

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

LAIS FERNANDA PASQUALOTTO

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com  
obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos à periodontite  
experimental

CASCAVEL-PR

Março/2019

LAIS FERNANDA PASQUALOTTO

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos à periodontite experimental

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação em Biociências e Saúde – 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

Orientadora: Patrícia Oehlmeyer Nassar

CASCADEL-PR

Março/2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pasqualotto, Laís Fernanda

Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos a periodontite experimental / Laís Fernanda Pasqualotto; orientador(a), Patrícia Oehlmeyer Nassar, 2019.

118 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2019.

1. Resveratrol. 2. Doença Periodontal. 3. Obesidade. I. Nassar, Patrícia Oehlmeyer . II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAÍS FERNANDA PASQUALOTTO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO RESVERATROL SOBRE OS TECIDOS  
PERIODONTAIS DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELO  
GLUTAMATO MONOSSÓDICO E SUBMETIDOS À PERIODONTITE  
EXPERIMENTAL**

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

---

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Oehlmeyer Nassar  
UNIOESTE – *Campus Cascavel*

---

Prof. Dr. João Paulo de Arruda Amorim  
UNIOESTE – *Campus Cascavel*

---

Prof. Dra. Morgana Guimarães Rodrigues Stabili  
UNESP - Araraquara

CASCADEL – PR

Março/2019

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e aos meus pais Adriano e Mariza, por me permitirem chegar até aqui.

Ao Gabriel Lemos Demartini, que esteve ao meu lado em todos os minutos me auxiliando e sendo um alicerce sem medir esforços.

A professora Patrícia Oehlmeyer Nassar por ter aceitado ser orientadora, pela paciência e confiança em acreditar no meu trabalho.

Ao professor Carlos Augusto Nassar por toda sua contribuição e paciência desde a graduação nos meus projetos.

A professora Celia Cristina Leme Beu, por sua instantânea disponibilidade em clarear as dúvidas na coleta das aortas.

Ao professor João Paulo de Arruda Amorim, por toda colaboração e disposição para qualificação e também para a defesa do trabalho.

A todos os integrantes do Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional e ao Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo pela oportunidade de desenvolver a pesquisa e receptividade nos experimentos.

A todo o corpo docente do Mestrado de Biociências e Saúde que de alguma forma contribuíram pra finalização do trabalho.

A Jordana e ao Pedro que estiveram independente do dia e horário, disponíveis para qualquer auxílio.

As pessoas especiais que pude conhecer durante o projeto, Bárbara, Ana Caroline e Matheus que estiveram sempre de prontidão pra me auxiliar em tudo dentro do laboratório, desde o primeiro até o último dia do mestrado, me socorrendo em todos os experimentos e testes e permitindo conhecer e admirar cada um de vocês.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente permitiram a realização deste trabalho, muito obrigada!

## RESUMO

PASQUALOTTO, L. F. Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos à periodontite experimental. 118. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Cascavel, Unioeste, 2019.

Diversas pesquisas científicas vêm sugerindo que a obesidade contribui efetivamente com a severidade da doença periodontal. Por outro lado, o resveratrol, um polifenol bem conhecido por seus benefícios à saúde, pode prevenir a obesidade e interferir positivamente com osteoblastogênese e promover efeitos imunomoduladores na resposta do hospedeiro na presença de doença periodontal. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar o aspecto dos tecidos periodontais, sob os efeitos da administração do resveratrol por meio de análises morfológicas e radiográficas em ratos com obesidade e periodontite induzida experimentalmente. Foram utilizados 48 ratos. Durante os cinco primeiros dias de vida, metade dos animais recebeu injeções de glutamato monossódico na dose de 4g/kg peso corporal, formando o grupo Obesidade, a outra metade dos animais recebeu injeções de solução salina 0,9% na dose 1,25g/kg, durante o mesmo período formando o grupo Controle. Aos 21 dias de idade foi realizado o desmame. Aos 75 dias de idade, metade dos animais de cada grupo (n=12) foi submetido à indução da periodontite experimental, formando os grupos ligadura. Após este procedimento foram originados 8 grupos(n=6): 1) Grupo Controle (CON), 2) Grupo Obesidade (OBS), 3) Grupo Resveratrol (RSV), 4) Grupo Ligadura (LIG), 5) Grupo Ligadura-Obesidade (LIG-OBS), 6) Grupo Ligadura-Resveratrol (LIG-RSV), 7) Grupo Obesidade-Resveratrol (OBS-RSV), 8) Grupo Ligadura-Obesidade-Resveratrol (LIG-OBS-RSV). Os animais pertencentes aos grupos Resveratrol, receberam uma dose de 10 mg/kg de peso corporal do polifenol, via oral, durante 4 semanas, tendo início aos 78 dias de vida. Após os 105 dias de período experimental, a obesidade foi avaliada e posteriormente foi realizada a eutanásia, onde foi coletado sangue e as concentrações de triglicerídeos e colesterol total foram determinadas. Também foram coletadas as hemimandíbulas para análise histológica e radiográfica, amostras de tecido gengival para realização de análise imunológica e análise histológica da artéria aorta abdominal, buscando avaliar os efeitos induzidos pela obesidade e pelo resveratrol. A obesidade foi confirmada pelo índice de Lee e pelas gorduras retroperitoneal e perigonadal ( $p < 0,05$ ). Na análise do tecido ósseo, constatou-se uma perda óssea alveolar mais acentuada nos animais do grupo LIG, com diminuição da perda óssea nos grupos LIGRSV e LIGOBS. No tecido gengival, todos os animais que foram submetidos à periodontite experimental apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparado aos animais que não receberam a ligadura. Os animais obesos também apresentaram concentração de triglicerídeos e colesterol maiores que os demais animais, e os que receberam a dieta com resveratrol tiveram redução nesses padrões. Na análise morfométrica da aorta abdominal, a espessura das

artérias mostrou-se estatisticamente diferente em todos os grupos, sendo o grupo LIGOBS a maior espessura ( $p < 0,05$ ), contudo, no que diz respeito à área das artérias, o grupo CON apresentou a maior área e os grupos LIG e LIGOBS a menor área. Assim sendo, é possível sugerir que o modelo de obesidade e o resveratrol, atuem com efeito protetor da perda óssea alveolar induzida pela ligadura. Também, pode-se observar que a associação entre a obesidade e a periodontite pode colaborar com o aumento da espessura da aorta abdominal.

**Palavras-Chaves:** Doença periodontal. Obesidade. Resveratrol.

## ABSTRACT

PASQUALOTTO, L. F. Evaluation of the effect of resveratrol on periodontic tissues of obesity-induced rats by monosodic glutamate and submitted to experimental periodontitis. 118. Dissertation. Postgraduate Program in Biosciences and Health, Center for Biological and Health Sciences, Cascavel Campus, Unioeste, 2019.

Several scientific studies have suggested that obesity contributes effectively to the severity of periodontal disease. On the other hand, resveratrol, a polyphenol well known for its health benefits, can prevent obesity and interfere positively with osteoblastogenesis and promote immunomodulatory effects on host response in the presence of periodontal disease. Thus, the objective of this study was to evaluate the appearance of periodontal tissues under the effects of administration of resveratrol by means of morphological and radiographic analyzes in rats with obesity and experimentally induced periodontitis. 48 rats were used. During the first five days of life, half of the animals received injections of monosodium glutamate at 4 g / kg body weight, forming the Obesity group, the other half of the animals received 0.9% saline injections at 1.25 g / kg, during the same period forming the Control group. At 21 days of age weaning was performed. At 75 days of age, half of the animals in each group (n = 12) were submitted to induction of experimental periodontitis, forming the ligation groups. After this procedure, 8 groups (n = 6) were generated: 1) Control Group (CON), 2) Obesity Group (OBS), 3) Resveratrol Group (RSV), 4) Ligature-Obesity Group (LIG-OBS), 6) Ligation-Resveratrol Group (LIG-RSV), 7) Obesity-Resveratrol Group (OBS-RSV), 8) Ligature-Obesity-Resveratrol Group. The animals belonging to the Resveratrol groups received a dose of 10 mg / kg body weight of the polyphenol orally for 4 weeks starting at 78 days of age. After the 105 days of the experimental period, obesity was evaluated and euthanasia was performed, where blood was collected and triglyceride and total cholesterol concentrations were determined. Hemimandibula were also collected for histological and radiographic analysis, gingival tissue samples for immunological analysis and histological analysis of the abdominal aorta artery, in order to evaluate the effects induced by obesity and resveratrol. Obesity was confirmed by the Lee index and by the retroperitoneal and perigonadal fats ( $p < 0.05$ ). In the analysis of bone tissue, a more pronounced alveolar bone loss was observed in the LIG group, with a decrease in bone loss in the LIGRSV and LIGOBS groups. In the gingival tissue, all animals that underwent experimental periodontitis presented a statistically significant difference when compared to the animals that did not receive the ligature. Obese animals also had higher levels of triglycerides and cholesterol than the other animals, and those who received the diet with resveratrol had a reduction in these patterns. In the morphometric analysis of the abdominal aorta, the thickness of the arteries was statistically different in all groups, and the LIGOBS group had the greatest thickness ( $p < 0.05$ ), however, with respect to the artery area, the CON group presented the largest area and the LIG and LIGOBS groups the smallest area. Thus, it is possible to suggest that the obesity model and resveratrol, act with



protective effect of alveolar bone loss induced by ligature. Also, it can be observed that the association between obesity and periodontitis may contribute to an increase in abdominal aortic thickness.

**Keywords:** Periodontal disease. Obesity. Resveratrol.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Fotografia da indução da Doença Periodontal. A: Mesa operatória adaptada. B: Abertura bucal do rato Wistar. C: Colocação da ligadura (fio de algodão 40) no primeiro molar inferior. D: Ligadura ao redor do primeiro molar inferior. .... 33
- Figura 2:** Esquema de distribuição dos grupos amostrais. Legenda: CON: Controle; LIG: Ligadura; RSV: Resveratrol; LIG-RSV: Ligadura-Resveratrol; OBS: Obesidade; LIG-OBS: Ligadura-Obesidade; OBS-RSV: Obesidade-Resveratrol; LIG-OBS-RSV: Ligadura-Obesidade-Resveratrol ..... 34
- Figura 3:** Esquema representando a linha do tempo dos eventos submetidos aos animais experimentais. .... 35
- Figura 4:** Radiografia representativa da hemi-mandíbula de rato mostrando a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (traço vermelho). .... 36
- Figura 5:** Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo. .... 38
- Figura 6:** Fotomicrografia do primeiro molar inferior, ilustrando a medida da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA). Hematoxilina e Eosina. Aumento 400x. .... 39
- Figura 7:** Fotomicrografia da aorta abdominal ilustrando a medida das túnicas (Tricrômico de Masson). Fotomicrografia A: aumento 4x. Fotomicrografia B: aumento 20x. .... 40

**Figura 8:** (A) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CTL. (B) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG. (C) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo RSV. (D) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG RSV. COA: Crista óssea alveolar; EJ: Epitélio juncional; ES: Epitélio sulcular; EO: Epitélio oral (D). Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 400x. .... 48

**Figura 9:** (A) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo OBS. (B) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo OBS RSV. (C) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG OBS. (D) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG OBS RSV. COA: Crista óssea alveolar; EJ: Epitélio juncional; ES: Epitélio sulcular; EO: Epitélio oral (D). Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 400x ..... 49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre parâmetros corporais dos ratos CON, OBS, RSV, OBS RSV, LIG, LIG OBS, LIG RSV, LIG OBS RSV. Os valores representam  $\pm$  desvio padrão..... 41

Tabela 2 - Resultados das concentrações plasmáticas de Triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros..... 43

Tabela 3 - Resultados das concentrações plasmáticas de Colesterol nos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros..... 43

Tabela 4 - Resultados da análise morfométrica da distância (cm) da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão..... 47

Tabela 5 - Análise histológica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos unidades. 48

Tabela 6 - Resultados da análise morfométrica da gengiva. As letras correspondem às comparações dentro do mesmo parâmetro. (parâmetro C, parâmetro E, parâmetro H e parâmetro L - as letras são para serem vistas sempre dentro da mesma coluna). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros..... 50

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-1	Ciclooxigenase-1
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
g	grama
h	hora
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1	Interleucina-1
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
IL-17	Interleucina-17
IL-23	Interleucina-23
IMC	Índice de Massa Corporal
kg	quilograma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
m	metro
mL	mililitro
MMP's	Metaloproteinases
MSG	Glutamato Monossódico
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa ligante
OMS	Organização Mundial de Saúde
.OH	Radicais Hidroxil
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RANK-L	Receptor ativador do fator nuclear kappa-ligante
RPM	Rotações por minuto
Th17	Linfócitos T helper 17
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
UNIOESTE	Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UV	Ultravioleta
$\mu$ m	micrômetro

## SUMÁRIO

1. EQUIPE EXECUTORA.....	16
2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO .....	18
3. INTRODUÇÃO.....	14
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. Objetivo geral .....	18
4.2. Objetivos específicos .....	18
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
5.1. Obesidade.....	19
5.2. Resveratrol.....	22
5.3. Doença Periodontal.....	25
5.4. Obesidade e doença periodontal .....	27
5.5. Resveratrol e Doença Periodontal .....	29
6. METODOLOGIA .....	31
6.1. Animais .....	31
6.2. Indução da Obesidade .....	32
6.3. Indução da Doença Periodontal .....	32
6.4. Grupos Experimentais.....	33
6.5. Administração do Resveratrol .....	35
6.6. Avaliação da Obesidade .....	35
6.7. Coleta das Amostras de Sangue para Colesterol Total e Triglicerídeos	35
6.8. Análise Radiográfica .....	36
6.9. Processamento e Análises Histológicas.....	37
6.10. Observações Microscópicas.....	37

6.11.	Morfometria da Gengiva .....	37
6.12.	Morfometria do Osso .....	38
6.13.	Análise Histomorfométrica da Aorta Abdominal .....	39
6.14.	Análise Estatística .....	40
7.	RESULTADOS .....	41
7.1.	Efeito no desenvolvimento da obesidade em ratos com e sem periodontite induzida. ....	41
7.2.	Níveis plasmáticos de Triglicérides e Colesterol.....	42
7.3.	Análise Radiográfica .....	44
7.4.	Análise histológica da hemimandíbula direita. ....	45
7.5.	Análise histomorfométrica das gengivas marginais vestibular e lingual. 49	
7.6.	Análise histomorfométrica da aorta abdominal. ....	50
8.	DISCUSSÃO.....	52
	CONCLUSÕES .....	57
	REFERÊNCIAS GERAIS .....	58

## **1. EQUIPE EXECUTORA**

### **Orientador:**

Patrícia Oehlmeyer Nassar. Cirurgiã-dentista. Doutora em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Araraquara-SP). Professora associada da disciplina de Periodontia e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia – nível Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Campus Cascavel - PR.

### **Mestranda:**

Laís Fernanda Pasqualotto. Cirurgiã-dentista. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – nível Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Campus Cascavel - PR.

### **Colaboradores:**

Carlos Augusto Nassar. Cirurgião-dentista. Doutor em Periodontia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Araraquara-SP). Professor associado da disciplina de Periodontia e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia – nível Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – Campus Cascavel - PR.

Célia Cristina Leme Beu. Bióloga. Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas. Professora associada da Universidade Estadual do Oeste do Paraná da disciplina de Anatomia Humana e Neuroanatomia e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – nível Mestrado.



Jordana Heidemann Pandini. Cirurgiã-dentista. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – nível Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE – Campus Cascavel – PR.

Lucinéia de Fátima Chaski Ribeiro. Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) pela Universidade Estadual de Maringá – UEM. Professora associada do Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, docente permanente no Programa de Residência em Terapia Intensiva e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde – Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE.

Pedro Henrique de Carli Rodrigues. Cirurgião-dentista. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – nível Mestrado – da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE – Campus Cascavel – PR.

## **2. LOCAIS DE REALIZAÇÃO**

A pesquisa foi realizada na Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Campus de Cascavel-PR. Laboratório de Histopatologia (microscopia e captura de imagem), Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabólica (LAFEM) da UNIOESTE, Laboratório de Biologia Estrutural e Funcional (LABEF) da UNIOESTE, Biotério de Fisiologia da UNIOESTE, Biotério de Fisioterapia da UNIOESTE.

### 3. INTRODUÇÃO

A obesidade tem alcançado proporções epidêmicas em todo o mundo, em grande parte, por causa do aumento do consumo de alta dieta calórica e estilo de vida sedentário (KHOSRAVI *et al.*, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 1,5 bilhões de adultos estão acima do peso e, entre eles, 500 milhões são clinicamente obesos (WHO, 2012). A obesidade é uma doença crônica, multifatorial que afeta adultos e crianças, sendo responsável por aumento dos riscos de ocorrência de diferentes desordens sistêmicas como doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças que apresentam risco de vida (PATARO *et al.*, 2012). 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). É uma doença caracterizada pela ativação de processo inflamatório em locais metabolicamente ativos, tais como tecido adiposo, fígado e células do sistema imunológico. A consequência desta resposta é um aumento acentuado nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, adipocinas e outros marcadores inflamatórios. A obesidade é acompanhada por um estado de inflamação de baixo grau e pode predispor a doenças crônicas, como as cardiovasculares e diabetes, e também, potencialmente a periodontite (KELLER *et al.*, 2015).

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). 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. Alguns modelos de indução de obesidade em ratos são encontrados na literatura e entre eles, a administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central, que resulta em

degeneração aguda do hipotálamo, destruindo locais específicos incluindo o núcleo arqueado ventromedial que leva além da obesidade, por provocar perturbações no controle de mecanismos de absorção e gasto de energia (FERNANDES *et al.*, 2012), também à disfunção sexual, parada no crescimento, déficit comportamental em roedores e alterações no controle cardiovascular (VOLTERA *et al.*, 2008).

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, reduzindo as respostas imunes que combatem os agentes microbianos patogênicos, contribuindo para evolução da doença periodontal em obesos (BORGES *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014). A doença periodontal não é mais identificada apenas como problema de saúde oral, mas como questão de saúde pública, uma vez que está associada à saúde sistêmica (SURESH; MAHENDRA, 2014).

Por outro lado a periodontite é uma inflamação associada à infecção bacteriana e atinge os tecidos de suporte dos dentes, causando reabsorção óssea alveolar e perda do tecido de inserção dental. É uma doença progressiva e destrutiva, acarretando em perda dental e edentulismo em adultos (PALLOS *et al.* 2006), entretanto variados estudos científicos vem demonstrando uma influência significativa na gradatividade da doença periodontal (AL-ZAHRANI, 2003; DALLA VECCHIA *et al.*, 2005; SAITO *et al.*, 2005; VERZELETTI *et al.*, 2012), sendo que provavelmente as citocinas, derivadas do tecido adiposo tenham papel chave neste processo (SOUZA *et al.*, 2010). É causada predominantemente por bactérias que liberam endotoxinas que ativam citocinas pró-inflamatórias (IL1, TNF- $\alpha$ , entre outras), afetando os tecidos de suporte dos dentes e induzindo perda do osso alveolar, cemento e ligamento periodontal (BASTOS *et al.*, 2005). O tecido adiposo produz uma vasta quantidade de citocinas e hormônios chamados coletivamente de adipocinas ou adipocitocinas, que por sua vez podem modular a periodontite.

A progressão da doença periodontal e consequente degradação tecidual estão diretamente relacionadas com a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 17 (IL 17), cujo mecanismo independe da imunidade mediada por células (RODRIGUES *et al.*, 2009). Schenkein *et al.* (2010), Adibrad *et al.* (2012) e Wang *et al.* (2013), mostraram proporcionalidade crescente entre a intensidade do infiltrado inflamatório, condição clínica e imunopositividade da doença periodontal, principalmente para IL-17. Lester e colaboradores (LESTER *et al.*, 2007) encontraram aumento significativo da IL-23, IFN- $\gamma$  e IL-17 no tecido gengival de sítios com perda de inserção moderada e severa, quando compararam com sítios saudáveis e uma correlação entre IL-23 e IL-17.

A IL-17 é considerada uma das principais citocinas pró-inflamatórias, dentro da rede de citocinas criada tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa, encontrando-se aumentada na mucosa de indivíduos com periodontite (SOUTO *et al.*, 2014; ISAILOVIC *et al.*, 2015). Ela é também uma citocina pró-inflamatória que compartilha dos efeitos biológicos da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , incluindo o estímulo para a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e metaloproteinases (MMP's) (YAO *et al.*, 1995).

O resveratrol é um polifenol não flavonóide produzido naturalmente por plantas em resposta ao ataque fúngico ou lesões que possam lhes acometer. É encontrado na dieta em alimentos como bagas, uvas, vinho tinto e nozes. Ele apresenta uma biodisponibilidade baixa, sendo rapidamente metabolizado no organismo humano (WENZEL, E.; SOMOZA, V., 2005). Recentemente tem-se pesquisado sobre os benefícios que esse polifenol tem sobre a saúde, sendo descrito como capaz de prevenir doenças cardiovasculares, câncer e lesões isquêmicas, reduzindo a inflamação e o estresse oxidativo celular, em controlar a glicemia em animais e humanos e prevenir a obesidade (SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T., 2010).

Além do controle glicêmico, o resveratrol atua no metabolismo do tecido adiposo, mantendo relação anti-adipogênica, uma vez que é capaz de aumentar a apoptose em adipócitos maduros e também induzir a lipólise pela

mobilização de lipídios estimulada por agentes  $\beta$ -adrenérgicos (FISHER-POSOVSZKY, P. *et al.*, 2010).

Nesse sentido, os artigos científicos trazem informações relevantes com o objetivo de esclarecer os benefícios que o resveratrol pode promover quando administrado de forma adequada e seus efeitos sobre os tecidos periodontais e em pacientes obesos. Assim sendo, é possível que o resveratrol possibilite um efeito antiinflamatório tendo como consequência uma menor perda óssea periodontal e consequente menor degradação dos tecidos, perda dentária e associação a efeitos sistêmicos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo do glutamato monossódico, associada ou não a doença periodontal.

### **4.2. Objetivos específicos**

Avaliar histomorfometricamente e radiograficamente a altura da crista alveolar da mandíbula dos animais;

Avaliar a efetividade da instalação da doença periodontal;

Quantificar osteócitos, osteoblastos e osteoclastos da mandíbula dos animais através de análise histológica;

Avaliar a possibilidade de reversão da doença periodontal através do resveratrol.

Verificar a instalação da obesidade através do peso corporal e das gorduras perigonadal e retroperitoneal, e o cálculo do Índice de Lee;

Avaliar a concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos;

Avaliar os efeitos anti-obesidade do Resveratrol sobre a artéria aorta abdominal através de análise histológica e histomorfométrica.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### 5.1. Obesidade

A obesidade pode ser definida como um acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal extremamente prejudicial à saúde além de ser uma doença de causas multifatoriais (WHO, 2016). Pode-se assim também definir a obesidade como excesso de gordura corporal em relação à massa magra (HALPERN, MANCINI, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram obesos e no geral, cerca de 13% da população adulta mundial (11% dos homens e 15% das mulheres) eram obesas (WHO, 2016).

A causa fundamental da obesidade e do excesso de peso é um desequilíbrio energético entre calorias consumidas e calorias gastas. Globalmente, tem havido um aumento da ingestão de alimentos com densidade energética rica em gordura e um aumento da inatividade física devido à natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, mudança de modos de transporte e crescente urbanização (WHO, 2016).

Na Europa, a prevalência da obesidade, assim como nos Estados Unidos está entre 25 e 35% (OGDEN *et al*, 2006). 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 IMC, que é medida pelo peso (Kg) dividindo-se pela altura (m) ao quadrado do indivíduo. O intervalo normal é 19-24,9 kg/m<sup>2</sup>, com excesso de peso definido como 25-29,9 kg/m<sup>2</sup>, e a obesidade como  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> (SURESH, MAHENDRA, 2014). É importante ressaltar que somente com o uso do IMC não é possível saber exatamente a quantidade de gordura corporal e, embora seja largamente utilizado, as disfunções metabólicas frequentemente associadas com a obesidade não



necessariamente apresentam-se em indivíduos com o IMC elevado, já que este índice não avalia o grau de distribuição de gordura pelo corpo (OLIVEROS *et al.*, 2014).

O aumento do IMC é um importante fator de risco para doenças não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares (principalmente doença cardíaca e acidente vascular cerebral), que foram a principal causa de morte em 2012, diabetes, distúrbios músculo-esqueléticos (principalmente a osteoartrite) e alguns tipos de câncer (endométrio, mama, próstata, fígado) (WHO, 2016).

A obesidade é caracterizada pelo aumento do número de adipócitos e lípideos devido a processos de mitogênese e diferenciação destas células, que são regulados por fatores genéticos, endócrinos, metabólicos, neurológicos, farmacológicos, ambientais e nutricionais (UNGER; ZHOU, 2001; FARMER; AUWERX, 2004; FU *et al.*, 2005). De forma preocupante, a obesidade está associada ao surgimento de inúmeras co-morbidades 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, e variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças não letais, mas debilitantes (PEREIRA *et al.*, 2003).

Recentes investigações associam a obesidade a algumas doenças crônico-degenerativas, tais 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 (KHANDER, *et al.*, 2009; NASCIMENTO, *et al.*, 2013; DALLA VECCHIA *et al.*, 2005). O denominador comum na patogênese dessas co-morbidades é a presença de 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. O tecido adiposo branco é 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. No tecido adiposo marrom, seus depósitos podem ser encontrados nas regiões interescapular, subescapular, axilar, intercostal, abdome e tórax, variando em distribuição e quantidade de acordo com a espécie (YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984). Apresenta função termogênica, é mais vascularizado e diminui com a idade (ALANIS-FONSECA *et al.*, 2006). Nos últimos anos, o entendimento da patogênese dessas co-morbidades, em pacientes obesos tem perpassado pela resposta inflamatória do tecido adiposo branco, considerado hoje um órgão endócrino metabolicamente ativo (LEITE *et al.*, 2009).

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 estes 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 glutamato monossódico (MSG) na região cervical de ratos recém nascidos causa destruição do núcleo hipotalâmico venteromedial e núcleo arqueado, levando os ratos a desenvolverem a obesidade pela falta de controle entre absorção e eliminação da energia. Não se conhece o mecanismo como acontece essa injúria, mas sabe-se que não é pelo aumento da ingestão alimentar (DIEMEN *et al.*, 2006). 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).

## 5.2. Resveratrol

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiistilbeno) é uma substância largamente encontrada na casca da uva vermelha, e menos constante na amora e amendoim (SOLEAS *et al.*, 1997; WENZEL, 2005), foi descrito antecipadamente como composto principal do Ko-Jo-Kon, extraído das raízes de uma planta conhecida como *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. (Polygonaceae) (KUMLER RESEARCH GROUP, 2005; NAKATA *et al.*, 2012). Este vegetal é cultivado comercialmente na China para a produção do resveratrol usado em suplemento dietético. No Japão, esse composto é utilizado para a produção de um chá conhecido como Itadori, que é uma versão não alcoólica do resveratrol (DELMAS *et al.*, 2005; SINCLAIR, 2006).

É uma fitoalexina produzida por diversas plantas quando estão sob ataque de patógenos como bactérias, fungos e até a radiação UV. A forma trans pode sofrer isomerização do cis-forma, quando expostos à radiação ultravioleta. As fitoalexinas constituem um grupo de metabólitos secundários quimicamente diversos, que se acumulam em torno do local de infecção e apresentam atividade antimicrobiana (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Sabe-se que o resveratrol é produzido pela videira em resposta à agressão de fungos e bactérias, e acumula-se na casca e sementes da uva, sendo que sua concentração é maior no vinho tinto (FRÉMONT, 2000; GEHM *et al.*, 1997), e foi isolado originalmente das raízes de heléboro branco em 1940 e, posteriormente, em 1963, a partir das raízes de knotweed japonês. No entanto, ele atraiu mais atenção apenas em 1992, quando foi indicada a sua presença no vinho como explicação para o efeito cardioprotetor (BAUR, 2006).

A quantidade desse polifenol no vinho tinto, deve-se ao processo de fabricação, no qual tal vinho é colocado para fermentar juntamente com a casca, sementes e talos, enquanto que na fabricação dos demais tipos de vinho, é retirado somente o suco da uva obtido por expressão, para fermentação (OAK *et al.*, 2005). A quantidade encontrada na casca da uva também varia de acordo com o cultivo, a sua origem geográfica, exposição e infecção fúngica. A quantidade de tempo que a fermentação de um vinho passa

em contato com a casca da uva é um fator determinante para o conteúdo de resveratrol (STERVBO, 2007).

Muito se tem estudado sobre os crescentes benefícios a saúde descobertos do resveratrol, no qual incluem atividade antiviral, anti-obesidade, anti-envelhecimento, anticancerígeno, neuroprotetor e também possui efeitos anti-inflamatórios (VALENZANO, 2006). O vinho de boa qualidade vem sendo alvo de pesquisa, desde que tomou-se conhecimento sobre suas propriedades benéficas a saúde, auxiliando no tratamento de doenças cardiovasculares e no acúmulo de colesterol, tem comprovada ação bactericida e antiviral, estimula o apetite e facilita a digestão, retarda o envelhecimento celular e orgânico, além da prevenção contra o câncer (WATERHOUSE, 1995; FRANKEL *et al.*, 1993; DELMAS *et al.*, 2005), e estudos recentes ainda, demonstram a atividade no metabolismo ósseo (RIBEIRO *et al.*, 2017).

O resveratrol por muitos anos, tem sido usado na terapia oriental como tratamento para aterosclerose, doenças inflamatórias e alérgicas, isso pode ser explicado pela sua estrutura polifenólica, que permite características antiplaquetária, anti-oxidante e redutora de triglicerídeos (BELGUENDOZ, F.L.; GOZZELINO, M.T., 1998; MEYER *et al.*, 1997). Sua estrutura molecular é semelhante ao estrogênio sintético, o dietilestilbestrol, possuindo características farmacológicas semelhantes ao estradiol, principal estrogênio humano (BRADAMANTE *et al.*, 2004).

Os compostos polifenólicos e fenólicos naturais da uva preservados no vinho são responsáveis pela ação antioxidante de proteção das alterações cardiovasculares e do câncer, através da interferência do processo oxidativo (WENZEL, E., SOMOZA, V., 2005). Assim sendo, ele apresenta ação antimutagênica em animais de laboratório (JANG *et al.*, 1997; SCHNEIDER *et al.*, 2000), reduzindo a atividade do tumor pela inibição da cicloxigenase-1 (COX-1), enzima que quebra o ácido araquidônico em substâncias pró-inflamatórias que estimulam o crescimento celular do tumor (RAY *et al.*, 1999; PACE-ASCIAK *et al.*, 1995; ROTONDO *et al.*, 1998).

O resveratrol possui propriedades estrogênicas através do consumo moderado e contínuo do vinho tinto, no qual surte efeitos no sistema

cardiovascular. Tem sido adicionado a dieta pelas suas propriedades anticarcinogênica e anti-esclerótica (PIVETA, 2005). Essas propriedades relacionadas aos estrogênios sintéticos podem levar ao desenvolvimento de novas drogas estrogênicas mais seletivas, no qual são utilizadas no tratamento do câncer de mama (Tamoxifeno) e da osteoporose pós-menopáusia (Raloxifeno) (FRÉMONT, 2000; OAK *et al.*, 2005).

Além dos testes em ratos, o resveratrol vem sendo utilizado no tratamento para câncer de cólon e herpes oral em humanos. Em roedores, o resveratrol possui atividade muito bem conhecida, como proteção contra desordens inflamatórias, derrame, infarto do miocárdio, outras doenças cardíacas e se destaca na prevenção contra o câncer (DERRIDA, 2005; WENZEL, E., SOMOZA, V., 2005; CHAO *et al.*, 2005).

Além disso, o corpo humano possui ácidos graxos poli-insaturados, que fazem parte da constituição das LDL (lipoproteínas de baixa densidade) (CHONGWOO, 2002). As LDL fazem o transporte do colesterol, e a oxidação dos LDL interrompe a função de transporte e seus produtos, ocasionando vários problemas cardiovasculares (URPÍ-SARDÀ *et al.*, 2005). Como consequência, temos a formação de placas de arteriosclerose, e com o tratamento com o resveratrol, há uma redução dos teores de LDL no sangue, reduzindo as chances de alterações cardiovasculares (BILGUENDOZ *et al.*, 1997).

Tem sido citado por sua capacidade em eliminar espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros radicais livres, além de inibir a peroxidação lipídica de membranas celulares, bem como inibir danos ao DNA (ácido desoxirribonucléico) causados por radicais hidroxil (OH). Associado a baixa mortalidade por doenças cardiovasculares, observada em indivíduos com elevada ingestão de lipídios tem sido hipotetizado como um provável responsável pelo “Paradoxo Francês”, que é uma expressão utilizada para se referir à alimentação inadequada dos franceses, porém seu bom estado de saúde geral. (TOMERA, 1999; GAMBELLI & SANTARONI, 2004).

### 5.3. Doença Periodontal

O periodonto, também denominado de tecido de suporte dos dentes, compreende as seguintes estruturas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar apresentando como principal função garantir a integridade da superfície da mucosa mastigatória (NANCI; BOSSHARDT, 2006; LINDHE; KARRING; LANG, 2010). 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).

A inflamação periodontal está associada à infecção por bactérias gram-negativas, que produzem polissacarídeos e endotoxinas resultando em aumento de mediadores biológicos como prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 17(IL-17). O desenvolvimento da periodontite é influenciado pela combinação de fatores genéticos e ambientais, fatores de risco, tais como: obesidade, fumo, estresse, diabetes, deficiência nutricional, uso de medicamento, que têm sido considerados fatores de inclusão novos em relação à progressão da doença periodontal (PASSOS, 2010; BERTULUCCI, 2012).

O principal agente etiológico é o biofilme bacteriano constituído predominantemente por microorganismos gram-negativos anaeróbicos (FENG; WEINBERG, 2006). Dessa maneira, dependendo da resposta do hospedeiro, a gengivite quando não tratada, pode evoluir para periodontite resultando em inflamação e destruição progressiva dos tecidos de suporte afetando sistemicamente o organismo humano através de mediadores inflamatórios. Clinicamente, a periodontite caracteriza-se pela perda de inserção, acompanhada pela formação de bolsa e reabsorção óssea (CARRANZA; NEWMAN, 2007).

A patogenia da periodontite é uma associação do acúmulo do biofilme dental, associado aos hospedeiros predominantemente por bactérias Gram-negativas, incluindo *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Bacteroides forsythus*. A ação de antígenos, lipossacarídeos e outros fatores virulentos, estimulam os hospedeiros, resultando na inflamação gengival e início da periodontite.

A progressão da doença periodontal e consequente degradação tecidual estão diretamente relacionadas com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , IL 6, a interleucina 1 beta (IL1  $\beta$ ), e a interleucina 17 (IL 17), cujo mecanismo independe da imunidade mediada por células (RODRIGUES *et al.*, 2009). A IL-17 é também uma citocina pró-inflamatória que compartilha dos efeitos biológicos da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , incluindo estímulo para a produção de mediadores pró-inflamatórios como IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  e metaloproteinases (MMP's) (YAO *et al.*, 1995).

Na última década, foi descrito um novo subtipo de célula T auxiliar, a célula Th17, com potencial extremamente inflamatório. A ativação das células Th1 e Th17 em análises de fluido gengival, biópsias ósseas e gengivais, ocorre devido a invasão tecidual por bactérias periodontopatógenas, gerando uma resposta imunológica exagerada do hospedeiro. As células Th17 produzem IL-17, que parece estar relacionada com o receptor ativador de NF $\kappa$ B ligante, RANK-L, envolvido na reabsorção óssea (FORD *et al.*, 2010).

A doença periodontal, sendo uma infecção oral crônica, tem indicativos de relação direta com doenças sistêmicas e seus efeitos. Essa susceptibilidade de interação com doenças sistêmicas pode ocorrer ao fato de que os lipossacarídeos e a viabilidade das bactérias gram-negativas no biofilme dental, bem como as citocinas inflamatórias dos tecidos do periodonto, podem entrar para corrente sanguínea em níveis patológicos. A severidade da doença periodontal é fator de risco elevado para certas doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, aterosclerose e diabetes mellitus (PAGE, 1998; IACOPINO; CUTLER, 2000)

#### 5.4. Obesidade e doença periodontal

Sabe-se que a doença periodontal é uma das mais importantes doenças orais que contribuem para o desenvolvimento subsequente de doenças crônicas, atingindo um grande número de indivíduos humanos em alta taxa de prevalência, representando um problema de saúde pública (PETERSEN; BAHENI, 2012). Já a obesidade, tem sido tratada como uma epidemia, porém muito negligenciada, visto que acomete países desenvolvidos e menos desenvolvidos (BITTENCOURT *et al.*, 2011). O número de indivíduos com sobrepeso já ultrapassa o número de pessoas desnutridas, uma estatística que, em parte, reflete a aceitação global de alimentos ricos em gorduras, porém carente de vitaminas e micronutrientes (FINUCANE *et al.*, 2011).

O primeiro estudo que mostrava a relação entre obesidade e doença periodontal foi publicado em 1977. Este trabalho mostrou que os ratos Zucker obesos hereditários, hipertensos e com doença periodontal induzida por ligadura são mais propensos a ter deterioração dos tecidos periodontais do que ratos normais (PERLSTEIN; BISSADA, 1977). A relação pode ser estabelecida devido ao tecido adiposo secretar citocinas pró-inflamatórias dentro da corrente sanguínea, que poderia promover e/ou exacerbar a doença periodontal tendo como resultado perda óssea alveolar.

AMAR e colaboradores em 2007 avaliaram em animais o efeito da obesidade sobre a resposta imune inata à infecção causada por *Porphyromonas gingivalis* (Pg), um microrganismo associado à periodontite. Animais alimentados com dieta associada à obesidade e outros alimentados com dieta saudável foram infectados com Pg, tanto oralmente, quanto sistemicamente.

Não estão totalmente definidos os mecanismos biológicos que estabelecem a fisiopatogenia entre obesidade e periodontite. Usualmente, esta inter-relação tem sido baseada na liberação de citocinas e hormônios pelo tecido adiposo, que alteram a resposta inflamatória tecidual (KHADER *et al.*, 2009).



O tecido adiposo é um órgão endócrino ativo que também secreta uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, que podem ser chamadas de adipocinas. Entre elas estão TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8, que são prevalentes na resposta inflamatória, e secretadas numa quantidade proporcional ao tecido adiposo existente (LUNDIN *et al.*, 2004). Na presença de periodontite, a gordura corporal aumentada pode estimular a ocorrência de uma hiper-resposta inflamatória nos tecidos periodontais, pela liberação dessas citocinas em maior quantidade (RITCHIE, C. S.; KINANE, D. F., 2003).

Devido ao alto nível de citocinas liberadas, a obesidade pode influenciar na resposta inflamatória e imunológica do paciente, resultante da agressão causada pelo biofilme bacteriano periodontopatogênico, o que sugere que a obesidade pode contribuir para a exacerbação das doenças periodontais (RITCHIE, C. S.; KINANE, D. F., 2003).

Outro modelo de estudo animal que pode ser uma alternativa é a dieta de cafeteria, no qual mais se aproxima da gênese da obesidade em humanos (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012). Neste modelo, os animais recebem dieta hipercalórica correspondente a alimentos industrializados juntamente com água e ração padrão *ad libitum* (SHAFAT *et al.*, 2009; SAMPEY *et al.*, 2011). Esse tipo de dieta leva a um aumento rápido e significativo de peso, além de causar alterações sistêmicas como a resistência a insulina (BERTRAND *et al.*, 2011).

Há uma correlação entre a doença periodontal e a obesidade, devido ao efeito das citocinas pró-inflamatórias lançadas no tecido adiposo, sugerindo mecanismos semelhantes na patofisiologia da doença periodontal e obesidade, e que essas citocinas provocariam uma resposta hiperinflamatória da periodontite (PATARO *et al.*, 2012).

A obesidade e a doença periodontal, por terem caráter inflamatório, apresentam correlação com distúrbios metabólicos e potencializar seus efeitos. Esses distúrbios podem ser alterações metabólicas, como doenças cardiovasculares como a arteriosclerose (NEMES, 2008). A aorta é uma artéria elástica que tem origem no coração e vai até a região abdominal. É formada por três camadas, a mais externa chamada adventícia ou externa, formada essencialmente por tecido conjuntivo; intermediária encontrando-se na camada

média ou muscular, e a mais interna chamada de íntima, e formada por uma fina camada de células endoteliais, e que na presença de alteração endotelial, essa região é acometida por placas ateroscleróticas, dando origem a aterosclerose.

Frente a todo esse contexto, buscou-se informações sobre a relação da obesidade e doença periodontal associadas sobre a aorta abdominal e sua morfologia em ratos obesos. Analisando-se as larguras das paredes da artéria, para que seja possível detectar a presença de placas ateroscleróticas ou alterações no tecido conjuntivo dos animais obesos.

### **5.5. Resveratrol e Doença Periodontal**

São poucos os estudos realizados utilizando-se o resveratrol para o controle da doença periodontal. Devido a sua conhecida atividade antimicrobiana e anti-inflamatória em diferentes circunstâncias, esse composto tornou-se visado para o controle de doenças inflamatórias.

Em relação a periodontite, O'Connor *et al.* (2011) demonstraram *in vitro* o efeito do resveratrol na inibição dos periodontopatógenos *A. actinomycetemcomitans* (Aa) e *P. gingivalis* (Pg).

Park *et al.* (2015), também mostraram que o resveratrol atenua a adesão de monócitos induzida por LPS de *P. gingivalis* (Pg) ao endotélio, o que sugeriu que o mesmo tinha um papel terapêutico na inflamação vascular induzida pelo patógeno periodontal.

Atmanspacher em 2013 descreve que a administração contínua do resveratrol em ratos com doença periodontal pode influenciar no controle da periodontite através da modulação do Th17, resposta imune em ratos que apresentam a periodontite induzida.

Rizzo *et al.* em 2012, sugerem que o resveratrol possui efeitos imunomoduladores determinados através da diminuição de citocinas pró-inflamatórias estimuladas por LPS dos *P. gingivalis*, o que pode fornecer possíveis aplicações terapêuticas para o tratamento da periodontite.

Bhattarai *et al.* em 2016, pesquisaram a relação do resveratrol na modulação da inflamação pelos fibroblastos gengivais, e concluíram através de análise histológica que a administração do resveratrol melhorou a perda óssea alveolar mediada por ligadura em ratos. Também sugerem a diminuição da produção de proteínas associadas à inflamação, formação de osteoclastos, e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO`s) circulantes.

Contudo, Cirano e colaboradores em 2016, mostraram que não houve diferença significativa nos resultados microbiológicos entre os animais que foram submetidos à periodontite experimental e ao resveratrol como tratamento comparado aos animais que não sofreram a terapia, não tendo diferença entre as concentrações de bactérias presentes do fluido crevicular. Assim sendo, o resveratrol não foi capaz de promover um benefício adicional na microbiologia durante o experimento.

Com isso, temos que o resveratrol pode ser capaz de reduzir o caráter anti-inflamatório dos tecidos gengivais de animais submetidos a periodontite experimental, devido ao seu caráter antioxidante e anti-inflamatório.

## 6. METODOLOGIA

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, experimental, realizada em laboratório (GIL, 2007).

### 6.1. Animais

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (ANEXO 01), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Ratas prenhas (n=12) foram obtidas do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Cascavel, e mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisioterapia sob condições controladas de temperatura ( $21 \pm 2^\circ$ ) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 7:00 - 19:00 h). Ao nascimento, os filhotes foram separados priorizando os machos, em um total de 8 animais por ninhada, e as fêmeas foram eutanasiadas. Os animais receberam dieta padrão e água a vontade por todo o período experimental. O dia do parto foi considerado como dia 0 e, aos 21 dias após o parto, foi realizado o desmame da ninhada.

No total, foram utilizados 48 Ratos Wistar machos (peso corporal entre 180-350 g) e após o desmame foram mantidos em biotério setorial do laboratório de Fisioterapia em caixas individuais em ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas as 07:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e temperatura controlados, com livre acesso à água e alimento e sendo acomodados em caixas individuais em grupos de 3-5 por caixa (41 cm de comprimento X 34 cm de largura X 17 cm altura). Inicialmente, os filhotes já foram separados em dois grandes grupos: controle (n=24) e obeso (n=24).

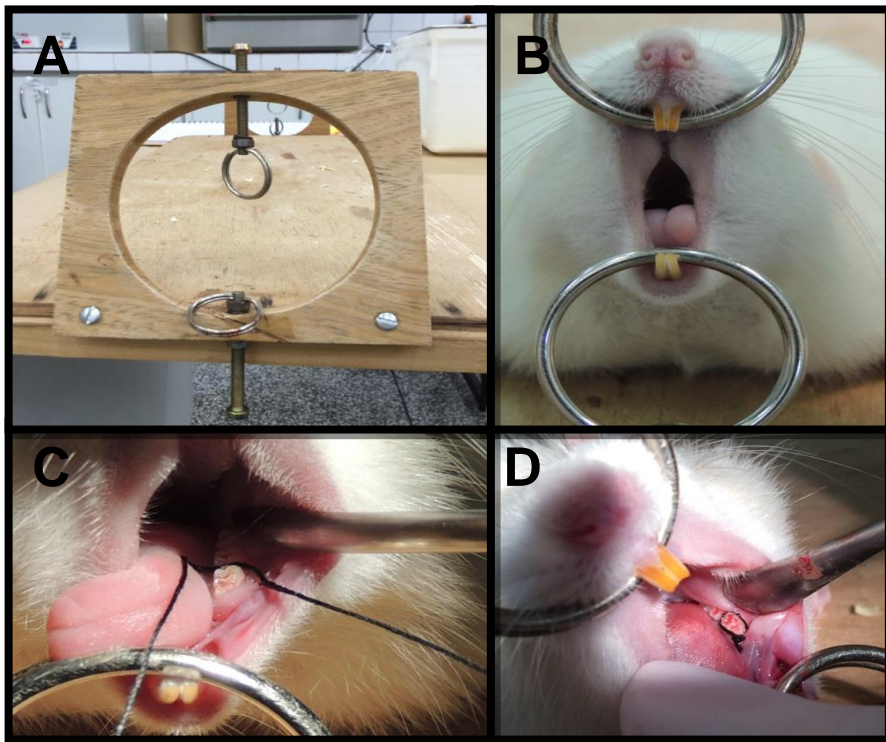
O cálculo amostral foi baseado no uso do teste de ANOVA para cálculo do tamanho das amostras, com poder de 90% e nível de significância de 5%, bem como em prévios estudos dos grupos de pesquisadores (NASCIMENTO *et al.*, 2013).

## **6.2. Indução da Obesidade**

Os animais pertencentes ao grupo obeso (OBS) foram submetidos durante os cinco primeiros dias de vida, a indução da obesidade através da administração intra-dérmica na região posterior de Glutamato Monossódico (MSG) (Ajinomoto – Brasil) na dose de 4 g/kg de peso corporal (grupo OBESO) ou 1,25 g/kg de salina (grupo CONTROLE) (FELIPETTI *et al.*, 2014).

## **6.3. Indução da Doença Periodontal**

Aos 75 dias de vida os animais pertencentes aos grupos Ligadura (LIG), Ligadura-Obesidade (LIG-OBS), Ligadura-Resveratrol (LIG-RSV) e Ligadura-Obesidade-Resveratrol (LIG-OBS-RSV) foram anestesiados através da administração intramuscular com xilazina (Virbac do Brazil Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 0,04mL/100g e quetamina (Francotar, Virbac do Brazil Indand Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil), 0,08mL/100g), e posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo (Figura 1). Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da doença periodontal (NASSAR *et al.*, 2009).



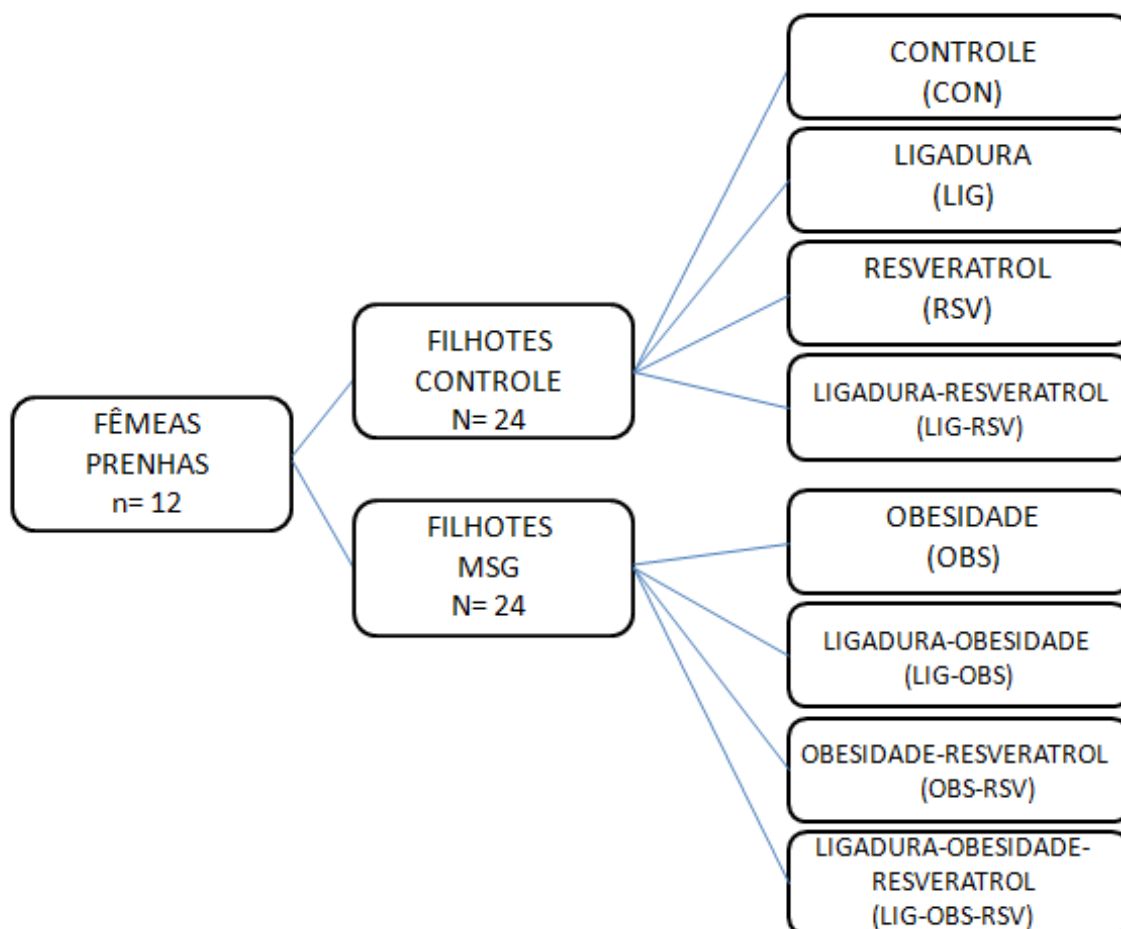
**Figura 1:** Fotografia da indução da Doença Periodontal. A: Mesa operatória adaptada. B: Abertura bucal do rato Wistar. C: Colocação da ligadura (fio de algodão 40) no primeiro molar inferior. D: Ligadura ao redor do primeiro molar inferior.

#### 6.4. Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em oito grupos, cada grupo contendo seis ratos, totalizando 48 ratos com delineamento inteiramente casualizado em um esquema fatorial 2 x 2 x 2.

- 1- Grupo Controle (CON);
- 2- Grupo Ligadura (LIG): onde foi induzida a doença periodontal por ligadura;
- 3- Grupo Resveratrol (RSV): ratos que receberam a dieta com resveratrol;
- 4- Grupo Obesidade (OBS): Ratos que foram submetidos a obesidade através do Glutamato Monossódico (MSG);
- 5- Grupo Ligadura e Obesidade (LIG-OBS): ratos que foram submetidos a obesidade através do MSG e induzido a doença periodontal através da ligadura;

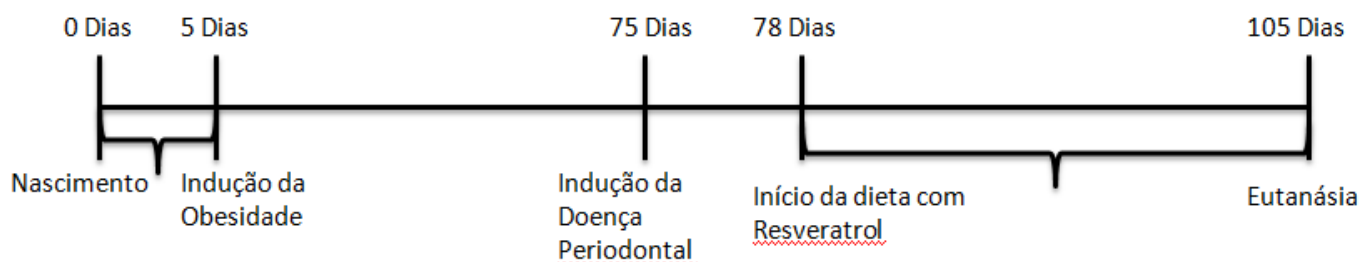
- 6- Grupo Ligadura e Resveratrol (LIG-RSV): ratos submetidos à dieta com o resveratrol e indução da doença periodontal por ligadura;
- 7- Grupo Obesidade e Resveratrol (OBS-RSV): ratos submetidos à obesidade através do MSG e também a dieta com o resveratrol;
- 8- Grupo Ligadura, Obesidade e Resveratrol (LIG-OBS-RSV): ratos submetidos à indução da obesidade através do MSG, indução da doença periodontal através de ligadura e dieta com o resveratrol.



**Figura 2:** Esquema de distribuição dos grupos amostrais. Legenda: CON: Controle; LIG: Ligadura; RSV: Resveratrol; LIG-RSV: Ligadura-Resveratrol; OBS: Obesidade; LIG-OBS: Ligadura-Obesidade; OBS-RSV: Obesidade-Resveratrol; LIG-OBS-RSV: Ligadura-Obesidade-Resveratrol

### 6.5. Administração do Resveratrol

Aos 78 dias de vida, os animais pertencentes aos grupos Resveratrol, receberam uma dose de 10 mg/kg de peso corporal do Resveratrol (TRANS RESVERATROL PUREST VANTAGE® - BRASIL), diluído em água destilada, via oral, durante 28 dias (CASATI *et al.* 2013).



**Figura 3:** Esquema representando a linha do tempo dos eventos submetidos aos animais experimentais.

### 6.6. Avaliação da Obesidade

Aos 105 dias os animais foram pesados e medidos para a obtenção do comprimento nasoanal para cálculo do índice de Lee [raiz cúbica do peso corporal (g) / comprimento naso-anal (cm)] (BERNARDIS; PATTERSON, 1968), em seguida os animais foram eutanasiados por decapitação. Após o sacrifício, as gorduras perigonadal e retroperitoneal foram retiradas e pesadas para a verificação dos parâmetros de obesidade.

### 6.7. Coleta das Amostras de Sangue para Colesterol Total e Triglicerídeos

Imediatamente após a decapitação, o sangue foi coletado e centrifugado a 3000 rpm em centrífuga. O plasma foi separado e armazenado em freezer a -20°C para dosagem das concentrações de Colesterol Total e Triglicerídeos, através dos kits Colesterol Liquiform – Labtest e Triglicérides Liquiform – Labtest.

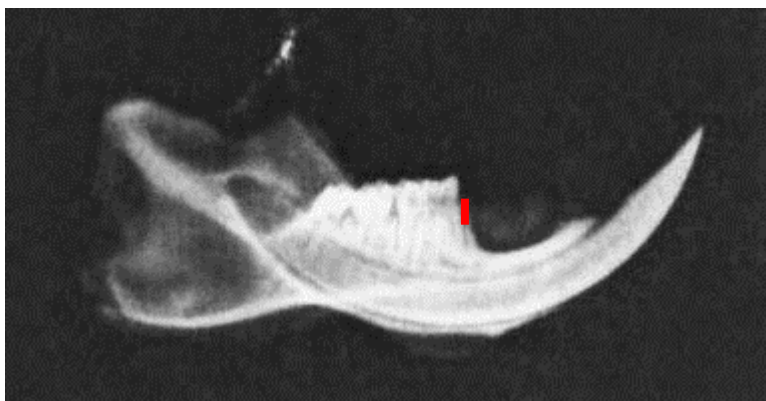


### 6.8. Análise Radiográfica

Logo após o sacrifício, a hemimandíbula esquerda de cada animal foi retirada, fixada em formol 10% (pH 7,2) durante 24 horas, lavadas e estocadas em álcool 70%. As hemimandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical (AGFA DENTUS®, Ultraspeed) e posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares fiquem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000 (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças.

Para processamento dos filmes, foram utilizados revelador e fixador Kodac® no respectivo processamento de tempo/temperatura e digitalizadas através de um “scanner” para dispositivos (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid).

As imagens digitalizadas foram analisadas e realizado três medidas através do programa Image Tools 3.0 e retiradas uma média entre elas, através de uma medida linear, que percorreu a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo do rato, com as medições em pixels (Figura 4).



**Figura 4:** Radiografia representativa da hemi-mandíbula de rato mostrando a distância da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (traço vermelho).

### **6.9. Processamento e Análises Histológicas**

Após a eutanásia dos animais, as hemimandíbulas direitas e aortas foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas, lavadas e estocadas em álcool 70%. As hemimandíbulas direitas foram descalcificadas com ácido tricloroacético (TCA) 5%, 10°C, por trinta dias. As peças foram avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com renovação da solução de TCA a cada cinco dias. Após a descalcificação, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% durante aproximadamente duas horas para neutralizar o TCA, lavados em água corrente por duas horas, mantidos em álcool 70% até o processamento histológico para inclusão em parafina (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). Os segmentos das hemimandíbulas e aortas abdominais foram desidratadas em série alcoólica ascendente, diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo manual (Olympus, CUT 4055 - Charleston, Carolina do Sul, EUA) para obtenção de secções de 7 µm de espessura em corte frontal e foram montadas em lâminas histológicas e coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (apenas os cortes de aorta abdominal).

### **6.10. Observações Microscópicas**

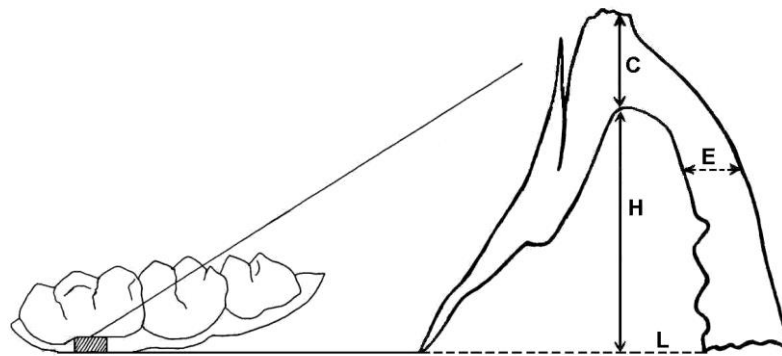
A análise microscópica foi realizada por um único examinador, por meio da avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de microscópio óptico transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland), para observações morfológicas do tecido gengival, processo alveolar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

### **6.11. Morfometria da Gengiva**

As medidas morfométricas foram feitas nas gengivas marginais vestibular e lingual direita em todos os grupos, utilizando-se o programa *Image Pro-Plus 6.0®*, 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 50  $\mu\text{m}$ ).

As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, como ilustrado na Figura 5 abaixo. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{m}$ .



**Figura 5:** 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 gengival

E – Largura do epitélio bucal

H - altura do tecido conjuntivo na região média

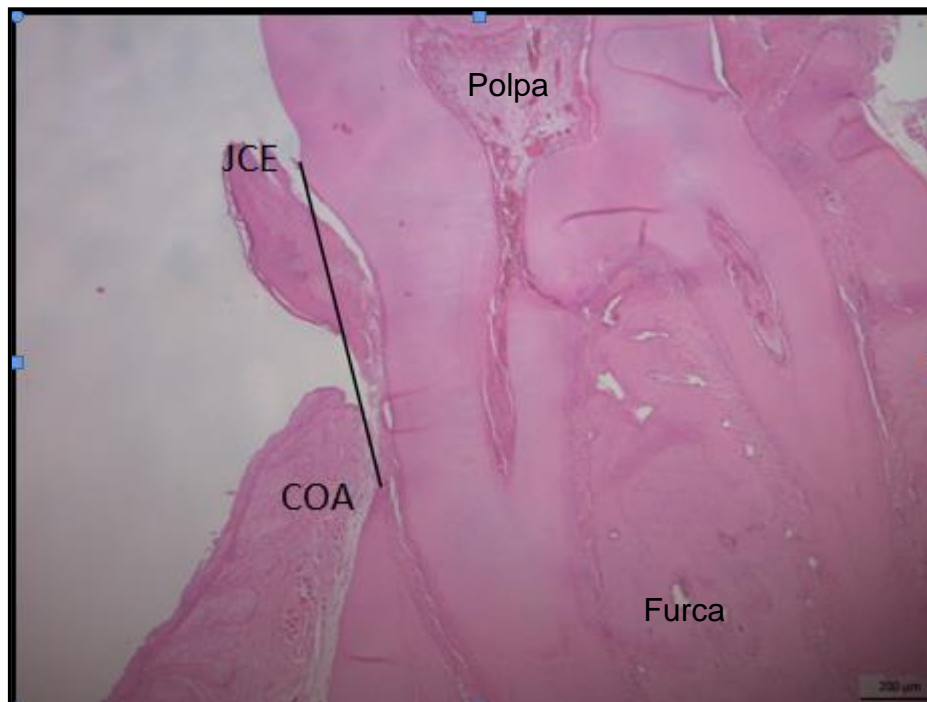
L - largura do tecido conjuntivo na região basal

### 6.12. Morfometria do Osso

Foram realizada a quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos do lado mesial da crista óssea alveolar vestibular, partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 1000x em imersão no microscópio. Serão feitas duas observações por campo, e então, feito à média dos valores para cada animal e para cada grupo.

A medida da crista óssea alveolar foi realizada por meio de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do software LazEz®. Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte.

As medidas foram repetidas duas vezes por dia, em três dias diferentes, e então foi feita a média entre os valores (Figura 6).

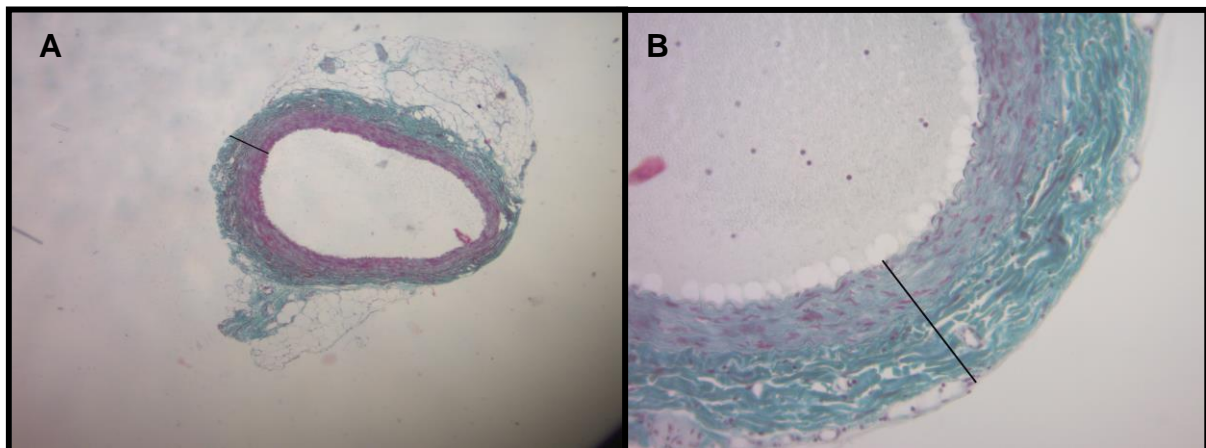


**Figura 6:** Fotomicrografia do primeiro molar inferior, ilustrando a medida da junção cimento-esmalte (JCE) até a crista óssea alveolar (COA). Hematoxilina e Eosina. Aumento 400x.

### 6.13. Análise Histomorfométrica da Aorta Abdominal

Após a obtenção das lâminas histológicas da aorta abdominal dos animais, foi realizada uma medida linear das espessuras das paredes e a área do lúmen da artéria, através de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do programa software Laz Ez® (Sistema de contagem e captura LAS V 4.2, Leica microsystems). Foi realizada uma medida da menor distância entre as camadas das paredes da artéria, foram feitas medidas em quatro pontos equidistantes e então a média dos pontos. Também foi mensurado o valor da área das aortas. As medidas foram

repetidas duas vezes por dia, em três dias diferentes, e então foi feita a média entre os valores (Figura 7).



**Figura 7:** Fotomicrografia da aorta abdominal ilustrando a medida das túnicas (Tricrômico de Masson). Fotomicrografia A: aumento 4x. Fotomicrografia B: aumento 20x.

#### 6.14. Análise Estatística

Para a análise estatística, todos os valores numéricos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Em um primeiro momento, através do programa Bioestat 5.3 (Instituto Mamiraua, Amazonas, Brasil), foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição de normalidade dos dados. Após a verificação da normalidade dos dados, foi realizado o teste ANOVA e complementado com o pós-teste de Tukey com  $p < 0,05$  para avaliar as diferenças entre os grupos.

## 7. RESULTADOS

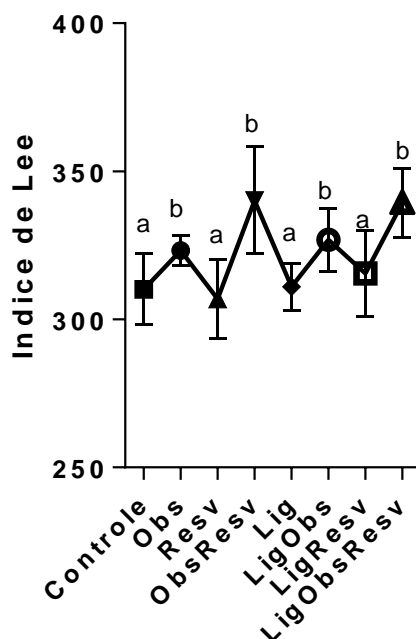
### 7.1. Efeito no desenvolvimento da obesidade em ratos com e sem periodontite induzida.

Os animais tratados com MSG no período neonatal apresentaram diminuição significativa no peso corporal ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1) e também apresentaram um aumento no índice de Lee ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos animais que não foram tratados com MSG (Gráfico 1), essa diferença não foi observada quando comparados os grupos obesos entre si.

**Tabela 1:** Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre parâmetros corporais dos ratos CON, OBS, RSV, OBS RSV, LIG, LIG OBS, LIG RSV, LIG OBS RSV. Os valores representam  $\pm$  desvio padrão.

Grupos	Peso dos Animais (g)	Peso Gordura Retroperitoneal(g)	Peso Gordura Perigonadal(g)
CON	366.33 $\pm$ 22.74 A	5.14 $\pm$ 1.11 A	3.13 $\pm$ 0.45 A
OBS	288.33 $\pm$ 27.31 B	6.44 $\pm$ 0.66 B	4.25 $\pm$ 0.57 B
RSV	364.33 $\pm$ 24.17 A	5.18 $\pm$ 0.80 A	3.43 $\pm$ 0.56 A
OBS RSV	299.00 $\pm$ 13.78 B	6.76 $\pm$ 0.48 B	4.95 $\pm$ 1.21 B
LIG	355.66 $\pm$ 16.31 A	4.38 $\pm$ 1.24 A	2.80 $\pm$ 0.59 A
LIG OBS	285.33 $\pm$ 24.45 B	6.88 $\pm$ 0.58 B	4.78 $\pm$ 1.23 B
LIG RSV	351.66 $\pm$ 21.74 A	4.81 $\pm$ 0.97 A	3.06 $\pm$ 0.63 A
LIG OBS RSV	278.66 $\pm$ 21.37 B	6.55 $\pm$ 0.62 B	4.18 $\pm$ 0.36 B

Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (A,B) dentro do mesmo parâmetro significam que os dados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro, com  $p < 0.05$ .



**Gráfico 1:** Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre o Índice de Lee dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão. Letras diferentes (a,b) significam que os dados são estatisticamente diferentes, com  $p < 0.05$ .

## 7.2. Níveis plasmáticos de Triglicerídeos e Colesterol

Através da análise estatística, pode-se observar que os grupos experimentais que não receberam a administração de MSG apresentaram menor concentração de triglicerídeos quando comparado aos grupos obesos. Os demais grupos apresentaram-se estatisticamente diferentes, e dentre eles, os animais que receberam a dieta com resveratrol apresentaram menor concentração de triglicerídeos quando comparado aos animais obesos que não receberam a substância (Tabela 2). Em relação às concentrações de colesterol, os animais pertencentes aos grupos controle (CON), resveratrol (RSV), obesidade-resveratrol (OBSRSV), ligadura (LIG) e ligadura-resveratrol (LIGRSV) apresentaram-se estatisticamente semelhantes e com a menor concentração plasmática de colesterol. Já os animais pertencentes aos grupos

LIGOBS e OBS apresentaram-se estatisticamente semelhantes e com a maior concentração plasmática de colesterol (Tabela 3).

**Tabela 2** - Resultados das concentrações plasmáticas de Triglicerídeos nos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>
Con	141.04 $\pm$ 24.46 A
Obs	324.77 $\pm$ 32.50C
Rsv	175.29 $\pm$ 67.75 A
ObsRsv	238.31 $\pm$ 10.76B
Lig	149.71 $\pm$ 40.62 A
LigObs	341.18 $\pm$ 39.49C
LigRsv	159.48 $\pm$ 14.56A
LigObsRsv	267.06 $\pm$ 56.51 B

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

**Tabela 3** - Resultados das concentrações plasmáticas de Colesterol nos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros.

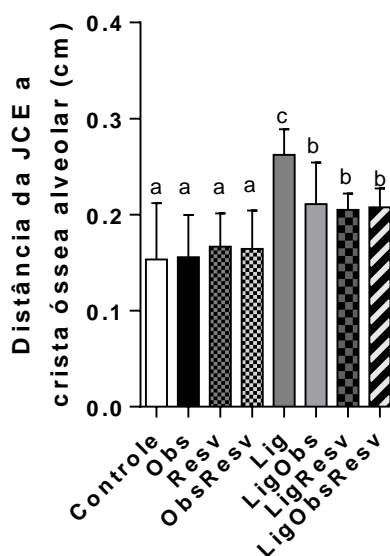
<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>
Con	123.84 $\pm$ 2.99 A
Obs	162.27 $\pm$ 12.02 C
Rsv	127.24 $\pm$ 4.32 A
ObsRsv	124.74 $\pm$ 4.80A
Lig	127.30 $\pm$ 5.79 A
LigObs	164.67 $\pm$ 11.38C
LigRsv	123.17 $\pm$ 7.44A
LigObsRsv	142.07 $\pm$ 14.22 B

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



### 7.3. Análise Radiográfica

Na análise radiográfica da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do primeiro molar inferior esquerdo, verificou-se que houve maior perda de inserção nos animais expostos a periodontite experimental quando comparado aos demais grupos ( $p < 0.05$ ), porém o grupo LIG apresentou perda óssea mais acentuada quando comparado aos demais grupos (Gráfico 2), demonstrando que houve efetividade da indução da doença periodontal sobre o tecido ósseo alveolar. A obesidade induzida também atuou como inibidor da perda óssea alveolar nos animais obesos do grupo LIGOBS quando comparado ao grupo LIG, e o resveratrol também proporcionou um efeito protetor na perda óssea alveolar nos grupos submetidos à dieta.



**Gráfico 2:** Análise radiográfica da distância da JCE à crista óssea alveolar da face mesial do primeiro molar inferior esquerdo dos ratos dos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em centímetros (cm). Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes, com  $p < 0.05$ .

#### **7.4. Análise histológica da hemimandíbula direita.**

Na análise histológica, observou-se perda óssea acentuada nos animais que foram submetidos a periodontite experimental ( $p < 0,05$ ) através da ligadura, comprovando a efetividade da indução da doença periodontal. Dentre eles, o grupo LIG apresentou a maior distância, representando uma maior perda óssea, quando comparado ao grupo LIG OBS (Tabela 4).

Não houve diferença estatística no número de células ósseas quando comparamos os grupos CON e OBS. Houve diferença estatística entre os grupos submetidos à periodontite experimental, dentre eles o grupo LIG apresentou o menor número de osteoblastos, osteócitos e maior número de osteoclastos, quando comparado aos demais ( $p < 0,05$ ). Também não houve diferença estatística nos grupos que receberam a terapia com resveratrol, porém os grupos LIGRSV e LIG OBSRSV apresentaram um aumento de osteoblastos e osteócitos e uma diminuição de osteoclastos quando comparados ao grupo LIG (Tabela 5).

##### **Grupo Controle**

Na análise histológica do grupo CTL, observou-se o epitélio oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo dentro do padrão de normalidade, sem presença de tecido inflamatório. O osso alveolar presente estava intacto, compacto e regular, com porção esponjosa normal no centro. Apresentava cristas ósseas espessas e a nível do terço cervical da raiz, visto através da mensuração da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar. Constituintes do periodonto como cimento, ligamento periodontal e a junção cimento-esmalte, apresentaram características anatômicas normais (Figura 8- A).

##### **Grupo Obeso**

Os animais que receberam o tratamento neonatal com o glutamato monossódico, apresentaram regularidade na diferenciação morfológica entre os epitélios oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo e não foi encontrado aspecto inflamatório nesses tecidos. O nível da crista óssea e a distância até a junção cimento-esmalte foi semelhante estatisticamente ao grupo CTL (Tabela 4 e Figura 9 - A).

**Grupo Resveratrol**

Após a administração do resveratrol, os animais deste grupodemonstraram regularidade nos tecidos periodontais e na morfologia dos epitélios oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo. Do mesmo modo, não apresentaram qualquer aspecto inflamatório. Por meio da mensuração da distância da crista óssea até a junção cimento-esmalte, temos que esta distância foi estatisticamente semelhante ao grupo CTL (Tabela 4 e Figura 8 - C).

**Grupo Obesidade Resveratrol**

Na avaliação histológica do grupo obesidade resveratrol foi possível observar a presença de um epitélio oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo regular e sem presença de infiltrado inflamatório, as cristas ósseas espessas e altas, tendo a mensuração da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea semelhante ao grupo CTL. (Tabela 4 e Figura 9 - B).

**Grupo Ligadura**

Na análise do grupo LIG, notamos alteração morfológica e anormalidade nos epitélios oral, juncional, sulcular e a migração em direção apical do tecido conjuntivo com a presença de infiltrado inflamatório agudo (Figura 8 - B). A crista óssea apresentou formato irregular, pontiaguda, com extensa perda óssea alveolar, o que levou a uma exposição do terço cervical dentário. Também houveram alterações em cimento e ligamento periodontal.

**Grupo Ligadura Obesidade**

No grupo LIG OBS, notou-se pequena alteração dos epitélios oral, juncional e sulcular, e a migração do tecido conjuntivo em direção a região apical é menor quando comparado ao grupo LIG, apresentando aspecto inflamatório. A crista óssea mostra formato irregular, com perda óssea alveolar, contudo encontra-se próxima ao terço cervical da raiz. Notam-se também alterações em cimento e ligamento periodontal (Figura 9 - C).

**Grupo Ligadura Resveratrol**

Na análise do grupo LIG RSV, observou-se pequena alteração na morfologia do epitélio juncional, sulcular e oral dos animais. Houve migração do tecido conjuntivo em direção apical, porém em menor grau quando comparado com o grupo LIG. A crista óssea se apresenta alterada, com formato

pontiagudo, caracterizando perda óssea e próxima ao terço médio do dente, tendo a mensuração da distância da crista óssea alveolar até a junção cimento-esmalte semelhante ao grupo LIG (Tabela 4 e Figura 8 - D).

**Grupo Ligadura Obesidade Resveratrol**

No grupo LIG OBS RSV nota-se alteração morfológica em epitélio juncional, sulcular e oral e a migração em sentido apical do tecido conjuntivo com presença de infiltrado inflamatório. Há perda óssea alveolar, com a crista óssea alterada, com formato de ponta e próxima ao terço médio da raiz, tendo a mensuração da distância da crista óssea alveolar até a junção cimento-esmalte semelhante ao grupo LIG OBS (Tabela 4 e Figura 9 - D).

**Tabela 4** - Resultados da análise morfométrica da distância (cm) da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar dos animais dos diferentes grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão.

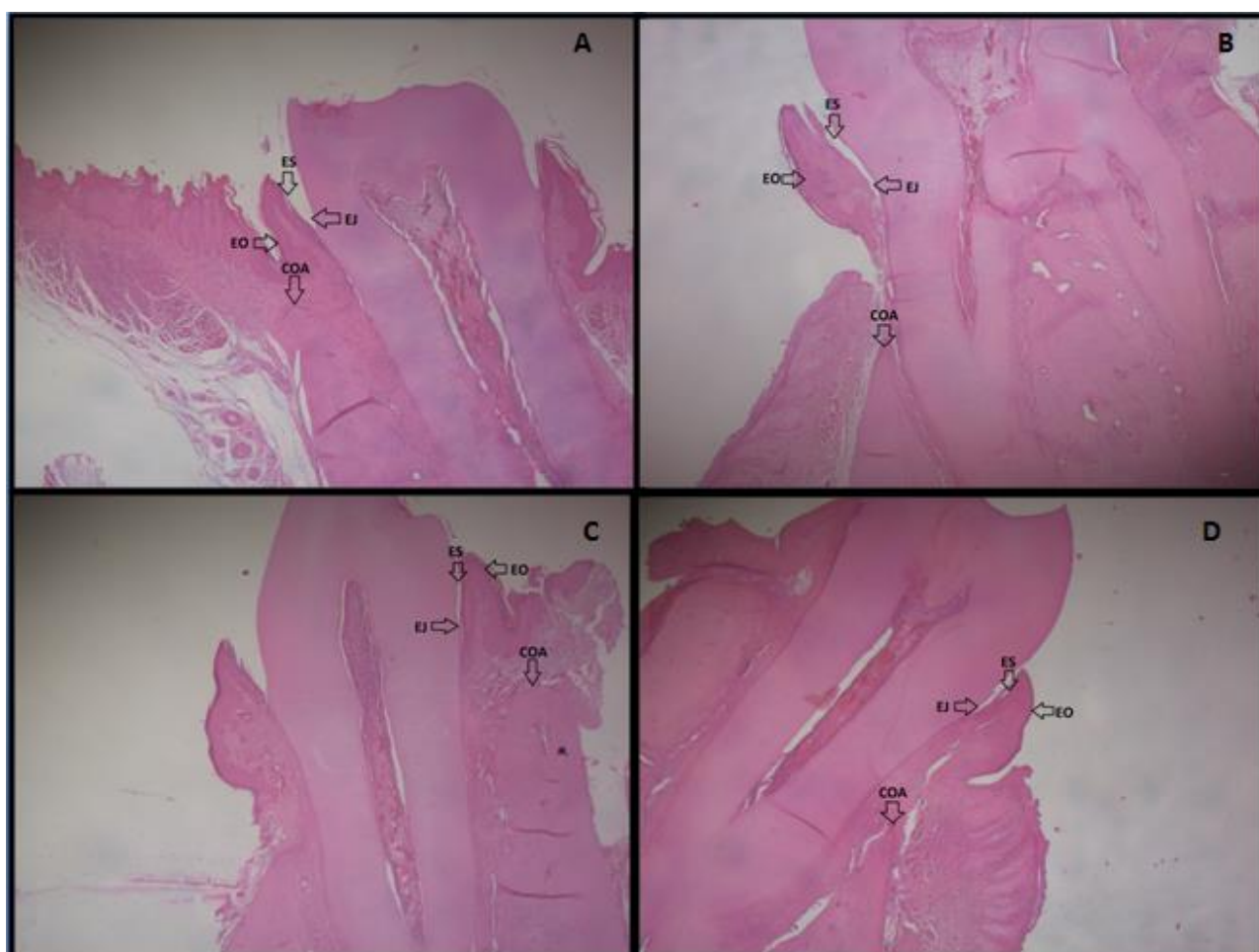
<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>
Con	0.030 $\pm$ 0.004 A
Obs	0.035 $\pm$ 0.005 A
Rsv	0.036 $\pm$ 0.010 A
ObsRsv	0.040 $\pm$ 0.005 A
Lig	0.087 $\pm$ 0.009 C
LigObs	0.056 $\pm$ 0.015 B
LigRsv	0.067 $\pm$ 0.016 B
LigObsRsv	0.068 $\pm$ 0.012 B

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

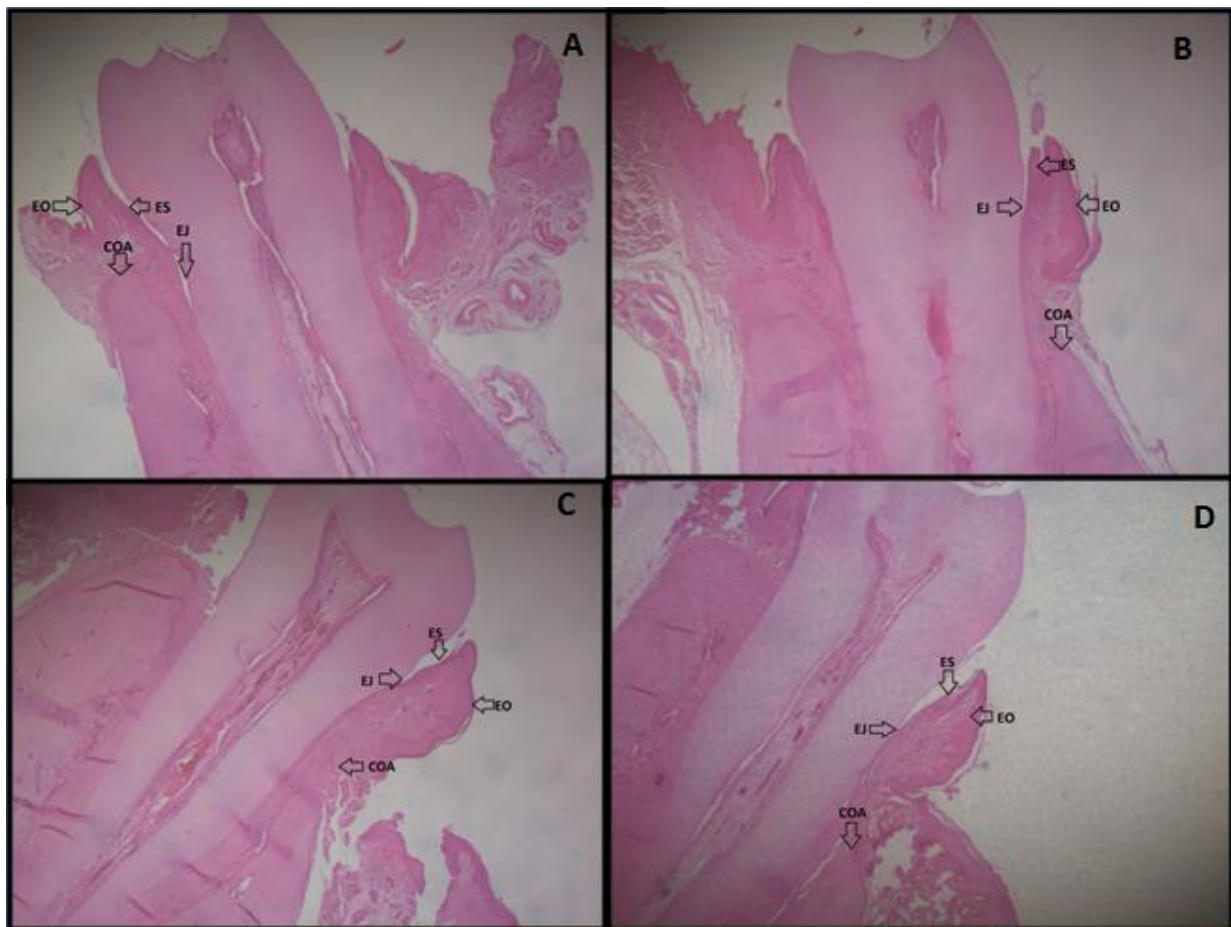
**Tabela 5** - Análise histológica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos unidades.

	<b>Osteoblasto</b>	<b>Osteócito</b>	<b>Osteoclasto</b>
CON	12.57 $\pm$ 2.14 A	32.23 $\pm$ 9.98A	0.37 $\pm$ 0.08A
OBS	11.13 $\pm$ 0.85 A	32.90 $\pm$ 8.35A	0.73 $\pm$ 0.60A
RSV	12.05 $\pm$ 0.63 A	34.25 $\pm$ 12.10A	0.46 $\pm$ 0.08A
OBSRSV	10.96 $\pm$ 1.36A	32.66 $\pm$ 8.88A	0.60 $\pm$ 0.50A
LIG	6.95 $\pm$ 0.69 B	10.67 $\pm$ 4.62B	3.46 $\pm$ 0.16B
LIGOBS	8.84 $\pm$ 1.36C	19.32 $\pm$ 8.05C	1.60 $\pm$ 0.70C
LIGRSV	8.64 $\pm$ 1.03 C	18.45 $\pm$ 4.23C	1.71 $\pm$ 0.14C
LIGOBSRSV	8.76 $\pm$ 0.71C	21.70 $\pm$ 5.10C	1.70 $\pm$ 0.29C

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



**Figura 8** - (A) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CTL. (B) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG. (C) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo RSV. (D) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG RSV. COA: Crista óssea alveolar; EJ: Epitélio juncional; ES: Epitélio sulcular; EO: Epitélio oral (D). Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 400x.



**Figura 9** - (A) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo OBS. (B) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo OBS RSV. (C) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG OBS. (D) Fotomicrografia representativa de um animal do grupo LIG OBS RSV. COA: Crista óssea alveolar; EJ: Epitélio juncional; ES: Epitélio sulcular; EO: Epitélio oral (D). Hematoxilina e Eosina (HE). Aumento 400x

### 7.5. Análise histomorfométrica das gengivas marginais vestibular e lingual.

Na análise morfométrica do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo, todos os animais submetidos à periodontite experimental apresentaram a altura do epitélio da crista gengival (parâmetro C), largura do epitélio bucal (parâmetro E), altura do tecido conjuntivo na região média (parâmetro H) e largura do tecido conjuntivo na região basal (parâmetro L) estatisticamente semelhantes, quando comparados entre si e estatisticamente diferentes quando comparados aos grupos que não foram submetidos a periodontite experimental (Tabela 6).

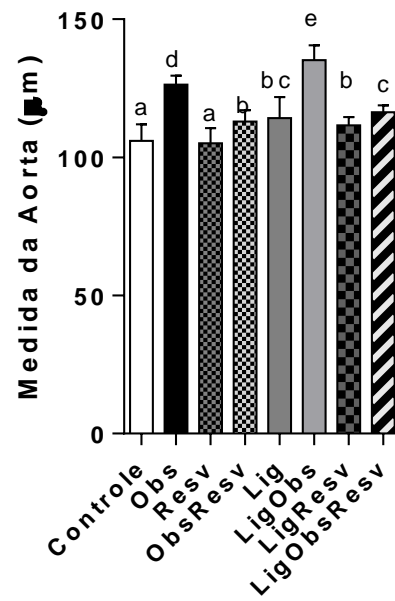
**Tabela 6** - Resultados da análise morfométrica da gengiva. As letras correspondem às comparações dentro do mesmo parâmetro. (parâmetro C, parâmetro E, parâmetro H e parâmetro L - as letras são para serem vistas sempre dentro da mesma coluna). Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros.

Grupos	C	E	H	L
<b>CTL</b>	476.09 $\pm$ 107.57A	337.76 $\pm$ 82.62A	504.04 $\pm$ 103.94A	325.77 $\pm$ 70.95A
<b>OBS</b>	526.23 $\pm$ 78.96A	418.01 $\pm$ 46.73A	531.70 $\pm$ 92.98A	335.16 $\pm$ 94.71A
<b>RSV</b>	481.37 $\pm$ 43.97A	373.77 $\pm$ 51.15A	495.60 $\pm$ 121.27A	331.91 $\pm$ 31.84A
<b>OBS RSV</b>	510.32 $\pm$ 129.37A	417.56 $\pm$ 48.03A	538.77 $\pm$ 65.33A	345.87 $\pm$ 31.64A
<b>LIG</b>	839.61 $\pm$ 216.65B	525.06 $\pm$ 103.51B	812.85 $\pm$ 194.38B	482.95 $\pm$ 89.96B
<b>LIG OBS</b>	706.42 $\pm$ 140.87B	539.65 $\pm$ 137.48B	769.43 $\pm$ 134.44B	479.72 $\pm$ 81.33B
<b>LIG RSV</b>	850.32 $\pm$ 145.39B	530.77 $\pm$ 65.45B	713.69 $\pm$ 144.02B	550.54 $\pm$ 94.69B
<b>LIG OBS RSV</b>	749.32 $\pm$ 136.65B	548.98 $\pm$ 46.40B	720.23 $\pm$ 108.02B	468.18 $\pm$ 32.82B

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

## 7.6. Análise histomorfométrica da aorta abdominal.

A média da espessura das paredes das artérias abdominais mostrou diferença estatisticamente significativa em todos os grupos, sendo que os grupos CON e RSV apresentaram a menor espessura, e o grupo LIG OBS apresentou a maior espessura das túnicas ( $p < 0.05$ ) (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Análise morfométrica da aorta abdominal para mensuração da largura das paredes da artéria dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão e estão expressos em micrômetros. Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes, com  $p < 0.05$ .



## 8. DISCUSSÃO

O glutamato monossódico (MSG) é uma substância neurotóxica que causa lesões no hipotálamo e no núcleo arqueado quando aplicado na região subcutânea e no período neonatal em ratos, gerando um descontrole entre a absorção e o gasto energético, levando a obesidade (BRANDELEIRO *et al.*, 2012, FERNANDES *et al.*, 2012). A administração de MSG provocou aumento no índice de Lee dos grupos obesos, com diferença significativa entre os grupos tratados, mas não houve diferença entre os grupos de MSG. Essa variável fica evidente nesse modelo de obesidade devido a este tratamento poder resultar em numerosas anormalidades endócrinas e comportamentais, tais como perturbações do crescimento, produção de glicocorticóides, obesidade e hipogonadismo (CUNHA *et al.*, 2010). Houve também maior acúmulo de gordura retroperitoneal e perigonadal (Tabela 1), o que corrobora com o estudo de Costa e colaboradores (COSTA *et al.*, 2017; GASPAR *et al.*, 2016). Também é possível notar que o peso dos animais que sofreram a indução da obesidade através do MSG também foi menor quando comparado aos demais animais, e isso se deve ao fato de o MSG provocar alterações endócrinas dentre seus efeitos colaterais, alterando a secreção do hormônio do crescimento, fazendo com que esses animais apresentassem menor tamanho (MIRANDA *et al.*, 2014, MAITER *et al.*, 1991, COSTA *et al.*, 2017).

Além da indução da obesidade, também foi administrado o resveratrol aos animais, que é um composto natural, polifenol não flavonóide que está presente em mais de 72 vegetais, apresenta um caráter antiinflamatório e antimicrobiano no tratamento da doença periodontal (ANDREOU *et al.*, 2004).

Assim sendo, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar se o resveratrol poderia modular e diminuir os efeitos deletérios da doença periodontal e da obesidade, e também das duas doenças associadas e seus efeitos sistêmicos. O presente estudo demonstrou que o resveratrol foi capaz de diminuir os níveis de colesterol e triglicerídeos nos animais obesos, o que pode ser explicado pela sua atividade antioxidante e redutora de triglicerídeos proposta por Belguendouz em 1998 e juntamente com sua capacidade de interromper o

transporte de colesterol pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), ocasionando uma redução de eventos cardiovasculares.

Os resultados do perfil lipídico, neste estudo, demonstraram que os animais dos grupos obesos apresentaram uma concentração de colesterol e triglicerídeos maiores quando comparados a ambos os grupos controles, corroborando com o estudo de Costa *et al.* (2017), que demonstrou um aumento nos níveis de colesterol e triglicerídeos, associados ou não a doença periodontal induzida, sugerindo que a periodontite não influenciaria no aumento destes parâmetros, corroborado pelo estudo de Shridar *et al.*, que também não demonstrou a influência da doença periodontal nestes parâmetros analisados. O presente estudo também demonstrou uma diminuição nos níveis destes marcadores lipídicos, quando da administração do resveratrol. Li *et al* (2018) demonstraram em um estudo com animais obesos que o uso de resveratrol reverteu significativamente o aumento do colesterol total e triglicerídeos que ocorreu em ratos obesos. Esses efeitos podem indicar que o resveratrol pode regular o metabolismo lipídico em camundongos hiperlipidêmicos. Os efeitos do resveratrol no metabolismo lipídico sugerem que ele pode ser usado para tratar pacientes com distúrbios associados à hiperlipidemia (LI *et al*, 2018).

Entretanto a obesidade pode influenciar diretamente a resposta vascular do hospedeiro, alterando a rede de citocinas e resultando na liberação aumentada das mesmas, tendo influência na etiopatogenia da doença cardiovascular, causando alterações endoteliais e permitindo maior adesão e fixação de placas de colesterol no endotélio (ARAÚJO, 2013). Neste estudo, foi possível observar que as espessuras das túnicas das aortas abdominais apresentaram-se maiores nos animais obesos e que apresentavam doença periodontal concomitante, sugerindo uma alteração endotelial a partir das alterações inflamatórias.

Em relação ao tecido gengival, os resultados do presente estudo não demonstraram diferenças nas análises dos grupos de animais com obesidade, uso de resveratrol e sem periodontite. Atualmente, o mecanismo para esclarecer a relação entre obesidade e o crescimento gengival é pouquíssimo estudado. No estudo de Al-Zahani *et al.* (2013) analisou-se a expressão de

defensinas humanas beta (HBD) como um mecanismo possível, através do qual o sistema imunológico inato afeta a suscetibilidade para periodontite em indivíduos obesos, entretanto o estudo não revelou diferenças na expressão de defensinas humanas beta -1 e -2 (HBD-1e HBD-2) entre obesos e participantes com peso normal. Logo, a expressão de HBD-2 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os pacientes com periodontite do que indivíduos adultos saudáveis. A indução dessas respostas não era mediada por lipopolissacarídeos (LPS), que propõem que a regulação da indução destes mediadores da imunidade inata na mucosa oral é controlada por mecanismos mais complexos do sistema imune inato (Al-ZAHANI *et al.*, 2013; COLTRI *et al.*, 2017).

Ainda nos grupos com periodontite induzida, neste estudo, a altura e espessura gengival se mostraram significativamente maiores, caracterizando desta forma não somente alterações histopatológicas, mas também um aumento de volume gengival, típico na presença de periodontite, provavelmente devido à existência do biofilme bacteriano (COLTRI *et al.*, 2017). Baseados nestes resultados podem afirmar que o modelo deste estudo cumpriu com os requisitos experimentais de periodontite.

Na análise do tecido ósseo, constata-se nesse estudo uma perda óssea alveolar mais acentuada nos animais que tiveram a periodontite induzida, sendo essa diferença mais evidente no grupo LIG. Os estudos que mostram a relação da obesidade com a doença periodontal, por vezes nos trazem que a perda de inserção nos animais obesos é maior, contribuindo para uma maior perda óssea, porém podendo variar de acordo com a dieta submetida ao animal e ao tipo de modelo experimental, o que não acontece nesse estudo (NASCIMENTO *et al.*, 2013; VERZELETTI, 2012). A doença periodontal e sua progressão podem ser modificadas por diversos fatores de ordem biológica, ambiental e comportamental, sugerindo que as citocinas criadas pelo tecido adiposo, poderiam atuar como moduladores no processo inflamatório, sugerindo também que a inflamação sistêmica dos obesos poderiam afetar a susceptibilidade a doenças crônicas, como por exemplo, a periodontite (PERLSTEIN e BISSADA, 1977; CAVAGNI *et al.*, 2013).

Embora a obesidade seja considerada um fator de risco para saúde pública, encontra-se evidências na literatura mostrando um efeito protetor do tecido adiposo sobre o tecido ósseo (COLAIANNI *et al.*, 2014, EVANS *et al.*, 2015). Isso se deve a um aumento no índice de massa corporal ocasionando um aumento na densidade mineral óssea, considerando que a carga excessiva exercida pelo sobrepeso atue como efeito benéfico para a formação óssea (COLAIANNI *et al.*, 2014, LECKA-CZERNIK *et al.*, 2015 & MAGGIO *et al.*, 2014), através da redução da apoptose, aumento da diferenciação de osteoblastos e estimulação da matriz óssea (EHRLICH.; LANYON., 2002). Os resultados apresentados nesse estudo mostraram um aumento estatisticamente significativo na quantidade de osteoblastos e osteócitos no grupo LIG OBS quando comparado ao grupo com periodontite somente (Tabela 5), sendo corroborado pelo estudo de Costa *et al.* (2017). Ainda outros estudos demonstram que o hormônio produzido pelo tecido adiposo conhecido como leptina, poderia induzir a diferenciação das células estromais da medula óssea em osteoblastos, levando ao aumento da mineralização da matriz extracelular (PROUTEAU *et al.*, 2006, BANDEIRA, 2007).

O resveratrol também demonstrou um efeito protetor na perda óssea alveolar, onde ocorreu uma diminuição estatisticamente significativa na distância da crista óssea alveolar até junção cimento-esmalte dos animais do grupo LIG RSV (Gráfico 2 e Tabela 4), quando comparado ao grupo somente com periodontite experimental induzida (LIG), além de um aumento estatisticamente significativo na quantidade de osteoblastos e osteócitos no grupo LIGRSV quando comparado ao grupo LIG (tabela 5), corroborando com Bhattarai *et al.* em 2016, que estudaram a relação do resveratrol na modulação da inflamação pelos fibroblastos gengivais, e concluíram através de análise histológica que a administração do resveratrol (5mg/kg de peso corporal) melhorou a perda óssea alveolar mediada por ligadura em ratos.

Casati *et al.* (2013) avaliaram o efeito da administração contínua do resveratrol na progressão da doença periodontal induzida experimentalmente em 24 ratos. Após 115 dias de experimento, os animais foram eutanasiados e as hemimandíbulas coletadas para análise morfométrica, na qual as

comparações intra-grupos mostraram diferenças significativas na perda óssea alveolar entre os animais com e sem ligadura em ambos os grupos, demonstrando a efetividade da indução da doença periodontal. Quando realizadas comparações intergrupos, analisando os molares com ligadura, o grupo controle exibiu maiores valores de perda óssea alveolar ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo que recebeu tratamento com resveratrol. Da mesma forma ocorreu nas análises intergrupos para os molares sem ligadura, corroborando com os resultados de nosso estudo, onde os grupos que receberam resveratrol apresentaram uma perda óssea alveolar significativamente menor em relação ao grupo apenas com periodontite induzida (Tabelas 4 e 5 e gráfico 2).

Embora haja de fato um potencial terapêutico do resveratrol na modulação inflamatória, ainda não há registros na literatura que expliquem quais os mecanismos exatos que essa substância atua para estimular tal efeito. Casati *et al.*, (2013) em seu estudo afirmam que mecanismos adicionais dessa via precisam ser esclarecidos, porém algumas descobertas demonstraram que o resveratrol pode reduzir a expressão de outros marcadores, incluindo IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), em diferentes modelos experimentais, embora muitos outros mediadores inflamatórios (IL-6, IL-8, IL-10, IL-23, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e fatores relacionados ao osso (osteoprotegerina [OPG], RANK e RANK ligante [RANKL]) estejam relacionados ao estabelecimento da periodontite. Assim, esses achados podem parcialmente sugerir a modulação da resposta inflamatória imune pelo resveratrol, porém estudos adicionais devem ser realizados.

## **CONCLUSÕES**

O resveratrol apresentou um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar em animais obesos com periodontite induzida. Entretanto não apresentou efeito sobre os tecidos gengivais nos grupos com a presença da doença periodontal.

Os animais obesos também apresentaram concentração de triglicerídeos e colesterol maiores que os demais animais sendo que os que receberam a dieta com resveratrol tiveram redução nesses padrões, melhorando assim o perfil lipídico dos animais, com ou sem periodontite experimental induzida.

## REFERÊNCIAS GERAIS

ADIBRAD, M.; DEYHIMI, P.; GANJALIKHANI HAKEMI, M.; BEHFARNIA, P.; SHAHABUEI, M.; RAFIEE, L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. **Journal of periodontal research**, 47(4): 525-531, 2012.

ALLENSPACH-PETRZILKA, G. E.; GUGGENHEIM, B. Bacterial invasion of the periodontium: an important factor in the pathogenesis of periodontitis?. **Journal Clinical of Periodontology**, 10(6):609-17. Nov, 1983.

AL-ZAHRANI, M. S.; ZAWAW, K. H.; ALTAF, F. M. The effect of obesity and periodontitis on the expression of antimicrobial peptides in gingival tissues. **Saudi Medical Journal**. 34(5):525-30. 2013.

AMAR, S.; ZHOU, Q.; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, Y.; LEEMAN, S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 104(51):20466-71. 2007.

ANDREOU, V.; D'ADDARIO, M.; ZOHAR, R.; SUKHU, B.; CASPER, R. F.; ELLEN, R. P.; TENENBAUM, H. C. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. **Journal of Periodontology**. Jul;75(7):939-48, 2004.

ARAÚJO Jr, R. F.; SOUZA, T. O.; MEDEIROS, C. A. X.; SOUZA, L. B.; FREITAS, M. L.; LUCENA, H. F.; ALVES, M. S. C. F.; ARAÚJO, A. A. Carvedilol decrease il-1 $\beta$  and tnf- $\alpha$ , inhibits mmp-2, mmp-9, cox-2, and rankl expression, and up-regulates opg in a rat model of periodontitis. **Plos One**. 8(7):1-6, 2013.

ASIKAINEN, S. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and spirochetes in relation to age localized juvenile periodontitis. **Journal Clinical of Periodontology**, 57(9):537-41. 1986.

ATMANSPACHER, C. A. Efeito do resveratrol na liberação de citocinas anti- e pró-inflamatórias na periodontite experimental. Estudos em ratos. **Anais do**

**Conic-Semesp**, volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. ISSN 2357-8904.

BANDEIRA, F. A. A obesidade realmente fortalece os ossos? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**.51(6):895-897, 2007.

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

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence". **Nature Reviews Drug Discovery**. 5 (6): 493–506. doi:10.1038/nrd2060. PMID 16732220. 2006.

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 mai. 2017.

BELGUENDOUZ, F. L.; GOZZELINO, M.T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v. 15:55; p. 811-6, 1998.  
BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B.D. Correlation between "lee index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**. 40:527-528. 1968.

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.; BIONDI, FILHO O.; POMILIO, A.; ALVES, P. E. V. Doença periodontal e obesidade: existe alguma relação? Periodontal disease and obesity: there is a relationship? **Revista de Ciências Médicas**, 19(1-6):65-72, 2010.

BERTRAND, R. L.; SENADHEERA, S.; MARKUS, I.; LIU, L.; HOWITT L.; CHEN, H. A Western diet increases serotonin availability in rat small intestine. **Endocrinology**, v. 152, n. 1, p. 36-347, 2011.



BHATTARAI, G.; POUDEL, S. B.; KOOK, S.; LEE, J. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. **Acta Biomaterialia**. 2015.

BINGUENDOZ, L.; FREMONT, L.; LUIARD, A. Resveratrol inhibits metal ion-dependent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochemical Pharmacology**, v.53, p.1347, 1997.

BO, S.; CICCONE, G.; CASTIGLIONE, A.; GAMBINO, R.; De MICHIELI, F.; VILLOIS, P.; DURAZZO, M.; CAVALLO-PERIN, P.; CASSADER, M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of resveratrol in healthy smokers a randomized, double-blind, placebocontrolled, cross-overtrial. **Current Medicinal Chemistry Journal**. 20 (10), 1323–133, 2013.

BORGES, L. P.; TEREZAN, M. L. F.; BITTENCOURT, M. S. P. Obesidade como fator de risco à doença periodontal: revisão de literatura. *Brazilian Journal of periodontology*, 23(02): 33-38, 2013.

BRADAMANTE, S.; BARRENGHI, L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effect of resveratrol. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 22, p. 169-88, 2004.  
BRANDELERO, J. S.; BONFLEUR, M. L.; RIBEIRO, L. A.; VANZELA, E. C.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Decreased *tnf- $\alpha$*  gene expression in periodontal ligature in msg obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? **Archives of Oral Biology**, 57, 3, 300-306, 2012.

BRANDELERO JR, S.; BONFLEUR, M. L.; RIBEIRO, R. A.; VANZELA, E. C.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; BALBO, S. L. Decreased TNF- $\alpha$  gene expression in periodontal ligature in MSG obese rats: A possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Archives of Oral Biology*, v.57, n.3, p.300-306, 2012.

BRASIL, **Pesquisa Nacional de Saude Bucal-2010**. Disponível em: <[http://www.idisa.org.br/img/File/SAUDE%20BUCAL-NotaParaImprensa-28dez2010%20\(2\).pdf](http://www.idisa.org.br/img/File/SAUDE%20BUCAL-NotaParaImprensa-28dez2010%20(2).pdf)>. Acesso em: 15 de julho de 2017.

BURT, B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. **Journal Clinical of Periodontology**, 76:1406–1419, 2005.

CALIXTO, J. B. *et al.* Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med** 2004; 70:93-103.

CASATI, M. Z.; ALGAYER, C.; CARDOSO DA CRUZ, G.; RIBEIRO, F. V.; CASARIN, R. C.; PIMENTEL, S. P.; CIRANO, F. R. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**. 84:58–64. 2013.

CAVAGNI, J.; WAGNER, T. P.; GAIO, E. J.; CITO, R. O.; REGO, C.; TORRES I. L. S. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. **Archives of Oral Biology**, 58, 8, 1034-1039, 2013.

CIRANO, F. R.; CASARIN, R. C. V.; RIBEIRO, F. V.; CASATI, M. Z.; PIMENTEL, S. P.; TEIETE, T.; BERNARDI, M. M. Effect of Resveratrol on periodontal pathogens during experimental periodontitis in rats. **Brazilian Oral Research**. ;30(1):e128. 2016.

CHAO, H. H.; JUAN, S. H.; LIU, J. C.; YANG, H. Y.; YANG, E.; CHENG, T. H.; SHY, K. G. Resveratrol inhibits angiotensin II – induced endothelin 1 gene expression and subsequent proliferation in rat aorta smooth muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 515, p. 1-9, 2005.

COLAIANNI, G.; BRUNETTI, G.; FAIENZA, M. F.; COLUCCI, S.; GRANO M. Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. **The World Journal of Orthopedics**, 5, 3, 242-246, 2014.

COLTRI, B. M.; COSTA, K. F.; PONTILLO, V.; BONFLEUR, M. L.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BEU, C. C. L.; PEDROTTI, S.; NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A. Avaliação morfométrica da influência da obesidade sobre o tecido gengival de ratos com periodontite experimental. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. 21(2): 127-132, 2017.

COSTA, K. F.; BONFLEUR, M. L.; PONTILLO, V.; PEDROTTI, S.; BERNARDON, P.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BEU, C. C. L.; NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A. Evaluation of Periodontal Tissues and Abdominal Aorta of Rats with Induced Obesity by Monosodium Glutamate and Experimental Periodontitis. **British Journal of Medicine & Medical Research**. 19(2): 1-14, 2017.

CRISTERSSON, C. E.; DUNFORD, R. G.; GLANTZ, P. O.; BAIER, R.E. Effect of critical surface tension or retention of oral microorganisms. **Scandinavian Journal of Dental Research**, 97(3):247-56. 1989.

CUNHA, N. V.; ABREU, A. S.; PANIS, C.; GRASSIOLI, S.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; MAZZUCO, T. L.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**. 87(11-12): 375-81, 2010.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S.; MAIS, A.T. Estrogens, the immune response and autoimmunity. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.13, n.2, p.217-26, 1995.

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

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: Preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p.377-95, 2005.

DERRIDA, M. Resveratrol: Human clinical studies on resveratrol. Disponível na Internet. <http://www.nanotech.com.cn/CGI-BIN/hbv/messages/766.html>, 2005. Acesso em: 23/07/2017.

DUARTE, P. M. *et al.* Expression of immune-inflammatory markers in sites of chronic periodontitis in patients with type 2 diabetes. **Journal Clinical of Periodontology**, 83:426-34, 2012.

EHRlich, P. J.; LANYON, L. E. Mechanical strain and bone cell function: a review. **Osteoporosis International**. 13(9):688-700, 2002.  
EVANS, A. L.; PAGGIOSI, M. A.; EASTELL, R. & WALSH, J. S. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. **The Journal of Bone and Mineral Research**, 30, 5, 920-928, 2015.

FARMER, S. R.; AUWERX, J. Adipose tissue: new therapeutic targets from molecular and genetic studies. IASO Stock Conference 2003 report. **Obesity Reviews**, 5: 189-196, 2004.

FELIPETTI, F. A.; SILVA, E. O.; RANGEL, A. L. C. A.; NASSAR, C. A.; BONFLEUR, M. L.; BALBO, S. L, *et al.* Evaluation of Alveolar Bone Mandibular of rats obese induced at monossodium glutamate undergoing modified duodenal-jejunal bypass surgery. **Journal of Endocrinology & Metabolism**. 4: 93-100. 2014.

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

FINUCANE, M. M.; STEVENS, G. A.; COWAN, M. J.; DANAEI, G.; LIN, J. K.; PACIOREK, C. J.; SINGH, G. M.; GUTIERREZ, H. R.; LU, Y.; BAHALIM, A. N.; FARZADFAR, F.; RILEY, L. M.; EZZATI, M. Global burden of metabolic risk factors of chronic diseases collaborating group (Body Mass Index). National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. **The Lancet**. 377(9765): 557-567, 2011.

FERNANDES, S. A. G.; ARENA, A. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DAMASCENO, D. C. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 10, 105, 2012.

FISHER-POSOVSZKY, P. *et al.* Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. **The American Journal of Clinical Nutrition**. Jul;92(1):5-15. doi: 10.3945/ajcn.2009.28435. 2010.

FORD, P. J.; GAMOMAL, J.; SEYMOUR, G. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. **Brazilian Journal of Periodontology**. 2000 2010; 53:111-123.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; KINSELLA, J. E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **The Lancet**, v.347, p. 1103-4, 1993.

FRÉMONT, L. Minireview – Biological effects of resveratrol. **Life Science**, v. 66, p. 663-673, 2000.

FU, J.; OVEISI, F.; GAETANI, S.; LIN, E.; PIONELLI, D. Oleoylethanolamide, naendogenous PPAR-alpha agonist, lowers body weight and hyperlipidemia in obese rats. **Neuropharmacology**, 48: 1147-1153, 2005.

GAMBELLI, L.; SANTARONI, G. P. Polyphenols content in some Italian red wines of different geographical origins. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17 (5): 613-618, 2004.

GASPAR, R. S.; BENEVIDES, R. O.; FONTELLES, J. L.; VALE, C. C.; FRANÇA, L. M.; BARROS, P. de T. et al. Reproductive alterations in hyperinsulinemic butnormoandrogenic MSG obese female rats. **Journal of Endocrinology**, 229, 2, 61-72, 2016.

GAO, Y. H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. **International Journal of Molecular Medicine**. March, 2000. Disponível em: <http://www.spandidos-publications.com/ijmm/5/3/261>. Acesso em: 14/10/2017.

GEHN, B. D.; MCANDREWS, J. M.; CHIEN, P-Y.; JAMESON, J. L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is the agonist for the estrogen receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.94, p. 1438-1443, 1997.

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

GUIMARÃES, M. R. *et al.* Potent anti-inflammatory effects of systemically administered curcumin modulate periodontal disease *in vivo*. **Journal Clinical of Periodontology**, 46: 269-279, 2011.

IACOPINO, A.M.; CUTLER, C.W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **Journal Clinical of Periodontology**, vol.71.n.8. August, 2000.

KELLER, A.; ROHDE, J. F.; RAYMOND, K.; HEITMANN, B. L. Association between periodontal disease and overweight and obesity: A systematic review. **Journal of Periodontology**, 86 (6): 766-776, 2015.

ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. **Journal of Autoimmunity**, v.60, p.1-11, 2015.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Working Group 2 of Seventh European Workshop on Periodontology. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions-consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **Journal Clinical of Periodontology**, 38(11): 44-48, 2011.

KHADER, Y. S.; BAWADI, H. A.; HAROUN, T. F.; ALOMARI, M.; TAYYEM, R. F. et al. The association between periodontal disease and obesity among adults in Jordan. **Journal Clinical of Periodontology**. 36(1):18-24. 2009.

KHOSRAVI, R.; KA, K.; HUANG, T.; KHALILI, S.; NGUYEN, B.H.; NICOLAU, B.; TRANIS, S. D. Tumor Necrosis Factor- and Interleukin-6: Potential Interorgan Inflammatory Mediators Contributing to Destructive Periodontal Disease in Obesity or Metabolic Syndrome. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013. p. 1-6, 2013.

KUMLER RESEARCH GROUP. Coordenador Dr. Philip Kumler. **Desenvolvido pela SUNY Fredonia Department of Chemistry and Biochemistry**. 2004/2005. Focalizado em vários aspectos de química do resveratrol. Disponível em: [http://www.fredonia.edu/chemistry/RESEARCH\\_0405/KumlerGroup.asp](http://www.fredonia.edu/chemistry/RESEARCH_0405/KumlerGroup.asp). Acesso em: 25 maio, 2017.

LANZILLI, G.; COTTARELLI, A.; NICOTERA, G.; GUIDA, S.; RAVAGNAN, G.; FUGGETTA, M. P. Antiinflammatory effect of resveratrol and polydatin by in vitro IL-17 modulation. **Inflammation**, 35(1):240-8, 2012.

LECKA-CZERNIK, B.; STECHSCHULTE, L. A.; CZERNIK, P. J.; DOWLING, A. R. 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. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 410, 35, 2015.

LEONARD, S. S.; XIA, C.; JIANG, B.; STINEFELT, B.; KLANDORF, H.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 309: 1017-1026, 2003.

LESTER, S. R.; BAIN, J. L.; JOHNSON, R. B.; SERIO, F. G. Gingival Concentrations of Interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of Clinical Attachment Loss. **Journal of Periodontology**, 78(8):1545-1550, 2007.

LI, X. N.; MA, L. Y.; JI, H.; QIN, Y. H.; JIN, S. S.; XU, L. X. Resveratrol protects against oxidative stress by activating the Keap-1/Nrf2 antioxidant defense system in obese-asthmatic rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 16(6):4339-4348, 2018.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P., Clinical periodontology and implant dentistry. **Copenhagen: Blakwell Munksgaard**. 5th edition. 2010.

LUNDIN, M.; YUCEL-LINDBERG, T.; DAHLLOF, G.; MARCUS, C.; MODEER, T. Correlation between TNF-alpha in crevicular fluid and body mass index in obese subjects. **Acta Odontologica Scandinavica**. 62(5):273-7. 2004.

MAGGIO, A. B.; BELLI, D. C.; PUIGDEFABREGAS, J. W.; RIZZOLI, R.; FARPOUR-LAMBERT, N. J.; BEGHETTI, M. High bone density in adolescents with obesity is related to fat mass and serum leptin concentrations. **The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, 58, 6, 723-728, 2014.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. 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, 1991.

MEYER, A. S.; YI, O. S.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation in relation to composition of phenolic antioxidants in grapes (*Vitisvinifera*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 1638, 1997.

MIRANDA, R. A.; AGOSTINHO, A. R.; TREVENZOLI, I. H.; BARELLA, L. F.; FRANCO, C. C.; TROMBINI, A. B. 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, 2014.

NAGASAWA, T.; KIJU, M.; YASHIRO, R.; HORMDEE, D.; LU, H.; KUNZE, M.; SUDA, T.; KOSHZ, G.; KOBAYASHI, H.; ODA, S.; NITTA, H.; ISHIKAWA, I. Roles of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand ( RANKL) and osteoprotegin in periodontal health and disease. **Journal Clinical of Periodontology**, v. 43. p. 65-84, 2007.

NAKATA, R.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. Recent advances in the study on resveratrol. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 35 (3), 273–279, 2012.  
NANCI, A.; BOSSHARDT, D. D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Journal Clinical of Periodontology**, v. 40. p. 11-28, 2006.

NASCIMENTO, L. C.; MENDES, I. J. M.; Perfil de Saú- de dos Trabalhadores de um Centro de Saúde-Escola. **Revista Latino-americana de Enfermagem**. 10(4):502-8. 2002.

NASCIMENTO, C. M.; CASSOL, T.; SILVA, F. S.; BONFLEUR, M. L.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity**, 6:365–370, 2013.

NASSAR, C. A.; BATTISTETTI, G. D.; NAHSAN, F. P.; OLEGÁRIO, J.; MARCONATO, J.; MARIN, C. F.; FACCIONI, D. M.; DA COSTA, K. F.; KOTTWITZ, L. B.; NASSAR, P. O. Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis--an animal study. **Journal of the International Academy of Periodontology**. Jan; 16(1):2-7, 2014.

NASSAR, P.O.; NASSAR C.A., GUIMARÃES, M.R.; AQUINO, S.G.; ANDIA, D.C.; MUSCARA, M. N.; SPOLIDORIO, D.M.; ROSSA, C.JR.; SPOLIDORIO, L.C. Simvastatin therapy in cyclosporine A- induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, 44(4):479-88. 2009.

NEMES, A. Aortic elasticity alterations in obesity--even in children! **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism**. v. 21, n. 11, p. 1029-30. 2008.

NISHII, D. Efeito clínico do uso sistêmico do resveratrol associado ou não à antibioticoterapia no tratamento da periodontite agressiva generalizada. **Dissertação de Mestrado**. São Paulo, 2017.



O'CONNOR, D. J.; WONG, R. W.; RABIE, A. B. Resveratrol Inhibits Periodontal Pathogens *In Vitro*. **Phytotherapy Research**. Nov 25(11):1727-1731, 2011.

OAK, M. H.; EL BEDOUI, J.; SCHINI-KETH, V. B. Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.16, p.1-8, 2005.

OLIVEROS, E.; SOMERS, V. K.; SOCHOR, O.; GOEL, K.; LOPEZ-JIMENEZ, F. The concept of normal weight obesity. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v.56, n. 4, p. 426–433, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pcad.2013.10.003>>.

PACE-ASCIAK, C.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D. The red wine phenolics trans-resveratrol and quecetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Phytotherapy Research**, v. 235, p. 207-19, 1995.

PAGE, R.C. The Pathobiology of periodontal disease may affect systemic diseases: Inversion of a paradigm. **Annals of Periodontology**, vol 3. N1. July, 1998.

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

PARK, E. J.; PEZZUTO, J. M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. **Biochimica et Biophysica Acta**.1852(6):1071113. . doi:10.1016/j.bbadis.2015.01.014. 2015.

PATARO, A. L.; COSTA, F. O.; CORTELLI, S. C.; CORTELLI, J. R.; ABREU, M.H. N. G.; COSTA, J. E. Association between severity of body mass index and periodontal condition in women. **Clinical Oral Investigations**, v. 16. .p. 727 - 734, 2012.

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

PIVETA, M. Estudos sugerem que compostos do vinho tinto aumentam a longevidade. **Boletim da FAPESB**, v. 112, p. 44-47, 2005.

PROUTEAU, S.; BENHAMOU, L.; COURTEIX, D. Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight reduction and weight regain in male and female judoists. **The European Journal of Endocrinology**. 154(3):389- 395, 2006.

RAY, P. S.; MAULIK, G.; CORDIS, G. A.; BERTELLI, A. A.; BERTELLI, A.; DAS, D. K. The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, p. 160-169, 1999.

REINHARDT, R. A. *et al.* Association of gingival crevicular fluid biomarkers during periodontal maintenance with subsequent progressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, 8: 251-259, 2010.

RIBEIRO, F. V.; PINO, D. S.; FRANCK, F. C.; BENATTI, B.B.; TENENBAUM, H.; PERIO, D.; DAVIES, J.E.; PIMENTEL, S.P.; CASARIN, R.C.; CIRANO, F.R.; CASATI, M. Z. Resveratrol Inhibits Periodontitis Related Bone Loss in Rats Submitted to Cigarette Smoke Inhalation. **Journal of Periodontology**. May 11:1-16, 2017.

RITCHIE, C. S.; KINANE, D. F. Nutrition, inflammation and periodontal disease. **Nutrition**. 19(5):475-6. 2003.

RIZZO, A.; BEVILACQUA, N.; LUIGI, G.; ANNUNZIATA, M.; ROMANO, C. C.; PAOLILLO, R. Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. **Cytokine** 60. 197–204, 2012.

RODRIGUES, A. Z.; KAWATA, V. K. S.; JÚNIOR, A. B. N.; SOUZA, S. L. S.; GRISI, M. F. M.; PALLOTO, D. B.; JÚNIOR, M. T. 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. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

ROTONTO, S.; RAJTAR, G.; MANARINIS, S.; CELARDO, A.; ROTILLO, D.; DE GAETANO, G.; EVANGELISTA, V.; CELETTI, C. Effect of trans-resveratrol, a natural polyphenolic compound, on human polymorphonuclear leukocyte function. **British Journal of Pharmacology**, 123:1691-1699, 1998.

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

SANTOS, T.; VASCONCELOS, R. M.; CARDOSO, L.; FAGUNDES, J.; ALVES, E. S.; RAMALHO, L. M. P. Evidências da interação entre obesidade e doença periodontal: Uma revisão de literatura. *Brazilian Journal of periodontology*. 24(1):35-40, 2014.

SAMPEY, B. P.; VANHOOSE, A. M.; WINFIELD, H. M.; FREEMERMAN, A. J.; MUEHLBAUER, M. J.; FUEGER, P. T.; NEWGARD, C. B.; MAKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity Reviews**, v. 6, p. 1109-1117, 2011.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. **Appetite**, v. 52, p. 34–38, 2009.  
SINCLAIR, D. A natural substance found in red wine is shown to extend lifespan in mice. Disponível na Internet.  
[http://websites.afar.org/site/PageServer?pagename=IA\\_feat46](http://websites.afar.org/site/PageServer?pagename=IA_feat46). 5nov. 2006.  
Acesso em: 13/05/2017.

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

SOLEAS G. J.; DIAMANDIS E. P.; GOLDBERG D. M. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clinical Biochemistry**, 30: 91-112, 1997.

SOUTO, R.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COLOMBO, A. P. V.; Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45(2), 2014.

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.

SPERETTA, G. F. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v.13, n. 1. p. 61-69, 2014.

SRIDHAR, R.; BYAKOD, G.; PUDAKALKATTI, P.; PATIL, R. A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. **International Journal of Dental Hygiene**. 7:144-150, 2009.

STERVBO, U.; VANG, O.; BONNESEN, C. "A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine". **Food Chemistry** 101 (2): 449-457. doi:10.1016/j.foodchem. 2006.01.047.

SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. **J. Clin.Diag. Res.**, v. 8, n.4, p. ZE01- ZE03, 2014.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, obesity and diabetes. **European Journal of Pharmacology**, 635(1-3):1-8, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre, editora: Artmed, terceira edição, p.719.2004.

TOMERA, J. F. Current knowledge of the health benefits and disadvantages of wine consumption. **Food Science & technology**, 10: 129-138, 1999.

TONETTI, M. S.; CLAFFEY, N.; European Workshop in Periodontology group C. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. Group C consensus report of the 5th European. Workshop in Periodontology. **Journal of Clinical Periodontology**, 32(6): 210-213, 2005.

UNGER, R. H.; ZHOU, Y.T. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. **Diabetes**, 50: S11-S121, 2001.

URPÍ-SARDÀ, M.; JÁUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; JAEGER, W.; MIKSITS, M.; COVAS, M. I.; ANDRES-LACUEVA, C. Uptake of diet resveratrol into the human low-density lipoprotein. Identification and quantification of resveratrol metabolites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.77, p.3149, 2005.

VALENZANO, D. R.; TERZIBASI, E.; GENADE, T.; CATTANEO, A.; DOMENICI, L.; CELLERINO, A. "Resveratrol Prolongs Lifespan and Retards the Onset of Age-Related Markers in a Short-Lived Vertebrate." **Current Biology**. Feb 7;16 (3):296–300 PMID 16461283. 2006.

VEIRA, C. L. Z. Relação entre doenças periodontais e aterosclerose subclínica em indivíduos com hipercolesterolemia familiar. São Paulo, SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008. **Tese**.

VERZELETTI, G. N.; GAIO, E. J.; LINHARES, D. S.; ROSING, C. K. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. **Journal of Applied Oral Science**. 20, 2, 218-221, 2012.

VIEIRA, F. *et al.* Cytokines and bone-related factors in systemically healthy patients with chronic periodontitis and patients with type 2 diabetes and chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, 82: 1187-1196. 2011.

VOLTERA, A. F.; CESARETTI, M. L. R.; GINOZA, M.; KOHLMANN JR, O. Efeito da indução da obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.52, nº 1, p. 47-54, 2008.

WANG, K.; KIM, M. K.; DI CARO, G.; WONG, J.; SHALAPOUR, S.; WAN, J.; ZHANG, W.; ZHONG, Z.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; WU, L.; TANIGUCHI, K.; FENG, Y.; FEARON, E.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Interleukin-17 Receptor A Signaling in Transformed Enterocytes Promotes Early Colorectal Tumorigenesis. **Cell Press**, 41(6):1052-1063, 2014.

WATERHOUSE, A. L. Wine and heart disease. **Chemistry & Industry**, p. 338-341. 1995.

WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism e bioavailability of *trans*-resveratrol. **Molecular Nutrition & Food Research**, V. 49, p. 472-81, 2005.

WHO **Global InfoBase**. Geneva. Disponível em:  
<http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=116&dm=5&iso=ZZZ&searchButton=Search+Surveys>. 2012. Acesso em: 15/08/2013.

WHO **Global InfoBase**. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. 2016. Acesso em:  
16/02/2018 Search+Surveys.

YAO, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. **The Journal of Immunology**. 155:5483-5486, 1995.

YOUNG, P.; ARCH, J. R. S.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. **The Federation of European Biochemical Societies Letters**. V. 167, p. 10-14.1984.

**APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO 1****EVALUATION OF THE EFFECT OF RESVERATROL ON THE PERIODONTAL TISSUES OF RATS WITH OBESITY INDUCED BY MONOSODIUM GLUTAMATE AND SUBMITTED TO EXPERIMENTAL PERIODONTITIS**

Laís Fernanda Pasqualotto – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Rua Mato Grosso, 1680, Ap. 1701. Centro – Cascavel –PR. Brasil.  
lais\_\_fernanda@hotmail.com.

Patrícia Oehlmeyer Nassar – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Carlos Augusto Nassar – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Celia Cristina Leme Beu – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Jordana Heidemann Pandini – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

Pedro Henrique de Carli Rodrigues – Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE

## EVALUATION OF THE EFFECT OF RESVERATROL ON THE PERIODONTAL TISSUES OF RATS WITH OBESITY INDUCED BY MONOSODIUM GLUTAMATE AND SUBMITTED TO EXPERIMENTAL PERIODONTITIS

**KEYWORD:** Periodontal disease. Obesity. Resveratrol.

### ABSTRACT

Several scientific studies have suggested that obesity contributes effectively to the severity of periodontal disease. On the other hand, resveratrol, a polyphenol well known for its health benefits, can prevent obesity and interfere positively with osteoblastogenesis and promote immunomodulatory effects on host response in the presence of periodontal disease. Thus, the objective of this study was to evaluate the appearance of periodontal tissues under the effects of administration of resveratrol by means of morphological and radiographic analyzes in rats with obesity and experimentally induced periodontitis. 48 rats were used. During the first five days of life, half of the animals received injections of monosodium glutamate at 4 g / kg body weight, forming the Obesity group, the other half of the animals received 0.9% saline injections at 1.25 g / kg, during the same period forming the Control group. At 21 days of age weaning was performed. At 75 days of age, half of the animals in each group (n = 12) were submitted to induction of experimental periodontitis, forming the ligation groups. After this procedure, 8 groups (n = 6) were generated: 1) Control Group (CON), 2) Obesity Group (OBS), 3) Resveratrol Group (RSV), 4) Ligature-Obesity Group (LIG-OBS), 6) Ligature-Resveratrol Group (LIG-RSV), 7) Obesity-Resveratrol Group (OBS-RSV), 8) Ligature-Obesity-Resveratrol Group. The animals belonging to the Resveratrol groups received a dose of 10 mg / kg body weight of the polyphenol orally for 4 weeks starting at 78 days of age. After the 105 days of the experimental period, obesity was evaluated and euthanasia was performed, where blood was collected and triglyceride and total cholesterol concentrations were determined. Hemimandibula were also collected for histological and radiographic analysis, gingival tissue samples for immunological analysis and histological analysis of the abdominal aorta artery, in order to evaluate the effects induced by obesity and resveratrol. Obesity was confirmed by the Lee index and by the retroperitoneal and perigonadal fats ( $p < 0.05$ ). In the analysis of bone tissue, a more pronounced alveolar bone loss was observed in the LIG group, with a decrease in bone loss in the LIGRSV and LIGOBS groups. In the gingival tissue, all animals that underwent experimental periodontitis presented a statistically significant difference when compared to the animals that did not receive the ligature. Obese animals also had higher levels of triglycerides and cholesterol than the other animals, and those who



received the diet with resveratrol had a reduction in these patterns. In the morphometric analysis of the abdominal aorta, the thickness of the arteries was statistically different in all groups, and the LIGOBS group had the greatest thickness ( $p < 0.05$ ), however, with respect to the artery area, the CON group presented the largest area and the LIG and LIGOBS groups the smallest area. Thus, it is possible to suggest that the obesity model and resveratrol, act with protective effect of alveolar bone loss through ligature. Also, it can be observed that the association between obesity and periodontitis may contribute to an increase in abdominal aortic thickness.

## INTRODUCTION

Obesity has reached epidemic proportions throughout the world, largely because of increased consumption of high calorie diet and sedentary lifestyle<sup>1</sup>. According to the World Health Organization (WHO), 1.5 billion adults are overweight and, among them, 500 million are clinically obese<sup>2</sup>. Obesity is a chronic, multifactorial disease that affects adults and children and is responsible for increasing the risk of different systemic disorders such as cardiovascular diseases, diabetes and other life-threatening diseases<sup>3</sup>. It is known that adipose tissue has, in addition to the ability to regulate storage and distribution of fat, communication with the central nervous system and the gastrointestinal tract, playing an important role in the inflammatory response and autocrine, paracrine or endocrine conditions<sup>4</sup>. It is a disease characterized by the activation of inflammatory process at metabolically active sites such as adipose tissue, liver and immune system cells. The consequence of this response is a marked increase in the circulating levels of proinflammatory cytokines, adipokines and other inflammatory markers. Obesity is accompanied by a low-grade inflammation state and may predispose to chronic diseases such as cardiovascular and diabetes, and also, potentially, to periodontitis<sup>5</sup>.

The study of the mechanisms by which obesity induces physiological dysfunctions can be facilitated with the use of an animal model in a research environment<sup>6</sup>. The great similarity and homology between rodent and human genomes make these animal models an important tool for the study of obesity, conditions that affect humans and can be simulated in rats.

Some models of obesity induction in rats are found in the literature, including subcutaneous monosodium glutamate (MSG), a neuroexcitatory

amino acid that damages the central nervous system, resulting in acute degeneration of the hypothalamus, destroying specific sites including the arcuate nucleus ventromedial that leads beyond obesity, to provoke disturbances in the control of mechanisms of absorption and energy expenditure<sup>7</sup> as well as to sexual dysfunction, growth retardation, behavioral deficits in rodents and changes in cardiovascular control<sup>8</sup>. Obesity increases host susceptibility by modulating the immune and inflammatory system, leading the patient to a greater risk of periodontitis<sup>9</sup>. The obese individual can undergo emotional and oxidative stress states, which can alter metabolic processes and generate immunosuppressive mechanisms, reducing immune responses that fight pathogenic microbial agents, contributing to the evolution of periodontal disease in obese individuals<sup>10,9</sup>. Periodontal disease is no longer only identified as an oral health problem, but as a public health issue, since it is associated with systemic health<sup>11</sup>.

On the other hand periodontitis is an inflammation associated with bacterial infection and reaches the supporting tissues of the teeth, causing alveolar bone resorption and loss of dental insertion tissue. It is a progressive and destructive disease, leading to dental loss and edentulism in adults<sup>12</sup>. However, several scientific studies have shown a significant influence on the gradation of periodontal disease<sup>13,14,15,16</sup>, and the cytokines derived from adipose tissue are probably key in this process<sup>17</sup>. It is caused predominantly by bacteria that release endotoxins that activate proinflammatory cytokines (IL1, TNF- $\alpha$ , among others), affecting the supporting tissues of the teeth and inducing loss of alveolar bone, cementum and periodontal ligament<sup>18</sup>. Adipose tissue produces a vast amount of cytokines and hormones collectively called adipokines or adipocytokines, which in turn can modulate periodontitis.

The progression of periodontal disease and consequent tissue degradation are directly related to the secretion of proinflammatory cytokines, such as interleukin 17 (IL 17), whose mechanism is independent of cell-mediated immunity<sup>19</sup>, showed increasing proportionality between the intensity of inflammatory infiltrate, clinical condition and immunopositivity of periodontal disease, mainly for IL-17<sup>20,21</sup>. Lester and colleagues found a significant increase

in IL-23, IFN- $\gamma$  and IL-17 in the gingival tissue of sites with moderate and severe insertion loss when compared to healthy sites and a correlation between IL-23 and IL-17<sup>22</sup>. IL-17 is considered to be one of the major proinflammatory cytokines within the cytokine network created both in the innate and adaptive immune response and is found to be increased in the mucosa of individuals with periodontitis<sup>23,24</sup>. It is also a proinflammatory cytokine that shares the biological effects of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , including the stimulus for the production of proinflammatory mediators such as IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  and metalloproteinases (MMPs)<sup>25</sup>. Resveratrol is a non-flavonoid polyphenol produced naturally by plants in response to fungal attack or injury that may affect them. It is found in the diet in foods like berries, grapes, red wine and nuts. It has low bioavailability and is rapidly metabolized in the human organism<sup>26</sup>. Recently it has been investigated about the benefits that this polyphenol has on health, being described as able to prevent cardiovascular diseases, cancer and ischemic lesions, reducing inflammation and oxidative cellular stress, controlling glycemia in animals and humans and preventing obesity<sup>27</sup>.

In addition to glycemic control, resveratrol acts on the metabolism of adipose tissue, maintaining an anti-adipogenic relationship, since it is able to increase apoptosis in mature adipocytes and also induce lipolysis by lipid mobilization stimulated by  $\beta$ -adrenergic agents<sup>28</sup>. In this sense, the scientific articles bring relevant information in order to clarify the benefits that resveratrol can promote when properly administered and its effects on the periodontal tissues and in obese patients. Thus, it is possible that resveratrol provides an anti-inflammatory effect, resulting in less periodontal bone loss and consequent lower tissue degradation, tooth loss and association with systemic effects.

## **METODOLOGY**

### **Animals**

The work was approved by the Committee on Ethics in the Use of Animals (CEUA) of UNIOESTE, being in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the National Council of Control of Animal Experimentation (CONCEA). Pregnant rats (n = 12) were obtained from the Central Biotério of the State University of the West of Paraná, Campus

Cascavel, and kept in the laboratory room of the Physical Therapy Laboratory under controlled conditions of temperature ( $21 \pm 2$  °) and light (12-hour cycle of course and 12 hours of dark 7:00 a.m. to 7:00 p.m.). At birth, the pups were separated prioritizing the males, in a total of 8 animals per litter, and the females were euthanized. The animals received standard diet and water at will throughout the experimental period. The day of delivery was considered as day 0 and, at 21 days postpartum, the weaning of the litter was performed.

In total, 48 male Wistar rats (body weight between 180-350 g) were used and after weaning were kept in a laboratory room of the Physical Therapy laboratory in individual boxes in a light dark cycle environment (lights on at 7:00 am and cleared at 7:00 p.m.) and temperature controlled, with free access to water and food and being accommodated in individual boxes in groups of 3-5 per box (41 cm long x 34 cm width X 17 cm height). Initially, the offspring were already separated into two large groups: control (n = 24) and obese (n = 24).

The sample calculation was based on the use of the ANOVA test to calculate the sample size, with a power of 90% and significance level of 5%, as well as previous studies of the groups of researchers<sup>46</sup>.

### **Obesity Induction**

The animals belonging to the obese group (OBS) were submitted during the first five days of life, the induction of obesity through intra-dermal administration in the posterior region of MSG (AJINOMOTO - BRAZIL) at a dose of 4 g / kg body weight (OBESO group) or 1.25 g / kg of saline (CONTROL group)<sup>29</sup>.

### **Periodontal Disease Induction**

At 75 days of age, the animals belonging to the Ligature groups (LIG), Ligation-Obesity (LIG-OBS), Ligation-Resveratrol (LIG-RSV) and Ligation-Obesity-Resveratrol (LIG-OBS-RSV) were anesthetized by intramuscular administration with xylazine (Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda., São Paulo, SP, Brazil), 0.04mL / 100g and ketamine (Francotar, Virbac do Brasil Indand Com. Ltda., São Paulo, 100g) and placed in an appropriate operative table, which allowed the maintenance of the mouth opening of the rats facilitating access to the teeth of the posterior region of the mandible. Using a modified forceps and

an exploratory probe, a cotton thread was placed around the first right and left lower first molar. This ligature acted as a gingival irritant for 30 days, favoring the accumulation of plaque and consequent development of periodontal disease<sup>30</sup>.

### **Resveratrol Administration**

At 78 days of age, animals belonging to the Resveratrol groups received a dose of 10 mg / kg body weight of Resveratrol (TRANS RESVERATROL PUREST VANTAGE® - BRAZIL) diluted in distilled water orally for 28 days<sup>31</sup>.

### **Obesity avaluation**

At 105 days the animals were weighed and measured to obtain the nasoanal length for the calculation of Lee's [cubic root of body weight (g) / nasoanal length (cm)]<sup>32</sup>, then the animals were euthanized by decapitation. After the sacrifice, the perigonadal and retroperitoneal fat were removed and weighed to verify the parameters of obesity.

### **Collection of Blood Samples for Total Cholesterol and Triglycerides**

Immediately after decapitation, blood was collected and centrifuged at 3000 rpm in a centrifuge. Plasma was separated and stored in a freezer at -20 ° C for the determination of Total Cholesterol and Triglycerides concentrations through the Liquiform - Labtest and Triglycerides Liquiform - Labtest Cholesterol kits.

### **Radiographic Analysis**

Soon after sacrifice, the left hemi jaws of each animal was removed, fixed in 10% formaldehyde (pH 7.2) for 24 hours, washed and stocked in 70% alcohol. The hemi jaws were placed with the lingual side on the periapical radiographic film (AGFA DENTUS®, Ultraspeed) and positioned so that the buccal and lingual cusps of the first molars lie in the same vertical plane. The X-ray apparatus GE-1000 (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) was used, set at 15mA, 65Vp, 18 focus / film distance pulses of 50 centimeters with an X-ray incidence perpendicular to the pieces. For processing of the films, Kodac® developer and fixative were used in the respective time / temperature

processing and scanned by means of a device scanner (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid).

The scanned images were analyzed and three measurements were carried out using the Image Tools 3.0 program and a mean of a linear measure was taken from the cement-enamel junction (JCE) to the alveolar ridge on the mesial side of the first lower left molar of the rat, with measurements in pixels.

### **Histological Processing and Analysis**

After euthanasia of the animals, the right hemi jaws and aorta were fixed in 10% formalin solution for 24 hours, washed and stored in 70% alcohol. The right hemi jaws were descaling with trichloroacetic acid (TCA) 5%, 10 ° C, for thirty days. The pieces were evaluated to verify the degree of decalcification expected, with renewal of the TCA solution every five days. After decalcification, the tissues were immersed in 5% sodium sulfate for approximately two hours to neutralize the TCA, washed in running water for two hours, kept in 70% alcohol until histological processing for inclusion in paraffin (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Fine Chemical, Rio de Janeiro, Brazil). The segments of the hemi-jaws and abdominal aortas were dehydrated in ascending alcoholic series, diaphanized in xylol and included in paraffin. The paraffin blocks were cut into a hand microtome (Olympus, CUT 4055 - Charleston, South Carolina, USA) to obtain sections of 7 µm thickness in frontal section and were mounted on histological slides and stained by the technique Hematoxylin and Eosin (HE) and Masson's trichrome (abdominal aorta sections only).

### **Microscopic Observations**

Microscopic analysis was performed by a single examiner, through the evaluation of stained histological sections. The slides are being analyzed with the aid of a commonly transmitted optical microscope (Leica Microsystems, Switzerland) for morphological observations of the gingival tissue, alveolar process and counting of osteocytes and osteoclasts of the hemi-jaws of the animals.

### **Gingival Morphometry**

Morphometric measurements were performed on the marginal vestibular and lingual gingiva in all groups using the Image Pro-Plus 6.0®

program, coupled to a light microscope with a 10x objective, at 10-cut intervals between counts in the cut-out (about 50  $\mu\text{m}$ ). Measurements were made from predetermined morphological points on the marginal gingiva. The results were expressed in  $\mu\text{m}$ .

### **Bone Morphometry**

Quantification of osteocytes, osteoblasts and osteoclasts was performed in five consecutive fields on the mesial side of the vestibular alveolar bone crest, starting from the highest point of the crest. For the observation was used the increase of 1000x immersion in the microscope. Two observations were made per field, and then averaged values for each animal and for each group.

The measurement of the alveolar bone crest was performed by means of a microscope coupled to a computer, which allowed capturing the images through LazEz® software. A measure of the shortest distance between the apex of the vestibular alveolar bone crest and the cemento-enamel junction was performed. Measurements were repeated twice a day, on three different days, and then averaged between values.

### **Morphometric Analysis of the Abdominal Aorta**

After obtaining the histological slides of the abdominal aorta of the animals, a linear measurement of the wall thicknesses and the lumen area of the artery was performed, through a microscope coupled to a computer which allowed to capture the images through the Laz Ez® software (LAS V 4.2 Capture System, Leica microsystems). A measurement of the shortest distance between the layers of the artery walls was made measurements were taken at four equidistant points and then the mean points. The value of the area of the aorta is also measured. Measurements were repeated twice a day, on three different days, and then averaged between values.

### **Statistical analysis**

For statistical analysis, all numerical values were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Initially, through the program Bioestat 5.3 (Instituto Mamiraua, Amazonas, Brazil), the Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the distribution of normality of the data. After checking the normality of the data,

the ANOVA test was performed and complemented with the Tukey post-test with  $p < 0.05$  to evaluate the differences between the groups.

## **RESULTS**

### **Effect on the development of obesity in rats with and without induced periodontitis.**

Animals treated with MSG in the neonatal period had a significant decrease in body weight ( $p < 0.05$ ) (Table 1) and also showed an increase in Lee index ( $p < 0.05$ ) when compared to animals that were not treated with MSG (Graph 1), this difference was not observed when the obese groups were compared to each other.

### **Plasma levels of Triglycerides and Cholesterol**

Through the statistical analysis, it can be observed that the experimental groups that did not receive the administration of MSG presented lower concentration of triglycerides when compared to the obese groups. The other groups were statistically different, and among them, the animals that received the diet with resveratrol presented lower concentration of triglycerides when compared to the obese animals that did not receive the substance (Table 2). In relation to the cholesterol concentrations, the animals belonging to the control (CON), resveratrol (RSV), obesity-resveratrol (OBSRSV), ligature (LIG) and ligature-resveratrol (LIGRSV) groups were statistically similar and with the lowest concentration cholesterol. However, the animals belonging to the LIGOBS and OBS groups were statistically similar and with the highest plasma cholesterol concentration (Table 3).

### **Radiographic Analysis**

In the radiographic analysis of the mean distance from the cementum-enamel junction to the alveolar bone crest of the first left lower molar, it was verified that there was a greater loss of insertion in the experimentally exposed animals compared to the other groups ( $p < 0.05$ ) however, the LIG group presented more pronounced bone loss when compared to the other groups (Graph 2), demonstrating that the induction of periodontal disease on alveolar bone tissue was effective. Induced obesity also acted as an inhibitor of alveolar bone loss in obese animals of the LIGOBS group when compared to the LIG



group, and resveratrol also provided a protective effect on alveolar bone loss in the dietary groups.

### **Right Hemy-jaw Histological Analysis**

In the histological analysis, marked bone loss was observed in the animals that underwent experimental periodontitis ( $p < 0.05$ ) through ligation, proving the effectiveness of periodontal disease induction. Among them, the LIG group showed the greatest distance, representing a greater bone loss, when compared to the LIGOBS group (Table 4).

There was no statistical difference in the number of bone cells when comparing the CON and OBS groups. There was a statistical difference between the groups submitted to experimental periodontitis. Among them, the LIG group had the lowest number of osteoblasts, osteocytes and more osteoclasts when compared to the others ( $p < 0.05$ ). There was also no statistical difference in the groups that received resveratrol therapy, but the LIGRSV and LIGOBSRSV groups showed an increase in osteoblasts and osteocytes and a decrease in osteoclasts when compared to the LIG group (Table 5).

### **Control Group**

In the histological analysis of the CTL group, the oral, junctional, sulcular and connective epithelium were observed within the normality pattern, with no inflammatory tissue present. The alveolar bone present was intact, compact and regular, with a normal spongy portion in the center. It presented thick bony ridges and at the level of the cervical third of the root, seen through the measurement of the distance of the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest. Constituents of the periodontium, such as cementum, periodontal ligament and cemento-enamel junction, presented normal anatomical characteristics (Figure 1-A).

### **Obeso Group**

The animals that received the neonatal treatment with monosodium glutamate presented regularity in the morphological differentiation between the oral, junctional, sulcular and connective tissue epithelia, and no inflammatory

aspect was found in these tissues. Bone crest level and distance to cementum-enamel junction were statistically similar to CTL group (Table 4 and Figure 2-A).

### ***Resveratrol Group***

After resveratrol administration, the animals in this group demonstrated regularity in the periodontal tissues and in the morphology of the oral, junctional, sulcular and connective tissue epithelia. Likewise, they did not present any inflammatory appearance. By measuring the distance from the bone crest to the cementum-enamel junction, we found that this distance was statistically similar to the CTL group (Table 4 and Figure 1-C).

### ***Resveratrol Obesity Group***

In the histological evaluation of the resveratrol obesity group, it was possible to observe the presence of an oral, junctional, sulcular and regular connective tissue and no inflammatory infiltrate, thick and high bony crests, measuring the distance from the cemento-enamel junction to the bone crest similar to the CTL group (Table 4 and Figure 2-B).

### ***Ligation Group***

In the analysis of the LIG group, we noticed morphological alteration and abnormality in the oral, junctional, sulcular epithelia and the apical migration of the connective tissue with the presence of acute inflammatory infiltrate (Figure 1 - B). The bony crest had irregular, pointed shape, with extensive loss of alveolar bone, which led to an exposure of the cervical third of the teeth. There were also changes in cementum and periodontal ligament.

### ***Ligation Obesity Group***

In the LIG OBS group, small alteration of the oral, junctional and sulcular epithelia was noticed, and the migration of the connective tissue toward the apical region is smaller when compared to the LIG group, presenting an inflammatory aspect. The bone crest shows irregular shape, with alveolar bone loss, yet it is close to the cervical third of the root. There are also changes in cementum and periodontal ligament (Figure 2 - C).

### ***Resveratrol Ligation Group***

In the analysis of the LIG RSV group, there was a small change in the morphology of the junctional, sulcular and oral epithelium of the animals. There

was migration of the connective tissue in the apical direction, but to a lesser extent when compared to the LIG group. Bone crest is altered, with a pointed shape, characterizing bone loss and close to the middle third of the tooth, measuring the distance from the alveolar bone crest to the cement-enamel junction similar to the LIG group (Table 4 and Figure 1-D).

#### ***Ligation Obesity Resveratrol Group***

In the LIG OBS RSV group, morphological alteration was observed in junctional, sulcular and oral epithelium and the apical migration of connective tissue with the presence of inflammatory infiltrate. There is alveolar bone loss, with the altered bone crest, with a tip shape and close to the middle third of the root, measuring the distance from the alveolar bone crest to the cement-enamel junction similar to the LIG OBS group (Table 4 and Figure 2 - D).

#### **Histomorphometric analysis of marginal vestibular and lingual gums**

In the morphometric analysis of the buccal epithelium, epithelial crest and connective tissue, all animals submitted to experimental periodontitis showed the height of the gingival crest epithelium (parameter C), width of the buccal epithelium (parameter E), height of the connective tissue in the middle region (parameter H) and width of connective tissue in the basal region (parameter L) were statistically similar, when compared to each other and statistically different when compared to groups that did not undergo experimental periodontitis (Table 6).

#### **Histomorphometric analysis of the abdominal aorta.**

The mean thickness of the abdominal artery walls showed a statistically significant difference in all groups, and the CON and RSV groups had the lowest thickness, and the LIG OBS group presented the highest thickness of the tunics ( $p < 0.05$ ) (Graph 3).

## **DISCUSSION**

Monosodium glutamate (MSG) is a neurotoxic substance that causes lesions in the hypothalamus and arcuate nucleus when applied in the subcutaneous region and in the neonatal period in rats, generating a lack of control between absorption and energy expenditure, leading to obesity<sup>33,34</sup>. The

administration of MSG caused an increase in the Lee index of the obese groups (Graphic 1), with a significant difference between the treated groups, but there was no difference between the MSG groups. This variable is evident in this model of obesity because this treatment may result in numerous endocrine and behavioral abnormalities, such as growth disturbances, glucocorticoid production, obesity and hypogonadism<sup>35</sup>. There was also a greater accumulation of retroperitoneal and perigonadal fat (Table 1), which corroborates with the study by Costa *et al.*<sup>36,37</sup>. It is also possible to observe that the weight of the animals that underwent obesity induction through MSG was also lower when compared to the other animals (Table 1), and this is due to the fact that MSG causes endocrine changes among its side effects, secretion of the growth hormone, causing these animals to present a smaller size<sup>38,39,36</sup>. In addition to the induction of obesity, resveratrol was also administered to the animals, which is a natural compound, non-flavonoid polyphenol that is present in more than 72 plants, has an anti-inflammatory and antimicrobial character in the treatment of periodontal disease<sup>40</sup>.

Thus, the objective of our study was to evaluate whether resveratrol could modulate and reduce the deleterious effects of periodontal disease and obesity, as well as the two associated diseases and their systemic effects. The present study demonstrated that resveratrol was able to lower cholesterol and triglyceride levels in obese animals (Tables 2 and 3), which can be explained by its antioxidant and triglyceride activity proposed by Belguendouz in 1998 and together with its capacity to interrupt the transport of cholesterol by low density lipoproteins (LDL), causing a reduction of cardiovascular events<sup>41</sup>.

The results of the lipid profile, in this study, showed that the animals of the obese groups had a higher concentration of cholesterol and triglycerides when compared to both control groups, corroborating with the study of Costa *et al.* (2017)<sup>36</sup>, which demonstrated an increase in cholesterol and triglyceride levels, associated or not with periodontal disease induced, suggesting that periodontitis would not influence the increase of these parameters, corroborated by the study by Shridar *et al.*<sup>42</sup>, who also did not demonstrate the influence of periodontal disease in these analyzed parameters (Table 2 and 3). The present

study also demonstrated a decrease in the levels of these lipid markers when administering resveratrol. Li *et al.* (2018) demonstrated in a study with obese animals that the use of resveratrol significantly reversed the increase in total cholesterol and triglycerides that occurred in obese rats. These effects may indicate that resveratrol can regulate lipid metabolism in hyperlipidemic mice. The effects of resveratrol on lipid metabolism suggest that it can be used to treat patients with disorders associated with hyperlipidemia<sup>43</sup>.

However, obesity can directly influence the vascular response of the host, altering the cytokine network and resulting in an increased release of the cytokines, influencing the etiopathogenesis of cardiovascular disease, causing endothelial changes and allowing greater adhesion and fixation of cholesterol plaques in the endothelium<sup>44</sup>. In this study, it was possible to observe that abdominal aortic tunica thickness was higher in obese animals and that they presented concomitant periodontal disease, suggesting an endothelial alteration from the inflammatory alterations (Graphic 3).

Regarding gingival tissue, the results of the present study did not show differences in the analyzes of groups of animals with obesity, use of resveratrol and without periodontitis. Currently, the mechanism to clarify the relationship between obesity and gingival growth is scarcely studied. In the study by Al-Zahani *et al.* (2013) the expression of human defensins beta (HBD) was analyzed as a possible mechanism by which the innate immune system affects the susceptibility to periodontitis in obese individuals, however the study did not reveal differences in the expression of human defensins beta -1 and -2 (HBD-1 and HBD-2) among obese and normal weight participants. Therefore, the expression of HBD-2 did not present a statistically significant difference between patients with periodontitis and healthy adults<sup>13</sup>. The induction of these responses was not mediated by lipopolysaccharides (LPS), which propose that the regulation of the induction of these mediators of innate immunity in the oral mucosa is controlled by more complex mechanisms of the innate immune system<sup>13,45</sup>. Even in the groups with periodontitis induced, in this study, the height and gingival thickness were significantly higher, characterizing not only histopathological changes, but also an increase in gingival volume, typical in the

presence of periodontitis, probably due to the existence of bacterial biofilm (Table 6)<sup>45</sup>. Based on these results, we can state that the model of this study complied with the experimental requirements of periodontitis.

In the analysis of bone tissue, a more pronounced alveolar bone loss was observed in the animals that had induced periodontitis, and this difference was more evident in the LIG group. Studies that show the relationship between obesity and periodontal disease sometimes lead us to believe that loss of insertion in obese animals is greater, contributing to a greater bone loss, but may vary according to the diet submitted to the animal and the type of experimental model<sup>46,16</sup>, which does not happen in this study. Periodontal disease and its progression can be modified by several biological, environmental and behavioral factors, suggesting that the cytokines created by adipose tissue could act as modulators in the inflammatory process, suggesting also that the systemic inflammation of the obese could affect the susceptibility to chronic diseases, such as periodontitis<sup>47,48</sup>.

Although obesity is considered a risk factor for public health, there is evidence in the literature showing a protective effect of adipose tissue on bone tissue<sup>49</sup>. This is due to an increase in the body mass index causing an increase in the bone mineral density, considering that the excessive load exerted by the overweight act as a beneficial effect for the bone formation<sup>49,50,51</sup> through the reduction of apoptosis, increased osteoblast differentiation and stimulation of the matrix bone<sup>52</sup>. The results presented in this study showed a statistically significant increase in the amount of osteoblasts and osteocytes in the LIG OBS group when compared to the group with periodontitis only, being corroborated by the study by Costa *et al.* (2017)<sup>36</sup>. Still other studies have shown that the hormone produced by adipose tissue known as leptin could induce the differentiation of stromal cells from the bone marrow into osteoblasts, leading to increased extracellular matrix mineralization<sup>53,54</sup>. Resveratrol also demonstrated a protective effect on alveolar bone loss, where there was a statistically significant decrease in the distance from the alveolar bone crest to cement-enamel junction of the animals in the LIG RSV group (Graphic 2 and Table 4) when compared to the group with only periodontitis (LIG), in addition to a

statistically significant increase in the amount of osteoblasts and osteocytes in the LIG RSV group when compared to the LIG group (Table 5), corroborating with Bhattarai et al. in 2016 who studied the relationship of resveratrol in the modulation of inflammation by gingival fibroblasts and concluded through histological analysis that the administration of resveratrol (5mg / kg body weight) improved ligation-mediated alveolar bone loss in rats<sup>55</sup>.

Casati *et al.* (2013) evaluated the effect of continuous administration of resveratrol on the progression of experimentally induced periodontal disease in 24 rats<sup>31</sup>. After 115 days of experiment, the animals were euthanized and the hemimandibula collected for morphometric analysis, in which intra-group comparisons showed significant differences in alveolar bone loss between the animals with and without ligation in both groups, demonstrating the effectiveness of the induction of periodontal disease. When intergroup comparisons were performed analyzing molars with ligature, the control group had higher values of alveolar bone loss ( $p < 0.05$ ) when compared to the group receiving resveratrol treatment. Likewise, in the intergroup analyzes for unlaced molars, corroborating with the results of our study, the groups that received resveratrol presented significantly lower alveolar bone loss than the group with only induced periodontitis (Tables 4 and 5 and graphic 2 ).

Although there is in fact a therapeutic potential of resveratrol in inflammatory modulation, there are as yet no records in the literature that explain the exact mechanisms that this substance acts to stimulate such an effect. However, some findings have shown that resveratrol may reduce the expression of other markers, including IL-2, IL-6, IL-8, IL -12, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) in different experimental models, although many other inflammatory mediators (IL-6, IL-8, IL-10, IL-23, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) and bone related factors (osteoprotegerin [OPG], RANK and RANK ligand [RANKL]) are related to the establishment of periodontitis. Thus, these findings may partially suggest modulation of the immune inflammatory response by resveratrol, but additional studies should be performed.

## REFERENCES

1. KHOSRAVI, R.; KA, K.; HUANG, T.; KHALILI, S.; NGUYEN, B.H.; NICOLAU, B.; TRANIS, S. D. Tumor Necrosis Factor- and Interleukin-6: Potential Interorgan Inflammatory Mediators Contributing to Destructive Periodontal Disease in Obesity or Metabolic Syndrome. Hindawi Publishing Corporation, v. 2013. p. 1-6.
2. WHO. Global InfoBase. Geneva. Disponível em: <http://www.who.int/infobase/report.aspx?rid=116&dm=5&iso=ZZZ&searchButton=Search+Surveys>. 2012. Acesso em: 15/08/2013.
3. PATARO, A. L.; COSTA, F. O.; CORTELLI, S. C.; CORTELLI, J. R.; ABREU, M.H. N. G.; COSTA, J. E. Association between severity of body mass index and periodontal condition in women. *Clinical Oral Investigations*. 2012, v. 16. .p. 727 – 734.
4. SPERETTA, G. F. F.; LEITE, R. D.; DUARTE, A. C. G. Obesity, inflammation and exercise: focus on TNF-alpha and IL-10. *Revista HUPE*, 2014. Rio de Janeiro, v.13. n. 1. p. 61-69.
5. KELLER, A.; ROHDE, J. F.; RAYMOND, K.; HEITMANN, B. L. Association between periodontal disease and overweight and obesity: A systematic review. *Journal of Periodontology*, 2015. 86 (6): 766-776.
6. ROSINI, T. C.; SILVA, A. S. R.; MORAES, C. Obesity induced by diet consumption: model in rodents for the study of disorders related to obesity. *Journal of the Brazilian Medical Association*, 2012. v. 58, n. 3, p. 383-387.
7. FERNANDES, S. A. G.; ARENA, A. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DAMASCENO, D. C. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, 10,105.
8. VOLTERA, A. F.; CESARETTI, M. L. R.; GINOZA, M.; KOHLMANN JR, O. Effect of induction of neuroendocrine obesity on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats. *Brazilian Archives of Endocrinology & Metabolism*, 2008, v.52, nº 1, p. 47-54.



9. SANTOS, T.; VASCONCELOS, R. M.; CARDOSO, L.; FAGUNDES, J.; ALVES, E. S.; RAMALHO, L. M. P. Evidence of the interaction between obesity and periodontal disease: A review of the literature. *Brazilian Journal of periodontology*, 2014, 24(1):35-40.
10. BORGES, L. P.; TEREZAN, M. L. F.; BITTENCOURT, M. S. P. Obesity as a risk factor periodontal disease: a literature review. *Brazilian Journal of periodontology*, 2013, 23(02): 33-38.
11. SURESH, S.; MAHENDRA, J. Multifactorial Relationship of Obesity and Periodontal Disease. *J. Clin.Diag. Res*,2014, v. 8, n.4, p. ZE01- ZE03.
12. PALLOS, D. *et al.* Menopause: a risk factor for periodontal disease? *Rev. Bras. Ginecol. Obst*, 2006, v. 28,n.5, p. 292-297.
13. AL-ZAHRANI, M. S.; ZAWAW, K. H.; ALTAF, F. M. The effect of obesity and periodontitis on the expression of antimicrobial peptides in gingival tissues. *Saudi Medical Journal*, 2013, 34(5):525-30.
14. DALLA VECCHIA, C. F. *et al.* Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J. Periodontology*, 2005, v.76, p. 1721-1728.
15. SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol.* 2007, v. 43,n.1, p. 254-266.
16. VERZELETTI, G. N.; GAIO, E. J.; LINHARES, D. S.; ROSING, C. K. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Journal of Applied Oral Science*, 2012, 20, 2, 218-221.
17. SOUZA, A. B. *et al.* Obesity as a risk factor for periodontal disease: literature review. *Rev. Dental Press Period. Implantol.*, 2010, v.3, n.3, p. 74-82.
18. BASTOS, A. A. *et al.* Obesity and Periodontal disease. *Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Intergr.*, 2005, v.5,n.3, p. 275-279.
19. RODRIGUES, A. Z.; KAWATA, V. K. S.; JÚNIOR, A. B. N.; SOUZA, S. L. S.; GRISI, M. F. M.; PALLOTO, D. B.; JÚNIOR, M. T. Therapeutic strategies and potential targets for modulation of the periodontal patient response. *R. Period*, 2009, v. 19. n. 1. p. 14- 21.
20. ADIBRAD, M.; DEYHIMI, P.; GANJALIKHANI HAKEMI, M.; BEHFARNIA, P.; SHAHABUEI, M.; RAFIEE, L. Signs of the presence of Th17 cells in chronic periodontal disease. *Journal of periodontal research*, 2012, 47(4): 525-531.

- 21.** WANG, K.; KIM, M. K.; DI CARO, G.; WONG, J.; SHALAPOUR, S.; WAN, J.; ZHANG, W.; ZHONG, Z.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; WU, L.; TANIGUCHI, K.; FENG, Y.; FEARON, E.; GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Interleukin-17 Receptor A Signaling in Transformed Enterocytes Promotes Early Colorectal Tumorigenesis. *Cell Press*, 2014, 41(6):1052-1063.
- 22.** LESTER, S. R.; BAIN, J. L.; JOHNSON, R. B.; SERIO, F. G. Gingival Concentrations of Interleukin-23 and -17 at Healthy Sites and at Sites of Clinical Attachment Loss. *Journal of Periodontology*, 2007, 78(8):1545-1550.
- 23.** SOUTO, R.; SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; COLOMBO, A. P. V.; Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2014, 45(2).
- 24.** ISAILOVIC, N.; DAIGO, K.; MANTOVANI, A.; SELMI, C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *Journal of Autoimmunity*, 2015, v.60, p.1-11.
- 25.** YAO, Z. *et al.* Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *The Journal of Immunology*, 1995, 155:5483-5486.
- 26.** WENZEL, E.; SOMOZA, V. Metabolism e bioavailability of *trans*-resveratrol. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2005, V. 49, p. 472-81.
- 27.** SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T. Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*, 2010, 635(1-3):1-8.
- 28.** FISHER-POSOVSZKY, P. *et al.* Resveratrol regulates human adipocyte number and function in a Sirt1-dependent manner. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2010, Jul;92(1):5-15. doi: 10.3945/ajcn.2009.28435.
- 29.** FELIPETTI, F. A.; SILVA, E. O.; RANGEL, A. L. C. A.; NASSAR, C. A.; BONFLEUR, M. L.; BALBO, S. L, *et al.* Evaluation of Alveolar Bone Mandibular of rats obese induced at monossodium glutamate undergoing modified duodenal-jejunal bypass surgery. *Journal of Endocrinology & Metabolism*, 2014, 4: 93-100.
- 30.** NASSAR, P.O.; NASSAR C.A., GUIMARÃES, M.R.; AQUINO,S.G.; ANDIA,D.C.; MUSCARA, M. N.; SPOLIDORIO, D.M.; ROSSA, C.JR.;

SPOLIDORIO, L.C. Simvastatin therapy in cyclosporine A- induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontal Research*, 2009, 44(4):479-88.

**31.** CASATI, M. Z.; ALGAYER, C.; CARDOSO DA CRUZ, G.; RIBEIRO, F. V.; CASARIN, R. C.; PIMENTEL, S. P.; CIRANO, F. R. Resveratrol decreases periodontal breakdown and modulates local levels of cytokines during periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 2013, 84:58–64.

**32.** 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.*, 1968, v.40, p. 527-528.

**33.** BRANDELEIRO JR, S.; BONFLEUR, M. L.; RIBEIRO, R. A.; VANZELA, E. C.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O.; BALBO, S. L. Decreased TNF- $\alpha$  gene expression in periodontal ligature in MSG obese rats: A possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Archives of Oral Biology*, 2012, v.57, n.3, p.300-306.

**34.** FERNANDES, S. A. G.; ARENA, A. C.; CAMPOS, K. E.; VOLPATO, G. T.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DAMASCENO, D. C. Glutamate-induced obesity leads to decreased sperm reserves and acceleration of transit time in the epididymis of adult male rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012, 10,105.

**35.** CUNHA, N. V.; ABREU, A. S.; PANIS, C.; GRASSIOLI, S.; GUARNIER, F. A.; CECCHINI, R.; MAZZUCO, T. L.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M. C. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sciences*, 2010. 87(11-12): 375-81.

**36.** COSTA, K. F.; BONFLEUR, M. L.; PONTILLO, V.; PEDROTTI, S.; BERNARDON, P.; BRANCAALHÃO, R. M. C.; BEU, C. C. L.; NASSAR, P. O.; NASSAR, C. A. Evaluation of Periodontal Tissues and Abdominal Aorta of Rats with Induced Obesity by Monosodium Glutamate and Experimental Periodontitis. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 2017, 19(2): 1-14.

**37.** GASPAR, R. S.; BENEVIDES, R. O.; FONTELLAS, J. L.; VALE, C.

C.; FRANÇA, L. M.; BARROS, P. de T. et al. Reproductive alterations in hyperinsulinemic butnormoandrogenic MSG obese female rats. *Journal of Endocrinology*, 2016, 229, 2, 61-72.

**38.** MIRANDA, R. A.; AGOSTINHO, A. R.; TREVENZOLI, I. H.; BARELLA, L. F.; FRANCO, C. C.; TROMBINI, A. B. Insulin oversecretion in MSG-obese rats is related to alterations in cholinergic muscarinic receptor subtypes in pancreatic islets. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33, (4), 1075-1086.

**39.** MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology*, 1991, 128, 2, 1100-1116.

**40.** ANDREOU, V.; D'ADDARIO, M.; ZOHAR, R.; SUKHU, B.; CASPER, R. F.; ELLEN, R. P.; TENENBAUM, H. C. Inhibition of osteogenesis in vitro by a cigarette smoke-associated hydrocarbon combined with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: reversal by resveratrol. *Journal of Periodontology*. 2004, Jul;75(7):939-48.

**41.** BELGUENDOZ, F. L.; GOZZELINO, M.T. Interaction of transresveratrol with plasma lipoproteins. *Biochemical Pharmacology*, 1998, v. 15:55; p. 811-6.

**42.** SRIDHAR, R.; BYAKOD, G.; PUDAKALKATTI, P.; PATIL, R. A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. *International Journal of Dental Hygiene*. 2009, 7:144-150.

**43.** LI, X. N.; MA, L. Y.; JI, H.; QIN, Y. H.; JIN, S. S.; XU, L. X. Resveratrol protects against oxidative stress by activating the Keap-1/Nrf2 antioxidant defense system in obese-asthmatic rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018, 16(6):4339-4348.

**44.** ARAÚJO Jr, R. F.; SOUZA, T. O.; MEDEIROS, C. A. X.; SOUZA, L. B.; FREITAS, M. L.; LUCENA, H. F.; ALVES, M. S. C. F.; ARAÚJO, A. A. Carvedilol decrease il-1 $\beta$  and tnf- $\alpha$ , inhibits mmp-2, mmp-9, cox-2, and rankl expression, and up-regulates opg in a rat model of periodontitis. *Plos One*. 2013, 8(7):1-6.

**45.** COLTRI, B. M.; COSTA, K. F.; PONTILLO, V.; BONFLEUR, M. L.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BEU, C. C. L.; PEDROTTI, S.; NASSAR, P. O.;

NASSAR, C. A. Morphometric evaluation of the influence of obesity on the gingival tissue of rats with experimental periodontitis. *Brazilian Journal of Health Sciences*. 2017, 21(2): 127-132.

**46.** NASCIMENTO, C. M.; CASSOL, T.; SILVA, F. S.; BONFLEUR, M. L.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 2013, 6:365–370.

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

**48.** CAVAGNI, J.; WAGNER, T. P.; GAIO, E. J.; CITO, R. O.; REGO, C.; TORRES I. L. S. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Archives of Oral Biology*, 2013, 58, 8, 1034-1039.

**49.** COLAIANNI, G.; BRUNETTI, G.; FAIENZA, M. F.; COLUCCI, S.; GRANO M. Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. *The World Journal of Orthopedics*, 2014, 5, 3, 242-246.

**50.** LECKA-CZERNIK, B.; STECHSCHULTE, L. A.; CZERNIK, P. J.; DOWLING, A. R. 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2015, 410, 35.

**51.** MAGGIO, A. B.; BELLI, D. C.; PUIGDEFABREGAS, J. W.; RIZZOLI, R.; FARPOUR-LAMBERT, N. J.; BEGHETTI, M. High bone density in adolescents with obesity is related to fat mass and serum leptin concentrations. *The Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2014, 58, 6, 723-728.

**52.** EHRLICH, P. J.; LANYON, L. E. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis International*. 2002, 13(9):688-700.

**53.** PROUTEAU, S.; BENHAMOU, L.; COURTEIX, D. Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight reduction and weight regain in male and female judoists. *The European Journal of Endocrinology*. 2006, 154(3):389- 395.

- 54.** BANDEIRA, F. A. Does Obesity Really Strengthen Bones? *Brazilian Archives of Endocrinology & Metabolism*. 2007, 51(6):895-897.
- 55.** BHATTARAI, G.; POUDEL, S. B.; KOOK, S.; LEE, J. Resveratrol prevents alveolar bone loss in an experimental rat model of periodontitis. *Acta Biomaterialia*. 2015.

## APPENDIX B

**Table 1:** Effect of neonatal treatment with MSG on body parameters of CON, OBS, RSV, OBS RSV, LIG, LIG OBS, LIG RSV, LIG OBS RSV. Values represent  $\pm$  standard deviation.

Grupos	Peso dos Animais (g)	Peso Gordura Retroperitoneal(g)	Peso Gordura Perigonadal(g)
CON	366.33 $\pm$ 22.74 A	5.14 $\pm$ 1.11 A	3.13 $\pm$ 0.45 A
OBS	288.33 $\pm$ 27.31 B	6.44 $\pm$ 0.66 B	4.25 $\pm$ 0.57 B
RSV	364.33 $\pm$ 24.17 A	5.18 $\pm$ 0.80 A	3.43 $\pm$ 0.56 A
OBS RSV	299.00 $\pm$ 13.78 B	6.76 $\pm$ 0.48 B	4.95 $\pm$ 1.21 B
LIG	355.66 $\pm$ 16.31 A	4.38 $\pm$ 1.24 A	2.80 $\pm$ 0.59 A
LIG OBS	285.33 $\pm$ 24.45 B	6.88 $\pm$ 0.58 B	4.78 $\pm$ 1.23 B
LIG RSV	351.66 $\pm$ 21.74 A	4.81 $\pm$ 0.97 A	3.06 $\pm$ 0.63 A
LIG OBS RSV	278.66 $\pm$ 21.37 B	6.55 $\pm$ 0.62 B	4.18 $\pm$ 0.36 B

Values represent mean  $\pm$  standard deviation. Different letters mean that the data are statistically different, within the same parameter, with  $p < 0.05$ .

**Table 2 –** Results of plasma concentrations of Triglycerides in the different experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation and are expressed in micrometers

Grupos	Médias
Con	141.04 $\pm$ 24.46 A
Obs	324.77 $\pm$ 32.50C
Rsv	175.29 $\pm$ 67.75 A
ObsRsv	238.31 $\pm$ 10.76B
Lig	149.71 $\pm$ 40.62 A
LigObs	341.18 $\pm$ 39.49C
LigRsv	159.48 $\pm$ 14.56A
LigObsRsv	267.06 $\pm$ 56.51 B

Different letters mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ .

**Tabela 3** - Results of plasma Cholesterol concentrations in the different experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation and are expressed in micrometers.

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>
Con	123.84 $\pm$ 2.99 A
Obs	162.27 $\pm$ 12.02 C
Rsv	127.24 $\pm$ 4.32 A
ObsRsv	124.74 $\pm$ 4.80A
Lig	127.30 $\pm$ 5.79 A
LigObs	164.67 $\pm$ 11.38C
LigRsv	123.17 $\pm$ 7.44A
LigObsRsv	142.07 $\pm$ 14.22 B

Different letters mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ .

**Table 4** - Results of the morphometric analysis of the distance (cm) of the cement-enamel junction to the alveolar bone crest of the animals of the different experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation.

<b>Grupos</b>	<b>Médias</b>
Con	0.030 $\pm$ 0.004 A
Obs	0.035 $\pm$ 0.005 A
Rsv	0.036 $\pm$ 0.010 A
ObsRsv	0.040 $\pm$ 0.005 A
Lig	0.087 $\pm$ 0.009 C
LigObs	0.056 $\pm$ 0.015 B
LigRsv	0.067 $\pm$ 0.016 B
LigObsRsv	0.068 $\pm$ 0.012 B

Different letters on the same line indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups, within the same parameter.



**Table 5** - Histological analysis of the right hemimandibula of the rats of the experimental groups for quantification of osteocytes, osteoblasts and osteoclasts. The mean values are  $\pm$  standard deviations and units are expressed.

	<b>Osteoblasto</b>	<b>Osteócito</b>	<b>Osteoclasto</b>
CON	12.57 $\pm$ 2.14 A	32.23 $\pm$ 9.98A	0.37 $\pm$ 0.08A
OBS	11.13 $\pm$ 0.85 A	32.90 $\pm$ 8.35A	0.73 $\pm$ 0.60A
RSV	12.05 $\pm$ 0.63 A	34.25 $\pm$ 12.10A	0.46 $\pm$ 0.08A
OBSRSV	10.96 $\pm$ 1.36A	32.66 $\pm$ 8.88A	0.60 $\pm$ 0.50A
LIG	6.95 $\pm$ 0.69 B	10.67 $\pm$ 4.62B	3.46 $\pm$ 0.16B
LIGOBS	8.84 $\pm$ 1.36C	19.32 $\pm$ 8.05C	1.60 $\pm$ 0.70C
LIGRSV	8.64 $\pm$ 1.03 C	18.45 $\pm$ 4.23C	1.71 $\pm$ 0.14C
LIGOBSRSV	8.76 $\pm$ 0.71C	21.70 $\pm$ 5.10C	1.70 $\pm$ 0.29C

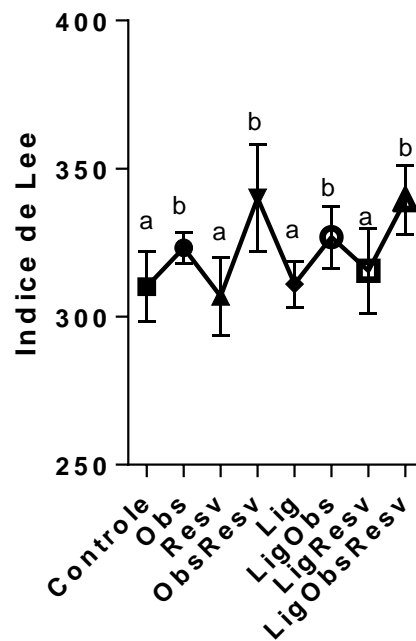
Different letters on the same line indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups, within the same parameter.

**Table 6** - Results of gingival morphometric analysis. Letters correspond to comparisons within the same parameter. (parameter C, parameter E, parameter H and parameter L - the letters are always to be seen within the same column). Values represent mean  $\pm$  standard deviation and are expressed in micrometers.

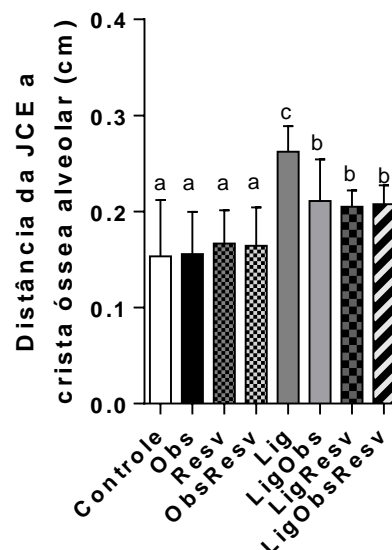
Grupos	C	E	H	L
<b>CTL</b>	476.09 $\pm$ 107.57A	337.76 $\pm$ 82.62A	504.04 $\pm$ 103.94A	325.77 $\pm$ 70.95A
<b>OBS</b>	526.23 $\pm$ 78.96A	418.01 $\pm$ 46.73A	531.70 $\pm$ 92.98A	335.16 $\pm$ 94.71A
<b>RSV</b>	481.37 $\pm$ 43.97A	373.77 $\pm$ 51.15A	495.60 $\pm$ 121.27A	331.91 $\pm$ 31.84A
<b>OBS RSV</b>	510.32 $\pm$ 129.37A	417.56 $\pm$ 48.03A	538.77 $\pm$ 65.33A	345.87 $\pm$ 31.64A
<b>LIG</b>	839.61 $\pm$ 216.65B	525.06 $\pm$ 103.51B	812.85 $\pm$ 194.38B	482.95 $\pm$ 89.96B
<b>LIG OBS</b>	706.42 $\pm$ 140.87B	539.65 $\pm$ 137.48B	769.43 $\pm$ 134.44B	479.72 $\pm$ 81.33B
<b>LIG RSV</b>	850.32 $\pm$ 145.39B	530.77 $\pm$ 65.45B	713.69 $\pm$ 144.02B	550.54 $\pm$ 94.69B
<b>LIG OBS RSV</b>	749.32 $\pm$ 136.65B	548.98 $\pm$ 46.40B	720.23 $\pm$ 108.02B	468.18 $\pm$ 32.82B

Different letters mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ , within the same parameter.

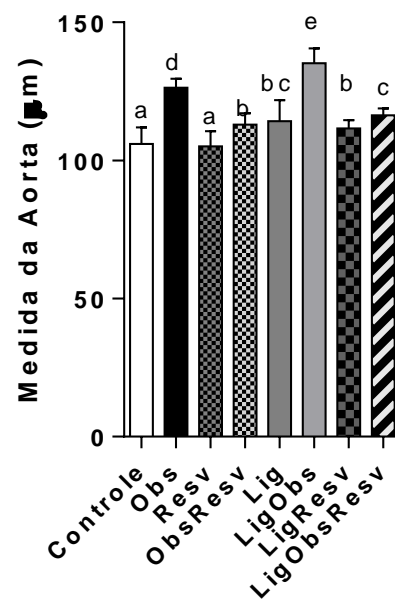
## APPENDIX C



**Graphic 4:** Effect of neonatal treatment with MSG on the Lee Index of animals from different experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation. Different letters mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ .

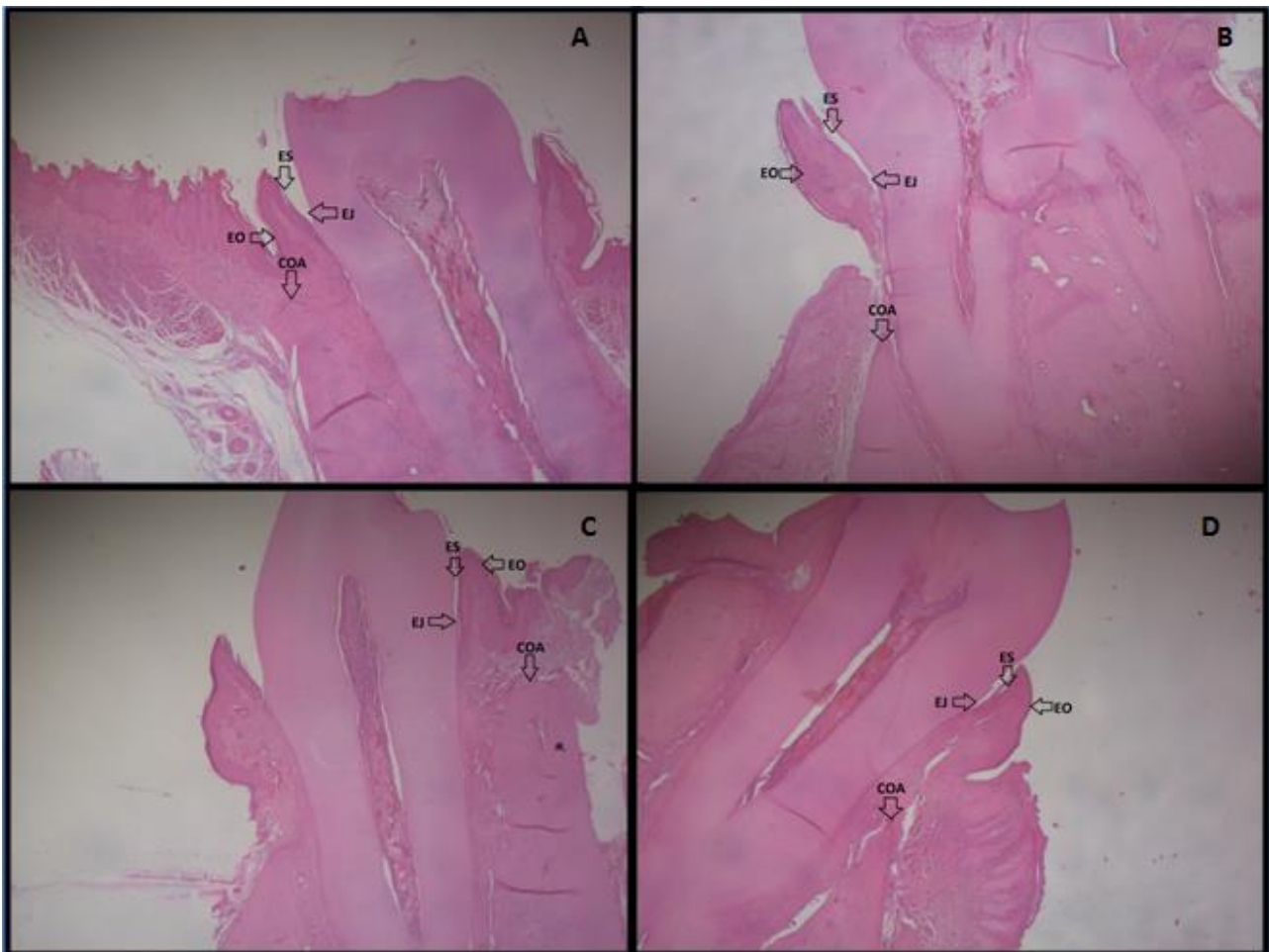


**Graphic 5:** Radiographic analysis of the JCE distance to the alveolar bone crest of the mesial aspect of the first lower left molar of the rats of the different experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation and are expressed in centimeters (cm). Different letters mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ .

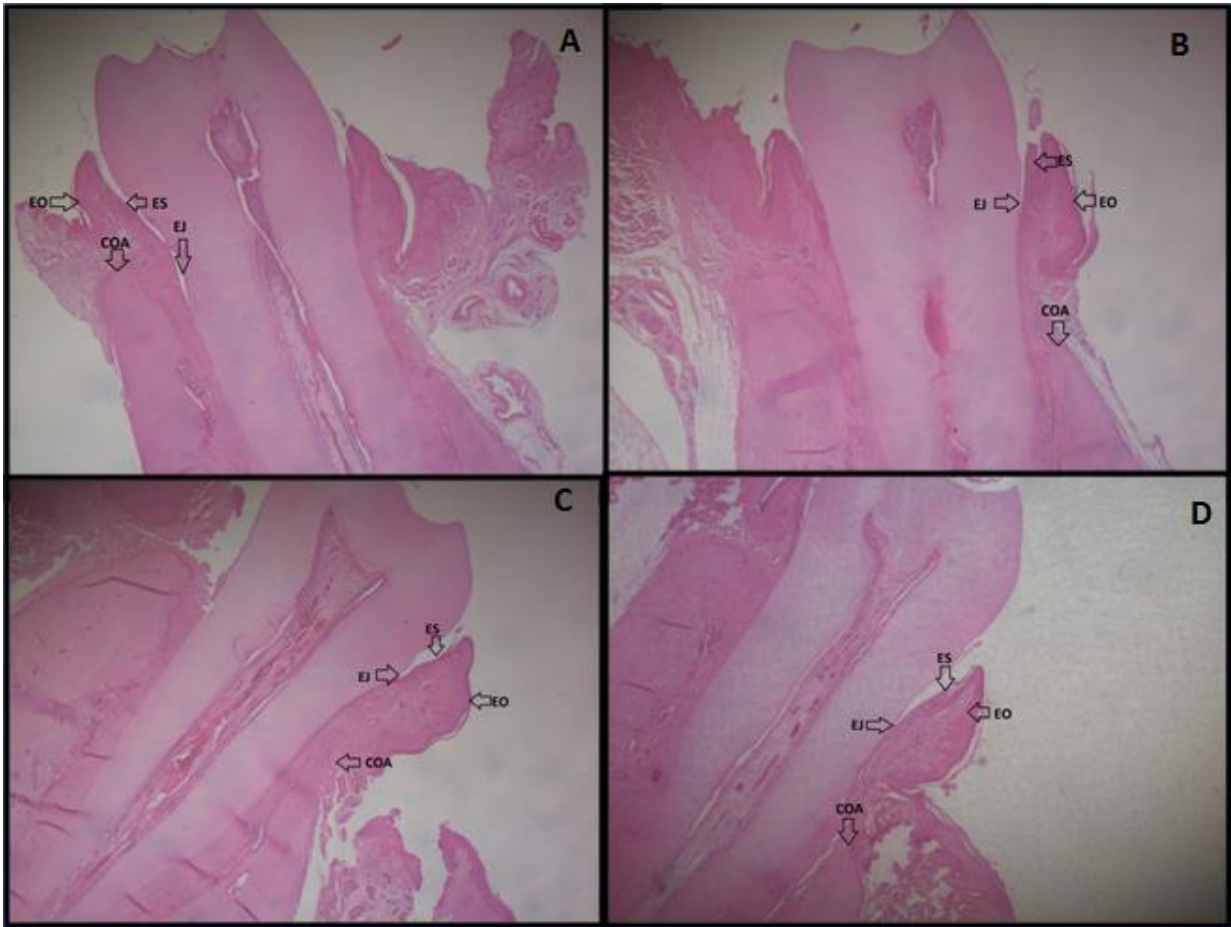


**Graphic 6:** Morphometric analysis of the abdominal aorta to measure the width of the artery walls of the rats of the experimental groups. Values represent mean  $\pm$  standard deviation and are expressed in micrometers. Different meanings mean that the data are statistically different, with  $p < 0.05$ .

## APPENDIX D



**Figure 1:** (A) Representative photomicrograph of an animal of the CTL group. (B) Representative photomicrograph of an animal of the LIG group. (C) Representative photomicrograph of an animal of the RSV group. (D) Representative photomicrograph of an animal from the LIG RSV group. COA: Alveolar bone crest; EJ: Junctional epithelium; ES: Sulcular epithelium; EO: Oral epithelium (D). Hematoxylin and Eosin (HE). Increase 400x.



**Figure 2:** (A) Representative photomicrograph of an animal of the OBS group. (B) Representative photomicrograph of an animal from the OBS RSV group. (C) Representative photomicrograph of an animal in the LIG group OBS. (D) Representative photomicrograph of an animal of the group LIG OBS RSV. COA: Alveolar bone crest; EJ: Junctional epithelium; ES: Sulcular epithelium; EO: Oral epithelium (D). Hematoxylin and Eosin (HE). Increase 400x.

## ANEXO

## ANEXO 01 – Aprovação CEUA



## Autorização

O protocolo intitulado "Avaliação do efeito do resveratrol sobre os tecidos periodontais de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e submetidos à periodontite experimental", sob a responsabilidade de Carlos Augusto Nassar que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 14/07/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017 - 31/03/2019
Espécie/Inhagem/raça	Rato heterogênico - Wistar
N. de animais	12 fêmeas prenhas. A ser informado no relatório final a quantidade de animais que foram efetivamente utilizados.
Peso/idade	200 gramas/100 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIOESTE.

Cascavel, 14/07/2017

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña  
 Coordenadora do CEUA  
 Portaria nº 3730/2016 - GRE

## ANEXO 02 – NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

### Author Guidelines

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance, 7. Data Protection.

**Journal of Periodontal Research guarantees an effective review and publication process.**

**Rapid review processing: on average 32 days from submission to first decision**

**Rapid publication: on average 55 days from acceptance to online availability and Medline indexing**

**Useful Websites:** [Submission Site](#), [Author Services](#), [Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

#### **1. GENERAL**

The *Journal of Periodontal Research* is an international research periodical the purpose of which is to publish original clinical and basic investigations and review articles concerned with every aspect of periodontology and related sciences. Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in the *Journal of Periodontal Research*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell's [Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

#### **2. ETHICAL GUIDELINES**

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

##### **2.1. Authorship and Acknowledgements**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal.

The *Journal of Periodontal Research* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Please also include specifications of the source of funding for the study and any potential conflict of interests if appropriate. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

## 2.2. Ethical Approvals

All studies using human or animal subjects should include an explicit statement in the Material and Methods section identifying the review and ethics committee approval for each study, if applicable. Editors reserve the right to reject papers if there is doubt as to whether appropriate procedures have been used.

## 2.3 Photographs of People

The *Journal of Periodontal Research* follows current HIPAA guidelines for the protection of patients/subject privacy. If an individual pictured in a digital image or photograph can be identified, his or her permission is required to publish the image. The corresponding author may submit a letter signed by the patient authorizing the *Journal of Periodontal Research* to publish the image/photo. Or, a form provided by the *Journal of Periodontal Research* (available by clicking the “Instructions and Forms” link in Manuscript Central) may be downloaded for your use. This approval must be received by the Editorial Office prior to final acceptance of the manuscript for publication. Otherwise, the image/photo must be altered such that the individual cannot be identified (black bars over eyes, tattoos, scars, etc.). The *Journal of Periodontal Research* will not publish patient photographs that will in any way allow the patient to be identified, unless the patient has given their express consent.

## 2.4 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

The *Journal of Periodontal Research* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrc.tn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

## 2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

Please disclose information concerning sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest under Acknowledgements

## 2.6 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

## 2.7. Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

## 2.8. Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login to Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS), they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

### For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected, the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

### For authors choosing OnlineOpen



If the OnlineOpen option is selected, the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Agreements (OAA):

Creative Commons License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements, please visit the Copyright FAQ hosted on Wiley Author

Services <http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-301.html> and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by certain funders [e.g. The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) or the Austrian Science Fund (FWF)], you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy, please visit <http://www.wiley.com/go/funderstatement>

### 3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further assistance, please contact the editorial office at [jreedoffice@wiley.com](mailto:jreedoffice@wiley.com)

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.

#### 3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>
- Log-in or, if you are a new user, click "register here".
- If you are registering as a new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click 'Finish'.
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/jre> and enter your email address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select "Corresponding Author Center"

### 3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your “Corresponding Author Center”, submit your manuscript by clicking the submission link under “Author Resources”.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
  - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
  - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
  - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### 3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, figure legends and tables but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

### 3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research will be reviewed by two experts in the field. The Journal of Periodontal Research uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### 3.5. Suggest a Reviewer

The Journal of Periodontal Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of 2 potential international reviewers whom you consider capable of reviewing your manuscript.

### 3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### 3.7. Email Confirmation of Submission

After submission you will receive an email to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check your email address carefully in the system. If the email address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your email server. Also, the emails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

### 3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre'. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Articles:** must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if

necessary, repeated. Original articles must conform to the highest international standards in the field.

**Review Articles:** are selected for their broad general interest; all are refereed by experts in the field. Reviews should take a broad view of the field rather than merely summarizing the authors' own previous work, so extensive citation of the authors' own publications is discouraged.

**Mini Reviews** are covering a smaller area and may be written in a more free format.

**Short Communications:** Short communications, limited to 1-3 pages, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a full-length paper. Short communications need not follow the usual divisions.

**Meeting Reports:** Reports of scientific meetings in periodontology and related fields are also published.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages (including figures and tables) are subject to a charge of GBP70.00 per additional page. For guidance purposes, one published page amounts approximately to 5,500 characters; text should be reduced if figures/tables are included within the 7 pages. If authors are unable to pay additional page fees they will need to reduce the length of their articles.

### 5.2. Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

**Abbreviations and symbols:** Abbreviations should be in accordance with Guidelines laid down by the American Society of Microbiology. Unless they are in common usage (e.g. DNA), all terms must be displayed in full in the key words, and the first time that they appear in the abstract, the main text, tables and figures, followed by the abbreviation in parentheses. If an abbreviation is used in the body of figure or table only it must be defined in the figure legend or table footnotes. The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster's Third New International Dictionary* will be adhered to.

**Scientific Names:** Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps.* for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names.

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential

medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

### 5.3. Structure

All manuscripts submitted to the Journal of Periodontal Research should include: Title page, abstract, main text, references and tables, figures and figure legends were appropriate.

**Title Page:** should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. We accept only one corresponding author per manuscript and in case of co-correspondence a foot note will be added indicating 'Both the authors have contributed equally to the work'. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

**Abstract:** The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

### Main Text of Original Research Articles

**Introduction:** Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

**Material and methods:** Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

**Results:** Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

**Discussion:** Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

**Acknowledgements:** Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support must be acknowledged.

### 5.4. References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in superscript format. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://refman.com/downloads/styles>

#### Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49.

Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; 2: 628-630.

(3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; 283: 628-635.

(4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; 92 (2 pt 2): 316- 324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; 54 (suppl 1): 26- 28.

(5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; 16 (Sep): 24-29.

(6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response*, 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

(7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

(8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease*. Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

(9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. *Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975*. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. *Infrared spectroscopic studies of solid oxygen*. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

## 5.5. Tables, Figures and Figure Legends

**Tables:** Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Use titles which are self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

**Figures:** All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed.

**Preparation of Electronic Figures for Publication:** Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible).

For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones (including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Wiley Blackwell's guidelines for figures: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Check your electronic artwork before submitting it: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp>.

**Permissions:** If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

### 5.6. Supporting Material

Supporting Material, such as data sets or additional figures or tables, that will not be published in the print edition of the journal, but which will be viewable via the online edition, can be submitted.

It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Material is intended to be made available through the online edition. If the size or format of the Supporting Material is such that it cannot be accommodated on the journal's Web site, the author agrees to make the Supporting Material available free of charge on a permanent Web site, to which links will be set up from the journal's website. The author must advise Wiley Blackwell if the URL of the website where the Supporting Material is located changes. The content of the Supporting Material must not be altered after the paper has been accepted for publication.

The availability of Supporting Material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supporting Material' and providing titles of figures, tables, etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the authors Web site cannot be reviewed. The Supporting Material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly.

## 6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

### 6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site.

Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: [www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html](http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html). This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained

by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

### **6.2. Early Online Publication Prior to Print**

The Journal of Periodontal Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### **6.3. Production Tracking**

Online production tracking is available for your article through Wiley Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a

### **6.4. Video Abstracts**

A video abstract can be a quick way to make the message of your research accessible to a much larger audience. Wiley and its partner Research Square offer a service of professionally produced video abstracts, available to authors of articles accepted in this journal. You can learn more about it at [www.wileyauthors.com/videoabstracts](http://www.wileyauthors.com/videoabstracts). If you have any questions, please direct them to [videoabstracts@wiley.com](mailto:videoabstracts@wiley.com).

## **7. Data Protection**

By submitting a manuscript to or reviewing for this publication, your name, email address, and affiliation, and other contact details the publication might require, will be used for the regular operations of the publication, including, when necessary, sharing with the publisher (Wiley) and partners for production and publication. The publication and the publisher recognize the importance of protecting the personal information collected from users in the operation of these services, and have practices in place to ensure that steps are taken to maintain the security, integrity, and privacy of the personal data collected and processed. You can learn more at <https://authorservices.wiley.com/statements/data-protection-policy.html>.