

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

TATIANE MORGENSTERN DE MATTIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO NOS TECIDOS PERIODONTAIS DE RATAS SUBMETIDAS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

CASCAVEL – PR
(Fevereiro/2017)

TATIANE MORGENSTERN DE MATTIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO NOS TECIDOS PERIODONTAIS DE RATAS SUBMETIDAS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença

ORIENTADOR: Carlos Augusto Nassar

CASCADEL – PR
(Fevereiro/2017)

FOLHA DE APROVAÇÃO

TATIANE MORGENSTERN DE MATTIA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO NOS TECIDOS PERIODONTAIS DE RATAS SUBMETIDAS À
PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
UNIOESTE – *Campus Cascavel*

Prof. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro
UNIOESTE – *Campus Cascavel*

Prof. Dra. Juliana Fraga Soares Bombonatti
USP - Bauru

CASCADEL – PR
(Fevereiro/2017)

Ao meu esposo Diogo e à minha filha Lívia, por tornarem a minha vida repleta de luz e alegria. Ao meu esposo, pelo apoio incondicional, suportando minhas ausências, incentivando-me a ir mesmo quando seus olhos me pediam para ficar. Por contribuírem para que alcançasse esse objetivo, todo o meu amor e minha sincera gratidão. Vocês são eternos em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Entretanto, não poderia deixar de fazer nominalmente alguns especiais:

A Deus, pelo dom da vida, por me permitir viver até agora. Também pela graça que me concedeu durante essa trajetória, realizando meu sonho de ser mãe.

Aos meus pais Mario e Elaine, por nunca medirem esforços para que eu pudesse evoluir em meus estudos. Por estarem sempre me incentivando, apoiando, ouvindo e aconselhando em todos os momentos da minha vida. Por serem meu alicerce, meu exemplo, meu porto seguro.

Ao meu irmão Iuri, por seu apoio e incentivo. Por estar sempre presente torcendo por mim. Obrigada por existir, pela sua preocupação comigo, por ser tão companheiro.

À minha tia Elaide, por me acolher em sua casa desde a minha infância. Não somente durante essa trajetória, mas por todas as outras vezes que assim o fez, sempre com todo carinho. Por me ouvir e aconselhar como uma segunda mãe. A sua acolhida tornou mais leve essa jornada.

Ao meu sogro Delir e à minha sogra Sonia, por me tratarem como filha, incentivando-me sempre a realizar meus sonhos e nunca medindo esforços pela felicidade da nossa família.

Ao meu professor orientador Carlos Augusto Nassar, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade em desenvolver esta pesquisa. Pelo exemplo de profissional, pela sua paciência, prestatividade e por me ensinar que pensamento positivo é sempre o melhor caminho. Sua humildade e sua forma de nos ensinar ficarão para sempre em minha memória.

À professora Sara Cristina Saggae, pelo seu grande auxílio nesse trabalho. Por sua atenção e paciência em todos os momentos.

À professora Patrícia Oehlmeyer Nassar, por sua receptividade e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

À professora Ana Claudia Paiva Alegre Maller, por sua ajuda desde o nascimento dos animais até a realização do Elisa, que nos ensinou e auxiliou com toda dedicação e carinho.

Às professoras Rose Meire Costa Brancalhão e Lucineia de Fatima Chasko, por terem me recebido no Laboratório de Biologia Celular para realização de parte deste trabalho. Pela prestatividade e paciência ao me ensinar e esclarecer todas as dúvidas.

A todo o corpo docente do Mestrado em Biociências e Saúde que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, pela receptividade e apoio durante a realização dos experimentos.

À Marcela Aparecida Leite, amiga que o mestrado trouxe, por sua parceria na realização dos experimentos, por não se importar em me acompanhar no Natal e Ano Novo ao laboratório. O seu alto astral e bom humor fizeram com que tudo se tornasse mais leve.

Aos colegas acadêmicos Vinicius, Jordana e Nahana, pela dedicação e cuidado com os animais da pesquisa, por serem sempre tão solícitos e companheiros.

Ao técnico de laboratório Edson Duarte Ribeiro Paz, por me auxiliar e ensinar em uma fase importante desta pesquisa, pelo seu comprometimento e dedicação.

À Regina Kunz e à Celeste da Rocha Paiva, por estarem sempre dispostas a me ajudar e a me localizar no laboratório de Biologia Celular.

À Karine Figueredo da Costa, por sua valiosa ajuda para a realização de alguns procedimentos práticos desta pesquisa. Pela sua infinita disponibilidade para dividir seus conhecimentos.

Aos demais amigos do mestrado, em especial à Bruna e Alessandra, pela companhia nos almoços, pelas conversas, desabafos e risadas. A presença de vocês sempre foi muito especial.

A todos minha eterna gratidão.

RESUMO GERAL

Doença periodontal trata-se de uma das doenças orais mais importantes no mundo. Sua progressão ocorre devido a uma combinação de fatores que atingem os tecidos de sustentação dos dentes, levando à formação de bolsas periodontais e indução de reabsorção do osso alveolar, podendo resultar em perdas dentárias. Considerando a obesidade como uma doença sistêmica, que predispõe o indivíduo a uma série de complicações e sendo citada como um fator de risco para várias patologias crônicas, diversos estudos têm sugerido que essa condição vem se revelando como um importante fator de risco também para o desenvolvimento da doença periodontal. Sabendo-se que a doença periodontal é imunoinflamatória, podendo ser expressa quando ocorrer um desequilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro com o agente causador e que ela pode ser exacerbada quando associada a fatores ou condições sistêmicas, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) sobre os tecidos periodontais de ratas com periodontite induzida. Para a realização deste estudo, 33 ratas foram divididas inicialmente em dois grupos que foram submetidas a injeções intradérmicas na região cervical de 1,25g/kg/dia de solução salina (grupo CON) e 4g/kg/dia de solução de MSG (grupo OB), nos primeiros 5 dias de vida. Aos 70 dias, foi induzida a doença periodontal com a colocação de ligadura nos 1^{os} molares inferiores de ambos os lados dos animais, que atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e conseqüente desenvolvimento da doença periodontal. Após esse procedimento, os animais foram subdivididos em 4 grupos: grupo controle sem ligadura (CON); grupo controle com ligadura (CONLIG); obeso sem ligadura (OB), obeso com ligadura (OBLIG). Aos 100 dias de vida, as ratas foram pesadas e mensurado o comprimento nasoanal para determinação do índice de Lee. Através da citologia vaginal as ratas que se encontravam em proestro do ciclo estral foram sacrificadas. Após a eutanásia, as gorduras perigonadal e retroperitoneal foram coletadas e pesadas, também foi coletado sangue do tronco cerebral direito e as concentrações de estradiol e progesterona foram determinadas utilizando-se *kits* específicos. As hemimandíbulas direita e esquerda foram coletadas e submetidas à análise radiográfica e histológica, respectivamente, bem como a remoção de uma amostra do tecido gengival para a dosagem de citocinas. Os dados obtidos foram analisados e avaliados através dos testes Anova e Tukey. A obesidade foi confirmada pelo índice de Lee e pelas gorduras retroperitoneal e perigonadal ($p < 0,05$). Na análise radiográfica, verificou-se a efetividade da indução da doença periodontal, mostrando a perda de inserção nos grupos submetidos a periodontite experimental, com perda óssea alveolar menor no grupo OBLIG quando comparado ao grupo CONLIG ($p < 0,05$), fato esse também comprovado pela análise histológica. Ao analisar o tecido gengival, não foram encontradas diferenças entre os grupos CONLIG e OBLIG. Na análise hormonal, as concentrações de LH e FSH estavam reduzidas nos grupos OB e OBLIG. De acordo com os resultados encontrados, é possível sugerir que o modelo de obesidade pode exercer efeito protetor sobre a perda óssea alveolar nos casos de periodontites induzidas. Tal condição também pode interferir negativamente nas concentrações plasmáticas de alguns hormônios sexuais femininos.

Palavras-chave: Obesidade. Periodontite. Hormônios ovarianos.

GENERAL ABSTRACT

Periodontal disease is one of the most important diseases around the world. Its progress occurs due to a combination of factors which affect the sustainable tissues of teeth, and which leads to the development of periodontal pockets and to the reabsorption of the alveolar bone. This can also result in tooth loss. By considering obesity as one of the systemic diseases which pre-establishes a series of complications and as a risk factor to other chronic pathologies, several studies have suggested that this condition is also an important risk factor for the development of periodontal diseases. It is known that the periodontal disease is immune-inflammatory when there is an imbalance between the immune host responses and the causative agents, and that it may be intensified when associated to systemic factors and conditions. This study aims at evaluating the effect of obesity induced by monosodium glutamate (MSG) over the periodontal tissues of rats having induced periodontitis. In this study, 33 rats were divided, initially, into two groups which were submitted to intradermal injections in the cervical region using 1,25g/kg/day of saline solution (group CON), and 1,25g/kg/day of MSG solution (group B), in their first 5 days of life. At 70 days, the periodontal disease was induced with the placement of ligatures in first inferior premolars of both sides of animals. This served as a gingival irritation for 30 days, and provided the cumulus of bacterial plaque, and consequently, the development of periodontal disease. After this procedure, the animals were subdivided into 4 groups: control group without ligatures (CON); control group with ligatures (CONLIG); obese without ligature (OB), and obese with ligature (OBLIG). At 100 days, the rats were weighed and measured related to the naso-anal length in order to determine the Lee index. Through the vaginal cytology, the female rats which were in proestrus in their estrous cycles were euthanized. After that, the perigonadal and retro perigonadal fats were collected and weighted. It was also collected blood from the right brain stem. The conditions of the estradiol and progesterone were determined by using specific kits. The left and right hemi mandibles were withdrawn and submitted to a radiographic and histological analysis, respectively. A sample of the gingival tissue was collected in order to dosage the cytokines. The data were analyzed and evaluated through the ANOVA and Tukey. Obesity was confirmed by Lee index and by retroperitoneal and perigonadal fat ($p < 0.05$). At the radiographic analysis, it was verified the efficacy of the induction of periodontal diseases, showing the insertion loss in the groups submitted to the experimental periodontitis, with an alveolar bone loss smaller in the group OBLIG when compared to the group CONLIG ($p < 0.05$). This was also proved by the histological analysis. By analyzing the gingival tissue, no differences between CONLIG and OBLIG groups were found. In the hormonal analysis, the concentrations of LH and FSH were reduced to the OB and OBLIG groups. According to the results, it is possible to suggest that the obesity model may have some protector effect over the alveolar bone loss in the cases of induction of periodontitis. Such condition also may interfere negatively in the plasmatic concentrations of some female sexual hormones.

Keywords: Obesity. Periodontitis. Ovary hormones.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 REVISÃO GERAL DE LITERATURA	15
2.1 PROCESSO SAÚDE-DOENÇA.....	15
2.2 DOENÇA PERIODONTAL.....	17
2.3 OBESIDADE	20
2.4 OBESIDADE E DOENÇA PERIODONTAL.....	24
2.5 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS	27
2.6 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS E DOENÇA PERIODONTAL.....	29
REFERÊNCIAS	34
ARTIGO CIENTÍFICO.....	44
ANEXOS.....	70

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo. C: altura do epitélio da crista gengiva, E: Largura do epitélio bucal, H: altura do tecido conjuntivo na região média, L: largura do tecido conjuntivo na região basal66
- Figura 2 Fotomicrografias de dente de rata corte longitudinal, coloração hematoxilina e eosina. Grupo controle (A), controle ligadura (B), obeso (C), obeso ligadura (D). Cimento, CE; crista óssea alveolar, COA; epitélio juncional, EJ; epitélio sulcular, ES; ligamento periodontal, LP; osso alveolar, AO.....66
- Figura 3 Fotomicrografias representativas dos animais corte longitudinal, coloração hematoxilina e eosina. Grupo controle (A), controle ligadura (B), obeso (C), obeso ligadura (D). Osteócito, O;osteoblasto, OB; osteoclasto, OC; linhas incrementais, LI67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre parâmetros corporais em ratas CON, CONLIG, OB e OBLIG. Os valores representam média \pm desvio padrão.....67
- Tabela 2 Concentração de LH, FSH, Progesterona e Estradiol das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão68
- Tabela 3 Média da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo das ratas de todos os grupos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels.....68
- Tabela 4 Concentração de IL-6 nas amostras gengivais das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/mL.....68
- Tabela 5 Análise histológica da hemimandíbula direita das ratas dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades.....69
- Tabela 6 Análise histomorfométrica gengival da hemimandíbula direita das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels69

LISTA DE ABREVIATURAS

CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cobea	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
OMS	Organização Mundial de Saúde
GH	Hormônio do Crescimento
IL-1 β	Interleucina -1 Beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IMC	Índice de Massa Corporal
LH	Hormônio Luteinizante
Labef	Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional
Lafem	Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo
MSG	Glutamato Monossódico
NIH	<i>National Institute of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA I	Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1
RANKL	Receptor do ativador do fator nuclear kappa B
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TGFB	Fator de Crescimento Transformador Beta
Unioeste	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VMH	Hipotálamo Ventro Medial

1 INTRODUÇÃO GERAL

Obesidade é sinônimo de doença crônica, multifatorial que afeta adultos e crianças, sendo responsável por aumento dos riscos de ocorrência de diferentes desordens sistêmicas, cardiovasculares, diabetes e outras alterações que apresentam risco de vida (PATARO et al., 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), indivíduos com Índice de Massa Corpórea (IMC) de 25,0 - 29,9 Kg/m² são considerados com sobrepeso e com IMC \geq 30,0 Kg/m² são considerados obesos (RITCHIE, 2007). É uma enfermidade caracterizada pela ativação de um processo inflamatório em locais metabolicamente ativos, como tecido adiposo, fígado e células do sistema imunológico. A consequência dessa resposta é um aumento acentuado nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, adipocinas e outros marcadores inflamatórios (KARALIS et al., 2009).

O estudo dos mecanismos pelos quais a obesidade induz as disfunções fisiológicas pode ser facilitado com a utilização de modelo animal em ambiente de pesquisa (ROSINI et al., 2012). Os animais nos permitem obter respostas em um curto tempo, pois 10 dias na vida de um rato são aproximadamente 1 ano nos seres humanos em comparação às alterações no peso corporal. Alguns modelos de indução de obesidade em ratos são amplamente utilizados; entre eles, a administração subcutânea de MSG. Esse aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central resulta na degeneração aguda do hipotálamo, destruindo locais específicos incluindo o núcleo arqueado ventromedial. Por provocar perturbações no controle de mecanismos de absorção e gasto de energia, causa obesidade (FERNANDES et al., 2012), além de disfunção sexual, parada no crescimento, déficit comportamental e alterações no controle cardiovascular (VOLTERA et al., 2008).

Estudos sugerem a relação entre a obesidade como sendo um dos possíveis fatores que podem influenciar significativamente na severidade e progressão da doença periodontal (AL-ZAHRANI et al., 2003; DALLA VECCHIA et al., 2005; SAITO et al., 2005; VERZELETTI et al., 2012), sendo provável que as citocinas derivadas do tecido adiposo tenham papel-chave nesse processo (SOUZA et al., 2010). O tecido adiposo produz vasta quantidade de citocinas e hormônios chamados coletivamente de adipocinas que, por sua vez, podem modular a periodontite. A

obesidade aumenta a suscetibilidade do hospedeiro através da modulação do sistema imune e inflamatório levando o paciente a um maior risco à periodontite (SANTOS et al., 2014). O indivíduo obeso pode sofrer estados de estresse emocional e oxidativo, os quais podem alterar processos metabólicos e gerar mecanismos imunossupressores, diminuindo as respostas imunes que combatem os agentes microbianos patogênicos, contribuindo para a evolução da doença periodontal em obesos (BORGES et al., 2013).

A doença periodontal é uma doença infecciosa crônica causada predominantemente por bactérias. Componentes da placa bacteriana têm capacidade de induzir o infiltrado inicial de células inflamatórias incluindo os neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos (SANTOS et al., 2014). É uma condição que acarreta diferentes manifestações clínicas das condições periodontais, tais como gengivite, que se trata de uma inflamação aguda dos tecidos moles da gengiva causada pelo acúmulo de bactérias ao longo da margem gengival e a periodontite, uma forma inflamatória mais avançada da doença periodontal. Nessa fase, ocorre a desagregação dos tecidos de suporte dos dentes cuja progressão pode levar à mobilidade e, finalmente, à perda dos dentes (NASCIMENTO, 2014). A doença só ocorre quando a agressão microbiana e a resposta do hospedeiro são alteradas para um ou outro lado. Assim, todo tipo de alteração capaz de modificar o equilíbrio fisiológico do indivíduo pode também mudar a etiologia, extensão, curso e resposta ao tratamento das doenças periodontais (BASTOS et al., 2005). A doença periodontal não é mais identificada apenas como um problema de saúde oral, mas também uma questão de saúde pública, uma vez que está relacionada à saúde sistêmica (SURESH; MAHENDRA, 2014).

Outro fator que está associado às doenças periodontais são as alterações nos níveis de estrógeno e progesterona, possuindo efeito modulatório sobre a resposta inflamatória, frente às agressões bacterianas sofridas no hospedeiro quando da ocorrência das doenças periodontais (SANTOS; PILLON, 2009). Segundo Mariotti (1994), grande parte das evidências que descrevem a gengiva como um tecido alvo dos hormônios esteroidais sexuais é descrita com fenômenos clínicos durante períodos de flutuação hormonal, sendo que em uma variedade de espécies foi observada a presença de andrógenos, estrogênio e progesterona no periodonto. Desse modo, ao avaliar doença periodontal em indivíduos do sexo feminino, percebe-se a necessidade de compreender como as variações hormonais, que ocorrem

durante toda vida reprodutiva da mulher, podem alterar a resposta dos tecidos periodontais aos fatores de risco locais (SANTOS et al., 2008).

Verificando a existência de diversos relatos demonstrando a associação da obesidade com o desenvolvimento e progressão das doenças periodontais, bem como da influência das alterações hormonais, observa-se a importância de estudos adicionais que descrevam as evidências que possam ocorrer em pacientes com condições de obesidade e presença de doença periodontal. Para isso, esta pesquisa utilizou modelos animais para estudo, ratas, que foram induzidas à periodontite experimental através de ligadura, à obesidade através da aplicação de MSG e através de exames laboratoriais e radiográficos, buscando uma provável associação entre esses fatores.

2 REVISÃO GERAL DE LITERATURA

2.1 PROCESSO SAÚDE-DOENÇA

O conceito de saúde é explorado a partir da definição da OMS, que a considera não como ausência de doença, mas numa perspectiva positiva e ampliada, cujo foco é o processo social de sua produção. Isso requer a interação de conhecimentos interdisciplinares e a mobilização de práticas intersetoriais que objetivem à expansão dos modelos de intervenção para além do enfoque biomédico (ARANTES et al., 2008).

A manifestação da vida ocorre através da saúde e da doença, que são formas únicas, experiências subjetivas e que não podem ser manifestadas integralmente através de palavras (BACKES et al., 2009). Desde os primórdios da humanidade, o homem tem buscado a cura das doenças, seja através de rituais mágicos, seja através de remédios; isso demonstra que essa é uma característica inerente ao homem em defesa da vida e que a arte de curar nasceu ao mesmo tempo mágica e empiricamente (BALESTRIN; BARROS, 2009).

A concepção do processo saúde-doença evoluiu a partir das ideias defendidas por Hipócrates, médico grego que influenciou o mundo antigo (460-377 aC), o qual não aceitava a ideia de intervenção dos deuses e tratava o adoecimento como resultante da desarmonia dos constituintes da *physis* (natureza) (SEVALHO, 1993). A história da produção dos conceitos de saúde e doença é marcada pelas diferentes tentativas de buscar modelos explicativos para os sofrimentos humanos que pudessem superar a visão mágico-religiosa dominante. Com o nascimento da chamada Medicina Moderna, com o fim da idade média, essas explicações começam, de fato, a serem substituídas pela busca das causas biológicas que estariam na origem dos processos patológicos (ARANTES et al., 2008).

Dentre as múltiplas tentativas para explicar o processo saúde-doença ao longo dos anos, a partir do século XX destaca-se a teoria da unicausalidade difundida por profissionais e nos serviços de saúde. Essa teoria defendia que as doenças

possuíam um único fator etiológico. A superação desse conceito ocorre a partir da compreensão de que para a existência de condição de saúde-doença entram em cena fatores biológicos, econômicos, sociais e culturais (BARROS, 2002).

O conceito de multicausalidade das doenças, surgiu no final do século XX, substituindo a teoria unicausal. A teoria da multicausalidade não exclui a presença de agentes etiológicos numa pessoa como fator de surgimento de doenças, mas vai além e leva em consideração os fatores psíquicos do paciente, seus conflitos familiares, seus recursos financeiros, nível de instrução, entre outros, como causadores de doenças. O homem então começa a ser visto como um ser bio-psico-social (BACKES et al., 2009). Assim, foi no final do século XX que o saber da prática médica começou a relativizar “certas verdades” e a reconhecer a importância de outros instrumentos teórico-metodológicos ou de outros saberes que são fundamentais na prática da medicina (BALLESTRIN; BARROS, 2009).

Com a busca por uma explicação cuja lógica não resida em causas aparentes, mas na essência dos problemas, emergiu a teoria da determinação social do processo saúde-doença. Segundo essa teoria, baseada no materialismo histórico e dialético, a causa última do comportamento do processo saúde-doença deve ser buscada na forma segundo a qual a sociedade se organiza para a construção da vida social (ALMEIDA-FILHO, 2004). Essa teoria interpreta os fenômenos saúde e doença como expressões de um mesmo processo, evidenciando o seu duplo caráter: o biológico e o social, uma vez que encara que a natureza humana, apesar de ter um lastro biológico, determina-se a partir da vida do homem em sociedade. Assim, a organização social é o determinante fundamental desse processo. A teoria da determinação social do processo saúde-doença permite compreender como cada sociedade cria determinado padrão de desgaste, em razão do consumo e gasto de energia no processo de reprodução social (FONSECA, 1997).

Dessa maneira, percebe-se que o processo saúde-doença vem acompanhando uma grande e significativa evolução na história e está diretamente atrelado à forma como o ser humano, no decorrer de sua existência, foi se aproximando da natureza para transformá-la. Enquanto na Idade Moderna o pensamento científico tende à redução, à objetividade e à fragmentação do conhecimento, traduzindo os acontecimentos por meio de formas demonstráveis e calculáveis, na contemporaneidade, surge a subjetividade e a complexidade, na tentativa de explicar a realidade através de modelos que procuram levar em conta as

relações estabelecidas com o meio em que as pessoas vivem (BACKES et al., 2009). Fica claro que tal processo representa o conjunto de relações e variáveis que produzem e condicionam o estado de saúde e doença de uma população (GUALDA; BERGAMASCO, 2004).

No caso do Brasil, historicamente os atendimentos às necessidades de saúde responderam muito mais a interesses econômicos e a grupos específicos do que propriamente às necessidades da população. Apesar dos avanços obtidos com a criação do SUS, o que se observava sobre a organização do sistema de saúde no Brasil é a separação entre a assistência à saúde individual, eminentemente privada, ainda que financiada direta ou indiretamente pelo Estado e as ações públicas dirigidas à saúde coletiva (BALLESTRIN; BARROS, 2009).

O processo saúde-doença é um dos pontos centrais para os profissionais da saúde que buscam promovê-la, cuidando para que as pessoas possam ter, tanto quanto possível, uma boa qualidade de vida, mesmo quando as limitações se estabelecem. Um novo instrumento intelectual para a apreensão da saúde e da doença deve levar em conta a distinção entre a doença, tal como definida pelo sistema da assistência à saúde e a saúde, tal como percebida pelos indivíduos. Ademais, deve incluir a dimensão do bem-estar, um conceito mais amplo, no qual a contribuição da saúde não é a única, nem a mais importante (OLIVEIRA; EGRY, 2000). Assim, tornam-se necessárias, também, transformações nos nossos valores e na forma como concebemos o mundo, a vida, a saúde e a doença, a forma como produzimos o conhecimento e, principalmente, a maneira pela qual atuamos como profissionais da saúde (BACKES et al., 2009).

2.2 DOENÇA PERIODONTAL

O termo periodonto refere-se aos tecidos que envolvem e sustentam o dente, que é formado por quatro componentes: gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento (NANCI; BOSSHARDT, 2006). Doença periodontal é um termo abrangente que envolve as enfermidades que atingem esses tecidos de suporte dos dentes (SOCRANSKY, 1977). É uma doença que leva à formação de bolsas

periodontais, que promovem a perda de adesão entre dentes, gengiva e também induz à reabsorção do osso alveolar, que pode resultar na perda dentária (NAGASAWA et al., 2007). As bolsas periodontais constituem um ambiente único para colonização de micro-organismos, as quais podem conter até 400 espécies distintas, organizando-se na forma de biofilmes (PETELIN et al., 2015). Trata-se de uma doença infecciosa e a causa mais comum de perda de dentes em adultos (CHEN et al., 2015). A característica clínica que diferencia a periodontite da gengivite é a presença da perda de inserção clinicamente detectável, que tem demonstrado progredir tanto continuamente quanto em surtos episódicos de atividade da doença (NEWMAN et al., 2004).

O principal agente etiológico é o biofilme bacteriano constituído predominantemente por micro-organismos gram-negativos anaeróbicos (FENG; WEINBERG, 2006). A presença dessas bactérias, leva a uma resposta do hospedeiro, potencialmente destrutiva (LANG; TONETTI, 1996). O conceito atual sobre a etiologia das doenças periodontais considera três grupos de fatores que determinam se a destruição periodontal ativa irá ocorrer no organismo: hospedeiro suscetível, presença de espécies patogênicas e ausência/pequena proporção das bactérias chamadas benéficas (NEWMAN et al., 2011). O progresso da doença é devido a uma combinação de fatores, incluindo a presença de bactérias periodontopatogênicas, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases da matriz e prostaglandinas E₂ e baixos níveis de citocinas anti-inflamatórias, incluindo a interleucina 10, fator transformador do crescimento (TGF) – β e inibidores tissulares da metaloproteinase (PAGE et al., 1997).

Assim, as manifestações clínicas dessa doença complexa envolvem as interações entre três características principais: desafio microbiano, resposta imune do hospedeiro e fatores de risco ambientais e genéticos em sua patogênese (JI et al., 2014). Contudo, a importância do hospedeiro no início e na progressão da doença é claramente reconhecida. Embora bactérias patogênicas sejam necessárias para a doença periodontal, somente elas próprias não são suficientes para causar a doença, sendo que um hospedeiro suscetível também é imperativo (NEWMAN et al., 2004). O papel dos genes do hospedeiro na etiopatogênese das doenças periodontais é de fundamental importância para determinar o risco de colapso de tecido periodontal em um paciente (NEWMAN et al., 2007). Após seu início, a doença progride com a perda das fibras de colágeno e da adesão à superfície do cimento, migração apical do

epitélio juncional, formação de bolsas periodontais profundas e reabsorção do osso alveolar (SHANKAR RAM, 2015).

Embora a doença periodontal tenha sido considerada como resultado de uma resposta hiperimune ou hiperinflamatória à placa bacteriana, estudos recentes indicam que os agentes patogênicos periodontais são ativadores e/ou supressores da resposta imune do hospedeiro. Isso levanta a questão de como patógenos periodontais causam inflamação (JI et al., 2015; MOHAMED et al., 2015).

Bactérias que estão presentes em elevadas proporções na doença periodontal ativa são designadas como principais patógenos ou bactérias do “complexo vermelho” que incluem: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (antigamente *Actiobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*. Outras espécies podem também contribuir para destruição periodontal, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium species*, *Dialister pneumosintes* e *Dialister invisus*. Um diverso grupo de bastonetes gram-negativos incluindo *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, *Streptococcus* beta-hemolíticos e *Candida albicans* podem também habitar lesões periodontais (CONTRERAS et al., 2015).

A progressão da doença periodontal e consequente degradação tecidual está diretamente relacionada com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL 6, a interleucina 1 beta (IL1 β) e a interleucina 17 (IL 17), cujo mecanismo independe da imunidade mediada por células (RODRIGUES et al., 2009). As respostas das citocinas são provocadas pelas moléculas de superfície da parede bacteriana e produtos secretados que penetram na gengiva. Assim, uma variedade de tipos celulares secretam IL – 1 β e TNF- α em resposta às bactérias periodontais (DENNISON; VAN DYKE, 1997). Além disso, as citocinas podem atuar em sinergismo com o ligante do receptor ativador k B (RANKL), gerando reabsorção (JIN et al., 2007). Essas vias são inibidas pela molécula protetora do osso, a osteoprotegerina (OPG), a qual tem a mesma conformação da RANKL sendo capaz de se ligar ao precursor RANKL, inibindo a ativação dos osteoclastos e a destruição óssea (TENG, 2003). Assim, um aumento nos níveis de expressão de RANKL nos tecidos periodontais pode indicar um quadro de periodontite (BOSTANCI et al., 2007). Por outro lado, as citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 (IL-4), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) e o fator de crescimento transformador beta (TGF β) estão

associados à supressão da reabsorção óssea (GARLET et al., 2005; GARLET et al., 2010).

Distúrbios sistêmicos que afetam a função de neutrófilos, monócitos/macrófagos e linfócitos resultam em produção ou atividades alteradas de mediadores inflamatórios do hospedeiro, sendo que essas alterações podem manifestar-se clinicamente como um início precoce da destruição periodontal ou como maior rapidez de destruição, em comparação com o que ocorreria na ausência de tais distúrbios (NEWMAN et al., 2004).

A terapia da doença periodontal visa diretamente controlar e, quando possível, eliminar fatores causais responsáveis pela doença (CORTELLI et al., 2013). O tratamento objetiva a eliminação dos depósitos bacterianos localizados sub e supragengivalmente, fato que pode ser alcançado através do debridamento mecânico realizado com instrumentos manuais ou ultrassônicos (PETELIN et al., 2015).

Um periodonto saudável é importante para a saúde oral global, mas a evidência crescente de que a periodontite também pode ter consequências sistêmicas levanta o tratamento da doença periodontal para um novo nível de importância (CONTRERAS et al., 2015).

2.3 OBESIDADE

A OMS (2003) define a obesidade como uma condição de acúmulo excessivo de gordura corporal em determinado grau, em que a saúde e o bem-estar dos indivíduos podem ser prejudicialmente afetados. É caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura no tecido adiposo, levando ao aumento de peso do indivíduo (RITCHIE, 2007). O excesso de peso tem como bases etiopatogênicas a genética e o meio ambiente. Na verdade, desenvolve sobrepeso aquele que acumula fatores que levam ao aumento de gordura corporal. Pode-se assim também definir a obesidade como um excesso de gordura corporal em relação à massa magra (HALPERN; MANCINI, 2009). De acordo com a OMS, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso e mais 700 milhões estarão obesos em 2025 (KHOSRAVI et al., 2013).

Em geral, o reconhecimento da obesidade não é difícil, mas o diagnóstico correto requer que os níveis de risco sejam identificados, e isso com frequência necessita de algumas formas de quantificação (HALPERN; MANCINI, 2009). A definição da obesidade é baseada no índice de massa corporal (IMC), que é medida pelo peso (Kg) dividindo-se pela altura (m) ao quadrado do indivíduo. O intervalo normal é 19-24,9 kg / m², com excesso de peso definido como 25-29,9 kg / m², e a obesidade como ≥ 30 kg / m² (SURESH; MAHENDRA, 2014). No entanto, o IMC apresenta algumas limitações, pois não avalia a distribuição de gordura pelo corpo (SOUZA et al., 2010). Sabe-se que a gordura abdominal, conhecida como gordura visceral, está muito mais associada ao índice de morbidade do que a gordura gluteofemoral ou a gordura subcutânea (PISCHON et al., 2007). Por esse motivo, alguns estudos medem também a circunferência abdominal (AL-ZAHRANI et al., 2003; KHANDER et al., 2009; SAITO et al., 2001), sendo preconizado que a circunferência da cintura maior que 102 cm nos homens e 88 cm nas mulheres é fator de risco para doença cardiovascular. O perímetro da cintura representa a correlação com a quantidade de tecido adiposo visceral, a qual é mais ativa e secreta maior quantidade de citocinas e hormônios (SURESH; MAHENDRA, 2014).

A obesidade tem alcançado proporções epidêmicas em todo o mundo, em grande parte, por causa do aumento no consumo de dieta calórica e altamente associada ao estilo de vida sedentário (KHOSRAVI et al., 2013). A prevalência em crianças também está aumentando e isso pode ser devido a fatores comportamentais envolvendo educação familiar, visto que crianças com pais obesos têm cerca de 80% mais chance de serem obesas (BRIANEZZI et al., 2013). Pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde alerta que 52,5% dos brasileiros adultos estão com sobrepeso e 17,9% são obesos, enfatiza que os quilos a mais na balança são fatores de risco para o surgimento de várias doenças crônicas, que são responsáveis por 72% dos óbitos no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). No Brasil, cerca de 1,5 bilhões de reais por ano são gastos no tratamento da obesidade, abrangendo internações hospitalares, consultas médicas e medicamentos (ANJOS, 2006).

De forma preocupante, a obesidade está associada ao surgimento de inúmeras comorbidades que prejudicam a qualidade de vida; isso se torna um problema de saúde pública, uma vez que as consequências da obesidade para a saúde são muitas, incluindo aumento do risco de morte prematura a graves doenças não letais, mas debilitantes (PEREIRA et al., 2003). Recentes investigações associam

a obesidade a algumas doenças crônico-degenerativas, como diabetes *mellitus* tipo 2, dislipidemia, hiperinsulinemia, hipertensão arterial, aterosclerose, esteatose hepática não alcoólica e alguns tipos de câncer, que, em conjunto, contribuem para o aumento da morbimortalidade em todo o mundo (SPERETTA, 2014). Encontram-se, também, estudos sugerindo a obesidade como possível fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal (DALLA VECCHIA et al., 2005; KHANDER et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2013). O denominador comum na patogênese dessas comorbidades é a presença de um processo inflamatório ativo em tecidos que são importantes para o metabolismo, tais como tecido adiposo, fígado, músculo e endotélio (KARALIS et al., 2009).

Sabe-se hoje que o tecido adiposo possui, além de capacidade de regulação do armazenamento e da distribuição de gordura, comunicação com o sistema nervoso central e o trato gastrointestinal, desempenhando importante papel na resposta inflamatória e condições tanto autócrinas quanto parácrinas ou endócrinas (SPERETTA et al., 2014). O tecido adiposo humano é subdividido em tecido adiposo branco e marrom, sendo que o branco localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral armazena energia na forma de triglicerídeos e participa da regulação do balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise. O tecido adiposo marrom, localizado no sistema nervoso central, apresenta função termogênica, é mais vascularizado e diminui com a idade (ALANIS -FONSECA et al., 2006). Nos últimos anos, o entendimento da patogênese dessas comorbidades em pacientes obesos tem perpassado pela resposta inflamatória do tecido adiposo branco, considerado um órgão endócrino metabolicamente ativo (LEITE et al., 2009).

Os adipócitos, principais constituintes do tecido adiposo, além de armazenar e metabolizar lipídeos, sintetizar triglicérides e realizar lipólise, também sintetizam e secretam proteínas chamadas adipocinas (SANTOS; TORRENT, 2010). As adipocinas abrangem uma ampla gama de funções metabólicas, incluindo a regulação do apetite e do equilíbrio de energia, a sensibilidade à insulina, angiogênese, regulação da pressão arterial, homeostasia vascular e a inflamação e ainda resposta imunológica. Há grande interesse no envolvimento das adipocinas na resposta inflamatória, refletindo a ligação entre a inflamação no tecido adiposo e o desenvolvimento de doenças associadas à obesidade (TRAYHURN, 2013).

A literatura sugere explicações sobre a origem da inflamação na obesidade. Acredita-se que com o ganho de peso e consequente hipertrofia dos

adipócitos haja compressão dos vasos sanguíneos no tecido adiposo branco, impedindo suprimento adequado de oxigênio (NEELS; OLEFSKY, 2006; WOOD et al., 2009). A elevação dos marcadores inflamatórios (TNF- α , IL-6, MCP-1) observados na obesidade seria proveniente da produção destes pelos próprios adipócitos e pelos macrófagos infiltrados em resposta à hipóxia (TRAYHURN; WOOD, 2004). Entretanto, a inflamação tecidual aparece como resposta não só à hipóxia, mas também ao estresse oxidativo e ao estresse do retículo endoplasmático. Fato esse demonstrado em estudo no qual uma nova citocina multifuncional denominada TWEAK (TNF-*like induced of apoptosis*) é super expressa em indivíduos diabéticos com obesidade grave, mas não tem hipóxia como fator contributivo para essa relação (VENDRELL et al., 2010).

A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e humanos tornam esses modelos animais, uma ferramenta importante para o estudo da obesidade, de condições que afetam os humanos e podem ser simuladas em ratos (DIEMEN et al., 2006). A indução da obesidade pode ser realizada em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas (YORK, 1996). De acordo com esses modelos, se for realizado o tratamento neonatal nos animais com MSG, os ratos tornam-se obesos durante o curso do seu desenvolvimento (SUKANOV et al., 1999).

A administração do MSG leva à destruição de locais específicos no hipotálamo, incluindo o núcleo arqueado ventromedial, que, por sua vez, provoca perturbações no controle de mecanismos de absorção e gasto de energia resultando num estado de obesidade (FERNANDES et al., 2012). A obesidade nos animais tratados com MSG se torna aparente por volta das oito semanas de idade, e, por conseguinte, tem sido reconhecido como um modelo adequado para estudos de disfunções metabólicas (BAUTISTA et al., 2014).

Todavia, a visão da obesidade como doença inflamatória tem despertado interesse para manipulação farmacológica e genética da inflamação, abrindo portas para a inovação terapêutica. Torna-se necessário prevenir ou controlar a inflamação crônica, comum na obesidade visceral, reduzindo, assim, os efeitos da elevação das adipocinas inflamatórias (LEITE et al., 2009; KARALIS et al., 2009).

2.4 OBESIDADE E DOENÇA PERIODONTAL

O aumento excessivo de peso vem sendo considerado como uma epidemia global e um dos problemas públicos mais negligenciados, que afetam tanto países mais desenvolvidos quanto os menos desenvolvidos (BITTENCOURT et al., 2011). A periodontite é uma das duas mais importantes doenças orais que contribuem para a carga global de enfermidades crônicas; essa patologia atinge populações humanas em todo o mundo com altas taxas de prevalência, representando, portanto, um grande problema de saúde pública (PETERSEN; BAHENI, 2012). Sabendo-se que o início e a progressão da doença periodontal podem ser modificados por fatores de risco de ordem biológica, ambiental e comportamental e que citocinas derivadas do tecido adiposo e hormônios podem desempenhar um papel modulador em processos inflamatórios (SANTOS et al., 2014), surge a hipótese de que a inflamação sistêmica presente nos obesos pode afetar a suscetibilidade a doenças infecciosas crônicas, como a periodontite (SUVAN et al., 2011).

O primeiro estudo que mostra a relação entre obesidade e doença periodontal foi publicado em 1977. Este trabalho mostrou que os ratos obesos, com modelo de indução por dieta de cafeteria e hipertensos são mais propensos a ter deterioração dos tecidos periodontais do que ratos normais (PERLSTEIN; BISSADA, 1977).

A partir disso, outros estudos também demonstram essa relação com sobrepeso ou obesidade associados ao aumento da suscetibilidade e severidade da doença periodontal (KHANDER et al., 2009; LINDEN et al., 2007; RITCHIE, 2007; SAITO; SHIMAZAKI, 2007). A plausibilidade biológica dessa associação é baseada no efeito das citocinas pró-inflamatórias lançadas pelo tecido adiposo, sugerindo que mecanismos similares são envolvidos na patofisiologia da obesidade e da periodontite e que as secreções dessas substâncias podem induzir a uma resposta hiperinflamatória na doença periodontal (PATARO et al., 2012).

Se a obesidade aumenta o potencial de desenvolvimento da periodontite por alterações do sistema imunológico, podem-se esperar alterações semelhantes nas funções de células imunes inatas e adaptativas nas duas doenças. Embora a ordem temporal de infiltração de células imunes e inflamatórias em gengiva com infecção crônica possa ser diferente da ordem para o tecido adiposo em expansão na inflamação / obesidade, muitos estudos destacam os paralelos entre as mudanças pró-inflamatórias nos indivíduos com periodontite e indivíduos obesos (ZHU; NIKOLAJCZYK, 2014).

Assim como os adipócitos são o tipo de célula dominante no tecido adiposo, células epiteliais e fibroblastos são os principais tipos de células de tecido gengival que ajudam a manter a homeostase. Nas situações de saúde gengival, essas células mediam uma resposta imune inata e também o tráfico gengival tradicional de células do sistema imunológico (BOSSHARDT; LANG, 2005). O tráfico gengival coordena o movimento de neutrófilos, entre outros tipos de células que migram através do epitélio juncional para dentro do sulco gengival, para formar uma barreira contra o biofilme bacteriano na gengiva saudável (HAJISHENGALLIS; HAJISHENGALLIS, 2014).

A periodontite é caracterizada por múltiplas mudanças na imunidade inata gengival. Células epiteliais gengivais e fibroblastos respondem aos patógenos pela expressão transitória de citocinas, como TNF- α e IL-1 β ; assim, essas células provavelmente desempenham um papel ativo na iniciação e manutenção da inflamação gengival (MIYAUCHI et al., 2001). Além disso, os neutrófilos exibem pró-sobrevivência e fenótipos hiper-sensíveis que prolongam a vida de neutrófilos e promovem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (DIAS et al., 2011; LAKSCHEVITZ et al., 2013), o que contribui ainda mais para a patogênese da periodontite. A função inicial de neutrófilos na periodontite é semelhante para a contribuição inicial de neutrófilos para a obesidade associada à inflamação do tecido adiposo, apesar da natureza estéril do último processo. A periodontite é também caracterizada por infiltração de monócitos que se diferenciam em macrófagos infiltrantes ou, em alguns casos, em células dendríticas. Como neutrófilos, macrófagos fagocitam patógenos periodontais e, além disso, orquestram a reparação de feridas por funcionalmente coordenarem as respostas imunes inatas e adaptativas. Macrófagos reconhecem micróbios orais através de receptores semelhantes a *Toll* de superfície (MUTHUKURU et al., 2005), que ativam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e moléculas microbidas. Assim, classicamente respostas inatas definidas mediam múltiplos resultados em doenças cronicamente infectadas no tecido oral (ZHU; NICOLACZYK, 2014).

O tecido adiposo participa na regulação da homeostasia de energia e é um órgão endócrino que secreta mais de cinquenta substâncias biologicamente ativas. Dentre essas substâncias, podem-se citar as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e IL-6 (GARLET et al., 2006), sendo que os níveis dessas citocinas são proporcionais ao índice de massa corporal, em particular em indivíduos com

obesidade visceral (VGONTZAS et al., 1997). Algumas dessas citocinas parecem regular à resposta inflamatória e são muito importantes para a progressão da periodontite (GAFFEN; HAJISHENGALLIS, 2008). O ativador de plasminogênio também tem sido mostrado como tendo um importante papel na inflamação gengival. O inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PA-I) tem aumento na expressão na gordura visceral e induz a aglutinação do sangue aumentando o risco de doença vascular isquêmica, também podendo diminuir o fluxo sanguíneo na gengiva em pessoas obesas, o que promove a progressão da periodontite (WOOD et al., 2003). Embora a doença periodontal tenha o biofilme dental como seu fator etiológico primário, esta também apresenta um caráter multifatorial, em que a manifestação e a progressão da doença podem ser influenciadas por uma grande variedade de determinantes (GENCO, 2002).

Existe ainda uma questão importante a ressaltar, a qual sustenta que indivíduos obesos parecem apresentar menores cuidados com a saúde geral quando comparados a indivíduos com peso normal (AL-ZHRANI et al., 2005; SAITO et al., 1998). Isso provavelmente se deva a uma menor valorização da saúde, obviamente tem reflexo também na saúde bucal, colocando-os em maior risco de desenvolver problemas periodontais (MACHADO et al., 2011).

Com base nessas informações, pode-se levantar a hipótese de que a obesidade na indução das citocinas promove o processo inflamatório crônico das estruturas periodontais. Uma vez que os macrófagos superativados servem como fonte principal dos mediadores da inflamação crônica da doença periodontal (TNF- α , IL-6, IL-1, metaloproteinases, prostaglandinas, dentre outros), supõe-se que o tecido adiposo não só secreta algumas das citocinas pró-inflamatórias, como também estimula, de alguma forma, a participação dos macrófagos no processo patogênico da doença, ora por meios diretos ainda desconhecidos, ora por mecanismos indiretos, induzindo a produção do interferon gama molécula ativadora de macrófagos produzidos por linfócitos T (BASTOS et al., 2005). Embora estudos mostrem evidências quanto à predisposição do paciente obeso à doença periodontal, os mecanismos celulares e moleculares específicos ainda não estão bem esclarecidos e mais estudos são necessários para desvendá-los.

2.5 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS

Todas as funções do corpo humano e dos vertebrados de uma maneira geral são permanentemente controladas, em estado fisiológico, por dois grandes sistemas que atuam de forma integrada: o sistema nervoso e o sistema endócrino (GUYTON; HALL, 1997).

O sistema endócrino é um mecanismo complexo que coordena e regula a comunicação entre as células, constituído por combinações de glândulas e hormônios, sendo responsável pelas funções biológicas normais, como reprodução, desenvolvimento embrionário, crescimento e metabolismo (REIS FILHO et al., 2006). Hormônios são mensageiros químicos que respondem pela comunicação entre diferentes tipos de células, as quais identificam através de receptores que são estruturas proteicas especializadas em reconhecimento molecular. Depois da aproximação e interação (hormônio-receptor), ocorre uma série de reações bioquímicas, levando a respostas biológicas específicas (SIMONDS, 1992).

Os hormônios sexuais são produzidos a partir do colesterol e podem ser classificados em três grupos principais: hormônios sexuais femininos ou estrógenos, hormônios sexuais masculinos ou andrógenos e hormônios da gravidez ou progestógenos (SOLOMONS; FRHYLE, 2000).

Os estrógenos e a progesterona são hormônios cuja produção é unicamente controlada pelo ovário feminino. Estrógenos são responsáveis pelo desenvolvimento sexual, pelas mudanças fisiológicas que ocorrem na puberdade das mulheres, também, pelas alterações sexuais mensais e, junto com a progesterona, têm um papel vital na preparação do trato reprodutor feminino para recepção do esperma e implantação do óvulo fertilizado (BOSCO et al., 2004). O estrogênio é, em realidade, um conjunto de hormônios chamados estradiol, estriol e estrona, sendo o mais importante deles o estradiol. Entretanto, possuem funções quase semelhantes, embora suas estruturas químicas não sejam tão idênticas (GUYTON, 1988).

A diminuição dos níveis hormonais no decorrer da vida é fisiológica, fazendo parte do processo natural e espontâneo do envelhecimento dos seres humanos (ZAHAR et al., 2005). Nas mulheres, isso ocorre devido à progressiva diminuição da atividade ovariana, já que o ovário é o responsável pela secreção dos hormônios ditos femininos, em especial o estradiol, a estrona e o estriol. Essas mudanças acompanham a transição da idade fértil e não fértil (POLONINI et al., 2011). No entanto, essa diminuição pode ocorrer de forma tão abrupta e intensa que tende a levar a quadros considerados patológicos. Alguns sintomas clínicos que podem ser

observados em decorrência desse hipoestrogenismo e que são de especial interesse são: distúrbios psicológicos como perda de libido e insônia, modificação do perfil lipídico, com aumento nos níveis de triglicérides e de lipoproteína de baixa densidade e diminuição de lipoproteína de alta densidade, tendência à fratura osteoporótica pela perda acelerada de massa óssea, ondas de calor repentinas que passam pelo corpo, entre outros (PEREIRA, 2004). Com a diminuição da secreção de estrógenos na menopausa, tem-se como consequência maior atividade metabólica óssea, ou seja, maior ritmo na remodelação óssea (AMADEI et al., 2006).

Os hormônios sexuais têm importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea (COMPSTON, 2001). Os osteoblastos, que são as células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea, possuem receptores para diversos fatores, como glicocorticoides, hormônio do crescimento (GH), além de IL-1, TNF- α , prostaglandinas e fator de crescimento semelhante à insulina, além de receptores para hormônios sexuais (KESSEL, 2001). O receptor se liga de maneira reversível ao estrógeno com alta afinidade e especificidade. A ativação do receptor parece envolver uma mudança conformacional capaz de ligá-lo ao receptor nuclear (GRAY, 1989).

Os estrógenos e seus análogos apresentam importante papel na expressão de fatores de crescimento e de citocinas sintetizadas e secretadas pelos osteoblastos ou pelos osteoclastos. Entre as citocinas com propriedades de reabsorção, moduladas pelo estrógeno, destaca-se a IL-1. A deficiência estrogênica provoca aumento na secreção dessa citocina, potente indutora da reabsorção óssea (HOROWITZ, 1993). Esses mediadores celulares são responsáveis pelo equilíbrio funcional das células ósseas, determinando um controle autócrino e parácrino da remodelação óssea (TURNER, 1994). Os estrógenos inibem a reabsorção óssea prevenindo a liberação desses fatores de crescimento previamente depositados na matriz óssea (AMADEI et al., 2006).

Os níveis de estrógeno começam a cair principalmente durante a fase folicular e lútea tardia do ciclo menstrual, quando as mulheres se aproximam da menopausa (SHERMAN; KORENMAN, 1975). O período de pós-menopausa está associado a um aumento do risco de fraturas osteoporóticas, infarto do miocárdio, ciclo menstrual desordenado, suores noturnos e uma possibilidade de um início precoce da doença de Alzheimer. O problema mais significativo que se desenvolve durante a menopausa é a osteoporose, a qual é uma doença mundial caracterizada por baixa massa óssea e fragilidade com consequente aumento do risco de fraturas

(WACTAWSKI-WENDE et al., 1996). Osteoporose é também responsável por diminuição da crista óssea alveolar por unidade de volume, uma condição que promove perda óssea mais rápida quando se encontra com infecções, tais como infecções periodontais. Além disso, as mulheres osteoporóticas apresentaram maior frequência de perda óssea alveolar em altura, bem como a perda de densidade crestal e subcrestal comparadas às mulheres com densidade óssea normal (PAYNE et al., 1999). A incidência da doença periodontal também se correlaciona com sinais de osteoporose generalizada (GROEN et al., 1968).

Existem claras evidências de que a diminuição ou ausência de estrógenos leva à progressiva redução da massa óssea. De acordo com a literatura, a diminuição dos níveis de estrógeno altera tanto o processo de remodelação quanto o de reparação, embora nem todos os mecanismos estejam completamente elucidados (AMADEI et al., 2011; SURI, 2012; XU et al., 2015).

2.6 HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS E DOENÇA PERIODONTAL

Os esteroides sexuais são fundamentais para o desenvolvimento do esqueleto e para a manutenção da saúde do osso ao longo da vida adulta (SHIAU, 2014). A homeostasia do periodonto envolve uma relação complexa multifatorial, a qual o sistema endócrino representa papel importante (MARIOTTI, 1994). Assim como os hormônios esteroidais sexuais regulam a função reprodutiva, eles têm efeitos potentes no sistema nervoso e cardiovascular, também sobre os principais determinantes no desenvolvimento e na integridade do esqueleto e da cavidade oral incluindo os tecidos periodontais (LORENZO, 2003). O desequilíbrio endócrino sistêmico pode ter um impacto importante na patogênese da doença periodontal e vice-versa, mudanças na condição periodontal podem estar associadas com a variação dos hormônios sexuais (MARKOU et al., 2009). Gravidez, puberdade, menstruação e menopausa são as quatro condições fisiológicas que oferecem um meio para examinar as mudanças que ocorrem na microbiota oral durante as flutuações dos níveis hormonais endógenos (KUMAR, 2013).

A associação entre hormônios sexuais e doenças periodontais é evidente na classificação das doenças periodontais proposta pela Academia Americana de Periodontia, a qual inclui as seguintes categorias de doenças periodontais relacionadas com hormônios sexuais: gengivite associada à puberdade, gengivite associada ao ciclo menstrual, gengivite associada à gravidez, sendo o granuloma piogênico e o tumor gravídico também classificados como manifestações gengivais relacionadas à gravidez (ARMITAGE, 1999).

Os hormônios sexuais femininos modulam a resposta imunológica e a resposta às infecções (SHIAU, 2014). Os principais hormônios sexuais que exercem influência no periodonto são o estrógeno e a progesterona. O estrógeno pode promover a queratinização e aumentar o conteúdo de mucopolissacarídeos do tecido conjuntivo, a progesterona pode aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos da gengiva (ELEY et al., 2012). Esses hormônios podem alterar fatores e respostas imunológicas, incluindo expressão e apresentação de antígenos e produção de citocinas, bem como a expressão de apoptose e fatores de morte celular (MARKOU et al., 2009). Os hormônios sexuais têm mostrado direta e indiretamente influências na proliferação celular, diferenciação e crescimento nos tecidos alvos, incluindo queratinócitos e fibroblastos na gengiva (MEALEY; MORITZ, 2003). Tanto o sistema imune quanto o osso são alvos dos esteroides sexuais, o que, por conseguinte, tornam essas alterações importantes no contexto da doença periodontal destrutiva (SHIAU et al., 2014).

O estrógeno modula elementos relacionados à função imune e ao metabolismo ósseo, como refletido na ativação das células T dos osteoclastos. Ele induz a formação osteoclastogênica por fatores de células T ativadas. Os osteoclastos, resultantes a partir de precursores monócitos no compartimento hematopoiético, são um componente vital do sistema esquelético, contribuindo para atividades que vão desde a reabsorção óssea à remodelação óssea fisiológica normal, bem como homeostase de cálcio (VAANANEN, 2000). Mulheres na menopausa têm um aumento do número de monócitos circulantes comparado com mulheres na fase folicular do ciclo menstrual. Estrógeno e progesterona possivelmente diminuem o número de monócitos circulantes no sangue (BOUMANN et al., 2004). Especificamente o estrógeno representa o maior fator de risco para a osteoporose na mulher. Evidências demonstraram que a deficiência de estrógeno estava associada não somente com a rápida perda óssea associada à menopausa precoce, mas

também ligada à fase lenta depois da perda óssea atribuída ao envelhecimento (LAMONTE et al., 2013).

Os neutrófilos, que são componentes críticos da imunidade inata, também parecem ser sensíveis aos esteroides sexuais. A quimiotaxia de neutrófilos, por exemplo, é aumentada na presença de progesterona, mas diminuída na presença de estrógeno (MIYAGI et al., 1992). A produção de óxido nítrico, que exerce efeitos anti-inflamatórios impedindo a adesão dos neutrófilos ao endotélio, foi alterada com relação ao *status* reprodutivo, pois se verificou que a produção de óxido nítrico é mais elevada na presença de estrógeno. O estrógeno tem sido mostrado para regular expressão de sintase de óxido nítrico nos neutrófilos. Como os neutrófilos são um tipo de célula imune predominante na lesão periodontal inflamatória inicial, mediando a resposta do hospedeiro inicial para desafio microbiano, esteroides sexuais, assim, alteram a defesa imunológica (VAN DYKE, 1990).

Em relação à progesterona, recentes pesquisas indicam que ela tem efeitos sobre o osso através da regulação da expressão e função da matriz de proteínas e metaloproteinases envolvidas na remodelação óssea e reabsorção, servindo como uma função de proteção contra a perda óssea (SHIAU, 2014). Esse mecanismo protetor pode mediar a expressão do receptor desse hormônio na célula osteoblástica, assim como pela interação dele com o receptor de glicocorticoide (PRIOR, 1990). Demonstrou-se que a progesterona é capaz de estimular a produção do mediador inflamatório, prostaglandina E2 e melhorar o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no sulco gengival (MARKOU, 2009). Também foi citada para melhorar a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares. Além disso, os hormônios esteroidais sexuais parecem modular a produção de citocinas, e a progesterona tem sido evidenciada para diminuir a produção da IL-6 por fibroblastos gengivais humanos em até 50% dos valores de controle (LAPP, 1995).

Alterações endócrinas exercem uma grande influência sobre a homeostase dos tecidos periodontais durante os vários estágios da vida da mulher, porém a ação hormonal isolada não é suficiente para produzir a inflamação gengival. Esta é dependente da colonização subgengival por um biofilme bacteriano específico relacionado às doenças periodontais, associada à resposta imunológica do hospedeiro (BERTOLINI et al., 2007).

Hsieh et al. (1995) analisaram o efeito da ovariectomia no reparo de alvéolos dentários em ratas e verificaram que a deficiência estrogênica pode afetar a

remodelação óssea pós-exodontia. A influência da deficiência estrogênica na reparação óssea alveolar foi investigada também por Kawamoto e Nagaoka (2000), que observaram que as alterações ósseas alveolares induzidas por oclusão traumática são agravadas pelos baixos níveis de estrógeno de ratas ovariectomizadas. Eles verificaram que a dinâmica óssea alveolar induzida pelo trauma oclusal foi aumentada pela deficiência estrogênica consequente à remoção dos ovários. Outro estudo em modelo animal, realizado por Dai et al. (2016) com ratas ovariectomizadas e ratas com cirurgia simulada (pseudocirurgia), demonstrou que as ratas ovariectomizadas apresentaram maior perda óssea vertical em todos os pontos quando comparadas às demais, sugerindo que pacientes osteoporóticas têm maior potencial de progressão da doença periodontal.

Pallos et al. (2006) pesquisaram se a menopausa era um fator de risco para a periodontite. Das 46 mulheres avaliadas, entre 44 e 68 anos de idade, houve avaliação de parâmetros periodontais comparando aos níveis de estrógeno e da densidade óssea mineral; logo, o estudo demonstrou dados que não correlacionavam a doença periodontal com a menopausa e osteoporose.

Bertulucci et al. (2012) pesquisaram a mesma relação, em estudo com 99 mulheres na pós-menopausa, no qual se avaliou a condição periodontal e comparou-a à osteoporose pela avaliação da densidade mineral óssea. Os resultados demonstraram que o grupo de mulheres com osteoporose apresentou maior percentual de doença periodontal e teve como conclusão que a osteoporose pode ter uma influência na condição periodontal, por haver relação entre periodontite e osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Achados semelhantes foram encontrados por Lohana et al. (2015), ao avaliar em 65 mulheres com idades entre 45 e 75 anos, correlacionando a severidade da osteoporose com a periodontite, avaliando a densidade mineral óssea. Encontraram que o aumento da severidade da osteoporose aumenta o desenvolvimento da periodontite, concluindo que existe uma associação entre as duas doenças.

Corroborando com os resultados anteriores, outro estudo de associação da osteoporose com a doença periodontal acompanhou 33 mulheres na pós-menopausa, que foram avaliadas por um período de três anos, quanto à categorização da massa óssea pela densidade mineral na região lombar com o exame da situação periodontal. Encontraram em todas as mulheres que inicialmente apresentaram quadro de normalidade óssea ou osteopenia e progrediram ao longo dos três anos

para osteoporose, um aumento significativo no índice de sangramento gengival, sugerindo que alterações periodontais podem estar associadas à osteoporose em mulheres na menopausa (PEREIRA et al., 2015).

REFERÊNCIAS

AL-ZAHRANI, M. S.; BISSADA, N. F.; BORAWSKIT, E. A. Obesity and periodontal disease in young, middle aged and older adults. **J. Periodontol**, v. 74, p. 610-615, 2003.

AL-ZAHRANI, M. S.; BORAWSKIT, E. A.; BISSADA, N. F. Periodontitis and three health-enhancing behaviors: maintaining normal weight, engaging in recommended level of exercise, and consuming a high-quality diet. **J. Periodontol**, v. 76, n. 8, p. 1362-1366, 2005.

ALMEIDA-FILHO, N. Modelos de determinação social das doenças crônicas não transmissíveis. **Cien. Saúde Colet.**, v. 9, n. 4, p. 865-884, 2004.

AMADEI, S. U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpm/v42n1/29910.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2015.

AMADEI, S. U. et al. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. **Braz. Oral Res.**, v. 5, n. 6, p. 538-543, 2011.

ANJOS, L. A. **Obesid. e Saúde Púb.** Rio de Janeiro: Fiocruz, 2006.

ARANTES, R. C. et al. Processo saúde-doença e promoção da saúde: aspectos históricos e conceituais. **Rev. APS**, v. 11, n. 2, p. 189-198, 2008.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann. Periodontol.**, v. 4, p. 1-6, 1999.

BACKES, M. T. S. et al. Conceitos de Saúde e Doença ao Longo da História Sob o Olhar Epidemiológico e Antropológico. **Rev. enferm. UERJ.**, v. 17, n. 1, p. 111-117, 2009. Disponível em: <<http://www.facenf.uerj.br/v17n1/v17n1a21.pdf>>. Acesso em: 8 ago. 2015

BALESTRIN, M. F.; BARROS, S. A. B. M. A relação entre a concepção do processo saúde-doença e a identificação/ hierarquização das necessidades em saúde. **Rev. Polid. Fac. Guairacá.**, v. 1, p. 18-41, 2009.

BARROS, J. A. C. Pensando o processo saúde doença: a que responde o modelo biomédico? **Saúde e Societ.**, v. 11, n. 1, p. 67-84, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010412902002000100008&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 jul. 2015.

BASTOS, A. A. et al. Obesidade e Doença Periodontal. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Intergr.**, v. 5, n. 3, p. 275-279, 2005.

BAUTISTA, R. J. H. et al. Biochemical Alterations during the Obese-Aging Process in Female and Male Monosodium Glutamate (MSG) - Treated Mice. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 11473-11494, 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/15/7/11473/htm>>. Acesso em: 4 ago. 2015.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol.**, v. 40, p. 527-528, 1968.

BERTOLINI, P. F. R. et al. Medicina periodontal e a mulher: a importância do seu conhecimento para uma abordagem preventiva por ginecologistas/obstetras e cirurgiões-dentistas. **Rev. Ciênc. Méd.**, v. 16, n. 3, p. 175-185, 2007.

BERTULUCCI, L. A. B. et al. Doença periodontal em mulheres na pós-menopausa e sua relação com a osteoporose. **Rev. Bras. Ginecol. Obst.**, v. 34, n. 12, p. 563-567, 2012.

BITTENCOURT, B. F. et al. Influência da Obesidade na Doença Periodontal – Revisão de Literatura. **Braz. J. Periodontol.**, v. 21, n. 2, p. 18-24, 2011.

BOSTANCI, N. et al. Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: implications of their relative ratio. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, p. 370-376, 2007.

BOSCO, I. F. et al. A influência dos hormônios sexuais nos tecidos periodontais. **Rev. Odont. Araçatuba**, v. 25, n. 2, p. 22-27, 2004.

BOSSHARDT, D. D.; LANG, N. P. The junctional epithelium: from health to disease. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 9-20, 2005.

BOUMAN, A. et al. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 52, p. 19-26, 2004.

BRIANEZZI, L. F. F. et al. Impacto da obesidade na saúde bucal: revisão de literatura. **RFO, Passo Fundo**, v. 18, n. 2, p. 211-216, 2013.

CHEN, X. et al. Advanced biomaterials and their potential applications in the treatment of periodontal disease. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 25, p. 1-16, 2015.

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Phys. Rev.**, v. 81, n. 1, p. 419-447, 2001.

CONTRERAS, A. et al. Periodontal microbiology in Latin America. **Periodontol. 2000.**, v. 67, p. 58-86, 2015.

CORTELLI, J. R. et al. Avaliação da eficácia clínica e microbiana de dois protocolos terapêuticos periodontais. **Bras. J. Periodontol.**, v. 2, n. 3, 2013. Disponível em: <http://www.revistasobrape.com.br/arquivos/2013/setembro/REVPERIO_SET_2013_PUBL_SITE_PAG-24_A_29.pdf>. Acesso em: 10 maio 2015.

DAI, J. et al. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. **Clin. Oral Investig.**, v. 20, n. 3, p. 581-588, 2016.

DALLA VECCHIA, C. F. et al. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. **J. Periodontol.**, v. 76, p. 1721-1728, 2005.

DENNINSON, D. K.; VAN DYKE, T. E. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 54-78, 1997.

DIAS, I. H. K. et al. Activation of the neutrophil respiratory burst by plasma from periodontitis patients is mediated by pro-inflammatory cytokines. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, p. 1-7, 2011.

DIEMEN, V. V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta. Cir. Bras.**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/acb/v21n6/13.pdf>>. Acesso em: 3 ago. 2015.

ELEY, B. M.; SOORY, M.; MANSON, J. D. O efeito dos fatores sistêmicos sobre os tecidos periodontais. **Periodontia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

FENG, Z.; WEINBERG, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol. 2000.**, v. 40, p. 50-76, 2006.

FERNANDES, S. A. G. et al. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 10, n. 105, 2012.

FONSECA-ALANIS, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abem/v50n2/29305.pdf>>. Acesso em: 11 maio 2015.

FONSECA, R. M. G. S. da. Espaço e gênero na compreensão do processo saúde-doença da mulher brasileira. **Rev. latino-am. Enfermagem**, v. 5, n. 1, p. 5-13, 1997.

GAFFEN, S.; HAJISHENGALLIS, G. A new inflammatory cytokine on the block: rethinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th 17 cells and IL-17. **J. Dent. Res.**, v. 87, n. 9, p. 817-828, 2008.

GARLET, G. P. et al. Actinobacillus actinomycetencomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leucocyte migration. **Microbes Infect.**, v. 7, p. 738-747, 2005.

GARLET, G. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetencomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 12-20, 2006.

GARLET, G. P. et al. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 50, p. 11-81, 2010.

GENCO, R. J. Fatores de risco na doença periodontal. **Medicina periodontal**. São Paulo: Santos, 2002.

GIL, A. C. **Como elaborar projetos de pesquisa**. 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007.

GRAY, T. K. Estrogens and skeleton: cellular and molecular mechanisms. **J. Steroid. Biochem.**, v. 34, n. 1, p. 285-287, 1989.

GROEN, J. J.; MENCZEL, J.; SHAPIRO, S. Chronic destructive periodontal disease in patients with presenile osteoporosis. **J. Periodontol.**, v. 39, p. 19-23, 1968.

GUALDA, D. M. R.; BERGAMASCO, R. B. **Enfermagem e cultura e o processo Saúde- Doença**. São Paulo: Ícone, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

GUYTON, A. C. **Endocrinologia e Reprodução**. Fisiologia humana. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

HAJISHENGALLIS, E.; HAJISHENGALLIS, G. Neutrophil homeostasis and periodontal health in children and adults. **J. Dent. Res.**, v. 93, p. 231-237, 2014.

HALPERN, A.; MANCINI, M. C. **Obesidade e Síndrome Metabólica para o Clínico**. São Paulo: Roca, 2009.

HOROWITZ, M. C. Cytokines and estrogen in bone. **Science.**, v. 260, n. 5108, p. 626-627, 1993.

HSIEH, Y. D.; DEVLIN, H.; MC CORD, F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Arch. Oral Biol.**, v. 40, n. 6, p. 529-531, 1995.

JI, S.; CHOI, Y. S.; CHOI, Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? **J. Periodont. Res.**, v. 50, n. 5, p. 570-585, 2015.

JIN, Q. et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 7, p. 1300 -1308, 2007.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KARALIS, K. P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **FEBS J.**, v. 276, p. 5747-5754, 2009.

KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. **J. Oral Rehabil.**, v. 27, n. 7, p. 587-594, 2000.

KESSEL, R. G. Tecido Conjuntivo: osso e formação óssea. **Histologia Médica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

KHANDER, Y. S. et al. The association between periodontal disease and obesity among adults in Jordan. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 1, p. 18-24, 2009.

KHOSRAVI, R. et al. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6: Potential Interorgan Inflammatory Mediators Contributing to Destructive Periodontal Disease in Obesity or Metabolic Syndrome. **Hindawi Publ. Corp.**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

KUMAR, P. S. Sex and the subgingival microbiome: Do female sex steroids affect periodontal bacteria? **Periodontol.** 2000, v. 61, n. 1, p. 103-124, 2013.

LAMONTE, M. J. et al. Five year changes in periodontal disease measures among postmenopausal women. The Buffalo osteoperio study. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 5, p. 572-584, 2013.

LANG, N. P.; TONETTI, M. S. Periodontal diagnosis in treated periodontitis. Why, when and how to use clinical parameters. **J. Clin. Periodontol.**, v. 23, n. 3, p. 240-250, 1996.

LAPP, A.; THOMAS, M. E.; LEWIS, J. B. Modulation by progesterone of interleukin-6 production by gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, v. 66, n. 4, p. 279-284, 1995.

LAKSCHEVITZ, F. S.; ABOODI, G. M.; GLOGHAUER, M. Oral neutrophil transcriptome changes result in a pro-survival phenotype in periodontal diseases. **Plos One.** , v. 8, p. e68983, 2013.

LEITE, L. D.; ROCHA, E. D. M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Rev. Ciência & Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

LINDHEN, G. et al. Obesity and periodontitis in 60-70 year-old-men. **J. Clin. Periodontol.**, v. 34, n. 6, p. 461-466, 2007.

LORENZO, J. A new hypothesis for how sex steroids hormones regulate bone mass. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1641-1643, 2003.

LOHANA, M. et al. A Study to Assess and Correlate Osteoporosis and Periodontitis in Selected Population of Maharashtra. **J. Cl. Diagn. Res.**, v. 9, n. 6, p. 46-50, 2015.

MARIOTTI, A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 5, p. 27-53, 1994.

MARKOU, E. et al. The influence of Sex Steroid Hormones in gingiva of women. **The Open Dent. J.**, v. 3, p. 114-119, 2009.

MEALEY, L.; MORITZ, J. Hormonal influences on periodontium. **Periodontol.** **2000**, v. 32, p. 59-81, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde**. Ministério da Saúde. Disponível em: <[www.saude.gov.br/http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/17455-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta](http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/noticias-svs/17455-obesidade-estabiliza-no-brasil-mas-excesso-de-peso-aumenta)>. Acesso em: 31 maio 2015.

MIYAGI, M. et al. Effects of sex hormones on chemotaxis of human peripheral polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **J. Periodontol.**, v. 63, p. 28-32, 1992.

MIYAUCHI, M. et al. Cytokine expression in rat molar gingival periodontal tissues after topical application of lipopolysaccharide. **Histochem. Cell. Biol.**, v. 116, p. 57-62, 2001.

MOHAMED, H. G. et al. Influence of type 2 diabetes on local production of inflammatory molecules in adults with and without chronic periodontitis: a cross-sectional study. **BMC Oral Health.**, v. 15, n. 86, 2015.

MUTHUKURU, M.; JOTWANI, R.; CUTLER, C. W. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 687-694, 2005.

NAGASAWA, T. et al. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. **Periodontol.** **2000**, v. 43, p. 65-84, 2007.

NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Periodontol.** **2000.**, v. 40, p. 11-28, 2006.

NASCIMENTO, C. M. et al. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 6, p. 365-370, 2013.

NASSAR, P. O. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **J. Perio. Res.**, v. 44, n. 4, p. 479-488, 2009.

NASSAR, C. A. et al. Efeito de anti-inflamatório no desenvolvimento da doença periodontal induzida. Avaliação radiográfica em ratos. **Rev. Odont. UNESP**, v. 32, p. 25-30, 2003.

NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. Inflamed fat: what starts the fire? **J. Clin. Invest.**, v. 116, n. 1, p. 33-35, 2006.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; CARRANZA, F. A. Medicina Periodontal. **Carranza Periodontia Clínica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NEWMAN, M. G.; TAKEI, H. H.; KLOKKEVOLD, P. R. Etiologia das Doenças Periodontais. **Carranza Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

NEWMAN, M. G. et al. Etiologia das doenças periodontais. **Carranza Periodontia Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

OLIVEIRA, M. A. C.; EGRY, E. Y. A historicidade das teorias interpretativas do processo saúde-doença. **Rev. Enf. USP.**, v. 34, n. 1, p. 9-15, 2000.

PAGE, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000.**, v. 14, p. 216-248, 1997.

PALLOS, D. et al. Menopausa: fator de risco para doença periodontal? **Rev. Bras. Ginecol. Obst.**, v. 28, n. 5, p. 292-297, 2006.

PATARO, A. L. et al. Association between severity of body mass index and periodontal condition in women. **Clin. Oral Invest.**, v. 16, p. 727 -734, 2012.

PAYNE, J. B.; NUMMIKOSKI, P. V.; PATIL, K. D. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/ osteopenic women. **Osteoporos. Int.**, v. 40, p. 34-40, 1999.

PEREIRA, D. H. Reposição hormonal masculina e feminina. **Tratado de medicina estética**. São Paulo: Roca, 2004.

PEREIRA, F. M. B. et al. Association between periodontal changes and osteoporosis in postmenopausal women. **Climateric.** , v. 18, n. 2, p. 311-315, 2015.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHETA, A. H. Obesidade: Hábitos Nutricionais, Sedentarismo e Resistência à Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 2, p. 111-122, 2003.

PETELIN, M. et al. Effect of repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy on subgingival periodontal pathogens in the treatment of chronic periodontitis. **Lasers Med. Sci.**, v. 30, p. 1647-1656, 2015.

PETERSEN, P. E.; BAHENI, P. C. Periodontal health and global public health. **Periodontol. 2000.**, v. 60, p. 7-14, 2012.

PERLSTEIN, M. I.; BISSADA, N. F. Influence of obesity and hypertension on severity of periodontitis in rats. **Oral Surg.**, v. 43, n. 5, p. 707-719, 1977.

PISCHON, N. et al. Obesity, inflammation and periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v. 86, p. 400-409, 2007.

PRIOR, J. C. Progesterone as bone-trophic hormone. **Endocr. Rev.**, v. 11, p. 386-398, 1990.

REIS FILHO, R. W.; ARAUJO, J. C.; VIEIRA, E. M. Hormônios sexuais estrógenos: Contaminantes bioativos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 817-822, 2006.

RITCHIE, C. S. Obesity and periodontal disease. **Periodontol.** **2000**, v. 44, n. 1 p. 154-163, 2007.

RODRIGUES, A. Z. et al. Estratégias terapêuticas e potenciais alvos para modulação da resposta do paciente periodontal. **R. Period.**, v. 19, n. 1, p. 14-21, 2009.

ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Obesity and periodontitis. **N. Eng. J. Med.**, v. 339, n. 7, p. 482-483, 1998.

SAITO, T. et al. Relationship between upper body obesity and periodontitis. **J. Clin. Res.**, v. 80, p. 1631-1636, 2001.

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. **Periodontol.** **2000.**, v. 43, n. 1, p. 254-266, 2007.

SANTOS, T. et al. Evidências da interação entre obesidade e doença periodontal: uma revisão de literatura. **Braz. J. Periodontol.**, v. 24, n. 1, p. 35-40, 2014.

SANTOS, L. C.; TORRENT, I. F. O tecido adiposo e a produção de adipocinas. **Synthesis Rev. Dig, FAPAM**, v. 2, n. 2, p. 110-119, 2010.

SEVALHO, G. Uma abordagem histórica das representações sociais de saúde e doença. **Cad. Saúde Pública**, v. 9, n. 3, p. 349-365, 1993. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1993000300022>>. Acesso em: 4 jul. 2015.

SHANKAR RAM, V. Bonebiomarkers in Periodontal Disease: Review Article. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, 2015.

SHERMAN, B. M.; KORENMAN, S. G. Hormonal characteristics of the human menstrual cycle through reproductive life. **J. Clin. Invest.**, v. 55, p. 699-706, 1975.

SHIAU, H. J.; AICHELMANN-REIDY, M. E.; REYNOLDS M. A. Influence of sex steroids on inflammation and bone metabolism. **Periodontol.** **2000**, v. 64, p. 81-94, 2014.

SIMMONDS, R. J. **Chemistry of Biomolecules: An Introduction**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992.

SOCRANSKY, S. S. Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations. **J. Periodontol.**, v. 48, p. 497-504, 1977.

SOUZA, A. B. et al. A obesidade como fator de risco para doença periodontal: revisão de literatura. **Rev. Dental Press Period. Implantol.**, v. 3, n. 3, p. 74-82, 2010.

- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LCT, 2000.
- SPERETTA, G. F. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Rev. HUPE, Rio de Janeiro**, v. 13, n. 1, p. 61-69, 2014.
- SUKHANOV, S. N. et al. Neonatal monosodium glutamate treatment alters rat intestinal muscle reactivity to some agonists. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 386, n. 2-3, p. 247-252, 1999.
- SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. **J. Clin. Diag. Res.**, v. 8, n. 4, p. ZE01- ZE03, 2014.
- SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. **J. Clin. Diag. Res.**, v. 8, n. 4, p. ZE01- ZE03, 2014.
- SURI, V.; SURI, V. Menopause and oral health. **J. Mid-Life Health**, v. 5, n. 3, p. 115-120, 2014.
- SUVAN, J. et al. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. **Obes. Rev.**, v. 12, p. e381-e404, 2011.
- TENG, Y. T. The role of acquired immunity and periodontal disease progression. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, n. 4, p. 237-252, 2003.
- TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.
- TRAYHURN, P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. **Physiol. Rev.**, v. 93, p. 1-21, 2013.
- TURATO, E. R. Métodos qualitativos e quantitativos na área da saúde: definições, diferenças e seus objetos de pesquisa. **Rev. Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 507-514, 2005.
- TURNER, R. T.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. **Endocrine Rev.**, v. 15, p. 275-300, 1994.
- VAANANEN, H. K. et al. The cell biology of osteoclast function. **J. Cell. Sci.**, v. 113, p. 377-381, 2000.
- VAN DYKE, T. E.; HOOP, G. A. Neutrophil function and oral disease. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 1, p. 1990.
- VENDRELL, J. et al. Tumor Necrosis-Like Weak Inducer of Apoptosis as a Proinflammatory Cytokine in Human Adipocyte Cells: Up-Regulation in Severe Obesity is Mediated by Inflammation But not Hypoxia. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 6, p. 2983-2992, 2010.

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. 218-221, 2012.

VGONTZAS, A. N. et al. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 82, n. 5, p. 1313-1316, 1977.

VOLTERA, A. F. et al. Efeito da indução da obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, n. 1, p. 47-54, 2008.

WACTAWSKI-WENDE, J. et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 67, n. 10, p. 1076-1084, 1996.

WOOD, N.; JHONSON, R. B.; STRECKFUS, C. S. Comparison of body composition & periodontal disease using nutritional assessment techniques. Third National Health & Nutrition Examination Survey (NHANES III). **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p. 321-327, 2003.

WOOD, I. S. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 68, n. 4, p. 370 -377, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases. **WHO technical report series**. Geneve, 2003.

XU, C. X. et al. Effects of oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats experimental periodontitis. **Mol. Med. Rep.**, v. 12, n. 3, p. 3494-3502, 2015.

YORK, D. A. Lessons from animal models of obesity. **Endocrinol. Metab. Clin.**, v. 25, n. 4, p. 781-800, 1996.

ZAHAR, S. E. V. et al. Qualidade de vida em usuárias e não usuárias de terapia de reposição hormonal. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 51, n. 3, p. 133-138, 2005.

ZHU, M.; NIKOLAJCZYK, B. S. Immune Cells Link Obesity- associated Type 2 Diabetes and Periodontitis. **J. Dent. Res.**, v. 93, n. 4, p. 346-352, 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO

A influência da obesidade induzida nos tecidos periodontais de ratas com periodontite experimental

Artigo submetido à revista *Archives of Oral Biology*.

A influência da obesidade induzida nos tecidos periodontais de ratas com periodontite experimental

Tatiane Morgenstern de Mattia^{a1}, Marcela Aparecida Leite^{b2}, Patrícia Oehlmeyer Nassar^{c3}, Sara Cristina Sagae^{d4}, Ana Claudia Paiva Alegre-Maller^{e5}, Jordana Heindman Pandini^{f6}, Nahana Cardoso^{f7}, Vinicius Marchiori^{f8}, Rose Meire Costa Brancalhão^{g9}, Carlos Augusto Nassar^{h10}

^aCirurgiã-dentista. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^bFisioterapeuta. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^cCirurgiã-dentista. Doutora em Odontologia. Professora associada da disciplina de Periodontia e dos Programas de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^dBióloga. Doutora em Ciências Biológicas. Professora associada da disciplina de Fisiologia da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^eBióloga. Pós-Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^fAcadêmicos do curso de Odontologia da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^gBióloga. Pós-Doutora em Biologia Celular. Professora associada da disciplina de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento Humano e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

^hCirurgião-dentista. Doutor em Periodontia. Professor associado da disciplina de Periodontia e dos Programas de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia da Unioeste, *Campus* Cascavel, PR, Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) e dos hormônios sexuais femininos sobre tecidos periodontais de ratas *Wistar* submetidas à periodontite experimental.

Métodos: Trinta e três ratas *Wistar* recém-nascidas foram inicialmente divididas em dois grupos, os quais receberam injeções subcutâneas na região cervical de solução salina hipertônica 1,25/kg/dia (grupo CON) ou injeções de MSG 4g/Kg/dia (grupo OB). Aos 70 dias foi induzida a doença periodontal em metade desses animais originando a partir desse momento 4 grupos: controle (CON), controle com ligadura (CONLIG), obeso (OB), obeso com ligadura (OBLIG). Ao final do período experimental, as ratas foram pesadas e mensurado o comprimento nasoanal e então sofreram decapitação. Coletou-se sangue, as gorduras perigonadais e retroperitoneais foram retiradas e pesadas, removeu-se amostra de tecido gengival e as hemimandíbulas, então o material foi submetido à análise imunológica, histológica e radiográfica. **Resultados:** As análises radiográficas e histológicas demonstraram menor perda óssea alveolar no grupo OBLIG quando comparado ao grupo CONLIG ($p < 0,05$). Na análise do tecido gengival, não foram encontradas diferenças entre os grupos Conlig e Oblig. As concentrações de LH e FSH estavam reduzidas nos grupos OB e OBLIG. **Conclusão:** Os resultados sugerem que a obesidade hipotalâmica pode exercer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar nos casos de periodontites induzidas, porém não exerceu efeito sobre a inflamação gengival. Pode-se afirmar ainda que dentre hormônios sexuais a obesidade pode interferir negativamente nas concentrações plasmáticas de LH e FSH em ratas associadas ou não à periodontite induzida.

Palavras-chave: Obesidade. Periodontite. Hormônios.

¹Address: Avenida Willy Barth, 430, Centro, São Miguel do Iguaçu, Paraná, Brasil, CEP 85877-000.

²Address: Rua Epitácio Pessoa, 213, Parque São Paulo, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85877-000.

³Address: Rua Pernambuco, 593, apto 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil – CEP 85810-020.

⁴Address: Rua Elias Maximiliano, 216, Cidade Nova, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85803-175.

⁵Address: Rua Vitória, 1532, Ap. 401, Neva, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85802-020. ⁶Address: Rua

Rubens Lopes, 479, ap 22, Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85819-170. ⁷Address: Rua

Victor Meireles, 249, Country, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85813-260. ⁸ Address : Rua Pernambuco,

1051, São Cristóvão, Medianeira, Paraná, Brasil, CEP 85844-000. ⁹ Address: Rua Universitária, 2069,

Jardim Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil, CEP 85819-110. ¹⁰Address: *Corresponding author.

Address: Rua Pernambuco, 593, apto 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil –CEP 85810-020. Fax: +55 45 32203169, e-mail address:canassar@yahoo.com

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é um problema mundial de saúde e a sua prevalência aumentou sensivelmente nas últimas décadas (Han et al., 2010). Ela é sinônimo de doença crônica, multifatorial que afeta adultos e crianças, sendo responsável por aumento dos riscos de ocorrência de diferentes desordens sistêmicas, cardiovasculares, diabetes e outras alterações que apresentam risco de vida (Pataro et al., 2012, Ritchie, 2007). A descoberta de que a obesidade por si só resulta em um estado inflamatório nos tecidos metabólicos marcou o início de um campo de pesquisa que examina os mecanismos inflamatórios na obesidade (Gregor & Hotamisligil, 2011). O estudo desses mecanismos pelos quais ela induz as disfunções fisiológicas pode ser facilitado com a utilização de modelo animal em ambiente de pesquisa, sendo o rato um modelo que oferece grande potencial para investigar os mecanismos moleculares e celulares subjacentes ao desenvolvimento da obesidade (Cox & Church, 2011).

Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais conhecida, através da administração subcutânea de MSG, nos primeiros dias após o nascimento, em que ocorre uma degeneração aguda do hipotálamo, destruindo locais específicos incluindo o núcleo arqueado ventromedial, provocando perturbações no controle de mecanismos de absorção e gasto de energia, causando obesidade, parada no crescimento, déficit comportamental e alterações no controle cardiovascular (Fernandes et al., 2012 & Olney, Adamo & Ratner, 1971).

Diversos estudos sugerem que a obesidade pode ser um dos possíveis fatores que influenciam significativamente na severidade e progressão da doença periodontal (Olney, Adamo & Ratner, 2003, Verzeletti, 2012) sendo provável que as citocinas derivadas do tecido adiposo tenham papel-chave nesse processo (Slotwinska & Slotwinski, 2015). O tecido adiposo produz vasta quantidade de citocinas e hormônios chamados coletivamente de adipocinas, que, por sua vez, podem modular a periodontite, afetando negativamente o tratamento da doença e também representarem um mecanismo pelo qual as infecções periodontais podem ter impacto nas doenças sistêmicas (Deschner et al., 2014). Entre as adipocinas que o tecido adiposo secreta estão o TNF – α e a IL-6, com concentrações proporcionais ao IMC. O aumento dessas citocinas pro-inflamatórias pode explicar a relação entre obesidade e doença periodontal (Nascimento et al., 2013).

A doença periodontal é uma doença infecciosa crônica causada predominantemente por bactérias (Slotwinska & Slotwinski, 2015) podendo causar a destruição dos tecidos e estruturas que circundam os dentes se não for tratada. Fato esse que pode resultar em edentulismo, o que representa um grande impacto negativo na qualidade de vida dos indivíduos (Shewale, 2016). Embora a presença de microrganismos seja necessária, não é suficiente para a iniciação da doença. Pelo contrário, é a reação inflamatória desequilibrada e persistente do hospedeiro contra os agentes patogênicos que resulta na destruição dos tecidos periodontais (Lira-Junior & Figueredo, 2016). A gravidade da inflamação varia entre os indivíduos, independentemente do grau de infecção bacteriana, o que sugere que uma desregulação da resposta inflamatória do hospedeiro pode contribuir para a sua existência (Fabbri, 2014). Como as doenças periodontais são moduladas pela resposta imune, elas podem representar um fator de risco para doenças sistêmicas (Carvalho-Filho et al., 2016).

A hemostasia do periodonto envolve uma relação complexa multifatorial, a qual o sistema endócrino representa papel relevante (Mariotti, 1994). Os hormônios sexuais têm sido considerados com importante influência nos tecidos periodontais, taxa de renovação óssea, cicatrização de feridas e progressão da doença periodontal (Mascarenhas et al., 2003). O estrógeno e a progesterona têm ações biológicas significantes que podem afetar outros sistemas incluindo a cavidade oral (Sooriyamoorthy & Gower, 1989, Pack & Thomson, 1980). Receptores desses hormônios foram demonstrados na gengiva, sobre as fibras de periósteo, fibroblastos da lâmina própria, também dispersos em fibroblastos de ligamento periodontal e osteoblastos comprovando a ação direta dos hormônios sexuais sobre os tecidos periodontais (Jafri et al., 2015).

Diversos estudos (Pataro et al., 2012, Al-Zahrani, Bissada & Borawskit, 2003, Verzeletti et al., 2012, Deschner, 2014, Gorman et al., 2012, Perlstein & Bissada, 1977) demonstram a associação da obesidade com o desenvolvimento e progressão das doenças periodontais, bem como da influência das alterações hormonais, porém ainda não existe consenso em relação a esses fatores (Mariotti, 1994, Sooriyamoorthy & Gower, 1989, Jafri et al., 2015, Khosravisamani et al., 2014) Assim, observa-se a importância de estudos adicionais que descrevam as evidências que possam ocorrer em fêmeas portadoras ou não de doença periodontal. Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG) e dos

hormônios sexuais femininos sobre os tecidos periodontais de ratas *Wistar* submetidas à periodontite experimental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Ratas prenhas foram obtidas do biotério central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus Cascavel*, e mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 7h - 19h), com água e alimentação a vontade. Ao nascimento (considerado dia 0), os filhotes foram separados por sexo ficando somente as fêmeas em cada ninhada e os machos foram eutanasiados por decapitação. Posteriormente, esses animais foram desmamados com 21 dias e receberam dieta padrão (Nuvital, Curitiba, Brasil) e água à vontade por todo o período experimental. Foram utilizadas 33 Ratas *Wistar* fêmeas adultas ciclando na fase do proestro do ciclo estral (peso corporal entre 180-350 g), as quais foram mantidas em caixas de criação com grupos de 3-5 animais por caixa (41 cm de comprimento X 34 cm de largura X 17 cm altura); as ratas mães foram mantidas em ambiente com ciclo claro-escuro e temperatura controlados, com livre acesso à água e alimento. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

2.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE

Os animais foram subdivididos em 2 grupos, controle (CON) e obeso (OB), com 15 e 18 ratas respectivamente e então submetidas durante os cinco primeiros dias de vida à injeção intradérmica, na região cervical de 1,25 g/kg de peso corporal de solução salina (CON) ou MSG na dose de 4g/kg (OB).

2.3 INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL

Aos 70 dias de vida os animais dos grupos CON e OB foram subdivididos em dois grupos, então submetidos à anestesia através da administração intramuscular de xilazinha (Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) 0,04mL/100g de peso corporal e quetamina (Francotar, Virbac do Brasil Indand Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) na dose 0,08mL/100g de peso corporal e posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitia a manutenção da abertura bucal das ratas facilitando o acesso aos dentes da região posterior. Com auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, esses animais receberam uma ligadura de fio de algodão número 40 (Coats Corrente Ltda., SP, Brasil) em torno dos primeiros molares inferiores de ambos os lados da mandíbula em uma posição sub marginal para induzir a periodontite experimental. Após esse procedimento, foram originados 4 grupos: CON (8 animais), CONLIG (7 animais), OB (9 animais) e OBLIG (9 animais). Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana (Nassar et al., 2009).

2.4 AVALIAÇÃO DA OBESIDADE

Aos 100 dias de vida, os animais foram pesados e foi obtido o comprimento nasoanal para cálculo do índice de Lee (raiz cúbica do peso corporal (g) / comprimento nasoanal (cm)) (Bernardis & Patterson, 1968). Posteriormente, após o sacrifício por decapitação, as gorduras perigonadal e retroperitoneal foram retiradas e pesadas (AAKER®, Porto Alegre, RS, Brasil).

2.5 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Seguidamente foram coletadas amostras de sangue do tronco cerebral direito, as quais foram centrifugadas a 300xG por 15 minutos e armazenadas em *freezer* – 80°C para realização das análises hormonais. Foram removidas e pesadas as gorduras perigonadal e retroperitoneal. As amostras dos tecidos periodontais da hemimandíbula do lado direito foram retiradas e armazenadas para as análises histológicas. Na hemimandíbula do lado esquerdo, a gengiva que envolvia o dente acometido pela periodontite experimental foi removida e armazenada para análise

imunológica e então a hemimandíbula esquerda foi dissecada para posterior análise radiográfica.

2.6 COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA DOSAGEM DOS HORMÔNIOS

As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 minutos, o plasma foi separado e estocado em *freezer* a -80°C para dosagem das concentrações hormonais.

As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio. A concentração de estradiol foi determinada utilizando-se *kit* específico (Estradiol DSL – 4400, Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). As concentrações plasmáticas de LH, FSH foram determinadas utilizando reagentes obtidos com o National Hormone&PeptideProgram (Harbor – UCLA Medical Center, USA). As doses mínimas detectáveis foram: 0,05ng/mL para LH; 0,2 ng/mL para FSH. O coeficiente de variação intraensaio foi 4% para LH, 3% para FSH. A concentração plasmática de progesterona foi determinada por meio de kits produzidos por MP Biomedicals® e o erro intra e interensaio foi 2,5%.

2.7 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

A hemimandíbula esquerda de cada animal foi retirada e fixada em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas. As radiografias foram obtidas através de um sistema de imagiologia digital (Sensy–A-Ray 3.11) que utiliza sensor eletrônico ao invés de filme de Rx. A distância foco-filme foi fixada em 50 cm e os sensores eletrônicos foram expostos a 70 kV e 8 mA com um tempo de exposição de 0,3 impulsos / s. As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa Image Tools 3.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) e retiradas uma média entre elas através de uma medida linear entre a distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo da rata, com as medições em pixels (Nassar et al., 2014).

2.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA 6

Uma porção do tecido gengival ao redor dos dentes da hemimandíbula do lado esquerdo, submetidos ou não à colocação de ligadura de todos os grupos experimentais, foi removida e utilizada para dosagem por Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Elisa) da citocina IL 6. Para a dosagem, foram utilizadas placas previamente sensibilizadas com anticorpos monoclonais (Biosource, INVITROGEN®, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas com os sobrenadantes do tecido gengival ou com diferentes concentrações da citocina IL-6 recombinantes, nas concentrações indicadas pelo fabricante, durante 2 horas à temperatura ambiente (TA). Seguiram-se 5 lavagens. O anticorpo de detecção conjugado à peroxidase específico da citocina foi adicionado à placa e deixado a TA por mais 1 hora. Após, as placas foram lavadas e a reatividade revelada pela adição da solução de revelação. A reação foi bloqueada após 20 minutos com solução de parada e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas. A concentração da citocina foi calculada utilizando-se a curva de regressão linear, a partir de curva padrão realizada para a respectiva citocina.

2.9 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As hemimandíbulas do lado direito foram coletadas, dissecadas e fixadas em solução de formol a 10%, por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente por 1 hora e imersas em solução de ácido tricloroacético (TCA) 5%. As peças foram mantidas na solução descalcificadora de TCA por 20 dias, sendo avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com troca da solução a cada 5 dias. Após, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% durante aproximadamente 2 horas para neutralizar o TCA; então, as peças foram lavadas em água corrente por 1 hora e acondicionadas no álcool 70% a 4°C. Em seguida, o material seguiu o protocolo para embocamento em parafina, sendo desidratado em série crescente alcóolica, diafanizado em xilol e incluso em parafina (Purified Paraffin, *Vetec Química Fina*, Rio de Janeiro, Brasil). Os cortes foram realizados em micrótomo manual (Olimpus CUT 4055 – Charleston, Carolina do Sul, EUA), com 5 µm de espessura. As lâminas foram montadas e coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) (Junqueira & Junqueira, 1983).

2.10 OBSERVAÇÕES MICROSCÓPICAS

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland) para observações morfológicas do tecido gengival, processo alveolar e contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos das hemimandíbulas dos animais.

2.10.1 Morfometria do osso

Foi realizada a quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 100 vezes. Foram feitas duas observações por campo; então, foi feita a média dos valores para cada animal e para cada grupo. A medida da crista óssea alveolar foi realizada através de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do software LazEz®. Foi realizada uma medida (Image Pro Plus 6.0) da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte. As medidas foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes e então foi feita a média entre os valores.

2.10.2 Morfometria da gengiva

As medidas morfométricas foram feitas nas gengivas marginais vestibular e lingual direita em todos os grupos, utilizando-se um programa analisador de imagens (Image Tool 3.0), acoplado a um microscópio de luz com objetiva de 10x, a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento dos cortes (cerca de 70 µm). As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, como ilustrado na Figura 1. Os resultados foram expressos em µm.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os valores numéricos estão expressos como média \pm desvio padrão. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição de normalidade dos dados e então realizados o teste Anova e, conseqüentemente, o teste Tukey com significância $p < 0,05$ para avaliar a diferença entre os grupos.

3 RESULTADOS

3.1 EFEITO DO MSG NO DESENVOLVIMENTO DA OBESIDADE DE RATAS COM E SEM PERIODONTITE INDUZIDA

A administração de MSG promoveu alterações nos grupos OB e OBLIG, mostrando através do índice de Lee que obteve diferenças significantes em comparação aos grupos CON e CONLIG ($p < 0,05$), essa diferença não foi visualizada quando comparados os grupos obesos entre si ($p > 0,05$). Os animais que receberam tratamento neonatal com MSG apresentaram uma diminuição no peso das ratas ($p < 0,05$). O peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal das ratas tratadas com MSG mostrou diferença significativa em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). (Tabela 1)

3.2 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE LH, FSH, PROGESTERONA E ESTRADIOL

Através da análise estatística, pode-se observar que a concentração de LH apresentou diferença em comparação aos grupos CON e CONLIG com OB e OBLIG. O mesmo fato ocorreu quando avaliada a concentração de FSH, demonstrando que os animais submetidos à indução de obesidade por MSG apresentam menor concentração tanto de LH quanto de FSH quando comparados aos grupos controle ($p < 0,05$). Em relação à progesterona e ao estradiol, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados (Tabela 2).

3.3 ANÁLISE RADIOGRÁFICA DA MÉDIA DA DISTÂNCIA DA JUNÇÃO CEMENTO-ESMALTE ATÉ A CRISTA ÓSSEA ALVEOLAR DO PRIMEIRO MOLAR INFERIOR ESQUERDO

Na análise radiográfica, observou-se perda óssea alveolar aumentada nos animais expostos à periodontite experimental ($p < 0,05$), comprovando a efetividade da indução da periodontite experimental sobre o tecido ósseo alveolar, porém no grupo CONLIG essa perda foi mais acentuada que no grupo OBLIG (Tabela 3).

3.3.1 Quantificação de IL-6 no tecido gengival

A concentração de IL-6 foi avaliada a partir do sobrenadante de tecido gengival de animais de todos os grupos. Os resultados demonstram que a concentração de IL-6 se apresentou maior no grupo CONLIG em comparação aos demais grupos ($p < 0.05$) (Tabela 4).

3.4 ANÁLISES HISTOLÓGICA E MORFOLÓGICA DA HEMIMANDÍBULA DIREITA

3.4.1 Grupo Controle

A morfologia do periodonto do grupo CON que compreende a gengiva, ligamento periodontal, cemento e osso alveolar apresentou aspectos teciduais seguindo o padrão de normalidade (Figura 2-A). Nesse sentido, a gengiva marginal (superfície lisa) e a inserida (superfície pontilhada), que circundam a porção cervical dos dentes e envolvem o processo alveolar, apresentaram a mucosa formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e pelo tecido conjuntivo subjacente. Esse epitélio gengival se apresentou dividido nas zonas: oral, sulcular e juncional. No caso do conjuntivo, foi visualizada a rede de fibras colágenas caracteristicamente eosinófilas e organizadas em feixes, também estavam presentes vasos sanguíneos, nervos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos, plasmócitos, dentre outras células do sistema de defesa, sendo que não foram encontrados aspectos inflamatórios nesse local. Macroscopicamente se observou nos animais desse grupo a gengiva com coloração rosada, bem aderida, cobrindo toda a raiz dos dentes e com ausência de sinais de inflamação.

O ligamento periodontal de tecido conjuntivo frouxo que representa o tecido de ligação entre o dente e o osso alveolar apresentou grande quantidade de fibroblastos e rica vascularização, bem como as fibras de Sharpey incorporadas ao osso alveolar. Já no cemento, de tecido conjuntivo calcificado e que reveste a dentina radicular, verificou-se inserção dos feixes de fibras colágenas periodontais e cementoblastos. Com relação ao osso alveolar que sustenta e protege os dentes, foi visualizada a região do osteoide, identificada parcialmente pela presença dos osteoblastos, organizados externamente e responsáveis pela síntese da matriz óssea. Osteoclastos também estavam presentes nessa região, organizados nas lacunas de Howship.

Ainda na matriz óssea mineralizada, os osteócitos apresentaram-se posicionados nas lacunas (Figura 3-A). Na matriz óssea, foi possível visualizar áreas de osso alveolar, osso esponjoso e compacto. As cristas ósseas estavam com altura em nível do terço cervical da raiz.

3.4.2 Grupo Controle Ligadura

No grupo CONLIG foi possível observar alterações morfológicas no periodonto. No epitélio gengival oral, juncional e sulcular, houve evidente retração tecidual e desorganização de parte das fibras colágenas (Figura 3-B). O ligamento periodontal mostrou-se com diminuição das fibras, células desorganizadas e presença de infiltrado inflamatório. O osso alveolar manteve as características morfológicas do grupo controle, exceto na região da crista óssea que estava com formato irregular com aspecto de reabsorção óssea, além da presença de maior quantidade de osteoclastos.

Ainda, na análise macroscópica da gengiva, foi verificada coloração mais avermelhada, aspecto amolecido com sangramento e presença de áreas com exposição radicular (Figuras 2-B e 3-B).

3.4.3 Grupo Obeso

Após a aplicação de MSG, o grupo OB manteve a regularidade do epitélio gengival oral, juncional e sulcular. Os demais componentes do periodonto: cemento, ligamento periodontal e osso alveolar também apresentaram características de normalidade muito semelhante aos achados do grupo CON. Macroscopicamente, a gengiva mostrou-se de aspecto saudável, com coloração rosada e sem sinais de inflamação (Figuras 2-C e 3-C).

3.4.4 Grupo Obeso Ligadura

No grupo OBLIG, foram observadas irregularidades no epitélio gengival oral, juncional e sulcular, relativas à retração tecidual, porém em menor intensidade do

encontrado no grupo CONLIG. Na avaliação macroscópica, foi verificada coloração avermelhada com menor rigidez tecidual e em alguns animais áreas de exposição radicular. Em relação ao cemento e ligamento periodontal, apresentaram alterações nas fibras colágenas, com aparente diminuição no volume. No osso alveolar, irregularidades foram registradas na crista óssea com perda óssea menos evidente do que foi encontrado no grupo CONLIG (Figuras 2-D e 3-D).

Os números de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos apresentaram diferença estatística sob a administração de MSG, quando comparados os grupos sem ligadura (CON e OB) aos grupos com a ligadura (CONLIG e OBLIG) ($p < 0,05$) e também diferença entre Oblig e Conlig, podendo aventar a hipótese de efeito protetor do MSG sobre o tecido ósseo (Tabela 5).

3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA GENGIVAL DA HEMIMANDÍBULA DIREITA

Estatisticamente, observou-se diferença significativa em todos os parâmetros estudados ao se comparar os grupos com ligadura (CONLIG e OBLIG) aos grupos sem a ligadura (CON e OB). Vale destacar que, entre os grupos que receberam a ligadura, observa-se maior inflamação gengival, porém não existe diferença estatística entre eles. Tal fato sugere que o MSG não exerceu influência na inflamação gengival (Tabela 6).

4 DISCUSSÃO

O MSG é um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central, sua aplicação subcutânea neonatal em ratos resulta em lesões no núcleo arqueado e eminência média do hipotálamo, provocando perturbações nos mecanismos de absorção e gasto de energia, induzindo à obesidade (Fernandes et al., 2012, Olney, Adamo & Ratner, 1971, Brandelero et al., 2012). Neste estudo, a administração de MSG provocou aumento do índice de Lee nos grupos das ratas obesas, bem como maior acúmulo de gordura retroperitoneal e perigonadal nesses animais, como também demonstrado em recente estudo por Gaspar et al (Gaspar et al., 2016) (Tabela 1). Porém, não foi observada diferença entre os grupos OB e OBLIG, fato esse que pode ser justificado devido a esse tratamento predispor a diversas anormalidades endócrinas e comportamentais, como alterações no controle

cardiovascular, disfunção sexual, perturbações do crescimento, obesidade e hipogonadismo (Miranda et al., 2014, Cunha et al., 2010). Na Tabela 1, também é demonstrado o peso final dos animais; as ratas tratadas com MSG apresentaram peso menor quando comparadas às ratas do grupo controle. Essa diferença pode ser atribuída em razão do efeito colateral da aplicação de MSG, pois dentre as alterações endócrinas descritas encontra-se a alteração da secreção do hormônio de crescimento (Miranda et al., 2014, Maiter et al., 1991).

Visto que a administração neonatal de MSG em ratos produz lesões graves em certos núcleos hipotalâmicos, com repercussões em diferentes eixos neuroendócrinos (Camihort et al., 2005), é possível sugerir que os resultados das concentrações hormonais encontrados neste estudo (Tabela 2) estejam baseados nesse fator. Foi demonstrado que tanto as concentrações de LH quanto de FSH apresentaram valores alterados nos grupos que foram submetidos à indução da obesidade. Estudo realizado por Donham et al. (1990) em fêmeas hamsters demonstrou que a aplicação de MSG não alterou a secreção diária de LH e FSH, porém os animais adultos tornaram-se inférteis. Lamperti e Baldwin (1982) demonstraram queda basal de FSH, bem como no LHRH (hormônio liberador do LH) nos animais tratados com MSG. Os desequilíbrios endócrinos sistêmicos produzem importante impacto na homeostasia periodontal. Os níveis de hormônios sexuais femininos circulantes alteram a resposta do hospedeiro frente à placa bacteriana e cicatrização da ferida periodontal, além de terem importante papel no crescimento ósseo e no pico de massa óssea (Khosravisamani, 2014 & Compston, 2001) A redução das concentrações plasmáticas de LH e FSH observadas podem hipoteticamente estar influenciando negativamente o tecido periodontal das ratas submetidas à periodontite experimental, embora não se observaram alterações nas concentrações de progesterona e estradiol (Nemeroff et al., 1981).

Ao analisar o tecido ósseo, observa-se neste estudo perda óssea alveolar acentuada nos grupos com periodontite induzida, sendo essa diferença mais significativa no grupo CONLIG (tabelas 3 e 5). A maioria dos estudos que relacionam a perda óssea periodontal com obesidade apresenta resultados positivos nessa associação, sugerindo que a obesidade pode contribuir para a severidade da doença (Al-Zahrani, Bissada & Borawskit, 2003, Verzeletti, 2012, Saito et al., 2001, Gorman et al., 2012). Porém, existem diversos modelos experimentais que são utilizados para indução de obesidade, situação essa que pode resultar em diferentes respostas.

Como o início e a progressão da doença periodontal podem ser modificados por fatores de risco de ordem biológica, ambiental, comportamental e que citocinas derivadas do tecido adiposo podem desempenhar um papel modulador em processos inflamatórios (Suresh & Mahendra, 2014), surge a hipótese que a inflamação sistêmica presente nos obesos pode afetar a suscetibilidade a doenças infecciosas crônicas, como a periodontite. Esse fato foi comprovado primeiramente em 1977, por Perlstein e Bissada (1977) e posteriormente por Nascimento et al. (2013); Cavagni et al. (2013); Verzeletti et al (2012); que realizaram estudos em ratos utilizando a dieta de cafeteria para indução da obesidade e demonstraram diferença entre os grupos estudados com maior ocorrência de periodontite nos ratos obesos.

Embora a obesidade seja considerada fator de risco para saúde, existem evidências na literatura sobre a ação protetora da obesidade sobre o tecido ósseo (Felson et al., 1993 & Colaianni et al., 2014, Evans et al., 2015) demonstrando uma correlação positiva do aumento do índice de massa corporal com o aumento da densidade mineral óssea, considerando a carga mecânica exercida pelo sobrepeso como um efeito positivo para a formação óssea (Colaianni et al., 2014, Lecka-Czernik et al., 2015 & Maggio et al., 2014). Apesar desse mecanismo ainda não estar bem estabelecido, uma hipótese seria que esse aumento da carga mecânica promoveria alguns estímulos sobre o esqueleto, como a redução da apoptose, aumento da diferenciação de osteoblastos e estímulo da matriz óssea (Ehrlich & Lanyon, 2002). Outro efeito protetor da obesidade sobre o tecido ósseo pode ser explicado pela insulina, uma vez que os osteoblastos possuem receptor para insulina, os quais estimulam a diferenciação osteogênica, inibindo a osteoclastogênese (Ehrlich & Lanyon, 2002, Yano, Ohya & Amagasa, 1994) e demonstrando a existência de uma correlação positiva entre a concentração plasmática de insulina e a densidade mineral óssea (Zhao et al., 2008). A ação benéfica da obesidade frente à reabsorção óssea também foi comprovada por Brandelero et al. (2012), que, assim como em nosso experimento, utilizou o modelo de obesidade hipotalâmica e observou um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar em ratos.

Dentre as moléculas biologicamente ativas secretadas pelo tecido adiposo, destacam-se a leptina e adiponectina por serem as mais abundantes. Os níveis de leptina têm correlação positiva com a quantidade de tecido adiposo e, portanto, estão aumentados na obesidade (Abooshahab et al., 2016 & Uddin et al., 2010) Existem relatos apontando a leptina como sendo capaz de estimular a diferenciação de células

da medula óssea em osteoblastos, levando a um aumento na mineralização da matriz extracelular (Prouteau, Benhamou & Courteix, 2006). Turner et al. (2013) demonstraram em camundongos que a taxa de formação óssea aumentou substancialmente nos animais após a aplicação subcutânea de leptina, indicando que ela atua principalmente em vias periféricas aumentando a atividade e o número de osteoblastos.

Ao analisar a contagem celular (Tabela 5), é sabido que em condições normais os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo (Katayama, 2016) (Figura 3), sendo que a maturidade óssea pode ser verificada por uma maior quantidade dessa célula (Kurikchy et al., 2013). A formação e a reabsorção óssea encontram-se em equilíbrio na normalidade fisiológica de forma que a atividade dos osteoclastos é seguida imediatamente pela atividade dos osteoblastos (Silva & Branco, 2011). Verificamos em nosso estudo que a quantidade de osteócitos e osteoblastos apresentou-se menor no grupo CONLIG quando comparada aos demais grupos e, contrariamente, o número de osteoclastos apresentou-se mais elevado nesse mesmo grupo, sugerindo a ocorrência de reabsorção óssea, visto que os osteoclastos desempenham um papel central na destruição óssea (Kagiva, 2016). Assim, é possível afirmar que os animais desse grupo foram alvo de maior destruição óssea em comparação aos demais grupos estudados.

Avaliando a análise histométrica do tecido gengival, observou-se em nosso estudo o aumento da inflamação periodontal nos grupos que foram submetidos à colocação de ligadura (CONLIG e OBLIG) conforme já demonstrado previamente (Verzeletti et al., 2012, Nascimento et al., 2013, Nassar et al., 2013, Nassar et al., 2014 & Brandelero et al., 2012) (Tabela 6). Entretanto, esse procedimento resulta em danos nos tecidos e estruturas periodontais, induzindo assim a periodontite experimental (Nascimento et al., 2013). É possível verificar também que a obesidade induzida por MSG não provocou alterações nos tecidos moles, pois os grupos que foram submetidos à periodontite experimental apresentaram resultados estatisticamente iguais independente da condição de obesidade. Já em estudo feito por Mizutani et al. (2014) com amostras gengivais de ratos Zucker obesos e magros, demonstrou-se que a obesidade associada à resistência à insulina pode levar à disfunção endotelial e inflamação gengival. Quando essa relação foi estudada em jovens de idade escolar, não se encontrou relação da gengivite com a obesidade (Nascimento et al., 2013), assim como em nosso estudo.

5 CONCLUSÃO

Dentro dos limites da experimentação animal, os resultados deste estudo sugerem que a obesidade hipotalâmica pode exercer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar quando associada à periodontite experimental em fêmeas. Além disso, ela pode interferir negativamente nas concentrações plasmáticas dos hormônios sexuais femininos LH e FSH. No entanto, são necessárias pesquisas adicionais que tragam mais informações para auxílio no esclarecimento dos mecanismos pelos quais a obesidade pode influenciar a periodontite e a concentração desses hormônios.

6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Capes, Fundação Araucária e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) pelo suporte financeiro. Agradecemos, também, aos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e de Biologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) pelo apoio estrutural.

REFERÊNCIAS

Abooshahab R., Yaghmaei P., Ghadaksaz H.G. et al. (2016). Hedayati M. Lack of Association between Serum Adiponectin/Leptin Levels and Medullary Thyroid Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 17, 8, 3861-3864.

Al-Zahrani M.S., Bissada N.F. & Borawskit E.A. (2003). Obesity and periodontal disease in young, middle aged and older adults. *J Periodontol*, 74, 5, 610-615.

Bernardis L.L., Patterson B.D. (1968). Correlation between “lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*, 40, 4, 527-528.

Brandelero J.S., Bonfleur M.L., Ribeiro L.A., Vanzela E.C., Nassar C.A., Nassar P.O. et al. (2012). Decreased tnf- α gene expression in periodontal ligature in msg obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Arch Oral Biol*, 57, 3, 300-306.

Camihort G., Gómez Dumm C., Luna G., Ferese C., Jurado S., Moreno G. et al. (2005). Relationship between pituitary and adipose tissue after hypothalamic

denervation in the female rat. A morphometric immunohistochemical study. *Cells Tissues Organs*, 179, 4, 192-201.

Carvalho-Filho P.C., Gomes-Filho I.S., Meyer R., Olczak T., Xavier M.T. & Trindade S.C. (2016). Role of *Porphyromonas gingivalis* HmuY in Immunopathogenesis of Chronic Periodontitis. *Mediators Inflamm*, 7465-7852.

Cavagni J., Wagner T.P., Gaio E.J., Cito R.O., Rego C., Torres I.L.S. et al. (2013). Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Arch Oral Biol*, 58, 8, 1034-1039.

Colaiani G., Brunetti G., Faienza M.F., Colucci S. & Grano M. (2014). Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. *World J Orthop*, 5, 3, 242-246.

Compston J.E. (2001). Sex steroids and bone. *Phys Rev*, 81, 1, 419-447.
Cox R.D. & Church C.D. (2011). Mouse models and the interpretation of human GWAS in type 2 diabetes and obesity. *Dis Model Mech*, 4, (2), 155-164.

Cunha N.V., Abreu A.S., Panis C., Grassioli S., Guarnier F.A., Cecchini R., Mazzuco, T.L. et al. (2010). Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sciences*, 87, 375-381.

Dalla Vecchia C.F., Susin Z., Rosing C.K., Oppermann R.V. & Albandar J.M. (2005). Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol*, 76, 10, 1721-1728.

Deschner J., Eick S., Damanaki A. & Nokhbehshaim M. (2014). The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Mol Oral Microbiol*, 29, 6, 258-269.

Donham R.S., Ogilvie K.M., Kerner T.M. & Stetson M.H. (1990). Daily rhythms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone persist in female hamsters sterilized by neonatal administration of monosodium glutamate. *Biol Reprod*, 3, 3, 392-396.

Ehrlich P.J. & Lanyon L.E. (2002). Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int*, 13, 9, 688-700.

Evans A.L., Paggiosi M.A., Eastell R. & Walsh J.S. (2015). Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res*, 30, 5, 920-928.

Fabbri C., Fuller R., Bonfa E., Guedes L.K. D'Alleva P.S. & Borba E.F. (2014). Periodontitis treatment improves systemic lupus erythematosus response to immunosuppressive therapy. *Clin Rheumatol*, 33, 4, 505-509.

Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T. & Anderson J.J. (1993). Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J Bone and Min Res*, 8, 5, 567-573.

- Fernandes S.A.G., Arena A.C., Campos, K.E., Volpato G.T., Anselmo-Franci J.A., Damasceno D.C. et al. (2012). Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol*, 10, 105.
- Gaspar R.S., Benevides R.O., Fontelles J.L., Vale C.C., França L.M., Barros P. de T. et al. (2016), Reproductive alterations in hyperinsulinemic but normoandrogenic MSG obese female rats. *J Endocrinol* , 229, 2, 61-72.
- Gorman A., Kaye E.K., Apovian C., Fung T.T., Nunn M. & Garcia R. I. (2012). Overweight and obesity predict time to periodontal disease progression in men. *J Clin Periodontol*, 39, 2, 107-114.
- Gregor M.F & Hotamisligil G.S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*, 29, 415-45.
- Han D.H., Lim S.Y., Sun B.C., Paek D.M. & Kim H.D. (2010). Visceral fat area-defined obesity and periodontitis among Koreans. *J Clin Periodontol* , 37, (2), 172-179.
- Jafri Z., Bhardwai A., Sawai M. & Sultan N. (2015). Influence of female sex hormones on periodontium: A case series. *J Nat Sci Biol Med*, 6, 1, S146-149.
- Junqueira L.C.U. & Junqueira L.M.M.S. (1983). *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos.
- Kagiva T. (2016). MicroRNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets for Alveolar Bone Loss in Periodontal Disease. *Int J Mol Sci*, 17, 8, 1317.
- Katayama Y. (2016). *Osteocytes and osteonetwork*. *Clin Calcium*, 26, 8, 1111-1118.
- Khosravisamani M., Maliji G., Seyfi S., Azadmehr A., Abd Nikfarjam B., Madadi S. et al. (2014). Effect of the menstrual cycle on inflammatory cytokines in the periodontium. *J Periodontal Res.*, 49, 6, 770-776.
- Kurikchy M.Q., Al-Rawi N.H., Ayoub R.S. & Mohammed S.S. (2013). Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). *Clin Oral Invest*, 17, 3, 897-904.
- Lamperti A.A. & Baldwin D.M. (1982). Pituitary Responsiveness to LHRH Stimulation in Hamsters Treated Neonatally with Monosodium Glutamate. *Neuroendocrinol*, 34, 3, 169-174.
- Lecka-Czernik B., Stechschulte L.A., Czernik P.J. & Dowling A.R. (2015). High bone mass in adult mice with diet-induced obesity results from a combination of initial increase in bone mass followed by attenuation in bone formation; implications for high bone mass and decreased bone quality in obesity. *Mol Cell Endocrinol.*, 410, 35.

Lira-Junior R. & Figueredo C.M. (2016). Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? *World J Gastroenterol*, 22, 35, 7963-7972.

Maggio A.B., Belli D.C., Puigdefabregas J.W., Rizzoli R., Farpour-Lambert N.J., Beghetti M. et al. (2014). High bone density in adolescents with obesity is related to fat mass and serum leptin concentrations. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 58, 6, 723-728.

Maiter D., Underwood L.E., Martin J.B. & Koenig J.I. (1991). Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, 128, 2, 1100-1116.

Mariotti A. (1994). Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 5, 1, 27-53.

Mascarenhas P., Gapski R., Al-Shammari K. & Wang H.L. (2003). Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol*, 30, 8, 71-81.

Miranda R.A., Agostinho A.R., Trevenzoli I.H., Barella L.F., Franco C.C., Trombini A.B. et al. (2014). Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem*, 33, (4), 1075-1086.

Mizutani K., Park K., Mima A., Katagiri S. & King G.L. (2014). Obesity-associated Gingival Vascular Inflammation and Insulin Resistance. *J Dent Res*, 93, 6, 596-601.

Nascimento C.M., Cassol T., Silva F.S., Bonfleur M.L., Nassar C.A. & Nassar P.O. (2013). Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes, Metab Syndr Obes*, 6, 365-370.

Nascimento G.G., Seerig L.M., Vargas-Ferreira F., Correa F.O., Leite F.R. & Demarco F.F. (2013). Are obesity and overweight associated with gingivitis occurrence in Brazilian school children? *J Clin Periodontol*, 40, 12, 1072-1078.

Nassar C.A., Battistetti G.D., Nahsan F.P., Olegário J., Marconato J. & Marin C.F. et al. (2014). Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis-an animal study. *J Int Acad Periodontol*, 6, 1, 2-7.

Nassar P.O., Nassar C.A., Guimarães M.R., Aquino S.G., Andia D.C., Muscara M.N. et al. (2009). Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *J Perio Res*, 44, 4, 479-478.

Nemeroff C.B., Lamartiniere C.A., Mason G.A., Squibb R.E., Hong J.S. & Bondy S.C. (1981). Marked reduction in gonadal steroid hormone levels in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate: further evidence for disruption of hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. *Neuroendocrinol*, 33, 5, 265-267.

Olney J.W., Adamo N.J. & Ratner A. (1971). Monosodium glutamate effects. *Science*, 172, 294.

Pack A.R.C., Thomson M.E. (1980). Effects of topical and systemic folic acid supplementation on gingivitis in pregnancy. *J Clin Periodontol*, 7, 5, 402-414.

Pataro A. L., Costa F.O., Cortelli S.C., Cortelli J.R., Abreu M.H.N.G. & Costa J.E. (2012). Association between severity of body mass index and periodontal condition in women. *Clin Oral Invest*, 16, (3), 727-34.

Perlstein M.I & Bissada N.F. (1977). Influence of obesity and hypertension on severity of periodontitis in rats. *Oral Surg*, 43, 5, 707-719.

Pischon N., Heng N., Bernimoulin J.P., Kleber B.M., Willich S.N. & Pischon T. (2007). Obesity, inflammation and periodontal disease. *J Dent Res*, 86, 5, 400-409.

Prouteau S., Benhamou L. & Courteix D. (2006). Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight reduction and weight regain in male and female judoists. *Eur J Endocrinol*, 154, 3, 389-395.

Reid, I.R. (2008). Relationship between fat and bone. *Osteoporos Int*, 19, 5, 595-606.

Ritchie C.S. (2007). Obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 44, 154-163.

Saito T. & Shimazaki Y. (2007). Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol 2000*, 43, 254-266.

Saito T., Shimazaki Y., Kogal T., Suzuki M. & Ohshima A. (2001). Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Clin Res*, 80, 7, 1631- 1636.

Shewale A.H., Gattani D.R., Bhatia N., Mahajan R. & Saravanan S.P. (2016). Prevalence of Periodontal Disease in the General Population of India-A Systematic Review. *J Clin Diagn Res*, 10 (6), ZE04–ZE09.

Silva I. & Branco J.C. (2011). RANK/RANKL/OPG: Literature Review. *Acta Reumatológica Portuguesa*, 36, 3, 209-218.

Slotwinska S.M. & Slotwinski R. (2015). Host response, obesity, and oral health. *Centr Eur J Immunol*, 40, 2, 201-205.

Sooriyamoorthy M. & Gower D.B. (1989). Hormonal influences on gingival tissue: relationship to periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 16, 4, 201-208.

Suresh S. & Mahendra J. (2014). Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. *J Clin Diagn Res.*, 8, 4, ZE01–ZE03.

Turner R.T., Kalra S.P., Wong C.P., Philbrick M.S., Lindenmaier L.B., Boghossian S. et al. (2013). Peripheral Leptin Regulates Bone Formation. *J Bone Miner Res*, 28, 1, 22-34.

Uddin S., Bu R., Ahmed M., Hussain A.R., Ajarim D., Al-Dayel F. et al. (2010). Leptin receptor expression and its association with PI3K/AKT signaling pathway in diffuselarge B-cellymphoma. *Leuk Lymphoma*, 51, 7, 1305-1314.

Verzeletti G.N., Gaio E.J., Linhares D.S. & Rosing C.K. (2012). Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci*, 20, 2, 218-221.

Yano H., Ohya K. & Amagasa T. (1994). Effects of Insulin Parietal Bone on In Vitro Bone Formation in Fetal Rat. *Endoc J*, 41, 3, 293-300.

Zhao L.J., Jiang H., Papasian C.J., Maulik D., Drees B., Hamilton J. et al. (2008). Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 23, 1,17-29.

FIGURAS

Figura 1 – Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo. C: altura do epitélio da crista gengiva, E: Largura do epitélio bucal, H: altura do tecido conjuntivo na região média, L: largura do tecido conjuntivo na região basal

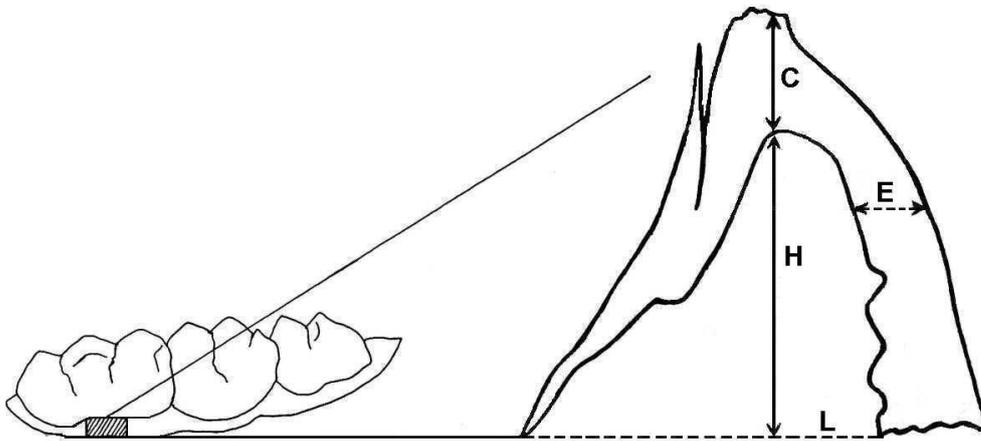


Figura 2 – Fotomicrografias de dente de rata corte longitudinal, coloração hematoxilina e eosina. Grupo controle (A), controle ligadura (B), obeso (C), obeso ligadura (D). Cimento, CE; crista óssea alveolar, COA; epitélio juncional, EJ; epitélio sulcular, ES; ligamento periodontal, LP; osso alveolar, AO

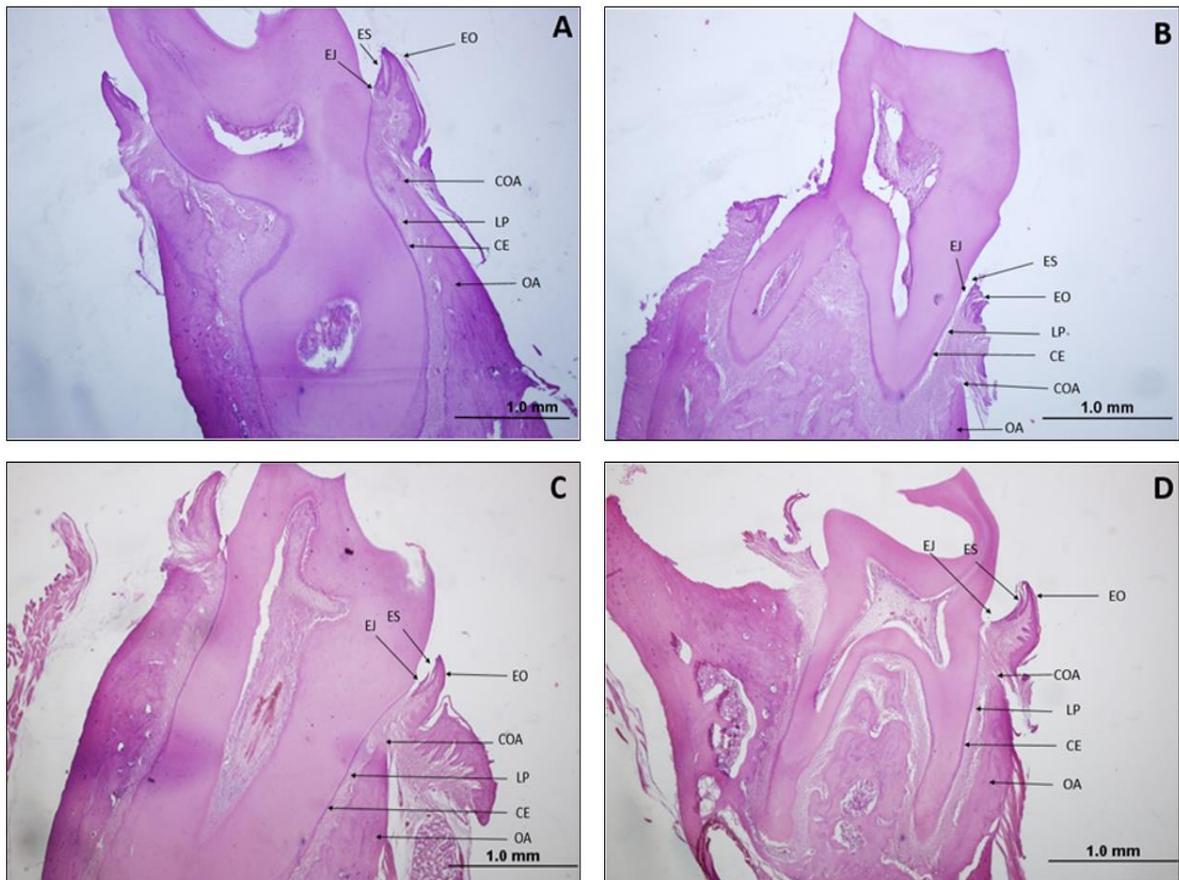
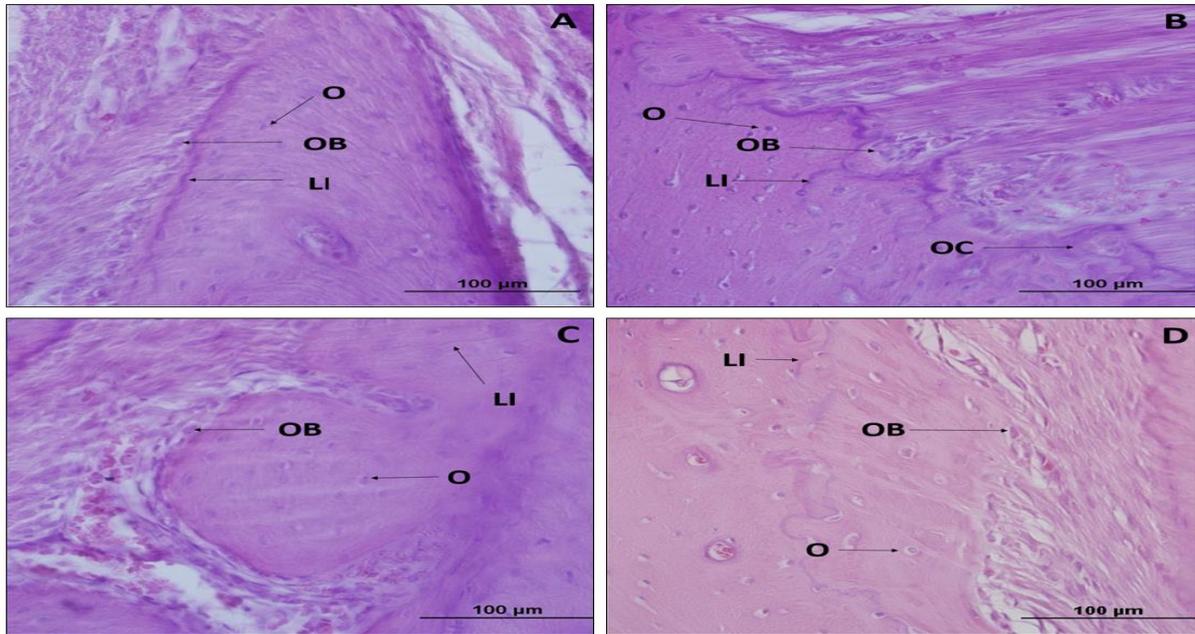


Figura 3 – Fotomicrografias representativas dos animais corte longitudinal, coloração hematoxilina e eosina. Grupo controle (A), controle ligadura (B), obeso (C), obeso ligadura (D). Osteócito, O; osteoblasto, OB; osteoclasto, OC; linhas incrementais, LI



TABELAS

Tabela 1 – Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre parâmetros corporais em ratas CON, CONLIG, OB e OBLIG. Os valores representam média \pm desvio padrão

	CON	CONLIG	OB	OBLIG
Índice de Lee (g/cm)	0.333 \pm 0.008A	0.329 \pm 0.012A	0.347 \pm 0.013B	0.356 \pm 0.006B
Peso final dos animais (g)	226.50 \pm 16.44A	214.42 \pm 18.90A	179.00 \pm 17.72B	189.22 \pm 9.02B
Gordura Retroperitoneal (mg)	1671.14 \pm 536.12A	1237.00 \pm 157.15A	2813.44 \pm 944.14B	3084.77 \pm 895.04B
Gordura Perigonadal(mg)	3260.00 \pm 1228.97A	2544.14 \pm 220.21A	5983.44 \pm 1356.30B	6259.11 \pm 1568.40B

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes dentro do mesmo parâmetro com $p < 0.05$.

Tabela 2 – Concentração de LH, FSH, Progesterona e Estradiol das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão

	CON	CONLIG	OB	OBLIG
LH (ng/mL)	0.31 \pm 0.04A	0.32 \pm 0.08A	0.26 \pm 0.05B	0.21 \pm 0.06B
FSH(ng/mL)	1.28 \pm 0.11A	1.10 \pm 0.22A	0.82 \pm 0.06B	0.86 \pm 0.02B
Progesterona (ng/mL)	56.55 \pm 22.98A	68.46 \pm 23.79A	51.48 \pm 33.02A	41.48 \pm 28.25A
Estradiol (pg/mL)	170.67 \pm 84.06A	155.62 \pm 49.02A	181.63 \pm 86.44A	186.07 \pm 121.70A

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes dentro do mesmo parâmetro com $p < 0.05$

Tabela 3 – Média da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo das ratas de todos os grupos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels

Grupos	Médias
CON	14.33 \pm 1.08 A
CONLIG	20.14 \pm 1.45 B
OB	15.18 \pm 1.19 A
OBLIG	18.12 \pm 1.82 C

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes com $p < 0.05$.

Tabela 4 – Concentração de IL-6 nas amostras gengivais das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/mL

Grupos	Médias
CON	0.39 \pm 0.09A
CONLIG	0.73 \pm 0.09B
OB	0.32 \pm 0.06A
OBLIG	0.65 \pm 0.02C

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes com $p < 0.05$.

Tabela 5 – Análise histológica da hemimandíbula direita das ratas dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos unidades

	Osteoblasto	Osteócito	Osteoclasto
CON	27.25 \pm 1.52A	66.12 \pm 2.54A	0.15 \pm 0.01A
CONLIG	23.41 \pm 0.38B	56.56 \pm 1.21B	0.25 \pm 0.02B
OB	26.60 \pm 0.38A	64.04 \pm 1.62A	0.14 \pm 0.02A
OBLIG	24.70 \pm 1.19C	58.89 \pm 1.22C	0.2 \pm 0.02C

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos, dentro do mesmo parâmetro.

Tabela 6 – Análise histomorfométrica gengival da hemimandíbula direita das ratas dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels

	C	E	H	L
CON	33.35 \pm 5.56 A	33.92 \pm 1.09A	79.95 \pm 12.60 A	66.61 \pm 16.99 A
CONLIG	43.37 \pm 5.97 B	37.96 \pm 3.99B	162.92 \pm 25.84B	105.60 \pm 27.00B
OB	26.09 \pm 9.78 A	29.50 \pm 3.87C	75.18 \pm 39.79 ^a	50.99 \pm 13.94A
OBLIG	40.02 \pm 5.88 B	35.18 \pm 1.16B	143.65 \pm 24.99B	93.27 \pm 16.10B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre os grupos, dentro do mesmo parâmetro.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Avaliação da influência dos hormônios sexuais na doença periodontal de ratas com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidas à periodontite experimental", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 14/08/2015

Profa. Dr.ª. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE

ANEXO B – Normas da Revista Científica

GUIDE FOR AUTHORS

Editors-in-Chief:

Dr G R Holland, Ann Arbor, MI, USA

Professor G B Proctor, London, UK

Archives of Oral Biology is an international journal which aims to publish papers of the highest scientific quality reporting new knowledge from the orofacial region including:

- developmental biology
- cell and molecular biology
- molecular genetics
- immunology
- pathogenesis
- microbiology
- biology of dental caries and periodontal disease
- forensic dentistry
- neuroscience
- comparative anatomy
- paeleodontology

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a disease process. These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. All submissions will be refereed.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio 5

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Contributors

If there are four or more authors, then each is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that "All authors have read and approved the final article" should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation

of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio 6

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors. Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards. For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio 7
Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you

embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archorabio 8

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition: ADP, AMP, ATP, DEAEcellulose, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris. Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles.

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio 9

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the

title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system. When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the *Int J Syst Bacteriol* since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see

Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. 'salmonellae'; plurals may be anglicized e.g. 'salmonellas'. For trivial names, use lower case Roman e.g. 'meningococcus'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.

- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio
 10 If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/archives-of-oral-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

AUTHOR INFORMATION PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archoralbio
11

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S.

Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing

Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> Accessed 13.03.03.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type

your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required
 - Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
 - Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
 - Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
 - Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- AUTHOR INFORMATION
PACK 14 Aug 2016 www.elsevier.com/locate/archorabio 12
- N values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply $n=50$ when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
 - Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.

AUTHOR INQUIRIES

Track your submitted article

Track your accepted article

You are also welcome to contact the Elsevier Support Center.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>