



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA (PPGO) - MESTRADO



THAYNÁ NÁTHALLY PETRY DE PAULA

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna induzida sobre a
perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta

Cascavel-PR
2020

THAYNÁ NÁTHALLY PETRY DE PAULA

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna induzida sobre a perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta

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

Área de concentração: Odontologia
Linha de Pesquisa: Patologia aplicada a Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
Co-orientadora: Prof. Dra. Sandra Lucinei Balbo

Cascavel-PR
2020

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

Paula, Thayna Nathally Petry de

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna induzida sobre a perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta : Programação fetal: efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal sobre a prole-F1 / Thayna Nathally Petry de Paula; orientador(a), Carlos Augusto Nassar; coorientador(a), Sandra Lucinei Balbo, 2020.

38 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Graduação em Odontologia Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2020.

1. Obesidade. 2. Doença periodontal. 3. Programação fetal. 4. Perda óssea alveolar. I. Nassar, Carlos Augusto. II. Balbo, Sandra Lucinei. III. Título.



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

THAYNÁ NÁTHALLY PETRY DE PAULA

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna sobre a perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Odontologia, linha de pesquisa Patologia Aplicada À Clínica Odontológica, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:

Orientador(a) - Carlos Augusto Nassar

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Mauro Carlos Agner Busato

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)

Laerte Luiz Brenin

Universidade Paranaense - UNIPAR (UNIPAR)

Cascavel, 20 de fevereiro de 2020

DEDICÁTORIA

“Para meu vô Ica, por tudo que representa para mim.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, prof. Carlos e prof. Sandra, pela confiança em mim depositada, pelo conhecimento compartilhado e, sobretudo, pela amizade construída.

Aos professores Joao Paulo, Elaine, Maria Lucia e Patricia por todo o auxilio para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Valeria, Victor, Milara e Jakeline pelo companheirismo, paciência e ajuda durante todo o processo. Seria impossível realizar este trabalho sem vocês.

À equipe do LAFEM, por todo o auxilio nos experimentos.

À todos os professores e colegas do Mestrado em Odontologia pelo apoio, ensinamentos e amizade.

À Leticia, Bruna e ao William, por serem meus grandes incentivadores diariamente.

Às minhas irmãs Elouise e Giulia, por me tornarem uma pessoa melhor.

À minha avo Georgina, pelo incentivo e confiança que sempre me deu.

Aos meus pais Gilvane e Paulo, a quem eu devo tudo que sou.

À Deus por sempre me abençoar.

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna induzida sobre a perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta

RESUMO

Objetivo: Verificar a influência da obesidade induzida pelo tratamento neonatal com glutamato monossódico (MSG) e da doença periodontal materna, associadas ou não, sobre a perda óssea mandibular da prole masculina na vida adulta. **Materiais e métodos:** Foram obtidas do biotério central, 20 fêmeas *Wistar* prenhas. Após o nascimento, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos. Metade dos filhotes fêmeas recebeu durante os cinco primeiros dias de vida injeções subcutâneas na região cervical de 4g/Kg/dia de glutamato monossódico (grupo MSG, n=30) e a outra metade recebeu 1.25/Kg/dia de solução salina hiperosmótica (grupo CTL, n=30). Todos os animais utilizados nos experimentos receberam água e ração padrão durante todo o período experimental. Aos 70 dias de vida, 15 animais de cada grupo foram submetidos à doença periodontal e distribuídos em quatro grupos experimentais: controle sem ligadura (CTL SL), controle com ligadura (CTL CL), MSG sem ligadura (MSG SL) e MSG com ligadura (MSG CL). Os quatro grupos de fêmeas foram colocadas para cruzamento com ratos controles (proporção 2:1). A prole foi classificada em quatro grupos: CTL SL-F1 (prole de mães controle sem ligadura), CTL CL-F1 (prole de mães controle com ligadura), MSG SL-F1 (prole de mães obesas-MSG sem ligadura), MSG CL-F1 (prole de mães obesas-MSG com ligadura). Aos 120 dias de vida, a prole foi eutanasiada. Foram coletadas as hemimandíbulas para análise histológica, morfológica e radiográfica e uma porção de tecido gengival ao redor dos dentes para análise por Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas (ELISA) da presença das citocinas IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-alfa. Os dados foram avaliados através dos testes ANOVA de duas vias e Pos teste Tukey. **Resultados:** Não foram evidenciadas alterações relacionadas à obesidade hipotalâmica materna associada à doença periodontal na perda óssea alveolar na prole masculina de ratos F1 com 120 dias. **Conclusão:** A obesidade hipotalâmica e a doença periodontal materna não afetou parâmetros corporais e plasmáticos de sua prole masculina na primeira geração, demonstrando que não houve efeito da programação fetal sobre estes parâmetros.

Palavras-chave: Obesidade, doença periodontal, programação fetal, perda óssea alveolar.

Influence of MSG-obesity and maternal periodontal disease on alveolar bone loss of male offspring in adulthood

ABSTRACT

Objective: To verify the influence of obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate (MSG) and maternal periodontal disease on the mandibular bone loss of male offspring in adulthood. **Materials and methods:** Twenty neonatal Wistar females were used and randomly separated into two groups. During the first five days of life, half of the female pups received subcutaneous injections in the cervical region of 4g/kg/day of monosodium glutamate (MSG group, n = 30), and the other half received 1.25/kg/day of hyperosmotic saline solution. (CTRL group, n = 30). All animals used in the experiments received water and standard feed throughout the experimental period. At 70 days of life, 15 animals from each group were submitted to periodontal disease and distributed into four experimental groups: control with no ligature (CTRL NL), control with a ligature (CTRL WL), MSG with no ligature (MSG NL), and MSG with a ligature (MSG WL). The four groups of females reproduced with control rats (2:1 ratio). Offspring were classified into four groups, according to the mothers' treatment: CTRL NL-F1, CTRL WL-F1, MSG NL-F1, and MSG WL-F1. At 120 days of age, the offspring were euthanized. Hemimandibles were collected for histological, morphological, and radiographic analysis and a portion of gingival tissue for analysis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of cytokines IL-6, IL-10, IL-17, and TNF-alpha. Data were assessed using Two-way ANOVA and Tukey's test. **Results:** There were no changes related to maternal hypothalamic obesity associated with periodontal disease in alveolar bone loss in the male offspring of F1 rats at 120 days. **Conclusion:** Hypothalamic obesity and maternal periodontal disease did not affect the body and plasma parameters of their male offspring in the first generation, demonstrating that there was no effect of fetal programming on these parameters.

Keywords: Obesity, periodontal disease, fetal programming, alveolar bone loss.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Delineamento experimental.....	13
Figura 2 - Esquema da gengiva marginal do rato.....	16
Gráfico 1 e 2 - Gordura retroperitoneal e perigonadal - fêmeas sem prole.....	18
Gráfico 3 - Perda óssea alveolar - fêmeas sem prole.....	18
Tabela 1 - Parâmetros corporais e plasmáticos das mães.....	19
Figura 3 - Perda óssea alveolar - mães.....	19
Tabela 2 - Parâmetros corporais e plasmáticos da prole.....	20
Gráfico 4 - Perda óssea alveolar da prole avaliada histologicamente.....	20
Tabela 3 - Medidas histológicas da gengiva da prole.....	21
Gráfico 5 - Perda óssea alveolar da prole avaliada radiograficamente.....	21
Tabela 4 - Quantificação de células ósseas.....	22
Tabela 5 - Citocinas inflamatórias no plasma.....	22
Tabela 6 - Citocinas inflamatórias no tecido gengival.....	22

Dissertação elaborada e formatada
conforme as normas das publicações científicas:
Journal of Periodontology disponível em:
[https://aap.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/1
9433670/homepage/forauthors.html](https://aap.onlinelibrary.wiley.com/hub/journal/19433670/homepage/forauthors.html)

SUMÁRIO

1 Introdução	11
2 Metodologia.....	13
3 Resultados.....	18
4 Discussão	24
5 Conclusão	28
6 Referências bibliográficas	29
7 Anexos.....	37

Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna induzida sobre a perda óssea alveolar da prole masculina na vida adulta

Introdução

Estudos têm demonstrado que a nutrição e o estilo de vida dos pais influenciam o estado de saúde dos filhos na vida adulta (GODFREY et al. 2010; CALKINS & DEVASKAR, 2011; KOLETZO et al. 2011). Nos últimos 30 anos, o paradigma das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença (DOHaD) identificou os períodos pré-concepcional, pré-natal e neonatal como fundamentais para moldar a suscetibilidade futura às doenças não transmissíveis (BARKER 2007; FERNANDEZ-TWINN et al. 2015; PORTHA et al. 2019). O ambiente em que as mães vivenciam no período pré-concepcional e aqueles aos quais seus filhos são expostos no útero e no primeiro ano de vida tendem a ser importantes para influenciar o crescimento tardio da adiposidade na infância por meio de numerosos mecanismos plausíveis (MATTERA et al. 2019; WILDING et al. 2019). Acredita-se que o aumento nos índices de obesidade não se dê apenas pelo consumo excessivo de alimentos calóricos e sedentarismo da atualidade, mas também pelo “ciclo vicioso” causado pela obesidade, uma vez que filhos de obesos apresentam uma maior predisposição para o desenvolvimento da doença (CATALANO, 2013). A obesidade hipotalâmica é utilizada como modelo experimental de obesidade em roedores. A administração de glutamato monossódico (MSG) no período neonatal acarreta lesões no núcleo arqueado e eminência mediana do hipotálamo, o que leva ao desenvolvimento da obesidade hipotalâmica (BRANDELERO et al. 2012; COSTA et al. 2017; SOARES et al. 2017; BAHADORAN et al. 2018). Segundo a literatura, altas doses de MSG administradas durante o período neonatal em ratos também induzem várias anormalidades que resultam em adiposidade extrema, acompanhadas de resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e hipersecreção de insulina (GRASSIOLLI et al. 2006; BALBO et al. 2007; CHEN et al. 2013).

O aumento da prevalência da obesidade ocupa uma das principais preocupações relacionadas à saúde a nível mundial, devido ao fato de que o excesso de peso representa um importante fator de risco para diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, dislipidemias, problemas respiratórios, apneia do sono, doenças gastrointestinais, artrite, doença circulatoria venosa, acidentes vasculares cerebrais e doença periodontal (ASHLEY e KANNEL 1974; BRIANEZZI et al. 2013). As taxas de obesidade em crianças e adolescentes em todo o mundo aumentaram de menos de 1% (equivalente a cinco milhões de meninas e seis milhões de meninos) em 1975 para quase 6% em meninas (50 milhões) e quase 8% em meninos (74 milhões) em 2016 (OMS, 2016). A projeção da Organização Mundial de Saúde (OMS) é de que, em 2025, o número de crianças com sobrepeso e obesidade possa chegar a 75 milhões – incluindo 427 mil crianças com pré-

diabetes, 1 milhão com hipertensão arterial e 1.4 milhão com aumento do acúmulo de gordura no fígado. Além disso, a obesidade tem sido sugerida também como fator de risco para periodontite (LEE et al. 2014; ZAMBON et al. 2018). A doença periodontal é uma doença infecciosa e inflamatória que afeta as estruturas de suporte dos dentes devido a interação entre bactérias periodontopatogênicas e a resposta imune do hospedeiro (PILHSTROM et al. 2005; HASAN e PALMER, 2014; LIRA-JUNIOR et al. 2016). O sistema imune do hospedeiro, principalmente para fins de proteção, eventualmente causa a destruição de tecidos de suporte do dente através da síntese e liberação de citocinas, mediadores pró-inflamatórios e metaloproteinases (LIMA et al. 2008; DIAS et al. 2011; TORRUNGRUANG et al. 2015).

Sabe-se que a doença periodontal é uma das doenças crônicas que mais afeta a população mundial. A medicina periodontal tem investigado a relação entre a periodontite e outras alterações sistêmicas, como a diabetes mellitus, artrite reumatóide, doenças cardiovasculares e obesidade (GENCO et al. 2005; ALAZAWI et al. 2017; VASCONCELOS et al. 2019). Acredita-se que a liberação de citocinas pelo tecido adiposo e hormônios pró-inflamatório denominados adipocitocinas, induzem processos inflamatórios e distúrbios de estresse oxidativo, gerando uma fisiopatologia semelhante entre as duas doenças (VENDRELL et al. 2004; SAITO et al. 2007; MOURA-GREC et al.2014).

Diante do exposto, devem ser desenvolvidos estudos que auxiliem o entendimento da relação bidirecional entre a obesidade e a doença periodontal, assim como a programação fetal, uma vez que os estímulos adversos sofridos pela prole no ambiente intrauterino podem influenciar o estado de saúde dos filhos na vida adulta. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da obesidade hipotalâmica e a doença periodontal materna sobre os tecidos periodontais da prole masculina na vida adulta.

Metodologia

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Após a aprovação do referido comitê, ratas *Wistar* prenhas (N=20) foram obtidas do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro - 07:00 - 19:00 h). Após o nascimento, metade dos filhotes fêmeas receberam durante os cinco primeiros dias de vida injeções subcutâneas na região cervical de 4g/Kg/dia de glutamato monossódico (MSG) para indução da obesidade hipotalâmica (grupo MSG, n=30) e a outra metade recebeu 1.25/Kg/dia de solução salina hiperosmótica (grupo CTL, n=30) (Figura 1) (BAHADORAN, MIRMIRAN e GHASEMI, 2019).

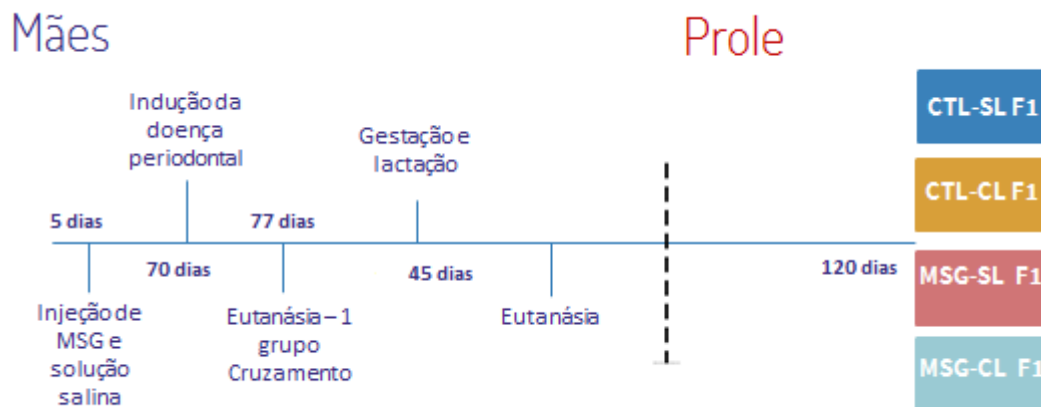


Figura 1 – Delineamento experimental.

Todos os animais utilizados nos experimentos receberam água e ração padrão durante todo o período experimental e também foram pesados uma vez por semana após o desmame. Os animais machos utilizados para o cruzamento receberam água e ração padrão à vontade e foram utilizados para o cruzamento com as fêmeas CTL e MSG. Não houve cruzamento entre ratos provenientes da mesma mãe.

Indução da Doença Periodontal

Aos 70 dias de vida, metade dos animais do grupo MSG (n=15) e CTL (n=15) foram submetidos à doença periodontal experimental. Para isso foram anestesiados com injeção intraperitoneal com cloridrato de xilazina 0.04 mg/kg (ANASEDAN®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP) e cloridrato de quetamina 0.08 mg/kg (DOPALEN®, Sespo Indústria e Comércio, Paulínia-SP). Em seguida, os animais foram posicionados em mesa operatória

apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 (GLACE®), ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Esta ligadura atuou como irritante gengival e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana (NASSAR et al. 2009). Após a indução da doença periodontal os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: controle sem ligadura n=15 (CTL SL), controle com ligadura n=15 (CTL CL), MSG sem ligadura n=15 (MSG SL) e MSG com ligadura n=15 (MSG CL).

Eutanásia do 1º grupo

Sete dias após a indução da doença periodontal, foi realizada a eutanásia de cinco ratas de cada grupo (CTL SL, CTL CL, MSG SL e MSG CL) para constatar a presença e desenvolvimento da doença periodontal por meio de análise radiográfica. Essas fêmeas foram pesadas e foi obtido o comprimento nasoanal. Logo após a eutanásia por decapitação, as gorduras perigonadal e retroperitonal foram coletadas e pesadas. As hemimandíbulas esquerdas foram coletadas para posterior análise radiográfica.

Cruzamento

Sete dias após a indução da doença periodontal foram realizados os cruzamentos das ratas CTL SL, CTL CL, MSG SL e MSG CL (n=10) com ratos controles, na proporção de um macho para duas fêmeas. Após a constatação da prenhez, os ratos machos foram eutanasiados e as fêmeas prenhas separadas em caixas individuais. Após a prenhez e lactação, cerca de 45 dias, as fêmeas foram eutanasiadas por decapitação. Foi utilizada apenas a prole masculina para este estudo.

Experimentos com as mães

Antes da eutanásia, as mães permaneceram em 8 horas de jejum. O sangue da cauda foi coletado para medição da glicemia em jejum utilizando um analisador de glicose (G-Tech Free®, SD Biosensor, Coreia). Rapidamente, o peso corporal e o comprimento nasoanal foram medidos para calcular o índice de Lee {[razão de PC (g) / comprimento nasoanal (cm)] x 1000}, que foi usado como parâmetro de obesidade em roedores. Em seguida, os animais foram dessensibilizados com dióxido de carbono em câmara de CO₂ (Insight®, Ribeirão Preto, SP, BRA) e submetidos à eutanásia por decapitação. As gorduras retroperitoneal e

perigonadal foram removidas e pesadas para avaliar o acúmulo de gordura. Foram coletadas as hemi-mandíbulas para avaliação radiográfica nas mães.

Experimentos com a Prole obtida (primeira geração – F1) de mães CTL e MSG, com ou sem doença periodontal experimental

Após o nascimento permaneceram seis machos para cada ninhada. Aos 21 dias de vida da prole, a prole obtida (primeira geração – F1) foi designada conforme o tratamento das mães em: 1) CTL SL-F1 (n=10), 2) CTL CL-F1 (n=10), 3) MSG SL-F1 (n=10) e 4) MSG CL-F1 (n=10). Esta prole foi mantida no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo sob condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e luz (ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro - 07:00 - 19:00 h), recebendo água e ração padrão à vontade por um período de 120 dias. Foi realizada a medida da glicose em jejum, peso corporal e comprimento naso-anal, assim como nas mães, previamente a eutanásia.

Avaliação da perda óssea alveolar mandibular por análise radiográfica

Após a eutanásia, foram coletadas as hemimandíbulas do lado esquerdo de cada animal, tanto das mães quanto da prole, sendo retiradas, fixadas em formol 10% durante 48 horas. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por 24 horas e mantidas em álcool 70%. As hemimandíbulas foram colocadas com a face lingual sobre o sensor radiográfico digital Kodak RVG 6100 com resolução de imagem 20 pl/mm, resolução teórica do sensor 27,03 pl/mm, fibra ótica 1, dimensões de superfície ativa de 22 x 30 mm e dimensões da matriz (pixels) 1200 x 1600 (1.92 milhões) e posicionados para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares fiquem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças. As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, EUA) e feito uma 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 (NASSAR et al. 2009). As medidas foram realizadas por um único examinador, cego para as identidades dos grupos experimentais.

Análises Morfométricas das Mandíbulas

As hemimandíbulas do lado direito obtidas da prole foram fixadas em solução de formol a 10% por 48 horas. Após este período, foram lavadas em água corrente por 24 horas

e imersas em álcool 70%. Posteriormente, foram imersas em solução de ácido tricloroacético 5% (Pr Labor®) para descalcificação. As peças foram avaliadas diariamente a fim de se verificar o grau esperado de descalcificação com renovação da solução de TCA a cada cinco dias. Após a descalcificação, as peças foram novamente lavadas em água corrente por uma hora e foi dado início ao processamento histológico. Os fragmentos das hemimandíbulas foram desidratados em série alcoólica ascendente, diafanizadas em xilol e incluídos em paraplast. Os blocos de paraplast foram cortados em micrótomo rotativo manual (Olympus 4060®) para obtenção de secções de 5µm de espessura, que foram montadas em lâminas histológicas e coradas pela técnica Hematoxilina e Eosina (HE).

Para as análises morfométricas foi utilizado microscópio óptico (Olympus BX61®). Para obtenção das fotomicrografias foi utilizada câmera digital Olympus DP71® com o software DP Controller® 3.2.1.276. Essas análises foram feitas através de mensurações nas gengivas marginais vestibular e lingual direita em todos os grupos da prole, utilizando-se um programa analisador de imagens, acoplado a um microscópio óptico com objetiva de 10x. As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, como ilustrado na Figura 2 abaixo. Os resultados foram expressos em pixels. Também foram realizadas as medidas da área total do epitélio e do tecido conjuntivo. Foram realizadas duas medições, em dias diferentes, com o valor da área ocupada por epitélio e tecido conjuntivo calculados. Os resultados foram expressos pixels, sendo utilizado o programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics, EUA). (PERALTA et al. 2015).

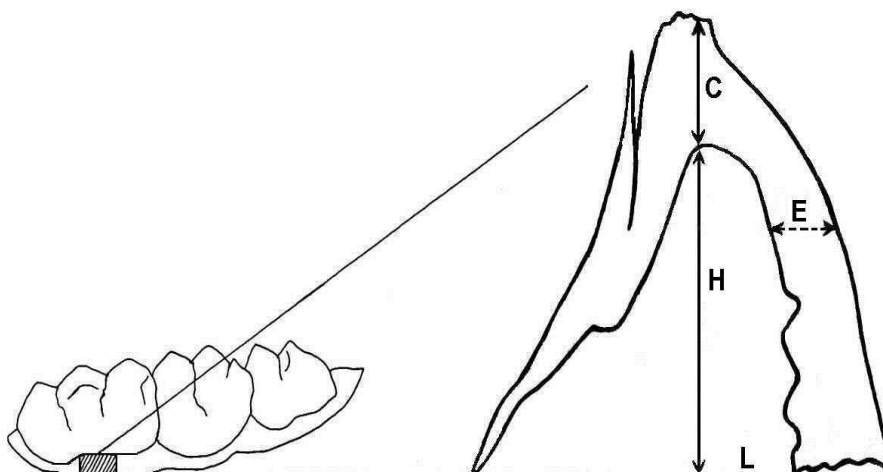


Figura 2 - Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo.

C- altura do epitélio da crista gengival; E – Largura do epitélio bucal

H - altura do tecido conjuntivo na região média; L - largura do tecido conjuntivo na região basal.

Foi realizada a quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado a objetiva de 40x. 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 (medida em pixels) foi realizada através do Fotomicroscópio BX61® acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens. 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 feito a média entre os valores.

Análise da Expressão das citocinas – tecido gengival e plasma

Foi coletado sangue no momento da decapitação. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3000 rpm e o plasma foi separado e estocado a -20°C. Uma porção de tecido gengival ao redor dos primeiros molares esquerdos de todos os grupos da prole foi removida e armazenada em RNA*later* Stabilization Solution® (ThermoFisher Scientific). O total de proteínas foi extraído das amostras de tecido gengival usando tampão de extração a base de detergente (T-PER®, Tissue Protein Extraction Reagent - Pierce) contendo um coquetel de inibidor de protease (Protein Stabilizing Cocktail® - Santa Cruz Biotechnology) de acordo com as instruções do fabricante.

Para a quantificação de citocinas no tecido gengival, as amostras foram sonicadas (DESRUPTOR®, Ultranique, Brazil). Posteriormente foram centrifugadas por 30 minutos à 12000 rpm a 4 °C. O sobrenadante concentrado foi quantificado utilizando o sistema de quantificação de proteína Bradford (Bio-Rad®). Para a detecção e quantificação das citocinas IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-alfa no plasma e no tecido gengival, foram utilizados 100 µL de amostra num comprimento de onda de 450 nm de acordo com Rat Custom Procarta Plex magnetic bead (Invitrogen, USA) with the immunoassay MAGPIX® platform), segundo as instruções do fabricante.

Análises estatísticas

Os resultados foram analisados usando o programa Graphpad Prism® 5.0. Em todas as variáveis foram testadas a distribuição normal e a variância homogênea. Como a distribuição foi considerada normal e a variância homogênea foram utilizados os testes paramétricos ANOVA – Two Way seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As diferenças observadas serão consideradas significantes quando $p < 0.05$.

Resultados

As fêmeas obesas-MSG eutanasiadas 7 dias após a indução da doença periodontal apresentaram maior porcentagem corporal de gordura retroperitoneal e perigonadal quando comparadas as fêmeas CTL (gráficos 1 e 2).

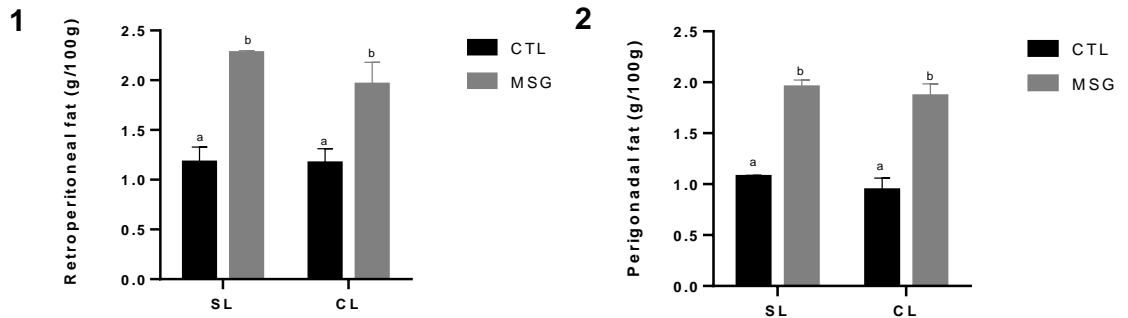


Gráfico 1 e 2 – Efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal experimental sobre o peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal em ratas CTL SL, CTL CL, MSG SL e MSG CL antes do cruzamento. As barras representam a média \pm EPM. Letras diferentes referem-se às diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida com pós-teste de Tukey, $P < 0.05$ ($n=5$).

A perda óssea alveolar medida radiograficamente foi maior nos grupos que receberam a indução da doença periodontal experimental (sete dias de ligadura), tanto no grupo CTL CL quanto MSG CL, comparado ao grupo SL. A obesidade hipotalâmica não agravou a progressão da doença periodontal nesses animais (Gráfico 3).

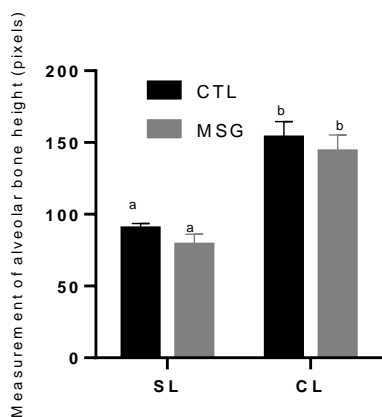


Gráfico 3 – Efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal experimental sobre a perda óssea alveolar mandibular em ratas CTL, CTL CL, MSG e MSG CL antes do cruzamento. As barras representam a média \pm EPM. Letras diferentes referem-se às diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, $P < 0.05$ ($n=5$).

Quando analisados os parâmetros corporais nas mães, foi observado que o peso corporal e o comprimento naso-anal foram reduzidos nos grupos MSG SL e MSG CL quando

comparados aos grupos controle (Tabela 1). Porém, os animais MSG SL e MSG CL apresentaram maior índice de Lee, comprovando a instalação da obesidade, decorrente do tratamento neonatal com glutamato monossódico. A administração do MSG provocou aumento nas gorduras retroperitoneal e perigonadal quando comparados aos grupos controle (tabela 1), porém não houve diferença estatística significativa quando comparados os grupos obesos entre si (MSG SL e MSG CL). Sobre o perfil glicêmico dos animais, não houve variação estatística significativa entre os grupos.

Tabela 1 – Parâmetros corporais e plasmáticos das mães, dos grupos CTL SL, CTL CL, MSG SL e MSG CL no momento da eutanásia.

	CTL SL	CTL CL	MSG SL	MSG CL
Peso (g)	245±4.3 ^a	258±5.3 ^a	193.7±4.3 ^b	203.4±6.5 ^b
CNA (cm)	19.4±0.1 ^a	19±0.2 ^a	17.2±0.1 ^b	17.5±0.1 ^b
Índice de Lee	320.9±3,1 ^a	333.9±4.1 ^a	359.5±6.2 ^b	354.7±4.9 ^b
Gord. retroperitoneal (% do peso corporal)	0.6±0.06 ^a	0.6±0.07 ^a	1.3±0.1 ^b	1±0.8 ^b
Gord. perigonadal (% do peso corporal)	1.07±0.1 ^a	1.07±0.8 ^a	2.1±0.2 ^b	1.7±0.1 ^b
Glicemia (mm/Hg)	90.5±8	77.3±6.4	79±6.7	81.1±6.2

Os dados foram apresentados como a média ± EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. P<0,05. (n=7-10)

Na análise radiográfica do osso alveolar nas mães, verificou-se que houve maior perda óssea alveolar (p<0.05) nos grupos com indução da doença periodontal (CTL CL e MSG CL), porém no grupo CTL CL a perda óssea foi mais acentuada do que no grupo MSG CL, sugerindo efeito protetor da obesidade MSG sobre a reabsorção óssea (figura 3).

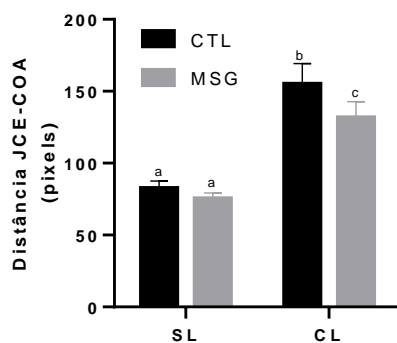


Figura 3 – Efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal materna sobre a reabsorção óssea alveolar nos grupos CTL SL (1), CTL CL (B), MSG SL (C) e MSG CL (D).

Resultados – Prole

Com relação aos parâmetros corporais e plasmáticos observados na primeira geração, o peso e o comprimento naso-anal dos quatro grupos da prole masculina foram similares, não havendo diferença no índice de Lee. Assim como a porcentagem de gordura retroperitoneal e perigonadal sobre o peso corporal total. A glicemia em jejum foi semelhante estatisticamente entre os quatro grupos observados (tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros corporais e plasmáticos da prole, dos grupos CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1 no momento da eutanásia (120 dias de vida).

	CTL SL-F1	CTL CL-F1	MSG SL-F1	MSG CL-F1
Peso (g)	394.4±7.3	388.1±7.9	364.9±5.5	373.2±3.5
CNA (cm)	23.6±0.2	23.6±0.1	23.3±0.2	23.1±0.2
Índice de Lee	307.5±3.3	304.1±1.9	302.6±3	308.8±3.6
Gord. retroperitoneal (% do peso corporal)	1.5±0.05	1.5±0.05	1.3±0.08	1.3±0.04
Gord. perigonadal (% do peso corporal)	1.4±0.05	1.5±0.05	1.3±0.08	1.3±0.04
Glicemia	82.1±3.0	86.6±3.0	87.4±1.0	82.1±3.0

Os dados foram apresentados como a média ± EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. P<0.05. (n=13-16)

Quando analisada a perda óssea alveolar, morfometricamente e radiograficamente, foi observado que a obesidade e doença periodontal materna não produziram efeitos na primeira geração da prole (Gráficos 4 e 5).

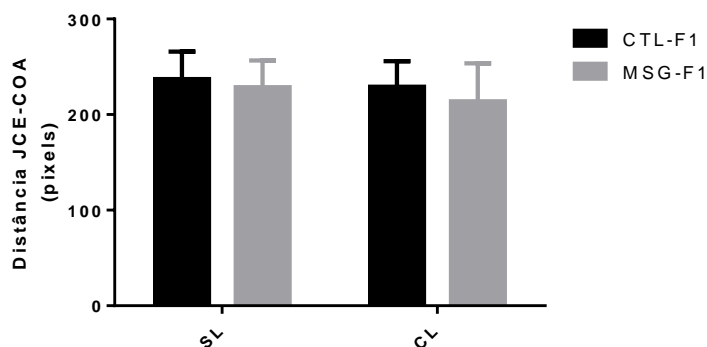


Gráfico 4 – Efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal experimental sobre a perda óssea alveolar mandibular avaliada morfometricamente na prole CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1. As barras representam a média \pm EPM. Letras diferentes referem-se às diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, $P < 0.05$ (n=13-16).

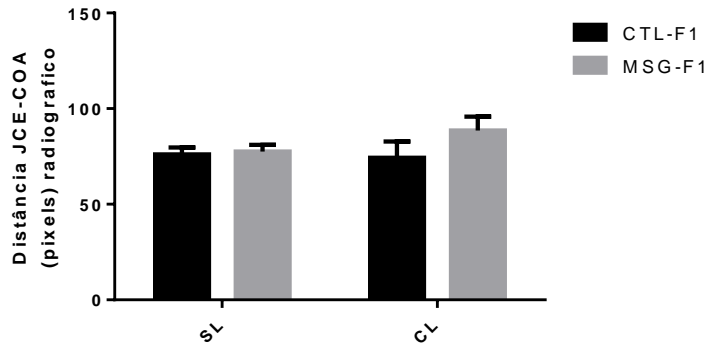


Gráfico 5 – Efeito da obesidade hipotalâmica e doença periodontal experimental materna sobre a perda óssea alveolar mandibular avaliada radiograficamente na prole CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1. As barras representam a média \pm EPM. Letras diferentes referem-se às diferenças estatísticas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, $P < 0.05$ (n=13-16).

Na análise morfológica dos tecidos periodontais, observou-se que a largura da base do epitélio foi similar entre a prole de mães CTL SL e MSG SL. Porém, o grupo CTL CL-F1 apresentou um aumento quando comparado aos outros grupos. Já no grupo MSG CL-F1 houve uma redução nesse valor (Tabela 3).

Tabela 3 – Medidas dos tecidos gengivais dos grupos CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1.

	CTL SL-F1	CTL CL-F1	MSG SL-F1	MSG CL-F1
Base epitelial (pixels)	136.8 \pm 6.8 ^a	150.2 \pm 7.8 ^b	87.9 \pm 7.5 ^a	91.9 \pm 17.2 ^{a,c}
Altura epitelial(pixels)	146.3 \pm 8.8	151.1 \pm 4.5	155.9 \pm 12.1	152.2 \pm 9.5
Área do epitélio(pixels ²)	67102 \pm 2857.0	73612 \pm 2801.0	73149 \pm 7586.0	57757 \pm 4582.0
Base do conjuntivo(pixels)	117.2 \pm 4.9	127.1 \pm 14.5	126.1 \pm 17.5	105.4 \pm 10.6
.Altura do conjuntivo (pixels)	426.7 \pm 15.6	434 \pm 21.3	423 \pm 42.0	379.5 \pm 25.4
Área do conjuntivo(pixels ²)	36323 \pm 2784.0	34112 \pm 2819.0	26068 \pm 6075.0	21406 \pm 2963.0

Os dados foram apresentados como a média \pm EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. $P < 0.05$. (n=13-16)

Não foram observadas diferenças estatísticas na quantificação de células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) entre os quatro de grupos de prole avaliados (tabela 4).

Tabela 4 – Análise histológica dos grupos CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1 para quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

	CTL SL-F1	CTL CL-F1	MSG SL-F1	MSG CL-F1
Osteoblastos	14.6 \pm 7.0	35.1 \pm 10.0	28.2 \pm 11.0	35.9 \pm 15.0
Osteócitos	919.4 \pm 84.0	1015 \pm 215.0	976.3 \pm 189.0	1375 \pm 207.0
Osteoclastos	13.6 \pm 7	16.3 \pm 8	1.5 \pm 0.9	1 \pm 0.7

Os dados foram apresentados como a média \pm EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. $P < 0.05$. (n=13-16)

Não foram observadas diferenças estatísticas na quantificação de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-10, IL-17 e TNF-alfa) no plasma e no tecido gengival entre os quatro de grupos de prole avaliados (tabela 5 e 6).

Tabela 5 – Concentração de citocinas inflamatórias no plasma da prole CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1.

	CTL SL-F1	CTL CL-F1	MSG SL-F1	MSG CL-F1
IL-6 (ng/ml)	60.456 \pm 9.784	79.900 \pm 3.899	82.088 \pm 14.723	80.428 \pm 3.950
IL-10 (ng/ml)	83.360 \pm 5.877	94.695 \pm 2.067	90.873 \pm 6.968	93.910 \pm 7.506
IL-17 (ng/ml)	4.241 \pm 1.444	7.959 \pm 967	6.758 \pm 396	6.741 \pm 1.726
TNF-alfa (ng/ml)	11.885 \pm 3850	19.746 \pm 2.824	18.033 \pm 1.110	22.635 \pm 7.333

Os dados foram apresentados como a média \pm EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. $P < 0.05$. (n=13-16)

Tabela 6 – Concentração de citocinas inflamatórias no tecido gengival da prole CTL SL-F1, CTL CL-F1, MSG SL-F1 e MSG CL-F1.

	CTL SL-F1	CTL CL-F1	MSG SL-F1	MSG CL-F1
IL-6 (ng/ml)	253.690 \pm 31.130	234.344 \pm 33.087	330.467 \pm 33.476	253.017 \pm 60.680

IL-10 (ng/ml)	1.458.006±27.673	1.473.000±17.711	1.581.000±71.252	1.449.030±29.756
IL-17 (ng/ml)	77.567±19.569	108.916±13.962	97.593±22.082	70.990±24.985
TNF-alfa (ng/ml)	353.300±72.629	184.584±59.555	592.810±89.293	315.890±52.844

Os dados foram apresentados como a média ± EPM. As letras diferentes referem-se às diferenças significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey. P<0.05. (n=13-16)

Discussão

No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez o efeito da obesidade hipotalâmica materna associada à doença periodontal experimental sobre a prole na vida adulta, com a finalidade de observar a possível ação da programação fetal. O grupo das mães MSG apresentou aumento de 93% e 81% no peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, respectivamente, além de diferença significativa no Índice de Lee ($p < 0.05$), quando comparado ao grupo CTL, comprovando que a obesidade já estava instalada aos 77 dias e o sucesso do modelo experimental utilizado (Tabela 1). Estudos clínicos e experimentais já demonstraram que a obesidade materna pode predispor o feto ao desenvolvimento de intolerância a glicose, obesidade e síndrome metabólica na vida adulta, uma vez que altera permanentemente uma variedade de processos de controle metabólico no feto (BARKER 2007; CAMPOS et al. 2007; GODFREY et al. 2017).

A alta prevalência da obesidade materna e, conseqüentemente, da maior predisposição a doenças metabólicas em sua prole, colocam esse tema como uma prioridade urgente para discussão da epidemia de obesidade. Portanto, é essencial que se tome conhecimentos sobre as conseqüências da epidemia de obesidade em grávidas, não apenas em termos de resultado da gravidez, mas também do impacto potencial sobre a saúde da próxima geração. Diversos estudos têm buscado compreender o efeito de alterações maternas, como a obesidade e doença periodontal, sobre a prole (VICKERS 2014; BERTASSO et al. 2017; PUERTAS et al. 2017; PIETROBON et al. 2017; MANRIQUE-CORREDOR et al. 2019).

Além da obesidade materna, é importante compreender se o estado inflamatório causado pela doença periodontal pode acarretar conseqüências na prole. A literatura já demonstrou a relação entre obesidade e doença periodontal (MARTINEZ-HERRARA et al. 2017), porém não relacionou as duas variáveis e analisou a perda óssea alveolar na primeira geração. O tecido adiposo libera citocinas e hormônios pró-inflamatórios denominados adipocitocinas, que induzem processos inflamatórios e distúrbios do estresse oxidativo, gerando uma fisiopatologia semelhante entre as duas doenças (JAGANNATHACHARY e KAMARAJ 2010).

Quando analisada radiograficamente a perda óssea alveolar materna, evidenciou-se que os grupos em que a doença periodontal foi induzida por ligadura, apresentaram maior reabsorção óssea do que os grupos SL, demonstrando a atividade da doença. Porém o grupo MSG CL apresentou ligeira redução desse valor comparado ao grupo CTL CL, sugerindo que a obesidade hipotalâmica teria um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar (figura 4). Estes dados corroboram com estudos realizados pelo mesmo grupo de

pesquisadores anteriormente (BRANDELERO et al. 2012; COSTA et al. 2017; MATTIA et al. 2017). Alguns autores sugerem que a obesidade pode levar a um efeito positivo sobre a massa óssea (LEONARD et al. 2004; STETTLER et al. 2008; SANTOS et al. 2008; EVANS et al. 2015), porém este assunto permanece contraditório, visto que outras pesquisas demonstraram haver maior reabsorção óssea em indivíduos obesos (NASCIMENTO et al. 2013; WANI et al. 2019). O efeito protetor da obesidade no tecido ósseo também pode ser decorrente da maior concentração de insulina em indivíduos obesos, uma vez que os osteoblastos possuem receptor para insulina que estimula a diferenciação osteogênica e inibe a osteoclastogênese (REID 2008; ZHAO et al. 2008). Além disso, adipocitocinas, como a leptina, e as citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF-alfa, também influenciam a massa óssea, diretamente ou como resultado de seu efeito no regulamento do apetite e no peso, sugerindo que a obesidade hipotalâmica teria um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar (figura 4).

Em nosso estudo, a obesidade hipotalâmica não exacerbou a doença periodontal, entretanto a literatura demonstra que se a obesidade induzida for feita por meio da dieta hipercalórica, os resultados demonstram microflora e defeitos nos tecidos periodontais compatíveis com doença periodontal, mesmo sem a indução da periodontite (BLASCO-BAQUE et al. 2012; BRANCHEREAU et al. 2015), sugerindo que o tipo de obesidade induzida é relevante para a exacerbação da doença periodontal. A plausibilidade biológica para associação entre obesidade e doença periodontal é explicado pelo aumento dos níveis de lipídios e de glicose, podendo contribuir para uma resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro, alterar a função de neutrófilos e, ainda, inibir a produção de fatores de crescimento pelos macrófagos, reduzindo a capacidade de reparo dos tecidos (MACHADO et al. 2011).

A inflamação oral devido a infecções bacterianas é uma fonte de bactérias e mediadores inflamatórios que podem se disseminar sistemicamente através da corrente sanguínea e alcançar a barreira placentária (REN e DU 2017). Ainda são escassos os estudos investigando a ação da doença periodontal materna sobre parâmetros da primeira geração, entretanto alguns autores já demonstraram que a presença de doença periodontal materna levou ao aumento dos níveis da citocina de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) no tecido cerebral da prole (SHIRAKASHI et al. 2013; TSOSURA et al. 2019) e resistência a insulina (COLOMBO et al. 2012; SHIRAKASHI et al. 2013; TSOSURA et al. 2019), o que demonstra a influência sistêmica causada pela inflamação da doença periodontal.

Após injetar endotoxina bacteriana (lipopolissacarídeo) em ratas grávidas, Nilsson et al (2001) observaram que a prole exibiu um aumento no peso corporal, aumento no tecido adiposo abdominal e redução do efeito da insulina sobre a captação de glicose, sugerindo que o período pré-natal é importante para determinar o risco de desenvolver resistência à insulina e obesidade em descendentes adultos. Neste estudo, não foi observado diferença estatística significativa no índice de Lee, gordura retroperitoneal, gordura perigonadal e glicemia entre os 4 grupos de prole estudados (Tabela 2). Outros estudos utilizando obesidade hipotalâmica materna demonstraram que a partir dos 5 meses de vida, a prole desenvolveu obesidade também (CAMPOS et al. 2007; CAMPOS et al. 2008), porém os animais do presente estudo foram eutanasiados com 120 dias de vida, sugerindo que as alterações decorrentes da obesidade materna são expressas mais tardiamente.

Estudos epidemiológicos e experimentais mostram que obesidade materna ou consumo de dieta hiperlipídica está associada ao aumento da suscetibilidade à esteatose hepática e inflamação (BRUCE et al. 2009; BERTASSO et al. 2017), hipertensão e desordens cardiovasculares (BLACKMORE et al. 2014; TAYLOR et al. 2014), obesidade e resistência à insulina (BOYLE et al. 2016; PIETROBON et al. 2017) nos filhos em diferentes estágios de desenvolvimento. Poucos estudos haviam sido realizados anteriormente com obesidade hipotalâmica materna para que se avaliasse o efeito desta alteração sobre a programação metabólica (CAMPOS et al. 2007; CAMPOS et al. 2008), podendo sugerir que seja devido o fato de que animais MSG apresentarem alterações na função reprodutiva (OLNEY et al. 1969).

Não houve diferenças na perda óssea alveolar entre a prole, tanto morfológica quanto radiograficamente (Gráficos 5 e 6), bem como também não apresentou diferenças significativas na quantificação de células ósseas (Tabela 5). A obesidade hipotalâmica e a doença periodontal materna não produziram efeitos na primeira geração da prole. Os estudos realizados até o momento utilizando obesidade e doença periodontal materna não investigaram se haveriam consequências desta alteração nos tecidos periodontais da prole (SHIRAKASHI et al. 2013; PIMENTEL et al. 2017; SOUSA-SOARES et al. 2017). Um modelo experimental de indução da doença periodontal por meio da inoculação de microorganismos periodontopatogênicos verificou alterações na prole, como aumento de citocinas inflamatórias na placenta (LIN et al. 2003; ARCE et al. 2009), danos cerebrais (OFFENBACHER et al. 2005), nascimento prematuro e baixo peso ao nascer (LIANG et al. 2018). No presente artigo, não foi observado diferença estatística significativa na quantificação de citocinas inflamatórias no plasma e no tecido gengival da prole.

Sugere-se que assim como o modelo experimental de obesidade, o tipo de doença periodontal induzida utilizada pode ser relevante para causar alterações na prole. Uma das teorias que permeia a programação metabólica e a hipótese chamada de teoria do segundo “hit”, que sugere que os estímulos adversos ocorridos durante o período perinatal (primeiro “hit”) não seriam por si só suficientes para alterar o fenótipo do indivíduo na vida adulta, porém, a exposição a estressores na vida pós-natal podem agir como um segundo “hit” ativando ou amplificando os efeitos da programação fetal e levando ao aparecimento de doenças (PADMANABHAN; CARDOSO; PUTTABYATAPPA, 2015).

Na análise morfométrica do tecido gengival, houve um aumento da base epitelial no grupo CTL CL-F1 em relação ao grupo CTL SL-F1 e MSG SL-F1(Tabela 3). Porém, no grupo MSG CL-F1 houve redução desse parâmetro quando comparado ao grupo CTL CL-F1, sugerindo que apesar de não haver perda óssea alveolar evidente no período avaliado, pode ocorrer uma maior predisposição para inflamação gengival na prole de ratas obesas com ligadura. Teleken et al. em 2019 demonstrou alteração em tecido epitelial da prole de animais expostos ao herbicida Glifosato. Apesar das discrepâncias entre os dois estudos, em virtude do modelo experimental utilizado, sugere-se que mais estudos sejam realizados para avaliar a programação fetal em tecido epitelial.

Conclusão

Os achados deste estudo demonstraram que a obesidade hipotalâmica materna associada à doença periodontal não afeta a perda óssea alveolar na prole masculina de ratos com 120 dias. Além disso, os resultados sugerem que mães obesas podem apresentar efeito protetor sobre a perda óssea alveolar induzida por doença periodontal experimental.

Referências Bibliográficas

1. Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinology Metabolism*. 2010;4:199-205.
2. Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2011;41-6:158-176.
3. Koletzko B, Symonds ME, Olsen SF. Programming research: where are we and where do we go from here? *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2011; 94-6: 2036-2043.
4. Barker DJ. P. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. 2007;261-5:412-417.
5. Fernandez-Twinn DS, Constância M, Ozanne SE. Intergenerational epigenetic inheritance in models of developmental programming of adult disease. *Seminars In Cell & Developmental Biology*. 2015;43:85-95.
6. Portha B, Grandjean V, Movasset J. Mother or Father: Who Is in the Front Line? Mechanisms Underlying the Non-Genomic Transmission of Obesity/Diabetes via the Maternal or the Paternal Line. *Nutrients*. 2019; 11-2:233-256.
7. Mattera MSLC, Chiba FY, Lopes FL, et al. Effect of maternal periodontitis on GLUT4 and inflammatory pathway in adult offspring. *Journal Of Periodontology*. 2019; 90-8:884-893.
8. Wilding S, Ziauddeen N, Smith D, Roderick P, Alwan NA. Maternal and early-life area-level characteristics and childhood adiposity: A systematic review. *Obesity Reviews*. 2019: 1093-1105.
9. Catalano PM. Obesity and pregnancy--the propagation of a viscous cycle? *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2003; 88-8: 3505-3506.
10. Ashley FW, Kannel WB. Relation of weight change to changes in atherogenic traits: the Framingham study. *Journal of Chronic Diseases*. 1974; 27: 103-114.
11. Brianezzi LFF, Al-Ahj LP, Prestes LA, et al. Impact of obesity on oral health: a literature review. *RFO UPF*. 103; 18-2: 211-216.
12. WHO. *World Health Organization* (2016). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Disponível em: <http://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_894/en/>. Acesso em: 14/07/2019
13. Lee HJ, Jun JK, Lee SM, Ha JE, Paik DI, Bae KH. Association Between Obesity and Periodontitis in Pregnant Females. *Journal Of Periodontology*. 2014;85-7: 224-231.

14. Zambon M, Mando C, Lissoni A, et al. Inflammatory and Oxidative Responses in Pregnancies With Obesity and Periodontal Disease. *Reproductive Sciences*. 2018; 25-10:1474-1484.
15. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005; 366-9499:1809-1820.
16. Hasan A, Palmer RM. A clinical guide to periodontology: Pathology of periodontal disease. *British Dental Journal*. 2014; 216- 8: 457-461
17. Lira-Junior R, Figueredo CM. Periodontal and inflammatory bowel diseases: Is there evidence of complex pathogenic interactions? *World Journal Gastroenterology*. 2016; 22-35:7963-7972.
18. Lima V, Bezerra MM, Leitão FRC, et al. Main inflammatory mediators involved in the physiopathology of periodontitis – role of pharmacological modulators. *Revista Periodontia*. 2008; 18-3: 7-19
19. Dias RB. Estudo da obesidade como indicador de risco para a doença periodontal. *Brazil Journal of Periodontology*. 2011; 21-2: 70-78.
20. Torrungruang K, Jitpakdeebordin S, Charatkulangkun O, Glebbua Y. Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population. *Plos One*. 2015;10-8: 1-13.
21. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *Journal Of Periodontology*. 2005; 76-11: 2075-2084.
22. Alazawi W, Bernabe E, Tai D, et al. Periodontitis is associated with significant hepatic fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Plos One*. 2017; 12- 12:1-13.
23. Vasconcelos ACCG, Vasconcelos DFP, Pereira da Silva FR, et al. Periodontitis causes abnormalities in the liver of rats. *Journal Of Periodontology*. 2018; 90-3: 295-305.
24. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, et al. Resistin, Adiponectin, Ghrelin, Leptin, and Proinflammatory Cytokines: Relationships in Obesity. *Obesity Research*. 2004; 12-6:962-971.
25. Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Journal of Periodontology*. 2007; 43: 254-266.
26. Moura-Gréc PG, Marsicano JA, Carvalho CA, Sales-Peres SH. Obesity and periodontitis: systematic review and meta-analysis. *Ciência&Saúde Coletiva*. 2014; 19: 1763-1772.

27. Nascimento CM, Cassol T, da 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*. 2013; 6: 365-370.
28. Pedrotti S, Nassar PO, Sagae SC, Costa KF, Leme Beu CC, Nassar CA. Evaluation of the Influence of Experimental Periodontitis on the Sexual Behaviour of Male Wistar Rats. *British Journal of Medicine and Medical Research*, 2016; 15: 1-8.
29. Costa KF, Bonfleur ML, Pontilho V. Evaluation of Periodontal Tissues and Abdominal Aorta of Rats with Induced Obesity by Monosodium Glutamate and Experimental Periodontitis. *British Journal Of Medicine And Medical Research*. 2017; 19-2: 1-14
30. Mattia TM, Leite MA, Nassar PO, et al. The Influence of Obesity Induced by Monosodium Glutamate in Periodontal Tissues of Female Wistar Rats with Experimental Periodontitis. *American International Journal of Contemporary Research*. 2017; 7-3: 28-40.
31. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. *Journal of Periodontology Research*. 2009; 44-4: 479-88.
32. da Silva Peralta F, Pallos D, Silva Queiroz C, Ricardo LH. Previous exposure to Cyclosporine A and periodontal breakdown in rats. *Archives Oral Biology*. 2015; 60-4: 566-573.
33. Heindel JJ, Vandenberg LN. Developmental Origins of Health and Disease: A Paradigm for Understanding Disease Etiology and Prevention. *Curr Opin Pediatr*. 2015; 27 - 2: 248–253.
34. Brandelero S Jr, Bonfleur ML, Ribeiro RA, et al. Decreased TNF-ALFA- α gene expression in periodontal ligature in MSG-obese rats: A possible protective effect of hypothalamic obesity against periodontal disease?. *Archives Of Oral Biology*. 2012; 57-3:300-306.
35. Soares GM, Cantelli KR, Balbo SL, et al. Liver steatosis in hypothalamic obese rats improves after duodeno-jejunal bypass by reduction in de novo lipogenesis pathway. *Life Sciences*. 2017; 188: 68-75.
36. Bahadoran Z, Mirmiran P, Ghasemi A. Monosodium Glutamate (MSG)-Induced Animal Model of Type 2 Diabetes. *Methods In Molecular Biology*. 2018: p.49-65.
37. Grassioli S, Bonfleur ML, Scomparin DX, de Freitas Mathias PC. Pancreatic islets from hypothalamic obese rats maintain K + ATP channel-dependent but not-

- independent pathways on glucose-induced insulin release process. *Endocrine*. 2006; 30: 191-196.
38. Balbo SL, Grassioli S, Ribeiro RA, et al. Fat storage is partially dependent on vagal activity and insulin secretion of hypothalamic obese rat. *Endocrine*. 2007; 31-2:142-148.
 39. Chen W, Chen Z, Xue N, Zheng Z, Li S, Wang L. Effects of CB1 receptor blockade on monosodium glutamate induced hypometabolic and hypothalamic obesity in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2013; 386:721–32.
 40. Godfrey KM, Reynolds RM, Prescott SL, et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2017; 5-1: 53-64.
 41. Hoffman DJ, Reynolds RM, Hardy DB. Developmental origins of health and disease: current knowledge and potential mechanisms. *Nutrition Reviews*. 2017; 75-12: 951-970.
 42. Campos KE, Sinzato YK, Pimenta W de P, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of maternal obesity on diabetes development in adult rat offspring. *Life Sciences*. 2007; 81 -19: 473-1478.
 43. Vickers MH. Developmental Programming and Transgenerational Transmission of Obesity. *Annals Of Nutrition And Metabolism*. 2014; 64-1:26-34.
 44. Bertasso, IM. Efeito da intervenção cirúrgica bariátrica sobre o metabolismo lipídico hepático materno de ratas obesas e sua repercussão sobre a prole. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Parana, Cascavel, 2017.
 45. Puertas A, Magan-Fernandez A, Blanc V, et al. Association of periodontitis with preterm birth and low birth weight: a comprehensive review. *The Journal Of Maternal-fetal & Neonatal Medicine*. 2017; 31-5: 597-602.
 46. Pietrobon CB, Bertasso IM, Ribeiro RA. Maternal Roux-en-Y gastric bypass impairs insulin action and endocrine pancreatic function in male F1 offspring. *European Journal Of Nutrition*. 2019: 1-13.
 47. Manrique-Corredor EJ, Orozco-Beltran D, Lopez-Pineda A, Quesada JA, Gil-Guillen VF, Carratala-Munuera C. Maternal periodontitis and preterm birth: Systematic review and meta-analysis. *Community Dentistry And Oral Epidemiology*. 2019; 47-3: 243-251.

48. Martinez-Herrera, M, Silvestre Rangil, J; Silvestre, FJ. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2017; 708-715.
49. Jagannathachary S, Kamaraj D. Obesity and periodontal disease. *Journal Of Indian Society Of Periodontology*. 2010; 14-2: 96-100.
50. Leonard MB, Shults J, Wilson BA, Tershakovec AM, Zemel BS. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *The American Journal Of Clinical Nutrition*. 2004; 80-2: 514-523.
51. Stettler N, Berkowitz RI, Cronquist JL, et al. Observational Study of Bone Accretion During Successful Weight Loss in Obese Adolescents. *Obesity*. 2008; 16-1: 96-101.
52. Santos LC, Cintra IP, Fisberg M, Castro ML, Martini LA. Association among weight loss, bone mass, body composition and dietary intake of post-pubertal obese adolescents. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2008; 52- 6: 1001-1008.
53. Evans AL, Paggiosi MA, Eastell R, Walsh JS. Bone density, microstructure and strength in obese and normal weight men and women in younger and older adulthood. *J Bone Miner Res*. 2015; 30- 5: 920-928.
54. Wani K, Yakout SM, Ansari MGA, et al. Metabolic Syndrome in Arab Adults with Low Bone Mineral Density. *Nutrients*. 2019; 11- 6: 1-13.
55. Reid IR. Relationship between fat and bone. *Osteoporosis Internacional*. 2008; 19- 5:595-606.
56. Zhao LJ, Jiang H, Papasian CJ, et al. Correlation of obesity and osteoporosis: effect of fat mass on the determination of osteoporosis. *Journal of Bone Mineral Res*. 2008; 23-1:17-29.
57. Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes JN, et al. High-Fat Diet Induces Periodontitis in Mice through Lipopolysaccharides (LPS) Receptor Signaling: Protective Action of Estrogens. *Plos One*. 2012; 7- 11: 1-12.
58. Branchereau M, Reichardt F, Loubieres P, et al. Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with cardiometabolic adaptation to high-fat diet in mice. *American Journal Of Physiology-gastrointestinal And Liver Physiology*. 2016; 310-11:1091-1101.
59. Machado E, Zanatta GB, Assis CA, Zanatta FB. *Obesity as a risk factor for periodontitis: is that possible? RGO*. 2011; 59-1:45-50.

60. Armitage GC. Bi-directional relationship between pregnancy and periodontal disease. *Periodontology 2000*. 2012; 61-1:160-176.
61. Ren H, Du M. Role of Maternal Periodontitis in Preterm Birth. *Front. Immunol*. 2018; 8: 1-10.
62. Shirakashi DJ, Leal RP, Colombo NH, et al. Maternal Periodontal Disease in Rats Decreases Insulin Sensitivity and Insulin Signaling in Adult Offspring. *Journal Of Periodontology*. 2013; 84-3: 407-414.
63. Tsosura TVS, Chiba FY, Mattera MSLC, et al. Maternal apical periodontitis is associated with insulin resistance in adult offspring. *International Endodontic Journal*. 2019; 52-7: 1040-1050.
64. Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, et al. Periodontal Disease Decreases Insulin Sensitivity and Insulin Signaling. *Journal Of Periodontology*. 2012; 83-7: 864-870.
65. Pimentel SP, Casati MZ, Cirano FR, et al. Maternal periodontitis induces intergenerational injuries on reproductive performance of adult female rat offspring. *Braz. J. Vet. Res. Anim*. 2016; 53-4: 1-8.
66. Nilsson C, Larsson BM, Jennische E, et al. Maternal Endotoxemia Results in Obesity and Insulin Resistance in Adult Male Offspring. *Endocrinology*. 2001; 142: 2622-2630.
67. Campos KE, Volpato GT, Calderon IM, Rudge MV, Damasceno DC. . Effect of obesity on rat reproduction and on the development of their adult offspring. *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research*. 2008; 41-2: 122-125.
68. Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, et al. Maternal High-Fat Feeding Primes Steatohepatitis in Adult Mice Offspring, Involving Mitochondrial Dysfunction and Altered Lipogenesis Gene Expression. *Hepatology*. 2009; 50-6: 1796-1808.
69. Blackmore HL, Niu Y, Fernandez-Twinn DS, Tarry-Adkins JL, Giussani DA, Ozanne SE. Maternal Diet-induced Obesity Programs Cardiovascular Dysfunction in Adult Male Mouse Offspring Independent of Current Body Weight. *Endocrinology*. 2014; 155-10: 3970-3980.
70. Taylor PD, Samuelsson AM, Poston L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: a role for leptin. *Acta Physiologica*. 2014; 210- 3: 508-523.
71. Boyle KE, Patinkin ZW, Shapiro AL, Baker PR, Dabelea D, Friedman JE. Mesenchymal Stem Cells From Infants Born to Obese Mothers Exhibit Greater

- Potential for Adipogenesis: The Healthy Start BabyBUMP Project. *Diabetes*. 2015; 65-3: 647-659.
72. Olney JW. Brain Lesions, Obesity, and Other Disturbances in Mice Treated with Monosodium Glutamate. *Science*. 1969; 164-3880: 719-721.
 73. Sousa-Soares T, Andreolla AP, Miranda CA, et al. Effect of the induction of transgenerational obesity on maternal-fetal parameters, *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2017: 1-9.
 74. Lin D, Smith MA, Champagne C, Elter J, Beck J, Offenbacher S. *Porphyromonas gingivalis* Infection during Pregnancy Increases Maternal Tumor Necrosis Factor Alpha, Suppresses Maternal Interleukin-10, and Enhances Fetal Growth Restriction and Resorption in Mice. *Infection and Immunity*. 2003; 71-9: 5156-5162.
 75. Arce RM, Barros SP, Wacker B, Peters B, Moss K, Offenbacher S. . Increased TLR4 Expression in Murine Placentas after Oral Infection with Periodontal Pathogens. *Placenta*. 2009; 30-2: 156-162.
 76. Offenbacher S, Riché EL, Barros SP, Bobetsis YA, Lin D, Beck JD. Effects of Maternal *Campylobacter rectus* Infection on Murine Placenta, Fetal and Neonatal Survival, and Brain Development. *Journal Of Periodontology*. 2005; 76- 11: 2133-2143.
 77. Liang S, Ren H, Guo H, et al. Periodontal infection with *Porphyromonas gingivalis* induces preterm birth and lower birth weight in rats. *Molecular Oral Microbiology*. 2018; 33-4: 312-321.
 78. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*. 2016; 157- 4: 1326-1340.
 79. Teleken JL, Gomes ECZ, Marmentini C, et al. Glyphosate-based herbicide exposure during pregnancy and lactation malprograms the male reproductive morphofunction in F1 offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2019: 1-8.

ANEXOS



Autorização

O protocolo intitulado “Influência da obesidade-MSG e doença periodontal materna sobre a massa óssea mandibular da prole na vida adulta”, sob a responsabilidade de **Sandra Lucinei Balbo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, para fins de pesquisa científica encontra-se **Aprovado** para execução, está de acordo com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do UNIOESTE em reunião de 08/12/2017.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/2017 - 02/02/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico: <i>Rattus norvegicus</i> Wistar
N. de animais	20
Peso/Idade	100-200g/70 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE - campus Cascavel - PR.

Cascavel, 11/12/2017

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