracterizados por periodontite crônica, nos níveis de antioxidantes presentes no fluido gengival.

A forte evidência relacionando as ERO na destruição patológica do tecido conjuntivo, durante a doença periodontal, está no fato de considerar a presença do infiltrado de neutrófilos como evento principal da resposta do hospedeiro contra a invasão bacteriana (PASSO; SYED; SILVA, 1982; MIYASAKI, 1991; SHAPIRA *et al*, 1991).

Ellis *et al* (1998) analisaram tecidos gengivais de pacientes com doença periodontal severa e mostraram que a atividade da SOD e da catalase, nestes tecidos, estava diminuída. No presente estudo, foi possível observar que a atividade da catalase em pacientes com periodontite estava ligeiramente aumentada em relação ao grupo controle, sem detectar diferenças significativas entre os grupos. Provavelmente, nos pacientes ora examinados, a doença periodontal não teria atingido aquele grau de severidade mencionado por aqueles autores.

A análise bioquímica da enzima glutathione peroxidase mostrou um aumento significativo no grupo experimental. É provável que esta diferença possa representar uma maior atividade da GPx nos sítios periodontais, atuando nas reações de detoxificação dos peróxidos orgânicos produzidos durante o estabelecimento do estresse oxidativo, em concordância com Flohé (1982).

A análise bioquímica da glutathione S-transferase, no presente estudo, mostrou um aumento significativo no grupo experimental. A GST compreende um grupo de enzimas capazes de detoxificar uma variedade de compostos, incluindo xenobiontes derivados de

microorganismos patogênicos, catalisando a sua conjugação com a GSH (SAGARA *et al*, 1998). Um aumento da ação da GST pode combater os efeitos das ERO produzidas no processo de detoxificação endógeno ou de fontes exógenas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c). Como a GST também tem um papel na neutralização das ERO através da ação sobre hidroperóxidos, os dados aqui obtidos sugerem que esta enzima provavelmente teve uma função importante no controle do estresse oxidativo causado pelo processo inflamatório periodontal.

O tripeptídeo glutathiona (GSH), atua diretamente como seqüestrador de radicais livres ou age como um co-substrato junto da glutathiona peroxidase (GPx), catalisando a redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (FORMAN; LIU; TIAN, 1997). Importante também é a contribuição da GSH na reciclagem de dehidroascorbato a ascorbato, por uma via enzimática onde a GSH-dehidroascorbato-redutase é preponderante (MAY *et al*, 1997). O papel da GSH na regulação de citocinas pró-inflamatórias (MORRIS; BERNARD, 1994) possui uma importante função na doença periodontal, apesar de não haver muitos estudos nesta área. Existem evidências de aumento da concentração da GSH em monócitos e macrófagos para o controle de ERO, produzidas pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (MORRIS; BERNARD, 1994). Neste estudo, observou-se um aumento deste tripeptídeo no grupo experimental, que, no entanto, não foi significativo. Um aspecto que pode ter sido determinante neste resultado, é o fato de algumas bactérias periodontopatogênicas degradarem a GSH, como foi mostrado nos estudos de Carlsson, Larsen & Edlund (1993, 1993). Em pacientes com periodontite crônica foram encontrados níveis mais baixos de GSH no fluido gengival crevicular, quando comparados com pacientes normais (CHAPPLE *et al*, 2002). Os valores médios obtidos foram na ordem de 0,6-2,5 mM, um pouco abaixo dos encontrados no presente trabalho.

A glutathiona redutase possui função antioxidante importante em conjunto com as glutathionas S-transferases. Sua atividade regenera a GSH a partir da GSSG em presença de NADPH, e altas razões de regeneração podem prevenir a perda celular de GSH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c). Nesta avaliação, observou-se uma ligeira diminuição da GR no grupo experimental, porém não significativa.

No presente estudo, a análise bioquímica da glutathiona total mostrou um aumento significativo no grupo experimental. Apesar de não ter sido encontrado nenhum estudo relacionando a presença deste tripeptídeo nos tecidos periodontais, o aumento na concentração da GT, nos pacientes com periodontite, sugere uma síntese de novo da glutathiona, necessária no controle do estresse oxidativo. Isto se explicaria, considerando a

provável depleção de GSH que estaria ocorrendo no tecido gengival com periodontite (CARLSSON; LARSEN; EDLUND, 1993 e 1993), combinada com uma tendência do aumento dos níveis de GSH encontrados e com as mesmas atividades da glutathione redutase (GR) verificadas no tecido afetado.

O aumento significativo da concentração de GSSG no grupo experimental evidencia uma acentuada oxidação da glutathione, constituindo uma clara indicação de estresse oxidativo, durante o processo inflamatório, vinculado à periodontite. Da mesma forma, em trabalhos semelhantes (CHAPPLE *et al*, 2002), foram observados aumentos significativos dos níveis de GSSG em indivíduos com periodontite, comparativamente com indivíduos saudáveis. As concentrações verificadas naquele trabalho foram da ordem de 0,1 a 0,6mM de GSSG, dentro do intervalo obtido no presente estudo.

Coerentemente com os resultados da GSSG, os valores médios da lipoperoxidação tecidual avaliados na gengiva, por meio da determinação do TBARS, comprovaram igualmente aumentos significativos ($p < 0,05$) nos indivíduos afetados pela periodontite, evidenciando e reforçando uma situação de estresse oxidativo associado à doença periodontal (BIRD; DRAPER, 1984). Os resultados obtidos no presente estudo estão também de acordo com Marton *et al* (1993), que encontraram em homogenatos de pacientes com periodontite crônica um aumento nos níveis de lipoperoxidação tecidual, quando comparados com amostras de tecidos saudáveis.

O grau com que as ERO influenciam a progressão da doença periodontal ainda não é totalmente conhecido. Entretanto, o seu papel não pode ser considerado um fato isolado, deve-se estimar a presença dos antioxidantes que protegem o organismo contra o excesso da atividade dos radicais livres, pois o desequilíbrio entre a produção elevada de ERO e a concentração de antioxidantes, tem sido relacionado com a patogênese da doença periodontal (CHAPPLE, 1997). O estresse oxidativo no tecido gengival pode estender-se a uma condição mais generalizada, envolvendo a mesma situação no plasma de pacientes com periodontite (CHAPPLE *et al*, 2002).

Os neutrófilos contêm várias substâncias antimicrobianas do tipo lactoferrina, lisozima, mieloperoxidase, além de outros componentes com potente atividade biológica. Estas substâncias são liberadas na presença de microorganismos ou na lise de células (SMITH; HINRICHS; MELNY, 1986). A enzima mieloperoxidase, presente em grânulos azurófilos, e que corresponde à cerca de cinco por cento do peso seco de um neutrófilo, é considerada um potente antimicrobiano (KLEABANOFT, 1975). Como produto de sua ação, forma-se o ácido hipocloroso, que além da atividade antimicrobiana, é capaz de alterar a

função de algumas proteínas, até mesmo em concentrações baixas. Além disso, é hábil em oxidar a α -tripsina e ativar colagenases neutrofílicas (WEISS, 1989; SUOMALAINEN *et al*, 1991). A determinação bioquímica da mieloperoxidase mostrou estar significativamente aumentada em pacientes com doença periodontal, quando comparada com homogenatos de pacientes saudáveis. Estes resultados foram semelhantes às determinações de fluido gengival crevicular dos estudos de Smith, Hinrichs & Melny, (1986) e Cao & Smith (1989). Isto indica um processo inflamatório crônico no tecido gengival e que pode estar refletido em nível sistêmico (CHAPPLE *et al*, 2002). Os valores encontrados no presente trabalho ($0,05-0,6 \text{ Uml}^{-1} \cong 50-600 \text{ mUml}^{-1}$) se situaram dentro dos valores obtidos por Smith, Hinrichs & Melny, (1986).

A correlação entre esses processos, a geração de ERO e o estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo, já estão bem definidas em diversas doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999c), mas o conhecimento quanto ao tecido gengival é ainda incipiente. Um aspecto que aparentemente está envolvido no estresse oxidativo é o comprometimento do sistema imunológico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Estudos têm demonstrado a inter-relação da doença periodontal com a obesidade, ou seja, a obesidade pode ser um fator de risco potencial para o desenvolvimento da doença periodontal, especialmente entre adultos jovens (CUTLER *et al*, 1999; NISHIMURA *et al*, 2003; AL-ZAHRAN; BISSADA; BORAWSKI, 2003).

É geralmente aceito que a obesidade está associada como fator de risco para várias outras síndromes como a hipertensão arterial, hiperlipidemia, *diabetes mellitus* tipo 2 (WHO,1998) e, mais recentemente sugerido, a doença periodontal. No presente estudo, os pacientes do grupo experimental foram classificados como pré-obesos, com IMC acima 25kg/m^2 e os pacientes sem doença periodontal eram eutróficos. Estes achados sugerem uma incidência maior da doença periodontal em indivíduos com maior índice de massa corporal, confirmando recentes achados na literatura que correlacionaram obesidade e periodontite (AL-ZAHRAN; BISSADA; BORAWSKI, 2003).

Os adipócitos presentes no tecido adiposo produzem grandes quantidades de moléculas biologicamente ativas tais como leptina, uma importante molécula que controla o gasto de energia e o peso corpóreo. Por essa razão, moléculas derivadas dos adipócitos, denominadas adipocitocinas, possuem uma estreita associação entre obesidade e outras doenças. A citocina pró-inflamatória fator de necrose tumoral-alfa (FNT- α) é produzida pelos adipócitos e está presente no sangue, em concentrações elevadas, dos pacientes obesos e diminuída em pacientes que perderam peso. Estudos demonstraram que FNT- α diminui a

ação da insulina, via receptor específico, conseqüentemente exacerbando a resistência insulínica. Além dos adipócitos, monócitos/macrófagos produzem grande quantidade de FNT- α . Assim, FNT- α , produzido de células monocíticas devido ao processo inflamatório (no caso da periodontite), pode ter uma influencia adicional na resistência insulínica já causada pelo FNT- α derivado dos adipócitos. Pode-se supor que FNT- α produzido pelo tecido adiposo dos pacientes obesos age como fator de risco para a inflamação periodontal, e FNT- α produzido devido ao processo inflamatório periodontal pode ser um fator adicional e influenciar na sensibilidade insulínica em pacientes obesos e diabéticos tipo 2 (NISHIMURA *et al*, 2003).

Considerando o consumo de alimentos fontes de antioxidantes, observou-se uma tendência predominante no grupo controle quando comparado com o grupo experimental. Além disso, pode-se observar que o grupo experimental consome com maior frequência alimentos mais calóricos (gorduras e carboidratos).

Desta forma, acredita-se que mesmo na presença dos mecanismos de defesas antioxidantes, muitas vezes os fatores oxidantes podem superar estes sistemas de proteção endógenos e determinar lesões teciduais por meio das membranas lipídicas de células e organelas, desnaturação de proteínas estruturais, lesões mutagênicas ou letais dos ácidos nucleicos e a desnaturação de polissacarídeos (BENZIE, 2000, 2003).

8 CONCLUSÕES

1) A partir dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a doença periodontal crônica possivelmente leva ao desenvolvimento do estresse oxidativo, onde a presença de ERO provavelmente exerce um importante papel na patologia e progressão das doenças periodontais;

2) O desequilíbrio entre alguns antioxidantes enzimáticos (aumento da GPx e GST) e não enzimáticos (aumento da GT), associado aos aumentos de biomarcadores de estresse oxidativo (GSSG e TBARS) no tecido gengival, vem corroborar esta referência anterior;

3) O acentuado aumento da enzima mieloperoxidase no tecido afetado é um forte indicativo do processo inflamatório local, associado à condição de estresse oxidativo;

4) O estado nutricional pode ter influência na progressão da doença periodontal, especialmente relacionado ao aumento do IMC;

5) Futuros estudos devem ser realizados com o objetivo de elucidar o papel dos pró e antioxidantes na histopatogênese das periodontites e sua relação com o envolvimento sistêmico.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adultos 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **Journal of Periodontology**, v. 67, p. 1041-1049, 1996.

AL-ZAHRAN, M. S.; BISSADA, N. F.; BORAWSKI, E.A. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 5, p. 610-615, 2003.

AMERICAM ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. The pathogenesis of periodontal diseases (position paper). **Journal of Periodontology**, v. 70, p. 457-470, 1999.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutagenic Research**, v. 350, p. 103-108, 2000.

ASMAN, B. Peripheral PMN cells in juvenile periodontitis. **Journal of Clinical of Periodontology**, v. 15, p. 360-364, 1988.

ASMAN, B. et al. Increased luminol enhanced chemiluminescence from peripheral granulocytes in juvenile periodontitis. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 92, p. 218-223, 1984.

BADERSTEN, A.; NILVÉUS, R.; EGELBERG, J. Scores of plaque, bleeding, suppuration and probing depth to predict probing attachment loss. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 17, p. 102-107, 1990.

BARTOLD, P. M.; WIEBKIN, O. W.; THONARD, J. C. The effect of oxygen – derivad free radicals on gingival proteoglycans, and hyaluronic acid. **Journal of Periodontal Research**, v. 19, p. 390-400, 1984.

BENZIE, I. F. F. Evolution of antioxidant defence mechanisms. **European Journal of Nutrition**, v. 39, p. 53-61, 2000.

BENZIE, I. F. F. Evolution of dietary antioxidants. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 136, p. 113-126, 2003.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-90, 1963.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIRD, R.P.; DRAPER, A.H. Comparative studies on different methods of malondialdehyde determination. **Methods in Enzymology**, v.105, p.295-305, 1984.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH, L.; MASSARO, D. **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function**, Marcel Dekker: New York. v.105, p.1-25, 1997.

BROWN, C. J.; LÖE H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. **Periodontology 2000**, v.2, p.57-71, 1993.

BUCHMANN, R. et al. Resolution of crevicular fluid leukocyte activity in patients treated for aggressive periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.73, p. 995-1002, 2002.

BURTON, G. W.; INCOLD, K.U. β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 62, p. 569, 1984.

CANTIN, A. et al. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. **Journal of Applied Physiology**, v. 63, p. 152-157, 1987.

CAO, C. F.; SMITH, Q. T. Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. **Journal of Clinical Periodontology**, v.16, p. 17-20, 1989.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 14, p. 5475-5480, 1975.

CARLSSON, J.; LARSEN, J. T.; EDLUND. Utilization of glutathione (l – y- glytamyl – l – cysteinylglycine) by fusobacterium nucleatum subspecies nucleatum. **Oral Microbiology and Immunology**, v.9, p. 297-300, 1993.

CARLSSON, J.; LARSEN, J. T.; EDLUND. Peptostreptococcus micros has a uniquely high capacity to form hydrogen sulfide from glutathione. **Oral Microbiology and Immunology**, v.8, p.42-45, 1993.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, p. 637S-646S, 2000.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Research**, v. 59, p. 527-602, 1979.

CHAPPLE, I. L. C. Reactive Oxygen species and antioxidants in inflamatory diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 24, p.287-296, 1997.

CHAPPLE, I. L. et al. Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease. **Journal of Clinic and Pathology: Molecular Pathology**, v. 55. p. 367-373, 2002.

CHRISTOPHERSEN, B. O. Formation of monohydroxi- polyenic fatty acids from lipid peroxides by glutathione peroxidase. **Biocinetics Biophysics Acta**, v. 176, p. 463-467, 1969.

COHEN, D.W. The periodontal-medical risk relationship. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v. 19, n. 1, p. 11-24, 1998.

CRESPO, R. B. **Testes Microbiológicos nas Doenças Periodontais-Eficácia Atual**. 1998. 105f. Monografia (Especialização em Periodontia) Curso de Especialização em Periodontia, Centro de Estudos Odontológicos S. Lopoldo Mandic. Campinas.

CUTLER, C. W. et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: Cause or effect? **Journal of Periodontology**, v. 70, n. 12, p. 1429-1434, 1999.

ELLIS, S. D. et al. Factors for progression of periodontal disease. **Journal of Oral Pathological Medicine**, v.27, p. 101-105, 1998.

FABER, J. L.; KYLE, M. E.; COLEMANN, J. B. Biology of disease. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. **Laboratory Investigations**, v. 62, p. 670-678, 1990.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; GUOYAO, W. Free radicals, antioxidants, and nutrition, **Nutrition**, v.18, p. 872-879, 2002.

FLOHE L. Glutathione peroxidase brought into focus. In: PRYOR, W. A. (ed.), **Free Radicals in Biology**, v. V, p.223-255, Orlando,1982.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.

FORMAN, H. J. et al. Glutathione cycling in oxidative stress. In: CLERCH, L. B. & MASSARO, D. J. (ed.) **Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function**. New York: Marcel Dekker, p. 99-121,1997.

FRIDOVICH, I. Hypoxia and oxygen toxicity In: FANH, S. et al., (ed.), **Advances in Neurology**, p.225-6, New York: Raven, 1979.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, p. 1203–1209, 1998.

FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induce by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators of Inflammation**, v.10, p. 223-227, 2001.

GENCO, R. J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, v. 67, p. 1041-1049, 1996.

GRACY, R. W. et al. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? **Mutation Research**, v. 428, p. 17-22, 1999.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-8, 1982.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a person view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. **The chemistry of free radicals and, related 'reactive species'**. In: Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford: Clarenton Press; 1999a; p.36-104.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. **Antioxidant defenses**. In: Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford: Clarenton Press; 1999b; p.105-245.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JMC. **Free radical, other reactive species and disease**. In: Free radicals in biology and medicine. 3.ed. Oxford: Clarenton Press; 1999c; p.617-783.

JENSEN, S. J. K. Oxidative stress and free radicals, **Journal of Molecular Structure: Theochem**, In Press, Corrected Proof, Available online 22 October 2003.

KAPPUS, H. A. A survey of chemicals inducing lipid peroxidation in biological systems. **Chemical Physics**, v.45, p.105-15, 1987.

KEEN, J. B.; HABIG, W. H. & JAKOBY, W. B. Mechanism for several actives from glutathione S-transferase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KELLING, P. L.; SMITH, L. L. Relevance of NADPH depletion and mixed disulphide formation in rat lung to the mechanism of cell damage following paraquat administration. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, p. 3243-49, 1982.

KEY, L. L. et al. Superoxide and bone resorption. **Bone**, v. 15, p. 431-436, 1993.

KIMURA, S.; YONEMURA, T.; KAYA, H. Increase oxidative product formation by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes in human periodontal diseases. **Journal of Periodontal Research**, v. 28, p. 197-203, 1993.

KLEBANOFF, S. J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leucocytes. **Seminars in Hematology**, v. 12, p. 117-142, 1975.

KOWASHI, Y.; CIMASONI, G. Sulcular polymorphonuclear leucocytes and gingival exudate during experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v. 15, p. 151-158, 1980.

KRINSKY, N. I.; DENEKE, S. M. Interaction of oxygen and oxyradicals with carotenoids. **Journal of National Cancer Institute**, v. 69, p. 205, 1982.

LIBERMAN, T. O.; BALTIMORE, D. Activation of interleukin-6 gene expression through NF- κ B transcription factor. **Molecular Cell Biology**, v. 10, p. 2327-2334, 1990.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, 3^a ed. 1999. 198p.

LÖE, H. et al. Natural history of periodontal disease in man: Rapid, moderate and no Loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 13, p. 431-445, 1986.

LOESCHE, W. J. The bacterial etiology of dental decay and periodontal Disease: the specific plaque hypothesis. **Clinical Dentistry**, v. 2, p. 1-54, 1982.

MACCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 108, p. 652-659, 2000.

MACCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: na enzymatic function for erythocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MALY, F. E. The B-lymphocyte: a newly-recognised source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. **Free Radical Research Communications**. v. 8, p. 143-148, 1990.

MARTON, B. et al. The role of reactive oxygen intermediates in the pathogenesis of chronic apical periodontitis. **Oral Microbiology & Immunology**, v. 8, p. 254-257, 1993.

MATÉS, J.M.; PÉREZ-GÓMEZ, C.; CASTRO I. N. de Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MAY, J. et al Reduction of dehydroascorbate to ascorbate by selenoenzyme thioredoxin reductase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271 n. 36, p. 22607-22610, 1997.

McCALL, M. R.; FREI, B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? **Free Radicals Biology Medicine**, v. 26, p. 1034-1053, 1999.

MÉNDEZ FILHO, J.D.; RODRÍGUEZ, H.G.R. Sobre los beneficios de los radicales libres. **Revista de Medicina IMSS**, v. 35, n. 4, p. 309-313, 1997.

MIYASAKI, K. T. The neutrophil: Mecaninsms of controlling periodontal bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 62, p; 761-774, 1991.

MONTERO, M. Los radicales libres y las defensas antioxidantes: revisión. **Annales de la Facultad de Medicina**, v. 57, n. 4, p. 278-281, 1996.

MOORE, S. et al. Antioxidant Activity of saliva and periodontal disease. **Free Radical Research Communications**, v. 21, p. 417-425, 1994.

MORRIS, P. E; BERNARD, G. R. Significance of glutathione in gingivitis and implications for therapy. **The American Journal of The Medical Sciences**, v. 307, p. 119-127, 1994.

MORROW, J. D. et al. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radicals-catalysed mechanism. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. 2d, v. 87, p. 9383-9387, 1990.

MORROW, J. D.; ROBERTS, L. J. II. Quantification of non-cyclooxygenase derived prostanoids as a marker of oxidative stress. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 10, p. 195-200, 1991.

NISHIMURA, F. et al. Periodontal disease and diabetes mellitus: the role of tumor necrosis factor- α in a 2-way relationship. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 1, p. 97-102, 2003.

OHGI, S.; JOHNSON, P. W. Glucose modulates growth of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells: correlation with expression of basic fibroblast growth factor. **Journal of Periodontal Research**, v. 31, p. 579-588, 1996.

OHKAWA, H.; OSHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p.351-358; 1979.

PAPAS, A. M. Diet and antioxidant status. **Food Chemical Toxicology**, v. 37, p. 999-1007, 1999.

PASSO, S. A.; SYED, S. A.; SILVA, J. Neutrophil chemiluminescence in response to *Fusobacterium nucleatum*. **Journal Periodontology Research**, v. 17, p. 604-613, 1982.

PONTORIERO, R.; CARNEVALE, G. Surgical crown lengthening: a 12-month clinical wound healing study. **Journal Periodontology**, v. 72, n.7, p.841-848, 2001.

PRYOR, W. A. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. **Annual Review of Physiology**, v. 48, p. 657-667, 1986.

RAO, C. et al. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa) and tretadecanoylphorbol acetate (tpa)-induced derma inflammation. **Inflammation**, v. 17, p. 723-741, 1993

ROSE, R. C. Solubility properties of reduced and oxidized ascorbate as determinants of membrane permeation. **Biochemical Biophysical Acta**, v. 924, n. 1, p. 254-256, 1987.

SACHS, A. **Hábito alimentar e estado nutricional de pacientes idosos ambulatoriais, pré e pós-diagnóstico de doença pulmonar obstrutiva crônica.** Tese apresentada ao curso de pós-graduação em Reabilitação pela Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1997.

SAGARA, Y. et al. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 24, p. 1375-1389, 1998.

SHAPIRA, L. et al. Superoxide formation and chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes in rapidly progressive periodontitis patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 18, p. 44-48, 1991.

SIES, H. Strategies of antioxidant defenses. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, p. 213-9, 1993.

SMITH, Q. T.; HINRICHS; MELNY K, R. S. Gingival crevicular fluid myeloperoxidase at periodontitis sites. **Journal of Periodontal Research**, v.21, p. 45-55, 1986.

SPEISKY, H.C.; JIMÉNEZ, I.T. Radicales libres y antioxidantes en la prevención de enfermedades III: evidencias clínico epidemiológicas de los riesgos y beneficios asociados al consumo de antioxidantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 27, n. 3, p. 314-325, 2000.

STOCKER, R.; FREI, B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha tocopherol. In: SIES, H. (ed.) **Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants**, p.213-243, London: Academic Press, 1991.

STUEHR, D. J.; KWON, N. S.; NATHAN, C. F. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 168, p. 558-565, 1990.

SUOMALAINEN, K. et al. Hypochlorous acid induced activation of human neutrophil and gingival crevicular fluid collagenase can be inhibited by ascorbate. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 99, p. 397-405, 1991.

THOMPSON, K. H.; GODIN, D. V. Micronutrients and antioxidants in the progression of diabetes. **Nutrition Research**, São Francisco, v.15, n.9, p.377-410, 1995.

TIETZE, F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and others tissues. **Annals of Biochemistry**. v.27, n.3, p.502-522, 1969.

WADDINGTON, R. J., MOSELEY, R., EMBERY, G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal disease. **Oral Diseases**, v. 6. p. 138-151, 2000.

WEISS, S. S. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 365-376, 1989.

WHO Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO. World Health Organization. Geneva, 1998, 276p.

WHO Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. WHO technical report series 854. Geneva: WHO, 1995. 453p.

WHYTE, G. J.; SEYMOUR, G. J.; CHEUNG, K.; ROBINSON, M. F. Chemiluminescence of peripheral polymorphonuclear leukocytes from adult periodontal patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 16, p. 69-74, 1989.

WILLIAMS, R.C.; HILL, C. Periodontal disease: The emergence of a new paradigm. **Compendium of Continuing Education in Dentistry**, v.19, n.1, p.4-10, 1998.

ZAFIROPOULOUS, G. G. K. et al. Polymorphonuclear neutrophil chemiluminescence in periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 18, p. 634-639, 1991.

Apêndice A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do participante: _____

As informações contidas neste documento fornecidas pelo mestrando Ivan Borges Júnior sob orientação da Prof^ª. Dr^ª. Emília Addison Machado Moreira, com o objetivo de firmar por escrito, mediante o qual, o voluntário da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

- 1. Título do trabalho:** AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM HUMANOS COM DOENÇA PERIODONTAL.
- 2. Objetivo:** avaliar o estresse oxidativo no tecido gengival em pacientes com doença periodontal.
- 3. Justificativa:** A avaliação da doença periodontal consiste de uma anamnese completa e precisa do paciente, além das avaliações clínicas e radiográficas. No entanto, a avaliação de sítios que continuarão a perder inserção, requerendo intervenção terapêutica, é complexa. Dessa forma, espera-se que a presente dissertação possa contribuir na avaliação do estresse oxidativo tecidual através da dosagem enzimática presente nos tecidos gengivais em indivíduos normais e com periodontite.
- 4. Procedimentos realizados no estudo:** Levantamento de dados do estado nutricional; avaliação da condição periodontal mediante a sondagem clínica; coleta do tecido gengival através de biópsia; avaliação laboratorial das amostras.
- 5. Desconforto ou risco:** Existência de inerentes e potenciais riscos que qualquer tratamento médico/odontológico possa proporcionar, como por exemplo edema, dor, sensibilidade ao frio e quente, restrita abertura de boca, traumatismos, exposição da coroa, interferências fonéticas, mobilidade dental, recessão gengival, hemorragia, parestesia, infecção, impacção alimentar.
- 6. Benefícios do estudo:** Espera-se que a presente dissertação possa contribuir no exame da periodontite, em especial a avaliação do estresse oxidativo através da dosagem de enzimas teciduais em indivíduos normais e com doença periodontal.
- 7. Informações:** Os pesquisadores assumem o compromisso de fornecer informações atualizadas obtidas durante o estudo, ainda que estas possam afetar a vontade do indivíduo de continuar participando. Os resultados obtidos na pesquisa serão utilizados somente para fins de publicações científicas, cursos, palestras e aulas.
- 8. Aspecto legal:** Este projeto foi elaborado de acordo com as diretrizes e normas que regulamentam as pesquisa envolvendo seres humanos, atendendo às resoluções 196/96 e 251/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde – Brasília/DF.

9. Garantia de sigilo: A participação do voluntário neste estudo é confidencial e nenhum nome será divulgado em qualquer tipo de publicação. Todas as informações coletadas serão somente utilizadas para fins científicos.

10. Telefones dos pesquisadores para contato: Os pesquisadores se encontram à disposição para esclarecer ou oferecer maiores informações sobre a pesquisa:

Prof^a Dr^a Emília Addison Machado Moreira (0XX48) 331-9784 / 331-5138

Mestrando: Ivan Borges Júnior (0XX48) 223-7333

11. Retirada do consentimento: A participação neste estudo é voluntária, podendo o participante retirar-se a qualquer momento e por qualquer razão, sem alguma penalidade. No entanto, pedimos que caso deseje retirar-se do estudo, entre em contato com os pesquisadores pessoalmente ou por telefone.

12. Consentimento pós-informação:

Eu, _____, certifico que tendo lido as informações acima e estando suficientemente esclarecido(a) de todos os itens propostos pela Prof^a Dr^a Emília Addison Moreira Machado e pelo Mestrando em Nutrição Ivan Borges Júnior, estou de pleno acordo com os dados a serem coletados, podendo os mesmos serem utilizados para a realização da pesquisa. Assim autorizo e garanto a minha participação no trabalho de pesquisa proposto acima.

Florianópolis, ____ de _____ de 200__

Nome completo: _____

RG: _____

Assinatura: _____

Apêndice B – IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA

1. Dados do Paciente:

Data do exame: ____/____/____

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: M() F()

Tipos de Diagnóstico: _____

Endereço: _____

Telefone para contato: _____

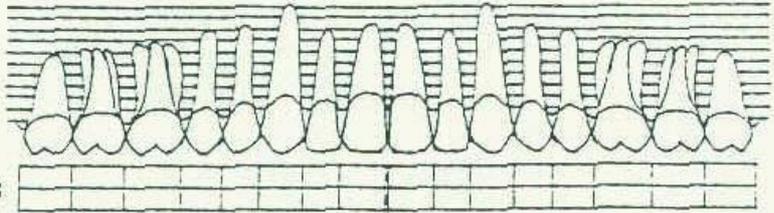
2. Dados Antropométricos:

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

CB: _____ PT: _____ CM: _____

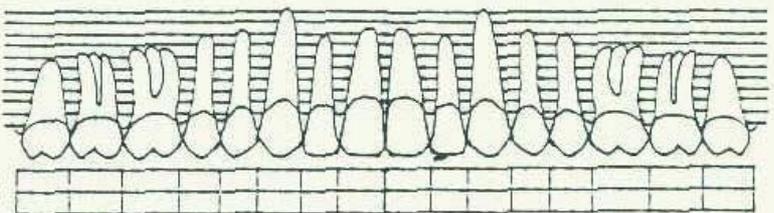
Apêndice C – FICHA PERIODONTAL

Palatino



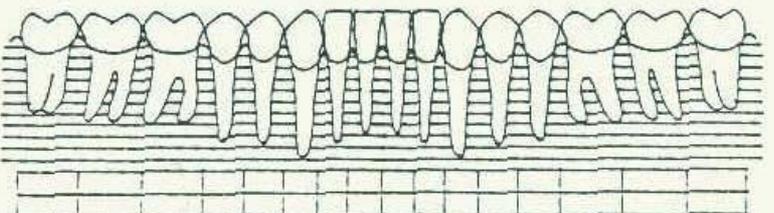
PS

Vestibular



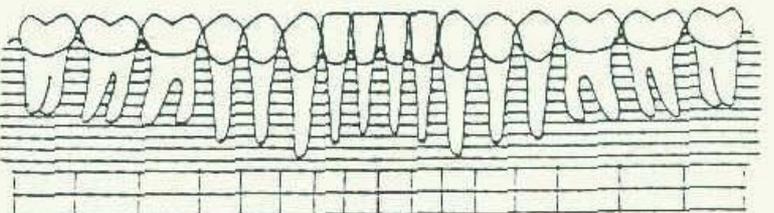
PS

Vestibular



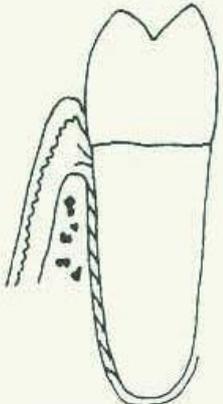
PS

Lingual



PS

Notas



Apêndice D – QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Nome: _____

Grupo / Alimento	Nunca/ Raro	Semanalmente			Diariamente			
		1	2-3	> 4	1	2	3	> 4
FRUTAS:								
Abacaxi								
Acerola								
Ameixa amarela								
Ameixa preta								
Banana								
Caju								
Caqui								
Goiaba								
Laranja								
Limão								
Maçã								
Manga								
Mamão								
Maracujá								
Melancia								
Melão								
Morango								
Nectarina								
Pêssego								
Pêra								
Pitanga								
Tangerina								
Uva								
VERDURAS FOLHOSAS								
Alface								
Acelga								
Aipo								
Almeirão								
Agrião								
Bertalha								
Chicória								
Couve								
Espinafre								
Mostarda								
VERDURAS NÃO FOLHOSAS								
Abóbora madura								
Beterraba								
Berinjela								
Brócolis								
Cenoura								
Chuchu								

Grupo / Alimento	Nunca/ Raro	Semanalmente			Diariamente			
		1	2-3	> 4	1	2	3	> 4
Cogumelo								
Couve-flor								
Moranga								
Pepino								
Pimentão								
Quiabo								
Repolho verde								
Repolho roxo								
Tomate								
Vagem								
Leite								
Tipo_____								
Iogurte								
Queijo								
Tipo_____								
Pão/Torrada								
Bolacha/Biscoito								
Ovos								
Frango								
Carne bovina								
Carne suína								
Fígado								
Embutidos (salsicha, salame, etc)								
Peixe								
Tipo_____								
Camarão								
Marisco								
Ostra								
Outros frutos do mar								
Batata								
Mandioca								
Feijão								
Arroz								
Arroz integral								
Massas (macarrão, lasanha, etc)								
Farinha de mandioca (Pirão)								
Farinha de milho								
Cereais integrais								
Tipo_____								

Grupo / Alimento	Nunca/ Raro	Semanalmente			Diariamente			
		1	2-3	> 4	1	2	3	> 4
Margarina								
Manteiga								
Creme de leite								
Banha de porco								
Óleo								
Tipo_____								
Germe de trigo								
Farelo de trigo								
Castanha								
Tipo_____								