



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ**
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia



KARINE FIGUEREDO DA COSTA

**AVALIAÇÃO DOS TECIDOS PERIODONTAIS E AORTA ABDOMINAL DE
RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO E
PERIODONTITIE EXPERIMENTAL**

Cascavel-PR

2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO
PARANÁ**
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia



KARINE FIGUEREDO DA COSTA

**AValiação DOS TECIDOS PERIODONTAIS E AORTA ABDOMINAL DE
RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO E
PERIODONTITIE EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Odontologia, do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde, da
Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
Co-Orientador: Prof. Dra. Maria Lucia Bonfleur

Assinatura do Orientador

**Cascavel-PR
2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C873a Costa, Karine Figueredo da
Avaliação dos tecidos periodontais e aorta abdominal de ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico e periodontite experimental. /Karine Figueredo da Costa. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2015.
80 p.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Bonfleur
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia

1.Doença periodontal. 2.Obesidade. 3. Aterosclerose. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD 21.ed. 617.632

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9^o/965



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

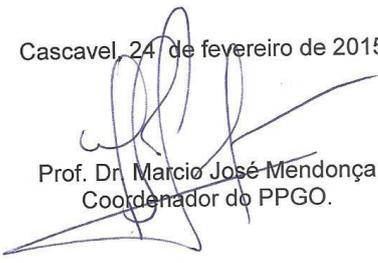
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS
Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Odontologia, nível de mestrado - PPGO

DECLARAÇÃO

O Coordenador do Programa de pós-graduação *stricto sensu* em Odontologia, área de concentração Odontologia, da Universidade Estadual da Oeste do Paraná – Unioeste, declara que KARINE FIGUEREDO DA COSTA - RG:9.501.508-5 SSP-PR, defendeu sua Dissertação de Mestrado, no dia 24 de fevereiro de 2015, perante a Comissão Julgadora composta pelos Professores Doutores Carlos Augusto Nassar, Elaine Manoela Porto Amorim e Marília Compagnoni Martins; em que foi APROVADA.

Para que o respectivo título possa ser concedido, com as prerrogativas legais dele advindas, será necessário o cumprimento dos termos dos artigos 88, 89 e 90 da Resolução 221/12 – CEPE.

Cascavel, 24 de fevereiro de 2015.


Prof. Dr. Marcio José Mendonça
Coordenador do PPGO.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública, realizada em 24 de fevereiro de 2015, considerou a candidata Karine Figueredo da Costa aprovada.



Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar



Prof.^a Dr.^a Elaine Manoela Porto Amorim



Prof.^a Dr.^a Marília Compagnoni Martins

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo Dom da Vida, pelo amor incondicional, por tudo que tenho e tudo o que sou.

Agradeço à melhor mãe por todo apoio, todo o sacrifício para que eu pudesse realizar meus sonhos.

Agradeço aos amigos e irmãos da IEL Faculdade por todas as orações e suporte em todo esse período.

Agradeço às meninas do LAFEM, por toda ajuda, pela paciência em nos ensinar.

Agradeço às professoras Sandra e Maria Lucia, pelas oportunidades e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço às professoras Célia e Rose por todo empenho em nos ajudar, também a Celeste que muitas vezes deixou de lado seus afazeres para contribuir com esse trabalho.

Agradeço à Stefany e à Vivi, minhas parceiras na realização desta pesquisa.

Agradeço a oportunidade de conhecer pessoas tão especiais, amigas pra toda vida Paulinha, Poli, Kathia e Gabi. Obrigada por cada momento dentro e fora da Universidade, obrigada por fazer minha vida melhor.

Agradeço em especial ao Professor Carlos e à Professora Patrícia, pelo privilégio de mais uma vez, trabalhar com vocês, por toda a responsabilidade depositada no meu trabalho, por confiar seus novos orientados para que eu pudesse contribuir. Agradeço ao professor Carlos pela orientação, pela paciência, por ser exemplo e inspiração. Obrigada por tudo SEMPRE.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações.....	6
Lista de Tabelas.....	7
Lista de Abreviaturas.....	8
Introdução Geral.....	9
Referências Bibliográficas.....	15
Artigo Científico – Título.....	19
Palavras Chave.....	19
Resumo.....	20
Introdução.....	21
Metodologia.....	22
Animais.....	22
Indução da Obesidade.....	22
Indução da Doença Periodontal.....	23
Avaliação da Obesidade.....	23
Sacrifício e Obtenção das amostras.....	23
Análise da Expressão da Interleucina 6 e Fator de Necrose Tumoral	
Alfa.....	24
Análise Radiográfica.....	24
Processamento Histológico.....	25
Observações Microscópicas.....	25
Morfometria do Osso.....	25

Análise Morfométrica da Aorta Abdominal.....	26
Estatística.....	26
Resultados.....	27
Efeito da administração de MSG.....	27
Concentração plasmática de Colesterol Total e Triglicerídeos.....	27
Análise da presença de IL-6 no tecido gengival.....	27
Análise da presença de TNF- α no tecido da aorta abdominal.....	27
Análise radiográfica.....	27
Análise morfológica da hemimandíbula direita.....	28
Análise morfométrica da hemimandíbula direita.....	29
Análise morfométrica da aorta abdominal.....	29
Discussão.....	29
Agradecimentos.....	33
Referências Bibliográficas.....	34
Apêndice A.....	40
Apêndice B.....	42
Anexo A.....	45
Anexo B.....	47
Anexo C.....	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fotomicrografias representativas das medidas das larguras das paredes das artérias aortas abdominais nos animais.....	40
Figura 2. Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CTL (A), CTL Lig (B), MSG (C), MSG Lig (D).....	40
Figura 3: Fotomicrografias representativas dos animais dos grupos CTL (A), CTL Lig (B), MSG (C) e MSG Lig (D).....	41

LISTA DE TABELAS

Efeito da administração de MSG.....	42
Concentração plasmática de Colesterol Total e Triglicerídeos.....	42
Análise da presença de IL-6 no tecido gengival e TNF- α no tecido da aorta abdominal	43
Análise radiográfica.....	43
Análise morfológica da hemimandíbula direita.....	43
Análise morfométrica da hemimandíbula direita.....	44
Análise morfométrica da aorta abdominal.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

LDL: Lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoproteins)

MSG: Glutamato monossódico

SNC: Sistema Nervoso Central

IL: Interleucina

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa

DP: Doença Periodontal

DCV: Doença Cardiovascular

Pg: *Porphyromonas gingivalis*

Aa: *Agregatibacter actinomycetemcomitans*

LPS: Lipopolissacarídeo

RANK: Fator nuclear kB

OPG: Osteoprotegerina

ON: Óxido Nítrico

INTRODUÇÃO GERAL

A obesidade é uma epidemia crescente a nível mundial e afeta grande parte da população em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BUDUNELI et al., 2014). Caracterizada por um acúmulo de gordura no tecido adiposo, a obesidade é uma desordem médica cujas consequências para a saúde variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças que, embora não letais, são debilitantes e afetam diretamente a qualidade de vida do indivíduo obeso (CUNHA, et al., 2010; BALBO et al., 2007; PEREIRA, FRANCISCHI & LANCHÁ-JUNIOR, 2003). Essa doença relaciona-se com a síndrome metabólica, uma entidade clínica complexa consistindo de obesidade abdominal, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão, hipertrigliceridemia e/ou redução da concentração dos níveis de colesterol – Lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoproteins - HDL) (CUNHA et al., 2010; BORGES et al., 2007).

Nosso organismo apresenta a eficiência em acumular energia, o que favorece a sobrevivência em períodos de escassez de alimentos. Porém nos dias atuais, a facilidade de acesso e o baixo custo de alimentos com grande densidade calórica, aliados a pouca ou nenhuma atividade física diária, fazem com que a obesidade tome proporções alarmantes (SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Essas proporções têm sido mostradas nos dados do Ministério da Saúde que aponta que cerca de 51% da população brasileira com mais de 18 anos, está acima do peso ideal; sendo que esse aumento atinge tanto homens quanto mulheres chegando a 54% e 48% respectivamente (BRASIL, 2013). Assim, esta é uma condição complexa de dimensões sociais, biológicas e psicossociais consideráveis, podendo eventualmente afetar qualquer pessoa de qualquer idade ou grupo socioeconômico (BARBOSA et al., 2005).

Para compreender melhor o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade, pesquisadores utilizam-se de modelos experimentais animais, que podem determinar de maneira controlada o papel dos componentes envolvidos na obesidade (CESARETTI & KOHLMANN JR, 2006). A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e humanos tornam, o modelo animal, uma ferramenta importante para o estudo da obesidade sendo que, esses modelos têm sido estudados e já foram classificados por sua etiologia (DIEMEN, TRINDADE, TRINDADE, 2006).

A obesidade pode ser induzida em animais através da ooforectomia, da alimentação com dietas hipercalóricas, da manipulação genética para obesidade e/ou ainda da lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial que pode ser por lesão elétrica direta ou administração de glutamato monossódico (MSG) (DIEMEN, TRINDADE, TRINDADE, 2006). Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais conhecida, um modelo de obesidade que mimetiza, pelo menos em partes, a situação clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina (DIEMEN, TRINDADE, TRINDADE, 2006). Em ratos essa obesidade pode ser conseguida por meio de administração subcutânea de glutamato monossódico, um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central (SNC) quando em quantidades excessivas, pois danifica núcleos pertencentes ao hipotálamo, ou seja, provoca alterações no eixo hipotálamo-hipofisário (VOLTERA et al 2008).

Há mais de 75 anos, pesquisas com modelos animais e humanos têm mostrado que a base medial do hipotálamo é a chave central da regulação metabólica pelo SNC. O hipotálamo recebe e integra uma variedade de sinais aferentes, comunicando o estado metabólico do organismo, ajustando os produtos autonômicos com o resultado fisiológico ideal para a manutenção dos reservatórios de energia (BINGHAN, ROSE, INGE, 2012). A administração neonatal de MSG em roedores, ainda com a barreira hemato-encefálica não formada (CUNHA, et al., 2010; DIEMEN, TRINDADE, TRINDADE 2006; CESARETTI & KOHLMANN JR, 2006), destrói 80-90% dos neurônios dos núcleos arqueados e provoca danos a outras estruturas centrais do hipotálamo, resultando em alterações neuroendócrinas e metabólicas, levando os ratos a desenvolver obesidade, devido à falta de controle entre a absorção e gasto energético (DIEMEN, TRINDADE, TRINDADE, 2006). Este tratamento tem demonstrado resultados com numerosas anormalidades endócrinas e comportamentais, tais como perturbações do crescimento, produção de glicocorticóides, obesidade e hipogonadismo (CUNHA, et al., 2010).

Outra doença que afeta grande proporção da população é a periodontite, (BUDUNELI, et al., 2014; YACOB, et al 2012; COTTI, et al., 2011). A periodontite é considerada atualmente um importante problema de saúde pública, pois pode reduzir a função mastigatória e prejudicar a estética, provocando a perda do dente, tornado-se então responsável por uma proporção substancial de edentulismo e disfunção mastigatória. Tudo isso leva a uma redução na qualidade de vida do

indivíduo (TONETTI, VAN DYKE, 2013). A sua natureza polimicrobiana orchestra um mecanismo complexo de inflamação que é caracterizado por destruição das fibras colágenas, e de outros constituintes da matriz do tecido conjuntivo do ligamento periodontal e do osso alveolar, em conjunto com a formação de bolsas periodontais (SAKALAUSKIENE, et al., 2014; RIVERA, et al., 2013; COTTI, et al., 2011). A infecção periodontal é iniciada por agentes patogênicos orais invasivos específicos que colonizam biofilme da placa dental que, em geral, tem uma estrutura organizada, composto de bactérias numa matriz de glicoproteínas salivares e polissacarídeos extracelulares (COTTI, et al., 2011). É causada predominantemente por bactérias que liberam endotoxinas que ativam citocinas pró-inflamatórias – Interleucinas -1 (IL-1), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) entre outras que afetam os tecidos de suporte dos dentes (VGONTZAS et al., 1977; ORBAN et al., 1999; NISHIMURA et al., 2001; BASTOS et al., 2005). Tornou-se evidente que, sem a reação inflamatória do hospedeiro, a presença de agentes patogênicos bacterianos por si só não é suficiente para causar a destruição dos tecidos que ocorre no curso da periodontite. Assim, tem sido sugerido que, em indivíduos com fraca saúde oral, a reação às bactérias podem conduzir a uma resposta excessiva do hospedeiro, resultando em resposta inflamatória sistêmica (YAKOB et al., 2012).

Diversas pesquisas científicas, tanto em ratos, camundongos e humanos, sugerem que a obesidade contribui efetivamente com a severidade da doença periodontal (DP) (PERLSTEIN & BISSADA, 1977; LÖSCHE et al., 2000; IACOPINO, 2001; SAITO et al., 2003; AL-ZAHRANI, BISSADA, BORAWSKIT, 2003). Dados epidemiológicos mostram que pacientes obesos e resistentes à insulina apresentam concentrações plasmáticas elevadas de marcadores inflamatórios (BRANDELERO JR et al., 2012). O tecido adiposo secreta grande quantidade de TNF- α e IL-6 (ORBAN et al., 1999) e a concentração dessas citocinas é proporcional ao índice de massa corporal (IMC) (VGONTZAS et al., 1977). A alta concentração de TNF- α pode exacerbar a doença periodontal pré-existente por meio da estimulação de fibroblastos que promovem a síntese de enzimas e pela estimulação de osteoclastos que realizam a reabsorção óssea (BRANDELERO JR et al., 2012). O aumento da concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias poderia justificar a relação entre obesidade e doença periodontal (BASTOS et al., 2005). A obesidade pode afetar a resposta imune e vascular do hospedeiro devido à diminuição do fluxo

sanguíneo (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2008). Uma vez que a periodontite e a obesidade estão associadas com inflamação sistêmica, é possível sugerir que essas duas condições estejam ligadas por uma via patofisiológica comum (IACOPINO, 1995). Tem sido demonstrado que citocinas e hormônios derivados do tecido adiposo, considerado um tecido endócrino, podem exercer um papel fundamental nesta associação visto que o tecido adiposo secreta uma variedade de citocinas e hormônios, também chamados de adipocinas, as quais têm potencial de modular a periodontite. A obesidade pode aumentar a suscetibilidade do indivíduo, modulando o sistema imune e inflamatório, aumentando a liberação de citocinas, ativando macrófagos e dessa forma elevando o risco para a periodontite (MOURA et al., 2010). Apesar disso tudo, a associação entre obesidade e periodontite, e o seu mecanismo biológico desta correlação ainda não está totalmente elucidado.

Assim como a periodontite, a Doença Cardiovascular (DCV) vem gerando grande preocupação visto que representa uma fonte crescente de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A obesidade, dislipidemia, hipertensão arterial, tabagismo, diabetes mellitus foram identificados como fatores de risco para DCV durante as últimas décadas. Apesar das tentativas para gerenciar essas comorbidades, a incidência de DCV continua a ser significativa e há um interesse crescente na identificação de novos fatores de risco (VAISHNAVA, NARAYAN, FUSTER, 2011). O principal responsável pela maioria dos casos de doença cardíaca vascular é a aterosclerose (JORGE, 1997), uma doença multifatorial, que representa a causa mais comum de doença cardíaca. Há um forte componente genético envolvido na gênese da aterosclerose em associação com vários fatores de risco, anatômicos, fisiológicos e comportamentais, incluindo alterações no perfil lipídico sérico, tabagismo, hipertensão arterial, diabetes, obesidade, sedentarismo, idade e gênero (COTTI et al., 2011). A disfunção endotelial é considerada uma das primeiras características de progressão do ateroma, de fato, o endotélio desempenha um papel fundamental na manutenção da função normal da parede do vaso. Vários fatores, tais como hipercolesterolemia, estresse oxidativo, diabetes, consumo de cigarros e infecção, podem aumentar a expressão de moléculas de adesão e causar disfunção endotelial. O aumento da produção de mediadores da adesão conduz a um aumento da permeabilidade da túnica íntima e formação inicial de ateroma (D'AIUTO, ORLANDI, GUNSOLLEY, 2013).

A hipótese de que a infecção e inflamação podem estar ativamente envolvidas na aterogênese é suportada por um número crescente de relatos, sendo que as infecções dentárias representam um contexto favorável para doenças sistêmicas vasculares, como doença coronariana, doença cerebrovascular e doença pulmonar obstrutiva crônica, através da indução de disfunção endotelial (BOBETSIS BARROS, OFFENBACHER, 2006; CHANG et al., 2010(COTTI,2011). Assim é razoável acreditar que a inflamação sistêmica induzida por patógenos periodontais pode estar associada com a disfunção endotelial e aterosclerose, primeiro nos pequenos vasos e mais tarde em artérias maiores, tais como as coronárias (ZADIK et al., 2009). O entusiasmo para a relação entre DCV e DP surgiu a partir da hipótese de que a periodontite, iniciada pelo acúmulo de bactérias e perpetuada por uma resposta imunológica pode contribuir para inflamação sistêmica ligadas à aterogênese (VAISHNAVA, NARAYAN, FUSTER, 2011). Procedimentos clínicos realizados pelo dentista nos dentes ou no periodonto e até mesmo a escovação realizada pelo paciente, pode levar à uma bacteremia transitória, provocando uma infecção secundária em tecidos e órgãos distantes, inclusive artérias. A presença de bactérias como *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) na doença periodontal é um fator importante a ser considerado, níveis elevados de anticorpos contra esses dois microorganismos têm sido associado com o aumento do risco para DCV. O desafio bacteriano da bolsa periodontal causa uma resposta inflamatória nos tecidos gengivais, levando à um aumento no recrutamento de leucócitos para a área e aumento da produção de mediadores inflamatórios. É provável que esses mediadores inflamatórios possam entrar via circulação sanguínea e induzir a um baixo grau de inflamação sistêmica, que por sua vez poderia afetar a progressão da aterosclerose (HOLMLUND, et al., 2011). Acredita-se que a doença periodontal fornece uma carga biológica de citocinas inflamatórias, que promove aterosclerose e acontecimentos trombóticos (COTTI,et al., 2011). Apesar da associação da doença periodontal crônica com inflamação sistêmica, juntamente com as mesmas citocinas pró-inflamatórias implicadas em algumas formas de DCV, ainda permanece instável a afirmação de que a periodontite provoca eventos cardiovasculares (VAISHNAVA, NARAYAN, FUSTER, 2011). Embora pareça haver uma associação entre saúde bucal e doenças cardiovasculares, a causalidade ainda não foi comprovada e os

mecanismos biológicos envolvidos ainda permanecem obscuros (HOLMLUND, et al., 2011).

Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no sentido de investigar a relação entre a obesidade e as várias doenças crônico-degenerativas que acompanha esta epidemia. Todavia, apesar das evidências mostrando as inter-relações entre obesidade, doenças cardiovasculares e doença periodontal, a literatura é muito restrita, necessitando de muitas pesquisas neste campo científico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ZAHRANI, M.S.; BISSADA, N.F.; BORAWSKIT, E.A. Obesity and periodontal disease in young, middle-age, and older adults. **Journal of Periodontology**, v.7, p.610-615, 2003.

BALBO, S.L.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, R.A.; BONFLEUR, M.L.; GRAVENA, C.; BRITO, M.N.; ANDREAZZI, A.E.; MATHIAS, P.C.F.; TORREZAN, R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. **Endocrine**, v. 31 n. 2, p. 142-8. Apr 2007.

BARBOSA, R.M.S.; SOARES, E.A.; CROCCIA, C.; CARVALHO, C.G.N.; FRANCO, V.C.; SALLES-COSTA, R. Consumo alimentar de crianças com base na pirâmide alimentar brasileira infantil. **Revista de Nutrição**, v.18, p.633-641, 2005.

BASTOS, A.A.; FALCÃO, C.B.; PEREIRA, A.L.A.; PEREIRA, A.F.V. Obesidade e doença periodontal. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v.5, p.275-279, 2005.

BINGHAN, A.C., ROSE, S.R., INGE, T.H. Bariatric surgery in hypotalamic obesity. **Frontiers in Endocrinology**, v.3, p.1-9, 2012.

BOBETSI, Y.A.; BARROS, S.P.; OFFENBACHER, S. Exploring the relationship between periodontal disease and pregnancy complications. **Journal of the American Dental Association**, v. 137, p.7-13, 2006.

BORGES, P.K.O.; GIMENO, S.G.A.; TOMITA, N.E.; FERREIRA, S.R. Japanese-brazilians diabetes study group. Prevalência e características associadas à síndrome metabólica em nipo-brasileiros com e sem doença periodontal. **Caderno de Saúde Pública**, mar, v.23, n.1, p.657-668, 2007.

BRANDELERO JR, S.; BONFLEUR, M.L.; RIBEIRO, R.A.; VANZELA, E.C.; NASSAR, C.A.; NASSAR, P.O.; BALBO, S.L. Decreased TNF- α 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, mar. 2012.

BRASIL, 2013, Portal Brasil – Saúde. URL accessed 15/08/2014 at: <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/08/obesidade-atinge-mais-da-metade-da-populacao-brasileira-aponta-estudo>.

BUDUNELI, N.; BIYIKOGLU, B.; ILGENLI, T.; BUDUNELI, E.; NALBANTSOY, A.; SARAÇ, F.; KINANE, D.F. Is obesity of periodontal disease as a chronic inflammatory process? A case-control study. **Journal Periodontal Research**, v. 49, p. 465-471, 2014.

CESARETTI, M.L.; KOHLMANN JR, O. Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.50, n.2, p.190-197, 2006.

CHANG, S.T.; CHU, C.M.; HSU, J.T.; HSIAO, J.F.; CHUNG, C.M.; HO, C.; PENG, Y.S.; CHEN, PY; SHEE, J.J. Independent determinants of coronary artery disease in erectile dysfunction patients. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 7, p. 1478–87, 2010.

COTTI, E.; DESSI, C; PIRAS A.; MERCURO, G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? A review of the literature. **International Journal of Cardiology**, v .148, n°1; p. 4-10. 2011.

CUNHA, N.V., ABREU, A.S., PANIS, C., GRASSIOLI, S., GUARNIER, F.A, CECCHINI, R., MAZZUCO, T.L., PINGE-FILHO, P., MARTINS-PINGE M.C. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sciences**, v.87, p. 375-381, 2010.

D'AIUTO, F.; ORLANDI, M.; GUNSOLLEY, J.C. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. **Journal of Clinical Periodontology**, v.40, n.14, 2013.

DIEMEN, V.V.; TRINDADE, E.M.; TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 425-429, 2006.

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. 214-29, Dec 1995.

IACOPINO, A.M. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. **Annals of Periodontology**, v.6, p.125-137, 2001.

HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. **Journal of Clinical Periodontology**. v. 36, p.89-99. 2008.

HOLMLUND, A.; HEDIN, M.; PUSSINEN, P.J.; LERNER, U.H., LIND, L. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, n.148, p. 148-153, 2011

JORGE, P.A.R. Endotélio, Lipídeos e Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 68, p. 129-34, 1997.

LÖSCHE, W. et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.27, p.537-541, 2000.

MOURA FOZ A et al. Periodontal therapy and biomarkers related to cardiovascular risk. **Minerva Stomatological**, v. 59, n.5, p.271-83, May 2010.

NISHIMURA, F.; MURAYAMA, Y. Periodontal Inflammation and Insulin Resistance – Lessons from Obesity. **Journal of Dental Research**, v.80, n.8, p.1690-1694, 2001.

ORBAN, Z.; REMALEY, A.T.; SAMPSON, M.; TRAJANOSKI, Z.; CHROUSOS, G.P. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.84, p.2126-2133, 1999.

PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; LANCHETA JR, A.H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 2, p.111-127, Abril 2003.

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

RIVERA, M.F.; LEE, J.Y.; ANEJA, M.; GOSWAMI, V.; LIU, L.; VELSKO, I.M.; CHUKKAPALLI, S.S.; BHATTACHARYYA, I.; CHEN, H.; LUCAS, A.R. Polymicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE null mice. **Plos One**, v.8, n.2, p. 1-10, 2013.

SAITO, T.; MURAKAMI, M.; SHIMAZAKI, Y.; OOBAYASHI, K.; MATSUMOTO S, KOGA T. Association between alveolar bone loss and elevated serum C-reactive protein in Japanese men. **Journal Periodontology**, v.74, p.1741-1746, 2003.

SAKALAUSKIENE, J.; GIEDRIMIENE, D.; KUBILIUS, R.; GLEIZNYS, A.; VITKAUSKIENE, A.; IVANAUSKIENE, E.; PUSKUNIGYTE, K. Cytokine production by leukocytes in patients with periodontitis. **Central European Journal of Medicine**, v. 9, n.6, p. 821-829, 2014.

SANDE-LEE S.V.; VELLOSO, L.A. Disfunção hipotalâmica na obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 56, nº 6, p. 341-350, 2012.

TONETTI, M.S.; VAN DYKE, T.E. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 40 Suppl 14, p. S24-9, Apr 2013.

VAISHNAVA, P; NARAYAN, R; FUSTER, V. Understanding systemic inflammation, oral hygiene, and cardiovascular disease. **The American Journal of Medicine**, v.124, n.11 p.997-999, 2011.

VGONTZAS, A.N.; PAPANICOLAOU, D.A.; BIXLER, E.O.; KALES, A.; TYSON, K.; CHROUSOS, G.P. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.1313-1316, 1977.

VOLTERA, A.F.; CESARETTI, M.L.R.; GINOZA, M.; KOHLMANN JR, O. Efeito da indução da obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função

ventricular esquerda de ratos normotensos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, nº 1, p. 47-54, 2008.

YAKOB, M.; MEURMAN, J.H.; JOGESTRAND, T.; NOWAK, J.; SÖDER, P.O.; SÖDER, B. C-reactive protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis. **Clinical Oral Investigations**. v.16; p. 259-265; Fevereiro/2012.

ZADIK, Y.; BECHOR, R.; GALOR, S.; JUSTO, D.; HERUTI, R.J. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: Two ends of the cardiovascular spectrum. **The Journal of Sexual Medicine**, v.6, p.1111–6, 2009.

ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DOS TECIDOS PERIODONTAIS E AORTA ABDOMINAL DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO E PERIODONTITIE EXPERIMENTAL

Autores: Karine Figueredo da Costa
Maria Lúcia Bonfleur
Viviane Pontillo
Stefany Pedrotti
Rose Meire Costa Brancalhão
Célia Cristina Leme Beu
Patricia Oehlmeyer Nassar
Carlos Augusto Nassar

PALAVRAS CHAVE:

Obesidade, MSG, Aterosclerose, Doença Periodontal

AVALIAÇÃO DOS TECIDOS PERIODONTAIS E AORTA ABDOMINAL DE RATOS COM OBESIDADE INDUZIDA PELO GLUTAMATO MONOSSÓDICO E PERIODONTITE EXPERIMENTAL

RESUMO

Objetivo: O objetivo desse trabalho foi avaliar o comportamento de tecidos periodontais e da artéria aorta abdominal em ratos com obesidade hipotalâmica associada a periodontite experimental.

A doença periodontal é uma doença crônica que afeta grande parte da população e tem sido associada a alterações sistêmicas. Sendo assim, sua relação com a obesidade e a aterosclerose, é motivo de preocupação para o sistema de saúde.

Metodologia: Vinte e oito ratos Wistar foram divididos, inicialmente, em 2 grupos que foram submetidos a injeções intradérmicas na região cervical de 4g/kg/dia de solução de Glutamato Monossódico (grupo MSG) e 1,25g/kg/dia de solução salina (grupo CTL), nos primeiros 5 dias de vida. Aos 70 dias, esse grupos foram subdivididos em outros 2 grupos, onde foi induzida a periodontite com a colocação de ligadura nos 1^{os} molares inferiores; originando-se assim 4 grupos: grupo controle sem ligadura (CTL); grupo controle com ligadura (CTL Lig); grupo MSG sem ligadura (MSG); grupo MSG com ligadura (MSG Lig). Aos 100 dias os ratos foram pesados e mensurados o comprimento naso-anal, assim o índice de Lee foi determinado e, então, os animais foram sacrificados. Amostras de tecido gengival e da aorta abdominal, bem como as hemimandíbulas foram retiradas para análises imunológicas, morfológicas e radiográficas.

Resultados: A concentração de interleucina-6 no tecido gengival foi significativa no grupo CTL Lig, sendo a concentração do Fator de Necrose Tumoral alfa na aorta abdominal maior nos grupos com periodontite induzida ($p < 0.05$). Tanto a análise radiográfica quanto a histológica demonstrou uma menor perda óssea alveolar no grupo MSG Lig, quando comparado ao grupo CTL Lig ($p < 0.05$). Na análise morfométrica da aorta abdominal houve diferença estatisticamente significativa na mensuração do diâmetro das paredes da artéria, sendo o maior diâmetro observado no grupo MSG Lig ($p < 0.05$).

Conclusion: Logo, este estudo sugere que a periodontite em associação com a obesidade hipotalâmica pode contribuir para o aumento da largura das paredes da aorta abdominal, bem como a obesidade hipotalâmica pode exercer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar.

INTRODUÇÃO

A obesidade tem alcançado proporções epidêmicas a nível mundial (1-3). É uma desordem médica caracterizada por um excesso de peso e suas consequências para a saúde variam do risco aumentado de morte prematura a graves doenças não letais, mas debilitantes que afetam diretamente a qualidade de vida destes indivíduos (4-6). Para compreender melhor o papel de cada um dos elementos envolvidos na fisiopatologia da obesidade, pesquisadores utilizam-se de modelos experimentais animais, que podem determinar de maneira controlada o papel dos componentes envolvidos na etiologia da obesidade (7). Entre os modelos neurais, a obesidade hipotalâmica é a mais conhecida, um modelo que mimetiza a situação clínica de síndrome metabólica rotulada como obesidade neuroendócrina (8). Em ratos essa obesidade pode ser conseguida por meio de administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG), um aminoácido neuroexcitatório lesivo ao sistema nervoso central, quando em quantidades excessivas, pois danifica núcleos pertencentes ao hipotálamo, ou seja, provoca alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário (8).

Outra doença que afeta grande proporção da população é a periodontite, a sua natureza polimicrobiana orchestra um mecanismo complexo de inflamação que é caracterizado por destruição das fibras colágenas, outros constituintes da matriz extracelular do ligamento periodontal e do osso alveolar, em conjunto com a formação de bolsas periodontais (9-11). É causada predominantemente por bactérias que liberam endotoxinas que ativam citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 – IL-1; fator de necrose tumoral alfa - TNF- α ; entre outras) que afetam os tecidos de suporte dos dentes (12-16). Sugere-se que a obesidade contribui efetivamente com a severidade da doença periodontal (17-21). O aumento da concentração plasmática das citocinas pró-inflamatórias poderia justificar a relação entre obesidade e doença periodontal (15). A obesidade pode aumentar a susceptibilidade do indivíduo

modulando o sistema imunológico e inflamatório, aumentando a liberação de citocinas, ativando macrófagos e dessa forma elevando o risco para a periodontite (22).

É razoável acreditar que a inflamação sistêmica induzida por patógenos periodontais pode estar associada com a disfunção endotelial e aterosclerose primeiro nos pequenos vasos, e mais tarde em artérias maiores, tais como as coronárias (23). O aumento da produção de mediadores da adesão conduz a um aumento da permeabilidade da camada íntima e formação inicial de ateroma (24). O entusiasmo para essa relação entre doença cardiovascular e doença periodontal surgiu a partir da hipótese de que a periodontite, iniciada pelo acúmulo de bactérias e perpetuada por uma resposta imunológica pode contribuir para uma inflamação sistêmica ligada à aterogênese (25). Embora sugere-se haver uma associação entre saúde bucal e doenças cardiovasculares, a causalidade ainda não foi comprovada e os mecanismos biológicos envolvidos ainda permanecem obscuros (26).

Assim, o presente estudo foi proposto para avaliar o comportamento de tecidos periodontais e artéria aorta abdominal em ratos com obesidade hipotalâmica associada a periodontite experimental.

METODOLOGIA

Animais

Quatro ratas Wistar prenhes foram obtidas no Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Cascavel, e mantidas no Biotério Setorial do Laboratório de Fisiologia Humana sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro – 7:00 - 19:00 h). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal e Aulas Práticas (CEEAAP) da UNIOESTE.

Indução da Obesidade

Ao nascimento, os filhotes foram separados por sexo ficando somente 7 machos para cada ninhada, perfazendo um total de 28 animais. Posteriormente esses animais foram desmamados com 21 dias e receberam dieta padrão e água à vontade por todo o período experimental. Os animais foram divididos em 2 grupos, com 14 ratos cada e então submetidos, durante os cinco

primeiros dias de vida, à injeção subcutânea, na região cervical, de glutamato monossódico na dose de 4g/kg de peso corporal (grupo MSG) ou salina na dose 1,25 g/kg de peso corporal (grupo CTL) (27).

Indução da Doença Periodontal

Aos 70 dias de vida os animais dos grupos MSG e CTL foram subdivididos em dois grupos com 7 animais cada, esses animais receberam uma ligadura de algodão (Coats Corrente Ltda., SP, Brasil) em torno dos primeiros molares inferiores em uma posição sub marginal para induzir periodontite experimental, de acordo com os métodos propostos por Nassar et al. (2009) (28). A anestesia foi obtida pela administração intramuscular de 0,08 mL/100 g de peso corporal de quetamina (Francotar, Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda., São Paulo, SP, Brasil) 0,04ml/100 g de peso corporal de xilazina (Virbac do Brazil Ind. and Com. Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil). Após este procedimento originaram-se 4 grupos (n=7): controle sem ligadura (CTL), controle com ligadura (CTL Lig), obeso sem ligadura (MSG) e obeso com ligadura (MSG Lig). Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana (28).

Avaliação da Obesidade

Aos 100 dias de vida, os animais foram pesados e o comprimento naso-anal fora obtido para cálculo do índice de Lee [raiz cúbica do peso corporal (g) / comprimento naso-anal (cm) X 100] (29).

Obtenção das amostras

Após os 100 dias do tempo total do experimento, os ratos de todos os grupos foram submetidos a um jejum de 8 horas, antes do sacrifício, sendo disponibilizada água à vontade. Os animais foram dessensibilizados com gás carbônico e então o sacrifício se deu por decapitação. Após o sacrifício, amostras de sangue foram obtidas e centrifugadas a 300xG por 15 minutos a 4°C e armazenadas em freezer -80°C, para realização das análises de triglicerídeos e colesterol total através de *kits* comerciais de acordo com instruções do fabricante (Laborclin®, Bioliquid, PR, BR). As amostras dos tecidos periodontais, da hemimandíbula do lado direito e aorta destinadas às análises foram reduzidas e pré-fixadas em metacarn (70% metanol, 20% clorofórmio e de 10% ácido acético glacial) com gotejamento constante, durante a redução. Na hemimandíbula do lado esquerdo, a gengiva que

envolvia o dente, acometido pela periodontite experimental, foi removida e assim como uma porção da aorta abdominal foram alocadas em ependorfs e armazenadas em freezer – 80°C, sendo que posteriormente, a hemimandíbula esquerda foi dissecada e fixada em formol a 10% para posterior análise radiográfica.

Análise da Expressão da Interleucina 6 e Fator de Necrose Tumoral Alfa

Amostras do tecido gengival ao redor dos dentes das hemimandíbulas esquerdas e aorta abdominal dos animais de todos os grupos experimentais, foram removidas e utilizadas para análise, por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA - INVITROGEN™ - Waltham, Massachusetts, EUA) da presença das citocinas interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa respectivamente.

Proteínas totais foram extraídas das amostras do tecido gengival e da aorta abdominal dos animais usando um tampão de extração total a base de detergente contendo um coquetel inibidor de protease. Após isso, foi realizada quantificação proteica pelo método de Bradford.

Análise Radiográfica

Logo após o sacrifício, a hemimandíbula esquerda de cada animal foi retirada, fixada em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas. As hemimandíbulas foram colocadas com o lado lingual sobre o filme radiográfico periapical (AGFA DENTUS®, Ultraspeed – Agfa Gevaert N. V., Bélgica) e posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares ficassem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE 1000® (General Electric Co, Milwaukee, WI, EUA), regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças. Para processamento dos filmes, foram utilizados revelador e fixador Kodak® (Kodak da Amazônia Indústria e Comércio Ltda, Manaus, Amazônia, Brasil) no respectivo processamento de tempo/temperatura e digitalizadas através de um “scanner” para dispositivos (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid, São Paulo, Brasil). As imagens digitalizadas foram analisadas através de 3 medidas no programa Image Tools 3.0 (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) e feita a média entre elas, através de uma medida linear, que percorreu a distância da junção

cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo do rato, com as medições em pixels(30).

Processamento Histológico

As hemimandíbulas direitas foram descalcificadas com ácido tricloroacético (TCA) 5%, 10°C, por 27 dias. As peças foram avaliadas para verificar o grau de descalcificação esperado, com renovação da solução de TCA a cada 5 dias. Após a descalcificação, os tecidos foram imersos em sulfato de sódio 5% durante aproximadamente 2 horas para neutralizar o TCA, lavados em água corrente por duas horas, mantidos em álcool 70% até o processamento histológico para inclusão em parafina (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, *Vetec Química Fina*, Rio de Janeiro, Brazil). Já os fragmentos da aorta abdominal depois de retiradas do metacarn foram mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. Os fragmentos das hemimandíbulas e aortas abdominais foram desidratadas em série alcoólica ascendente, diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo manual (Olympus, CUT 4055 - Charleston, Carolina do Sul, EUA) para obtenção de secções de 7µm de espessura, que foram montadas em lâminas histológicas e coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE).

Observações Microscópicas

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histológicos corados em HE. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Suíça) para observações morfológicas de gengiva e do processo alveolar das hemimandíbulas dos ratos de todos os grupos experimentais.

Morfometria do Osso

Após a obtenção das lâminas histológicas foi realizada a quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 400 vezes no microscópio. Foram feitas duas observações por campo, e então, feito a média dos valores para cada animal e para cada grupo.

A medida da crista óssea alveolar foi realizada através de um microscópio acoplado a um computador, o qual permite capturar as imagens,

através do programa software Laz Ez® (Sistema de contagem e captura LAS V4.2, Leica microsystems). Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cimento-esmalte. As medidas foram repetidas duas vezes por dia, em três dias diferentes, e então foi feita a média entre os valores.

Análise Morfométrica da Aorta Abdominal

A aorta é uma artéria elástica que tem origem no coração e vai até a região abdominal. É dividida em aorta ascendente (região que se comunica com ventrículo esquerdo); arco da aorta; aorta descendente - nessa região é designada aorta torácica e por fim, aorta abdominal, essa inicia-se a nível da 12ª vértebra torácica e termina à altura da 4ª vértebra lombar. As artérias são formadas por três camadas, a mais externa chamada adventícia ou externa, formada essencialmente por tecido conjuntivo; intermediária encontra-se a camada média ou muscular, formada por elastina, colágeno e células musculares lisas; a camada mais interna conhecida como íntima e formada por uma fina camada de células endoteliais, alguns fibroblastos e macrófagos, essa camada é a região de interesse na aterosclerose, mantém contato direto com o fluxo sanguíneo e quando há disfunção endotelial é nessa região que resulta na formação da placa aterosclerótica. (Figura 1A e B).

Após a obtenção das lâminas histológicas da aorta abdominal dos animais, foi realizada uma medida linear das larguras das paredes da artéria, através de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens, através do programa software Laz Ez® (Sistema de contagem e captura LAS V4.2, Leica microsystems). Foi realizada uma medida da menor distância entre as camadas das paredes da artéria. As medidas foram repetidas duas vezes por dia, em três dias diferentes, e então foi feita a média entre os valores.

Análise Estatística

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

RESULTADOS

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

A administração de MSG provocou um aumento no índice de Lee quando comparados aos animais do grupo controle ($p < 0.05$), essa diferença não foi observada quando comparados os grupos obesos entre si ($p > 0.05$). Os animais tratados com MSG neonatal apresentam uma diminuição significativa no peso de ratos ($p < 0.05$) (Tabela 1).

Concentração plasmática de colesterol total e triglicerídeos.

Os resultados demonstram que os grupos com obesidade tiveram um aumento significativo nas concentrações dos Triglicerídeos e Colesterol total ($p < 0.05$). (Tabela 2)

Análise da presença de IL-6 no tecido gengival

Os resultados mostram que a concentração média de IL-6 foi significativamente maior no grupo CTL Lig quando comparado com os demais grupos ($p < 0.05$). (Tabela 3)

Análise da presença de TNF- α nas amostras no tecido da aorta abdominal.

A concentração média de TNF- α foi maior no grupo CTL Lig ($p < 0.05$). Além disso quando comparados os grupos com ligadura com os grupos que não tiveram a periodontite induzida, os resultados demonstraram um significativo aumento desta citocina na aorta abdominal ($p < 0.05$). (Tabela 4)

Análise radiográfica da média da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do primeiro molar inferior esquerdo.

Na análise radiográfica verificou-se que houve diminuição de inserção nos animais expostos a periodontite experimental ($p < 0.05$), porém no grupo CTL Lig essa perda foi mais acentuada que MSG Lig. (Tabela 5)

Análise histológica da hemimandíbula direita

Grupo Controle

Na avaliação histológica do grupo CTL foi possível observar a normalidade dos epitélios oral, junciona

I, sulcular e tecido conjuntivo, sem observação de aspecto inflamatório sobre estes tecidos. O osso alveolar estava intacto, compacto e regular, com uma porção esponjosa central normal. As cristas ósseas eram espessas e altas (no terço cervical da raiz) e apresentaram altura ao nível cervical da raiz, dado obtido através da mensuração da distância entre junção cimento esmalte e crista óssea. A presença de osteoblasto e osteoclasto também foram observadas indicando a reabsorção e neoformação óssea, mas dentro da normalidade. Junção cimento-esmalte, cimento e ligamento periodontal apresentaram características normais. (Figura 2)

Grupo Controle Ligadura

No grupo CTL Lig notamos a anormalidade na morfologia dos epitélios oral, juncional, sulcular, com migração para a região apical e tecido conjuntivo com predominância de estado inflamatório agudo (Figura 3). A crista óssea se apresentou de forma irregular, com extensa perda óssea alveolar, fazendo com que ocorresse a exposição do terço cervical, com presença acentuada de osteoclasto revelando a atividade de reabsorção óssea. Também foram observadas alterações em cimento e ligamento periodontal.

Grupo MSG

Após o tratamento com o glutamato monossódico o grupo MSG continuou demonstrando regularidade na diferenciação morfológica entre os epitélios oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo sem aspecto inflamatório. O nível da crista óssea e a distância até a junção cimento esmalte foi semelhante ao encontrado no grupo CTL. (Figura 4)

Grupo MSG Ligadura

No grupo MSG Lig observou-se pequena irregularidade nos epitélios oral, juncional e sulcular, com tecido conjuntivo apresentado aspecto inflamatório. A crista óssea embora se apresente numa altura próxima ao nível do terço cervical da raiz, apresenta irregularidades, com perda óssea menos acentuada do que a que foi observada no grupo CTLLig. Há uma presença aumentada de osteoclasto em relação ao grupo MSG, revelando a atividade de

reabsorção óssea. Também são observadas alterações em cimento e ligamento periodontal (Figura 5).

Podemos notar na figura 6, a região da crista óssea, em (A) grupo CTL presença de osteoblasto na periferia do osso, formando um epitélio, e presença de osteócitos na região central do osso. O mesmo é observado na (C) grupo MSG. Em (B) grupo CTL Lig já notamos a presença de áreas osteoclásticas indicando evidência de reabsorção óssea. O mesmo se repete em (D) grupo MSG Lig, com presença de linhas incrementais observadas em todas as imagens.

Análise Morfométrica da hemimandíbula direita

A administração de MSG provocou diferença estatística no número de osteoblastos quando comparados grupos CTL com MSG ($p < 0.05$), não houve diferença estatística na contagem de osteócitos ($p > 0.05$) e em relação aos osteoclastos essa diferença foi significativa entre os grupos com ligadura ($p < 0.05$) (tabela 6).

Análise morfométrica da aorta abdominal

A média da largura das paredes das artérias mostraram diferença significativa em todos os grupos, sendo o grupo CTL apresentou a menor espessura, e o grupo MSG Lig apresentou uma maior espessura das paredes ($p < 0.05$) (tabela 7).

DISCUSSÃO

O tratamento neonatal com MSG induz a obesidade através de lesão de células neurais do núcleo arqueado e eminência mediana do hipotálamo (5, 31-32). A administração de MSG provocou aumento no índice de Lee dos grupos obesos (tabela 1), com diferença significativa entre os grupos tratados, mas não houve diferença entre os grupos de MSG, essa variável fica evidente nesse modelo de obesidade devido a este tratamento poder resultar em numerosas anormalidades endócrinas e comportamentais, tais como perturbações do crescimento, produção de glicocorticóides, obesidade e hipogonadismo (4). Entretanto o menor peso corporal final dos ratos tratados com MSG, também demonstrado na tabela 1, provavelmente pode ser atribuído ao menor tamanho

desses animais, uma vez que entre as alterações endócrinas descritas nesse modelo está a diminuição da secreção do hormônio de crescimento (8)

Em relação ao perfil lipídico, o presente estudo apresenta, concentração de colesterol total e triglicerídeos aumentados em ambos os grupos obesos quando comparados com os controles (tabela 2). Altos índices tanto de triglicerídeos, quanto de colesterol total têm sido encontrados em indivíduos com periodontite quando comparados com pacientes saudáveis, assim além de promover alterações a níveis de metabolismo lipídico, também pode potencializar os fatores clássicos para aterosclerose (33). Entretanto, esta afirmação ainda permanece incerta atualmente e não há um consenso dentro da Odontologia/Periodontia sobre estes achados (34). Na periodontite, a parede celular dos microrganismos que colonizam a placa bacteriana contém endotoxinas, também denominadas Lipopolissacarídeos (LPS), que induzem a resposta inflamatória e imunológica do hospedeiro. Essas alterações são associadas à resposta inflamatória tecidual e à perda de inserção periodontal, se relacionando com a agregação e adesão plaquetária e com a elevação da concentração de colesterol (35). Os resultados destes estudos são contraditórios, uma vez que a elevação da concentração de triglicerídeos e colesterol foi observada nos grupos obesos, independente da presença ou não de periodontite experimental, sugerindo que a periodontite não influenciaria no aumento destes parâmetros, corroborado pelo estudo de Shridar et al., (36), que também não demonstrou a influência da doença periodontal nestes parâmetros analisados

Por muitos anos acreditou-se que o tecido adiposo era um órgão inerte para armazenamento de triglicérides, sem funções metabólicas relevantes. Atualmente está claro que o tecido adiposo é um órgão endócrino complexo, metabolicamente ativo, que secretam mais de cinquenta moléculas bioativas. Algumas delas são citocinas clássicas do processo inflamatório tais como TNF- α e IL-6. O aumento destas citocinas na corrente sanguínea pode causar um processo inflamatório subclínico, o qual interfere em outros processos inflamatórios pré-existentes (37) (tabelas 3 e 4). A alta concentração de TNF- α pode exacerbar a periodontite pré-existente por meio da estimulação de fibroblastos que promovem a síntese de enzimas e pela estimulação de osteoclastos que ativam a reabsorção óssea (15). Não obstante, os níveis

dessas citocinas pró-inflamatórias são proporcionais ao IMC, em particular em indivíduos com obesidade visceral, de forma que um aumento na massa de gordura pode induzir a uma resposta hiperinflamatória na doença periodontal. A obesidade pode afetar a resposta imune e vascular do hospedeiro devido à diminuição do fluxo sanguíneo (38). A periodontite está diretamente envolvida na etiopatogenia da doença cardiovascular, tanto devido às bactérias orais, quanto devido a resposta do hospedeiro, pois pode liberar citocinas (IL- 6 e TNF- α) que podem iniciar uma cascata de reações bioquímicas e dano endotelial facilitando a fixação de placas de colesterol (39). Ambos marcadores inflamatórios apresentaram-se aumentados no presente estudo (tabelas 3 e 4).

Nossos resultados mostraram uma perda de óssea acentuada nos grupos com periodontite induzida, essa diferença foi mais significativa no grupo CTL Lig (tabela 5). A literatura atual demonstra uma relação da obesidade e periodontite, na qual a perda de inserção é maior nos grupos obesos, uma situação que pode variar com o tempo de exposição do animal a dieta ou o tipo de modelo experimental de obesidade (40). Estudos em cultura de células de gordura de ratos obesos, mostra um aumento significativo na liberação de TNF- α quando comparados com ratos não obesos. A grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias afeta tecidos que suportam os dentes e podem induzir a perda de osso alveolar, cemento e ligamento periodontal, sendo assim influenciam e contribuem efetivamente para o aumento ou progressão da periodontite. Nascimento et. al., (40) realizaram um estudo em que os animais foram submetidos a dieta de cafeteria e demonstraram diferença significativa na perda óssea entre os grupos, sendo que os grupos com ligadura perderam osso alveolar mais do que seus homólogos. Já Brandelero et al. (33) demonstraram que através da obesidade hipotalâmica, pode-se ter um efeito oposto e protetor quando a periodontite é induzida. Neste presente estudo, em que o modelo de obesidade foi a indução através de MSG também apresentou uma perda óssea alveolar menor no grupo MSG Lig quando comparado com o CTL Lig.(tabelas 5 e 6).

A obesidade pode apresentar fatores benéficos frente à reabsorção óssea, como demonstrado por Brandelero et al. (33) que observaram um efeito protetor da obesidade hipotalâmica sobre a perda óssea alveolar. Ainda assim apesar do mecanismo pelo qual a obesidade possa favorecer a formação

óssea ainda ser desconhecido, hipóteses têm sido propostas, através da observação de que em pacientes obesos, com um elevado peso corporal, possa se estabelecer uma maior carga mecânica sobre o osso (41-43). O aumento da carga mecânica promoveria alguns estímulos sobre o esqueleto, tais como redução da apoptose, aumento da diferenciação de osteoblasto e estimulação da matriz óssea (44). Outras evidências demonstram que a leptina, um hormônio secretado pelo tecido adiposo, é capaz de estimular a diferenciação de células estromais da medula óssea em osteoblastos, levando a um aumento na mineralização da matriz extracelular (45-46). Além disso, a leptina pode reduzir a expressão do receptor ativador do fator nuclear kB (RANK), estimular a expressão de osteoprotegerina (OPG), inibir a diferenciação de osteoclastos, levando a uma redução óssea e favorecimento da formação óssea (47-48).

Entretanto a leptina também pode afetar negativamente o metabolismo ósseo de animais sujeitos a uma dieta com elevado teor de gordura (40). A obesidade pode agir sobre o tecido ósseo, através da quantidade elevada de macrófagos infiltrados no tecido adiposo. Tais células são fontes consideráveis de citocinas pró-inflamatórias que, por sua vez, podem estimular a reabsorção óssea (49-50).

Em nosso estudo observou-se ainda uma diferença significativa da largura das paredes da aorta abdominal, corroborando com outros estudos que têm sugerido que o remodelamento vascular é um evento precoce na aterogênese, aparecendo antes da resposta inflamatória e podendo estar ligado com a incidência de eventos cardiovasculares (51-52). Patologicamente, a aterosclerose ocorre devido a uma lesão endotelial, alterando a permeabilidade do endotélio vascular da camada íntima, permitindo a entrada de lipídios e células inflamatórias nesse intervalo inter-endotélial. Normalmente, ocorre deposição de lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) nas células endoteliais. Estas LDLs são hidrolisadas em fosfolipídios, triglicerídeos, proteínas e colesterol. Após a hidrólise, alguns receptores são expressos na membrana celular e outros produtos são utilizados na recomposição da membrana celular, como é o caso do colesterol. Na presença de hipercolesterolemia ou de situações que agravem a deposição dos LDLs, ocorre maior consumo de óxido nítrico (ON) na célula endotelial e maior

produção de radicais livres, acarretando uma disfunção do metabolismo dos ácidos graxos, das apoproteínas, da lecitina e da proteína G. O resultado final é a incapacidade do endotélio em responder adequadamente às agressões sistemáticas (53-54).

A associação entre periodontite e doença cardiovascular aterosclerótica tem apresentado algumas hipóteses: 1) processo inflamatório provoca lesão endotelial devido à liberação de citocinas pró-inflamatórias; 2) presença de agentes infecciosos podem induzir ou acelerar a aterosclerose tais como: favorecer o aumento local dos linfócitos, macrófagos, produção de fatores de crescimento teciduais; liberação local de endotoxina (LPS) e mimetismo molecular da proteína microbiana com a humana induzindo uma reação auto-imune; 3) aumento sistêmico de citocinas com ativação de marcadores inflamatórios e estimulação de pró-coagulantes, podendo acarretar trombose e isquemia aguda, além de indução de mudanças nas lipoproteínas resultando em condições pré-ateroscleróticas (55). Nosso estudo corrobora com estas hipóteses, pois os resultados da tabela 7 demonstram um aumento na largura das paredes da aorta abdominal, nos grupos em que a periodontite experimental está presente, bem como com uma maior largura quando associada com a obesidade (MSG Lig).

Em conclusão, embora os mecanismos de influência da periodontite sobre a obesidade e aterosclerose não estejam elucidados, e não há concordância nessa associação, este estudo demonstrou diferenças relevantes nos parâmetros avaliados. Logo, sugere-se que a periodontite em associação com a obesidade hipotalâmica pode contribuir para o aumento da largura das paredes da aorta abdominal, bem como a obesidade hipotalâmica pode exercer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo suporte financeiro. Nós também agradecemos aos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e de Biologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Os autores são agradecidos à Celeste da Rocha Paiva, técnica do Laboratório de Biologia Celular, pela assistência técnica na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Deitel, M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg* 2003; **13**(3):329-330.
2. James PT, Rigby N, Leach R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; **11**(1):3-8.
3. Buduneli N, Biyikoglu B, Ilgenli T, Buduneli E, Nalbantsoy A, Saraç F, Kinane DF. Is obesity of periodontal disease as a chronic inflammatory process? a case-control study. *J Periodontal Res* 2014; **49**:465-471.
4. Cunha NV, Abreu AS, Panis C, Grassioli S, Guarnier FA, Cecchini, R, Mazzuco, TL, Pinge-Filho P, Martins-Pinge MC. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sciences* 2010; **87**:375-381.
5. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito MM, Andreazzi AE, Mathias PCF, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 2007; **31**(2):142-148.
6. Pereira LO, Francischi RP, Lancha Jr AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; **47**(2):111-127.
7. Cesaretti ML, Kohlmann Jr, O. Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; **50**(2):190-197.
8. Voltera AF, Cesaretti MLR, Ginoza M, Kohlmann Jr O. Efeito da indução da obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; **52**(1):47-54.
9. Sakalauskiene J, Giedrimiene D, Kubilius R, Gleiznys A, Vitkauskiene A, Ivanauskiene E, Puskunigyte K. Cytokine production by leukocytes in patients with periodontitis. *Cent Eur J Med* 2014; **9**(6):821-829.
10. Rivera MF, Lee JY, Aneja M, Goswami V, Liu L, Velsko IM, Chukkapalli SS, Bhattacharyya I, Chen H, Lucas AR. Polimicrobial infection with

- major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic apoE null mice. *Plos one* 2013; **8**(2):1-10.
11. Cotti E, Dessi C, Piras A, Mercurio G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? a review of the literature. *Int J Cardiol* 2011; **148**(1):4-10.
 12. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; **82**:1313-1316.
 13. Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; **84**:2126-2133.
 14. Nishimura F, Murayama Y. Periodontal inflammation and insulin resistance – lessons from obesity. *J Dent Res* 2001; **80**(8):1690-1694.
 15. Bastos AA, Falcão CB, Pereira ALA, Pereira AFV. Obesidade e doença periodontal. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr* 2005; **5**:275-279.
 16. Yakob M, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Söder PO, Söder B. C-reactive protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis. *Clin Oral Inv* 2012; **16**:259-265.
 17. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1977; **43**:707-719.
 18. Lösche W. et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2000; **27**:537-541.
 19. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. *Ann Periodontol* 2001; **6**:125-137.
 20. Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T. Association between alveolar bone loss and elevated serum c-reactive protein in Japanese men. *J Periodontol* 2003; **74**:1741-1746.
 21. Al-zahrani MS, Bissada NF, Borawski EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-age, and older adults. *J Periodontol* 2003; **7**:610-615.

22. Moura Foz A et al. Periodontal therapy and biomarkers related to cardiovascular risk. *Minerva Stomatol* 2010; **59**(5):271-83.
23. Zadik Y, Bechor R, Galor S, Justo D, Heruti RJ. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: two ends of the cardiovascular spectrum. *J Sex Med* 2009; **6**:1111–6.
24. D'aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and cvd outcomes. *J Clin Periodontol* 2013; **40**(14):85-105.
25. Vaishnava P, Narayan R, Fuster V. Understanding systemic inflammation, oral hygiene, and cardiovascular disease. *Am J Med* 2011; **124**(11):997-999.
26. Holmlund A, Hedin M, Pussinen PJ, Lerner UH, Lind L. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2011; **148**:148-153.
27. Balbo SL, Mathias PC, Bonfleur ML, Alves HF, Siroti FJ, Monteiro OG, Ribeiro FB, Souza AC. Vagotomy influence of apolipoprotein e on c-reactive protein (crp) concentration in obese adults. potencial anti-inflammatory role of apoe in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**(12):1752-61.
28. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa C Jr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine a-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2009; **44**:479-88.
29. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; **40**:527-528
30. Nassar CA, Battistetti GD, Nahsan FP, Olegário J, Marconato J, Marin CF, Faccioni DM, da Costa KF, Kottwitz LB, Nassar PO . Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis-an animal study. *J Int Acad Periodontol* 2014; **6**(1):2-7.
31. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, Aburada M, Myaamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse

- model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim* 2006; **55**(2):109-115.
32. Brandelero Jr S, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Vanzela EC, Nassar CA, Nassar PO, Balbo SL. Decreased *tnf- α* gene expression in periodontal ligature in msg obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Arch Oral Biol* 2012; **57**(3):300-306.
33. Veira CLZ. Relação entre doenças periodontais e aterosclerose subclínica em indivíduos com hipercolesterolemia familiar. São Paulo, SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008. Tese.
34. Tonetti MS, Van Dyke TE. Working group 1 of the joint efp/aapw. periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the joint efp/aap workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Clin Periodontol* 2013; **40**:24-29.
35. Bertolini PFR, Biondi Filho O, Pomilio A, Alves PEV. Doença periodontal e obesidade: existe alguma relação? Periodontal disease and obesity: there is a relationship? *Rev Ciênc Méd* 2010; **19**(1-6):65-72.
36. Sridhar R, Byakod G, Pudakalkatti P, Patil R. A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. *Int J Dent Hyg* 2009; **7**:144-150.
37. Souza AB, chambrone L, Okawa RTP, Silva CO, Araújo MG. A obesidade como fator de risco para doença periodontal: revisão de literatura. *Rev Dental Press Periodontia ImplantoL* 2010; **4**(3):74-82
38. Haffajee, AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *tannerella forsythia*. *J Clin Periodontol* 2008; **36**:89-99.
39. Araújo Jr RF, Souza TO, Medeiros CAX, Souza LB, Freitas ML, Lucena HF, Alves MSCF, Araújo AA. Carvedilol decrease *il-1 β* and *tnf- α* , inhibits *mmp-2*, *mmp-9*, *cox-2*, and *rankl* expression, and up-regulates *opg* in a rat model of periodontitis. *Plos One*. 2013; **8**(7):1-6.
40. Nascimento CM, Cassol T, Silva FS, Bonfleur ML, Nassar CA, Nassar PO. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013; **6**:365–370.

41. Silva HG, Mendonça FL, Zahar SEV, Farias ML. Influence of obesity on bone density in post menopausal women. *Braz Arc Endocrinol Metab* 2007. **51**(6):943-949.
42. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miayazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997; **186**(4):489-495.
43. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(5):1640-1646.
44. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis Int* 2002; **13**(9):688-700.
45. Bandeira FA. A obesidade realmente fortalece os ossos? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; **51**(6):895-897.
46. Prouteau S, Benhamou L, Courteix D. Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight reduction and weight regain in male and female judoists. *Eur J Endocrinol* 2006; **154**(3):389-395.
47. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002; **17**(2):200-209.
48. Reid IR. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone* 2002; **31**(5):547-555.
49. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol* 2001; **142**(12):5050-5055.
50. Raska O, Bernaskova K, Raska Jr I. Bone metabolism: a note on the significance of mouse model. *Physiol Res* 2009; **58**(4):459-471.
51. Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, Altayó FJ. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent one. *Exp Gerontol* 2013; **48**:1410-1419.

52. Onetti Y, Altayó FJ, Heras M, Vila E, Dantas AP. Western-type diet induces senescence, modifies vascular function in non-senescent mice triggers adaptive mechanisms in senescent one. *Exp Gerontol* 2013; **48**:1410-1419.
53. Toregeani JF, Nassar CA, Toregeani KM, Nassar PO. Periodontal disease and atherosclerosis. *J. Vasc Bras* 2014; **4**:2008-2016
54. Ekuni D, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Mizutani S, Kojima A, Morita M. hydrogen-rich water prevents lipid deposition in the descending aorta in a rat periodontitis model. *Arc Oral Biol* 2012; **57**:1615-1622.
55. Batista RM, Zandonade E, Roelke LH, Emmerich AO, Rosetti EP, Molina MCB, Santos Neto ET. Associação entre doença periodontal e aterosclerose subclínica: uma revisão sistemática *J Vasc Bras* 2011; **10**(3): 229-238.

APÊNDICE A:

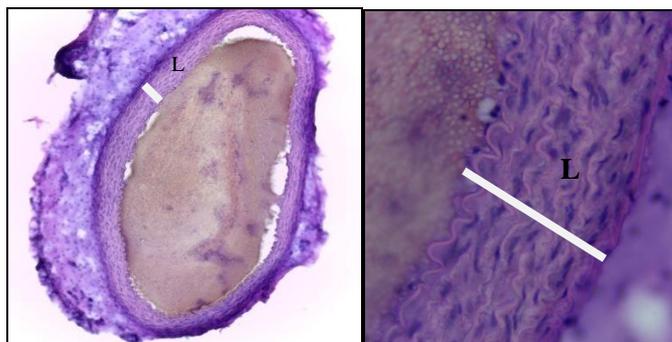


Figura 1: Fotomicrografias representativas das medidas das larguras das paredes das artérias aortas abdominais nos animais dos grupos CTL (A), CLTLig (B), MSG (C) e MSGLig (D). A: aumento de 40X ; B: aumento de 400X (Hematoxilina e Eosina)

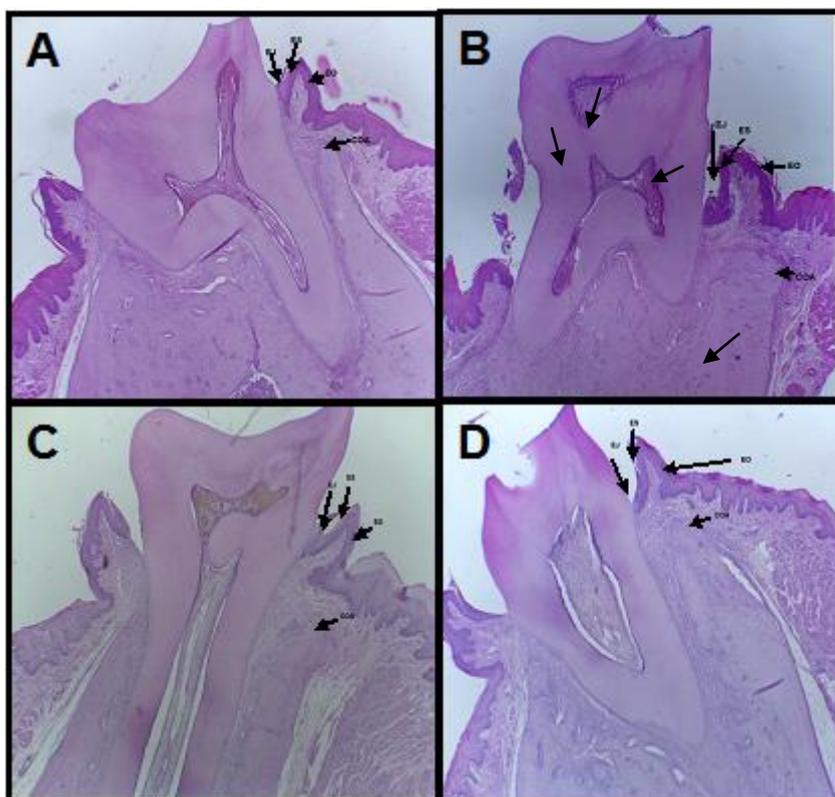


Figura 2: Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CTL. COA, crista óssea alveolar; EJ, epitélio juncional; EO, epitélio oral; ES, epitélio sulcular (A); Fotomicrografia representativa de um animal do grupo CLTLig. COA, crista óssea alveolar; EJ, epitélio juncional; EO, epitélio oral; ES, epitélio sulcular (B); Fotomicrografia representativa de um animal do grupo MSG. COA, crista óssea alveolar; EJ, epitélio juncional; EO, epitélio oral; ES, epitélio sulcular (C); Fotomicrografia representativa de um animal do grupo MSGLig. COA, crista óssea alveolar; EJ, epitélio juncional; EO, epitélio oral; ES, epitélio sulcular (Hematoxilina e Eosina, 40X).

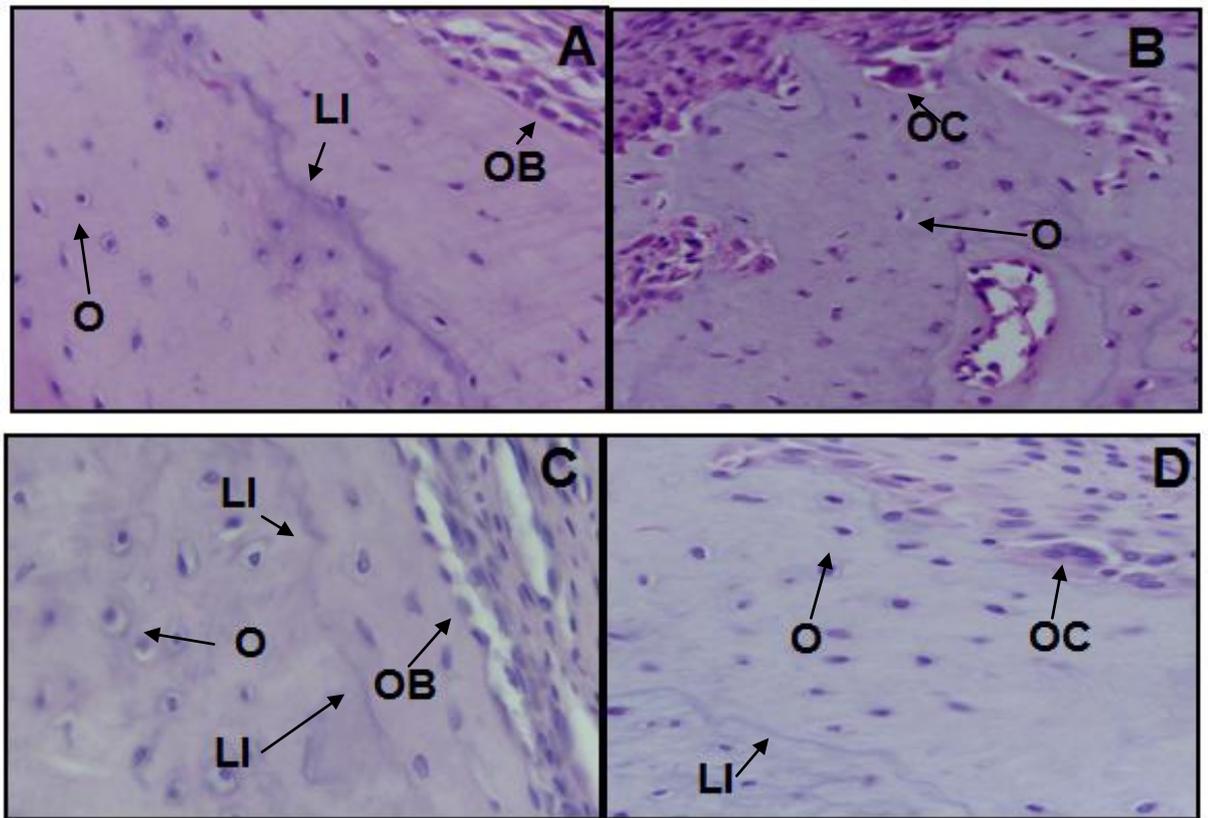


Figura 3: Fotomicrografias representativas dos animais dos grupos CTL (A), CTLLig (B), MSG (C) e MSGLig (D). O, osteócito; OB, osteoblasto; OC, osteoclasto; LI, linhas incrementais (Hematoxilina e Eosina, 400X)

APÊNDICE B:

Tabela 1: Efeito do tratamento neonatal com MSG sobre parâmetros corporais dos ratos CTL, CTLLig, MSG e MSGLig. Os valores representam média \pm desvio padrão.

	CTL	CTLLig	MSG	MSGLig
Índice de Lee (g/cm)	0,327 \pm 0,001A	0,355 \pm 0,001B	0,366 \pm 0,002C	0,369 \pm 0,002C
Peso final dos animais (g)	385,57 \pm 29,28A	356,14 \pm 17,07A	251,81 \pm 61,83B	223,16 \pm 23,68B

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

Tabela 2: Concentração de colesterol total e triglicerídeos no sangue dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em mg/dL.

	Colesterol Total	Triglicerídeos
CTL	91,15 \pm 6,07 A	150,5 \pm 29,0 A
CTLLIG	79,48 \pm 6,02 A	158,8 \pm 30,4 A
MSG	127,78 \pm 2,38 B	292,5 \pm 65,5 B
MSGLIG	134,85 \pm 3,05 B	352,6 \pm 81,2 B

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

Tabela 3: Concentração de IL-6 nas amostras gengivais dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/mL.

Grupos	Médias
CTL	9,75 \pm 2,70 A
CTLLig	15,33 \pm 1,50 B
MSG	7,78 \pm 3,19 A
MSGLig	12,78 \pm 1,03 C

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

Tabela 4: Concentração de TNF- α da aorta abdominal dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pg/mL.

Grupos	Médias
CTL	42,57 \pm 9,0 A
CTLLig	107,58 \pm 8,45 B
MSG	56,39 \pm 12,3 A
MSGLig	83,20 \pm 6,15 C

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

Tabela 5: Análise radiográfica da distância da junção cimento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels.

Grupos	Médias
CTL	64,46 \pm 1,01 A
CTLLig	80,62 \pm 3,95 B
MSG	62,03 \pm 0,84 A
MSGLig	71,00 \pm 0,56 C

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

Tabela 6: Análise morfométrica da hemimandíbula direita dos ratos dos grupos experimentais para quantificação de osteócitos, osteoblastos e osteoclastos e mensuração da distância da crista óssea alveolar até a junção cimento-esmaste (JCE-Crista). Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em unidades para o osteoblasto, osteócito e osteoclasto e expresso em pixels para JCE-Crista.

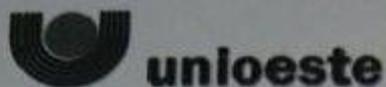
	Osteoblasto	Osteócito	Osteoclasto	JCE -Crista
CTL	16,80 \pm 1,01 A	221,50 \pm 41,41A	2,00 \pm 0,81 A	1,26 \pm 0,01 A
CTLLig	14,71 \pm 0,60 A	206,57 \pm 86,13A	5,20 \pm 0,62B	2,32 \pm 0,06B
MSG	20,33 \pm 1,01 B	175,83 \pm 57,40A	1,50 \pm 0,25A	1,27 \pm 0,02A
MSGLig	20,66 \pm 0,80 B	149,00 \pm 45,40A	3,50 \pm 0,15B	1,37 \pm 0,04C

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

Tabela 7: Análise morfométrica da aorta abdominal para mensuração largura das paredes da artéria dos ratos dos grupos experimentais. Os valores representam média \pm desvio padrão e estão expressos em pixels

Grupos	Médias
CTL	0,078 \pm 0,001 A
CTLLig	0,085 \pm 0,001 B
MSG	0,093 \pm 0,004 C
MSGLig	0,104 \pm 0,001 D

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

ANEXO A:

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

**Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa
Nº 03/2015 – CEUA**

O projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito da obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG) sobre os tecidos periodontais de ratos com doença periodontal induzida por ligadura" sob a coordenação do prof (a) Carlos Augusto Nassar, registrado no CEUA/Unioeste sob número de protocolo 14/13, foi aprovado e executado segundo os princípios éticos de experimentação animal.

Cascavel, 20/03/2015

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

ANEXO B:

EVALUATION OF PERIODONTAL TISSUES AND ABDOMINAL AORTA OF RATS WITH INDUCED OBESITY BY MONOSODIUM GLUTAMATE AND EXPERIMENTAL PERIODONTITIS

KEYWORD: Obesity, MSG, Atherosclerosis, Periodontal disease

ABSTRACT

Background and Objective: Periodontal disease is a chronic disease that affects a major population part and has been associated with systemic changes. As a result, its relationship with obesity and atherosclerosis, it is a matter of concern for the health system. The aim of this study was to evaluate the behavior of periodontal tissues and abdominal aorta artery in rats with hypothalamic obesity associated with experimental periodontitis.

Material and Methods: Twenty-eight male Wistar rats were divided, initially, into 2 groups that were subjected to intradermal injections of 4G/kg of solution of Monosodium glutamate (MSG) and 1,25G/kg/day of saline solution (group CTL) in the cervical region, in the first 5 days of life. At 70 days, the groups were subdivided into 2 other groups, where was induced periodontitis with the ligation placing in 1s lower molars; creating in this way 4 groups: control group without ligation (CTL); control group with ligation (CTL Lig); group MSG without ligation (MSG); group MSG with ligation (MSG Lig). After 100 days the rats were weighed and the naso-anal length was measured, so the index of Lee was determined and, then, the animals were sacrificed. Gingival tissue and abdominal aorta samples, as well as the hemi-jaws were withdrawn for immunological, morphological and radiographic analysis.

Results: The interleukin-6 concentration in gingival tissue was significant in CTL Lig group, being that the Tumor Necrosis Factor-alpha concentration in the abdominal aorta is higher in groups with experimental periodontitis ($p < 0.05$). Both the x-ray analysis as the histology showed a lower alveolar bone loss in the MSG Lig, group when compared to the CTL Lig group ($p < 0.05$). In the abdominal aorta morphometric analysis there was statistically significant

difference in the measurement of the artery wall diameter, being the largest diameter observed in the MSG Lig group ($p < 0.05$).

Conclusion: Therefore, this study suggests that the periodontitis in association with the hypothalamic obesity may contribute to the increase of the width of the abdominal aorta walls, as well as the hypothalamic obesity may exert a protective effect on alveolar bone loss.

INTRODUCTION

Obesity has reached epidemic worldwide proportions (1-3). It is a medical disorder characterized by an excess of weight and their consequences for health vary from increased premature death risk to serious non-lethal diseases, but debilitating that directly affect the life quality of these individuals (4-6).

For better understanding the role of each components involved in the obesity pathophysiology, researchers make use of animal experimental models, that can determine in a controlled manner the role of obesity components (7).

Between the neural models, the hypothalamic obesity is the most well-known, a model that mimics the clinical metabolic syndrome situation labeled as neuroendocrine obesity (8). In rats that obesity can be achieved by subcutaneous monosodium glutamate administration (MSG), an injurious neural excitatory amino acid that affects the central nervous system, when in excessive quantities, because it damages cores belonging to the hypothalamus, in other words, it provokes changes in hypothalamic-pituitary axis (8).

Another disease that affects a major proportion of the population is periodontitis, its polymicrobial nature orchestra a complex mechanism of inflammation that is characterized by collagen fibers destruction, others matrix constituents of the periodontal ligament and alveolar bone, in conjunction with the periodontal pockets formation (9-11).

It is mainly caused by bacteria that release endotoxins that activate proinflammatory cytokines (interleukin 1, IL-1; tumor necrosis factor-alpha (TNF- α ; among others) that affect the teeth's supporting tissue(12-16). It is suggested that obesity contributes effectively to the periodontal disease severity (17-21).

The pro-inflammatory cytokines concentration increase in the plasma could justify the relationship between obesity and periodontal disease (15). Obesity may increase the individual susceptibility by modulating the immune system and inflammation, increasing the cytokines release, activating macrophages and thus increasing the risk for periodontitis (22).

It's reasonable to believe that the systemic inflammation induced by periodontal pathogens may be associated with endothelial dysfunction and atherosclerosis 22 first in the small vessels, and later in larger arteries, such as the coronary arteries (23). The increase in production of accession mediators leads to an increase in the permeability of the intimal layer and initial formation of atheroma (24)

The enthusiasm for this relationship between cardiovascular disease and periodontal disease arose from the assumption that the periodontitis, initiated by the accumulation of bacteria and perpetuated by an immune response, may contribute to a systemic inflammation linked to atherogenesis (25).

Although is suggested that there is an association between oral health and cardiovascular disease, a causal link has not been proven and the biological mechanisms involved still remain obscure (26). Thus, the present study was proposed to evaluate the behavior of periodontal tissues and abdominal aorta artery in rats with hypothalamic obesity associated with experimental periodontitis.

METODOLOGY

Animals

Pregnant Rats were obtained from Central Animal Lab of the University of the West of Parana, Cascavel Campus, and maintained in the Laboratory Sector of the Laboratory of Human Physiology under controlled conditions of temperature (21 ± 2 degrees) and light (12-hour cycle of c &Light clustered dither and 12 hours of darkness - 7:00 - 19:00 h). At birth, the pups were separated by sex and only 7 males for each brood, making a total of 28 animals. Later these animals were weaned at 21 days and received a standard diet and water ad libitum throughout the experimental period. All experimental

protocols were approved by the UNIOESTE's Ethics Committee for Animal Experimentation and Practical Classes (CEEAAP).

Obesity Induction

The animals were divided into 2 groups, with 14 rats each one and then submitted, during the first five days of life, to intradermal injections, in the cervical region, of monosodium glutamate at a dose of 4g/kg of body weight (group MSG) or saline at a dose 1.25 g/kg of body weight (CTL) (27).

Periodontal Disease Induction

At 70 days of life the animals from MSG and CTL groups were subdivided into two groups of 7 animals each, these animals received 23 a ligature of cotton (Coats Corrente Ltda., SP, Brazil) around the first molars in a position sub marginal to induce experimental periodontitis, in accordance with the methods proposed by Nassar et al. (2009) (28)

The anesthesia was induced by intramuscular administration of 0.08 ml/100 g body weight of ketamine (Francotar, Virbac Brazil Ind. AND With. Ltda., Sao Paulo, SP, Brazil) 0.04ml/100 g body weight of xylazine (Virbac Brazil Ind. and With. Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil). After this procedure, 4 groups were created (n= 7): control without ligation (CTL), control with ligation (CTL Lig), obese without ligation (MSG) and obese with ligation (MSG Lig). This ligation acted as irritating gum for 30 days and favored the accumulation of plaque (28).

Obesity avaluation

After 100 days of life, the animals were weighed and was obtained the naso-anal length for calculation of the index of Lee (cube root of body weight (g) / length naso-anal (cm) X 100) (29).

Obtaining samples

After 100 days of the total time of the experiment, the rats of all groups were subjected to a fasting for 8 hours prior to sacrifice, being provided water ad libitum.

The animals were desensitized with carbon dioxide and then the sacrifice made by decapitation. After the sacrifice, blood samples were collected and centrifuged at 300xg for 15 min at 4 C and stored in a freezer at -80 °C, for output of the triglycerides and total cholesterol analysis using commercial kits

according to the manufacturer's instructions (Conjugate (Laborclin®, Bioliquid, PR, BR).

The periodontal tissues samples of the right side hemi-jaw and aorta for analyzes were reduced and pre-fixed in metacarn (70% methanol, 20% chloroform and 10% glacial acetic acid) with constant drips, during the reduction.

In left side hemi-jaw, the gum which involved the tooth, affected by experimental periodontitis, was removed and, as well as a portion of the abdominal aorta, were allocated in ependorfs and stored in freezer - 80C, and subsequently, the left hemi-jaw was dissected and fixed in 10% formalin for subsequent x-ray analysis . 24 .

Analysis of the Interleukin 6 and Tumor Necrosis factor alpha Expression

Samples of gingival tissue around the teeth of left hemi-jaws and animals abdominal aorta of all experimental groups, were removed and used for the analysis, by Linked Immunosorbent Assay Coupled to Enzymes (ELISA - INVITROGEN® - Waltham, Massachusetts, USA) for the cytokines interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha presence respectively.

Total proteins were extracted from samples of gingival tissue of the animals and abdominal aorta using an extraction buffer total base of detergent containing a protease inhibitor cocktail. After this, was performed protein quantification by the Bradford method.

Radiographic Analysis

Soon after the sacrifice, the left hemi-jaw of each animal was removed, fixed in buffered formalin (pH 7.2) for 48 hours. The hemi-jaws were placed with the lingual side on the radiographic film periapical (AGFA REDEMPTUS®, Ultraspeed disc - Agfa Gevaert N. V. , Belgium) and positioned so that the buccal and lingual leaflets of first molars fell in the same vertical plane.

The X-ray equipment used was the GE 1000® (General Electric Co, Milwaukee, WI, USA), set to 15mA, 65Vp, 18 pulses, distance focus/film of 50 centimeters with perpendicular incidence of X-ray to parts. For films processing were used developer and fixer Kodak® (Kodak Amazon's Industry and Trade Ltda, Manaus, Amazon, Brazil) in its processing time/temperature and digitalized by a "scanner" to devices (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid, Sao Paulo, Brazil).

The scanned images were analyzed using 3 measures in the Image Tools 3.0 program (The University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) and made the average between them, by means of a linear measure, that has traveled the distance from junction cement-enamel up to the mesial side crest alveolar bone of the lower first left molar of the mouse, with measurements in pixels(30).

Histological Processing

The right hemi-jaws were decalcified with trichloroacetic acid (TCA) 5 %, 10 °C for 27 days. The pieces were evaluated to assess the expected degree of descaling, with renewal of the solution of 25 TCA every 5 days.

After descaling, tissues were immersed in sodium sulphate 5% during approximately 2 hours to neutralize the TCA, washed in water for two hours, kept in 70% alcohol until the histological processing for inclusion in paraffin (Purified Paraffin, code 1228, lot 1008459, Vetec Fine Chemistry, Rio de Janeiro, Brazil)

The fragments of the abdominal aorta after withdrawals from metacarn were kept in 70% alcohol until the histological processing. The fragments of hemi-jaws and abdominal aortas were dehydrated in series ascending alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin.

The paraffin blocks were cut in manual microtome (Olympus, CUT 4055 - Charleston, South Carolina, USA) to obtain sections of 7µm thickness, which were assembled in histological slides and stained with Hematoxylin and Eosin (HE).

Microscopic Observation

The microscopic analysis was performed by a single examiner through the evaluation of the histological sections stained with HE. The slides were analyzed with the aid of a light microscope transmitted commonly (Leica Microsystems, Switzerland) for morphological observations of gingiva and alveolar process hemi-jaws of rats of all experimental groups.

Bone Morphometry

After obtaining the histological slides was performed the osteocytes, osteoblasts and osteoclasts quantification present in five consecutive fields of vestibular alveolar bone crest starting from the highest point of the crest. For the observation was used the increase of 400 times under the microscope. Were

made two observations per field, and then done the average of the values for each animal and each group.

The measure of alveolar bone crest was performed through a microscope coupled to a computer, which allows capturing images, through the Laz Ez® software program (accounting System and capture LAS V4.2 Leica microsystems). There was a measurement of the smallest distance between the apex of vestibular alveolar bone crest and the cement-enamel junction. The measurements were repeated twice a day, on three different days, and then was made the average between the values.

Morphometric Analysis of the Abdominal Aorta

The aorta is an elastic artery that originates in the heart and goes to the abdominal region. It is divided into ascending aorta (region that communicates with left ventricle); aortic arch; descending aorta - in this region is called thoracic aorta and finally, abdominal aorta, this starts at the level of the 12TH thoracic vertebra and ends at the height of the 4th lumbar vertebra

The arteries are composed of three layers, the outer most call adventitia or external, formed mainly by connective tissue; intermediate is the middle layer or muscular, formed of elastin, collagen and smooth muscle cells.

The innermost layer is known as intimate and formed by a thin layer of endothelial cells, some fibroblasts and macrophages, this layer is the region of interest in atherosclerosis, maintains direct contact with the blood flow and when there is endothelial dysfunction is in this region that results in the formation of atherosclerotic plaque. (Figure 1A and B).

After obtaining the histological slides of the animal's abdominal aorta, a linear measure of the widths of the walls'artery was performed through a microscope coupled to a computer, which allow capturing images, through the Laz Ez® software program (accounting System and capture LAS V4.2 Leica microsystems).

A measurement of the smallest distance between the layers of the artery walls was then realized. The measurements were repeated twice a day, on three different days, and then, the average between the values was made.

For the statistical analysis, all numerical values were expressed as mean standard deviation. In a first moment, through the Bioestat 5.3 program (Institute Mamiraua, Amazonas, Brazil), was carried out the Shapiro-Wilk test to

evaluate the distribution of the data normality. After checking the data normality, were made the ANOVA test and consequently the Tukey test with $p < 0.05$ to assess the difference between the groups.

RESULTS

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

The administration of MSG caused an increase in the index of Lee when compared treated groups with non-treated ($p < 0.05$), this 27 difference was not observed when compared to the obese groups ($p > 0.05$). The animals treated with neonatal MSG shown a significant decrease in body weight of rats ($p < 0.05$) (Table 1).

Plasma concentrations of total cholesterol and triglycerides.

The results show that groups with obesity had a significant increase in the concentrations of triglycerides and total cholesterol ($p < 0.05$), suggesting an effect of obesity induced on these analyzed parameters. (Table 2)

Analysis of the IL-6 presence in gingival tissue

The results show that the mean IL-6 concentration was significantly higher in the CTL Lig group when compared with the other groups ($p < 0.05$), in other words, there was a significant increase of this cytokine. (Table 3)

Analysis for the presence of TNF- α in the samples in the tissue of the abdominal aorta

The TNF- α mean concentration was greater in the CTL Lig group ($p < 0.05$). Furthermore when the groups with ligation were compared with the groups that did not have the ligature-induced, the results showed a significant increase of this cytokine in the abdominal aorta ($p < 0.05$). (Table 4)

Radiographic analysis of the average distance from cement-enamel junction until the alveolar bone crest of the left lower first molar.

In radiographic analysis, it was found that there was a decrease of insertion in animals exposed to experimental periodontitis ($p < 0.05$), demonstrating the effectiveness periodontal disease induction on alveolar bone tissue, but in CTL group Lig this loss was more pronounced than MSG Lig. (Table 5)

Right Hemy-jaw Histological Analysis

Control Group

In the histological evaluation of CTL group, it was possible to observe the normal oral epithelia, junctional, sulcular and connective tissue, without observation of inflammatory aspect on these tissues. The alveolar bone was intact, compact and regular, with a normal appearance of cancellous central bone.

The bone crests were thick and high (the cervical third of the root), data obtained by measuring the distance between enamel-cementum junction and bone crest. The presence of osteoblast and osteoclast was also observed indicating the resorption and bone formation, but within the normal range. Cementoenamel junction, cementum and periodontal ligament showed normal characteristics. (Figure 2.A)

Ligation Control Group

In CTL Lig, group we noticed the abnormality on the morphology of oral epithelia, junctional, sulcular, with migration to the apical region and connective tissue with predominance of acute inflammatory state (Figure 2.B). The bone crest presented an irregular manner, with extensive alveolar bone loss, causing the exposure of the cervical third of the root, with strong presence of osteoclast revealing the activity of bone resorption. We also observed changes in cementum and periodontal ligament.

MSG group

After the monosodium glutamate treatment, the MSG group continued showing regularity in morphological differentiation between the oral epithelia, junctional, sulcular and connective tissue without inflammatory aspect. The level of crest bone and the distance to the cement-enamel junction was similar to that found in CTL group. (Figure 2.C)

Ligation MSG Group

It has been observed in the MSG Lig group a small irregularity in oral epithelia, junctional and sulcular, with connective tissue presenting inflammatory aspect. The bone crest, although it is at a time close to the level of cervical root, shows irregularities, with bone loss less pronounced than that observed in the CTL Lig. group. There was an increased osteoclast presence in relation to MSG

group, revealing the activity of bone resorption. There are also observed changes in cementum and periodontal ligament (Figure 2.D).

We can notice in figure 3, the bone crest region, in (A) CTL group presence of osteoblasts in the periphery of the bone, forming an epithelium, and presence of osteocytes in the central region of the bone. The same is observed in (C) MSG group. (B) CTL Lig group already noticed the presence of osteoclastic areas indicating evidence of bone resorption. The same is repeated in (D) MSG group, with presence of incremental lines observed in all images.

Right Hemyjaw morphometric Analysis

The administration of MSG caused statistical difference as regards the number of osteoblasts when compared groups CTL with MSG ($p < 0.05$), there was no statistical difference in the count of osteocytes ($p > 0.05$) and in relation to osteoclasts this difference was significant between the groups with ligation ($p < 0.05$) (table 6).

Abdominal aorta morphometric analysis

The average walls arteries width showed a significant difference in all the groups, and the CTL group showed the lowest thickness, and the MSG Lig group presented a greater wall thickness ($p < 0.05$) (table 7).

DISCUSSION

The MSG neonatal treatment induces obesity through injury of neural cells of the arcuate nucleus and hypothalamus medium eminence (5, 31- 32). The MSG administration caused an increase in the index of Lee of obese groups (table 1), with a significant difference between the treated groups, but there was no difference between the MSG groups, this variable is evident in this model of obesity due to this treatment could result in numerous endocrine abnormalities and behavioral, such as disturbances of growth, production of glucocorticoids, obesity and hypogonadism (4).

However the lower final weight of rats treated with MSG, also shown in table 1, can probably be attributed to the smaller size of these 30 animals, since between the endocrine abnormalities described in this model is the reduction in the secretion of growth hormone (8) In relation to the lipid profile, this study

presents concentrations of total cholesterol and triglyceride levels increased in both obese groups when compared with the control groups (table 2).

High levels of triglycerides and total cholesterol has been found in individuals with periodontitis when compared with healthy patients, thus in addition to promote changes to levels of lipid metabolism, can also potentiate the classical factors for atherosclerosis (33).

However, this statement is still uncertain and currently there is no consensus within the Dentistry/Periodontics on these findings (34). In periodontitis, the microorganisms cell wall that colonize the plaque contains endotoxin, also known as lipopolysaccharide (LPS), which induce the inflammatory and immune response of the host.

These changes are associated with tissue inflammatory response and the periodontal attachment loss, whether relating to the aggregation and platelet adhesion and with the cholesterol levels elevation (35).

The results of these studies are contradictory, since an increase in the triglycerides levels and cholesterol was observed in obese groups, regardless of the presence or not of experimental periodontitis, suggesting that the periodontitis does not influence the increase in these parameters, corroborated by the study of Shridar et al., (36), which also failed to demonstrate the influence of periodontal disease in these parameters.

For many years it was believed that the adipose tissue was a dummy component for storage of triglycerides, without relevant metabolic functions. Today it is clear that the adipose tissue is a complex endocrine organ, metabolically active, which secrete more than fifty bioactive molecules. Some of them are classic cytokine of the inflammatory process such as TNF- α and IL-6.

The increase of these cytokines in the bloodstream can cause a subclinical inflammatory process, which interferes with other pre-existing inflammatory processes (37) (tables 3 and 4). The TNF- high concentration can exacerbate the pre-existing periodontitis through the fibroblasts stimulation which promote the enzymes synthesis and by osteoclasts stimulation that activate bone resorption (15).

Nevertheless, the pro inflammatory cytokines levels are proportional to BMI, particularly in individuals with visceral obesity, so that an increase in fat mass can induce a hiper inflammatory response in periodontal disease. Obesity

can affect the immune and vascular response of the host due to the decrease in blood flow (38).

The periodontitis is directly involved in the cardiovascular disease pathogenesis, both because of the oral bacteria, and because the response of the host, because it can release cytokines (IL-6, TNF- α) that can initiate a cascade of biochemical reactions and endothelial damage and facilitate the fixing of cholesterol plaques (39).

Both inflammatory markers were increased in the present study (tables 3 and 4). Our results showed a loss of sharp bone in groups with induced periodontitis, this difference was more significant in CTL Lig group (table 5).

The current literature demonstrates a relationship between obesity and periodontitis, in which the insertion loss is greater in obese groups, a situation that can vary with the time of exposure of the animal to diet or the type of obesity experimental model (40).

Studies in cell culture of fat in obese rats, shows a significant increase in the release of TNF- α when compared with not obese rats. The large amount of pro-inflammatory cytokines affects tissues that support the teeth and can lead to loss of alveolar bone, cementum and periodontal ligament, thus influence and contribute effectively to the periodontitis increase or its progression.

Nascimento et al. , (40) conducted a study in which the animals were submitted to cafeteria diet and showed significant difference in bone loss between the groups, being that the ligated groups lost more alveolar bone than their counterparts.

In the other hand Brandelero et al. (33) demonstrated that through hypothalamic obesity, you can have an opposite and protector effect when periodontitis is induced. In this study, in which the model of obesity was the induction through MSG also showed a smaller alveolar bone loss in MSG Lig group when compared with the CTL Lig group (tables 5 and 6).

Obesity can have beneficial factors facing the bone resorption, as demonstrated by Brandelero et al. (33) who observed a protective effect of hypothalamic obesity on the alveolar bone loss. Yet, despite the mechanism by which obesity may promote bone formation is still unknown, hypotheses have been proposed, through the 32 note that in obese patients, with a high body weight, can establish a greater mechanical load on the bone (41-43).

The increased mechanical load would promote some stimuli on the skeleton, such as reduction of apoptosis, increased osteoblast differentiation and bone matrix stimulation (44).

Others evidences show that leptin, a hormone secreted by adipose tissue, is capable of stimulating the differentiation of bone marrow stromal cells into osteoblasts, leading to an increase in extracellular matrix mineralization (45-46). In addition, leptin can reduce the expression of receptor activator of nuclear factor κ B (RANK), stimulate the expression of proteasome (EPG), inhibit the differentiation of osteoclasts, leading to a reduced bone and favoring of bone formation (47-48).

However leptin can also negatively affect the bone metabolism of animals subjected to a diet with a high fat content (40). Obesity can act on the bone tissue, through the high amount of infiltrated macrophages in adipose tissue. Such cells are considerable sources of proinflammatory cytokines, which in turn, can stimulate bone resorption (49-50).

In our study, we also observed a significant difference in the width of the abdominal aorta walls, corroborating with other studies that have suggested that vascular remodeling is an early event in atherogenesis, appearing before the inflammatory response and may be connected with the cardiovascular events incidence (51-52).

Pathologically, the atherosclerosis occurs due to an endothelial injury, changing the permeability of the vascular endothelium of the intimal layer, allowing the entry of lipids and inflammatory cells in this range inter endothelial.

Normally, happens low-density lipoproteins (LDL) deposition in endothelial cells. These electronegative charge are hydrolysed in phospholipids, triglycerides, proteins and cholesterol. After hydrolysis, some receptors are expressed in the cell membrane and other products are used during the cellular membrane restoration, as is the case of the cholesterol

In the presence of hypercholesterolemia or situations that aggravate the deposition of LDL, occurs greater consumption of nitric oxide (N) in the endothelial cell and increased production of free radicals, causing a dysfunction in the metabolism of fatty acids, of 33 apoproteins, lecithin and protein G.

The final result is the inability of the endothelium to respond adequately to systematic attacks (53-54). The association between periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease has presented some hypotheses:

1) Inflammatory process causes endothelial damage due to the pro-inflammatory cytokines release; 2) presence of infectious agents can induce or accelerate atherosclerosis such as: promoting the local lymphocytes, macrophages increase, growth factors tissue production; endotoxin local release (LPS) and molecular mimicry of microbial protein with the human inducing an autoimmune reaction.

3) Systemic cytokine increase with inflammatory markers activation and procoagulants stimulation and may cause thrombosis and acute ischemia, in addition to induction of changes in lipoproteins resulting in pre-atherosclerotic conditions (55). Our study corroborates these assumptions, because the results in table 7 show an increase in width of the abdominal aorta walls, in the groups that experimental periodontitis is present, as well as with a larger width when associated with obesity (MSG Lig).

In conclusion, although the mechanisms of influence of periodontitis on obesity and atherosclerosis are not elucidated, and there is no agreement on this association, this study showed significant differences in the parameters evaluated. Therefore, it is suggested that the periodontitis in association with the hypothalamic obesity may contribute to the width of the abdominal aorta walls, as well as the hypothalamic obesity may exert a protective effect on alveolar bone loss.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank CAPES and the State University of West Parana (UNIOESTE) for the financial support. We also thank the Metabolism and Endocrine Physiology and Cell Biology Laboratories from the West of Parana State University (UNIOESTE). The authors are extremely grateful to Celeste da Rocha Paiva, Cell Biology Laboratory technical, by technical assistance in carrying out this study.

REFERENCES

1. Deitel, M. Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people. *Obes Surg* 2003; **13**(3):329-330.
2. James PT, Rigby N, Leach R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2004; **11**(1):3-8.
3. Buduneli N, Biyikoglu B, Ilgenli T, Buduneli E, Nalbantsoy A, Saraç F, Kinane DF. Is obesity of periodontal disease as a chronic inflammatory process? a case-control study. *J Periodontal Res* 2014; **49**:465-471.
4. Cunha NV, Abreu AS, Panis C, Grassioli S, Guarnier FA, Cecchini, R, Mazzuco, TL, Pinge-Filho P, Martins-Pinge MC. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate- induce obese rats. *Life Sciences* 2010; **87**:375-381.
5. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, Bonfleur ML, Gravena C, Brito MM, Andreazzi AE, Mathias PCF, Torrezan R. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine* 2007; **31**(2):142-148.
6. Pereira LO, Francischi RP, Lancha Jr AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência a insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003; **47**(2):111-127.
7. Cesaretti ML, Kohlmann Jr, O. Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; **50**(2):190-197.
8. Voltera AF, Cesaretti MLR, Ginoza M, Kohlmann Jr O. Efeito da indução da obesidade neuroendócrina sobre a hemodinâmica sistêmica e a função ventricular esquerda de ratos normotensos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008; **52**(1):47-54.
9. Sakalauskiene J, Giedrimiene D, Kubilius R, Gleiznys A, Vitkauskiene A, Ivanauskiene E, Puskunigyte K. Cytokine production by leukocytes in patients with periodontitis. *Cent Eur J Med* 2014; **9**(6)821-829.
10. Rivera MF, Lee JY, Aneja M, Goswami V, Liu L, Velsko IM, Chukkapalli SS, Bhattacharyya I, Chen H, Lucas AR. Polimicrobial infection with major periodontal pathogens induced periodontal disease and aortic

- atherosclerosis in hyperlipidemic apoe null mice. Plos one 2013; **8**(2):1-10.
11. Cotti E, Dessi C, Piras A, Mercurio G. Can a chronic dental infection be considered a cause of cardiovascular disease? a review of the literature. Int J Cardiol 2011; **148**(1):4-10.
 12. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Kales A, Tyson K, Chrousos GP. Elevation of plasma cytokines in disorders of excessive daytime sleepiness: role of sleep disturbance and obesity. J Clin Endocrinol Metab 1977; **82**:1313-1316.
 13. Orban Z, Remaley AT, Sampson M, Trajanoski Z, Chrousos GP. The differential effect of food intake and beta-adrenergic stimulation on adipose-derived hormones and cytokines in man. J Clin Endocrinol Metab 1999; **84**:2126-2133.
 14. Nishimura F, Murayama Y. Periodontal inflammation and insulin resistance – lessons from obesity. J Dent Res 2001; **80**(8):1690-1694.
 15. Bastos AA, Falcão CB, Pereira ALA, Pereira AFV. Obesidade e doença periodontal. Pesq Bras Odontoped Clin Integr 2005; **5**:275-279.
 16. Yakob M, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Söder PO, Söder B. C-reactive protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis. Clin Oral Inv 2012; **16**:259-265.
 17. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1977; **43**:707-719.
 18. Lösche W. et al. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. J Clin Periodontol 2000; **27**:537-541.
 19. Iacopino AM. Periodontitis and diabetes interrelationships: role of inflammation. Ann Periodontol 2001; **6**:125-137.
 20. Saito T, Murakami M, Shimazaki Y, Oobayashi K, Matsumoto S, Koga T. Association between alveolar bone loss and elevated serum c-reactive protein in Japanese men. J Periodontol 2003; **74**:1741-1746.
 21. Al-zahrani MS, Bissada NF, Borawski EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-age, and older adults. J Periodontol 2003; **7**:610-615.

22. Moura Foz A et al. Periodontal therapy and biomarkers related to cardiovascular risk. *Minerva Stomatol* 2010; **59**(5):271-83.
23. Zadik Y, Bechor R, Galor S, Justo D, Heruti RJ. Erectile dysfunction might be associated with chronic periodontal disease: two ends of the cardiovascular spectrum. *J Sex Med* 2009; **6**:1111–6.
24. D'aiuto F, Orlandi M, Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and cvd outcomes. *J Clin Periodontol* 2013; **40**(14):85-105.
25. Vaishnava P, Narayan R, Fuster V. Understanding systemic inflammation, oral hygiene, and cardiovascular disease. *Am J Med* 2011; **124**(11):997-999.
26. Holmlund A, Hedin M, Pussinen PJ, Lerner UH, Lind L. *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2011; **148**:148-153.
27. Balbo SL, Mathias PC, Bonfleur ML, Alves HF, Siroti FJ, Monteiro OG, Ribeiro FB, Souza AC. Vagotomy influence of apolipoprotein e on c-reactive protein (crp) concentration in obese adults. potential anti-inflammatory role of apoe in vivo. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; **25**(12):1752-61.
28. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN, Spolidorio DM, Rossa C Jr, Spolidorio LC. Simvastatin therapy in cyclosporine a-induced alveolar bone loss in rats. *J Periodontal Res* 2009; **44**:479-88.
29. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; **40**:527-528
30. Nassar CA, Battistetti GD, Nahsan FP, Olegário J, Marconato J, Marin CF, Faccioni DM, da Costa KF, Kottwitz LB, Nassar PO . Evaluation of the effect of simvastatin on the progression of alveolar bone loss in experimental periodontitis-an animal study. *J Int Acad Periodontol* 2014; **6**(1):2-7.
31. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, Aburada M, Myaamoto K. Type 2 diabetes mellitus in obese mouse

- model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim* 2006; **55**(2):109-115.
32. Brandelero Jr S, Bonfleur ML, Ribeiro RA, Vanzela EC, Nassar CA, Nassar PO, Balbo SL. Decreased tnf- α gene expression in periodontal ligature in msg obese rats: a possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease? *Arch Oral Biol* 2012; **57**(3):300-306.
33. Veira CLZ. Relação entre doenças periodontais e aterosclerose subclínica em indivíduos com hipercolesterolemia familiar. São Paulo, SP: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008. Tese.
34. Tonetti MS, Van Dyke TE. Working group 1 of the joint efp/aapw. periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the joint efp/aap workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Clin Periodontol* 2013; **40**:24-29.
35. Bertolini PFR, Biondi Filho O, Pomilio A, Alves PEV. Doença periodontal e obesidade: existe alguma relação? Periodontal disease and obesity: there is a relationship? *Rev Ciênc Méd* 2010; **19**(1-6):65-72.
36. Sridhar R, Byakod G, Pudakalkatti P, Patil R. A study to evaluate the relationship between periodontitis, cardiovascular disease and serum lipid levels. *Int J Dent Hyg* 2009; **7**:144-150.
37. Souza AB, chambrone L, Okawa RTP, Silva CO, Araújo MG. A obesidade como fator de risco para doença periodontal: revisão de literatura. *Rev Dental Press Periodontia ImplantoL* 2010; **4**(3):74-82
38. Haffajee, AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and tannerella forsythia. *J Clin Periodontol* 2008; **36**:89-99.
39. Araújo Jr RF, Souza TO, Medeiros CAX, Souza LB, Freitas ML, Lucena HF, Alves MSCF, Araújo AA. Carvedilol decrease il-1 β and tnf- α , inhibits mmp-2, mmp-9, cox-2, and rankl expression, and up-regulates opg in a rat model of periodontitis. *Plos One*. 2013; **8**(7):1-6.
40. Nascimento CM, Cassol T, Silva FS, Bonfleur ML, Nassar CA, Nassar PO. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2013; **6**:365–370.

41. Silva HG, Mendonça FL, Zahar SEV, Farias ML. Influence of obesity on bone density in post menopausal women. *Braz Arc Endocrinol Metab* 2007. **51**(6):943-949.
42. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, Nakamaru Y, Hiroi E, Hiura K, Kameda A, Yang NN, Hakeda Y, Kumegawa M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med* 1997; **186**(4):489-495.
43. Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; **92**(5):1640-1646.
44. Ehrlich PJ, Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporosis Int* 2002; **13**(9):688-700.
45. Bandeira FA. A obesidade realmente fortalece os ossos? *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; **51**(6):895-897.
46. Prouteau S, Benhamou L, Courteix D. Relationships between serum leptin and bone markers during stable weight reduction and weight regain in male and female judoists. *Eur J Endocrinol* 2006; **154**(3):389-395.
47. Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, Myers DE, Hodge JM, Malakellis M, Gough TJ, Collier GR, Nicholson GC. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002; **17**(2):200-209.
48. Reid IR. Relationships among body mass, its components, and bone. *Bone* 2002; **31**(5):547-555.
49. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinol* 2001; **142**(12):5050-5055.
50. Raska O, Bernaskova K, Raska Jr I. Bone metabolism: a note on the significance of mouse model. *Physiol Res* 2009; **58**(4):459-471.
51. Dantas AP, Onetti Y, Oliveira MA, Carvalho MH, Heras M, Vila E, Altayó FJ. Western diet consumption promotes vascular remodeling in non-senescent mice consistent with accelerated senescence, but does not modify vascular morphology in senescent one. *Exp Gerontol* 2013; **48**:1410-1419.

52. Onetti Y, Altayó FJ, Heras M, Vila E, Dantas AP. Western-type diet induces senescence, modifies vascular function in non-senescent mice triggers adaptive mechanisms in senescent one. *Exp Gerontol* 2013; **48**:1410-1419.
53. Toregeani JF, Nassar CA, Toregeani KM, Nassar PO. Periodontal disease and atherosclerosis. *J. Vasc Bras* 2014; **4**:2008-2016
54. Ekuni D, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Mizutani S, Kojima A, Morita M. hydrogen-rich water prevents lipid deposition in the descending aorta in a rat periodontitis model. *Arc Oral Biol* 2012; **57**:1615-1622.
55. Batista RM, Zandonade E, Roelke LH, Emmerich AO, Rosetti EP, Molina MCB, Santos Neto ET. Associação entre doença periodontal e aterosclerose subclínica: uma revisão sistemática *J Vasc Bras* 2011; **10**(3): 229-238.

APPENDIX A:

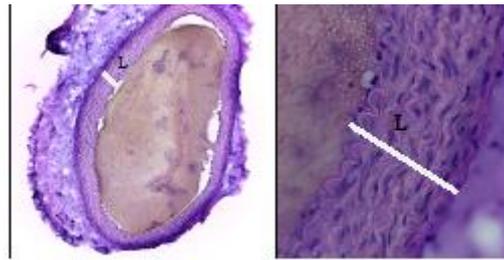


Figure 1: Representative photomicrographs of measures the widths of walls of abdominal aortas arteries in CTL (A), CLTLig (B), MSG (C) and MSGLig (D). A: increase of 40X ; B: increase of 400X (Hematoxylin and Eosin) animal groups.

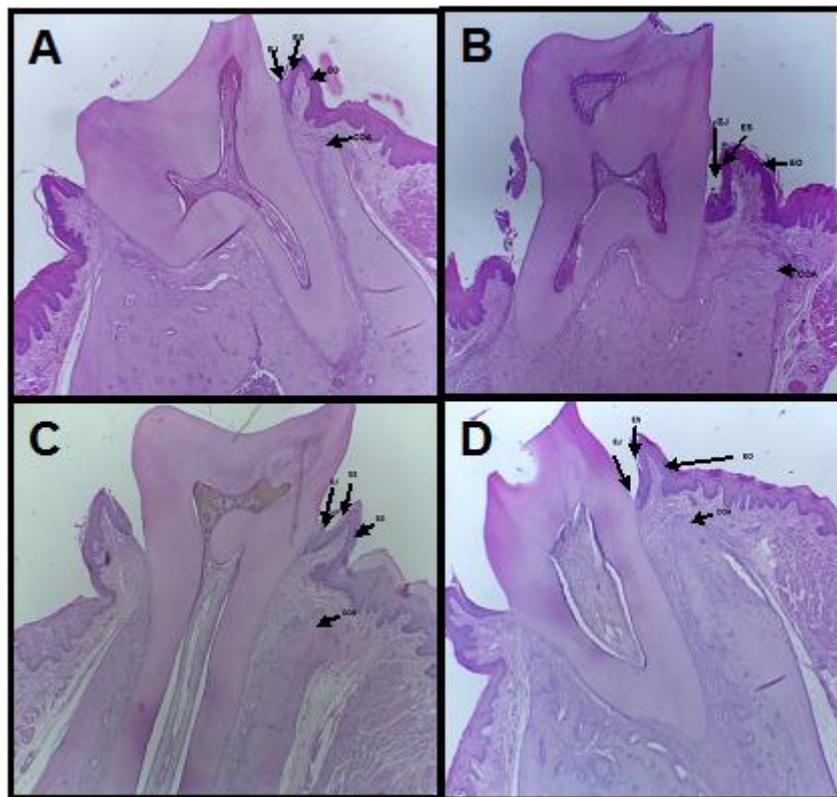


Figura 2: Representative photomicrography of an animal in the CTL group. COA, alveolar bone crest; EJ, junctional epithelium; EO, oral epithelium; ES, groove epithelium (A); Representative photomicrography of An Animal of CTLLig group. COA, alveolar bone crest; EJ, junctional epithelium; EO, oral epithelium; ES, groove epithelium (B); Representative Photomicrography of an animal in MSG group\ . COA, alveolar bone crest; EJ, junctional epithelium; EO, oral epithelium; ES, groove epithelium (C); Representative photomicrography of an animal of MSGLig group. COA, alveolar bone; EJ crest, junctional epithelium; EO, oral epithelium; ES, sulcular epithelium (D) (Hematoxylin and Eosin, 40X).

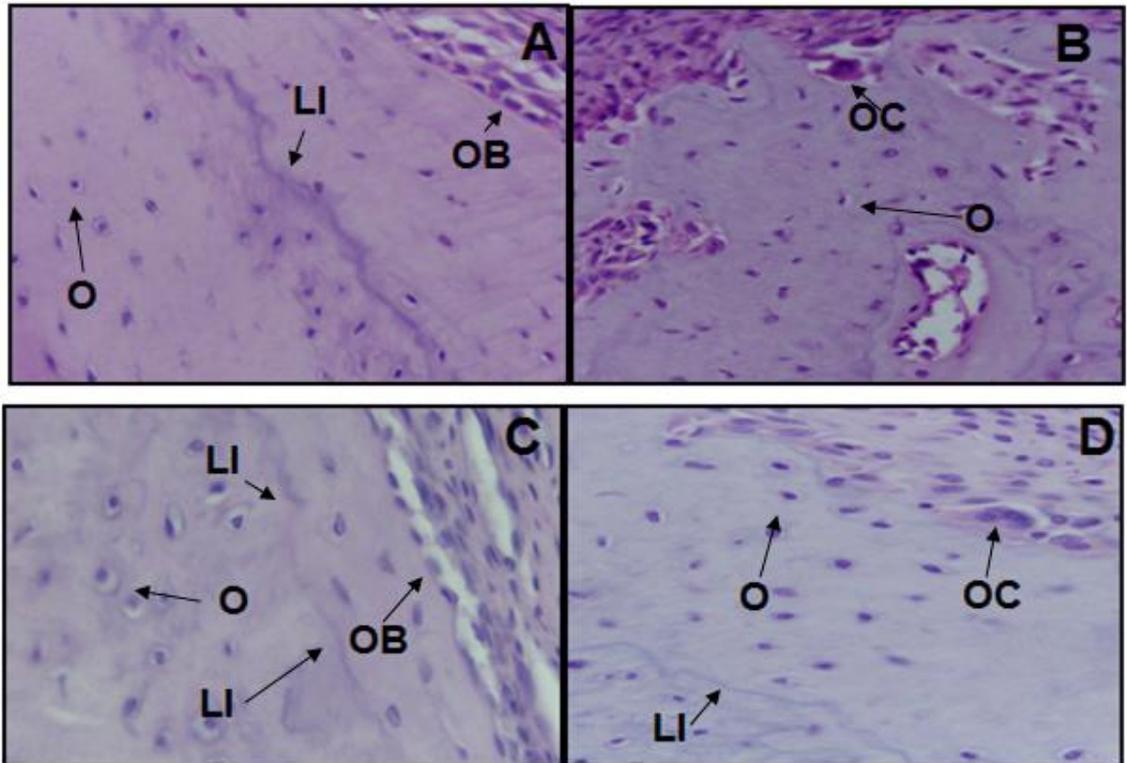


Figure 3: representative Photomicrographs of animals in CTL (A), CTLLig (B), MSG (C) and MSG Lig (D) groups. The osteocyte; OB, osteoblast; OC, osteoclast; LI, incremental lines (Hematoxylin and Eosin, 400X)

APPENDIX B:

Table 1: neonatal treatment effect with MSG on body parameters of CTL, CTLLig, MSG and MSGLig rats. The values represent mean standard deviation.

	CTL	CTLLig	MSG	MSGLig
Lee Index (g/cm)	0,327±0.001A	0,355±0,001B	0,366±0,002C	0,369±0,002C
Animals Final Weight (g)	385,57±29,28A	356,14±17,07A	251,81±61,83B	223,16±23,68B

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

Table 2: total cholesterol and triglycerides concentration in the rat's blood in the experimental groups. The values represent mean standard deviation and are expressed in mg/dL..

	Total Cholesterol	Triglycerides
CTL	91,15 ± 6,07 A	150,5 ± 29,0 A
CTLLIG	79,48 ± 6,02 A	158,8 ± 30,4 A
MSG	127,78 ± 2,38 B	292,5 ± 65,5 B
MSGLIG	134,85 ± 3,05 B	352,6 ± 81,2 B

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

Table 3: IL-6 concentration in rats gingival samples of experimental groups . The values represent mean standard deviation and are expressed in pg/mL.

Groups	Means
CTL	9,75 ± 2,70 A
CTLLig	15,33 ± 1,50 B
MSG	7,78 ± 3,19 A
MSGLig	12,78 ± 1,03 C

Different Letters, mean that the data are statistically different at $p < 0.05$.

Table 4: TNF-alpha Concentration of the abdominal aorta of rats in the experimental groups. The values represent mean standard deviation and are expressed in pg/mL.

Groups	Means
CTL	42,57 ± 9,0 A
CTLLig	107,58 ± 8,45 B
MSG	56,39 ± 12,3 A
MSGLig	83,20 ± 6,15 C

Different Letters, mean that the data are statistically different at $p < 0.05$.

Table 5: x-ray analysis of distance from enamel –cement junction until the alveolar bone crest of the left lower first molar mesial side of experimental groups rats. The values represent mean standard deviation and are expressed in pixels.

Groups	Means
CTL	64,46 ± 1,01 A
CTLLig	80,62 ± 3,95 B
MSG	62,03 ± 0,84 A
MSGLig	71,00 ± 0,56 C

Different Letters, mean that the data are statistically different at $p < 0.05$.

Table 6: Morphometric Analysis of right hemi-jaw of rats in the osteocytes, osteoblasts and osteoclasts in the experimental groups for quantification of osteocytes, osteoblasts and osteoclasts and measuring the distance from the crest alveolar bone to splice cementsmaste (JCE-Crest). The values represent mean standard deviation and are expressed in units for the osteoblast and osteocyte and osteoclast and expressed in pixels for JCE-Crest.

	Osteoblast	Osteocyte	Osteoclast	JCE -Crest
CTL	16,80±1,01 A	221,50±41,41A	2,00±0,81 A	1,26±0,01 A
CTLLig	14,71±0,60 A	206,57±86,13A	5,20±0,62B	2,32±0,06B
MSG	20,33±1,01 B	175,83±57,40A	1,50±0,25A	1,27±0,02A
MSGLig	20,66±0,80 B	149,00±45,40A	3,50±0,15B	1,37±0,04C

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

Table 7: Aorta abdominal morphometric analysis to measure rats artery walls in the experimental groups. The values represent mean standard deviation and are expressed in pixels.

Groups	Means
CTL	0,078 ± 0,001 A
CTLLig	0,085 ± 0,001 B
MSG	0,093 ± 0,004 C
MSGLig	0,104 ± 0,001 D

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

ANEXO C

Normas da revista científica

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Manuscript Submission Procedure](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#).

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

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

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

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

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

1. GENERAL

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

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

2. ETHICAL GUIDELINES

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

2.1. Authorship and Acknowledgements

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

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

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

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

2.2. Ethical Approvals

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

2.3 Photographs of People

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

2.4 Clinical Trials

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

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

2.5 Conflict of Interest and Source of Funding

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

2.6 Appeal of Decision

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

2.7. Permissions

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

2.8. Copyright

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

For authors signing the copyright transfer agreement

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

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

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

Creative Commons License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial - NoDerivs License OAA

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

hosted on Wiley Author Services http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

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

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

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

3.1. Getting Started

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

3.2. Submitting Your Manuscript

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

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc/.docx) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-

resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, figure legends and tables but *no* embedded figures. Figure tags should be included in the file. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

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

3.5. Suggest a Reviewer

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

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

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

3.7. Email Confirmation of Submission

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

3.8. Manuscript Status

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

3.9. Submission of Revised Manuscripts

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

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Articles: must describe significant and original experimental observations and provide sufficient detail so that the observations can be critically evaluated and, if necessary, repeated. Original articles must conform to the highest international standards in the field.

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

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

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

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

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 7 published pages are subject to a charge of GBP70 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. It is preferred that manuscript is professionally edited. A list of independent suppliers of editing services can be found

at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

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

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

It is strongly recommended that all abbreviations be introduced in the first paragraph in Materials and Methods. Alternatively, define each abbreviation and introduce it in parentheses the first time it is used; e.g., "Cultures were grown in Eagle minimal essential medium (MEM)." Generally, eliminate abbreviations that are not used at least three times in the text (including tables and figure legends).

5.3. Structure

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

Title Page: should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

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

Main Text of Original Research Articles

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

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

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

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

Main Text of Reviews, Short Communications and Meeting Reports

These need not follow the usual divisions.

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

5.4. References

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

We recommend the use of a tool such as [Reference Manager](#) for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

Examples:

(1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; 48: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; 125: 2402-2405.

(2) *Corporate author*

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

(3) *No author given*

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

(4) *Journal supplement*

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

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

(5) *Journal paginated by issue*

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

(6) *Personal author(s)*

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

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

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

(8) *Chapter in a book*

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

(9) *Published proceedings paper*

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

(10) *Agency publication*

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

(11) *Dissertation or thesis*

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

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

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

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

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

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

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

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

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

5.6. Supporting Material

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

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

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

6. AFTER ACCEPTANCE

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

6.1 Proof Corrections

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

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

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

6.2. Early Online Publication Prior to Print

The Journal of Periodontal Research is covered by Wiley Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no

changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3. Production Tracking

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