

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

Linha de pesquisa:

*Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das
Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas*

Tese:

INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E
DÉFICIT COGNITIVO EM RATOS WISTAR

por

MARCELO EKMAN RIBAS

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre 2017

MARCELO EKMAN RIBAS

INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DÉFICIT
COGNITIVO EM RATOS WISTAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica/Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Porto Alegre 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Ribas, Marcelo Ekman
INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA PERIODONTAL E DÉFICIT
COGNITIVO EM RATOS WISTAR / Marcelo Ekman Ribas. --
2017.
85 f.
Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.

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

1. Periodontia. 2. Déficit Cognitivo. 3. Doença de
Alzheimer. 4. Ratos Wistar. I. Rösing, Cassiano
Kuchenbecker, orient. II. Título.

DADOS CURRICULARES

Marcelo Ekman Ribas

Filiação: Cary Lauffer Ekman Tisbierck

Luiz Carlos Correa Ribas

2005 – 2010 – Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS

2011 – 2013 – Mestrado Acadêmico em Clínica Odontológica/Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS

2014 – atual – Professor Adjunto de Periodontia na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões campus Erechim – URI/Erechim, Erechim/RS

2014 – 2017 – Doutorado em Clínica Odontológica/Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS

DEDICATÓRIA

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.” (Bill Gates)

Dedico este trabalho à minha família, que nunca deixou de me apoiar e motivar a seguir em frente **SEMPRE**

AGRADECIMENTOS

Primeiro, e acima de tudo, devo agradecer à minha família... minha mãe **Cary** que sempre foi a pessoa que esteve do meu lado, mesmo quando muitas pessoas falavam que não conseguiríamos alcançar algum objetivo, tu esteve ali dizendo junto a mim, vamos conseguir! Nunca esquecerei, tu és meu exemplo de mulher guerreira e forte, muito obrigado por tudo sempre, e mais uma vez, conseguimos mãe!

Não posso deixar de agradecer meus irmãos **Eduardo** e **Gustavo**, que, mesmo sendo mais novos, sempre demonstraram apoio e força, nunca deixando de acreditar em mim, muito obrigado meus queridos.

Um agradecimento mais que especial para a minha namorada e companheira de vida, **Tainara**, por ser tudo o que eu sempre esperava e muito mais na vida, ser além do meu porto seguro, a calma dos meus pensamentos, a amplitude do meu ser e a flor mais bela que eu cultivo no jardim do coração...

Ao meu padrasto **Eduardo**, com carinho, por sempre estar presente quando eu precisei, e ser parte do meu alicerce e exemplo de pai de família.

Ao meu pai **Luiz Carlos**, que, mesmo não podendo estar em convívio diário, sempre me apoiou e estendeu seu abraço fraterno em todos os momentos de dificuldade.

Ao meu padrinho/tio/colega de profissão **Ivan**, pelo convívio diário, apoio incondicional desde o início da minha vida e da minha carreira profissional, sempre sendo uma referência em todos os aspectos para a minha vida. À minha madrinha **Helene**, pela presença em minha vida, carinho e convívio, profissional e familiar.

À minha avó **Cely**, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões, me ajudar a chegar até aqui sempre presente. Agradeço por ter sempre uma palavra de conforto nos momentos de angústia.

Ao meu amigo **Rogério**, por ser como um irmão em minha vida, mesmo não convivendo sempre, a irmandade permanece.

Ao grande irmão que fiz em Erechim, **Daniel Rambo**, além de poder ter sido teu professor, tenho a honra de dizer que nos tornamos amigos e irmãos, muito obrigado por tudo.

Ao grande amigo que a odontologia me proporcionou, **Vagner**, por sempre ser mais que um ombro amigo, ser meu irmão e dividir momentos difíceis e maravilhosos juntos, obrigado por tudo.

Ao meu colega e amigo **Fernando** Martins por fazer parte do meu crescimento profissional e estar presente como amigo, convivendo dia a dia de trabalho.

Aos meus colegas profissionais da Clínica Ivan Ekman, por sempre apoiarem meu desenvolvimento profissional, esta conquista também divido com vocês.

Agradeço de forma especial a todos os colegas professores da URI-Erechim e meus alunos queridos que fizeram e fazem parte de todo meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigado pelo carinho sempre.

Agradeço de forma especial também ao meu orientador, prof. **Cassiano**, por todo apoio e conhecimento que, brilhantemente, transmitiu, durante todo esse período de convivência. Obrigado pela confiança em mim depositada ao assumir a orientação. Obrigado por acreditar em uma proposta de trabalho diferente. A tua confiança e sabedoria foram os estímulos que me permitiram vencer as inseguranças deste processo. Agradeço por ter ido além da orientação e, como conselheiro, contribuiu para meu desenvolvimento pessoal e profissional, desde o início da graduação até o fim do doutorado, que jornada!

Aos meus colegas pós-graduação, por dividirem experiências, convívio, momentos bons e dificuldades, sempre sendo exemplo de força para continuar.

Aos professores, funcionários e colegas da Periodontia da UFRGS, pelos momentos inesquecíveis que passei e que passarei ao longo da minha vida.

Agradeço também aos animais que deram a vida para que possamos avançar nos conhecimentos científicos, muito obrigado, a vida de vocês vale muito.

Agradeço à Deus por me capacitar, me dar forças para poder seguir em frente, lutar e perseverar ao longo de toda minha vida.

Agradeço, do fundo do coração, às pessoas que participaram de maneira decisiva para que eu alcançasse mais este objetivo na vida. Sempre com dedicação, interesse, fraternidade, irmandade e solidariedade. Muito obrigado a todos do fundo do meu coração!

“Nenhum de nós vence sozinho, se eu não aceitar esse fato, estarei desmerecendo cada pessoa que me ajudou até hoje”

Arnold Schwarzenegger

RESUMO

As evidências científicas recentes vêm demonstrando uma possível associação entre doenças periodontais e patologias neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer. O corpo de evidências vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, entretanto, existem poucos estudos de caráter experimental, observando os mecanismos biológicos que podem explicar essa associação. A presente tese teve como objetivo principal analisar, em modelo animal, a associação entre doença periodontal e déficit cognitivo. Nesse contexto, foram produzidos 3 artigos científicos, sendo uma revisão da literatura e 2 estudos experimentais. A revisão de literatura de caráter informativo para os cirurgiões-dentistas buscou avaliar a literatura atual acerca da relação entre as doenças periodontais e Doença de Alzheimer (DA). Pode-se observar que há uma escassa literatura tangente ao tema, com uma ascensão marcante recente de estudos de caráter observacionais transversais, com poucos estudos experimentais clínicos e em modelo animal. A análise dessa literatura demarca o tópico como de notável relevância atual, sendo a DA uma patologia de caráter progressivo e alta morbidade, e as patologias periodontais tornando-se um possível fator modulador da etiopatogênese do Alzheimer. Contudo, ainda há carência de estudos experimentais que expliquem melhor os mecanismos biológicos dessa relação e o efeito sistêmico plausível entre as duas patologias. O segundo e terceiro artigos trataram da realização de um modelo experimental, em ratos Wistar, de indução de periodontite e indução de déficit cognitivo, analisando a influência que a doença periodontal pode apresentar sobre a progressão do déficit cognitivo, analisados por modelos comportamentais de retenção de memória (artigo 2) e por parâmetros químicos de estresse oxidativo em nível cerebral (artigo 3). No segundo artigo foram utilizados 30 ratos Wistar machos, com 45 dias de vida, divididos em 3 grupos experimentais. O grupo escopolamina recebeu indução de déficit cognitivo por escopolamina (3mg/kg), e os grupos doença periodontal e escopolamina, receberam indução de perda óssea por meio de ligaduras e indução de déficit cognitivo, sendo um dos grupos avaliado pelo teste comportamental de labirinto aquático de Morris, e o outro avaliado pelo teste comportamental de esQUIVA inibitória. Os animais com doença periodontal apresentaram piores retenção de memória de curta e longa duração, contudo, de forma não significativa. Pode-se concluir que nesse modelo experimental, a periodontite não foi capaz de modificar a latência de memória avaliada pelos testes comportamentais. Para o terceiro

artigo, 40 ratos Wistar foram divididos em 4 grupos experimentais. Grupo controle, grupo doença periodontal (DP), sendo realizada indução de perda óssea alveolar por ligadura, grupo escopolamina, sendo realizada indução de déficit cognitivo por escopolamina (3mg/kg) e grupo DP + escopolamina. Além da análise morfométrica da perda óssea alveolar, foram realizadas análises bioquímicas do tecido cerebral para aferição de estresse oxidativo. Os dados bioquímicos de alterações relacionadas ao estresse oxidativo evidenciam que a presença da doença periodontal induzida foi capaz de modificar significativamente os parâmetros de glutathiona reduzida (GSH) e sulfidrilas totais, tanto no grupo somente com doença periodontal em relação ao controle, como no grupo de indução de déficit cognitivo e doença periodontal (DP+Escopolamina). Pode-se concluir que a periodontite induzida foi capaz de modular o déficit cognitivo, diminuindo a ação de agentes antioxidantes em nível cerebral, no modelo experimental proposto. A partir dos resultados dos artigos e frente às reflexões evidenciadas, pode-se concluir que a doença periodontal apresenta um potencial modulador da etiopatogênese de doenças neurodegenerativas como a DA, todavia, uma análise crítica deve ser empregada pelos profissionais sobre os mecanismos que interligam as duas patologias, bem como novos estudos devem ser estimulados para melhor entendimento dos fatores etiopatogênicos que tangem as doenças periodontais e desordens neurodegenerativas.

Palavras chave: Doença periodontal, Periodontite, Alzheimer, Disfunção Cognitiva, Ratos Wistar, Patologia cerebral.

ABSTRACT

Recent scientific evidence has demonstrated a possible association between periodontal diseases and neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. The body of evidence has increased considerably in recent years, however, there are few experimental studies, observing the biological mechanisms possible explaining this association. The main objective of this thesis was to analyze, in an animal model, the association between periodontal disease and cognitive deficit. In this context, 3 scientific articles were written, being a review of the literature and 2 experimental studies. The review of informative literature for practicing dentists sought to evaluate the current literature on the relationship between periodontal diseases and Alzheimer's disease (AD). It can be observed that there is a scarce literature tangent to the subject, with a recent marked rise in cross-sectional observational studies, with few clinical and animal models. The analysis of literature demarcates the topic with outstanding current relevance, being AD a progressive pathology with high morbidity, and periodontal pathologies becoming a possible modulating factor of Alzheimer's disease etiopathogenesis. However, there is still a lack of experimental studies that could better explain the biological mechanisms of this relationship and the plausible systemic effect between the two pathologies. The second and third articles related the development of an experimental model, in Wistar rats, of induction of periodontitis and induction of cognitive deficit, analyzing the influence that periodontal disease may present on the progression of cognitive deficit, analyzed by behavioral models of retention of memory (article 2) and chemical parameters of oxidative stress in brain (article 3). In the second article, 30 male Wistar rats 45 days-old, were divided into 3 experimental groups. The scopolamine group received induction of a scopolamine cognitive deficit (3mg / kg), and the periodontal disease and scopolamine groups received induction of bone loss with ligatures and induction of cognitive deficit, one of the groups being evaluated by Morris aquatic maze, and the group evaluated by the step-down behavioral test. Animals with periodontal disease presented worse short and long term memory retention, however, non-significantly. It can be concluded that in this experimental model, periodontitis was not able to modify the memory latency evaluated by the behavioral tests. For the third article, 40 Wistar rats were divided into 4 other experimental groups. A control group, group periodontal disease (PD), with induction of alveolar bone loss by ligature, scopolamine

group, with induction of cognitive deficit by scopolamine (3mg / kg) and group DP + scopolamine. In addition to morphometric analysis of alveolar bone loss, biochemical analyzes of the brain tissue were performed to assess oxidative stress. The biochemical data of alterations related to oxidative stress showed that the presence of periodontal disease was able to significantly modify the parameters of reduced glutathione (GSH) and total sulfhydryl, both in the group with periodontal disease in relation to the control, and in the group of induction of cognitive deficit and periodontal disease (PD + Scopolamine). It can be concluded that the induced periodontitis was able to modulate the cognitive deficit, reducing the action of antioxidant agents in cerebral level, in the proposed experimental model. From the results of the articles and the reflections shown, it can be concluded that periodontal disease presents a potential modulator role of the etiopathogenesis of neurodegenerative diseases such AD, however, a critical analysis are stimulated for professionals on the mechanisms that interconnect the two pathologies, as well new studies should be stimulated to better understand the etiopathogenic factors that affect periodontal diseases and neurodegenerative disorders.

Key Words: Periodontal diseases, Periodontitis, Alzheimer, Cognitive dysfunction, Wistar rats, Brain pathology.

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFRGS, contando com parceria da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. Teve por objetivo adicionar informações à literatura concernente a inter-relação entre doenças periodontais e déficit cognitivo.

Nesse sentido, compõe-se de uma revisão da literatura, denominada “Antecedentes e Justificativa”, além de 3 artigos, a saber:

- 1) Artigo 1 - **“Inter-relação entre doença de alzheimer e doenças periodontais: o que se sabe hoje”**, publicado na Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry, com o objetivo de informar profissionais da Odontologia sobre essa relação, considerado como uma produção técnica de tradução do conhecimento existente;
- 2) Artigo 2 - **“Efeito da presença de doença periodontal sobre comportamento de ratos wistar com déficit cognitivo induzido por escopolamina”**, a ser submetido ao Periódico Archives of Oral Biology;
- 3) Artigo 3 - **“Efeito da presença de doença periodontal e indução de déficit cognitivo sobre parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo”**, a ser submetido ao Periódico Neurosciences.

Na sequência, considerações finais são apresentadas, procurando construir um raciocínio com base nos achados da tese.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS	14
1.1. Epidemiologia das Desordens Degenerativas e Doença de Alzheimer.....	14
1.2. Aspectos Fisiopatológicos da Doença de Alzheimer.....	15
1.3. Doenças Periodontais e Repercussões Sistêmicas.....	18
1.4. Doenças Periodontais e Doença de Alzheimer.....	18
1.5. Modelos Experimentais de Doença Alzheimer.....	24
2. PROPOSIÇÃO	25
2.1. OBJETIVO GERAL	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1. Delineamento de Pesquisa.....	26
3.2. Considerações Éticas.....	26
3.3. Modelo Animal.....	27
3.4. Randomização.....	27
3.5. Constituição dos Grupos Experimentais.....	27
3.6. Procedimentos Experimentais.....	28
3.6.1. Indução de Doença Periodontal.....	28
3.6.2. Indução de Déficit Cognitivo.....	28
3.6.3. Teste de Esquiva Inibitória.....	28
3.6.4. Teste de Labirinto Aquático de Morris.....	29
3.6.5. Preparo das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda Óssea Alveolar.....	30
3.6.6. Preparo do Tecido Cerebral e Medidas de Estresse Oxidativo.....	30
3.7. Cegamento e Reprodutibilidade.....	32
3.8. Análise de Dados.....	32
ARTIGO 1	34
ARTIGO 2	39
ARTIGO 3	55
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	84

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Metodologia

Figura 1 - Desenho esquemático das diferentes fases experimentais do estudo.

Artigo 2

Figura 1 – Comparação das médias de perda óssea alveolar induzida nos grupos experimentais (ANOVA-Bonferroni).

Figuras 2 e 3 – Comparação das médias de latência de memória nos grupos experimentais avaliados por labirinto de Morris e esQUIVA inibitória, respectivamente.

Artigo 3

Figura 1 – Comparação das médias de perda óssea alveolar induzida nos grupos experimentais (ANOVA-Bonferroni).

Figuras 2 a 6 – Comparação das médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo nos grupos experimentais (ANOVA-Bonferroni).

Antecedentes e Justificativas

Quadro 1 – Estudos relacionando doença periodontal e déficit cognitivo

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

1.1. Epidemiologia das Desordens Degenerativas e Doença Alzheimer

Dentre as patologias relacionadas com o processo de envelhecimento, os processos degenerativos destacam-se de forma significativa. Estima-se que, na maioria das regiões do mundo, a prevalência de doenças degenerativas, principalmente relacionados a demências, apresenta uma variabilidade de 5% e 7% acima da sexta década de vida (PRINCE et al., 2013). Quando se determina os dados de prevalência na América Latina, cerca de 35,6 milhões de pessoas (5,93%) apresentaram quadros degenerativos demenciais em 2010, com estimativa de dobrar a cada 20 anos. Parte significativa desses quadros demenciais decorrem da Doença de Alzheimer (DA), colocando esta condição como uma prioridade de saúde mundial (ROBERTA et al., 2015). A doença de Alzheimer constitui uma das patologias neurodegenerativas mais prevalentes, apresentando perda cognitiva e demência, sendo associada à morte e atrofia neuronal específica (BALIN & HUDSON, 2014; OLSEN & SINGHRAO, 2015). Essa patologia ocasiona o comprometimento das funções cognitivas, motoras e comportamentais, influenciando no dia a dia dos indivíduos e induzindo, em seus estágios mais avançados, a elevado grau de dependência (BALLARD et al., 2011). A enfermidade tem impacto significativo sobre um grupo social relacionado que inclui familiares e cuidadores, com extensão e complexidade de manifestações funcionais, emocionais e consequências sociais. A doença não tem cura e o manuseio da condição envolve o tratamento de sintomas cognitivos e comportamentais (SORBI et al., 2012).

Estima-se que a prevalência de Doença Alzheimer nos Estados Unidos, no ano de 2050, seja de cerca de 14 milhões de pessoas afetadas, possuindo, importante impacto econômico para os pacientes, cuidadores e para saúde pública, em decorrência dos custos indiretos, associados à perda ou redução dos ganhos do paciente e membros da família, e dos custos diretos relacionados com tratamento médico, serviços sociais, e necessidade de institucionalização ou de um cuidador formal, à medida que a doença atinge estágios avançados com um aumento de custo em saúde estimado em um trilhão de dólares (CASTRO et al., 2010; OLSEN & SINGHRAO, 2015). No Brasil, estudos apontam para prevalência de deficiências neurodegenerativas na população maior de 65 anos de 7,1%, sendo mais da metade dos casos representados pela Doença Alzheimer (HERRERA et

al., 2002). As taxas de incidência variam entre os estudos e regiões brasileiras, de acordo com a estrutura etária das populações e os métodos usados em sua mensuração. Em São Paulo, a incidência encontra-se em torno de 7,7/1.000 pessoas-ano (NITRINI et al., 2004), já no Rio Grande do Sul, 14,8/1.000 pessoas-ano (CHAVES et al., 2009). Considerando a prevalência de alterações neurodegenerativas no Brasil em conjunto com a população de idosos, de aproximadamente 15 milhões de pessoas, em 2013, a estimativa era de 1,1 milhão de casos para aquele ano (ROBERTA, 2015).

1.2. Aspectos Fisiopatológicos da Doença de Alzheimer

As características neuropatológicas do cérebro com doença de Alzheimer apresentam aspectos relevantes no entendimento do desenvolvimento dos processos neurodegenerativos. É caracterizada por ser uma patologia de destruição irreversível de certos neurônios e sinapses, levando à perda progressiva e incapacitante de determinadas funções do sistema nervoso. Foi estudada pela primeira vez pelo médico alemão Alois Alzheimer (1864-1915), onde os sintomas relatados incluíam falhas na memória recente, paranoia e problemas comportamentais e de linguagem, assim como, um cérebro atrofado e com sinais de deposições proteicas anômalas (observados em exames post-mortem), as quais foram posteriormente denominadas placas senis (de FALCO et al., 2016; GANESH et al., 2017). Atualmente, sabe-se que a memória recente é a primeira a ser afetada, porém outras habilidades também são comprometidas com o progresso da doença, como, por exemplo, a capacidade de realizar cálculos e de usar objetos e ferramentas que fazem parte do cotidiano da pessoa acometida pela doença (GANESH et al., 2017).

A Doença de Alzheimer inicia nas porções mais internas do tecido cerebral, como o hipocampo, amígdala cerebelosa e córtex entorrinal, espalhando-se externamente com a evolução da patologia. Com o avançar da doença, os sintomas se tornam mais prevalentes como perda de memória gradual e marcante, deterioração de estabilidade emocional, perda de capacidade de linguagem, pensamento abstrato e perda de habilidades motoras (GITTO et al., 2001; de FALCO et al., 2016). A hipótese mais antiga sobre a DA foi introduzida no início da década de 80, e descrita como a hipótese colinérgica na disfunção amnésica do idoso. A diminuição na concentração da colina acetiltransferase (ChAT), enzima responsável pela síntese da acetilcolina (ACh), no córtex e no hipocampo, assim como uma redução significativa dos neurônios colinérgicos localizados no núcleo basal de Meynert, tem sido associados positivamente com depleções e grau de severidade maior de déficit cognitivo do paciente em vida. Estudos subsequentes demonstraram que a

administração de substâncias colinomiméticas reduzem as dificuldades mnemônicas apresentadas por pessoas acometidas pela doença (de FALCO et al., 2016). Outra hipótese aceita e estudada sobre a etiopatogênese da DA é a hipótese glutamatérgica. Conhecida também como “excitotóxica”, sendo o glutamato, um dos principais neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central, tendo sua atividade mediada por receptores específicos. A hipótese glutamatérgica descreve que, em condições específicas, tais como, por exemplo, a alteração do metabolismo energético celular, ocorre uma excessiva ativação desses receptores, determinando alterações na homeostase de cálcio, levando a um aumento das concentrações intracelulares deste metal, iniciando, precocemente, o processo de apoptose neuronal (GANESH et al., 2017).

Uma outra hipótese etiopatogênica, com base molecular, vem ganhando destaque, nos últimos 20 anos, a formação das placas beta-amiloidais. Uma das principais características é o acúmulo de placas Beta-amiloides ($A\beta$), proteínas insolúveis encontradas no meio extracelular, sendo o tipo $A\beta$ neurotóxico (YANKNER et al., 1989; OLSEN & SINGHRAO, 2015). As placas proteicas beta-amilóides são capazes de matar todos os tipos celulares por indução de apoptose (DESHPANDE et al., 2006). Estudos *post mortem* demonstram que o acúmulo de placas amilóides pode iniciar em tenras idades, por volta da terceira década de vida, e apresentam aumento com o passar da idade (BRAAK & BRAAK, 1997; KLUNK, et al., 2004; JACK, et al., 2009; KOK, et al., 2009; LANDAU, et al., 2012).

Existem dois tipos conhecidos de peptídeos amilóides $A\beta$, $A\beta_{40}$ e $A\beta_{42}$, que exercem papéis fisiológicos diferentes em nível cerebral. O consenso científico relata que o peptídeo de maior carga ($A\beta_{42}$), é a forma neurotóxica, uma vez que o tecido cerebral, fisiologicamente, em indivíduos sem alterações cognitivas durante o processo de envelhecimento, também é capaz de produzir placas $A\beta$ amilóides ($A\beta_{40}$), em menor número e mais difusas, que, aparentemente, não apresenta significância patológica (OLSEN & SINGHRAO, 2015). Mais recentemente, as formas fibrilares dos peptídeos $A\beta$, tanto as isoformas $A\beta_{40}$, quanto $A\beta_{42}$, liberadas no tecido cerebral de um indivíduo com Doença de Alzheimer, foram reconhecidas com defensinas, ou moléculas de defesa da resposta imune inata que agem na proteção do hospedeiro frente infecções. Ambos peptídeos podem apresentar a capacidade de lise da membrana bacteriana, atuando como peptídeos antibacterianos (AMP), o que pode ser considerado como parte de uma defesa cerebral imune inata, identificando espectro largo bacteriano e microrganismos

formadores de esporos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e protozoários, dando origem à hipótese da influência infecciosa na Doença de Alzheimer (SOSCIA et al., 2010; OLSEN & SINGHRAO, 2015).

Outro aspecto importante, relatado na literatura, descreve que placas antigas A β 42, são reconhecidas como ativadores de células micróglia, iniciando, dessa forma, a resposta imune local. As micróglias ativadas são consideradas a maior contribuição do processo inflamatório no sistema nervoso central, sendo responsáveis pela secreção de imunomodulação por meio de citocinas pró-inflamatórias (AKIYAMA et al., 2000; HANISCH, 2002; PERRY, NICOLL, HOLMES, 2010). Outro aspecto relevante é o reconhecimento padrão molecular das AMPs, associado ao reconhecimento bacteriano e de seus debrís, em resposta à infecção no sistema nervoso central (RIVEST, 2009). Os resultados de estudos de intervenção clínica com desenho experimental para remoção das placas amilóides cerebrais tem demonstrado grandes taxas de falha, possivelmente oriundas de intervenções tardias (MORGAN, 2011, OZUDOGRU & LIPPA, 2012). Estes aspectos demonstram a grande necessidade e ênfase em desenvolvimento de estudos para identificar fatores e mecanismos que interfiram e promovam o depósito de placas amilóides.

Recentemente, duas hipóteses inflamatórias relacionadas ao desenvolvimento de DA são apresentadas: uma intrínseca e outra extrínseca. O modelo inflamatório intrínseco relata que a barreira vascular cerebral potencialmente restringe a entrada de moléculas imunes e do sistema linfático em nível cerebral. Em consequência, as células gliais são capazes de gerar um sistema imune inato completo (GASQUE, 2004). Essa ativação das células de micróglia iniciam uma cascata pró-inflamatória e de substâncias neurotóxicas, resultando em degeneração neuronal. (JACK et al., 2010). O modelo inflamatório extrínseco determina que as células cerebrais são equipadas com receptores CD14, os quais são capazes de reconhecer lipopolissacarídeos do sangue periférico (LACROIX, FEINSTEIN, RIVEST, 1998 & HANISCH, 2002). Em conjunto, diversos elementos oriundos de infecções sistêmicas como os produzidos por patógenos orais gram-negativos de alto potencial virulento, são capazes de ativar os receptores em nível de sistema nervoso central (HOLMES et al., 2003; KAMER et al., 2009). Este fato se deve ao pensamento antigo de que a barreira hematoencefálica ser considerada um órgão imuno-privilegiado, acreditando-se que elementos do sistema imune como neutrófilos, células T nativas, proteínas do plasma e toxinas extra cerebrais, não eram capazes de cruzar a

barreira hematoencefálica (HANISCH, 2002; HOLMES et al., 2003; GASQUE, 2004; KAMER et al., 2009; SINGHRAO et al., 2014). Sob as evidências atuais, sabe-se que os órgãos circumventriculares não estão protegidos pela barreira hematoencefálica, tornando-se uma região onde infecções, tanto sistêmicas, quanto por via direta através do nervo trigêmeo e olfatório, e mediadores inflamatórios possam acessar o cérebro, determinando um novo olhar para o papel inflamatório modulador da DA (KAMER et al., 2009; SINGHRAO et al., 2014).

1.3. Doenças Periodontais e Repercussões Sistêmicas

As evidências científicas têm demonstrado que existe uma associação entre infecções localizadas, como a doença periodontal, e condições sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares, partos prematuros, diabetes, doença pulmonar, osteoporose, câncer e doença de Alzheimer (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013; OLSEN & SINGHRAO, 2015). Estas associações apresentam embasamento principalmente relacionado à influência do caráter pró-inflamatório dessas patologias e de outras condições sistêmicas (SCANNAPIECO, 2005). Bactérias periodontopatogênicas estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e/ou proteínas de fase aguda em locais distantes, o que poderia iniciar ou intensificar um processo de doença, sendo que estas bactérias também podem circular para outras mucosas, causando infecção e inflamação nestes locais (LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013).

1.4. Doenças Periodontais e Doença Alzheimer

Estudos têm demonstrado que as citocinas inflamatórias provenientes da defesa frente a produtos bacterianos podem apresentar risco de demência em populações idosas, quando frente a múltiplas infecções em sequência. Em conjunto, infecções em nível sistêmico podem contribuir para episódios de delírio em pacientes com diagnóstico clínico de Doença Alzheimer, e em alguns pacientes, esses episódios podem contribuir para um estado de morbidade cognitiva importante (HOLMES et al., 2003; DUNN et al., 2005). Outro fator importante contribuinte é o papel ativo de mediadores inflamatórios, como Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interleucina 1- β (IL-1 β), agindo indiretamente no tecido cerebral contribuindo para acelerar o déficit cognitivo. Estudos em modelo animal e estudos clínicos demonstram que o processo inflamatório possui um papel contribuinte importante na patogênese da Doença Alzheimer (HOLMES & BUTCHART, 2011; TANZI, 2012).

Os principais patógenos associados à doença periodontal como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. denticola*, demonstram ação potencial em diversas doenças inflamatórias em órgãos distantes. *P. gingivalis* e *T. denticola* são bactérias gram-negativas anaeróbias que já foram observadas colônias em tecido cerebral de pacientes com DA (RIVIERE, RIVIERE, SMITH, 2002; POOLE et al., 2013). A plausibilidade biológica ligando esses microrganismos ao tecido cerebral é a capacidade de disseminação ao longo de fibras nervosas e pelo tecido linfático, sendo identificados junto ao nervo trigêmeo e gânglio trigeminal (MIKLOSSY, 2011). Em revisão realizada por Miklossy (2011), 14 estudos demonstraram que periodontopatógenos, como espiroquetas, e seus antígenos e marcadores de DNA, estão associados com DA, e estão fortemente associados como agentes causais determinando déficit cognitivo.

Existe uma gama de evidências crescente inter-relacionando doença periodontal crônica e Doença de Alzheimer. Estudos clínicos e epidemiológicos que avaliaram perda dentária, demonstraram que este aspecto, apesar de controverso na análise do histórico de doença periodontal, esteve associado com menores níveis de memória curta e de longo prazo (STEIN et al., 2007; NOBLE et al., 2009). Em um estudo de Kamer e colaboradores (2015), após a avaliação de 38 indivíduos com saúde cognitiva, demonstrou-se que, após exame clínico periodontal e análise de escaneamento em nível cerebral e ajuste para fatores de confusão como fumo, perda de inserção clínica maior ou igual a três milímetros esteve associada à maior formação de placas β -amiloides, que estão associadas à maior desenvolvimento de déficit cognitivo e DA. Estudos transversais e de caráter longitudinal demonstram que os principais fatores periodontais como sangramento gengival, perda de inserção clínica, profundidade de sondagem, perda óssea alveolar e anticorpos aos periodonto-patógenos estão significativamente associados com declínio de função cognitiva, mesmo frente a ajuste de co-fatores (KAMER et al., 2008; WATTS, CRIMMINS, GATZ, 2008; CERAJEWSKA, DAVIES, WEST, 2015).

O estudo de proteínas de fase aguda, incluindo citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , como possíveis fatores indiretos interligando periodontopatógenos e seus fatores de virulência com o desenvolvimento de DA (KAMER et al., 2008; WATTS, CRIMMINS, GATZ, 2008). Outro aspecto importante demonstrado na literatura é o fato de muitos indivíduos idosos, institucionalizados ou não, demonstraram um declínio de cuidados em higiene oral, o que se torna um fator importante no desenvolvimento e recidiva de infecção oral, contribuindo para inflamação que pode levar a índices de

confusão e demência importantes (HOLMES et al., 2003; DUNN et al., 2005; HOLMES, COTTERELL, 2009). Stewart e colaboradores (2008) demonstraram, em um estudo de coorte com 5138 adultos (29-50 anos de idade), que sangramento gengival e perda de inserção clínica estiveram associados significativamente com declínio cognitivo. Em um estudo avaliando 152 indivíduos adultos e idosos (50-70 anos de idade), que foram acompanhados por cerca de 20 anos, maiores níveis de inflamação periodontal estiveram associados com níveis cognitivos mais baixos (CICCIÙ et al., 2013). Kaye e colaboradores (2010), estudaram 597 comunidades acompanhadas por 32 anos, fatores periodontais como a perda dentária, aumento de profundidade de sondagem e progressão de perda óssea alveolar estiveram associadas com déficit cognitivo, particularmente na faixa etária acima de 45 anos de idade. Outro aspecto importante estudado é a capacidade de certos patógenos com característica comensal de baixa infecção serem capazes de colonizar e se multiplicarem em sítios fora de seus nichos primários. Esta característica de imuno-tolerância e colonização distante pode apresentar um efeito deletério marcante na saúde de indivíduos idosos ou com demência associado a um quando de imunossupressão prévia (SHOEMARK, ALLEN, 2015). O quadro 1 apresenta, em ordem cronológica, um resumo dos estudos observacionais da relação entre doenças periodontais e déficit cognitivo. Dentre as razões para a variabilidade dos resultados, podem-se destacar o fato da utilização de diferentes classificações para as doenças periodontais utilizadas nos estudos. Entretanto, sob uma visão ampliada, podem-se observar resultados que corroboram a idéia de que indivíduos com doenças periodontais, principalmente em nível mais avançado, apresentam maiores chances de desenvolvimento e progressão de neurodegeneração associada à DA. Deve-se ressaltar que é observado uma carência de estudos experimentais clínicos, por limitações metodológicas para a realização dos mesmos, levando em conta a gravidade e potencial mortalidade da doença de Alzheimer.

Quadro 1 - Estudos Relacionando Doença Periodontal e Déficit Cognitivo

Autor Ano País	População	Tipo de Estudo	Diagnóstico de Doença Alzheimer	Critério para Doença Periodontal	Principais Achados
Ship, Scott, Puckett 1994 EUA	21 adultos (13 homens e 8 mulheres) (49-90 anos)	Caso-controle	Critério NINCDS-ADRDA	Rarnfjord Index	Piores níveis de parâmetros de saúde oral (salivação estimulada e não estimulada, CPO-D e PS e SS), associados com maiores níveis de Doença de Alzheimer. Bem como com o avançar da DA, houve associação com declínio de cuidados em saúde oral.
Noble et al. 2009 EUA	2355 ≥ 60 anos	Transversal	Testes aferidos no NHANES-III (teste de retenção de memória verbal lógica de curta e longa duração do adaptado do the East Boston Memory Test	Níveis séricos de IgG para <i>P.gingivalis</i>	Maiores níveis do marcador sérico de periodontite (IgG <i>P.gingivalis</i>) foi associado à maiores níveis de déficit cognitivo e retenção de memória
Kamer et al. 2009 EUA	18 pacientes com Alzheimer e 16 pacientes saudáveis ≥ 65 anos	Transversal	Critério NINCDS-ADRDA MMSE	Anticorpos <i>contra A. actinomycetemcomitans</i> serotipo b (ATCC 43718), <i>T. forsythia</i> (ATCC 43037), e <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277); alelos genéticos ApoE	Níveis mais elevados de anticorpos frente aos peridontopatógenos e aumento de TNF- α , foram significativamente associados com Doença de Alzheimer, sendo considerados possíveis prognósticos de doença
Arrivè et al. 2012 França	405 pacientes (66-80 anos)	Coorte longitudinal	Critério NINCDS-ADRDA critério Hachinski	CPO-D CPITN	Pacientes que apresentavam 11 dentes perdidos ou mais, apresentaram menor déficit cognitivo. Possivelmente explicado pela diminuição da carga inflamatória
Kamer et al. 2012 EUA	Pacientes acima de 70 anos	Transversal	Critério DST (Digital Symbol) Critério BDT (Block Design)	Perda Dentária e Inflamação periodontal (PS, SS, NIC)	Pacientes que apresentaram maiores perdas dentárias e maiores níveis de inflamação apresentaram maiores índices de déficit cognitivo
Stewart et al. 2013 EUA	1053 pacientes (70-79 anos)	Coorte longitudinal	MMSE	Perda Dentária e Inflamação periodontal (PS, SS, NIC)	Aumento dos parâmetros inflamatórios periodontais e aumento de número de dentes perdidos foram considerados como fator de risco para declínio cognitivo
Poole et al. 2013 EUA	10 pacientes com Alzheimer e 10 pacientes controle ≥ 65 anos	Transversal	Pacientes com diagnóstico prévio de Doença de Alzheimer examinados <i>post-mortem</i>	Identificação de periodontopatógenos e fatores de virulência associados em nível cerebral	Maior presença de colônias de periodontopatógenos e lipopolissacarídeos identificados no cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer <i>post-mortem</i>
Minn et al. 2013 Coréia	300 pacientes testes e 350 pacientes controle (50-75 anos)	Transversal	Tomografia computadorizada para análise de mudanças de matéria cinzenta e isquemias cerebrais	Perda dentária	Aumento significativo de isquemias e alterações de massa cinzenta em pacientes com perda de 10 ou mais dentes (OR 2,3).
Park et al. 2013 Coréia	438 adultos acima de 50 anos	Transversal	MMSE	Perda dentária	Aumento do número de dentes perdidos associado com maior declínio cognitivo (6-10 dentes perdidos – OR=2,26)

Kubota et al. 2014 Japão	14 pacientes com periodontite e 14 pacientes controle (59-70 anos)	Transversal	Identificação de proteínas precursoras de formação de placas beta-amiloides (APP); Identificação de IL1-β; análise de componente 1 de ativação do sistema complemento (C1QA)	PS, SS, NIC	Associação significativa entre periodontite e parâmetros precursores de DA
Martande et al. 2014 Índia	58 indivíduos com Alzheimer e 60 indivíduos controle (50-80 anos)	Transversal	Critério NINCDS-ADRDA MMSE	Índice de placa, PS, SS, NIC	Todos os parâmetros inflamatórios apresentaram-se em maior nível nos pacientes com Doença de Alzheimer
Noble et al. 2014 EUA	219 pacientes ≥ 65 anos	Coorte	MMSE	Anticorpos séricos à periodontopatógenos	Níveis séricos de imunoglobulinas G (IgG) em resposta aos principais periodontopatógenos estão associadas com risco aumentado de desenvolvimento de DA
Farhad et al. 2014 Iran	80 pacientes (40-70 anos)	Caso-controle	Pacientes com diagnóstico prévio de DA que procuraram o Serviço de Neurologia do Hospital de Isfahan	NIC TNF-α	TNF-α apresentou associação positiva para DA e periodontite, podendo ser utilizado como possível biomarcador das duas patologias
Okamoto et al. 2015 Japão	2335 pacientes ≥ 65 anos	Coorte longitudinal	Índice de déficit cognitivo (MMI)	Perda dentária	Maior número de dentes perdidos foi associado com piores índices de déficit cognitivo
Gil-Montoya et al. 2015 Espanha	409 casos e controles pareados ≥ 50 anos	Caso-controle	MMSE	Perda dentária, PS, índice de placa, NIC, SS	Periodontite foi associada significativamente com déficit cognitivo, mesmo ajustando para cofatores como idade, sexo e nível educacional
Zhu et al. 2015 China	161 pacientes ≥ 65 anos	Transversal	Índice vascular e cognitivo de Montreal	Perda dentária	Múltiplas perdas dentárias associadas com maior risco de acidente vascular isquêmico cerebral e déficit cognitivo
Cestari et al. 2016 Brasil	65 pacientes ≥ 65 anos	Transversal	MMSE Questionário de Atividades Funcionais	Parâmetros periodontais (PS, SS, NIC) e IL-6, IL-1β e TNF-α	IL-6 e TNF-α apresentaram-se como marcadores biológicos relevantes tanto para a doença periodontal quanto para DA
Sochocka et al. 2017 Polônia	128 pacientes (55-90 anos)	Transversal	MMSE	PS, SS, NIC Mediadores inflamatórios	O estado pró-inflamatório sistêmico, avaliado pelo aumento do nível de mediadores inflamatórios, é importante na correlação entre doenças periodontais e DA
Gil-Montoya et al. 2017	166 pacientes ≥ 50 anos	Caso-controle	MMSE Análise sérica de precursores de placas beta amiloides	PS, NIC, SS	Níveis plasmáticos de precursores de placas beta-amiloides significativamente maiores em pacientes com periodontite

Espanha					
Chen et al. 2017 Taiwan	18672 pacientes ≥ 65 anos	Coorte retrospectiva	MMSE	PS, NIC, SS	Em 10 anos de acompanhamento foi demonstrado que piores condições periodontais aumentaram risco de desenvolvimento de DA (OR=1,7).

Legenda: NINCDS-ADRDA= critério diagnóstico para doença de Alzheimer proposto pelo National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke e pela Alzheimer's Disease and Related Disorders Association; NHANES-III= Third National Health and Nutrition Examination Survey; MMSE= Mini-Mental State Exam; CPO-D= Cariados, perdidos e obturados; TNF- α = Fator de necrose tumoral alfa; NIC= Nível de inserção clínica; PS= Profundidade de sondagem; SS= Sangramento à sondagem; CPITN= (Índice Peridontal comunitário de necessidades de tratamento (The community periodontal index of treatment needs); OR= Odds Ratio; IL1- β = Interleucina 1 beta; DA= Doença de Alzheimer; IL-6= Interleucina 6.

1.5. Modelos Experimentais de Doença Alzheimer

O fármaco escopolamina, sendo um antagonista muscarínico de receptor de acetilcolina, apresenta um papel fundamental no desenvolvimento de modelos experimentais de déficit cognitivo miméticos à Doença de Alzheimer (NAVARRO et al., 2017). É estabelecido que a escopolamina possui a capacidade de indução de déficit cognitivo, particularmente relacionado à memória de curta duração e retenção de informações (LONITA et al., 2017). Outro aspecto relevante tangente ao desenvolvimento de modelos experimentais de Doença de Alzheimer é referente ao papel que este fármaco apresenta aumentando, significativamente, a atividade da acetilcolinesterase e de níveis de malondialdeído, em nível de córtex cerebral e hipocampo, sendo um relevante estresse oxidativo no cérebro (TAO et al., 2014; HAIDER, TABASSUM, PERVEEN, 2016).

O estresse oxidativo apresenta-se como um importante fator relacionado com a patofisiologia de distúrbios neurodegenerativos, incluindo a Doença de Alzheimer (JOMOVA et al., 2010). As patologias neurodegenerativas estão fortemente correlacionadas com déficits colinérgicos e estresse oxidativo intracelular. O dano oxidativo, em nível de córtex cerebral, atua e contribui de forma significativa na patogênese e abalos cognitivos no Alzheimer (QUNXING, EDGARDO, JEFFREY, 2007). Diversos estudos estabelecem a validade e eficácia do modelo experimental de indução de Doença Alzheimer por escopolamina (ROHIT & ASHOK, 2015; LONITA et al, 2017; SHIN, KIM, SUH, 2017).

2. PROPOSIÇÃO

2.1.OBJETIVO GERAL

Analisar a relação entre doença periodontal e déficit cognitivo em ratos Wistar.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base nos objetivos específicos da presente tese foram escritos um artigo de divulgação e 2 artigos originais. Abaixo encontram-se descritos os objetivos referentes a cada um dos artigos.

Artigo 1

Divulgar uma revisão narrativa da literatura, para profissionais da saúde, em veículo de ampla circulação, aspectos relevantes atuais acerca da relação das doenças periodontais e Doença de Alzheimer

Artigo 2

Avaliar o efeito da presença de doença periodontal sobre o estado comportamental de ratos com déficit cognitivo.

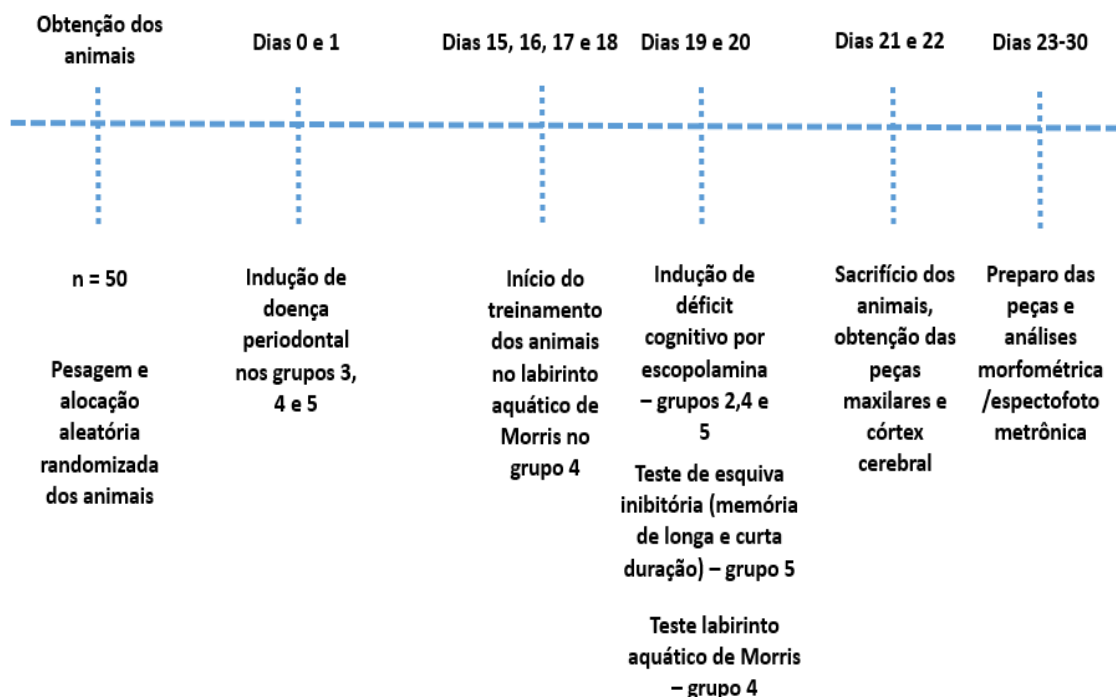
Artigo 3

Avaliar o efeito da indução da doença periodontal sobre parâmetros químicos de estresse oxidativo em um modelo de indução de déficit cognitivo em ratos Wistar.

3. METODOLOGIA

Todas as etapas realizadas para os artigos 2 e 3, bem como o momento de realização estão expressas na Figura 1.

Figura 1 – Desenho esquemático das diferentes fases experimentais do estudo



3.1. Delineamento da Pesquisa

Este estudo apresenta um desenho experimental do tipo prospectivo, randomizado controlado em modelo animal.

3.2. Considerações Éticas

Desde seu planejamento, as etapas de pesquisa foram conduzidas seguindo as recomendações e guias para execução e escrita de estudos em modelo animal propostas pela Diretriz ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) (KILKENNY et al., 2010). Os protocolos de estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-URI/Erechim), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI-Erechim/RS). Os procedimentos experimentais obedecem a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais.

3.3. Modelo Animal

Foram utilizados 50 ratos Wistar, com 45 dias de vida, machos, pesando cerca de 250g, dos quais 48 completaram as etapas experimentais. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas de polipropileno medindo 65 x 25 x 15 cm (4-5 animais em cada) com o assoalho recoberto de serragem, recebendo ração balanceada para roedores e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro e em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os processos necessários para minimizar qualquer desconforto ou dor foram realizados pelos pesquisadores, sendo determinada uma semana de aclimação dos animais ao biotério antes do início da fase experimental. O tamanho amostral foi baseado em estudos prévios utilizando como desfecho principal análises comportamentais (EUN et al., 2017), e perda óssea alveolar (LIBERMAN et al., 2011), totalizando 10 animais por grupo.

3.4. Randomização

Os animais foram alocados randomicamente para seus respectivos grupos experimentais distribuídos considerando o peso ponderal a partir de extratos representados pelos quartis de peso. Após, os animais foram sorteados e alocados nos respectivos grupos experimentais.

3.5. Constituição dos Grupos Experimentais

Considerando o macroprojeto, os animais foram divididos em 5 grupos experimentais, com 10 animais em cada grupo da seguinte forma:

Grupo 1 (Controle total): ausência de Indução de doença periodontal e ausência de indução de déficit cognitivo – n=10;

Grupo 2 (Escopolamina): indução de déficit cognitivo por escopolamina e ausência de indução de perda óssea alveolar – n=10;

Grupo 3 (Doença Periodontal): realizada a indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura - n=10;

Grupo 4 (Doença Periodontal + escopolamina – avaliação por meio de labirinto de Morris): realizada a indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura,

e depois de 15 dias, induzido o déficit cognitivo por meio de escopolamina, sendo realizada a avaliação do déficit cognitivo por meio de labirinto aquático de Morris – n=10.

Grupo 5 (Doença Periodontal + Escopolamina – avaliação por meio de labirinto de esQUIVA inibitória): realizada a indução de doença periodontal e déficit cognitivo por meio de escopolamina, e realizada a avaliação do déficit cognitivo por meio de esQUIVA inibitória – n=10.

3.6. Procedimentos Experimentais

3.6.1. Indução de Doença Periodontal

Foi realizada indução de perda óssea alveolar por meio de colocação de quatro ligaduras no segundo molar de cada hemiarcada superior e inferior do rato, sendo realizada por meio de anestesia geral. O protocolo anestésico utilizado foi o composto Tiletamina-Zolazepan (Zoletil®) 20mg/kg, intraperitoneal (IP), com manutenção quanto necessário (DIEH et al., 2001). Para realização das ligaduras foi utilizado o fio de sutura de seda (4-0) - Ethicon®, colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais e realizado um nó na face vestibular. Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram a metodologia proposta por Liberman et al. (2011), onde as ligaduras permaneceram por 14 dias, sendo o tempo necessário para desenvolvimento de periodontite. A presença e correta posição da ligadura foi verificada ao final do estudo nas coletas das amostras para análise morfométrica.

3.6.2. Indução de Déficit Cognitivo

O déficit de memória foi induzido pela administração de escopolamina hydrobromide 3 mg/kg intraperitoneal (IP), (Sigma, São Paulo/SP, Brasil), trinta minutos antes das sessões testes para avaliação de latência de memória por meio dos testes de esQUIVA inibitória e labirinto aquático de Morris (BIHAQI, SINGH, TIWARI, 2011).

3.6.3. Teste de EsQUIVA Inibitória

A esQUIVA inibitória foi realizada para avaliação de memória aversiva de curta e longa duração, sendo realizado por meio de uso de uma caixa de condicionamento, com face frontal de vidro. Na extremidade esquerda da caixa encontra-se uma plataforma de madeira de 8 cm x 25 cm, situada a 5 cm do chão da caixa. No restante da caixa o assoalho

é formado por uma grade de barras de inox, as quais apresentam 0,2 cm de diâmetro e encontram-se separadas umas das outras por um espaço de 1 cm. Na sessão treino os animais foram colocados delicadamente de frente para o fundo da caixa, e ao descer com as quatro patas nas grades de inox receberam um estímulo elétrico de 0,4 mA, durante 2 segundos e a latência de descida foi registrada. Logo após os animais foram retirados do equipamento e colocados em suas caixas de origem.

Nas sessões teste (24 horas pós-treino para memória de longa duração e 90 minutos pós-treino para memória de curta-duração) os animais foram reexpostos ao equipamento, mas com a extinção do choque elétrico. A diferença entre o tempo de descida (latência) da sessão teste e da sessão treino foi tomada como medida de memória. Como padrão, foi estabelecido um teto máximo de latência de descida da plataforma correspondente a 60 segundos na sessão treino e 180 segundos na sessão teste, igualmente para todos os grupos, de modo que as latências superiores a estes padrões foram consideradas como tais (ROSSATO et al., 2004), os testes foram realizados após decorridos 14 dias de indução de doença periodontal por meio de ligadura nos grupos que receberam indução de doença.

3.6.4. Teste de Labirinto Aquático de Morris

Neste teste foi utilizado um tanque (1 m de diâmetro), dividido em quadrantes (norte, sul, leste e oeste) por linhas imaginárias contendo água no seu interior, e em uma profundidade de 30 cm. Durante o treinamento foi colocada uma plataforma (10 cm de diâmetro) submersa a 1 cm abaixo da superfície de água ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) obscurecida com solução opaca para turvamento da água, sempre dentro do mesmo quadrante, durante quatro dias consecutivos. Cada treino consistiu de um bloco de quatro tentativas onde os animais foram gentilmente colocados em cada um dos quadrantes, no máximo um minuto cada. O treinamento dos animais ocorreu durante quatro dias consecutivos antecedendo a administração de escopolamina. Se os animais não localizaram a plataforma por si só em 60 segundos, eles foram guiados pelo pesquisador até a plataforma, e mantidos sobre ela por 10 segundos, para após retornar a uma caixa e descansar por 20 segundos. Para este teste foi registrado o tempo em que o animal levou para alcançar a plataforma durante o quarto dia. No quinto dia, os animais receberam a administração de escopolamina e o teste foi realizado. O teste consistiu em repetir o que eles aprenderam nos ensaios, mas sem a plataforma na água. Os animais foram alocados em um ponto inicial e liberados para nadar na posição da piscina oposta a qual estava à plataforma, permitindo avaliar a

memória espacial e compará-la entre os diversos grupos (ROSSATO et al., 2006), este teste também foi realizado, desde a fase de treino até o teste propriamente dito, após decorridos 14 dias de indução de doença periodontal por meio de ligadura nos grupos que receberam indução de doença.

3.6.5. Preparo das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda Óssea Alveolar

Após o término dos procedimentos experimentais foi realizada a eutanásia dos animais por meio de guilhotina. As maxilas e mandíbulas foram removidas e imersas em hipoclorito de sódio (9% de cloro ativo), durante cinco horas, e os tecidos moles restantes mecanicamente removidos, após, foi realizada lavagem e as peças foram secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, as peças foram coradas com azul de metileno a 1% durante um minuto, lavando-se e secando-se novamente para remover excessos da solução. Foram realizadas fotografias padronizadas das peças com câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal padrão.

Foi utilizado um aparato confeccionado com pasta pesada de silicona de adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo, sendo realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das peças, avaliando a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea através programa ImageJ 10.0, determinando uma média de perda óssea por animal por meio da média de cinco pontos por face livre, por um examinador calibrado e cego aos grupos experimentais.

3.6.6. Preparo do Tecido Cerebral e Medidas de Estresse Oxidativo

Após a eutanásia por decapitação, o córtex foi imediatamente separado. As estruturas foram homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato de sódio (200 mM) com KCl (140 mM). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3000 *rpm* por 10 minutos e o sobrenadante separado para as técnicas da homeostase redox. Para os experimentos da homeostase redox, os sobrenadantes obtidos dos diferentes tecidos foram submetidos a uma incubação a 37 °C na presença dos ácidos orgânicos por uma hora.

Determinação dos Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para quantificar os produtos da peroxidação lipídica foi utilizado o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica. Foram adicionados 300 μL de ácido tricloroacético 10 % a uma alíquota de 150 μL do sobrenadante. Após centrifugação, 300 μL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm (DELWING-DAL MAGRO et al., 2016).

Medida de Sulfidrilas Totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). Um volume de 50 μL de sobrenadante reagiu com o ácido ditionitrobenzóico 10mM (DTNB). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso o método determina os tióis totais da amostra.

Medida dos Níveis de Glutationa Reduzida (GSH)

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Salat e colaboradores (2014). Um volume de 300 μL de sobrenadante foi desprotezinado adicionando-se um volume de ácido metafosfórico 1,85 %. Após centrifugação, 150 μL do sobrenadante foram neutralizados com Na_2HPO_4 (0,3 M) e, posteriormente, reagiram com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) na concentração de 1 mM. A medida dos tióis livres de uma amostra desproteinizada reflete a concentração de GSH da amostra.

Atividade de Catalase (CAT)

Foi determinada a atividade desta enzima através do método de Olorunnisola e colaboradores (2016). Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foram adicionados 100 μl de H_2O_2 30% (v/v). Após adição de 20 μl de sobrenadante (previamente tratada com Triton 0,1 %) a 600 μl da mistura (tampão + H_2O_2) foi realizada a leitura da queda da absorvância do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm.

Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica utilizada baseia-se na metodologia de Marklund (1985). O sobrenadante obtido após a centrifugação do homogeneizado das planárias foi transferido para um tubo pequeno e 15 uL sendo posteriormente pipetado a uma placa de 96 poços. A atividade da SOD é medida baseando-se na capacidade do piragalol de se auto-oxidar em um processo altamente dependente de $O_2^{\cdot-}$, que é um substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente medida no espectrofotômetro a 420 nm. 15 uL de sobrenadante que foi posteriormente pipetado numa placa de 96 poços em duplicata. Adiciona-se então 210µL de uma mistura de catalase 80 U / mL (100µL) e tampão Tris 50 mM, ácido etilenodiaminotetracético (21500 µL), pH 8,2, em cada poço sobre as amostras e, por fim, 20µL de pirogalol (0,38 mM). Após, foi realizada a leitura da absorvância a 405 nm durante 5 min. em espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi feita com SOD purificada como padrão para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados são expressos como (µmol/mg).

3.7. Cegamento e Reprodutibilidade

O cegamento dos pesquisadores ocorreu no momento da análise morfométrica, análises comportamentais e condução das análises bioquímicas, sendo os avaliadores cegos aos grupos. Previamente ao início da análise morfométrica, para a calibragem do examinador, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos (por sorteio) para serem duplamente mensurados, em termos de perda óssea alveolar, com intervalo de uma semana sendo que suas médias foram comparadas através de teste t para amostras pareadas, acrescido de coeficiente de correlação de Pearson. Ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias foi considerada um indicativo de reprodutibilidade. Também foi realizado o coeficiente de correlação intra-classe, sendo resultado de 0,97 para análise morfométrica e 0,95 para as análises bioquímicas.

3.8. Análise de Dados

Hipótese Estatística

A hipótese de nulidade testada estatisticamente é a de ausência de diferença entre os grupos experimentais para os desfechos analisados. A hipótese alternativa é de que pelo menos um dos grupos é estatisticamente diferente dos demais.

Análise Estatística

As análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS 22.0 para Windows. Para todos os parâmetros utilizados, o teste de Kolmorov-Smirnov foi realizado para testar a normalidade dos dados. Para comparação das médias de perda óssea alveolar entre os grupos e para comparação das médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo foi realizado o teste ANOVA para comparações múltiplas. Para comparação das médias de latência entre os grupos de análises comportamentais foi utilizado o teste t para amostras independentes. Para fins de análise descritiva, foram realizadas médias e desvio-padrão das diferentes variáveis. A significância adotada para as análises foi de 95%.

Artigo 1

INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA DE ALZHEIMER E DOENÇAS
PERIDONTAIS: O QUE SE SABE HOJE

Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry, v.13, n.2,
p. 200-203, abr/jun, 2017.

Novas Tendências

INTER-RELAÇÃO ENTRE DOENÇA DE ALZHEIMER E DOENÇAS PERIODONTAIS: O QUE SE SABE HOJE

Inter-relationship between alzheimer and periodontal diseases: What is known today



Cassiano Kuchenbecker Rösing

Professor Titular de Periodonto da UFPRG
Rua Dr. Villa, 422/701, 95640-010, Porto Alegre, RS, Brazil
crosing@ufprg.com



Marcelo Ekman Ribas

Doutorando em Clínica Odontológica/Periodonto na UFPRG
marcelkriman@gmail.com

RESUMO

O envelhecimento humano é uma realidade dos tempos modernos. A partir de medidas de prevenção e controle da saúde, a expectativa de vida tem aumentado em todo o mundo. Dois fenômenos são muito importantes no contexto deste artigo: 1) diferentes doenças têm tido sua incidência incrementada – merece destaque a doença de Alzheimer; e 2) a mudança de paradigma da odontologia tem permitido que mais pessoas envelheçam com dentes, o que gera espaço para incremento na prevalência de doenças periodontais, por exemplo. A presença de doenças periodontais, entendidas como inflamação sistêmica, pode ter um papel importante no desenvolvimento de desordens neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. O objetivo desta coluna é expor alguns aspectos importantes da relação entre doenças periodontais e a doença de Alzheimer, ressaltando a importância da odontologia na saúde integral dos pacientes.

ABSTRACT

Human aging is a reality of contemporary times. After preventive and health control measurements, life expectancy has increased worldwide. Two phenomena are very important in the context of this article: 1) different diseases have increased their incidence, among them deserving highlight Alzheimer's Disease; 2) shift in paradigm in Dentistry has allowed that more people increase age with teeth, generating space to increase in prevalence of periodontal diseases, for example. The presence of periodontal diseases, being a systemic inflammation may have an important role in the development of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's Disease. The aim of this paper is to highlight some important aspects of the interrelationship between periodontal diseases and Alzheimer's Disease, demonstrating the importance of Dentistry in the context of general health of the patients.

Nas últimas décadas um fenômeno epidemiológico interessante tem ocorrido em paralelo ao aumento da expectativa de vida: as pessoas estão envelhecendo com dentes. Em momentos anteriores da história, basicamente se encontravam desdentadas as pessoas que atingiam idades avançadas. Em que se pese ainda existir um grande número de desdentados nas idades avançadas, o fenômeno do envelhecimento com dentes em boca é cada vez mais frequente. Isso é fruto do exitoso trabalho preventivo e terapêutico na odontologia.

Entre as patologias relacionadas com o processo de envelhecimento, os processos degenerativos destacam-se de forma significativa. Estima-se que na maioria das regiões do mundo a prevalência de doenças degenerativas, principalmente relacionadas a demências, apresenta variabilidade de 5% a 7% acima da sexta década de vida.¹ Quando se determinam os dados de prevalência na América Latina, cerca de 35,6 milhões de pessoas apresentaram quadros degenerativos demenciais em 2010, com estimativa de dobrar a cada 20 anos. Parte significativa desses quadros demenciais decorre da doença de Alzheimer (DA), o que coloca essa condição como prioridade de saúde mundial.² A doença de Alzheimer constitui uma das patologias neurodegenerativas mais prevalentes – apresenta perda cognitiva e demência –, sendo associada à morte e a atrofia neuronal específica.^{3,4} Essa patologia ocasiona o comprometimento das funções cognitivas, motoras e comportamentais, o que influencia o dia a dia dos indivíduos e induz, em seus estágios mais avançados, a elevado grau de dependência.⁵ A enfermidade tem impacto significativo sobre o grupo social relacionado, que inclui familiares e cuidadores, com extensão e complexidade de manifestações funcionais, emocionais e consequências sociais. A doença não tem cura, e o manejo da condição envolve o tratamento de sintomas cognitivos e comportamentais.⁶

Estima-se que a prevalência de doença de Alzheimer nos Estados Unidos no ano de 2050 seja de cerca de 14 milhões de pessoas afetadas, o que terá importante impacto econômico para os pacientes, para os cuidadores e para a saúde pública, em decorrência dos custos indiretos, associados à perda ou redução dos ganhos do paciente e membros da família, e dos custos diretos relacionados com tratamento médico, serviços sociais e necessidade de institucionalização ou de um cuidador formal, à medida que a doença atinge estágios avançados, com aumento de custo em saúde estimado em um bilhão de dólares.^{4,7} No Brasil estudos apontam para a prevalência de deficiências neurodegenerativas na população maior de 65 anos de 7,1%, sendo mais da metade dos casos representados pela DA.⁸ Considerando a prevalência de alterações neurodegenerativas no Brasil em conjunto com a população de idosos, de aproximadamente 15 milhões de pessoas, em 2013 a estimativa era de 1,1 milhão de casos para aquele ano.⁹

As características neuropatológicas do cérebro com do-

ença de Alzheimer apresentam aspectos relevantes no entendimento do desenvolvimento dos processos neurodegenerativos. Uma das principais características é o acúmulo de placas beta-amiloides (A β), proteínas insolúveis encontradas no meio extracelular, sendo o tipo A β neurotóxico.⁴ As placas proteicas beta-amiloides são capazes de matar todos os tipos celulares por indução de apoptose.⁸ Estudos *post mortem* demonstram que o acúmulo de placas amiloides pode se iniciar em tenras idades, por volta da terceira década de vida, as quais apresentam aumento com o passar da idade.¹⁰

Existem tipos conhecidos de peptídeos amiloides A β , A β 40 e A β 42 que exercem papéis fisiológicos diferentes em nível cerebral. O consenso científico relata que o peptídeo de maior carga (A β 42) é a forma neurotóxica, uma vez que o tecido cerebral, fisiologicamente, em indivíduos sem alterações cognitivas durante o processo de envelhecimento, também é capaz de produzir placas A β amiloides (A β 40), em menor número e mais difusas, o que, aparentemente, não apresenta significância patológica.⁴ Mais recentemente, as formas fibrilares dos peptídeos A β , tanto as isoformas A β 40 quanto A β 42, liberadas no tecido cerebral de um indivíduo com DA, foram reconhecidas com defensinas, ou moléculas de defesa da resposta imune inata, que agem na proteção do hospedeiro diante de infecções. Ambos os peptídeos podem apresentar a capacidade de lise da membrana bacteriana, atuando como peptídeos antibacterianos (AMP), o que pode ser considerado como parte de uma defesa cerebral imune inata, que identifica espectro largo bacteriano e microrganismos formadores de esporos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, vírus e protozoários, o que deu origem à hipótese da influência infecciosa na DA.⁶

Outro aspecto importante relatado na literatura descreve que placas antigas A β 42 são reconhecidas como ativadoras de células micróglias, iniciando-se, dessa forma, a resposta imune local. As micróglias ativadas são consideradas a maior contribuição do processo inflamatório no sistema nervoso central, sendo responsáveis pela secreção de imunomodulação por meio de citocinas pró-inflamatórias.^{11,12}

Recentemente, duas hipóteses inflamatórias relacionadas ao desenvolvimento de DA são apresentadas: uma intrínseca e outra extrínseca. O modelo inflamatório intrínseco relata que a barreira vascular cerebral potencialmente restringe a entrada de moléculas imunes e do sistema linfático em nível cerebral. Em consequência, as células gliais são capazes de gerar um sistema imune inato completo.¹³ Essa ativação das células de micróglias iniciam uma cascata pró-inflamatória e de substâncias neurotóxicas, resultando em degeneração neuronal.¹⁴ O modelo inflamatório extrínseco determina que as células cerebrais são equipadas com receptores CD14, capazes de reconhecer lipopolissacarídeos do sangue. Em conjunto, diversos elementos oriundos de infecções sistêmicas como os produzidos por

patógenos orais gram-negativos de alto potencial virulento são capazes de ativar os receptores no sistema nervoso central.¹⁴

As evidências científicas têm demonstrado que existe associação entre infecções localizadas, como a doença periodontal, e condições sistêmicas, tais como doenças cardiovasculares, partos prematuros, diabetes, doença pulmonar, osteoporose, câncer e doença de Alzheimer.⁴ As principais hipóteses estudadas que sustentam esse fato são as de que bactérias patogênicas do biofilme oral potencialmente entram na corrente sanguínea, causando bacteremias sistêmicas e podendo causar infecções a distância.¹⁴ Bactérias periodontopatogênicas estimulam a liberação de citocinas pró-inflamatórias e/ou proteínas de fase aguda em locais distantes, o que poderia iniciar ou intensificar um processo de doença. Essas bactérias também podem circular para outras mucosas, causando infecção e inflamação nesses locais.¹⁴

Estudos têm demonstrado que as citocinas inflamatórias provenientes da defesa contra produtos bacterianos podem apresentar risco de demência em populações idosas, quando diante de múltiplas infecções em sequência. Em conjunto, infecções em nível sistêmico podem contribuir para episódios de delírio em pacientes com diagnóstico clínico de DA, e em alguns pacientes esses episódios podem contribuir para um estado de morbidade cognitiva importante.¹⁴ Outro fator contribuinte relevante é o papel ativo de mediadores inflamatórios, como o Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interleucina 1- β (IL-1 β), que agem indiretamente no tecido cerebral e contribuem para acelerar o déficit cognitivo. Estudos em modelo animal e estudos clínicos demonstram que o processo inflamatório possui um papel contribuinte importante na patogênese da DA.¹⁴

Os principais patógenos associados à doença periodontal, como *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. dentocolla*, demonstram ação potencial em diversas doenças inflamatórias em órgãos distantes. *P. gingivalis* e *T. dentocolla* são bactérias gram-negativas anaeróbicas que já foram observadas como colônias em tecido cerebral de pacientes com DA.^{17,18} A plausibilidade biológica ligando esses microrganismos ao tecido cerebral é a capacidade de disseminação ao longo de fibras nervosas e pelo tecido linfático, sendo identificados junto ao nervo trigêmeo e gânglio trigeminal. Em revisão realizada, 14 estudos demonstraram que periodontopatógenos, como espiroquetas, e seus antígenos e marcadores de DNA estão associados com DA e estão fortemente associados como agentes causais, o que determina déficit cognitivo.¹⁹

Existe uma gama de evidências crescente inter-relacionando doença periodontal crônica e DA. Estudos clínicos e epidemiológicos que avaliaram perda dentária demonstraram que esse aspecto, apesar de controverso na análise do histórico de doença periodontal, esteve associado com menores níveis de memória curta e de longo prazo. Em um estudo, após a avir-

liação de 38 indivíduos com saúde cognitiva, demonstrou-se que, por meio de exame clínico periodontal e análise de escaneamento em nível cerebral e ajuste para fatores de confusão, como fumo, perda de inserção clínica maior ou igual a 3 mm esteve associada a maior formação de placas β -amiloides, que estão associadas, por sua vez, a maior desenvolvimento de déficit cognitivo e DA.²⁰ Estudos transversais e de caráter longitudinal demonstram que os principais fatores periodontais, como sangramento gengival, perda de inserção clínica, profundidade de sondagem, perda óssea alveolar e anticorpos aos periodontopatógenos, estão significativamente associados a declínio de função cognitiva, mesmo diante de ajuste de cofatores.

Proteínas de fase aguda, incluindo citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , são apontadas como possíveis fatores indiretos que interligam periodontopatógenos e seus fatores de virulência com o desenvolvimento de DA.²⁰ Outro aspecto importante demonstrado na literatura é o fato de que muitos indivíduos idosos, institucionalizados ou não, demonstraram declínio de cuidados em higiene oral, o que se torna um fator importante no desenvolvimento e recidiva de infecção oral, e contribui para a inflamação, que pode levar a índices de confusão e demência importantes.¹⁴

É importante também ressaltar que, com o envelhecimento, aspectos comportamentais sofrem modificações e, muitas vezes, as medidas de autocuidado ficam menos efetivas. Assim, o controle de placa pelo paciente pode também piorar com o envelhecimento, o que aumenta as chances do desenvolvimento de doenças periodontais. Ainda é digno de nota que a abordagem do paciente geriátrico precisa ser objeto de atenção na odontologia tanto em aspectos preventivos como terapêuticos, com vistas a sua saúde integral.

Com base na reflexão posta nesta coluna, é lícito sugerir que a manutenção de saúde bucal possa ter benefício também por limitar o desenvolvimento de doença de Alzheimer, o que incrementa o papel da odontologia como uma profissão que contribui para a saúde integral de indivíduos e populações.

REFERÊNCIAS

1. Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP. The global prevalence of dementia: a systematic review and meta-analysis. *Alzheimer's Dement*. 2013 Jan;9(1):63-75.
2. Costa RD, Osório-de-Castro CG, da Silva RM, Maia Ada A, Ramos MC, Carstano R. The acquisition of medication to treat Alzheimer's disease in Brazil: an analysis of federal purchases, 2009-2013. *Cien Saude Colet*. 2015 Dec;20(12):3527-35.
3. Dalin EJ, Hudson AR. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2014 Mar;14(3):417.
4. Olsen I, Singhrao SK. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? *J Oral Microbiol*. 2015 Sep;17(7):29143.
5. Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne G, Aarsland D, Jones C. Alzheimer's

- disease. *Lancet*. 2011 May;19(377(9770)):1019-31.
6. Sorbi S, Fort J, Enkjuenti T, Macloy T, Gainotti G, Gurvit H, et al. *EFNS Scientific Panel on Dementia and Cognitive Neurology, EFNS-EUS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia*. *Eur J Neurol*. 2012 Sep;19(9):1188-79.
 7. Castro DM, Dillon C, Macnicki G, Allegri RF. The economic cost of Alzheimer's disease: family or public-health burden? *Dement Neuropsychol*. 2010 Oct-Dec;4(4):262-7.
 8. Herrera C Jr, Caramelli P, Silveira AS, Nibini R. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002 Apr-Jun;16(2):103-8.
 9. Deshpande A, Mina C, Glabe C, Dasdigio J. Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. *J Neurosci*. 2008 May;28(22):6011-8.
 10. Landau SM, Marks SM, Mormino EC, Raminou G, Oh H, O'Neil JP, et al. Association of lifetime cognitive engagement and low beta-amyloid deposition. *Arch Neurol*. 2012 May;69(5):623-29.
 11. Akjyama H, Berger S, Demun S, Brach S, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2000 May-Jun;21(3):303-421.
 12. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*. 2002 Nov;40(2):140-55.
 13. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*. 2004 Nov;41(11):1059-60.
 14. Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen OS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):119-28.
 15. Holmes G, Butcher J. Systemic inflammation and Alzheimer's disease. *Biochem Soc Trans*. 2011 Aug;39(4):890-901.
 16. Scannapieco PA. Systemic effects of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005 Jul;49(2):533-60.
 17. Riviere GR, Riviere KM, Smith KS. Molecular and immunological evidence of oral *Treponema* in the human brain and their association with Alzheimer's disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Apr;17(2):113-8.
 18. Poole S, Singhrao SK, Kasanudu L, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(4):665-77.
 19. Mikoszy J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. *Expert Rev Mol Med*. 2013 Sep;66:140-55.
 20. Kanner AR, Dasanayake AR, Craig RG, Glodzik-Sobanska L, Bry M, de Leon MJ. Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. *J Alzheimers Dis*. 2008 May;13(4):437-49.

Artigo 2

**EFEITO DA PRESENÇA DE DOENÇA PERIODONTAL SOBRE
COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR COM DÉFICIT COGNITIVO
INDUZIDO POR ESCOPOLAMINA**

Em manuscrito (será submetido para o periódico Archives of Oral
Biology – Fator de impacto: 1,74)

Efeito da Presença de Doença Periodontal sobre Comportamento de Ratos Wistar com Déficit Cognitivo Induzido por Escopolamina

Marcelo Ekman Ribas^(a)

Tainara Steffens^(b)

Aline Gomes^(b)

Narlon Volpato^(b)

Narton Volpato^(b)

Gustavo Kociczski^(b)

Luciano Pitoni^(b)

Cassiano Kuchenbecker Rösing^(c)

(a) Professor de Periodontia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS); Doutorando em Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre/RS);

(b) Graduando em Odontologia pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS);

(c) Professor Titular de Periodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre/RS).

Autor para Correspondência:

Marcelo Ekman Ribas

Rua Felipe Neri, 129/16

Porto Alegre/RS

CEP: 90440-150

Cel: (51) 993422542

Email: marceloekman@gmail.com

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito da presença de doença periodontal sobre o estado comportamental de ratos com déficit cognitivo induzido por escopolamina. *Métodos:* Trinta ratos Wistar foram randomizados e subdivididos em três grupos experimentais: Grupo escopolamina, onde foi realizado indução de déficit cognitivo por escopolamina; Grupo doença periodontal e escopolamina avaliado pelo teste comportamental de labirinto aquático de Morris; e Grupo doença periodontal e escopolamina avaliado pelo teste comportamental de esQUIVA inibitória. A doença periodontal (DP) foi induzida pela colocação de ligadura nos segundos molares superiores e inferiores dos animais testes, totalizando quatro ligaduras. Após decorrida a fase experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas as maxilas e mandíbulas para análise morfométrica por meio de fotografias digitais padronizadas. Para comparação das médias de perda óssea alveolar entre os grupos foi realizado o teste ANOVA para comparações múltiplas. Para comparação das médias de latência entre os grupos de análises comportamentais foi utilizado o teste t para amostras independentes. *Resultados:* comparando a perda óssea alveolar, podem-se observar diferenças significativas entre os grupos que apresentaram indução de doença periodontal por ligadura (DP + Escopolamina labirinto - $0,46 \pm 0,04$) e (DP + escopolamina esQUIVA - $0,47 \pm 0,04$), e o grupo que não houve indução de doença ($0,22 \pm 0,01$). Observando-se os dados relacionados ao desfecho primário, quando comparado os grupos, não houve diferença estatística nos parâmetros comportamentais avaliados pelo teste de labirinto de Morris e teste de esQUIVA inibitória. *Conclusão:* pode ser concluído que, no presente modelo experimental, a indução de periodontite não foi capaz de modular, de forma significativa, prejuízos comportamentais de retenção de memória espacial de curta e longa duração em ratos Wistar.

Palavras chave: Periodontite, Alzheimer, Disfunção Cognitiva, ratos Wistar.

INTRODUÇÃO

Nos últimos 100 anos, por meio de avanços em saúde e inovações no tratamento de doenças, os países acrescentaram cerca de 30 anos à longevidade e estimativa de vida ao nascer (United Nations Department of Economics and Social Affairs, 2008). Dentre as patologias relacionadas com o processo de envelhecimento, os processos degenerativos destacam-se de forma significativa. Estima-se que, na maioria das regiões do mundo, a prevalência de doenças degenerativas, principalmente relacionadas a demências, apresenta uma variabilidade entre 5% e 7% acima da sexta década de vida (PRINCE et al., 2013). Parte significativa desses quadros demenciais decorrem da Doença de Alzheimer, colocando esta condição como uma prioridade de saúde mundial. A doença de Alzheimer constitui uma das patologias neurodegenerativas mais prevalentes, apresentando perda cognitiva e demência, sendo associada à morte e atrofia neuronal específica, de forma progressiva e fatal (BALIN & HUDSON, 2014; OLSEN & SINGHRAO, 2015). Correlacionando com as crescentes expectativas de vida e mudanças de estilos de vida, projeções recentes têm indicado que 1 a cada 85 indivíduos poderá ser diagnosticado com Doença de Alzheimer (DA) até o ano de 2050 (BROOKMEYER et al., 2007).

A memória recente é a primeira a ser afetada, porém outras habilidades também são comprometidas com o progresso da doença, como, por exemplo, a capacidade de realizar cálculos e de usar objetos e ferramentas que fazem parte do cotidiano da pessoa acometida pela DA, sendo considerada de alta morbidade neurodegenerativa (de FALCO et al., 2016; GANESH et al., 2017). Evidências científicas recentes têm demonstrado que alterações inflamatórias oriundas de infecções periféricas, bem como danos vasculares e estresse oxidativo, podem agravar o processo inflamatório em nível cerebral, desempenhando um papel significativo na patogênese do déficit cognitivo na DA (HOLMES, BUTCHART, 2011; MARCHESI, 2011). As doenças periodontais são patologias de caráter infecto/inflamatório associadas à modulação hiperinflamatória sistêmica, evidenciada por aumento de níveis séricos de proteína C-reativa e citocinas pró-inflamatórias (LINDEN et al., 2013; SHAIK et al., 2014). Estudos têm revelado uma relação importante entre doenças periodontais e efeitos adversos sistêmicos como doenças cardiovasculares, doenças pulmonares, parto prematuro e baixo peso neonatal,

obesidade, osteoporose, diabetes, artrite, câncer e doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (LIU et al., 2013; LINDEN, LYONS, SCANNAPIECO, 2013; GANESH et al., 2017).

Evidências recentes demonstram uma plausibilidade biológica na relação entre as doenças periodontais e DA embasada em três principais vias: disseminação metastática de bactérias gram-negativas da cavidade oral para o cérebro; Injúria neuronal por transmigração de mediadores inflamatórios através da barreira hematoencefálica, em resposta à periodontite e possível papel dos polimorfismos genéticos na patogênese das doenças periodontais e da DA (SINGHRAO et al., 2014; KAMER et al., 2015; HARRIS e HARRIS, 2015; SINGHRAO et al., 2015; OLSEN E SINGHRAO, 2015; IDE et al., 2016; PAZOS et al., 2017; GANESH et al., 2017). Estudos observacionais têm demonstrado que a periodontite pode ser um fator de risco para déficit cognitivo, contudo, estudos longitudinais e revisões sistemáticas não foram capazes de elucidar bem essa possível inter-relação (WU et al., 2016; TONSEKAR, JIANG, YUE, 2017). O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da presença de doença periodontal sobre o estado comportamental de ratos com déficit cognitivo.

METODOLOGIA

Desenho Experimental

Este estudo apresenta delineamento prospectivo, randomizado, controlado, cego, em modelo animal. Desde seu planejamento, as etapas de pesquisa foram conduzidas seguindo as recomendações e guias para execução e escrita de estudos em modelo animal propostas pela Diretriz ARRIVE (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) (KILKENNY et al., 2010). Os protocolos de estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-URI/Erechim), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI-Erechim/RS). Os procedimentos experimentais obedecem a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais.

Modelo Animal

Foram utilizados trinta ratos Wistar, com 45 dias de vida, machos, pesando cerca de 250g, dos quais vinte e nove completaram as etapas experimentais. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas de polipropileno medindo 65 x 25 x 15 cm (4-5 animais em cada) com o assoalho recoberto de serragem, recebendo ração balanceada para roedores e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro e em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os processos necessários para minimizar qualquer desconforto ou dor foram realizados pelos pesquisadores, sendo determinada uma semana de aclimação dos animais ao biotério antes do início da fase experimental. O tamanho amostral foi baseado em estudos prévios utilizando como desfecho principal análises comportamentais (EUN et al., 2017), e perda óssea alveolar (LIBERMAN et al., 2011), totalizando 10 animais por grupo.

Randomização e Alocação dos Animais

Os animais foram alocados randomicamente para seus respectivos grupos experimentais distribuídos considerando o peso ponderal a partir de extratos representados pelos quartis de peso. Os grupos experimentais foram constituídos de: Grupo Escopolamina - indução de déficit cognitivo por escopolamina, e ausência de indução de perda óssea alveolar, sendo realizada análise comportamental pelas técnicas de Labirinto de Morris e Esquiva Inibitória – n=10; Grupo Escopolamina + Doença periodontal (DP) – Labirinto de Morris - indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura, e indução de déficit cognitivo por meio de escopolamina, sendo realizada análise comportamental pelo Labirinto de Morris – n=10; Grupo Escopolamina + Doença Periodontal (DP) – Esquiva Inibitória - - indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura, e indução de déficit cognitivo por meio de escopolamina, sendo realizada análise comportamental pela Esquiva Inibitória – n=10.

Indução de Doença Periodontal

Foi realizada indução de perda óssea alveolar por meio de colocação quatro ligaduras no segundo molar de cada hemiarcada superior e inferior do rato, sendo realizada por meio de anestesia geral. O protocolo anestésico utilizado foi o composto

Tiletamina-Zolazepan (Zoletil®) 20mg/kg, intraperitoneal (IP), com manutenção quanto necessário (DIEH et al., 2001). Para colocação das ligaduras foi utilizado o fio de sutura de seda (4-0) - Ethicon®, colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais e realizado um nó na face vestibular. Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram a metodologia proposta por Liberman et al. (2011), onde as ligaduras permaneceram por 14 dias, sendo o tempo necessário para desenvolvimento de periodontite. A presença e correta posição da ligadura foi verificada ao final do estudo nas coletas das amostras para análise morfométrica.

Indução de Déficit Cognitivo

O déficit de memória foi induzido pela administração de escopolamina hydrobromide 3 mg/kg intraperitoneal (IP), (Sigma, São Paulo/SP, Brasil), trinta minutos antes das sessões testes para avaliação de latência de memória por meio dos testes de esQUIVA inibitória e labirinto aquático de Morris (BIHAQI, SINGH, TIWARI, 2011).

Teste de EsQUIVA Inibitória

A esQUIVA inibitória foi realizada para avaliação de memória aversiva de curta e longa duração, sendo realizado por meio de uso de uma caixa de condicionamento, com face frontal de vidro. Na extremidade esquerda da caixa encontra-se uma plataforma de madeira de 8 cm x 25 cm, situada a 5 cm do chão da caixa. No restante da caixa o assoalho é formado por uma grade de barras de inox, as quais apresentam 0,2 cm de diâmetro e encontram-se separadas umas das outras por um espaço de 1 cm. Na sessão treino os animais foram colocados delicadamente de frente para o fundo da caixa, e ao descer com as quatro patas nas grades de inox receberam um estímulo elétrico de 0,4 mA, durante 2 segundos e a latência de descida foi registrada. Logo após os animais foram retirados do equipamento e colocados em suas caixas de origem. Nas sessões teste (24 horas pós-treino para memória de longa duração e 90 minutos pós-treino para memória de curta-duração) os animais foram reexpostos ao equipamento, mas com a extinção do choque elétrico. A diferença entre o tempo de descida (latência) da sessão teste e da sessão treino foi tomada como medida de memória. Como padrão, foi estabelecido um teto máximo de latência de descida da plataforma correspondente a 60 segundos na sessão treino e 180 segundos na sessão teste, igualmente para todos os grupos, de modo que as latências

superiores a estes padrões foram consideradas como tais (ROSSATO et al., 2004), os testes foram realizados após decorridos 14 dias de indução de doença periodontal por meio de ligadura nos grupos que receberam indução de doença.

Teste de Labirinto Aquático de Morris

Neste teste foi utilizado um tanque (1 m de diâmetro), dividido em quadrantes (norte, sul, leste e oeste) por linhas imaginárias contendo água no seu interior, e em uma profundidade de 30 cm. Durante o treinamento foi colocada uma plataforma (10 cm de diâmetro) submersa a 1 cm abaixo da superfície de água ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) obscurecida com solução opaca para turvamento da água, sempre dentro do mesmo quadrante, durante quatro dias consecutivos. Cada treino consistiu de um bloco de quatro tentativas onde os animais foram gentilmente colocados em cada um dos quadrantes, no máximo um minuto cada. O treinamento dos animais ocorreu durante quatro dias consecutivos antecedendo a administração de escopolamina. Se os animais não localizaram a plataforma por si só em 60 segundos, eles foram guiados pelo pesquisador até a plataforma, e mantidos sobre ela por 10 segundos, para após retornar a uma caixa e descansar por 20 segundos. Para este teste foi registrado o tempo em que o animal levou para alcançar a plataforma durante o quarto dia. No quinto dia, os animais receberam a administração de escopolamina e o teste foi realizado. O teste consistiu em repetir o que eles aprenderam nos ensaios, mas sem a plataforma na água. Os animais foram alocados em um ponto inicial e liberados para nadar na posição da piscina oposta a qual estava à plataforma, permitindo avaliar a memória espacial e compará-la entre os diversos grupos (ROSSATO et al., 2006), este teste também foi realizado, desde a fase de treino até o teste propriamente dito, após decorridos 14 dias de indução de doença periodontal por meio de ligadura nos grupos que receberam indução de doença.

Preparo das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda Óssea Alveolar

Após o término dos procedimentos experimentais foi realizada a eutanásia dos animais por meio de guilhotina. As maxilas e mandíbulas foram removidas e imersas em hipoclorito de sódio (9% de cloro ativo), durante cinco horas, e os tecidos moles restantes mecanicamente removidos, após, foi realizada lavagem e as peças foram secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, as peças foram coradas com azul de

metileno a 1% durante um minuto, lavando-se e secando-se novamente para remover excessos da solução. Foram realizadas fotografias padronizadas das peças com câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal padrão.

Foi utilizado um aparato confeccionado com pasta pesada de silicosa de adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo, sendo realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das peças, avaliando a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea através programa ImageJ 10.0, determinando uma média de perda óssea por animal por meio da média de cinco pontos por face livre por um examinador calibrado e cego aos grupos experimentais.

Cegamento e Reprodutibilidade

O cegamento dos pesquisadores ocorreu no momento da análise morfométrica e condução das análises comportamentais, sendo os avaliadores cegos aos grupos. Previamente ao início da análise morfométrica, para a calibragem do examinador, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos (por sorteio) para serem duplamente mensurados, em termos de perda óssea alveolar, com intervalo de uma semana sendo que suas médias foram comparadas através de teste t para amostras pareadas, acrescido de coeficiente de correlação de Pearson. Ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias foi considerada um indicativo de reprodutibilidade. Também foi realizado o coeficiente de correlação intra-classe, sendo resultado de 0,97.

Análise Estatística

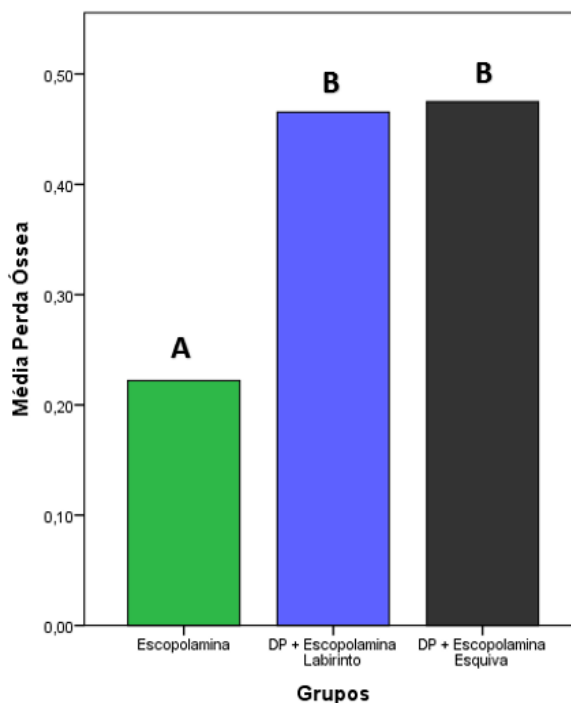
As análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS 22.0 para Windows. Para todos os parâmetros utilizados, o teste de Kolmorov-Smirnov foi realizado para testar a normalidade dos dados. Para comparação das médias de perda óssea alveolar entre os grupos foi realizado o teste ANOVA para comparações múltiplas. Para comparação das médias de latência entre os grupos de análises comportamentais foi utilizado o teste t para amostras independentes. Para fins de análise descritiva, foram realizadas médias e

desvio-padrão das diferentes variáveis. A significância adotada para as análises foi de 95%.

RESULTADOS

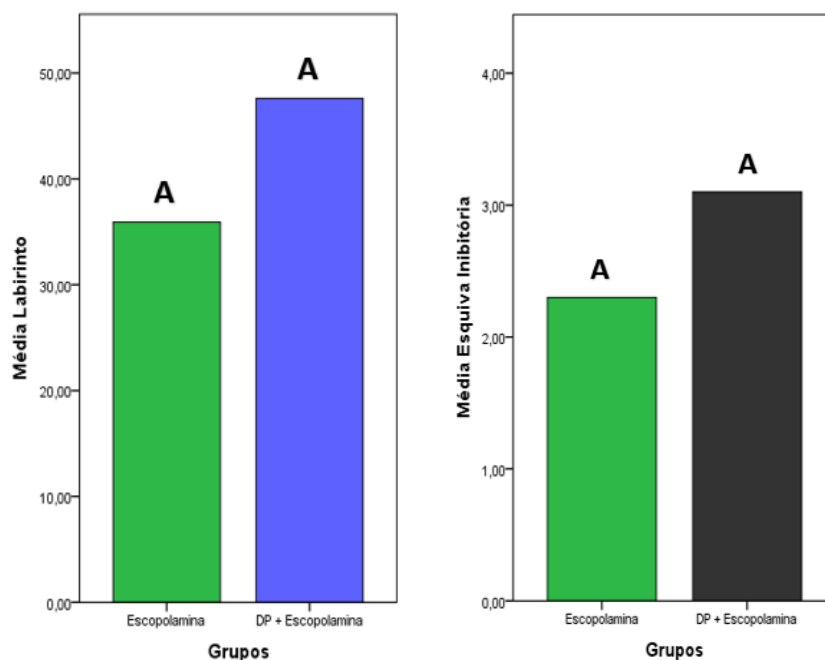
Os resultados do presente estudo relatam dados de perda óssea alveolar e do desfecho primário relacionados ao tempo de latência de memória como parâmetro comportamental. Um animal, do grupo que foi induzido doença periodontal e déficit cognitivo por escopolamina – esquiva inibitória, morreu durante o procedimento de instalação de ligadura, não se recuperando do procedimento anestésico, tendo 29 animais completado o estudo. A figura 1 mostra os resultados do teste ANOVA para comparação das médias de perda óssea alveolar nos diferentes grupos. As figuras 2 e 3 demonstram as comparações estatísticas (teste t para amostras independentes) das médias de tempo de latência nas diferentes avaliações comportamentais.

Figura 1 – Comparação das médias de perda óssea alveolar induzida (milímetros) nos grupos experimentais (ANOVA - Bonferroni).



Letras diferentes indicam significância estatística com teste ANOVA de uma via com *Post Hoc* Bonferroni ($p < 0,05$).

Figuras 2 e 3 – Comparação das médias de latência de memória (segundos) nos grupos experimentais avaliados por Labirinto de Morris e Esquiva Inibitória, respectivamente.



Letras diferentes indicam significância estatística com teste t para amostras independentes ($p < 0,05$).

Em relação à perda óssea alveolar, podem-se observar diferenças significativas entre os grupos que apresentaram indução de doença periodontal por ligadura (DP + Escopolamina Labirinto - $0,46 \pm 0,04$) e (DP + escopolamina Esquiva - $0,47 \pm 0,04$), e o grupo que não houve indução de doença ($0,22 \pm 0,01$). Observando-se os dados relacionados ao desfecho primário, quando comparado os grupos, não houve diferença estatística nos parâmetros comportamentais avaliados pelo teste de Labirinto de Morris e teste de Esquiva Inibitória.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da presença da doença periodontal sobre déficit cognitivo por meio de dois parâmetros comportamentais de avaliação de memória de curta e longa duração. O estudo da possível relação modulatória da doença periodontal sobre outras doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer, é recente, com poucos estudos experimentais e clínicos (WU et al., 2016;

TONSEKAR, JIANG, YUE, 2017). Os dados epidemiológicos demonstram diversos fatores contribuintes para a plausibilidade biológica relacionando as doenças periodontais e DA, esses fatores emergem a necessidade de desenvolvimento de estudos experimentais para melhor compreender os mecanismos que associam as duas patologias.

Os estudos em modelo animal, apesar da impossibilidade de extrapolação de resultados para seres humanos, permanecem como uma alternativa viável e relevante por similaridades anatômicas, bioquímicas e, em parte, microbiológicas, dos tecidos periodontais e etiopatogenia de doença, sendo utilizados em estudos de inter-relação entre patologias periodontais e outros efeitos adversos sistêmicos (SUSIN e RÖSING, 2002; OZ et al., 2011; VARGAS-SANCHEZ et al., 2017). Nos resultados do presente estudo, relacionando o nível de perda óssea entre os grupos, pode-se observar que, apesar de menores níveis de perda óssea nos dois grupos em que houve indução comparados com outros estudos na literatura (WAGNER et al., 2016; CAVAGNI et al., 2016), houve diferença estatística entre os grupos, demonstrando que o modelo experimental de indução de periodontite por ligadura foi efetivo. Pode-se destacar como ponto positivo do estudo, a indução de periodontite por meio de 4 ligaduras (segundos molares de cada hemiarcada), incrementa o desafio inflamatório, mimetizando com maior fidelidade o perfil de periodontite crônica generalizada em humanos, diferente de outros estudos que utilizam uma ou duas ligaduras somente (VERZELETTI et al., 2012; MIHADA-WARA et al., 2017).

Da mesma forma, modelos experimentais animais de desenvolvimento de déficit cognitivo por indução com escopolamina e análises comportamentais de memória, tangentes à etiopatogênese da DA, são utilizados de forma importante para avaliação de retenção de memória espacial de curta e longa duração (MALIN et al., 2015; MALEKI, EZATTI-HASSANPOUR, NAVAEIAN, 2017; LI et al., 2017). O presente estudo, de forma pioneira, avalia o possível efeito da doença periodontal sobre o déficit cognitivo induzido por escopolamina, analisando dois parâmetros comportamentais, esQUIVA inibitória e labirinto de Morris em ratos Wistar. Outro estudo realizado com intuito de elucidar a relação das enfermidades periodontais e DA, de caráter microbiológico, analisou colonização direta de periodontopatógenos em nível cerebral, e demonstrou que *P. gingivalis* foi capaz de acessar o cérebro dos ratos infectados, contribuindo para ativação do sistema complemento e consequente lesão neuronal, entretanto, sem análises de caráter comportamental dos animais (POOLE et al., 2015).

No estudo em questão, apesar de apresentar uma tendência de associação entre perda óssea alveolar induzida e aumento de déficit cognitivo, não houve significância estatística nos resultados. A ausência de significância estatística pode ser explicada devido às alterações comportamentais de latência de memória espacial estarem presentes em estágios mais avançados de déficit cognitivo. As alterações bioquímicas, principalmente relacionadas ao estresse oxidativo, estão presentes, em nível cerebral, anteriormente à qualquer alteração comportamental (LIU et al., 2008a; LIU et al., 2008b). Outros fatores apontados na literatura que podem modular o comportamento e influenciar a performance nos testes de memória incluem a espécie do animal, estresse emocional e idade (D'HOOGHE e DEYN, 2001; BROMLEY-BRITS, DENG, SONG, 2011).

Deve-se salientar que os achados do presente estudo em modelo animal devem ser interpretados em perspectiva. Estudos com roedores são importantes para o entendimento e estabelecimento de plausibilidade biológica e etiopatogenia, entretanto, o potencial translacional não é direto. Pode ser concluído que, no presente modelo experimental, a indução de periodontite não foi capaz de modular prejuízos comportamentais de retenção de memória espacial de curta e longa duração em ratos Wistar. Novos estudos em modelo animal e clínicos devem ser conduzidos para melhor entendimento da possível relação das doenças periodontais e a Doença de Alzheimer, principalmente em nível bioquímico cerebral.

REFERÊNCIAS

BALIN, B. J.; HUDSON, A. P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. **Current allergy and asthma reports**, v. 14, n. 3, p. 417, 2014.

BIHAQI, S. W.; SINGH, A. P.; TIWARI, M. In vivo investigation of the neuroprotective property of *Convolvulus pluricaulis* in scopolamine-induced cognitive impairments in Wistar rats. **Indian J Pharmacol**, v. 43, n. 5, p. 520-5, 2011.

BROMLEY-BRITS, K., DENG, Y., SONG, W. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. **J. Vis. Exp.** v. 53, e2920, doi:10.3791/2920, 2011.

BROOKMEYER, R. et al. Forecasting the global burden of Alzheimer's Disease. **Alzheimers Dement.** v. 3, p.186-91, 2007.

CAVAGNI, J. et al. Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in wistar rats. **J. Periodontol.** v. 87, n. 2, p. 9-17, 2016.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.

D'HOOGE, R., DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews.** v. 36, p. 60-90, 2001.

EUN, C. S. et al. The protective effect of fermented *Curcuma longa* L. on memory dysfunction in oxidative stress-induced C6 glioma cells, proinflammatory-activated BV2 microglial cells, and scopolamine-induced amnesia model in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** v. 17, p. 367, 2017.

de FALCO, A., et al. Doença de Alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova.** v.39, n.1, p.63-80, 2016.

GANESH, P., et al. A potential role of periodontal inflammation in Alzheimer's disease: a review. **Oral Health Prev. Dent.** v.15, p.7-12, 2017.

HARRIS, S. A.; HARRIS, E. A. Herpes simplex virus type 1 and other pathogens are key causative factors in sporadic Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease.** v.48 p.319-353, 2015.

HOLMES, C.; BUTCHART, J. **Systemic inflammation and Alzheimer's disease:** Portland Press Limited 2011.

IDE, M. et al., Periodontitis and cognitive decline in Alzheimer's disease. **PLOS One.** v.11, n.3, 2016.

KAMER, A. R. et al. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 2, p. 627-633, 2015.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Vet. Clin. Pathol.** v. 41, n. 1, p. 27-31, 2010.

LI, W. et al. Effect of walnut protein hydrolysate on scopolamine-induced learning and memory deficits in mice. **J. Food Sci. Technol.** v. 54, n. 10, p. 3102-3110, 2017.

- LIBERMAN, D. N. et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch. Oral Biol.** v. 56, n. 2, p. 109-13, 2011.
- LINDEN, G. J., et al. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussion of working group 4 of the joint EFP/AAP workshop of periodontitis and systemic diseases. **J. Periodontology.** v.84, n.4, 2013.
- LINDEN, G. J; LYONS, A.; SCANNAPIECO, F. A. Periodontal systemic associations: review of the evidence. **J. Periodontology.** v.84, n.4, p.8-19, 2013.
- LIU, P. et al. Spatial learning results in elevated agmatine levels in the rat brain. **Hippocampus.** v. 18, p.1094–1098. 2008a.
- LIU, P. et al. Behavioural effects of intracerebroventricular microinfusion of agmatine in adult rats. **Behav. Neurosci.** v.122, p. 557– 569. 2008b.
- LIU, T. C. et al. Increased risk of parkinsonism following chronic periodontitis: a retrospective cohort study. **Mov. Disord.** v. 28, p.1307–8, 2013.
- MALEKI, M.; EZATTI-HASSANPOUR, M.; NAVAEIAN, M. Cross state-dependent learning interaction between scopolamine and morphine in mice: the role of dorsal hippocampus. **Basic and Clinical Neuroscience,** v. 8, n. 3, p. 193-202, 2017.
- MALIN, D. H. et al. Validation and scopolamine-reversal of latent learning in the water maze utilizing a revised direct platform placement procedure. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 135, p. 90-6, 2015.
- MARCHESI, V. T. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. **FASEB J.** v. 25, p. 5–13, 2011.
- MIHADA-WARA, C. et al. Local administration of calcitonin inhibits alveolar bone loss in an experimental periodontitis in rats. **Biomed. Pharmacother.** v. 3, n. 97, p. 765-770, 2017.
- OLSEN, I.; SINGHRAO, S. K. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? **Journal of oral microbiology,** v. 7, 2015.
- OZ, H. S. et al. Animal models for periodontal disease. **J. Biomed. Biotechnol.** 2011: 754857, 2011.
- PAZOS, P. et al., Asociación entre enfermedad periodontal y demencia. Revisión de la bibliografía. **Neurología,** 2016.
- POOLE, S., et al. Active Invasion of porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. **Journal of Alzheimer's Disease.** v.43, n.1, p.67-80, 2015.
- PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia,** v. 9, n. 1, p. 63-75. e2, 2013.
- ROSSATO, J. I. et al. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. **Behavioral neuroscience,** v. 118, n. 3, p. 563, 2004.
- ROSSATO, J. I. et al. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias,** v. 78, n. 3, p. 515-523, 2006

SHAIK, M. M., et al. How do periodontal infections affect the onset and progression of Alzheimer's disease? **CNS Neurol. Disord. Drug. Targets.** v.13, n.3, 2014.

SINGHRAO, S. K., et al. Oral inflammation, tooth loss, risk factors and association with progression of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease.** v.42, n.3, p.723-737, 2014.

SINGHRAO, S. K., et al. Porphyromonas gingivalis periodontal infection and its putative links with Alzheimer's disease. **Mediators of Inflammation.** v.2015.

SUSIN, C.; RÖSING, C. K. O rato como modelo para o estudo das repercussões do estresse nas doenças periodontais. **Rev. Periodontia.** v. 13, n. 6, p. 5-10, 2002.

TONSEKAR, P. P.; JIANG, S. S.; YUE, G. Periodontal disease, tooth loss and dementia: Is there a link? A systematic review. **Gerodontology.** v.34, p.151–163, 2017.

United Nations Statistics Division. Population division of the department of economic and social affairs of the united nations secretariat, world population prospects: the 2008 revision.

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

VERZELETTI, G. N. et al. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. **J. Appl. Oral Sci.** v. 20, n. 2, p. 218-21, 2012.

WAGNER, M. C. et al. Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and tnf- α secretion in wistar rats. **Braz. Dent. J.** v. 27, n. 2, p.135-40.

WU, B., et al. Association between oral health and cognitive status: a systematic review. **J. Am. Geriatr. Soc.** v.64, n.4, p.739–751, 2016.

Artigo 3

EFEITO DA PRESENÇA DE DOENÇA PERIODONTAL E INDUÇÃO DE DÉFICIT COGNITIVO SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Em manuscrito (será submetido para o periódico Neurosciences – Fator de Impacto: 3,27)

Efeito da Presença de Doença Periodontal e Indução de Déficit Cognitivo sobre Parâmetros Bioquímicos de Estresse Oxidativo

Marcelo Ekman Ribas^(a)

Tainara Steffens^(b)

Aline Gomes^(b)

Emanuel Contini Bertol^(c)

Ana Cristina Roginski^(c)

Alexandre Amaral^(d)

Helissara Diefenthaler^(e)

Cassiano Kuchenbecker Rösing^(f)

- (a) Professor de Periodontia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS); Doutorando em Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre/RS);
- (b) Graduando em odontologia pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS);
- (c) Graduando de Ciências Biológicas pela Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS);
- (d) Professor de Bioquímica da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS);
- (e) Professora de Farmacologia da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Campus Erechim (Erechim/RS);
- (f) Professor Titular de Periodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS (Porto Alegre/RS).

Autor para Correspondência:

Marcelo Ekman Ribas

Rua Felipe Neri, 129/16; CEP: 90440-150

Porto Alegre/RS

Cel: (51) 993422542

Email: marceloekman@gmail.com

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito da indução da doença periodontal sobre parâmetros químicos de estresse oxidativo em um modelo de indução de déficit cognitivo em ratos Wistar. *Métodos:* quarenta ratos Wistar foram randomizados e distribuídos em quatro grupos experimentais. Grupo Controle - ausência de Indução de doença periodontal e ausência de indução de déficit cognitivo – n=10; Grupo doença periodontal (DP) - realizada indução de doença periodontal - n=10; Grupo Escopolamina – indução de déficit cognitivo por escopolamina – n=10; Grupo Escopolamina + Doença periodontal (DP) - indução de doença periodontal e indução de déficit cognitivo – n=10. A periodontite foi induzida por colocação de ligadura nos segundos molares superiores e inferiores dos animais testes, totalizando quatro ligaduras. O déficit cognitivo foi induzido por escopolamina (3mg/kg). Após decorrida a fase experimental, os animais foram eutanasiados e foram coletadas as maxilas e mandíbulas para análise morfométrica por meio de fotografias digitais padronizadas. Foram realizados testes bioquímicos para aferição de estresse oxidativo em nível cerebral (córtex e hipocampo). Para comparação das médias de perda óssea alveolar e diferenças nas médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo entre os grupos foi realizado o teste ANOVA para comparações múltiplas. *Resultados:* os dados bioquímicos de alterações relacionadas ao estresse oxidativo evidenciam que a presença da doença periodontal induzida foi capaz de modificar significativamente os parâmetros de glutathiona reduzida (GSH) e sulfidrilas totais, tanto no grupo somente com doença periodontal (DP) (GSH - $5,15 \pm 0,80$; Sulfidrilas - $48,14 \pm 6,17$) em relação ao controle (GSH - $8,00 \pm 0,77$; Sulfidrilas - $62,59 \pm 12,05$), como no grupo de indução de déficit cognitivo e doença periodontal (DP+Escopolamina) (GSH - $3,87 \pm 0,72$; Sulfidrilas – $42,00 \pm 6,25$). *Conclusão:* pode-se concluir que a periodontite induzida foi capaz de modular o déficit cognitivo, diminuindo a ação de agentes antioxidantes em nível cerebral, no modelo experimental proposto.

Palavras Chave: Alzheimer, Periodontite, Disfunção Cognitiva, Estresse Oxidativo.

INTRODUÇÃO

As patologias neurodegenerativas são caracterizadas pela destruição irreversível neuronal, o que leva à perda progressiva e incapacitante de determinadas funções do sistema nervoso. Algumas delas são hoje consideradas as maiores causas de demência no mundo, sendo doenças de grande morbidade progressiva (de FALCO et al., 2016). A Doença de Alzheimer (DA) é a patologia que, atualmente, representa a forma mais comum de déficit cognitivo. As estimativas de prevalência indicam que até o ano de 2030, cerca de 72 milhões de pessoas no mundo sejam acometidas pela doença, dobrando o valor a cada 20 anos (REITZ, BRAYNE, MAYEUX, 2011). Em um primeiro momento, os números absolutos de indivíduos afetados pela DA, em escala global, podem parecer baixos, entretanto, somente nos Estados Unidos, os custos de tratamento da doença são estimados em 172 bilhões de dólares por anos (ALZHEIMER'S ASSOCIATION, 2010). O estudo de fatores que podem contribuir na etiopatogênese da DA torna-se de extrema relevância no atual contexto epidemiológico.

As evidências científicas demonstram que o estresse oxidativo desempenha papel central na Doença de Alzheimer, ainda que não esteja bem estabelecido o real papel desencadeador e efeito secundário (RICCIARELLI et al., 2007). O estresse oxidativo determina a ação de radicais livres ocasionando danos celulares por meio de peroxidação lipídica, oxidação proteica e do DNA. Para combater as ações citotóxicas dos radicais livres, as células apresentam defesas antioxidantes, que incluem enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutationala peroxidase (GPx) (CUI et al., 2004). A expressão de enzimas antioxidantes como a SOD, catalase, sulfidrilas e a glutationala, tem sido reportada como relevante na ação antioxidante tanto no sistema nervoso central como nos tecidos periféricos em pacientes com DA (CHEN e ZHONG, 2014). O cérebro humano constitui apenas 2% do peso corporal, por outro lado, consome cerca de 20% do suprimento de oxigênio do sistema respiratório. O alto consumo de energia determina um maior risco e suscetibilidade ao estresse oxidativo do que qualquer outro órgão (SOKOLOFF, 1999; PRATICO, 2008).

As evidências atuais demonstram que outras condições inflamatórias sistêmicas podem modular o estresse oxidativo em nível cerebral. As doenças periodontais apresentam caráter infecto-inflamatório dependente da presença de biofilme bacteriano, que pode levar à destruição local diretamente através de produtos tóxicos ou indiretamente pela ativação do processo inflamatório (LINDEN, 2013). Além do aumento de diversos

marcadores inflamatórios frente à periodontite, tais como proteína IL-1 β , IL-6 e TNF- α , verifica-se aumento das espécies reativas de oxigênio, demonstrando uma potencial relação entre inflamação e estresse oxidativo (BATTINO et al., 1999; D'AIUTO et al., 2010). Sabe-se que a destruição tecidual associada à periodontite é considerada resultado de uma resposta inflamatória excessiva à agressão bacteriana. Essa resposta determina a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que resulta em estresse oxidativo pelo desequilíbrio entre produção de ERO e defesas antioxidantes (D'AIUTO et al., 2010; CALLAWAY e JIANG, 2015; WHITE et al., 2016). Levando em consideração a oxidação exacerbada frente às doenças periodontais, tanto a pró-oxidação quanto a redução na antioxidação poderão gerar mais danos celulares e teciduais, encontrando-se relação da periodontite com diferentes tipos de danos oxidativos: lipídicos, proteicos (16) e ao DNA (AKALIN et al., 2007; KANOPKA et al., 2007; BALTACIOĞLU et al., 2008; CANAKCI et al., 2009; VILLA-CORREA et al., 2015). O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da indução da doença periodontal sobre parâmetros químicos de estresse oxidativo em um modelo de indução de déficit cognitivo em ratos Wistar.

METODOLOGIA

Este estudo apresenta delineamento prospectivo, randomizado, controlado, cego, em modelo animal. A análise bioquímica do presente estudo faz parte de um projeto de pesquisa maior de relação entre doenças periodontais e Alzheimer. Os protocolos de estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-URI/Erechim), da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI-Erechim/RS). Os procedimentos experimentais obedecem a normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais (UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e das Orientações Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (Council for International Organizations of Medical Sciences - CIOMS) para pesquisa com animais.

Modelo Animal

Foram utilizados 40 ratos wistar, com 45 dias de vida, machos, pesando cerca de 250g, dos quais 38 completaram as etapas experimentais. Durante o experimento, os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas de polipropileno medindo 65 x 25 x 15 cm (4-5 animais em cada) com o assoalho recoberto de serragem, recebendo ração

balanceada para roedores e água *ad libitum* e mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro e em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Todos os processos necessários para minimizar qualquer desconforto ou dor foram realizados pelos pesquisadores, sendo determinada uma semana de aclimatação dos animais ao biotério antes do início da fase experimental. O tamanho amostral foi baseado em estudos prévios utilizando como desfecho principal a perda óssea alveolar (LIBERMAN et al., 2011), totalizando 10 animais por grupo.

Randomização e Alocação dos Animais

Os animais foram alocados randomicamente para seus respectivos grupos experimentais distribuídos considerando o peso ponderal a partir de extratos representados pelos quartis de peso. Os grupos experimentais foram constituídos de: Grupo Controle - ausência de Indução de doença periodontal e ausência de indução de déficit cognitivo – n=10; Grupo doença periodontal (DP) - realizada indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura - n=10; Grupo Escopolamina – indução de déficit cognitivo por escopolamina – n=10; Grupo Escopolamina + Doença periodontal (DP) - indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura, e indução de déficit cognitivo por meio de escopolamina – n=10.

Indução de Doença Periodontal

Foi realizada indução de perda óssea alveolar por meio de colocação de quatro ligaduras no segundo molar de cada hemiarcada superior e inferior do rato, sendo realizada por meio de anestesia geral. O protocolo anestésico utilizado foi o composto Tiletamina-Zolazepan (Zoletil®) 20mg/kg, intraperitoneal (IP), com manutenção quanto necessário (DIEH et al., 2001). Para realização das ligaduras foi utilizado o fio de sutura de seda (4-0) - Ethicon®, colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais e realizado um nó na face vestibular. Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram a metodologia proposta por Liberman et al. (2011), onde as ligaduras permaneceram por 14 dias, sendo o tempo necessário para desenvolvimento de periodontite. A presença e correta posição da ligadura foi verificada ao final do estudo nas coletas das amostras para análise morfométrica.

Indução de Déficit Cognitivo

O déficit de memória foi induzido pela administração de escopolamina hydrobromide 3 mg/kg intraperitoneal (IP), (Sigma, São Paulo/SP, Brasil), trinta minutos mínimos antes da eutanásia dos animais (BIHAQI, SINGH, TIWARI, 2011).

Preparo do Tecido Cerebral e Medidas de Estresse Oxidativo

Os animais foram eutanasiados por decapitação sem uso de fármaco anestésico para não interferir nas posteriores análises bioquímicas cerebrais, e o córtex imediatamente separado. As estruturas foram homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato de sódio (200 mM) com KCl (140 mM). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 3000 *rpm* por 10 minutos e o sobrenadante separado para as técnicas da homeostase redox. Para os experimentos da homeostase redox, os sobrenadantes obtidos dos diferentes tecidos foram submetidos a uma incubação a 37 °C na presença dos ácidos orgânicos por uma hora.

Determinação dos Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

Para quantificar os produtos da peroxidação lipídica foi utilizado o método de análise da formação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica. Foram adicionados 300 µL de ácido tricloroacético 10 % a uma alíquota de 150 µL do sobrenadante. Após centrifugação, 300 µL do sobrenadante foram tratados com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água a temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm (DELWING-DAL MAGRO et al., 2016).

Medida de Sulfidrilas Totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). Um volume de 50 µL de sobrenadante reagiu com o ácido ditionitrobenzóico 10mM (DTNB). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto; o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso o método determina os tióis totais da amostra.

Medida dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Salat e colaboradores (2014). Um volume de 300 μL de sobrenadante foi desproteizado adicionando-se um volume de ácido metafosfórico 1,85 %. Após centrifugação, 150 μL do sobrenadante foram neutralizados com Na_2HPO_4 (0,3 M) e, posteriormente, reagiram com o ácido ditionitrobenzóico (DTNB) na concentração de 1 mM. A medida dos tióis livres de uma amostra desproteinizada reflete a concentração de GSH da amostra.

Atividade de Catalase (CAT)

Foi determinada a atividade desta enzima através do método de Olorunnisola e colaboradores (2016). Em 50 mL de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foram adicionados 100 μl de H_2O_2 30% (v/v). Após adição de 20 μl de sobrenadante (previamente tratada com Triton 0,1 %) a 600 μl da mistura (tampão + H_2O_2) foi realizada a leitura da queda da absorvância do H_2O_2 em espectrofotômetro a 240 nm.

Determinação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica utilizada baseia-se na metodologia de Marklund (1985). O sobrenadante obtido após a centrifugação do homogeneizado das planárias foi transferido para um tubo pequeno e 15 μL sendo posteriormente pipetado a uma placa de 96 poços. A atividade da SOD é medida baseando-se na capacidade do piragalol de se auto-oxidar em um processo altamente dependente de $\text{O}_2^{\cdot-}$, que é um substrato para a SOD. A inibição da auto-oxidação desse composto ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente medida no espectrofotômetro a 420 nm. 15 μL de sobrenadante que foi posteriormente pipetado numa placa de 96 poços em duplicata. Adiciona-se então 210 μL de uma mistura de catalase 80 U / mL (100 μL) e tampão Tris 50 mM, ácido etilenodiaminotetracético (21500 μL), pH 8,2, em cada poço sobre as amostras e, por fim, 20 μL de pirogallol (0,38 mM). Após, foi realizada a leitura da absorvância a 405 nm durante 5 min. em espectrofotômetro. Uma curva de calibração foi feita com SOD purificada como padrão para calcular a atividade da SOD presente nas amostras. Os resultados são expressos como ($\mu\text{mol}/\text{mg}$).

Preparo das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda Óssea Alveolar

Após o término dos procedimentos experimentais foi realizada a eutanásia dos animais por meio de guilhotina. As maxilas e mandíbulas foram removidas e imersas em

hipoclorito de sódio (9% de cloro ativo), durante cinco horas, e os tecidos moles restantes mecanicamente removidos, após, foi realizada lavagem e as peças foram secas. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, as peças foram coradas com azul de metileno a 1% durante um minuto, lavando-se e secando-se novamente para remover excessos da solução. Foram realizadas fotografias padronizadas das peças com câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal padrão.

Foi utilizado um aparato confeccionado com pasta pesada de silicosa de adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo, sendo realizadas fotografias das faces vestibular e palatina de cada uma das peças, avaliando a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea através programa ImageJ 10.0, determinando uma média de perda óssea por animal por meio da média de cinco pontos por face livre, por um examinador calibrado e cego aos grupos experimentais.

Cegamento e Reprodutibilidade

O cegamento dos pesquisadores ocorreu no momento da análise morfométrica e condução das análises bioquímicas, sendo os avaliadores cegos aos grupos. Previamente ao início da análise morfométrica, para a calibragem do examinador, 20 espécimes foram aleatoriamente escolhidos (por sorteio) para serem duplamente mensurados, em termos de perda óssea alveolar, com intervalo de uma semana sendo que suas médias foram comparadas através de teste t para amostras pareadas, acrescido de coeficiente de correlação de Pearson. Ausência de diferença estatisticamente significativa entre as médias foi considerada um indicativo de reprodutibilidade. Também foi realizado o coeficiente de correlação intra-classe, sendo resultado de 0,97 para análise morfométrica e 0,95 para as análises bioquímicas.

Análise Estatística

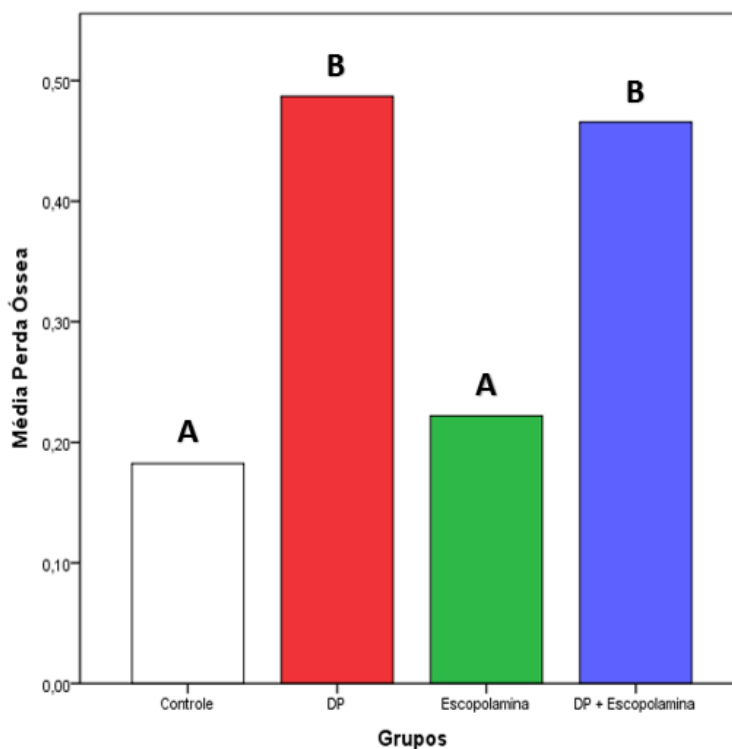
As análises foram realizadas com o auxílio do software SPSS 22.0 para Windows. Para todos os parâmetros utilizados, o teste de Kolmorov-Smirnov foi realizado para testar a normalidade dos dados. Para comparação das médias de perda óssea alveolar e diferenças nas médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo entre os grupos foi realizado o teste ANOVA para comparações múltiplas. Para fins de análise descritiva,

foram realizadas médias e desvio-padrão das diferentes variáveis. A significância adotada para as análises foi de 95%

RESULTADOS

Durante a fase de indução de doença periodontal nos grupos, dois animais morreram devido a complicações na recuperação anestésica, um do grupo doença periodontal (DP) e outro do grupo doença periodontal e déficit cognitivo (DP + Escopolamina), totalizando 38 animais que completaram o estudo. A figura 1 mostra a comparação das médias de perda óssea alveolar nos diferentes grupos experimentais.

Figura 1 – Comparação das médias de perda óssea alveolar induzida (milímetros) nos grupos experimentais (ANOVA - Bonferroni).

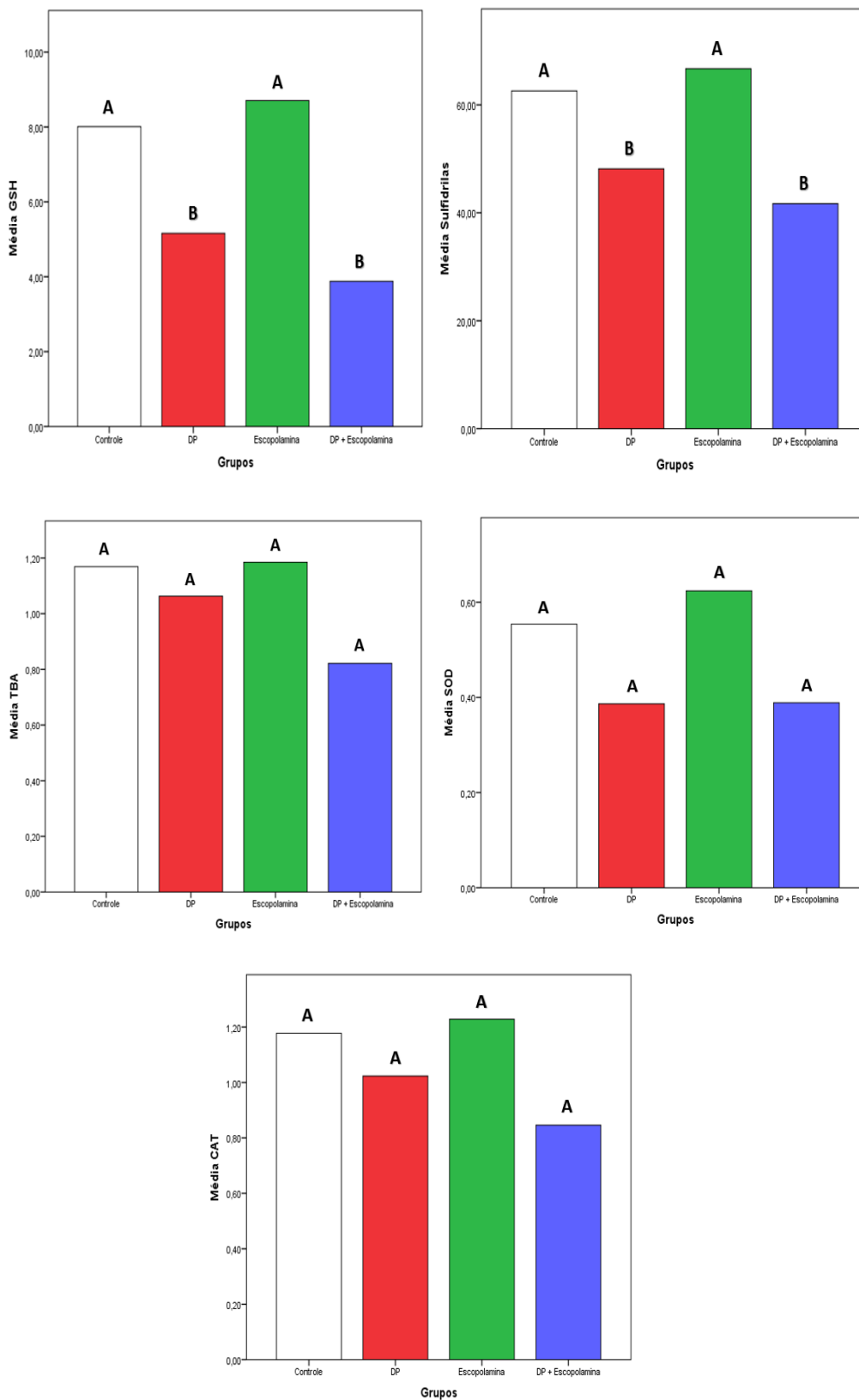


Letras diferentes indicam significância estatística com teste ANOVA de uma via com *Post Hoc* Bonferroni ($p < 0,05$).

Observando os dados em perspectiva podemos observar que em relação à perda óssea alveolar, houve diferenças significativas entre os grupos que apresentaram indução de doença periodontal por ligadura (DP - $0,48 \pm 0,04$) e (DP+Escopolamina - $0,46 \pm 0,04$) em relação aos grupos sem indução (Controle - $0,18 \pm 0,03$) e (Escopolamina - $0,22 \pm 0,01$).

As figuras 2 a 6 demonstram as diferenças das médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, em nível cerebral, nos diferentes grupos experimentais

Figuras 2-6 – Comparação das médias dos parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo nos grupos experimentais (ANOVA - Bonferroni).



Letras diferentes indicam significância estatística com teste ANOVA de uma via com *Post Hoc* Bonferroni ($p < 0,05$).

Os dados bioquímicos de alterações relacionadas ao estresse oxidativo evidenciam que a presença da doença periodontal induzida foi capaz de modificar significativamente os parâmetros de glutathiona reduzida (GSH) e sulfidrilas totais, tanto no grupo somente com doença periodontal (DP) (GSH - $5,15 \pm 0,80$; Sulfidrilas - $48,14 \pm 6,17$) em relação ao controle (GSH - $8,00 \pm 0,77$; Sulfidrilas - $62,59 \pm 12,05$), como no grupo de indução de déficit cognitivo e doença periodontal (DP+Escopolamina) (GSH - $3,87 \pm 0,72$; Sulfidrilas - $42,00 \pm 6,25$).

DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da doença periodontal sobre um modelo de indução de déficit cognitivo por escopolamina em ratos. Parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo, como nível de antioxidantes, foram avaliados para determinar o dano oxidativo em nível cerebral. Até o momento, o modelo experimental realizado da combinação de avaliação da doença periodontal, déficit cognitivo e estresse oxidativo em ratos é pioneiro. O modelo de indução de déficit cognitivo por escopolamina demonstrou que não houve uma redução significativa de agentes antioxidantes comparado ao grupo controle. Esse dado vai de encontro com outros estudos na literatura (JAWAID, JAHAN, KAMAL, 2015; PATTANASHETTI et al., 2017). As diferenças de resultados podem ser explicadas pelas diferenças de modelos experimentais, com doses de escopolamina diferentes, variações na espécie do animal, idade e mecanismos compensatórios bioquímicos complexos da ação combinada dos antioxidantes (CHAPPLE, MATHEWS, 2007).

Em relação ao desfecho de perda óssea alveolar, os grupos onde foi induzido periodontite por meio de ligadura apresentaram maiores médias de perdas ósseas que os grupos de perda óssea espontânea, semelhantes a outros modelos experimentais de doença periodontal (CAVAGNI et al., 2016; MIHADA-WARA et al., 2017). Destacando que no presente estudo, foram realizadas 4 ligaduras, uma por hemiarcada, procurando mimetizar periodontite generalizada. Evidências têm demonstrado que doença periodontal, principalmente em estado mais avançado, possui um potencial de ser fonte de um caráter inflamatório sistêmico e estado de estresse oxidativo sistêmico global, reduzindo a

capacidade antioxidante (D'AIUTO, 2010; KANZAKI et al., 2017) da mesma forma, a etiopatogênese da DA sendo modulada pelos desequilíbrios de fatores oxidativos e ação de antioxidantes (CERVELLATI et al., 2016). Os dados do estudo evidenciam que a doença periodontal induzida, por si só, foi capaz de diminuir de forma significativa os níveis dos agentes antioxidantes GSH e níveis de sulfidrilas totais, quando comparado com o controle. É demonstrado em conjunto, que a doença periodontal associada com a escopolamina, foi capaz de determinar diminuição significativa de agentes antioxidantes (GSH e sulfidrilas), também, quando comparada com escopolamina individualmente e com o controle. Esses dados demonstram que a periodontite por si só foi capaz de aumentar o estresse oxidativo, e que, quando associada com a indução de déficit cognitivo, foi capaz de modular e diminuir mais fortemente a ação de agentes antioxidantes (GSH e sulfidrilas).

Para avaliação de estresse oxidativo, recomenda-se avaliar tanto a atividade enzimática, presente no meio intra-celular (SOD, CAT, GSH), quanto análise da atividade não enzimática, presente no meio extra-celular (TBA e sulfidrilas), observando de forma global a peroxidação protéica e lipídica (VASCONCELOS et al., 2007; NIBALI e DONOS, 2013). Nos dados evidenciados pelo estudo, pode-se observar uma alteração significativa de níveis de GSH e sulfidrilas, com redução não significativa dos níveis dos demais fatores antioxidantes (CAT, TBA e SOD). Entretanto, não se pode interpretar os dados de forma isolada, uma vez que a mensuração de antioxidantes específicos não leva em conta o fato de que os antioxidantes agem em conjunto, e não separadamente, portanto, a soma de antioxidantes individuais não representará a capacidade global de neutralizar o estresse oxidativo e reparar danos teciduais. A antioxidação total, por sua vez, fornece dados da complexidade das interações de forma mais fidedigna (TARPEY, WINK, GRISHAM, 2004; CHAPPLE, MATHEWS, 2007). Os níveis elevados de certos antioxidantes apresentados no estudo podem ser explicados por mecanismo compensatório bioquímico, onde a interação entre os agentes antioxidantes pode determinar um aumento dos níveis apresentados frente a um elevado estresse oxidativo local (BARBOSA et al., 2010). A importância do estudo é refletida no fato do crescente estudo do potencial oxidativo e da ação dos agentes oxidantes como possíveis fatores de diagnóstico precoce da Doença de Alzheimer, sendo a identificação dos níveis alterados de agentes antioxidantes como futuros biomarcadores de doença (de LEEUW et al., 2017; WOSJSIAT et al., 2017).

Analisando em contexto global, pode-se concluir que a periodontite induzida foi capaz de modular o déficit cognitivo, diminuindo a ação de agentes antioxidantes em nível cerebral, no modelo experimental proposto. Contudo, mais estudos são necessários para evidenciar melhor a possível associação entre doenças periodontais e doenças relacionadas ao déficit cognitivo, como a DA, principalmente relacionados ao potencial oxidativo em nível cerebral.

REFERÊNCIAS

- AKALIN, F. A., et al. Lipid peroxidation levels and total oxidant status in serum, saliva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.** v. 34, n. 7, p. 558-65, 2007.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, n. 2, p. 141-145, 2001.
- ALZHEIMER'S ASSOCIATION. 2010 Alzheimer's disease facts and figures. **Alzheimers Dement.** v. 6, p. 158-194, 2010.
- BALTACIOĞLU, E., et al. Protein carbonyl levels in serum and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis. **Arch. Oral Biol.** v. 53, n. 8, p. 716-22, 2008.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.** v. 2, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BATTINO, M., et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. **Crit. Ver. Oral Biol. Med.** v. 10, n. 4, p. 458-76, 1999.
- BIHAQI, S. W.; SINGH, A. P.; TIWARI, M. In vivo investigation of the neuroprotective property of *Convolvulus pluricaulis* in scopolamine-induced cognitive impairments in Wistar rats. **Indian J Pharmacol**, v. 43, n. 5, p. 520-5, 2011.
- CALLAWAY, D. A., JIANG, J. X. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. **J. Bone Miner. Metab.** v. 33, p. 359-370, 2015.
- CANAKCI, C. F., et al. Increased levels of 8- hydroxydeoxyguanosine and malondialdehyde and its relationship with antioxidant enzymes in saliva of periodontitis patients. **Eur. J. Dent.** v. 3, n. 2, p.100-6, 2009.
- CAVAGNI, J. et al. Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in wistar rats. **J. Periodontol.** v. 87, n. 2, p. 9-17, 2016.
- CERVELLATI, C. et al. Oxidative challenge in Alzheimer's disease: state of knowledge and future needs. **J. Investig. Med.** v. 64, p. 21-32, 2016.
- CHEN, Z.; ZHONG, C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. **Neurosci. Bull.** v. 30, n. 2, p. 271-281, 2014.
- CHAPPLE, I. L, MATTHEWS, J. B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. **Periodontol. 2000.** v.43, p.160-232, 2007.
- CUI, K., et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** v. 28, n. 5, p. 771-799, 2004.
- D'AIUTO, F, et al. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. **J. Dent. Res.** v. 89, n. 11, p. 1241-6, 2010.

- DELWING-DAL MAGRO, D. et al. Protective effect of green tea extract against proline-induced oxidative damage in the rat kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1422-1427, 2016.
- DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001.
- de FALCO, A., et al. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Quim. Nova**. v.39, n.1, p.63-80, 2016.
- JAWAID, T.; JAHAN, S.; KAMAL, M. A comparative study of neuroprotective effect of angiotensin converting enzyme inhibitors against scopolamine-induced memory impairments in rats. **J. Adv. Pharm. Technol. Res.** v. 6, n. 3, p. 130–135, 2015.
- KANZAKI, H. et al. Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis. **Front. Physiol.** v. 8, p. 351, 2017.
- KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Vet. Clin. Pathol.** v. 41, n. 1, p. 27-31, 2010.
- KONOPKA, T., et al. Total antioxidant status and 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine levels in gingival and peripheral blood of periodontitis patients. **Arch. Immunol. Ther. Exp.** v. 55, n. 6, p. 417-22, 2007.
- de LEEUW, F. A. et al. Blood-based metabolic signatures in Alzheimer's disease. **Alzheimers Dement. (Amst)**. v. 8, p. 196–207, 2017.
- LIBERMAN, D. N. et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch. Oral Biol.** v. 56, n. 2, p. 109-13, 2011.
- LINDEN, G. J., et al. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussion of working group 4 of the joint EFP/AAP workshop of periodontitis and systemic diseases. **J. Periodontology**. v.84, n.4, 2013.
- MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. Mutation Research/Fundamental and Molecular. **Mechanisms of Mutagenesis**, v. 148, n. 1, p. 129-134, 1985.
- MIHADA-WARA, C. et al. Local administration of calcitonin inhibits alveolar bone loss in an experimental periodontitis in rats. **Biomed. Pharmacother.** v. 3, n. 97, p. 765-770, 2017.
- NIBALI, L.; DONOS, N. Periodontitis and redox status: a review. **Curr. Pharm. Des.** v. 19, n. 15, p. 2687- 97, 2013.
- OLORUNNISOLA, O. S. et al. Effect of methanolic leaf extract of *Talinum triangulare* (Jacq). willd. on biochemical parameters in diet induced dyslipidemia wistar rats. **Pharmacognosy Magazine**. v. 12, n. 48, p. 333, 2016.
- PATTANASHETTI, L. A. et al. Evaluation of neuroprotective effect of quercetin with donepezil in scopolamine-induced amnesia in rats. **Indian J. Pharmacol.** v. 49, n. 1, p. 60–64, 2017.

- PRATICO, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. **Trends Pharmacol. Sci.** v. 29, p. 609–615, 2008.
- REITZ, C.; BRAYNE, C.; MAYEUX, R. Epidemiology of Alzheimer disease. **Nat. Rev. Neurol.** v. 7, n. 3, p. 137-52, 2011.
- RICCIARELLI, R. et al. Vitamin E and neurodegenerative diseases. **Mol. Aspects Med.** v. 28, n. 5-6, p. 591-606, 2007.
- SALAŁAT, K. et al. Influence of analgesic active 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one on the antioxidant status, glucose utilization and lipid accumulation in some in vitro and ex vivo assays. **Toxicology Mechanisms and Methods.** v. 24, n. 3, p. 204-211, 2014.
- SOKOLOFF, L. Energetics of functional activation in neural tissues. **Neurochem. Res.** v. 24, p. 321–329, 1999.
- TARPEY, M. M.; WINK, D. A.; GRISHAM, M. B. Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 286, n. 3, p. 431-44, 2004.
- WHITE, P. C., et al. Neutrophil extracellular traps in periodontitis: a web of intrigue. **J. Dent. Res.** v. 95, p. 26–34, 2016.
- WOSJSIAT, J. et al. Search for Alzheimer's disease biomarkers in blood cells: hypotheses-driven approach. **Biomark. Med.** v. 11, n. 10, p. 917–931, 2017.
- VASCONCELOS, S. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio , antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova.** v.30, n. 5, p. 1323-38, 2007.
- VILLA-CORREA, Y. A., et al. Prognostic Value of 8-Hydroxy-2'- Deoxyguanosine and Human Neutrophil Elastase/ α 1-Proteinase Inhibitor Complex as Salivary Biomarkers of Oxidative Stress in Chronic Periodontitis. **J. Periodontol.** v. 86, n. 11, p. 1260-7, 2015.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese teve como objetivo avaliar a possível relação entre a doença periodontal e doença de Alzheimer. À luz da literatura vigente, observa-se que essa possível relação é objeto de estudo recente e de forma crescente. Pode-se observar uma diversificação de estudos, com metodologias variadas, com carências de experimentos em modelo animal e clínico, sendo ainda não totalmente elucidados os mecanismos biológicos interligando as patologias. Para entender o panorama da literatura vigente, em um primeiro momento, foi realizada uma produção técnica de revisão de literatura, voltada para os profissionais da saúde, com objetivo de compreender melhor a plausibilidade biológica e os mecanismos envolvidos na etiopatogênese da doença de Alzheimer.

Foram buscados, nas diversificadas base de dados, os artigos relacionados à inter-relação entre doença periodontal e déficit cognitivo, envolvendo os diferentes tipos de estudos. O estudo da relação das patologias periodontais e desordens neurodegenerativas surgiu na década de 90, com aumento relevante de estudos observacionais e modelos experimentais nos últimos cinco anos. As evidências científicas demonstram que a plausibilidade biológica que interliga as duas patologias é embasada em três aspectos principais: disseminação metastática de periodontopatógenos da cavidade oral para o cérebro; Injúria neuronal por transmigração de mediadores inflamatórios através da barreira hematoencefálica, em resposta à periodontite; Possível papel de polimorfismos genéticos na patogênese das doença periodontal e da doença de Alzheimer. As evidências demonstram que existe a plausibilidade biológica de que a exposição de longo prazo à ação dos periodonto patógenos e sua subsequente modulação de mediadores inflamatórios podem determinar mudanças neurológicas significativas e modular a DA. A busca por estudos de intervenção revelou somente dois estudos clínicos e um em modelo animal (KIKUTANI et al., 2010; ROLIM et al., 2014; POOLE et al., 2015) Deste modo, ficou claro que o tema tem potencial importância e ainda é recentemente explorado, havendo necessidade de que outros delineamentos fossem utilizados na perspectiva de estudo de fatores de risco.

Levando-se em perspectiva a importância de estudos em animais para entendimento de plausibilidade biológica, um passo ainda indispensável na caracterização de um fator de risco, observou-se a possibilidade de que o tema fosse explorado com esse tipo de modelo. Apesar da limitação metodológica de não haver possibilidade de transposição de resultados de modelos animais para seres humanos, este tipo de modelo experimental ainda pode ser considerado de marcante relevância. Nesse contexto, um macro modelo experimental, com ratos Wistar, foi desenvolvido para tentar elucidar o papel da doença periodontal como possível fator modulatório do déficit cognitivo. Pode-se destacar como pontos positivos da metodologia a utilização do modelo de indução de doença periodontal pela colocação de ligaduras para indução de perda óssea alveolar. Como diferencial, foi utilizado a colocação de quatro ligaduras por animal, diferente de outros estudos que utilizaram uma ou duas ligaduras, para tentar mimetizar o caráter inflamatório crônico generalizado da periodontite em seres humanos. Em consonância, também foi utilizada a metodologia de indução de déficit cognitivo com uso de escopolamina, método amplamente realizado na literatura.

No desenho experimental duas metodologias de análise de déficit cognitivo foram adotadas, uma relacionada ao aspecto comportamental, já que as alterações comportamentais são de notável relevância no estudo da patogênese da doença de Alzheimer, principalmente relacionado à degeneração neuronal. Outro fator analisado foram as alterações bioquímicas de estresse oxidativo cerebral, sendo esse, desempenhando um papel central de modulação da DA. Os resultados apresentados na presente pesquisa evidenciam que a periodontite induzida foi capaz de alterar de forma significativa o papel antioxidativo em nível cerebral, dessa forma modulando o déficit cognitivo em nível bioquímico. Até o presente momento, frente à literatura vigente, esse resultado pode ser considerado pioneiro, levando em consideração o modelo experimental empregado. Observando em perspectiva o resultado das análises comportamentais, a doença periodontal não foi capaz de modular, de forma significativa, a retenção de memória dos animais. Este achado pode ser explicado devido às alterações comportamentais de latência de memória espacial estarem presentes em estágios mais avançados de déficit cognitivo.

A partir dos resultados obtidos, frente às reflexões realizadas, pode-se concluir que a doença periodontal apresenta um caráter sistêmico relevante, apresentando potencial modulador na etiopatogênese de desordens neurodegenerativas como a DA. Entretanto, novos estudos experimentais em modelo animal e clínicos são estimulados para elucidar de forma mais clara o real papel modulatório que as doenças periodontais podem apresentar frente a etiopatogênese da doença de Alzheimer.

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, H. et al. Inflammation and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 21, n. 3, p. 383-421, 2000. ISSN 0197-4580.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience letters**, v. 302, n. 2, p. 141-145, 2001. ISSN 0304-3940.

ARRIVÉ, E. et al. Oral health condition of French elderly and risk of dementia: a longitudinal cohort study. **Community Dent. Oral Epidemiol.** v.40, p.230–238, 2012.

BALIN, B. J.; HUDSON, A. P. Etiology and pathogenesis of late-onset Alzheimer's disease. **Current allergy and asthma reports**, v. 14, n. 3, p. 417, 2014. ISSN 1529-7322.

BALLARD, C. et al. Alzheimer's disease. **Lancet**, v. 377, n. 9770, p. 1019-31, Mar 19 2011. ISSN 1474-547X

BIHAQI, S. W.; SINGH, A. P.; TIWARI, M. In vivo investigation of the neuroprotective property of *Convolvulus pluricaulis* in scopolamine-induced cognitive impairments in Wistar rats. **Indian J Pharmacol**, v. 43, n. 5, p. 520-5, Sep 2011. ISSN 1998-3751

BRAAK, H.; BRAAK, E. Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. **Neurobiol Aging**, v. 18, n. 4, p. 351-7, Jul-Aug 1997. ISSN 0197-4580

CAMMAROTA, M. et al. Reversible changes in hippocampal 3H-AMPA binding following inhibitory avoidance training in the rat. **Neurobiol Learn Mem**, v. 66, n. 1, p. 85-8, Jul 1996. ISSN 1074-7427

CASTRO, D. M. et al. The economic cost of Alzheimer's disease: Family or public-health burden? **Dementia & Neuropsychologia**, v. 4, n. 4, p. 262-267, 2010. ISSN 1980-5764.

CAVAGNI, J. et al. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Brazilian oral research**, v. 19, n. 4, p. 290-294, 2005. ISSN 1806-8324.

CERAJEWSKA, T.; DAVIES, M.; WEST, N. Periodontitis: a potential risk factor for Alzheimer's disease. **BDJ Team**, v. 3, p. 16062, 2016. ISSN 2054-7617.

CESTARI, J. A., et al. Oral infections and cytokine levels in patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment compared with controls. **J. Alzheimer Dis.** v.52, n.4, 1479-85, 2016.

CHAVES, M. L, et al. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in southern Brazil. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* v.22, n.3, p.181-187, 2009.

CICCIÙ, M. et al. Relationship between oral health and its impact on the quality life of Alzheimer's disease patients: a supportive care trial. **Int J Clin Exp Med**, v. 6, n. 9, p. 766-72, 2013.

COSTA, R. D. F. D. et al. The acquisition of medication to treat Alzheimer's disease in Brazil: an analysis of federal purchases, 2008-2013. **Ciencia & saude coletiva**, v. 20, n. 12, p. 3827-3838, 2015. ISSN 1413-8123.

DELWING-DAL MAGRO, D. et al. Protective effect of green tea extract against proline-induced oxidative damage in the rat kidney. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1422-1427, 2016. ISSN 0753-3322.

DESHPANDE, A. et al. Different conformations of amyloid β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 22, p. 6011-6018, 2006. ISSN 0270-6474.

DIEHL, K. H. et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. **Journal of applied Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 15-23, 2001. ISSN 1099-1263.

DING, Q.; DIMAYUGA, E.; KELLER, J. N. Oxidative damage, protein synthesis, and protein degradation in Alzheimer's disease. **Current Alzheimer Research**, v. 4, n. 1, p. 73-79, 2007. ISSN 1567-2050.

DUNN, N. et al. Association between dementia and infectious disease: evidence from a case-control study. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 19, n. 2, p. 91-94, 2005. ISSN 0893-0341.

de FALCO, A., et al. Doença de alzheimer: hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. *Quim. Nova.* v.39, n.1, p.63-80, 2016.

FARHAD, S. Z., et al. The effect of chronic periodontitis on serum levels of tumor necrosis factor-alpha in Alzheimer disease. *Dent. Res. J.* v.11, n.5, p.549-552, 2014.

FERNANDES, M. I. et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Brazilian oral research**, v. 21, n. 3, p. 216-221, 2007. ISSN 1806-8324.

GALVÃO, M. P. D. A. et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003. ISSN 1517-7491.

GANESH, P., et al. A potential role of periodontal inflammation in Alzheimer's disease: a review. **Oral Health Prev. Dent.** v.15, p.7-12, 2017.

GASQUE, P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. **Molecular immunology**, v. 41, n. 11, p. 1089-1098, 2004. ISSN 0161-5890.

GIL-MONTOYA, J. A., et al. Is periodontitis a risk factor for cognitive impairment and dementia? A case-control study. **J. Periodont.** v.86, n.2, p.244-53, 2015.

GIL-MONTOYA, J. A., et al. Association between periodontitis and amyloid β peptide in elderly people with and without cognitive impairment. **J. Periodont.** v.88, n.10, p.1051-58, 2017.

GITTO, C. A., et al. The patient with Alzheimer's disease. **Quintessence Int.** v.32, n.3, p.221-31, 2001.

GOLDIM, J. R.; RAYMUNDO, M. M. Pesquisa em saúde e direitos dos animais. **Pesquisa em saúde e direitos dos animais**, 1997.

HAIDER, S.; TABASSUM, S.; PERVEEN, T. Scopolamine-induced greater alterations in neurochemical profile and increased oxidative stress demonstrated a better model of dementia: A comparative study. **Brain Research Bulletin**, v. 127, p. 234-247, 2016. ISSN 0361-9230.

HANISCH, U. K. Microglia as a source and target of cytokines. **Glia**, v. 40, n. 2, p. 140-155, 2002. ISSN 1098-1136.

HERRERA JR, E. et al. Epidemiologic survey of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 16, n. 2, p. 103-108, 2002. ISSN 0893-0341.

HOLMES, C.; BUTCHART, J. **Systemic inflammation and Alzheimer's disease**: Portland Press Limited 2011.

HOLMES, C.; COTTERELL, D. Role of infection in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **CNS drugs**, v. 23, n. 12, p. 993-1002, 2009. ISSN 1172-7047.

HOLMES, C. et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. **Neurology**, v. 73, n. 10, p. 768-774, 2009. ISSN 0028-3878.

HOLMES, C. et al. Systemic infection, interleukin 1 β , and cognitive decline in Alzheimer's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 74, n. 6, p. 788-789, 2003. ISSN 1468-330X.

JACK, C. R. et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 1, p. 119-128, 2010. ISSN 1474-4422.

JACK, C. R. et al. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. **Brain**, v. 132, n. 5, p. 1355-1365, 2009. ISSN 0006-8950.

JOMOVA, K. et al. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 345, n. 1-2, p. 91-104, 2010. ISSN 0300-8177.

KAMER, A. R. et al. TNF- α and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. **Journal of neuroimmunology**, v. 216, n. 1, p. 92-97, 2009. ISSN 0165-5728.

KAMER, A. R. et al. Alzheimer's disease and peripheral infections: the possible contribution from periodontal infections, model and hypothesis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 13, n. 4, p. 437-449, 2008. ISSN 1387-2877.

KAMER, A. R. et al. Periodontal disease associates with higher brain amyloid load in normal elderly. **Neurobiology of aging**, v. 36, n. 2, p. 627-633, 2015. ISSN 0197-4580.

KAYE, E. K. et al. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 58, n. 4, p. 713-718, 2010. ISSN 1532-5415.

KLUNK, W. E. et al. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. **Annals of neurology**, v. 55, n. 3, p. 306-319, 2004. ISSN 1531-8249.

KOK, E. et al. Apolipoprotein E-dependent accumulation of Alzheimer disease-related lesions begins in middle age. **Annals of neurology**, v. 65, n. 6, p. 650-657, 2009. ISSN 1531-8249.

KUBOTA, T., et al. Amyloid beta (A β) precursor protein expression. In human periodontitis-affected gingival tissues. **Archives of Oral Biology**. v.59, p.586-594, 2014.

KILKENNY, C. et al. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **Vet. Clin. Pathol.** v. 41, n. 1, p. 27-31, 2010.

LACROIX, S., FEINSTEIN, D., RIVEST, S. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. **Brain Pathol.** v. 8, n. 4, p. 625-40, 1998.

LANDAU, S. M. et al. Association of lifetime cognitive engagement and low β -amyloid deposition. **Archives of neurology**, v. 69, n. 5, p. 623-629, 2012. ISSN 0003-9942.

LIBERMAN, D. N. et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch. Oral Biol.** v. 56, n. 2, p. 109-13, 2011.

LINDEN, G. J; LYONS, A.; SCANNAPIECO, F. A. Periodontal systemic associations: review of the evidence. **J. Periodontology**. v.84, n.4, p.8-19, 2013.

LONITA, R. et al. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of the aqueous extract from *Markhamia tomentosa* (Benth.) K. Schum. stem bark in a rat model of scopolamine. **Behav. Brain Func.** v. 13, n.1, 2017.

LORENA CHAVES, M. et al. Incidence of mild cognitive impairment and Alzheimer disease in Southern Brazil. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 22, n. 3, p. 181-187, 2009. ISSN 0891-9887.

MALABADE, R.; TARANALLI, A. D. Calotropis procera: A potential cognition enhancer in scopolamine and electroconvulsive shock-induced amnesia in rats. **Indian journal of pharmacology**, v. 47, n. 4, p. 419, 2015.

MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 148, n. 1, p. 129-134, 1985. ISSN 0027-5107.

MARTANDE, S. S., et al. Periodontal health condition in patients with Alzheimer's disease. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**. v.29, n.6 p.498-502, 2014

MIKLOSSY, J. Alzheimer's disease-a neurospirochetosis. Analysis of the evidence following Koch's and Hill's criteria. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 90, 2011a. ISSN 1742-2094.

MIKLOSSY, J. Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 13, p. e30, 2011b. ISSN 1462-3994.

MINN, Y. K., et al. Tooth loss is associated with brain white matter change and silent infarction among adults without dementia and stroke. **J. Korean Med. Sci.** v.28, p.929-933, 2013.

MORGAN, D. Immunotherapy for Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 9, n. 3 Supplement, p. 425-432, 2006. ISSN 1387-2877.

NAVARRO, N. et al. Extinction and recovery of an avoidance memory impaired by scopolamine. **Physiology & Behavior**, 2017. ISSN 0031-9384.

NITRINI, R. et al. Incidence of dementia in a community-dwelling Brazilian population. **Alzheimer Disease & Associated Disorders**, v. 18, n. 4, p. 241-246, 2004. ISSN 0893-0341.

NOBLE, J. M. et al. Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 11, p. 1206-1211, 2009. ISSN 1468-330X.

NOBLE, J. M., et al. Serum IgG antibody levels to periodontal microbiota are associated with incident Alzheimer disease. **PLoS ONE**. v.9, n.12, 2014.

OKAMOTO, N. et al. Association between tooth loss and the development of mild memory impairment in the elderly: the Fujiwara-kyo Study. **J. Alzheim. Dis.** v. 44, n. 3, p. 77-86, 2015.

OLORUNNISOLA, O. S. et al. Effect of methanolic leaf extract of *Talinum triangulare* (Jacq). willd. on biochemical parameters in diet induced dyslipidemia wistar rats. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. 48, p. 333, 2016.

OLSEN, I.; SINGHRAO, S. K. Can oral infection be a risk factor for Alzheimer's disease? **Journal of oral microbiology**, v. 7, 2015. ISSN 2000-2297.

OZUDOGRU, S.; LIPPA, C. Disease modifying drugs targeting β -amyloid. **American Journal of Alzheimer's Disease & Other Dementias**, v. 27, n. 5, p. 296-300, 2012. ISSN 1533-3175.

PARK, H., et al. Tooth loss may predict poor cognitive function in community dwelling adults without dementia or stroke: The PRESENT Project. **J. Korean Med. Sci.** v.28, p.1518-1521, 2013.

PERRY, V. H.; NICOLL, J. A.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 4, p. 193-201, 2010. ISSN 1759-4758.

POOLE, S. et al. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 36, n. 4, p. 665-677, 2013. ISSN 1387-2877.

POOLE, S., et al. Active Invasion of porphyromonas gingivalis and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brains. **Journal of Alzheimer's Disease**. v.43, n.1, p.67-80, 2015.

PRINCE, M. et al. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. **Alzheimer's & Dementia**, v. 9, n. 1, p. 63-75. e2, 2013. ISSN 1552-5260.

QUNXING, D., EDGARDO, D., JEFFREY, N. K. Oxidative Damage, Protein Synthesis, and Protein Degradation in Alzheimers Disease. **Current Alzheimer Research**. v. 4, n. 1, 2007.

RAMALINGAYYA, G. V. et al. Naringin and rutin alleviates episodic memory deficits in two differentially challenged object recognition tasks. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. Suppl 1, p. S63, 2016.

RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 6, p. 429-439, 2009. ISSN 1474-1733.

RIVIERE, G. R.; RIVIERE, K.; SMITH, K. Molecular and immunological evidence of oral Treponema in the human brain and their association with Alzheimer's disease. **Oral microbiology and immunology**, v. 17, n. 2, p. 113-118, 2002. ISSN 1399-302X.

ROBERTA, D. F. da C. The acquisition of medication to treat Alzheimer's disease in Brazil: an analysis of federal purchases, 2008-2013. *Ciência e Saúde Coletiva*. V.20, n.12, p.3827-3838, 2015.

- ROHIT, M., ASHOK, D. T. Calotropis procera: A potential cognition enhancer in scopolamine and electroconvulsive shock-induced amnesia in rats. **Indian J. Pharmacol.** v. 47, n. 4, p. 419–424, 2015.
- ROLIM, T. S., et al. Evaluation of patients with Alzheimer's disease before and after dental treatment. **Arq. Neuropsiquiatr.** v.72, n.12, p.919-924, 2014.
- ROSSATO, J. I. et al. Retrograde amnesia induced by drugs acting on different molecular systems. **Behavioral neuroscience**, v. 118, n. 3, p. 563, 2004. ISSN 1939-0084.
- ROSSATO, J. I. et al. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 3, p. 515-523, 2006. ISSN 0001-3765.
- SALAT, K. et al. Influence of analgesic active 3-[4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-piperazin-1-yl]-dihydrofuran-2-one on the antioxidant status, glucose utilization and lipid accumulation in some in vitro and ex vivo assays. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 24, n. 3, p. 204-211, 2014. ISSN 1537-6516.
- SINGHRAO, S. K., et al. Oral inflammation, tooth loss, risk factors and association with progression of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease.** v.42, n.3, p.723-737, 2014.
- SCANNAPIECO, F. A. Systemic effects of periodontal diseases. **Dental Clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 533-550, 2005. ISSN 0011-8532.
- SHIN, K. Y.; KIM, K. Y.; SUH, Y.-H. Dehydroevodiamine· HCl enhances cognitive function in memory-impaired rat models. **The Korean Journal of Physiology & Pharmacology**, v. 21, n. 1, p. 55-64, 2017. ISSN 1226-4512.
- SHIPP, J. A.; PUCKETT, S. A. Longitudinal study on oral health in subjects with Alzheimer's disease. **J. Am. Geriatr. Soc.** v.42, p.57-63, 1994.
- SHOEMARK, D. K.; ALLEN, S. J. The microbiome and disease: reviewing the links between the oral microbiome, aging, and Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 43, n. 3, p. 725-738, 2015. ISSN 1387-2877.
- SORBI, S. et al. EFNS-ENS Guidelines on the diagnosis and management of disorders associated with dementia. **European Journal of Neurology**, v. 19, n. 9, p. 1159-1179, 2012. ISSN 1468-1331.

SOSCIA, S. J. et al. The Alzheimer's disease-associated amyloid β -protein is an antimicrobial peptide. **PloS one**, v. 5, n. 3, p. e9505, 2010. ISSN 1932-6203.

STEIN, P. S. et al. Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 10, p. 1314-1322, 2007. ISSN 0002-8177.

STEWART, R. et al. Oral health and cognitive function in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Psychosomatic medicine**, v. 70, n. 8, p. 936-941, 2008. ISSN 0033-3174.

STEWART, R., et al. Adverse oral health and cognitive decline: the health, aging and body composition study. **J. Am. Geriatr. Soc.** v.61, n.2, p.177–184, 2013.

TANZI, R. E. The genetics of Alzheimer disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 10, p. a006296, 2012. ISSN 2157-1422.

TAO, L. et al. Protective effects of aloe-emodin on scopolamine-induced memory impairment in mice and H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 24, n. 23, p. 5385-5389, 2014. ISSN 0960-894X.

WATTS, A.; CRIMMINS, E. M.; GATZ, M. Inflammation as a potential mediator for the association between periodontal disease and Alzheimer's disease. 2008. ISSN 1176-6328.

YANKNER, B. A. et al. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. **Science**, v. 245, n. 4916, p. 417-421, 1989. ISSN 0036-8075.

ZHU, J., et al. Multiple tooth loss is associated with vascular cognitive impairment in subjects with acute ischemic stroke. **J. Periodontol. Res.** v.50, n.5, p.683-8, 2015.

APÊNDICE

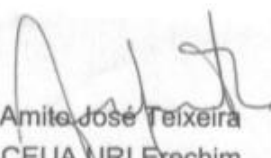
Erechim, 04 de abril de 2017.

Carta de Aprovação

O projeto intitulado ""Inter-relação entre doença periodontal e déficit cognitivo em ratos Wistar", **de responsabilidade do** professor Marcelo Ekman Ribas, **foi avaliado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA URI Erechim) e está adequado a LEI 11.794 DE 08 DE OUTUBRO DE 2008** que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. A CEUA URI Erechim aprovou o uso de 50 ratos Wistar machos.

O projeto foi **considerado aprovado sem nenhuma restrição.**

Atenciosamente


Amite José Teixeira
Coordenador da CEUA URI Erechim
amito@uricer.edu.br
54 3520 9000