

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE  
CASCAVEL

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCÊNCIAS E  
SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**POLIANA DE FÁTIMA BIEDERMAN**

**AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS  
SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS OBESAS  
SUBMETIDAS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

CASCAVEL, PR

(Maio/2015)

**POLIANA DE FÁTIMA BIEDERMAN**

**AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS  
SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS OBESAS  
SUBMETIDAS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

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

Área de concentração: Processo saúde-doença

ORIENTADORA: Patrícia Oehlmeyer Nassar

COORIENTADORA: Sara Cristina Sagae

CASCADEL, PR

(Maio/2015)

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**POLIANA DE FÁTIMA BIEDERMAN**

**AVALIAÇÃO DOS HORMÔNIOS SEXUAIS FEMININOS  
SOBRE O TECIDO ÓSSEO DE RATAS OBESAS  
SUBMETIDAS À PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Oehlmeyer Nassar  
UNIOESTE

Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro  
UNIOESTE

Profa. Dra. Shelon Cristina Souza Pinto  
UEPG

CASCADEL, PR  
(Maio/2015)

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B485a

Biederman, Poliana de Fátima

Avaliação dos hormônios sexuais femininos sobre o tecido ósseo de ratas obesas submetidas à periodontite experimental. /Poliana de Fátima Biederman. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2015.

92 p.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Oehlmeyer Nassar

Coorientadora: Sara Cristina Sagae

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde.

1. Obesidade. 2. Doença periodontal. 3. Tecido ósseo. I.Nassar, Patrícia Oehlmeyer. II. Sagae, Sara Cristina. III.Universidade Estadual do Oeste do Paraná. IV. Título.

CDD 21.ed. 616.398

CIP 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo CRB-9ª/965

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.*

*(Isaac Newton)*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me agraciar com uma família maravilhosa, uma profissão pela qual sou completamente apaixonada e por ser meu amparo e indicar sempre uma direção a seguir.

Ao meu pai Adolfo (*in memoriam*), por ter me deixado a mais linda herança que se pode deixar: o exemplo. Sem seus exemplos de humildade, paciência e amor, sei que seria impossível chegar até aqui. Obrigada por ter me ensinado tanto em tão pouco tempo. Você permanece vivo em meu coração.

À minha mãe Cleci, pela mulher forte e batalhadora que és, por confiar em mim e por não ter medido esforços para que eu chegasse até aqui. Obrigada por ser mãe e pai ao mesmo tempo, por muitas vezes abdicar de si para que eu pudesse realizar meus sonhos e por me ensinar a ser teimosa e persistir no que quero. Minha gratidão e amor eterno a você. Eu te amo.

Ao meu namorado Cleberson, ou simplesmente “Binho”, pelo apoio e pela paciência de sempre, por abrir meus olhos para que muitas vezes eu veja o óbvio, por dividir comigo conquistas, inseguranças e principalmente por partilhar comigo o sonho de construir uma família. Você é meu porto seguro. Obrigada por estar ao meu lado mesmo quando eu não mereço. Amo você.

Às minhas irmãs Fran e Bruna, por estarem sempre por perto, por me incentivarem, por me deixarem ser uma tia babona, por ficarem sempre na torcida por mim e por serem tão sinceras. Sem vocês, eu não teria conseguido; aliás, sem sua insistência, Fran, eu não teria tentado a prova do mestrado. Amo vocês.

Aos meus sogros Jair e Olivia, meus pais adotivos, e ao meu cunhado Willian, obrigada por me aceitarem na família e no lar de vocês, por me tornarem uma filha, pelos conselhos, conversas... O apoio de vocês foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Muito amor e gratidão a vocês.

À professora Patrícia Oehlmeyer Nassar, pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Obrigada por partilhar seu conhecimento comigo e por ser um exemplo de profissional e humildade. Com o mestrado, minha admiração, não só pela profissional, mas pela pessoa que és, só aumentou. Agradeço pela paciência e por seu empenho para que tudo desse certo. Você estará sempre em minhas orações. Obrigada.

À professora Sara Cristina Sagae, minha coorientadora, pela disposição e o empenho na elaboração deste trabalho. Obrigada por atender meus telefonemas fora de horário, pela paciência e pela forma carinhosa com que sempre me recebeu e ajudou. Obrigada.

À professora Rose Meire Costa Brancalhão, por sua disponibilidade, disposição e paciência. Obrigada por todas as sextas-feiras em que ficou sem almoço para poder me ajudar, por jamais se recusar a um “Profeee”, por me incentivar a sempre buscar mais. Você foi uma mãezona. A você meu respeito e minha gratidão.

Ao professor Carlos Augusto Nassar, por tornar o mestrado mais leve com seu jeito tranquilo, divertido e amigo de ser. Obrigada por nos acalmar sempre que tudo parecia que ia dar errado. Tenho grande admiração pelo profissional e pela pessoa que és. Obrigada.

Ao corpo docente do Mestrado em Biociências e Saúde da UNIOESTE, pela contribuição direta com a minha formação. Agradeço também à Graselha, pela

paciência e disposição em sempre me atender e responder a todas as dúvidas.

A todos os técnicos e funcionários que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, em especial à técnica Celeste da Rocha Paiva, por me localizar no laboratório e por estar sempre disposta a ajudar.

A Karine Figueredo da Costa e Paula Bernardon, para mim eternamente “Neides”, e a “Neide adotada” Kathia Regina Cantelli, obrigada por toda a ajuda, todos os conselhos, por estarem sempre ali, por sempre arrumarem um tempinho para mim. O mestrado não teria a menor graça sem vocês. Obrigada pela amizade.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação, Stéfany Pedrotti, Ademar Dantas Cunha Jr., Jeferson Freitas Toregeani, Márcia Borges, José Martim, Milene Sedrez Rover, Francielly Andressa Felipetti e a todos os outros colegas, pelo companheirismo e aprendizado proporcionados. Vocês tornaram esses dois anos mais fáceis.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho, meu sincero agradecimento e eterna gratidão. Obrigada!



## RESUMO GERAL

A obesidade tem sido tema de diversas polêmicas e controvérsias, seja no meio científico ou na população em geral. Poucos assuntos chamam tanto a atenção da sociedade e de estudiosos, quer devido ao elevadíssimo número de pessoas obesas a nível mundial, quer devido às suas potenciais complicações para a saúde dos indivíduos. Diversas doenças crônicas têm sido relacionadas à obesidade, dentre elas as doenças periodontais, as quais podem estar associadas à reabsorção óssea e ter seus mecanismos intensificados na obesidade. Atualmente, demonstra-se que o tecido ósseo sofre influência da obesidade, sendo que os hormônios sexuais femininos parecem um importante elo entre a obesidade e o ganho de massa óssea em pacientes obesos. Dada a importância da obesidade e sua considerável relação com a doença periodontal e o tecido ósseo, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da influência hormonal nos tecidos periodontais de ratas adultas na fase do proestro do ciclo estral, com obesidade induzida experimentalmente, através da dieta de cafeteria, associada ou não à doença periodontal. Para a realização da pesquisa, 20 ratas fêmeas adultas ciclando, na fase do proestro do ciclo estral, foram divididas em grupo controle (CON), grupo ligadura (LIG), grupo cafeteria (CAF) e grupo cafeteria e ligadura (CAFLIG). Aos 75 dias de vida, os animais dos grupos LIG e CAFLIG receberam uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito, a qual atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e o conseqüente desenvolvimento da doença periodontal. Após a eutanásia, aos 105 dias de vida, realizou-se a coleta de sangue do tronco cerebral direito para a determinação das concentrações de estradiol e progesterona utilizando-se *kits* específicos; e a dissecação da hemi-mandíbula direita, que foi submetida à análise histológica. Os dados obtidos foram analisados e avaliados por meio dos testes ANOVA e Tukey, sendo que os resultados demonstraram uma diminuição na concentração dos hormônios sexuais femininos quando obesidade e doença periodontal foram associadas; da mesma forma, observou-se reabsorção óssea acentuada e mudança na morfologia do tecido ósseo no grupo CAFLIG. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a diminuição nos hormônios sexuais femininos associados à obesidade e à doença periodontal interferiu negativamente no tecido ósseo mandibular.

**Palavras-chave:** obesidade; doença periodontal; tecido ósseo.

## ABSTRACT

Obesity has been the subject of several controversies, whether in scientific circles or among the general population. Few subjects call so much attention to society and researchers, whether due to the huge number of obese people worldwide, or due to its potential complications to the health of individuals. Several chronic diseases have been associated with obesity among them periodontal diseases, which may be associated with bone resorption and have its mechanisms intensified in obesity. Nowadays, it is demonstrated that the bone tissue undergoes influence of obesity, so that female sex hormones seem an important link between obesity and bone mass gain in obese patients. Given the importance of obesity and its considerable relation to periodontal disease and bone tissue the aim of this study was to evaluate the effect of the hormonal influence on periodontal tissues of adult female mice in proestrus phase of the estrous cycle, with experimentally induced obesity, through the cafeteria diet, whether or not associated with periodontal disease. For this study 20 adult female mice cycling, in proestrus phase of the estrous cycle were divided into control group (CON), ligature group (LIG), cafeteria group (CAF) and cafeteria and ligature group (CAFLIG). At 75 days of life, the animals from groups LIG and CAFLIG received a ligature around the right mandibular first molar which acted as a gum irritating for 30 days, favoring the accumulation of bacterial plaque and the consequent development of periodontal disease. After euthanasia, at 105 days of life, it was held the blood collection from the right brain stem to determine the estradiol and progesterone concentrations by using specific kits; and the dissection of the right hemi mandible, which was submitted to histological analysis. The obtained data were analyzed and evaluated using the ANOVA and Tukey tests so that the results showed a decrease in the concentration of female sex hormones when obesity and periodontal disease were associated; in the same way it was observed an evident bone resorption and a change in the morphology of the bone tissue in the group CAF/LIG. Based on the results obtained the current study can conclude that the decrease in female sex hormones associated with obesity and periodontal disease negatively influenced on the mandibular bone tissue.

**Keywords:** Obesity; Periodontal Disease; Bone tissue.

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.1 Objetivos específicos.....	18
3. REVISAO GERAL DE LITERATURA.....	19
3.1 Obesidade.....	19
3.2 Doença periodontal.....	21
3.3 Obesidade e doença periodontal... ..	23
3.4 Tecido ósseo e Obesidade.....	25
3.5 Hormônios esteroides e tecido ósseo.....	28
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 Tipos de pesquisa.....	31
4.2 Animais.....	31
4.3 Grupos experimentais.....	32
4.4 Dieta de cafeteria.....	32
4.5 Indução da doença periodontal.....	33
4.6 Coleta das amostras de sangue para LH, estradiol e progesterona .....	34
4.7 Processamento Histológico.....	34
4.8 Observações Microscópicas.....	35
4.9 Comitê de Ética.....	36
4.10 Análise dos dados.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Influência hormonal nos tecidos periodontais.....	37
5.2 Análise Morfológica.....	39
5.3 Análise Morfométrica.....	41
6. DISCUSSÃO.....	44

6.1 Relação da Obesidade e Doença Periodontal com hormônios sexuais femininos.....	44
6.2 Efeito da Obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre a morfologia dos tecidos periodontais.....	45
6.3 Efeito da Obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre a morfometria do osso alveolar mandibular das ratas.....	46
7. CONCLUSÃO.....	50
8. REFERÊNCIAS.....	51
9. ARTIGO CIENTÍFICO.....	65
ANEXO : Aprovação pelo Comitê de Ética.....	92

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital..... 35
- Figura 2: Concentração plasmática de progesterona em ratas alimentadas com dieta de cafeteria ou ração padrão submetidas ou não à doença periodontal induzida..... 38
- Figura 3: Concentração plasmática do hormônio luteinizante em ratas alimentadas com dieta de cafeteria ou ração padrão submetidas ou não à doença periodontal induzida..... 38
- Figura 4: Fotomicrografia de dente de rato, grupo CAFLIG, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, corte sagital..... 39
- Figura 5: Fotomicrografia da crista óssea alveolar de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital..... 40
- Figura 6: Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital, representativa dos padrões de osso encontrado nos grupos estudados..... 41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Conteúdo nutricional da ração padrão para ratos e dos componentes da dieta da cafeteria.....	33
Tabela 2: Valores sanguíneos de progesterona e LH dos ratos dos grupos estabelecidos.....	37
Tabela 3: Média dos valores da distância da junção cimento-esmalte a crista óssea alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos.....	42
Tabela 4: Média dos valores da contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no osso alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DMO: Densidade Mineral Óssea

IL-6: Interleucina-6

JCE: Junção Cimento-Esmalte

IMC: Índice de Massa Corpórea

LH: Hormônio Luteinizante

NIH: National Institute of Health

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPG: Osteoprotegerina

RANK: Receptor Ativador do Fator de Transcrição Nuclear KB

RANKL: Receptor Ativador do Fator de Transcrição Nuclear KB Ligante

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

## INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo do tempo, a obesidade vem sendo estudada, por meio de modelos experimentais animais, com a finalidade de esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de patologias relacionadas à sua instalação. Entre eles, incluem-se os provocados por lesões cerebrais, os de origem genética (BRAY; YORK, 1979), a lesão química de regiões hipotalâmicas induzidas por injeção de drogas (SUZUKI et al., 1990; SEGAL et al., 1991) e a obesidade induzida por dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas (SCLAFANI; SPRINGER, 1976).

As dietas ricas em calorias para indução da obesidade em modelos experimentais são utilizadas com o objetivo de se assemelhar à obesidade em humanos, comumente provocada por ingestão de alimentos ricos em calorias. A dieta de cafeteria é uma dieta de indução à obesidade, consiste em uma escolha de alimentos processados com uma elevada quantidade de gordura e/ou açúcares e sal (incluindo biscoitos, salgadinhos, chocolates etc.) e é fornecida em adição à ração padrão (PRADA et al., 2005). O termo dieta da cafeteria foi originalmente usado para designar a ingestão de uma variedade de itens característicos da alimentação ocidental (também conhecida como “Western diet”) ofertados a ratos para indução de obesidade (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Vários protocolos de oferta dessa dieta são utilizados, incluindo trabalhos que iniciam a dieta 7 dias pós-parto (DAMETO et al., 1994), aos 21 dias (a data de desmame em ratos) (PRATS et al., 1989), ou em adultos jovens (ROTHWELL; STOCK, 1979). A duração da dieta e os itens ofertados também apresentam variações (SHAFAT et al., 2009). A dieta da cafeteria promove adaptações fisiológicas que resultam em redução na sensibilidade aos efeitos anoréxicos da leptina (WEI et al., 2004), hipertensão (COATMELLECC-TAGLIONI et al., 2002), aumento da adiposidade e resistência à insulina em roedores (LLADO et al., 1995; PRADA et al., 2005).

A semelhança com o perfil hormonal da mulher torna a rata um excelente modelo experimental para estudos de reprodução. Dessa forma, grande parte do conhecimento que se possui, até o presente momento, sobre o controle do ciclo



ovariano de vários mamíferos, cuja ovulação é espontânea, é baseado em estudos sobre o ciclo estral das ratas (SMITH et al., 1975). A função reprodutiva das ratas inicia-se com a instalação da puberdade, caracterizada pela ocorrência da abertura vaginal e usualmente acompanhada pela primeira ovulação (TERASAWA; FERNANDEZ, 2001), sendo definida como o período transiente entre a infância e a idade adulta, em que as características sexuais secundárias aparecem, o crescimento corporal ocorre e as gônadas iniciam a produção de gametas maduros capazes de fertilização (REITER et al., 1975). Posteriormente à instalação da puberdade, com início próximo dos 70 dias de vida, o ciclo reprodutivo tem como marco principal a ovulação, e a rata, assim como a mulher, apresenta ovulação cíclica espontânea independente de alterações sazonais ou de atividade sexual. Os processos de crescimento e maturação folicular, assim como o funcionamento do corpo lúteo, são coordenados diretamente pelas gonadotrofinas e modulados pela ação dos esteroides ovarianos. O ciclo de ratas compõe um meio natural para se estudar as variações nas concentrações plasmáticas dos esteroides ovarianos e hipofisários e suas ações fisiológicas sobre o epitélio vaginal, o comportamento sexual e a ovulação (SMITH et al., 1975).

O conceito de que os hormônios ovarianos podem aumentar a inflamação dos tecidos gengivais e exacerbar a resposta a irritantes locais tem sido postulado por diversos estudos. A inflamação gengival parece ser agravada por um desequilíbrio e/ou aumento dos hormônios sexuais. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os hormônios sexuais afetam e modificam a ação das células do sistema imune. Além disso, evidências sugerem que interações entre estrogênio e células do sistema imune podem ter efeitos regulatórios não imunes (CUTOLO et al., 2007).

Devido ao exposto, surge o seguinte problema: qual é o efeito da obesidade induzida por dieta de cafeteria e influência hormonal sobre o tecido ósseo mandibular de ratas com e sem doença periodontal?

A partir desse problema, surge a seguinte hipótese: o tecido ósseo de ratas obesas com periodontite pode apresentar aumento ou diminuição do número de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos sugerindo um aumento da

reabsorção óssea ou neoformação óssea respectivamente.

Dada a complexidade do problema proposto, torna-se necessário que ele seja abordado a partir de uma visão interdisciplinar, de modo que informações de disciplinas como a fisiologia, a endocrinologia e a periodontia, tanto da área médica quanto da odontológica, sejam capazes de se integrar, a fim de enriquecer a compreensão do problema criando perspectivas para o desenvolvimento de novos estudos e intervenções para o tratamento da obesidade e de problemas ósseos em humanos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da influência hormonal no tecido ósseo de ratas na fase do proestro do ciclo estral, com obesidade induzida por dieta de cafeteria, associada ou não à doença periodontal.

### **2.2 Objetivos específicos**

- a) Realizar uma análise descritiva morfológica do tecido ósseo da mandíbula;
- b) Avaliar a quantidade de osteócitos, osteoclastos e osteoblastos na mandíbula dos animais, por meio de análise histológica;
- c) Avaliar histometricamente a altura da crista alveolar da mandíbula dos animais;
- d) Avaliar a influência hormonal de LH e progesterona sobre o tecido ósseo dos animais.

## 3 REVISÃO GERAL DE LITERATURA

### 3.1 Obesidade

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é o exagerado acúmulo de gordura corporal em proporções que podem ser prejudiciais à saúde e ao bem-estar dos indivíduos (DEURENBEERG; YAP, 1999). Manifestando-se como uma condição crônica, a obesidade, que já foi entendida como consequência da escolha de se alimentar demasiadamente e não realizar exercícios físicos, atualmente é compreendida como uma doença cuja etiologia parece ser resultante de fatores (genéticos, endócrinos, ambientais, neurológicos e psicológicos, além do estilo de vida) isolados ou que interagem entre si (HALPERN, 1992; NAMMI et al., 2004).

Atualmente, o método mais utilizado para diagnosticar excesso de peso é o Índice de Massa Corporal (IMC), o qual é calculado a partir do peso do indivíduo em quilos dividido pelo quadrado da sua altura em metros ( $IMC = \text{peso}/\text{altura}^2$ ) (WHO, 2012). Quando o IMC é igual ou superior a  $30 \text{ Kg/m}^2$ , o indivíduo é considerado obeso (VIÉGAS et al., 2010; WHO, 2012) e quando o IMC é superior a  $40 \text{ Kg/m}^2$ , o indivíduo é caracterizado por apresentar obesidade mórbida (DIEMEN et al., 2006).

Considerados um dos piores problemas de saúde pública da atualidade, a obesidade e o excesso de peso são a maior causa de mortalidade possível de se evitar depois do tabaco (HAMDY, 2011) e a quinta principal causa de mortes no mundo, sendo que pelo menos 3,4 milhões de adultos morrem anualmente em consequência do excesso de peso e obesidade (OMS, 2012). No Brasil, um recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde demonstra que o excesso de peso e a obesidade aumentaram nos últimos seis anos, avançando de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011, sendo que, no mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8% (BRASIL, 2013).

Preocupantemente, a obesidade está associada ao surgimento de inúmeras comorbidades que prejudicam a qualidade de vida e agravam o prognóstico dos pacientes. Segundo a OMS, 44% da carga de diabetes, 23% da carga de doença isquêmica do coração e de 7% a 41% da carga de determinados tipos de câncer

estão relacionados ao excesso de peso e à obesidade (OMS, 2012). Nos últimos anos, a compreensão da relação dessas comorbidades com a obesidade tem passado pela resposta inflamatória do tecido adiposo (TRAYHURN; WOOD, 2004; ANTUNA-PUENTE, 2008).

Os seres humanos apresentam o tecido adiposo dividido em dois subtipos: o tecido adiposo branco, que pode estar localizado periféricamente nas regiões subcutânea e visceral, responsável por armazenar energia na forma de triglicerídeos e auxiliar na regulação do balanço energético; e o tecido adiposo marrom, localizado no sistema nervoso central, cuja função é termogênica (FONSECA-ALANIS et al., 2006).

Composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, monócitos e macrófagos resistentes (BERG; SCHERER, 2005; BAYS, 2008; GOOSSENS, 2008), o tecido adiposo branco é visto atualmente como um grande e importante órgão endócrino metabolicamente ativo, sendo considerado patogênico quando o excesso da adiposidade corporal, de forma isolada ou associada a efeitos deletérios de atividades endócrinas e imunológicas, está relacionado a desordens metabólicas (BAYS, 2008).

O tecido adiposo, além de expressar receptores responsivos a sinais aferentes do sistema nervoso central e dos sistemas hormonais como os receptores de insulina e glucagon (KERSHAW; FLIER, 2004), secreta uma série de substâncias bioativas denominadas adipocinas. Essas substâncias possuem ação local ou sistêmica e estão envolvidas em processos metabólicos, imunes e neuroendócrinos. Segundo Hermsdorff e Monteiro (2004), as adipocinas, além de atuar nos próprios adipócitos, agem em diferentes tecidos modulando-os por mecanismos de *feedback*.

A elevação de marcadores e citocinas inflamatórios e a presença de macrófagos infiltrados no tecido adiposo de indivíduos obesos são evidências científicas que demonstram que a obesidade é uma enfermidade caracterizada por um baixo grau de inflamação crônica nesse tecido (TRAYHURN; WOOD, 2004; BULLÓ et al., 2003; CANCELLO; CLÉMENT, 2006). Um estudo de revisão realizado por Trayhurn e Wood (2004) demonstrou que a inflamação responde de forma diretamente proporcional ao aumento da adiposidade corporal, ou seja, a maior infiltração de macrófagos em proporção ao aumento do tamanho dos adipócitos

pode aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias e proteínas de fase aguda e, assim, contribuir com as consequências fisiopatológicas da obesidade (WEISBERG *et al.*, 2003; BERG; SCHERER, 2005; YE *et al.*, 2007; HAJER; VAN HAEFTEN; VISSEREN, 2008).

De acordo com a literatura, uma possível explicação para a origem da inflamação na obesidade seria que, com o ganho de peso e o consequente aumento de tamanho dos adipócitos, ocorre a compressão dos vasos sanguíneos presentes no tecido adiposo, o que impede a oxigenação adequada do tecido, ocasionando uma hipóxia local e a consequente morte de alguns tecidos, de modo a desencadear a cascata da resposta inflamatória e o processo de angiogênese para a formação de novos vasos (NEELS; OLEFSKY, 2006; LOLMÈDE *et al.*, 2003; WOOD *et al.*, 2009).

### **3.2 Doença periodontal**

Devido ao fato de que causam muita dor e sofrimento, além de afetar a qualidade de vida das pessoas, as doenças bucais são consideradas um grande problema de saúde pública devido à alta prevalência e incidência e aos impactos desses agravos (PETERSEN, 2003).

Independente de idade, sexo, ou raça, a placa bacteriana e a inflamação gengival estão fortemente associadas entre si. No entanto, além da placa bacteriana e da inflamação gengival, outros fatores de risco são importantes para o aparecimento e a patogênese de formas severas de periodontites que, frequentemente, afetam pequenos grupos da população mundial (ALBANDAR; RAMS, 2002).

O periodonto, também denominado de tecido de suporte dos dentes, compreende as seguintes estruturas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar. Ele apresenta como principal função garantir a integridade da superfície da mucosa mastigatória (LINDHE; KARRING; LANG, 2010). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal de 2010, mais conhecida como SB Brasil, os problemas gengivais aumentam em razão diretamente proporcional à idade. Os resultados da pesquisa indicam que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal foi de 68% para a idade de 12 anos, 51% para a faixa de 15 a

19 anos, 17% para os adultos de 35 a 44 anos e somente 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos (BRASIL, 2013).

Na década de 70, acreditava-se que a doença periodontal era caracterizada unicamente pelo acúmulo de biofilme dental; portanto, supunha-se que qualquer indivíduo fosse susceptível ao desenvolvimento da doença periodontal severa e que a gengivite sempre evoluía para a periodontite (POSITION, 1996). Por meio da epidemiologia, a história natural e os riscos para o desenvolvimento da doença periodontal passaram a ser melhor esclarecidos e, no final dos anos 90, já se sabia que a progressão da doença periodontal é multifatorial e que bactérias gram-negativas específicas, embora essenciais, não são suficientes para causar a doença, sendo seu desenvolvimento influenciado pela mistura de fatores genéticos e ambientais ou adquiridos que afetam a resposta do hospedeiro ao biofilme dental (KINANE et al., 2006).

A doença periodontal acontece quando, a partir do acúmulo de biofilme dental, inicia-se um desequilíbrio entre a agressão microbiana e a resposta do hospedeiro, o que conduz a um aumento de bactérias no tecido periodontal. Dessa maneira, dependendo da resposta do hospedeiro, a gengivite, quando não tratada, pode evoluir para a periodontite, resultar em inflamação e destruição progressiva dos tecidos de suporte e afetar sistemicamente o organismo humano por meio de mediadores inflamatórios. Clinicamente, a periodontite caracteriza-se pela perda de inserção, acompanhada pela formação de bolsa e reabsorção óssea (CARRANZA; NEWMAN, 2007).

Os microorganismos associados com a periodontite envolvem espécies com potencial periodontopatogênico elevado, principalmente bactérias gram-negativas, anaeróbias, em especial *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (ORINGER, 2002; PAGE, 1998). Embora essas bactérias sejam essenciais para o desencadeamento da doença periodontal, a extensão e a gravidade desta apresentam razões multifatoriais, podendo estar associadas a condições de risco, como alterações sistêmicas e aspectos comportamentais (VIEIRA et al., 2010).

Nas duas últimas décadas, surgiram evidências que sustentam o fato de que a doença periodontal pode ter efeito adverso em órgãos e tecidos de locais

distantes; desse modo, a periodontite pode ser apontada como uma doença inflamatória com envolvimento sistêmico (ENGBRETSON et al., 1999), apresentando-se como potencial de risco para patologias sistêmicas como as doenças cardiovasculares e cerebrovasculares (KUO et al., 2008; BECK; SLADE; OFFENBACHER, 2000; RAMIRES; CÉSAR; FERREIRA, 2003; GENCO et al., 2001), o nascimento de bebês prematuros e/ou com baixo peso (OFFENBACHER et al., 1998; CLOTHIER; STRINGER; JEFFCOAT, 2007; XIONG et al., 2006) e o mau controle metabólico em pacientes com Diabetes Mellitus (STEGEMAN, 2005), entre outras.

### **3.3 Obesidade e doença periodontal**

Em 1977, Perlstein e Bissada realizaram um estudo para tentar responder se havia influência da obesidade e/ou hipertensão na inflamação gengival e na resposta periodontal. Eles estudaram 44 ratos divididos em 4 grupos, sendo 12 ratos normais, 12 ratos não obesos hipertensos, 8 ratos obesos e 12 ratos obesos e hipertensos. Após induzir um quadro de periodontite durante sete semanas, observou-se uma contribuição significativa da obesidade na gravidade da periodontite (PERLSTEIN; BISSADA, 1977).

Estudos posteriores também têm demonstrado que o aumento no índice de massa corporal tem associação com a elevação no risco do desenvolvimento da periodontite (BERTOLINI et al., 2010; BRIANEZZI et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Em 2003, Al-Zahrani et al. examinaram 31.311 pacientes entre 2 e 90 anos com o intuito de correlacionar a incidência e severidade da doença periodontal com o Índice de Massa Corporal (IMC), concluindo que jovens abaixo do peso considerado ideal para suas idades apresentam 80% menos chance de desenvolver a doença periodontal (AL-ZAHRANI; BISSADA; BORAWSKIT, 2003).

Embora seus mecanismos ainda não sejam conhecidos, é provável que as citocinas derivadas do tecido adiposo tenham um papel chave na relação existente entre a doença periodontal e a obesidade (PICHON et al., 2007). As citocinas clássicas do processo inflamatório, secretadas pelo tecido adiposo, tais como Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e Interleucina-6 (IL-6), afetam o metabolismo de todo o corpo e contribuem para o desenvolvimento de um baixo grau de inflamação



sistêmica (WOOD et al., 2009). Além disso, os níveis de citocinas pró-inflamatórias são proporcionais ao IMC, particularmente em indivíduos com obesidade visceral, de tal modo que o aumento da massa de gordura pode induzir a uma resposta inflamatória aumentada da doença periodontal.

Outra importante citocina encontrada em pacientes obesos e que relaciona a obesidade à doença periodontal é a Inibidora da Ativação do Plasminogênio, o PAI-1, que é fortemente expressado pela gordura visceral e cuja ação é inibir a degradação de coágulos, o que pode levar à diminuição da irrigação no periodonto, contribuindo para o desenvolvimento da doença periodontal (SAITO; SHIMAZAKI, 2007).

É plausível sugerir que indivíduos obesos apresentam maior chance de destruição tecidual na presença de uma injúria como a infecção periodontal, haja vista que alterações metabólicas passíveis de estarem presentes nessa condição potencialmente influenciariam a imunidade desses indivíduos. O aumento da concentração de lipídios e de glicose também pode estar associado à doença periodontal e contribuir para uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro, causada pela mudança na função de neutrófilos, de modo a impedir a produção de fatores de crescimento pelos macrófagos, diminuindo a capacidade de reparo dos tecidos (IACOPINO, 1995; NIEMAM et al., 1999; CUTLER et al., 1999; NOACK et al., 2000; KATZ et al., 2002).

O estado nutricional também tem demonstrado um importante papel no estado periodontal. Em estudo realizado por Tomofuji et al. (2005), observou-se que uma dieta rica em colesterol foi associada com a migração do epitélio juncional e aumentou a reabsorção óssea em ratos. Geralmente, os obesos ingerem grandes quantidades de alimentos com gordura saturada e baixo valor nutricional, o que pode favorecer a debilidade da saúde bucal (RITCHIE, C. S.; KINANE, D. F. 2003; SCHIFFERLE, 2005; TOMOFUJI et al., 2005). Além disso, uma dieta rica em gordura potencialmente ocasiona o desenvolvimento da doença periodontal, uma vez que esse tipo de dieta é capaz de deprimir a função bactericida do sistema imune sobre a *Porphyromonas gingivalis* em humanos (CLUTER; IACOPINO, 2003).

### 3.4 Tecido ósseo e obesidade

O osso, apesar de sua aparência simples e estática, é um tecido dinâmico que, devido à ação de osteoblastos e osteoclastos, está em constante processo de formação e reabsorção (CAO, 2011). A saúde do osso e o desempenho adequado de sua função estão baseados no equilíbrio entre os diversos fatores envolvidos nesse processo (CAO, 2011; REID, 2008; ZHAO et al., 2008).

A remodelação óssea, que se mantém durante toda a vida adulta do indivíduo, é responsável pela renovação e manutenção da integridade anatômica e estrutural do esqueleto (BROWN; JOSSE, 2002; DUONG; RODAN, 2001; MANOLAGAS; JILKA, 1995), sendo definida como um processo de aposição no qual ocorre a substituição do osso antigo por osso recém-formado (HILL; ORTH, 1998; MEGHJI, 1992).

Apesar de ser bastante discutido, o processo inicial da remodelação óssea ainda não foi completamente identificado. No entanto, forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TURNER; ROBLING, 2004).

Após o processo inicial, ocorre o recrutamento das células precursoras de osteoclastos por meio de sinais físicos e hormonais. Essas células migram da medula óssea concentrando-se sobre a região óssea que será absorvida (BOYDE; ALI; JONES, 1984; KOBAYASHI; KRONENBERG, 2005). A diferenciação das células progenitoras em osteoclastos ocorre por meio de um mecanismo que envolve a interação célula a célula com células osteoblásticas (SUDA, 1997).

Três fatores têm sido identificados como principais envolvidos na gênese de osteoclastos: o RANKL (receptor ativador do fator de transcrição nuclear KB ligante), o RANK (receptor ativador do fator de transcrição nuclear KB) e a OPG (osteoprotegerina). O receptor RANKL, manifestado na superfície dos pré-osteoblastos, conecta-se ao seu receptor RANK, localizado na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros, estimulando a diferenciação e ativação dos osteoclastos e inibindo a apoptose destes. A OPG, secretada pelos osteoblastos, pode atuar inibindo o RANKL por meio da ligação com o RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos;

apresenta, portanto, efeitos antagônicos aos do RANKL, impede a diferenciação dos osteoclastos e impossibilita a reabsorção óssea (CAO, 2011; STEEVE, 2004).

Após a reabsorção, num estágio denominado fase de reversão, a superfície reabsorvida é preparada, por meio da produção de uma glicoproteína, por células mononucleares da linhagem dos monócitos e macrófagos, para que os novos osteoblastos iniciem a formação óssea (BANDEIRA, 2000). A partir daí, uma complexa cascata de eventos que envolvem a proliferação de células mesenquimais primitivas, diferenciação em células precursoras osteoblásticas (pré-osteoblasto), maturação dos osteoblastos, formação de matriz e mineralização, resultará na formação óssea (HILL; ORTH, 2008; KOBAYASHI; KRONENBERG, 2005).

Hormônios, nutrientes provenientes da alimentação, atividade física, descarga de peso (REID, 2008) e doenças inflamatórias (LACATIVA; FARIAS, 2010) são alguns fatores envolvidos no processo de formação e reabsorção óssea, sendo que, recentemente, reconheceu-se a possibilidade de haver uma relação entre o tecido adiposo e a massa óssea (REID, 2008). O fato de se conceber o tecido ósseo como um órgão endócrino capaz de modular o tecido adiposo (KARSENTY; OURI, 2012) proporciona avanços no entendimento de doenças crônicas e suas inter-relações, como a osteoporose, a obesidade e o diabetes tipo 2 (KARSENTY; FERRON, 2012; PAULA et al., 2010).

Fatores clínicos e evolutivos demonstram que o tecido adiposo e o tecido ósseo estão diretamente relacionados (KARSENTY; OURI, 2012; KARSENTY; FERRON, 2012), sendo que a obesidade parece afetar o metabolismo ósseo por meio de vários mecanismos, contribuindo para o aumento (REID et al., 1992a; REID et al., 1992b; FELSON et al., 1993) ou a diminuição da massa óssea (ZHAO et al., 2008; CAO, 2011).

A obesidade, de modo tradicional, é entendida como benéfica à saúde do osso. Estudos têm demonstrado correlação positiva entre o aumento da massa corporal e o aumento da densidade mineral óssea (DMO) em várias populações (FELSON et al., 1993). No entanto, o mecanismo básico pelo qual a obesidade pode favorecer a formação óssea ainda é desconhecido (ZHAO et al., 2007).

Uma das hipóteses que sustenta a relação positiva existente entre a obesidade e o tecido ósseo é o fato de que o elevado peso corporal aumenta o

impacto mecânico, o que estimula a formação óssea por meio da mecanotransdução e, dessa forma, resulta em aumento da DMO (ZHAO et al., 2007, 2008; REID, 2008). Observações clínicas corroboram com essa hipótese, visto que indivíduos com anorexia nervosa apresentam diminuição do crescimento, redução da massa óssea e distúrbios alimentares (TENG, 2011).

Outro efeito protetor da obesidade sobre o tecido ósseo pode ser explicado pela insulina. Os osteoblastos apresentam receptor para insulina que, por sua vez, estimula a diferenciação osteogênica e inibe a osteoclastogênese (REID, 2008; YANO et al., 1994), o que demonstra a existência de uma correlação positiva entre a concentração plasmática de insulina e a DMO (ZHAO et al., 2008). Além disso, as altas concentrações plasmáticas de insulina, comum em pacientes obesos, contribuem para a superprodução de estrógenos pelo ovário e a diminuição da síntese hepática de proteínas carreadoras de hormônios sexuais (SHBG), o que aumenta a concentração da fração livre de estrógeno e androgênio levando a uma redução da atividade osteoclástica e um aumento da atividade osteoblástica, de modo a resultar no aumento da massa óssea (BANDEIRA, 2007; COBAYASHI et al., 2005; SANTOS et al., 2008; ZHAO et al., 2007).

Apesar de vários fatores proporem efeitos positivos da obesidade sobre a massa óssea, essa perspectiva tem sido questionada devido ao possível aumento dos estímulos catabólicos que a obesidade gera no tecido ósseo. Fatores que regulam o catabolismo nos ossos, como citocinas pró-inflamatórias e glicocorticoides que estimulam a reabsorção óssea por meio da osteoclasia e inibem a diferenciação osteogênica, aumentam na obesidade (ZHAO et al., 2008; MIGLIACCIO et al., 2007).

O Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória secretada por vários tipos de células como fibroblastos, adipócitos e macrófagos (POPA et al., 2007). Além de estar associada com o aumento na resistência à insulina, essa citocina tem sido associada à obesidade (QI; PEKALA, 2000; KIENS, 2006; HOTAMISLIGIL, 2006; SUN et al., 2011). Estudos epidemiológicos demonstram uma correlação negativa entre a DMO e a concentração plasmática de TNF- $\alpha$  (ZHENG et al., 1997), sendo que os mecanismos propostos para explicar essa correlação baseiam-se no fato de o TNF- $\alpha$  aumentar a osteoclastogênese e

diminuir a atividade osteoblástica *in vitro* e *in vivo* (NANES, 2003; BERTOLINI et al., 1986; GASPERSIC et al., 2006).

Outra citocina secretada pelo tecido adiposo e que apresenta correlação negativa com a DMO é a Interleucina seis (IL-6), que tem sido utilizada como um marcador para prever a reabsorção óssea (DING et al., 2008). Assim como o TNF- $\alpha$ , essa citocina aumenta a osteoclastogênese contribuindo para a reabsorção óssea (ISHIMI et al., 1990; ROZEN et al., 2000).

A leptina, hormônio derivado dos adipócitos que atua na supressão do apetite e no aumento do gasto calórico, apresenta concentração aumentada proporcionalmente ao aumento do tecido adiposo (VELLOSO, 2006). Dependendo do local em que atua, central ou periférico, e da função que desempenha, a leptina parece ter efeitos positivos e negativos sobre o tecido ósseo (DUCY et al., 2000). Estudos *in vitro* constataram que a leptina pode agir sobre as células-tronco da medula, estimulando a diferenciação de osteoblastos e inibindo adipócitos; *in vivo*, estudos mostram que esses efeitos podem depender da função e do local de ação (ZHAO et al., 2008). O aumento da secreção de leptina pelos adipócitos contribui potencialmente para o acúmulo de macrófagos, intensificando, assim, o papel inflamatório das citocinas sobre a reabsorção óssea (ZHAO et al., 2008; CAO, 2011).

### **3.5 Hormônios esteroides e tecido ósseo**

Estrógenos são hormônios esteroides monofenólicos que exercem numerosas atividades clássicas bem documentadas, incluindo efeitos no desenvolvimento, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, no desenvolvimento e preparo cíclico do sistema reprodutor para a fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de carboidratos, minerais, proteínas e lipídios (WILLIAMS; STANGEL, 1996).

Com os ovários como principal fonte de estrógeno circulante, tem-se observado que os hormônios sexuais apresentam importante papel no crescimento e na manutenção do pico de massa óssea (BORELLI, 1994). A deficiência de estrógeno tem sido considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose em mulheres, visto que apresenta causa primária de perda óssea após a menopausa (RICHELSON et al., 1984; SZENJFELD, 2003).

Os mecanismos pelos quais os estrógenos agem ainda não foram completamente elucidados; no entanto, sabe-se que seu mecanismo de ação envolve interação entre uma molécula ligante e um receptor (COMPSTON, 2001). Os receptores para hormônios sexuais estão presentes nos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, condrócitos e células-tronco mesenquimais da medula óssea, o que sugere a modulação do esqueleto por estes hormônios (VENKEN et al., 2008).

O estrógeno atua diretamente no tecido ósseo, de modo a aumentar a formação de osteoblastos, inibir a osteoclastogênese e induzir a apoptose de osteoclastos, favorecendo, portanto, a mineralização do tecido ósseo. Dentre as evidências que suportam essas ações, destaca-se que, quando ovariectomizado, o animal tem seu potencial osteogênico diminuído (OCARINO et al., 2008), além de apresentar maior apoptose dos osteócitos, o que é revertido após a reposição hormonal (FONSECA et al., 2011). Em estudo realizado por Hsieh et al. (1995), analisou-se o efeito da ovariectomia no reparo de alvéolos dentários em ratas, concluindo-se que a deficiência estrogênica pode afetar a remodelação óssea pós-exodontia (HSIEH; DEVLIN; MCCORD, 1995).

Além de sua atuação direta no tecido ósseo, o estrógeno apresenta ainda efeitos indiretos sobre os ossos uma vez que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6, que favorecem a reabsorção óssea e estão aumentadas após a ovariectomia (WEITZMANN; PACIFICI, 2006). Resultados obtidos em pesquisa realizada por Von Wowern et al. (1994) sugerem que a osteoporose severa reduz significativamente o conteúdo ósseo das arcadas dentárias podendo estar associada a um nível de inserção desfavorável em casos de periodontite (VON-WOWERN; KLAUSEN; KOLLERUP, 1994).

Em estudo realizado por Reinhardt et al. (1999) com mulheres em terapia de manutenção periodontal, observou-se que, no grupo de indivíduos com periodontite progressiva, os níveis de IL1- $\beta$  foram maiores do que naqueles com insuficiência de estrógenos (REINHARDT et al., 1998). Os baixos níveis de estrógeno na corrente sanguínea têm sido associados com inflamação gengival (NORDERYD et al., 1993) e perda de inserção clínica (REINHARDT et al., 1999).

Segundo Pinto-Neto et al. (2002), fatores como o sedentarismo, o hábito de fumar, medicamentos a base de corticosteroides e ausência de terapia hormonal podem aumentar a probabilidade de desenvolver mais tarde a osteoporose.

Após a menopausa, com a redução da produção estrogênica, o estrógeno circulante é derivado principalmente da conversão dos androgênios adrenais por meio da aromatase, que ocorre principalmente no tecido adiposo (VENKEN et al., 2008; MESEGUER et al., 2002). No estado obeso, os adipócitos, que produzem a aromatase, estão hipertrofiados e a sua secreção aumenta (ZHAO et al., 2008; REID, 2008). O estrógeno produzido a partir da aromatização no tecido adiposo representa uma importante fonte desse hormônio, o que sugere que tal fonte possa explicar um menor número de fraturas em mulheres obesas (ZHAO et al., 2008; REID, 2008).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipos de pesquisa

Esta pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, de Biologia Celular e de Patologia Geral da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* de Cascavel, no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS). Com base em seus objetivos, ela é classificada como descritiva (GIL, 2007), uma vez que expõe as características de um fenômeno e identifica a realidade sem modificá-la, ou seja, narra o que acontece.

Trata-se também de uma pesquisa experimental que, segundo Gil (2008), “consiste em determinar um objeto, selecionar as variáveis que seriam capazes de influenciá-lo, definir as formas de controle e de observação dos efeitos que a variável produz no objeto”. Conforme Turato (2005), a relação causa-efeito, comparando-se a ocorrência entre grupos expostos e não expostos a certas variáveis, caracteriza-a como quantitativa.

### 4.2 Animais

Foram utilizadas 20 ratas Wistar adultas, na fase do proestro do ciclo estral (peso corporal entre 180 e 350 g), provenientes do biotério central, que foram mantidas em biotério setorial do laboratório de Fisiologia e Biofísica do CCBS, em caixas individuais e ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas às 07h00min e apagadas às 19h00min), temperatura controlada, com livre acesso a água e alimento. O dia do parto foi considerado como dia 0 e, aos 21 dias após o parto, realizou-se o desmame da ninhada, sendo separadas as fêmeas em caixas com grupos de 3 a 5 por caixa. O peso corporal (em dias alternados) e a ingestão alimentar (diária) foram monitorados durante o período experimental. Para a pesagem do alimento, o restante (sobra do dia anterior) era retirado, pesado e, então, era ofertado o alimento do dia (volume já previamente calculado). O alimento ingerido foi calculado subtraindo-se o peso (dia anterior) do peso do dia e dividindo-se pelo número de animais na caixa (SAGAE et al., 2013).



### 4.3 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada:

- 1- Grupo Controle (CON): ratas submetidas à dieta de ração padrão e água do desmame até a idade adulta;
- 2- Grupo Ligadura (LIG): ratas submetidas à dieta de ração padrão e água do desmame até a idade adulta, onde foi induzida a doença periodontal por ligadura aos 75 dias;
- 3- Grupo Cafeteria (CAF): ratas submetidas à dieta de cafeteria do desmame até a idade adulta;
- 4- Grupo Cafeteria e Ligadura (CAFLIG): ratas submetidas à dieta da cafeteria do desmame até a idade adulta, em que foi induzida doença periodontal por ligadura aos 75 dias.

### 4.4 Dieta de cafeteria

Aos 21 dias de vida, realizou-se o desmame dos animais e as ratas foram separadas em dois grupos formados por 10 animais: o grupo Controle (CTL), que recebeu ração padrão para ratos (3,8 kcal/g: 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de gordura – Biobase, Brazil), e o grupo Cafeteria (CAF), que recebeu a ração padrão e a dieta de cafeteria, constituída por alimentos processados, altamente palatáveis, com elevada quantidade de gordura e açúcares (Tabela I) (adaptado de SAGAE *et al.*, 2013). Os componentes das dietas eram repostos todas as manhãs e as caixas onde os animais estavam alojados eram trocadas a cada dois dias.

**Tabela 1.** Composição nutricional dos alimentos da dieta de cafeteria.

	Energia (kcal/g)	Carboidratos (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Gorduras (g/100g)	Sódio (mg/100g)
Ração padrão	3,8	70	20	10	0
Salgadinho de queijo	4,65	72	6,4	17,2	676
Salgadinho de bacon	5,25	56	8,8	30	1040
Bolacha	4,28	73	8	10,7	300
Bolo de chocolate	4,29	55	5	21,7	141,7
Refrigerante de cola	0,43	11	0	0	5
Guaraná®	0,4	10	0	0	5,5
Salame	4,35	2	22	38	1140
Salsicha	3,71	1,4	16	34	1342
Bisnaguinha	3,17	54	11,2	6,2	300
Wafer de Chocolate	5,2	63	5	27	113
Mortadela	2,02	2	12	16	1545
Marshmallow	3,4	80	5	0	46

\*

#### 4.5 Indução da doença periodontal

Aos 75 dias de vida, 5 animais do grupo CTL e 5 animais do grupo CAF foram submetidos à indução da doença periodontal, originando dois novos grupos: grupo CTL/LIG e grupo CAFLIG.

Para indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 mL/100 g e quetamina 0,08 mL/100 g), 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, colocou-se um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e, conseqüentemente, o desenvolvimento da doença periodontal (NASSAR et al., 2009).

#### **4.6 Coleta das amostras de sangue para LH e progesterona**

Aos 105 dias de vida, os animais foram eutanasiados por decapitação, realizando-se então a coleta do sangue. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm e o plasma foi separado e estocado a -20°C, para dosagem das concentrações de LH e progesterona.

As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio. As concentrações de progesterona foram determinadas utilizando-se *kit* específico (Progesterona DSL – 3400, Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). O limite mínimo para detecção foi de 0,34 ng/mL. O radioimunoensaio para LH foi realizado usando *kit* específico fornecido pelo National Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, USA). O anticorpo utilizado foi o anti-rato LH-S10 e o padrão foi LH-RP3. O limite mínimo para a detecção foi 0,04 ng/mL para o LH.

#### **4.7 Processamento histológico**

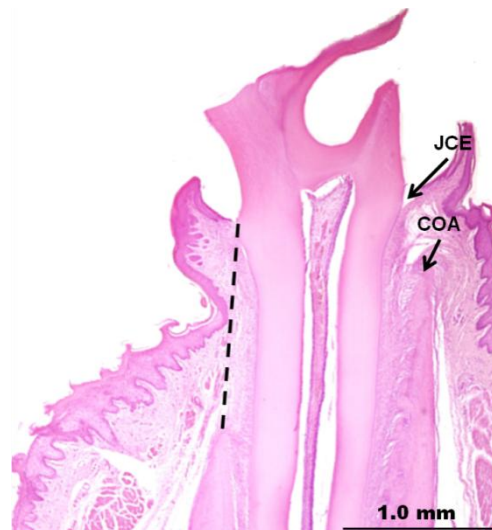
Após a eutanásia dos animais, as hemimandíbulas do lado direito foram coletadas e fixadas em solução de formol a 10%, por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente por uma hora e imersas em solução de ácido tricloroacético, preparado da seguinte forma: 100 mL de água destilada para 5 mL de ácido. As peças foram mantidas na solução descalcificadora por 20 dias, sendo que diariamente se verificava o grau de descalcificação e a cada 5 dias a solução de ácido tricloroacético era trocada.

Após esse intervalo de tempo, as peças foram colocadas em solução de Sulfato de Sódio a 5% por três horas e meia para neutralização do ácido; posteriormente, foram lavadas em água corrente por doze horas e, em seguida, realizou-se a sua desidratação e diafanização. A partir daí, as peças foram inclusas

em parafina obtendo-se 20 blocos, os quais foram seccionados, por um micrótomo semi-automático, em cortes de 7  $\mu\text{m}$  cada. Foram confeccionadas dez lâminas por grupo, sendo que cada lâmina apresentava 4 cortes seriados, totalizando, portanto, 40 cortes por grupo. Tais lâminas foram coradas utilizando-se a técnica histológica de hematoxilina e eosina.

#### 4.8 Observações microscópicas

A análise microscópica foi realizada por um único examinador, por meio da avaliação dos cortes histológicos corados em microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland). Para observações morfológicas do processo alveolar e contagem de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos da hemimandíbula dos animais, padronizou-se um retângulo, sendo que todas as células que estivessem presentes nesse retângulo deveriam ser contadas. Ao todo, em cada corte, foram contados 5 retângulos: dois na região vestibular, dois na lingual e um na região apical do primeiro molar estudado. Além disso, realizou-se a medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (Figura 1). Para realização da contagem de células e medida da junção cimento-esmalte, utilizou-se o programa Image-Pro Plus 6.0.



**Figura 1.** Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital. Mostra o local das medições da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte (linha tracejada) nos grupos estudados. Crista óssea alveolar (COA) e junção cimento-esmalte (JCE).

#### **4.9 Comitê de Ética**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Anexo 1).

#### **4.10 Análise dos dados**

Para avaliação estatística, utilizou-se o teste análise de variância ANOVA de uma via seguida do post test Tukey. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ , sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Influência hormonal nos tecidos periodontais

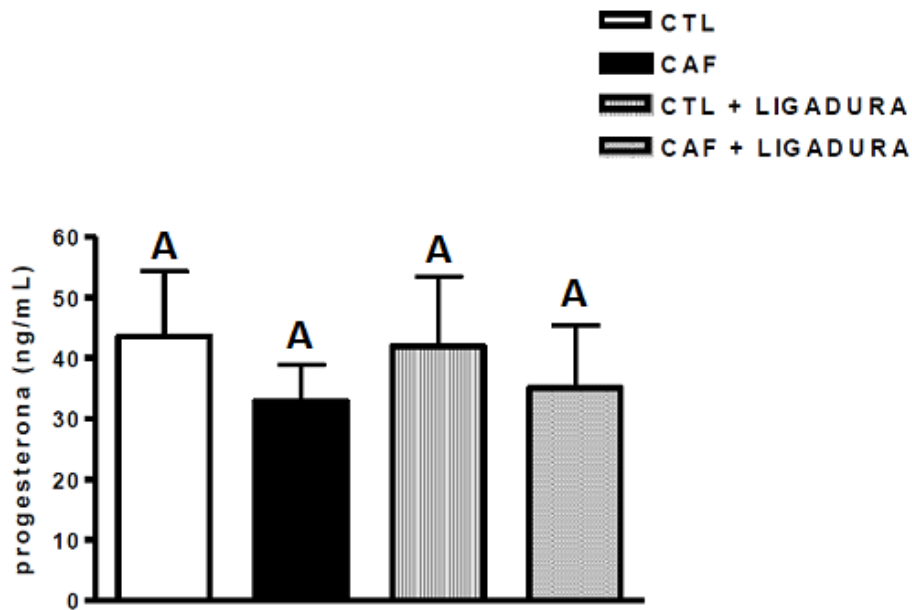
Conforme análise estatística, foi possível observar que não existem diferenças significativas entre os tratamentos estudados com relação à progesterona. No entanto, observa-se diferença significativa entre os grupos estudados em relação à concentração do hormônio luteinizante (LH). Quando comparado aos grupos CTL e LIG, o grupo CAF apresentou diferença estatisticamente significativa na concentração de LH, sendo essa diferença estatística encontrada também quando comparado o grupo CAF + LIG ao grupo CTL e o grupo CAF + LIG ao grupo LIG. Esta análise demonstra que os animais submetidos à dieta de cafeteria apresentaram uma menor concentração do hormônio luteinizante quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão, sendo que, quando se associou a doença periodontal a esses animais (CAF + LIG), a concentração do hormônio caiu ainda mais, sugerindo uma influência da obesidade e da doença periodontal na concentração desse hormônio.

Tabela 2 - Valores sanguíneos de Progesterona e LH dos ratos dos grupos estabelecidos.

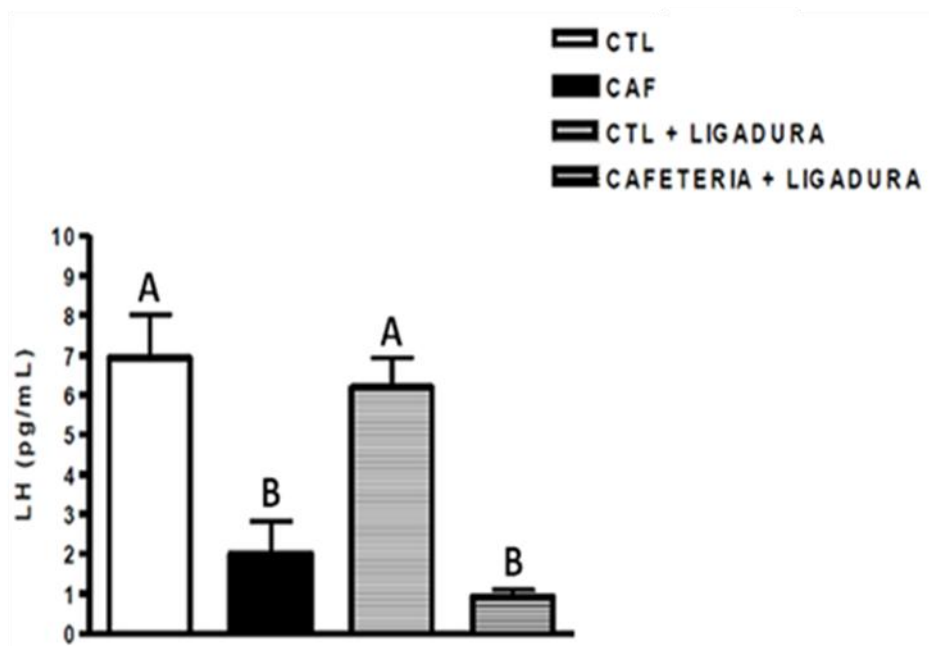
Grupos	PROGESTERONA	LH
CONTROLE	43,6 ± 32,1 <b>A</b>	6,9 ± 2,9 <b>A</b>
LIGADURA	47,3 ± 35,4 <b>A</b>	6,3 ± 2,4 <b>A</b>
CAF	32,8 ± 17,3 <b>A</b>	2,0 ± 2,8 <b>B</b>
CAF + LIG	27,3 ± 12,9 <b>A</b>	1,2 ± 0,3 <b>B</b>

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão.

Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação. P < 0.05.



**Figura 2.** Concentração plasmática de progesterona em ratas alimentadas com dieta de cafeteria ou ração padrão submetidas ou não à doença periodontal induzida. \* Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação.

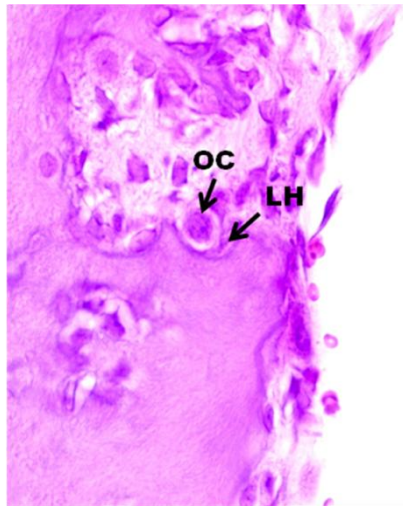


**Figura 3.** Concentração plasmática do hormônio luteinizante em ratas alimentadas com dieta de cafeteria ou ração padrão submetidas ou não à doença periodontal induzida. \* Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação.

## 5.2 Análise morfológica

Os animais dos grupos CTL, CAF, LIG e CAFLIG apresentaram crista óssea alveolar com espessura mediana, sendo que sua altura variou de acordo com o grupo estudado. A figura 3 apresenta o local onde as medições foram efetuadas.

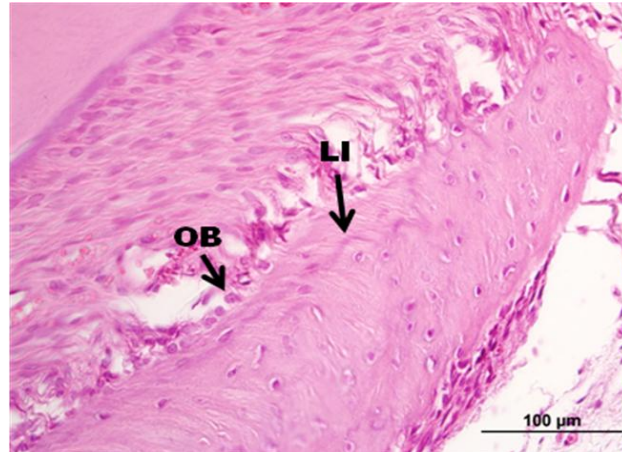
A análise da crista óssea revelou áreas osteoclásticas com lacuna de Howship e uma evidência de reabsorção óssea. Essas áreas foram mais expressivas no grupo CAFLIG (Figura 4).



**Figura 4.** Fotomicrografia de dente de rato, grupo CAFLIG, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, corte sagital. Imagem representativa das evidências de reabsorção óssea em todos os grupos estudados. Mostra o osteoclasto ocupando a lacuna de Howship, indicando uma área de reabsorção óssea. LH, lacuna de Howship; OC, osteoclastos.

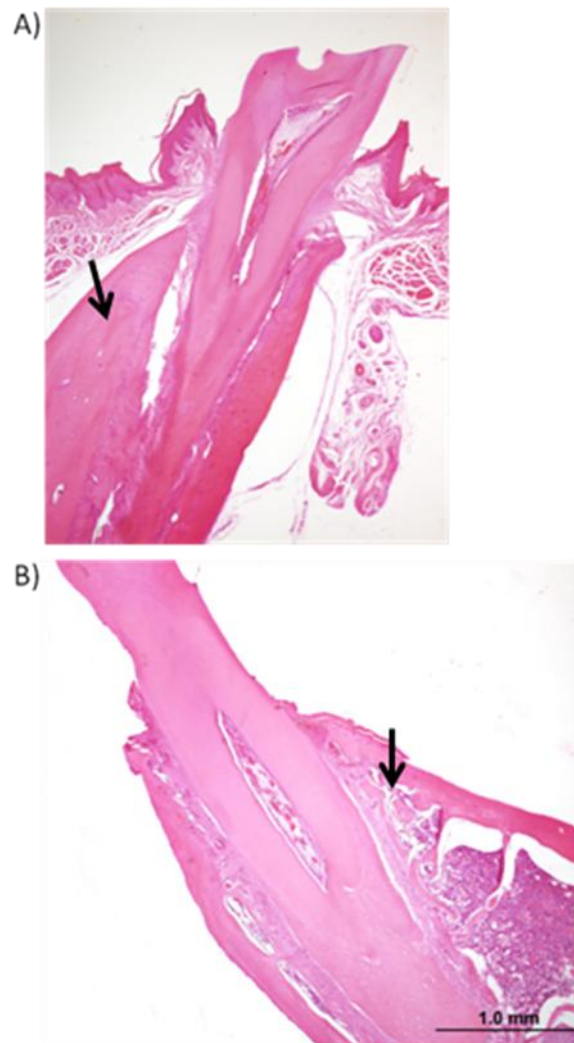
Além disso, foi observada a presença de linhas incrementais, organização de alguns canais de Havers e osteoblastos alinhados, posicionados adjacentes à crista óssea, o que revela a existência de atividade de formação óssea em todos os grupos estudados (Figura 5).





**Figura 5.** Fotomicrografia da crista óssea alveolar de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital. Imagem representativa das evidências de formação óssea em todos os grupos estudados. Mostra as áreas de formação óssea com a presença de linhas incrementais e osteoblastos. LI linhas incrementais; OB, osteoblastos.

Ainda, analisando a crista óssea alveolar, foi observada a presença de diferentes padrões de osso quando comparado o grupo CAFLIG aos demais grupos. O grupo CTL, assim como os grupos CAF e LIG, apresentou osso compacto e regular; já o grupo CAFLIG apresentou predominância de osso trabeculado/esponjoso com cristas ósseas alveolares delgadas (Figuras 6).



**Figura 6.** Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital, representativa dos padrões de osso encontrado nos grupos estudados. Figura (A) mostra o padrão compacto encontrado nos grupos CTL, LIG e CAF e a figura (B) o padrão esponjoso/lacunar encontrado no grupo CAFLIG.

### 5.3 Análise morfométrica

Na análise microscópica, realizou-se a medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar com o intuito de avaliar a ocorrência ou não de perda óssea; além disso, foram realizadas as contagens de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, a fim de determinar a reabsorção ou neoformação óssea nos grupos estudados.

Realizada a análise da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte (Tabela 3), verificou-se que, embora no grupo LIG essa distância e, portanto, a reabsorção óssea tenha sido maior que no grupo CAF, ambos apresentam médias significativamente maiores que o grupo controle, o que sugere

que tanto a obesidade quanto a doença periodontal levam à perda óssea. Ao compararmos ainda o grupo CAFLIG aos demais grupos estudados, podemos observar que ele apresentou a maior média de distância avaliada, o que sugere, portanto, que a perda óssea existente tanto na obesidade quanto na doença periodontal é acentuada quando essas duas patologias estão associadas.

Os resultados obtidos por meio da contagem de células (Tabela 4) demonstram que houve uma diminuição no número de osteoblastos e osteócitos nos grupos LIG, CAF e CAFLIG quando comparados ao grupo CTL; já o número de osteoclastos foi significativamente maior nos grupos tratados quando comparado ao grupo CTL, o que sugere, num primeiro momento, que tanto a indução da doença periodontal quanto a obesidade resultam na perda óssea.

Quando comparados os grupos tratados entre si, observamos que os grupos LIG e CAF não apresentaram diferença significativa em relação ao número de células avaliadas. No entanto, os dois grupos citados apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo CAFLIG, sendo que esse grupo apresentou um menor número de osteoblastos e osteócitos e maior número de osteoclastos em relação aos demais. Tal resultado reforça que a perda óssea é acentuada quando obesidade e doença periodontal estão associadas.

Tabela 3 - Média dos valores da distância da junção cimento-esmalte a crista óssea alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos. Valores expresso em  $\mu\text{m}$ .

<b>Grupos</b>	<b>Médias (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
CONTROLE	579.2 $\pm$ 43.0 <b>A</b>
CAFETERIA	662.4 $\pm$ 31.8 <b>B</b>
LIGADURA	1033.4 $\pm$ 51.7 <b>C</b>
CAF + LIG	1276.4 $\pm$ 78.7 <b>D</b>

Nota: Os valores representam média  $\pm$  desvio padrão.

Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação.  $P < 0.05$ .

Tabela 4 - Média dos valores da contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no osso alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos. Valores expressos em unidade.

<b>Grupos</b>	<b>OSTEOBLASTOS</b>	<b>OSTEÓCITOS</b>	<b>OSTEOCLASTOS</b>
CONTROLE	76.7 ± 12.3 <b>A</b>	361.2 ± 30.9 <b>A</b>	1.0 ± 0.4 <b>A</b>
CAFETERIA	62.3 ± 6.7 <b>B</b>	316.6 ± 16.6 <b>B</b>	2.3 ± 0.4 <b>B</b>
LIGADURA	61.7 ± 4.7 <b>B</b>	300.8 ± 18.3 <b>B</b>	2.1 ± 0.7 <b>B</b>
CAF + LIG	54.0 ± 4.01 <b>C</b>	250.0 ± 15.4 <b>C</b>	3.1 ± 0.7 <b>C</b>

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão.

Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação. P<0.05.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Relação da obesidade e doença periodontal com hormônios sexuais femininos

Embora os resultados da concentração de estrógeno ainda não tenham sido obtidos, esta primeira análise da concentração de LH talvez sugira que a concentração de estrógeno poderá apresentar diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos, haja vista que o estrógeno induz a secreção do hormônio LH durante a fase folicular (MARSHALL et al., 1983; BURGER, 1999).

Uma vez que os esteroides sexuais apresentam diversas funções no tecido ósseo, como aumento da atividade dos osteoblastos, inibição da retirada de cálcio do organismo ao interferir e diminuir a formação e atividade dos osteoclastos e promoção da rápida calcificação óssea ocasionando a diminuição, até cessar, da atividade de proliferação do disco epifisário (IRIE et al., 2005; OSHIMA et al., 2007), a redução das concentrações plasmáticas de LH observada nos primeiros resultados deste trabalho, e em consequência uma possível redução de estradiol, podem hipoteticamente estar influenciando negativamente o tecido periodontal das ratas submetidas à periodontite experimental, apesar da ausência de alteração nas concentrações de progesterona.

Conforme Nordeyd et al. (1993), em estudo realizado com 228 mulheres, verificaram a associação entre a ingestão de estrógeno e a saúde periodontal; parâmetros clínicos foram avaliados, sendo que os resultados indicaram que a suplementação com estrógeno está associada com um menor grau de inflamação gengival quando comparadas ao grupo controle. Ainda segundo Krejci e Bissada (2002), mudanças nos níveis hormonais, como as que ocorrem durante a menopausa, puberdade, gravidez e menstruação, assim como aquelas que ocorrem com o uso de suplementos hormonais, podem levar à quebra da homeostase do periodonto, facilitando o desenvolvimento da gengivite.

Os resultados deste trabalho mostram uma diminuição da concentração de LH e, conseqüentemente, uma possível redução de estrogênio nos grupos CAF e CAFLIG. Além disso, os dois grupos citados apresentaram perda óssea alveolar

quando comparados ao grupo CTL. O grupo LIG, embora não tenha apresentado diferença significativa em relação às concentrações de hormônio quando comparado ao grupo CTL, também apresentou reabsorção óssea, sugerindo que o acúmulo de placa bacteriana é fator decisivo na reabsorção. Duarte et al. (2004) relatam que a terapia de reposição de estrógeno pode fazer algum efeito na perda de massa óssea alveolar, mas esse efeito é desconsiderado quando ocorre o acúmulo de placa bacteriana.

Em pesquisa realizada por Anbinder et al. (2009), avaliou-se, em 40 ratas, a influência da falta de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia como fator de risco para a doença periodontal. Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais ovariectomizados e não ovariectomizados. Com base nos achados desse estudo, a deficiência de hormônios ovarianos não pôde ser considerada como fator de risco para a doença periodontal.

Tendo em vista que indivíduos obesos apresentam maior DMO quando comparado a eutróficos, verifica-se que a obesidade pode ser fator protetor contra fraturas e osteoporose (WANG, 2005; LEONARD, 2004). A grande quantidade de tecido adiposo dos obesos pode contribuir para o aumento da aromatização de andrógenos em estrógenos, fazendo com que a concentração circulante de esteroides sexuais aumente, influenciando, assim, positivamente a massa óssea. Estudos demonstram maior concentração de hormônios sexuais em mulheres obesas do que em eutróficas (RICCI et al., 2001).

Estudos associam a osteopenia e a osteoporose, caracterizadas por perda de massa óssea, com níveis de estrógeno e doença periodontal. No entanto, apesar das evidências, permanecem controvérsias a respeito da possível associação entre tais condições (JEFFCOAT, 2005).

## **6.2 Efeito da obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre a morfologia dos tecidos periodontais**

A análise morfológica da crista óssea alveolar dos grupos estudados revelou características de normalidade no grupo CTL; o osso alveolar apresentou-se intacto, compacto e regular; as cristas ósseas desse grupo apresentaram espessura

mediana e altura ao nível cervical da raiz – dado obtido a partir da medida da distância entre crista óssea alveolar e junção cimento-esmalte.

Segundo Bergström e Boström (2001), a mensuração da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte (COA-JCE) possibilita o estudo das alterações decorrentes da doença periodontal, dos movimentos dentais eruptivos ou da influência de fatores sistêmicos, como o diabetes e o tabagismo, podendo, portanto, ser considerada um parâmetro adequado para se avaliar a ausência de perda óssea alveolar. Neste estudo, nos grupos tratados foi possível observar um aumento na distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, sendo a maior distância encontrada no grupo CAFLIG, o que sugere, portanto, perda óssea alveolar.

Em situações fisiológicas normais, a formação e a reabsorção óssea estão em equilíbrio, de forma que a atividade dos osteoclastos é seguida imediatamente pela atividade dos osteoblastos (SILVA; BRANCO, 2011). Embora áreas de formação óssea e reabsorção tenham sido encontradas em todos os grupos, este estudo demonstrou um aumento na atividade dos osteoclastos dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, principalmente no grupo CAFLIG, o que demonstra, novamente, a ocorrência de perda óssea alveolar.

No grupo CAFLIG, foi possível observar um padrão ósseo diferenciado dos demais grupos estudados. Esse grupo apresentou predominância de osso trabeculado/esponjoso e crista óssea alveolar mais delgada, o que demonstra que a obesidade associada à doença periodontal foi capaz de promover alterações morfológicas no tecido ósseo.

### **6.3 Efeito da obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre a morfometria do osso alveolar mandibular das ratas**

Embora os mecanismos biológicos por meio dos quais a obesidade pode afetar o periodonto não tenham sido totalmente elucidados, diversos estudos têm demonstrado associação entre doença periodontal e obesidade em diferentes populações (ALABDULKARIM et al., 2005; AL-ZAHRANI et al., 2003; BOUCHARD et al., 2006; DALLA VECCHIA et al., 2005; NISHIDA et al., 2005).

A plausibilidade biológica de uma potencial ligação entre obesidade e periodontite sugere envolver um processo imuno-inflamatório, visto que o tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias proporcionais à massa corporal do indivíduo (PISCHON et al., 2007; RITCHIE, 2007). Secretados em maior quantidade em pacientes obesos, os mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 podem levar a um estado hiperinflamatório aumentando o risco de desenvolvimento ou progressão da doença periodontal (RITCHIE, 2007). A produção e a liberação de neutrófilos, que são a primeira linha de defesa dos tecidos periodontais e linfócitos T e B, responsáveis pelas respostas celulares e humorais, também podem ser alteradas em decorrência da obesidade (SAITO; SHIMAZAKI, 2008). A capacidade de reparo dos tecidos periodontais pode ser reduzida ainda devido ao aumento dos níveis de glicose e lipídios nos obesos, o que potencializa a contribuição para uma resposta exacerbada e até inibição da produção dos fatores de crescimento pelos macrófagos (GAIO, 2008).

Segundo diversos estudos, a obesidade é vista como benéfica para a massa óssea, favorecendo sua formação (BANDEIRA, 2007; COBAYASHI; LOPES; TADDEI, 2005; HOLLOWAY et al., 2002; RICCI et al., 2001; SANTOS et al., 2008; VAN COEVERDEN et al., 2001). O mecanismo básico pelo qual a obesidade parece favorecer a formação óssea permanece desconhecido, no entanto, explicações baseadas nos estímulos promovidos por uma maior carga mecânica sobre esqueleto (KAMEDA et al., 1997 apud ZHAO et al., 2007), na relação positiva do estrogênio com a massa óssea (RICCI et al., 2001; VAN COEVERDEN et al., 2001; BANDEIRA, 2007; COBAYASHI; LOPES; TADDEI, 2005; SANTOS et al., 2008) e na secreção de insulina (REID, 2002; SILVA et al., 2007), têm sido propostas.

Em estudo realizado por Brandelero et al. (2012), ratos com obesidade hipotalâmica induzida por MSG apresentaram menor reabsorção óssea quando comparados ao grupo controle. Tal fato sugere que a obesidade hipotalâmica experimental pode produzir um mecanismo protetor sobre a massa óssea e causar benefícios a esta. De forma contrária, o presente estudo demonstrou a ocorrência de perda óssea, por meio da medida da JCE à COA, nos animais submetidos à dieta de cafeteria, sendo que a perda óssea foi acentuada quando se associou doença periodontal. Uma possível explicação para essa diferença de resultados decorre do



fato que, neste estudo, os hormônios sexuais femininos, principalmente estrogênio que parece ser um protetor da massa óssea (RICCI et al., 2001; VAN COEVERDEN et al., 2001; BANDEIRA, 2007; COBAYASHI; LOPES; TADDEI, 2005; SANTOS et al., 2008), apresentaram concentrações menores nos grupos tratados, os quais obtiveram maior perda óssea.

Em pesquisa de revisão sistemática sobre associação entre obesidade e doença periodontal realizada por Moura-Grec et al. (2014), os autores revisaram 31 artigos nos quais 25 associaram o risco de periodontite com obesidade e em apenas 6 não encontraram esta associação, o que evidencia uma relação significativa entre obesidade e doença periodontal. Os resultados deste estudo também demonstraram associação entre essas duas patologias, sendo que, quando obesidade e doença periodontal atuaram juntas, obtivemos uma maior reabsorção óssea alveolar, o que sugere uma influência negativa da obesidade sobre a massa óssea.

Por outro lado, objetivando verificar a possível associação entre a obesidade e a doença periodontal, Dias et al. (2011) realizaram estudo com 100 pacientes não fumantes, sistemicamente saudáveis, que não receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses, nem usaram antibiótico e/ou anti-inflamatório nos últimos 3 meses. O resultado do estudo não demonstrou relação entre obesidade e doença periodontal. Para Genco e Borganakke (2013), no que diz respeito aos fatores de risco para a doença periodontal, evidências sugerem que mudanças na resposta pró-inflamatória e imunológica associadas com a obesidade podem contribuir para o aumento da susceptibilidade à doença periodontal; entretanto, os mecanismos celulares e moleculares não estão esclarecidos e mais estudos são necessários para desvendá-los.

Corroborando com os resultados deste estudo, um estudo realizado no Japão investigou a prevalência da doença periodontal em adultos jovens obesos e explorou a relação entre obesidade e periodontite. Os autores verificaram uma alta prevalência de doença periodontal em indivíduos japoneses obesos jovens e particularmente em mulheres obesas (KATAGIRI et al., 2010).

No que diz respeito à quantificação celular, estudos demonstram que, em condições normais, os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo (LI et al., 2011), sendo que a maturidade óssea pode ser indicada por uma maior

quantidade dessa célula (KURIKCHY et al., 2013). No presente estudo, a quantidade de osteócitos e osteoblastos foi menor nos grupos CAF e LIG quando comparados ao grupo controle, sendo que essa quantidade caiu ainda mais no grupo CAFLIG, em que se associou doença periodontal e obesidade. O contrário aconteceu ao quantificarmos os osteoclastos, que se apresentaram em maior quantidade no grupo CAFLIG, o que sugere que houve reabsorção óssea, visto que, segundo Spolidorio et al. (2007), o aumento do número de osteoclastos está associado com a reabsorção óssea. Além disso, há uma relação positiva entre o número de osteoclastos ativos na superfície óssea e a distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, o que evidencia a ocorrência de perda óssea e demonstra que a obesidade associada à doença periodontal provoca alterações sobre o tecido ósseo.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, o presente estudo experimental demonstrou que a redução na concentração dos hormônios sexuais femininos associada à obesidade induzida por dieta de cafeteria e à doença periodontal interferiu negativamente na massa óssea alveolar. Essas condições ocasionaram mudanças na quantificação de células ósseas (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos) e na morfologia do osso mandibular. No entanto, mais estudos ainda precisam ser realizados para melhor entendimento das possíveis consequências e mecanismo de ação da associação das patologias aqui estudadas e de que maneira essa associação pode influenciar a massa óssea.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALABDULKARIM, M. et al. Alveolar bone loss in obese subjects. **Journal International Academy of Periodontology**, v. 8, p. 7-34, 2005.
- ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontology 2000**, v. 29, p. 7-10, 2002.
- ALMEIDA, E. S.; CASTRO, C. G. J.; VIEIRA, C. A. L. **Distritos sanitários: concepção e organização**. Para gestores municipais de serviços de saúde. 1. ed. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, 1998.
- AL-ZAHRANI, M. S.; BISSADA, N. F.; BORAWSKIT, E. A. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. **Journal of Periodontology**, v. 74, p. 610-615, 2003.
- ANBINDER, A. L. et al. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. **Brasilian Dental Journal**, v. 17, n. 3, p. 201-207, 2006.
- ANTUNA-PUENTE, B.; FEVE, B.; FELLAHI, S.; BASTARD, J. P. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & metabolism**, v. 34, n. 1, p. 2-11, 2008.
- BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.
- BANDEIRA, F. A obesidade realmente fortalece os ossos? **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, [São Paulo], v. 51, n. 6, p. 895-897, ago. 2007.
- BAYS, H. E. et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. **Expert Reviews Cardiovascular Therapy**, v. 6, n. 3, p. 343-368, 2008.
- BECK, J.; SLADE, G.; OFFENBACHER, S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. **Periodontology 2000**, v. 23, n. 1, p. 110-120, 2000.
- BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.
- BERGSTRÖM, J.; BOSTRÖM, L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 28, n. 7, p. 680, 2001.
- BERTOLINI, D. R. et al. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319, p. 516-518, 1986.

BERTOLINI, P. F. R. et al., Doença Periodontal e Obesidade: existe alguma relação? **Revista de Ciências Médicas**, v. 19, n. 1-6, p. 65-72, 2010.

BOLANDER, B. **Enfermagem fundamental**: abordagem psicofisiológica. p. 32-52, 1998. Lisboa: Lusodidacta.

BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: CARVALHO FILHO, E. T.; PAPALÉO NETTO, M. **Geriatría: fundamentos, clínica e terapêutica**. São Paulo: Atheneu, 1994. cap. 22, p. 297-308.

BOUCHARD, P. et al. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. 77-479, 2006.

BOYDE, A.; ALI, N. N.; JONES, S. J. Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro. **British Dental Journal**, v. 156, n. 6, p. 216-220, 1984.

BRANDELERO JR. et al. 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. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia prático do PSF**. Brasília, MS, 2001.

BRASIL, **Pesquisa Nacional de Saúde 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 2013.

BRASIL. Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4718/162/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>>. Acesso em: 25 de julho de 2013.

BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: na autonomic and endocrine hypothesis. **Physiology Reviews**, v. 59, n. 3, p. 719-809, 1979.

BRÊTAS, A. C. P.; GAMBA, M. A. (Org.). **Enfermagem e saúde do adulto**. São Paulo: Manole, 2006.

BRIANEZZI, L. F. F. et al., Impacto da obesidade na saúde bucal: revisão de literatura. **Revista da Faculdade de Odontologia – UPF**, v. 18, n. 2, 2013.

BROWN, J. P.; JOSSE, R. G. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v. 167, n. 10, p. s1-s34, 2002.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obesity research**, v. 11, n. 4, p. 525-531, 2003.

BURGER, H.G. The endocrinology of the menopause. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, n. 1-6, p. 31-35, 1999.

CAMILO, M. V. R. F. Trajetória do direito à saúde: uma experiência de hospital escola. In: **Revista Serviço Social e Sociedade**. São Paulo: Cortez, mar. 1999.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 113, n. 10, p. 1141-1147, 2006.

CAO, J. J. Effects of obesity on bone metabolism. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, [Reino Unido], v. 6, n. 30, p. 1-7, june 2011.

CAPONI, S. A saúde como abertura ao risco. In: BRÊTAS, A. C. P.; GAMBA, M. A. (Org.). **Enfermagem e saúde do adulto**. São Paulo: Manole, 2006.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. **Periodontia Clínica**. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

CLOTHIER, B.; STRINGER, M.; JEFFCOAT, M. K. Periodontal disease and pregnancy outcomes: exposure, risk and intervention. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 451-466, 2007.

COATMELLEC-TAGLIONI, G.; DAUSSE, J. P.; GIUDICELLI, Y.; RIBIERE, C. Gender difference in diet-induced obesity hypertension: implication of renal alpha2-adrenergic receptors. **American Journal of Hypertension**, v.15, p. 143-149, 2002.

COBAYASHI, F.; LOPES, L. A.; TADDEI, J. A. A. C. Densidade mineral óssea de adolescentes com sobrepeso e obesidade. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 4, p. 337-342, jul./ago. 2005.

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

CUTLER, C. W.; SHINEDLING, E. A; NUNN, M.; et al. Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? **Journal of periodontology**, v. 70, n. 12, p. 1429-1434, 1999.

CUTLER, C. W.; IACOPINO, A. M. Periodontal disease: links with serum lipid/triglyceride levels? Review and new data. **Journal International Academy of Periodontology**, v. 5, p. 47-51, 2003.

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. 217-226, 2007.

DALLA VECCHIA, C. F.; SUSIN, C.; RÖSING, C. K.; OPPERMAN, R. V.; ALBANDAR, J. M. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. **Journal of Periodontol**, Chicago, v. 76, n. 10, p.1721-1728, 2005.

DAMETO, M. C.; RAYO, J. M.; ESTEBAN, S.; PIETRO, R. M. Effect of cafeteria diet on alpha-MG intestinal absorption in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology. Comparative Physiology**, v. 108, p. 467-470, 1994.

DEURENBERG, P.; YAP, M. The assessment of obesity: methods for measuring body fat and global prevalence of obesity. **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, England, v. 13, n. 1, p. 1-11, Apr. 1999.

DIAS, B. R. et al. Estudo Da Obesidade Como Indicador De Risco Para a Doença Periodontal. **Brazilian Journal Periodontology**, v. 21, n. 02, p. 70-78, 2011.

DIEMEN, V. V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [São Paulo], v. 21, n. 6, p. 425-429, nov./dec. 2006.

DING, C. et al. Circulating levels of inflammatory markers predict change in bone mineral density and resorption in older adults: a longitudinal study. **Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism**, v. 3, p. 1952-1958, 2008.

DUARTE, P. M. et al. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. **Journal. Periodontal Research**, v. 39, p. 107-110, 2004.

DUCY, P.; AMLING, M.; TAKEDA, S.; PRIEMEL, M.; SCHILLING, A. F.; BEIL, F. T.; SHEN, J.; VINSON, C.; RUEGER, J. M.; KARSENTY, G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. **Cell**, v. 100, p. 197-207, 2000.

DUONG, L. T.; RODAN, G. A. Regulation of osteoclast formation and function. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 2, p. 95-104, 2001.

ENGBRETSON, S. P.; LALLA, E.; LAMSTER, I. B. Periodontitis and Systemic Disease. **The New York State Dental Journal**, v. 65, n. 8, p. 30-32, October, 1999.

FELSON, D. T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M. T.; ANDERSON, J. J. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 8, n. 5, p. 567-573, 1993.

FONSECA, H. et al. Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. **Calcified Tissue International**, v. 88, p. 443-454, 2011.

FONSECA-ALANIS, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

GAIO, E.J. **Efeito da obesidade na progressão da perda de inserção periodontal: estudo de Porto Alegre**. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GASPERSIC, R. et al. *In vivo* administration of recombinant TNF- promotes bone resorption in mice. **Journal of Periodontology Research**, v. 38, p. 446-448, 2006.

GENCO, R. J. et al. Overview of risk factors for periodontal diseases and implications for diabetes and cardiovascular diseases. **Compendium of Continuing Education Dentistry**, v. 22, n. 2, p. 21-23, 2001.

GENCO, R. J.; BORGNACKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. **Periodontol** 2000, v. 2, p. 59-94, 2013.

GIL, A. C. Como elaborar Projetos de Pesquisa. In: \_\_\_\_\_. Como Classificar as Pesquisas? 4. ed. São Paulo: Atlas, 2007. cap. 4.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. **Physiology & behavior**, v. 94, n. 2, p. 206-218, 2008.

HAJER, G. R.; VAN HAEFTEN, T. W.; VISSEREN, F. L. J. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. **European Heart Journal**, p. 1-13, 2008.

HALPERN, A. Obesidade. In: Waschenberg BL. **Tratado de endocrinologia clínica**. São Paulo: Roca; 1992. p. 911-929.

HAMDY, O.; UWAIFO, G.; ORAL, E. **Obesidade**. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/123702-overview>>. Acesso em: 15 de julho de 2013.

HERMSDORFF, H. H. M.; MONTEIRO, J. B. R. Gordura Visceral, Subcutânea ou Intramuscular: onde está o problema? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 803-811, 2004.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **British Journal of Orthodontics**, v. 25, n. 2, p. 101-107, 1998.

HOLLOWAY et al. Leptin Inhibits Osteoclast Generation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 2, p. 200-209, 2002.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. V. 144, p. 860-867, 2006.



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

IACOPINO, A. M. Diabetic periodontitis: possible lipid-induced defect in tissue repair through alteration of macrophage phenotype and function. **Oral Diseases**, v. 1, n. 4, p. 214-229, 1995.

IRIE, T.; AIZAWA, T.; KOKUBUM S. The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 87, p. 1278-1284, 2005.

ISHIMI, Y.; MIYAURA, C.; JIN, C. H. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 3297-3303, 1990.

JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss. **Journal Periodontology**, v. 76, p. 2125-2132, 2005.

JOSHIPURA, K. J.; WILLETT, W. C.; DOUGLASS, C. W. The impact of edentulousness on food and nutrient intake. **The Journal of the American Dental Association**, v. 127, p. 459-467, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAMEDA et al. Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 4, p. 489-495, 1997.

KARSENTY, G.; FERRON, M. A contribution of bone to whole – organism physiology. **Nature**. v. 481, p. 314-320, 2012.

KARSENTY G.; OURI F. The Central Regulation of Bone Mass, The First Link between Bone Remodeling and Energy Metabolism. **Journal of Clinical and Endocrinology and Metabolism**, v. 95, p. 4795-4801, 2010.

KATAGIRI, S. et al. High prevalence of periodontitis in non-elderly obese Japanese adults. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 4, n. 4, p. 301-306, 2010.

KATZ, J. et al. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 5, p. 494-500, 2002.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KIENS, B. Skeletal Muscle Lipid Metabolism in Exercise and Insulin Resistance. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 205-243, 2006.

KINANE, D. F.; PETERSON, M.; STATHOPOULOU, G. Environmental and other modifying factors of the periodontal disease. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 40, p. 107-119, 2006.

KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, H. Minireview: transcriptional regulation in development bone. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1012-1017, 2005.

KREJCI, C.B.; BISSADA, N.F. Women's health issues and their relationship to periodontitis. **Journal of the American Dental Association**, v. 133, p. 323-329, 2002.

KUO, L. C.; POLSON, A. M.; KANG, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public health**, v. 122, n. 4, p. 417-433, 2008.

KURIKCHY, M. Q. et al. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). **Clinical Oral Investigations**, v. 17, n. 3, p. 897-904, 2013.

LACATIVA, P. G. S.; FARIAS, M. L. F. Osteoporose e inflamação. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 54, n. 2, 2010.

LAZZAROTTO, E. M. et al. **Atenção à saúde em aldeias kaingáng e guarani: o caso do Rios da Cobras/PR**. Cascavel: Coluna do Saber, 2007.

LEONARD, M. B. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 23, p. 80-514, 2004.

LI, W. et al. Decreased bone formation and osteopenia in lamin a/c-deficient mice. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2011.

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

LLADO, I.; PICO, C.; PALOU, A.; PONS, A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. **Physiology & Behavior**, v. 58, p. 513-519, 1995.

LOLMÈDE, K. et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. **International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 27, n. 10, p. 1187-1195, 2003.

MANOLAGAS, S. C.; JILKA, R. L. Mechanisms of diseases: bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 5, p. 305-311, 1995.

MARSHALL, J. G.; CASE, G. D.; VALK, T. W. Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 71, p. 248-257, 1983.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **British Dental Journal**, v. 172, n. 6, p. 235-242, 1992.

MESEGUER, A.; PUCHE, C.; CABERO, A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. **Hormone Metabolic Research**, v. 34, p. 731-736, 2002.

MIGLIACCIO, S. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an osteoblastic disease. **Aging Clinical Experimental Research**, v.19, p. 5-10, 2007.

MINAYO, M. C. S. **O Desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde**. 4. ed. São Paulo, Hucitec: 1996.

MOURA-GREC, Patrícia Garcia de et al . Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro , v. 19, n. 6, June 2014 . Available from <[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232014000601763&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232014000601763&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 03 de maio de 2015.

NAMMI, S.; KOKA, S.; CHINNALA, K. M.; BOINI, K. M. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. **Nutrition Journal**, v. 14, p. 3, 2004.

NANES, M. S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. **Genes**, v. 321, p. 1-15, 2003.

NASSAR. P. O. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 4, p. 479-478, 2009.

NEELS, J. G.; OLEFSKY, J. M. Inflamed fat : what starts the fire ? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 33-35, 2006.

NIEMAN, D. C. et al. Influence of obesity on immune function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 3, p. 294-299, 1999.

NISHIDA, N. et al. Determination of smoking and obesity as periodontitis risks using the classification and regression tree method. **Journal of Periodontology**, v. 8, n. 76, p. 923, 2005.

NOACK, B. et al. Metabolic diseases and their possible link to risk indicators of periodontitis. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 6, p. 898-903, 2000.

NORDERYD, O.M. et al. Periodontal status of women taking postmenopausal estrogen supplementation. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 64, n. 10, p. 957-962, 1993.

OCARINO, N. M. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 320-325, 2008.

OFFENBACHER, S. et al. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. **Annals of periodontology / the American Academy of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 233-250, 1998.

ORINGER, R. J. Modulation of the host response in periodontal therapy. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 4, p. 460-470, 2002.

OSHIMA, Y.; MATSUDA, K.; YOSHIDA, A.; WATANABE, N.; KAWATA, M.; KUBO, T. Localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the articular surface of the rat femur. **ACTA HISTOCHEM CYTOCHEM**, v. 40, p. 27-34, 2007.

PAGE, R. C. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. **Annals Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 108-120, 1998.

PAULA, F. J. A.; Horowitz, M. C.; ROSEN, C. J. Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis. **Diabetes/Metabolism Research And Reviews**, v. 26, p. 622-630, 2010.

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

PETERSEN, P. E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Global Oral Health Programme. **Community Dentistry & Oral Epidemiology, Hoboken**, v. 31, n. 1, p. 3-24, 2003.

PINTO-NETO, A. M. *et al.* Consenso brasileiro de osteoporose – 2002. **Revista Brasileira de Reumatologia, São Paulo**, v. 42, n. 6, p. 343-354, 2002.

PISCHON, N. et al. Obesity, Inflammation, and Periodontal Disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 5, p. 400-409, 2007.

POPA, C. et al. The role of TNF- $\alpha$  in chronic inflammatory conditions intermediary metabolism, and cardiovascular risk. **Journal of Lipid Research**, v. 48, p. 751-762, 2007.

POSITION paper: epidemiology of periodontal diseases. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 67, n. 9, p. 935-945, 1996.

PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-Terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, v. 146, p. 1576-1587, 2005.

PRATS, E. et al. Energy intake of rats fed a cafeteria diet. **Physiology & Behavior**, v. 45, p. 263-272, 1989.

QI, C.; PEKALA, P. H. Tumor Necrosis factor - a induced insulin resistance in adipocytes. **Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 223, p. 128-135, 2000.

RAMIRES, J. A. F.; CÉSAR, L. A. M.; FERREIRA, J.M.F. Insuficiência coronariana crônica. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 7, p. 415-428, 2003.

REID, I.R. Relationship between fat and bone. **Osteoporosis International**, v. 9, p. 595-606, 2008.

REID, I. R.; AMES, R.; EVANS, M. C.; SHARPE, S.; GAMBLE, G.; FRANCE, J. T.; LIM, T. M.; CUNDY, T. F. Determinants of total body and regional bone mineral density in normal postmenopausal women-a key role for fat mass. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 1, 1992.

REID, I. R.; PLANK, L. D.; EVANS, M. C. Fat mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 3, p. 779-782, 1992.

REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. **Bone**, v. 31, n. 5, p. 547-555, 2002.

REINHARDT, R.A. et al. Gingival fluid IL-1beta in postmenopausal females on supportive periodontal therapy: a longitudinal 2-year study. **Journal of Periodontology**, Copenhagen, v. 25, n. 12, p. 1029-1035, 1998.

REINHARDT, R.A. et al. Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 70, n. 8, p. 823-828, 1999.

REITER, E. O. et al. Responsivity of pituitary gonadotropes to luteinizing hormone-releasing factor in idiopathic precocious puberty, precocious thelarche, precocious adrenarche, and in patients treated with medroxyprogesterone acetate. **Pediatrics in Review**, v. 9, p. 11-116, 1975.

RICCI, T. A. et al. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 347-352, 2001.

RICHELSON, L. S. et al. Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. **The New England Journal of Medicine**, 1984, 311, p. 1273-1275 apud Aisenbrey JA.

RITCHIE, C. S.; KINANE, D. F. Nutrition, inflammation, and periodontal disease. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 19, n. 5, p. 475-476, 2003.

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

ROTHWELL, N. J.; STOCK, M. J. Brown adipose tissue and diet-induced thermogenesis. **Nature**, v. 281, p. 3-35, 1979.

ROZEN, N. *et al.* Interleukin-6 modulates trabecular and endochondral bone turnover in the nude mouse by stimulating osteoclast differentiation. **Bone**, v. 26, p. 469-474, 2000.

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

SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Trastornos metabólicos relacionados con La obesidad y enfermedad periodontal. **Periodontology 2000**, v. 18, p. 162-170, 2008.

SANTOS, L. C.; CINTRA, I. P.; FISBERG, M.; CASTRO, M. L.; MARTINI, L. A. Associação entre a perda de peso, a massa óssea, a composição corporal e o consumo alimentar de adolescentes obesos pós-púberes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [São Paulo], v. 52, n. 6, p. 1001-1008, ago. 2008.

SANTOS, T. *et al.* Evidências da interação entre obesidade e doença periodontal: uma revisão de literatura. **Braz Journal Periodontology**, v. 24, n. 1, 2014.

SCHIFFERLE, R. E. Nutrition and periodontal disease. **Dental clinics of North America**, v. 49, n. 3, p. 595-610, vii, 2005.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary in obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human syndromes. **Physiology & Behavior**, v. 17, p. 461-471, 1976.

SEGAL, M. M.; BELL, J.; ABRAMS, G. M. Hypothalamic or central obesity associated with an early rise in plasma insulin concentration. **Archives of Neurology**, v. 48, p. 429-431, 1991.

SHAFAT, A.; MURRAY, B.; RUMSEY, D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat, **Appetite**, v. 52, p. 34-38, 2009.

SILVA, H. G. *et al.* Influence of Obesity on Bone Density in Postmenopausal Women. **Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism**, v. 51, n. 6, p. 943-949, 2007.

SILVA, I.; BRANCO, J. C. RANK/RANKL/OPG: Literature Review. **Acta Reumatológica Portuguesa**, v. 36, n. 3, p. 209-218, 2011.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the strous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, p. 219-226, 1975.

SPOLIDORIO, L. C. et al. Conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporin a to tacrolimus reverses bone loss in rats. **Calcified tissue international**, v. 81, n. 2, p. 114-123, 2007.

STÉDILE, N. L. R. **Prevenção em saúde**: comportamentos profissionais a desenvolver na formação do enfermeiro. (Mestrado). Caxias do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 1996.

STEEVE, K. T. et al. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 15, p. 49-60, 2004.

STEGEMAN, C. A. Oral manifestations of diabetes. **Home Healthc Nurse**, v. 23, n. 4, p. 233-241, 2005.

SUDA, T.; et al. Regulation of osteoclast function. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 6, p. 869-879, 1997.

SUN K.; KUSMINSKI C.M.; SCHERER P.E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, p. 2094-2101, 2011.

SUZUKI, N. et al. Hypothalamic obesity due to hydrocephalus caused by aqueductal stenosis. **Journal of Neurology Neurosurg Psychiatry**, v. 53, p. 1102-1103, 1990.

SZEJNFELD, V. L. Alterações ósseas: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. In: Fernandes, C. E. **Menopausa: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Seguimento 2003; 49-9.

TENG K. Premenopausal osteoporosis, an overlooked consequence of anorexia nervosa. **Cleveland Clinical Journal of Medicine**. v. 28, p. 50-58, 2011.

TERASAWA, E.; FERNADEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 111-151, 2001.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 10, p. 772-783, 2006.

TOMOFUJI, T.; KUSANO, H.; AZUMA, T.; et al. Effects of a High-cholesterol Diet on Cell Behavior in Rat Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 8, p. 752-756, 2005.

TRAYHURN, P.; WOOD, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **The British Journal of Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

TURATO, E. R. Métodos qualitativos e quantitativos na área da saúde: definições, diferenças e seus objeto de pesquisa. **Revista de Saúde Pública**, [São Paulo], v. 39, n. 3, p. 507-514, jun. 2005.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. Mechanical loading and bone formation. **Bonekey-Osteovision**. v. 1, n. 9, p. 15-23, 2004.

VAN COEVERDEN et al. Pubertal Maturation Characteristics and the Rate of Bone Mass Development Longitudinally Toward Menarche. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 4, p. 774-781, 2001.

VELLOSO, L. A. O Controle Hipotalâmico da Fome e da Termogênese - Implicações no Desenvolvimento da Obesidade. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, 2006.

VENKEN, K.; CALLWAERT, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHEREN, D. Sex hormones, their receptors and bone health. **Osteoporosis International**, v. 19, p. 1517-1525, 2008.

VIÉGAS, M. et al. Bariatric surgery and bone metabolism: a systematic review. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, [São Paulo], v. 54, n. 2, p. 158-163, mar. 2010.

VIEIRA, R.; AM, L. Alterações periodontais associadas às doenças sistêmicas em crianças e adolescentes. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 2, p. 237-243, 2010.

VON-WOWERN, N.; KLAUSEN, B.; KOLLERUP, G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 65, n. 12, p. 1134-1138, 1994.

WANG, M.C. et al. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. **Journal Bone**, v. 37, p. 474-481, 2005.

WEI, S. et al. Obesity and diabetes in transgenic mice expressing pro SAAS. **Journal of Endocrinology**, v. 180, p. 357-368, 2004.

WEISBERG, S.P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, p. 1796-1808, 2003.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1186-1194, 2006.

WHO. **Obesity and overweight, may 2012. Seção Media Centre**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 16 jun. 2013.



WILLIAMS, C. L.; STANGEL, G. M. Estrógenos e progestogênios. In: GOODMAN. GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996. cap. 57, p. 1045-1067.

WOOD, I. S. et al. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 370-377, 2009.

XIONG, X. et al. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 113, n. 2, p. 135-143, 2006.

YANO H.; OHYA K.; AMAGASA T. Effects of Insulin Parietal Bone on In Vitro Bone Formation in Fetal Rat. **Endocrine Journal**. v. 41, p. 293-300, 1994.

YE, J.; GAO, Z.; YIN, J.; HE, Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. **The American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**, v. 293, p. E1118-E1128, 2007.

ZHAO, L. J. et al. Relationship of obesity with osteoporosis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, [Bethesda, USA], v. 92, n. 5, p. 1640-1646, may 2007.

ZHAO, L.J. et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 23, p. 17-29, 2008.

ZHENG, S. X. et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. **Maturitas**, v. 26, p. 63-71, 1997.

**ARTIGO CIENTÍFICO**

## Avaliação dos Hormônios Sexuais Femininos Sobre o Tecido Ósseo de Ratas Obesas

### Submetidas à Periodontite Experimental

**Poliana de Fátima Biederman<sup>a,1</sup>; Carlos Augusto Nassar<sup>b,2</sup>; Rose Meire Costa Brancalhão<sup>c,3</sup>; Sara Cristina Sagae<sup>d,4</sup>; Patrícia Oehlmeier Nassar<sup>e,5,\*</sup>**

<sup>a</sup>Cirurgiã-dentista. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – *Campus* de Cascavel, PR, Brasil.

<sup>b</sup>Cirurgião-dentista. Doutor em Periodontia. Professor adjunto da disciplina de Periodontia e dos Programas de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia da UNIOESTE – *Campus* de Cascavel, PR, Brasil.

<sup>c</sup>Bióloga. Doutora em Zoologia. Professora associada da disciplina de Biologia Celular e do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde da UNIOESTE – *Campus* de Cascavel, PR, Brasil.

<sup>d</sup>Bióloga. Doutora em Ciências Biológicas. Professora adjunta da disciplina de Fisiologia da UNIOESTE – *Campus* de Cascavel, PR, Brasil.

<sup>e</sup>Cirurgiã-dentista. Doutora em Odontologia. Professora adjunta da disciplina de Periodontia e dos Programas de Pós-Graduação em Biociências e Saúde e Odontologia da UNIOESTE – *Campus* de Cascavel, PR, Brasil.

*Objetivo:* o objetivo do estudo consiste em avaliar o efeito da influência hormonal nos tecidos periodontais de ratas adultas na fase do proestro do ciclo estral, com obesidade induzida experimentalmente, por meio da dieta de cafeteria, associada ou não à doença periodontal. *Design:* para a realização da pesquisa, 20 ratas fêmeas adultas ciclando, na fase do proestro do ciclo estral, foram divididas em grupo controle (CON), grupo ligadura (LIG), grupo cafeteria (CAF) e grupo cafeteria e ligadura (CAFLIG). Aos 75 dias de vida, os animais do grupo LIG e CAFLIG receberam uma ligadura ao redor do primeiro molar inferior direito, a qual atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e o consequente desenvolvimento da doença periodontal. Após a eutanásia, aos 105 dias de vida, realizou-se a coleta de sangue do tronco cerebral direito para a determinação das concentrações de estradiol e progesterona, utilizando-se *kits*

<sup>1</sup> Endereço: Rua Rio Grande do Sul, 1190, apto. 02, Sagrada Família, Dois Vizinhos, Paraná, Brasil. CEP 85660-000.

<sup>2</sup> Endereço: Rua Pernambuco, 593, apto. 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil. CEP 85810-020.

<sup>3</sup> Endereço: Rua Universitária, 2069, Jardim Universitário, Cascavel, Paraná, Brasil. CEP 85819-110.

<sup>4</sup> Endereço: Rua Elias Maximiliano, 216, Nova Cidade, Cascavel, Paraná, Brasil. CEP 85803-175.

<sup>5</sup> \* Corresponding author. Endereço: Rua Pernambuco, 593, apto. 504, Centro, Cascavel, Paraná, Brasil. CEP 85810-020. Fax: +55 45 32203169, endereço eletrônico: [ponassar@yahoo.com](mailto:ponassar@yahoo.com).

<sup>6</sup> Abreviações: DMO, Densidade Mineral Óssea; IMC, Índice de Massa Corpórea; JCE, Junção cimento-esmalte; LH, Hormônio Luteinizante; NIH, National Institute of Health; OMS, Organização Mundial da Saúde; OPG, Osteoprotegerina; RANK: Receptor ativador do fator de transcrição nuclear KB; RANKL, Receptor ativador do fator de transcrição nuclear KB ligante; TNF-  $\alpha$ , Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ .

específicos; e a dissecação da hemi-mandíbula direita, que foi submetida à análise histológica. Os dados obtidos foram analisados e avaliados por meio dos testes ANOVA e Tukey. Resultados: os resultados demonstram uma diminuição na concentração dos hormônios sexuais femininos quando obesidade e doença periodontal foram associadas; da mesma forma, observou-se reabsorção óssea acentuada e mudança na morfologia do tecido ósseo no grupo CAFLIG. *Conclusão:* com base nos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que a diminuição nos hormônios sexuais femininos associados à obesidade e à doença periodontal interferiu negativamente no tecido ósseo mandibular de ratas.

**Palavras-chave:** Obesidade; Doença Periodontal; Tecido ósseo.

## INTRODUÇÃO

Considerados um dos piores problemas de saúde pública da atualidade, a obesidade e o excesso de peso são a maior causa de mortalidade possível de se evitar depois do tabaco<sup>1</sup> e a quinta principal causa de mortes no mundo, sendo que pelo menos 3,4 milhões de adultos morrem anualmente em consequência do excesso de peso e da obesidade<sup>2</sup>.

Composto por adipócitos, pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, leucócitos, monócitos e macrófagos resistentes<sup>3,4,5</sup>, o tecido adiposo é considerado, atualmente, um grande e importante órgão endócrino metabolicamente ativo, sendo considerado também patogênico quando o excesso da adiposidade corporal, de forma isolada ou associada a efeitos deletérios de atividades endócrinas e imunológicas, está relacionado a desordens metabólicas<sup>4</sup>.

Ao longo do tempo, a obesidade vem sendo estudada, por meio de modelos experimentais animais, com a finalidade de esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de patologias relacionadas à sua instalação. Entre eles, incluem-se os provocados por lesões cerebrais, os de origem genética<sup>6</sup>, a lesão química de regiões hipotalâmicas induzidas por injeção de drogas<sup>7,8</sup> e a obesidade induzida por dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas<sup>9</sup>. As dietas ricas em calorias para indução da obesidade em modelos experimentais são utilizadas com o objetivo de se assemelhar à obesidade em humanos; assim, a dieta de cafeteria promove adaptações fisiológicas que resultam em redução na sensibilidade aos efeitos anoréxicos da leptina<sup>10</sup>, hipertensão<sup>11</sup>, aumento da adiposidade e resistência à insulina em roedores<sup>12</sup>.

Apesar de vários fatores proporem efeitos positivos da obesidade sobre a massa óssea, essa perspectiva tem sido questionada devido ao possível aumento dos estímulos catabólicos que a obesidade gera no tecido ósseo. Fatores que regulam o catabolismo nos ossos, como as citocinas pró-inflamatórias e glicocorticoides, que estimulam a reabsorção óssea por meio da osteoclasia e inibem a diferenciação osteogênica, estão aumentados na obesidade<sup>13,14</sup>.

Tem-se observado que, assim como a obesidade, os hormônios sexuais apresentam importante papel no crescimento e na manutenção do pico de massa óssea<sup>15</sup>. A deficiência de estrógeno tem sido considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de osteoporose em mulheres, visto que apresenta causa primária de perda óssea após a menopausa<sup>16</sup>. Nesse período, com a redução da produção estrogênica, o estrógeno circulante é derivado principalmente da conversão dos androgênios adrenais por meio da aromatase, que ocorre principalmente no tecido adiposo<sup>17,18</sup>. No estado obeso, os adipócitos, que produzem a aromatase, estão hipertrofiados, o que aumenta a sua secreção<sup>13,19</sup>. O estrógeno produzido a partir da aromatização no tecido adiposo representa uma importante fonte desse hormônio, o que sugere que tal fonte possa explicar um menor número de fraturas em mulheres obesas<sup>13,19</sup>.

O conceito de que os hormônios ovarianos podem aumentar a inflamação dos tecidos gengivais e exacerbar a resposta a irritantes locais tem sido postulado por diversos estudos. A inflamação gengival parece ser agravada por um desequilíbrio e/ou aumento dos hormônios sexuais. Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os hormônios sexuais afetam e modificam a ação das células do sistema imune. Além disso, evidências sugerem que interações entre estrogênio e células do sistema imune podem ter efeitos regulatórios não imunes<sup>20</sup>.

A semelhança com o perfil hormonal da mulher torna a rata um excelente modelo experimental para estudos de reprodução. Dessa forma, grande parte do conhecimento que se possui, até o presente momento, sobre o controle do ciclo ovariano de vários mamíferos, cuja ovulação é espontânea, é baseado em estudos sobre o ciclo estral das ratas<sup>21</sup>. O ciclo de ratas compõe um meio natural para se estudar as variações nas concentrações plasmáticas dos esteroides ovarianos e hipofisários e suas ações fisiológicas sobre o epitélio vaginal, o comportamento sexual e a ovulação<sup>21</sup>. Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da influência hormonal

nos tecidos periodontais de ratas adultas na fase do proestro do ciclo estral, com obesidade induzida experimentalmente, a partir da dieta de cafeteria, associada ou não à doença periodontal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Animais**

Foram utilizadas 20 ratas Wistar adultas, na fase do proestro do ciclo estral (peso corporal entre 180 e 350 g), provenientes do biotério central, que foram mantidas em biotério setorial do laboratório de Fisiologia e Biofísica do CCBS, em caixas individuais e ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas às 07h00min e apagadas às 19h00min), temperatura controlada, com livre acesso a água e alimento. O dia do parto foi considerado como dia 0 e, aos 21 dias após o parto, realizou-se o desmame da ninhada, sendo separadas as fêmeas em caixas com grupos de 3 a 5 por caixa. O peso corporal (em dias alternados) e a ingestão alimentar (diária) foram monitorados durante o período experimental. Para a pesagem do alimento, o restante (sobra do dia anterior) era retirado, pesado e, então, era ofertado o alimento do dia (volume já previamente calculado). O alimento ingerido foi calculado subtraindo-se o peso (dia anterior) do peso do dia e dividindo-se pelo número de animais na caixa (SAGAE et al., 2013).

### **Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em quatro grupos com cinco animais cada:

- 1- Grupo Controle (CON): ratas submetidas à dieta de ração padrão e água do desmame até a idade adulta;
- 2- Grupo Ligadura (LIG): ratas submetidas à dieta de ração padrão e água do desmame até a idade adulta, onde, aos 75 dias, foi induzida a doença periodontal por ligadura;
- 3- Grupo Cafeteria (CAF): ratas submetidas à dieta de cafeteria do desmame até a idade adulta;
- 4- Grupo Cafeteria e Ligadura (CAFLIG): ratas submetidas à dieta de cafeteria do desmame até a idade adulta, onde, aos 75 dias, foi induzida doença periodontal por ligadura.

### **Dieta de cafeteria**

Aos 21 dias de vida, realizou-se o desmame dos animais e as ratas foram separadas em dois grupos formados por 12 animais: o grupo Controle (CTL), que recebeu ração padrão para ratos (3,8 kcal/g: 70% de carboidratos, 20% de proteínas e 10% de gordura – Biobase, Brazil), e o grupo Cafeteria (CAF), que recebeu a ração padrão e a dieta de cafeteria, adaptado de trabalho prévio<sup>22</sup>, constituído por alimentos processados, altamente palatáveis, com elevada quantidade de gordura e açúcares. Os componentes das dietas eram repostos todas as manhãs e as caixas onde os animais estavam alojados eram trocadas a cada dois dias.

### **Indução da doença periodontal**

Aos 75 dias de vida, 5 animais do grupo CTL e 5 animais do grupo CAF foram submetidos à indução da doença periodontal, originando dois novos grupos: grupo CTLLIG e grupo CAFLIG.

Para indução da doença periodontal, os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 mL/100 g e quetamina 0,08 mL/100 g) 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, colocou-se um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito. Essa ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e o consequente desenvolvimento da doença periodontal (NASSAR et al., 2009).

### **Coleta das amostras de sangue para hormônio luteinizante, estradiol e progesterona**

Aos 105 dias de vida, os animais foram eutanasiados por decapitação, realizando-se então a coleta do sangue. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm e o plasma foi separado e estocado a -20°C, para dosagem das concentrações de LH e progesterona.

As dosagens hormonais foram realizadas por radioimunoensaio. As concentrações de progesterona foram determinadas utilizando-se *kit* específico (Progesterona DSL – 3400, Diagnostics Systems Laboratories, Texas, USA). O limite mínimo para detecção foi de 0,34 ng/mL. O radioimunoensaio para LH foi realizado a partir da utilização do kit específico fornecido pelo National

Hormone and Peptide Program (Harbor-UCLA Medical Center, USA). O anticorpo utilizado foi o anti-rato LH-S10 e o padrão foi LH-RP3. O limite mínimo para a detecção foi 0,04 ng/mL para o LH.

### **Processamento histológico**

Após a eutanásia dos animais, as hemimandíbulas do lado direito foram coletadas e fixadas em solução de formol a 10%, por 24 horas. Após esse período, foram lavadas em água corrente por uma hora e imersas em solução de ácido tricloroacético, preparado da seguinte forma: 100 mL de água destilada para 5 mL de ácido. As peças foram mantidas na solução descalcificadora por 20 dias, sendo que, diariamente, se verificava o grau de descalcificação e a cada 5 dias a solução de ácido tricloroacético era trocada. Após esse intervalo de tempo, as peças foram colocadas em solução de Sulfato de Sódio a 5% por três horas e meia para neutralização do ácido; posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por doze horas e, em seguida, realizou-se a desidratação e diafanização das peças. A partir daí, as peças foram inclusas em parafina, obtendo-se 20 blocos que foram seccionados, por um micrótomo semi-automático, em cortes de 7 µm cada. Foram confeccionadas dez lâminas por grupo, sendo que cada lâmina apresentava 4 cortes seriados, totalizando, portanto, 40 cortes por grupo; as lâminas foram coradas utilizando-se a técnica histológica de hematoxilina e eosina.

### **Observações microscópicas**

A análise microscópica foi realizada por um único examinador, por meio da avaliação dos cortes histológicos corados em microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland). Para observações morfológicas do processo alveolar e contagem de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos da hemimandíbula dos animais, foi padronizado um retângulo, sendo que todas as células que estivessem presentes nesse retângulo deveriam ser contadas. Ao todo, em cada corte, foram contados 5 retângulos: dois na região vestibular, dois na lingual e um na região apical do primeiro molar estudado. Além disso, realizou-se a medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar (Figura 1). Para realização da contagem de células e medida da junção cimento-esmalte, utilizou-se o programa Image-Pro Plus 6.0.



### **Comitê de Ética**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE, estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **Análise dos dados**

Para avaliação estatística, utilizou-se o teste análise de variância ANOVA de uma via seguida do post test Tukey. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ , sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média.

## **RESULTADOS**

### **Influência hormonal no tecido ósseo**

Conforme análise estatística, foi possível observar que não existem diferenças significativas entre os tratamentos estudados com relação à progesterona (Tabela 1). No entanto, observa-se diferença significativa entre os grupos estudados em relação à concentração do hormônio luteinizante (LH). Quando comparado aos grupos CTL e LIG, o grupo CAF apresentou diferença estatisticamente significativa na concentração de LH, sendo essa diferença estatística encontrada também quando comparado o grupo CAF + LIG ao grupo CTL e o grupo CAF + LIG ao grupo LIG. Essa análise demonstra que os animais submetidos à dieta de cafeteria apresentaram uma menor concentração do hormônio luteinizante quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão, sendo que, quando se associou a doença periodontal a esses animais (CAF + LIG), a concentração do hormônio caiu ainda mais, o que sugere uma influência da obesidade e da doença periodontal na concentração desse hormônio.

### **Análise morfológica**

Os animais dos grupos CTL, CAF, LIG e CAFLIG apresentaram crista óssea alveolar com espessura mediana, sendo que sua altura variou de acordo com o grupo estudado.

A análise da crista óssea revelou áreas osteoclásticas com lacuna de Howship, uma evidência de reabsorção óssea. Essas áreas foram mais expressivas no grupo CAFLIG (Figura 2). Além disso, foi observada a presença de linhas incrementais, bem como a organização de alguns canais de Havers e osteoblastos alinhados, posicionados adjacentes à crista óssea, o que revela a existência de atividade de formação óssea em todos os grupos estudados (Figura 3).

Ainda, a partir da análise da crista óssea alveolar, foi observada a presença de diferentes padrões de osso quando comparado o grupo CAFLIG aos demais grupos. O grupo CTL, assim como os grupos CAF e LIG, apresentou osso compacto e regular; já o grupo CAFLIG apresentou predominância de osso trabeculado/esponjoso, com cristas ósseas alveolares delgadas (Figuras 4).

### **Análise morfométrica**

Na análise microscópica, realizou-se a medida da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar com o intuito de avaliar a ocorrência ou não de perda óssea; além disso, foram realizadas as contagens de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, objetivando determinar a reabsorção ou neoformação óssea nos grupos estudados.

Realizada a análise da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte (Tabela 2), verificou-se que, embora no grupo LIG essa distância e, portanto, a reabsorção óssea tenha sido maior que no grupo CAF, ambos apresentam médias significativamente maiores que o grupo controle. Tal fato sugere que tanto a obesidade quanto a doença periodontal levam à perda óssea. Ao compararmos ainda o grupo CAFLIG aos demais grupos estudados, é possível observar que ele apresentou a maior média de distância avaliada, o que sugere que a perda óssea existente tanto na obesidade quanto na doença periodontal é acentuada quando essas duas patologias estão associadas.

Os resultados obtidos por meio da contagem de células (Tabela 3) demonstram que houve uma diminuição no número de osteoblastos e osteócitos nos grupos LIG, CAF e CAFLIG quando comparados ao grupo CTL. Já o número de osteoclastos foi significativamente maior nos grupos tratados quando comparados ao grupo CTL, o que sugere, num primeiro momento, que tanto a indução da doença periodontal quanto a obesidade resultam na perda óssea.

Quando comparados os grupos tratados entre si, observou-se que os grupos LIG e CAF não apresentaram diferença significativa em relação ao número de células avaliadas; no entanto, os dois grupos citados apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo CAFLIG, sendo que esse grupo apresentou um menor número de osteoblastos e osteócitos e maior número de osteoclastos em relação aos demais, o que sugere, novamente, que a perda óssea é acentuada quando obesidade e doença periodontal estão associadas.

## DISCUSSÃO

Embora os resultados da concentração de estrógeno ainda não tenham sido obtidos, esta primeira análise da concentração de LH sugere que a concentração de estrógeno poderá apresentar diferença estatisticamente significativa entre os mesmos grupos, haja vista que o estrógeno induz a secreção do hormônio LH durante a fase folicular<sup>23,24</sup>.

Os esteroides sexuais apresentam diversas funções no tecido ósseo, como aumento da atividade dos osteoblastos, inibição da retirada de cálcio do organismo ao interferir e diminuir a formação e atividade dos osteoclastos e promoção da rápida calcificação óssea ocasionando a diminuição, até cessar, da atividade de proliferação do disco epifisário<sup>25,26</sup>. Tal dado sugere que a redução das concentrações plasmáticas de LH observada nos primeiros resultados deste trabalho e, em consequência, uma possível redução de estradiol podem hipoteticamente estar influenciando negativamente o tecido periodontal das ratas submetidas à periodontite experimental, apesar da ausência de alteração nas concentrações de progesterona.

Já em 1993, em estudo realizado com 228 mulheres, Nordeyd et al. verificaram a associação entre a ingestão de estrógeno e a saúde periodontal. Parâmetros clínicos foram avaliados, sendo que os resultados indicaram que a suplementação com estrógeno está associada com um menor grau de inflamação gengival quando comparado ao grupo controle<sup>27</sup>. Ainda segundo Krejci e Bissada, mudanças nos níveis hormonais, como as que ocorrem durante menopausa, puberdade, gravidez e menstruação, assim como aquelas que ocorrem com o uso de suplementos hormonais, podem levar à quebra da homeostase do periodonto, facilitando o desenvolvimento da gengivite<sup>28</sup>.

Os resultados deste trabalho mostram uma diminuição da concentração de LH e, conseqüentemente, uma possível redução de estrogênio nos grupos CAF e CAFLIG. Além disso, os dois grupos citados apresentaram perda óssea alveolar quando comparados ao grupo CTL. O grupo LIG, embora não tenha apresentado diferença significativa em relação às concentrações de hormônio quando comparado ao grupo CTL, também apresentou reabsorção óssea, o que sugere que o acúmulo de placa bacteriana é fator decisivo na reabsorção óssea. Duarte et al. relatam que a terapia de reposição de estrógeno pode fazer algum efeito na perda de massa óssea alveolar, mas esse efeito é desconsiderado quando ocorre o acúmulo de placa bacteriana<sup>29</sup>.

Em pesquisa realizada por Anbinder et al., avaliou-se, em 40 ratas, a influência da falta de hormônios ovarianos induzida por ovariectomia como fator de risco para a doença periodontal. Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais ovariectomizados e não ovariectomizados. Com base nos achados desse estudo, a deficiência de hormônios ovarianos não pôde ser considerada como fator de risco para a doença periodontal<sup>30</sup>.

Tendo em vista que indivíduos obesos apresentam maior densidade mineral óssea (DMO) quando comparado a eutróficos, verifica-se que a obesidade pode ser fator protetor contra fraturas e osteoporose<sup>31,32</sup>. A grande quantidade de tecido adiposo dos obesos potencialmente contribui para o aumento da aromatização de andrógenos em estrógenos, fazendo com que a concentração circulante de esteroides sexuais aumente, influenciando, assim, positivamente a massa óssea. Estudos demonstram maior concentração de hormônios sexuais em mulheres obesas do que em eutróficas<sup>33</sup>.

Embora os mecanismos biológicos por meio dos quais a obesidade pode afetar o periodonto não tenham sido totalmente elucidados, diversos estudos têm demonstrando associação entre doença periodontal e obesidade em diferentes populações<sup>34,35,36,37,38</sup>.

A plausibilidade biológica de uma potencial ligação entre obesidade e periodontite sugere envolver um processo imunoinflamatório, visto que o tecido adiposo secreta citocinas pró-inflamatórias proporcionais à massa corporal do indivíduo<sup>39,40</sup>. Secretados em maior quantidade em pacientes obesos, os mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 podem levar a um estado hiperinflamatório, aumentando o risco de desenvolvimento ou progressão da doença periodontal<sup>40</sup>. A produção e liberação de neutrófilos, que são a primeira linha de defesa dos tecidos periodontais e linfócitos T e B, responsáveis pelas respostas celulares e humorais também pode ser alterada em

decorrência da obesidade<sup>41</sup>. A capacidade de reparo dos tecidos periodontais pode ser reduzida ainda devido ao aumento dos níveis de glicose e lipídios nos obesos, o que potencialmente contribui para uma resposta exacerbada e até inibição da produção dos fatores de crescimento pelos macrófagos<sup>42</sup>.

Segundo diversos estudos, a obesidade é vista como benéfica à massa óssea, visto que favorece sua formação<sup>33,43,44,45,46,47</sup>. O mecanismo básico pelo qual a obesidade parece favorecer a formação óssea permanece desconhecido, no entanto, explicações baseadas nos estímulos promovidos por uma maior carga mecânica sobre esqueleto<sup>48,49</sup>, na relação positiva do estrogênio com a massa óssea<sup>33,43,44,46,47</sup> e na secreção de insulina<sup>50,51</sup> têm sido propostas.

Em estudo realizado por Brandelero et al., ratos com obesidade hipotalâmica induzida por MSG apresentaram menor reabsorção óssea quando comparados ao grupo controle, o que sugere que a obesidade hipotalâmica experimental pode produzir um mecanismo protetor sobre a massa óssea e causar benefícios a esta<sup>52</sup>. De forma contrária, o presente estudo demonstrou a ocorrência de perda óssea, por meio da medida da distância entre JCE e COA, nos animais submetidos à dieta de cafeteria, sendo que a perda óssea foi acentuada quando se associou doença periodontal. Uma possível explicação para essa diferença de resultados decorre do fato que, em nosso estudo, os hormônios sexuais femininos, principalmente o estrogênio, que é um protetor da massa óssea<sup>33,43,44,46,47</sup>, apresentaram concentrações menores nos grupos tratados, os quais obtiveram maior perda óssea.

Em pesquisa de revisão sistemática sobre associação entre obesidade e doença periodontal, realizada por Moura-Grec et al., os autores revisaram 31 artigos dos quais 25 associaram o risco de periodontite com obesidade e apenas 6 não encontraram essa associação, o que evidencia uma relação significativa entre obesidade e doença periodontal<sup>53</sup>. Os resultados deste estudo também demonstraram associação entre essas duas patologias, sendo que, quando obesidade e doença periodontal atuaram juntas, foi obtida uma maior reabsorção óssea alveolar, que sugere uma influência negativa da obesidade sobre a massa óssea.

Por outro lado, objetivando verificar a possível associação entre a obesidade e a doença periodontal, Dias et al. realizaram estudo com 100 pacientes não fumantes, sistemicamente saudáveis, que não receberam tratamento periodontal nos últimos 6 meses, nem usaram antibiótico

e/ou anti-inflamatório nos últimos 3 meses. O resultado do estudo não demonstrou relação entre obesidade e doença periodontal<sup>54</sup>. Para Genco e Borganakke, no que diz respeito aos fatores de risco para a doença periodontal, evidências sugerem que mudanças na resposta pró-inflamatória e imunológica associadas com a obesidade podem contribuir para o aumento da susceptibilidade à doença periodontal, entretanto, os mecanismos celulares e moleculares não estão esclarecidos e mais estudos são necessários para desvendá-los<sup>55</sup>.

Corroborando com os resultados deste estudo, um estudo realizado no Japão investigou a prevalência da doença periodontal em adultos jovens obesos e explorou a relação entre obesidade e periodontite. Os autores verificaram uma alta prevalência de doença periodontal em indivíduos japoneses obesos, jovens e particularmente em mulheres obesas<sup>56</sup>.

No que diz respeito à quantificação celular, estudos demonstram que, em condições normais, os osteócitos são as células mais abundantes no tecido ósseo<sup>57</sup>, sendo que a maturidade óssea pode ser indicada por uma maior quantidade dessa célula<sup>58</sup>. No presente estudo, a quantidade de osteócitos e osteoblastos foi menor nos grupos CAF e LIG quando comparados ao grupo controle, sendo que essa quantidade caiu ainda mais no grupo CAFLIG, onde se associou doença periodontal e obesidade. O contrário aconteceu ao quantificar os osteoclastos, que se apresentaram em maior quantidade no grupo CAFLIG, o que sugere que houve reabsorção óssea, visto que, segundo Spolidorio et al., o aumento do número de osteoclastos está associado com a reabsorção óssea<sup>59</sup>. Além disso, há uma relação positiva entre o número de osteoclastos ativos na superfície óssea e a distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, o que torna evidente a ocorrência de perda óssea e demonstra que a obesidade associada à doença periodontal provoca alterações sobre o tecido ósseo.

Quanto à análise morfológica, a mensuração da distância da crista óssea alveolar à junção cimento-esmalte (COA-JCE) possibilita o estudo de alterações decorrentes da doença periodontal, movimentos dentais eruptivos ou influência de fatores sistêmicos, como o diabetes e o tabagismo<sup>60</sup>, podendo, portanto, ser considerado um parâmetro adequado para se avaliar a ausência de perda óssea alveolar. Neste estudo, nos grupos tratados, foi possível observar um aumento na distância da junção cimento-esmalte à crista óssea alveolar, sendo a maior distância encontrada no grupo CAFLIG, o que sugere perda óssea alveolar.

Em situações fisiológicas normais, a formação e a reabsorção óssea estão em equilíbrio, de forma que a atividade dos osteoclastos é seguida imediatamente pela atividade dos osteoblastos<sup>61</sup>. Embora áreas de formação óssea e reabsorção tenham sido encontradas em todos os grupos, este estudo demonstrou um aumento na atividade dos osteoclastos dos grupos tratados quando comparados ao grupo controle, principalmente no grupo CAFLIG, o que demonstra, novamente, a ocorrência de perda óssea alveolar.

No grupo CAFLIG, foi observado um padrão ósseo diferenciado dos demais grupos estudados; esse grupo apresentou predominância de osso trabeculado/esponjoso e crista óssea alveolar mais delgada, demonstrando que a obesidade associada à doença periodontal foi capaz de promover alterações morfológicas no tecido ósseo.

## **CONCLUSÃO**

Baseado nos resultados obtidos, o presente estudo experimental demonstrou que a redução na concentração dos hormônios sexuais femininos associada à obesidade induzida por dieta de cafeteria e à doença periodontal interferiu negativamente na massa óssea alveolar. Essas condições ocasionaram mudanças na quantificação de células ósseas (osteoclastos, osteoblastos e osteócitos) e na morfologia do osso mandibular. No entanto, mais estudos ainda precisam ser realizados para melhor entendimento de possíveis consequências e mecanismo de ação da associação das patologias aqui estudadas e de que maneira essa associação pode influenciar a massa óssea.

## REFERÊNCIAS

1. HAMDY, O.; UWAIFO, G.; ORAL, E. Obesidade. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/123702-overview>>. Acesso em: 15 de julho de 2013.
2. WHO. Obesity and overweight, May 2012. Seção Media Centre. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>>. Acesso em: 29 jun. 2013, 17:30:30.
3. BERG, A. H.; SCHERER, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research* 2005; 96(9):939-49.
4. BAYS, H. E. et al. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte visceral adiposity. *Expert Reviews Cardiovascular Therapy* 2008; 6(3):343-368.
5. GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology & behavior* 2008;94(2):206-18.
6. BRAY, G. A.; YORK, D. A. Hypothalamic and genetic obesity in experimental animals: na autonomic and endocrine hypothesis. *Physiology Reviews* 1979;59(3):719-809.
7. SUZUKI, N. et al. Hypothalamic obesity due to hydrocephalus caused by aqueductal stenosis. *Journal of Neurology Neurosurg Psychiatry* 1990;53:1102-1103.
8. SEGAL, M. M.; BELL, J.; ABRAMS, G. M. Hypothalamic or central obesity associated with an early rise in plasma insulin concentration. *Archives of Neurology* 1991;48: 429-431.
9. SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary in obesity in adult rats: similarities to hypotalamic and human syndromes. *Physiology & Behavior* 1976;17: 461-471.
10. WEI, S. et al. Obesity and diabetes in transgenic mice expressing pro SAAS. *Journal of Endocrinology* 2004;180: 357-368.
11. COATMELLECC-TAGLIONI, G.; DAUSSE, J. P.; GIUDICELLI, Y.; RIBIERE, C. Gender diference in diet-induced obesity hypertension: implication of renal alpha2-adrenergic receptors. *American Journal of Hypertensio* 2002;15:143-149.
12. LLADO, I.; PICO, C.; PALOU, A.; PONS, A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiology & Behavior* 1995; 58:513-519.
13. ZHAO, L. J. et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research* 2008;23:17-29.
14. MIGLIACCIO, S. et al. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an osteoblastic disease. *Aging Clinical Experimental Research* 2007;19: 5-10.
15. BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: CARVALHO FILHO, E. T.; PAPALÉO NETTO, M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu, 1994. cap.22, p.297-308.
16. SZEJNFELD, V. L. Alterações ósseas: fisiopatologia, diagnóstico e tratamento. In: Fernandes, C. E. *Menopausa: diagnóstico e tratamento*. 1ª ed. São Paulo: Seguimento 2003;49( 9).
17. VENKEN, K.; CALLWAERT, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHEREN, D. Sex hormones, their receptors and bone health. *Osteoporosis International* 2008;19:1517-1525.
18. MESEGUER, A.; PUCHE, C.; CABERO, A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Hormone Metabolic Research* 2002;34:731-6.
19. REID, IR. Relationship between fat and bone. *Osteoporosis International* 2008;9:595-606.
20. CUTOLO, M.; SULLI, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S.; MAIS, A. T. [Estrogens, the immune response and autoimmunity](#). *Clinical and Experimental Rheumatology* 2007;13(2):217-26.
21. SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the strous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated whit rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975; 96:219-226.
22. PRADA, P. O. et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun n-Terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005;146:1576-1587.
23. MARSHALL, J.G., CASE, G.D., VALK, T.W. Selective inhibition of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol. Mechanism for modulation of gonadotropin responses to low dose pulses of gonadotropin-releasing hormone. *The Journal of Clinical Investigation* 1983; 71:248-57.
24. BURGER, H. G. The endocrinology of the menopause. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1999; 69:31-5.
25. IRIE, T.; AIZAWA, T.; KOKUBUM, S. The role of sex hormones in the kinetics of chondrocytes in the growth plate. *Journal of Bone and Joint Surgery* 2005;87:1278-84.



26. OSHIMA, Y. et al. Localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the articular surface of the rat femur. *ACTA HISTOCHEM CYTOCHEM* 2007; 40:27-34.
27. NORDERYD, O.M. et al. Periodontal status of women taking postmenopausal estrogen supplementation. *Journal of Periodontology* 1193;64(10): 957-962.
28. KREJCI, C. B.; BISSADA, N. F. Women's health issues and their relationship to periodontitis. *Journal of the American Dental Association* 2002;133:323-329.
29. DUARTE, P. M. et al. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *Journal. Periodontal Research* 2004;39:107-110.
30. ANBINDER, A. L. et al. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Brasilian Dental Journal* 2006;17(3):201-207.
31. WANG, M.C. et al. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. *Journal Bone* 2005;37:474-481.
32. LEONARD, M. B. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2004;23:80-514.
33. RICCI, T. A. et al. Moderate energy restriction increases bone resorption in obese postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001;73:347-352.
34. ALABDULKARIM, M. et al. Alveolar bone loss in obese subjects. *Journal International Academy of Periodontology* 2005;8:7-34.
35. AL-ZAHRANI, M. S.; BISSADA, N. F.; BORAWSKIT, E. A. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *Journal of Periodontology* 2003;74:610-615.
36. BOUCHARD, P. et al. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *Journal of Periodontology* 2006;89:77- 479.
37. DALLA VECCHIA, C. F.; SUSIN, C.; RÖSING C. K.; OPPERMANN R. V.; ALBANDAR J. M. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *Journal of Periodontology* 2005;76(10):1721-8.
38. NISHIDA, N. et al. Determination of smoking and obesity as periodontitis risk factors using the classification and regression tree method. *Journal of Periodontology* 2005;8(76):923.
39. PISCHON, N. et al. Obesity, Inflammation, and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research* 2007;86(5):400-409.
40. RITCHIE, C. S. Obesity and periodontal disease. *Periodontology* 2000 2007;44:154-163.
41. SAITO, T.; SHIMAZAKI, Y. Trastornos metabólicos relacionados con La obesidad y //enfermedad periodontal. *Periodontology* 2000 2008;18:162-170.
42. GAIO, E. J. Efeito da obesidade na progressão da perda de inserção periodontal: estudo de Porto Alegre. 2008. 53 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
43. BANDEIRA, F. A obesidade realmente fortalece os ossos? *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia*, [São Paulo] ago. 2007;51(6):895-897.
44. COBAYASHI, F.; LOPES, L. A.; TADDEI, J. A. A. C. Densidade mineral óssea de adolescentes com sobrepeso e obesidade. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro 2005;81(4):337-342.
45. HOLLOWAY et al. Leptin Inhibits Osteoclast Generation. *Journal of Bone and Mineral Research* 2002;17(2):200-209.
46. SANTOS, L. C. et al. Associação entre a perda de peso, a massa óssea, a composição corporal e o consumo alimentar de adolescentes obesos pós-púberes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* ago. 2008;52(6):1001-1008.
47. VAN COEVEDEN, S. C. et al. Pubertal Maturation Characteristics and the Rate of Bone Mass Development Longitudinally Toward Menarche. *Journal of Bone and Mineral Research* 2001;16(4):774-781.
48. KAMEDA et al. Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. *The Journal of Experimental Medicine* 1997;186(4):489-495.
49. ZHAO, L. J. et al. Relationship of obesity with osteoporosis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, [Bethesda, USA] may 2007;92(5):1640-6.
50. REID, I. R. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone* 2002;31(5):547-55.
51. SILVA, H. G. et al. Influence of Obesity on Bone Density in Postmenopausal Women. *Brazilian Archives of Endocrinology and Metabolism* 2007;51( 6):943-949.
52. BRANDELEIRO JR. et al. 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;57(3):300-306.

53. MOURA-GREC, Patrícia Garcia de et al . Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Ciênc. saúde coletiva*, Rio de Janeiro 2014;19(6).
54. DIAS, B. R. et al. Estudo Da Obesidade Como Indicador De Risco Para a Doença Periodontal. *Brazilian Journal Periodontology* 2011;21(2):70-78.
55. GENCO, R. J.; BORGNAKKE, W. S. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000 2013;2:59-94.
56. KATAGIRI, S. et al. High prevalence of periodontitis in non-elderly obese Japanese adults. *Obesity Research & Clinical Practice* 2010;4(4):301-306.
57. LI, W. et al. Decreased bone formation and osteopenia in lamin a/c-deficient mice. *Plos One* 2011;6(4):1-9.
58. KURIKCHY, M. Q. et al. Histological evaluation of bone healing using organic bovine bone in combination with platelet-rich plasma (an experimental study on rabbits). *Clinical Oral Investigations* 2013;17(3):897-904.
59. SPOLIDORIO, L. C. et al. Conversion of immunosuppressive monotherapy from cyclosporin a to tacrolimus reverses bone loss in rats. *Calcified tissue international* 2007;81(2):114-23.
60. BERGSTRÖM, J.; BOSTRÖM, L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. *Journal of Clinical Periodontology* 2001;28(7):680.
61. SILVA, I.; BRANCO, J. C. RANK/RANKL/OPG: Literature Review. *Acta Reumatológica Portuguesa* 2011;36(3):209-218.

## FIGURAS

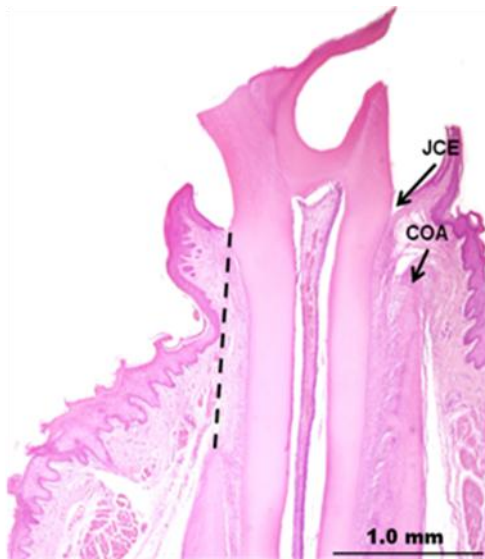


Figura 1 – Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital. Mostra o local das medições da altura da crista óssea alveolar e a distância da mesma à junção cimento - esmalte (linha tracejada) nos grupos estudados. Crista óssea alveolar (COA) e junção cimento - esmalte (JCE).

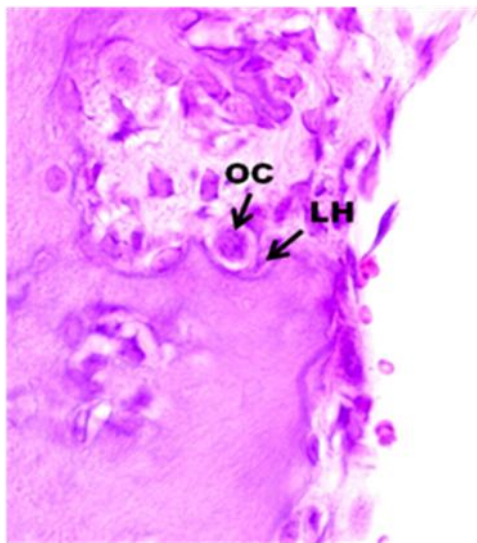


Figura 2 – Fotomicrografia de dente de rato, grupo caf/lig, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, corte sagital. Imagem representativa das evidências de reabsorção óssea em todos os grupos estudados. Mostra o osteoclasto ocupando a lacuna de Howship, indicando uma área de reabsorção óssea. LH, lacuna de Howship; OC, Osteoclastos.

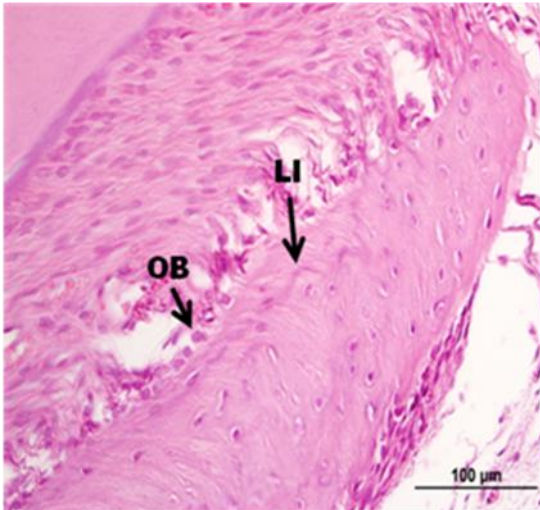


Figura 3 – Fotomicrografia da crista óssea alveolar de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital. Imagem representativa das evidências de formação óssea em todos os grupos estudados. Mostra as áreas de formação óssea com a presença de linhas incrementais e osteoblastos. LI linhas incrementais; OB, osteoblastos.

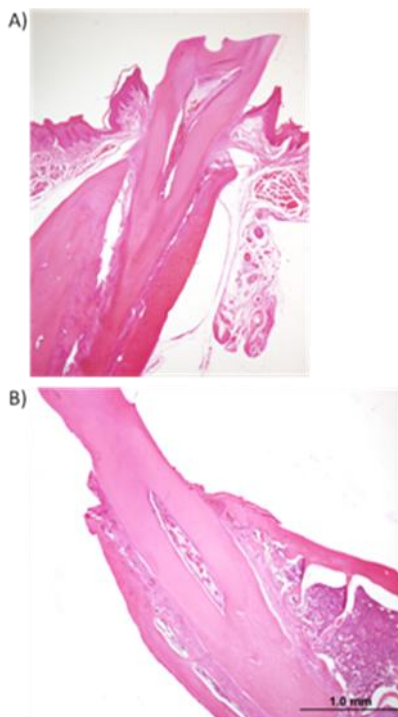


Figura 4 – Fotomicrografia de dente de rato, grupo controle, coloração hematoxilina e eosina, corte sagital, representativa dos padrões de osso encontrado nos grupos estudados. Mostra o padrão compacto encontrado nos grupos CTL, LIG e CAF (A) e o padrão esponjoso/lacunar encontrado no grupo CAF/LIG (B).

## TABELAS

Tabela 1 - Valores sanguíneos de Progesterona e LH dos ratos dos grupos estabelecidos.

<b>Grupos</b>	<b>PROGESTERONA</b>	<b>LH</b>
CONTROLE	43,6 ± 32,1 <b>A</b>	6,9 ± 2,9 <b>A</b>
LIGADURA	47,3 ± 35,4 <b>A</b>	6,3 ± 2,4 <b>A</b>
CAF	32,8 ± 17,3 <b>A</b>	2,0 ± 2,8 <b>B</b>
CAF + LIG	27,3 ± 12,9 <b>A</b>	1,2 ± 0,3 <b>B</b>

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão.  
Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação. P<0.05.

Tabela 2 - Média dos valores da distância da junção cimento-esmalte a crista óssea alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos. Valores expresso em µm.

<b>Grupos</b>	<b>Médias (µm)</b>
CONTROLE	579.2 ± 43.0 <b>A</b>
CAFETERIA	662.4 ± 31.8 <b>B</b>
LIGADURA	1033.4 ± 51.7 <b>C</b>
CAF + LIG	1276.4 ± 78.7 <b>D</b>

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão.  
Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação. P<0.05.

Tabela 3 - Média dos valores da contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos no osso alveolar dos ratos dos grupos estabelecidos. Valores expressos em unidade.

<b>Grupos</b>	<b>OSTEOBLASTOS</b>	<b>OSTEÓCITOS</b>	<b>OSTEOCLASTOS</b>
CONTROLE	76.7 ± 12.3 <b>A</b>	361.2 ± 30.9 <b>A</b>	1.0 ± 0.4 <b>A</b>
CAFETERIA	62.3 ± 6.7 <b>B</b>	316.6 ± 16.6 <b>B</b>	2.3 ± 0.4 <b>B</b>
LIGADURA	61.7 ± 4.7 <b>B</b>	300.8 ± 18.3 <b>B</b>	2.1 ± 0.7 <b>B</b>
CAF + LIG	54.0 ± 4.01 <b>C</b>	250.0 ± 15.4 <b>C</b>	3.1 ± 0.7 <b>C</b>

Nota: Os valores representam média ± desvio padrão.  
Letras diferentes significam que os resultados são estatisticamente diferentes, dentro do mesmo parâmetro de avaliação. P<0.05.

## Normas da Revista Científica

### Archives of Oral Biology

#### Guide for Authors

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

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

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will only consider clinical papers where they make a significant contribution to the understanding of a diseaseprocess.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals.

#### PREPARATION

##### Use of word processing software

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

##### Article structure

### *Manuscript Structure*

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

### *Introduction*

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

### *Materials and Methods*

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

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

### *Results or Findings*

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

### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short

### *Conclusions*

section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names.



Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- *Corresponding author.* Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

*Present/permanent address.* If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes. As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible.

Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic, histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

#### Structured abstract

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

#### Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

#### Keywords

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



### Abbreviations

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

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Bacterial nomenclature

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

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

'meningococcus' Artwork

### *Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do

not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

*Electronic  
artwork  
General  
points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

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

*Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

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

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

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

Please do not:

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

Illustration services

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

### Tables

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

### References

All manuscripts should use the 'Vancouver' style for references, which should be numbered consecutively in the order in which they are first cited in the text and listed at the end of the paper.

For journal references, all authors should be included when there are six or fewer (first six followed by 'et al.' when seven or more), followed by the title of article, name of journal abbreviated according to Index Medicus, or left in full, year, volume with part number in brackets, and first and last pages. For example:

1. Walsh NP, Montague JC, Callow N and Rowlands AV. Saliva flow rate, total protein concentration and osmolality as potential markers of whole body hydration status during progressive acute dehydration in humans. Arch Oral Biol 2004;49(2):149-154.

For book references, the author(s) should be followed by the chapter title (if appropriate), editor(s) (if applicable), book title, place of publication, publisher, year and page numbers. For example:

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function. 6th ed. St. Louis: Mosby; 2003.

Papers in the course of publication should only be entered in the references if the paper has been accepted by a journal, and then given in the standard manner in the text and list of references but with the words "In press" following the name of the journal.

### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

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

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers
- All necessary files have been uploaded, and contain:
  - Keywords
  - All figure captions
  - All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources

(including  
the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## Anexo

### Aprovação do Comitê de Ética



### PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Avaliação dos hormônios sexuais femininos sobre os tecidos periodontais de ratas obesas submetidas à periodontite experimental", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

#### ATENÇÃO!

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

Cascavel, 10/12/2013



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña  
Coordenadora do CEUA  
Portaria nº 2861/2012-GRE

