

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

Ian de Meira Chaves

AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES PERIODONTAIS INDUZIDAS
PELO AUMENTO DO TECIDO ADIPOSEO EM CAMUNDONGOS

Belo Horizonte

2020

IAN DE MEIRA CHAVES

Avaliação de alterações periodontais induzidas pelo aumento do
tecido adiposo em camundongos

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais como requisito
parcial para obtenção do grau de
mestre em Ciências Biológicas:
Microbiologia.

Orientador: Profa. Dra. Mila Fernandes
Moreira Madeira

Belo Horizonte

2020

043

Chaves, Ian de Meira.

Avaliação de alterações periodontais induzidas pelo aumento do tecido adiposo em camundongos [manuscrito] / Ian de Meira Chaves. – 2020.
63 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Doenças Periodontais. 3. Obesidade. 4. Inflamação. 5. Dieta hiperlipídica. 6. Camundongos. I. Madeira, Mila Fernandes Moreira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME DO ALUNO: IAN DE MEIRA CHAVES - 2018684811

Título do Trabalho: "Avaliação de alterações periodontais induzidas pelo aumento do tecido adiposo em camundongos"

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Membros da banca:

Dra. Tarcília Aparecida da Silva
Dra. Adaliene Versiani Matos Ferreira

Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira
(Orientadora)

Dra. Daniele da Glória de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-graduação
em Microbiologia/UFMG

Belo Horizonte, 21 de fevereiro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 23/09/2022, às 08:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1781249** e o código CRC **80178568**.

Referência: Processo nº 23072.231970/2021-40

SEI nº 1781249

Agradecimentos

À minha orientadora, Mila Fernandes Moreira Madeira, por todos esses anos de orientação, amizade e disponibilidade.

A todos os colaboradores deste projeto, incluindo a Dr Marina Campos Zicker, Prof. Poliana Mendes Duarte, Prof. Mauro Martins Teixeira, Prof. Daniele da Glória de Souza, Prof. Tarcília Aparecida da Silva e Prof. Adaliene de Matos Versiani.

À Mariana e Thales, por toda ajuda nos experimentos.

Ao Celso e Aninha pelas críticas e sugestões no desenvolvimento do projeto.

À equipe técnico-administrativo da UFMG.

À minha família e namorada Gabi, que me encorajaram e estiveram ao meu lado, dando suporte nos piores e melhores momentos.

A todos os meus amigos que fiz no curso de Ciências Biológicas e no ICB.

À toda a família LIMHO que, há 6 anos, estão presentes no meu desenvolvimento como pesquisador, como pessoa, e que, certamente, serão grandes amigos para a vida toda.

Às agências de fomento.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma condição inflamatória de etiologia infecciosa, que acomete os tecidos de suporte dos dentes. Alterações na homeostase da microbiota bucal podem desencadear uma resposta inflamatória exacerbada, podendo levar ao comprometimento dos tecidos periodontais. A obesidade é um problema de saúde pública mundial, associado ao excesso no consumo de gorduras e carboidratos refinados. O aumento do tecido adiposo corporal pode contribuir para a ativação da resposta inflamatória sistêmica, levando a comorbidades. Alguns estudos demonstraram que pacientes obesos apresentam maior incidência de DP que pacientes eutróficos, entretanto, os mecanismos ainda não são bem esclarecidos. Já foi demonstrado que o aumento de tecido adiposo é capaz de induzir uma perda óssea alveolar similar à observada em modelo experimental de DP. Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos na perda óssea alveolar induzida pelo aumento de tecido adiposo em camundongos, além de avaliar um possível papel da microbiota bucal neste processo. Para isto, camundongos foram submetidos a dietas controle ou rica em lipídeos (HF). Camundongos deficientes para o receptor de leptina (*db/db^{-/-}*) também foram utilizados. Os resultados deste estudo mostram que o aumento de tecido adiposo, por dieta HF ou por alteração genética, induziu o recrutamento de neutrófilos e perda óssea alveolar em camundongos, associados a uma disbiose do biofilme bucal. A depleção da microbiota bucal pelo uso de CHX preservou a condição óssea fisiológica. Assim, os resultados mostram que modificações na microbiota bucal e o infiltrado neutrofílico possuem um papel importante na perda óssea alveolar induzida pelo aumento do tecido adiposo.

Palavras chave: Doença periodontal, obesidade, inflamação, dieta hiperlipídica, camundongos, microbiota bucal.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is an inflammatory condition of infectious etiology, which affects the supporting tissues of the teeth. Changes in oral microbiota homeostasis can trigger an exacerbated inflammatory response, which can lead to impairment of periodontal tissues. Obesity is a worldwide public health problem, associated with high consumption of fats and carbohydrates. Increased body fat tissue may contribute to the activation of the systemic inflammatory response, leading to comorbidities. Some studies have shown that obese patients have a higher incidence of PD than eutrophic. However, mechanisms are still unclear. It has been shown that increased adipose tissue can induce alveolar bone loss similar of what is observed in an experimental model of PD. Thus, this study aimed to investigate the mechanisms involved in alveolar bone loss induced by the increase in adipose tissue in mice, also assessing a role of the oral microbiota in this process. For this, mice were submitted to control or high fat (HF) diet. Leptin receptor-deficient mice (*db/db*^{-/-}) were also used. The results show that the increased adipose tissue, through HF diet or by genetic alteration, induced neutrophils recruitment and alveolar bone loss in mice, associated with a dysbiosis of the oral biofilm. The depletion of the oral microbiota by the use of CHX preserved the physiological bone conditions. Thus, the results show that changes in the oral microbiota and a neutrophilic infiltrate may play an important role in alveolar bone loss induced by the increase in adipose tissue.

Keywords: Periodontal disease, obesity, inflammation, high fat diet, mice, oral microbiota

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática de um tecido periodontal saudável, com gengivite ou com periodontite.....	15
Figura 2. Sucessão de eventos que culminam em periodontite.	17
Figura 3- Esquema representativo do desenho experimental deste estudo..	29
Figura 4. Avaliação de parâmetros metabólicos relacionados à dieta HF e de parâmetros periodontais relacionados à dieta HF, associada ou não à inoculação de <i>A. actinomycetemcomitans</i> . (A).	36
Figura 5. Comparativo de parâmetros entre animais alimentados com as dietas labina, AIN-93 ou HF..	38
Figura 6. Índice de adiposidade e alterações na maxila de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta HF (HF) nos períodos de 5 ou 8 semanas.....	39
Figura 7 : Alterações dos níveis de citocinas no tecido de adiposo de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta HF (HF) nos períodos de 5, 8 ou 12 semanas.	40
Figura 8 Análise microbiológica de tecidos periodontais de animais alimentados com dieta controle (C) ou HF (HF).....	42
Figura 9 Parâmetros avaliados em animais sob as dietas controle (C), HF (HF) ou HF tratados com CHX (CHX).	43
Figura 10. Análises de micro-CT de ossos longos de animais alimentados com dieta controle (C), HF (HF) ou HF tratados com CHX (CHX).	45
Figura 11. Quantificação de citocinas nos tecidos periodontais de animais sob dieta controle (C), HF (HF) ou HF tratados com clorexidina (CHX).	46
Figura 12. Contagem de enterobactérias nas fezes de animais alimentados com dieta controle (C), dieta HF (HF) ou alimentados com dieta HF tratados com CHX (CHX) nos períodos de 8 ou 12 semanas.	47
Figura 13. Análise de perda óssea alveolar de camundongos WT ou <i>db/db</i> ^{-/-}	48
Figura 14. Parâmetros inflamatórios de citocinas e adipocinas avaliados nos tecidos periodontais de camundongos WT (WT) e animais deficientes para o receptor de leptina (<i>db/db</i> ^{-/-}).	49
Figura 15. Parâmetros inflamatórios de citocinas e moléculas relacionadas à reabsorção óssea avaliadas no soro de animais WT (WT) e <i>db/db</i> ^{-/-}	50

Lista de abreviaturas

μL – Microlitros

Aa - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

CDT - Toxina distensora citoletal

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CHX – Clorexidina

COA - Crista óssea alveolar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP - Doença periodontal

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

HF - *High fat*

eHOMD – extended *Human Oral Microbiome Database*

HTAB - Hexadeciltrimetilamônio

IFN- γ - interferon-gama

IL – Interleucina

IMC- Índice de Massa Corporal

JCE- Junção cimento-esmalte

Kcal - Quilocalorias

Kg - Quilogramas

LEPR – Leptin Receptor

LPS – Lipopolissacarídeo

LTB4 - Leucotrieno B4

LtxA - Leucotoxina A

m - Metro

mg - Miligramas

MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos

mL – Mililitros

MPO - Mieloperoxidase

NF κ B - Fator nuclear kappa B

nm- Nanômetros

OD – Densidade óptica

OMS - Organização Mundial de Saúde

OPG - Osteoprotegerina

PAF- *Platelet-activating fator* (Fator de ativação plaquetária)

PBS – Tampão salina fosfato

PGC - Percentual de gordura corporal

Rpm- Rotações por minuto

RANK - Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL - Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

SNC- Sistema nervoso central

TAE- Tecido adiposo epididimal

TAM - Tecido adiposo mesentérico

TAR- Tecido adiposo retroperitoneal

TGF- β - *Transforming growth factor- β* (Fator de transformação de crescimento- β)

TRAP - *Tartrate-resistant acid phosphatase* (Fosfatase ácida resistente ao tartarato)

TLR - *Toll-like receptor* (Receptor do tipo *Toll*)

TMB - Tetrametilbenzedina

TSA - *Tryptic Soy Agar*

TSB - *Tryptone Soya Broth*

UFC- Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1.1 Quadros clínicos da doença periodontal.....	14
1.1.2 Envolvimento dos microrganismos na patogênese da DP	16
1.1.3 Resposta imunológica relacionada à DP	18
1.1.4 Associação de DP com outras doenças	20
1.2 Obesidade	20
1.2.1 Fatores que induzem a obesidade	21
1.2.2 Tecido adiposo e adipocinas	22
2. Justificativa	24
3. Hipótese	24
4. Objetivos	24
4.1 Objetivo geral	24
4.2 Objetivos específicos.....	24
5. Material e Métodos.....	25
5.1 Animais.....	25
5.2 Protocolo de indução da obesidade.....	26
5.3 Abordagem experimental	27
5.4 Indução do modelo experimental de DP.....	29
5.5 Depleção da microbiota bucal.....	30
5.6 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	30
5.7 ELISA	31
5.8 Avaliação da perda óssea alveolar	32
5.9 Micro tomografia computadorizada (micro-CT)	32
5.10 Avaliação de espécies bacterianas na cavidade bucal por hibridização DNA-DNA	33
5.11 Avaliação da microbiota intestinal.....	33
5.12 Análises estatísticas.....	34
6. Resultados	35
7. Discussão	51
8. Referências.....	55

1. INTRODUÇÃO

A cavidade bucal de mamíferos é considerada um ambiente intensamente colonizado por microrganismos, formando a sua microbiota. No corpo humano, a composição da microbiota em cada sítio é bem diversa (Blum, 2017). Estima-se que existam cerca de 100 milhões de células bacterianas em um mililitro de saliva humana, em um indivíduo saudável, além disso, a microbiota bucal também é composta por protozoários, *Archaea*, vírus e fungos (Deng et al., 2017). Esses diferentes microrganismos ocupam uma enorme variedade de sítios na cavidade bucal dos seres humanos e de outros animais (Curtis, Zenobia, & Darveau, 2011). O banco de dados *expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD)* abrange todas as espécies bacterianas presentes no trato aero digestivo humano, que engloba os tratos digestivo superior e respiratório superior. O banco de dados contém 771 espécies, sendo 687 da sua versão anterior, que compreendia apenas espécies da cavidade bucal. De todas as espécies presentes no banco de dados, 57% são oficialmente nomeadas, 13% são cultiváveis, porém não nomeadas; e 30% são conhecidas apenas como não cultiváveis. Das bactérias cultiváveis, a grande maioria no banco de dados pertence aos filos Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria.

Os microrganismos da cavidade bucal estão dispostos em estruturas organizadas e complexas denominadas biofilmes (Edlund et al., 2018; Marsh, 2004). O biofilme bucal é uma comunidade microbiana única no corpo humano, que contém inúmeros microrganismos envoltos por uma matriz composta por exopolissacarídeos, proteínas e ácido nucleico (Solano, Echeverz & Lasa, 2014). Essas estruturas proporcionam proteção aos microrganismos contra estresses ambientais, sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (Solano et al., 2014). Em homeostase, esses microrganismos dispostos em biofilmes podem coexistir entre si e com o hospedeiro sem causar dano (Kolenbrander et al., 2010). Na cavidade bucal, os microrganismos estão presentes em diferentes sítios como: mucosas, dorso da língua, esmalte dos dentes, superfície radicular exposta, ou superfícies sintéticas, como

próteses. O biofilme dentário está associado aos dentes e pode ser classificado com base em sua localização como: supragengival (presente coronariamente em relação à margem gengival) ou subgengival (presente apicalmente em relação à margem gengival) (Kolenbrander et al., 2010).

Em um estado de eubiose, ou seja, na relação de equilíbrio entre a microbiota e o seu hospedeiro, a microbiota residente desempenha importantes papéis como imunomodulação (Devine, Marsh, & Meade, 2015) e proteção pela competição com outros microrganismos não residentes, dificultando a colonização por possíveis patógenos (Dethlefsen, McFall-Ngai & Relman, 2007). Mudanças na homeostase dessa complexa comunidade microbiana, relacionadas a um desequilíbrio na composição da microbiota bucal, ou disbiose, podem ser suficientes para o início de um processo inflamatório nos tecidos periodontais e, conseqüentemente, o estabelecimento de doenças como a doença periodontal (DP) (Hajishengallis & Lamont, 2012).

A microbiota bucal envolve a presença de microrganismos mutualistas, comensais e microrganismos denominados patobiontes (Hajishengallis, 2014). Patobiontes são microrganismos residentes com a capacidade de causar dano ao hospedeiro dentro de um contexto disbiótico, ou seja, quando há alterações na microbiota homeostática do biofilme subgengival. Há também microrganismos que possuem um papel fundamental na manutenção da disbiose na cavidade bucal, conhecidos como microrganismos-chave ou *keystone-pathogen* (Hajishengallis, 2014). Em situações de homeostase, esses microrganismos não são diretamente prejudiciais ao hospedeiro, porém, em disbiose, a presença de microrganismos-chave pode estar relacionada a processos patológicos, uma vez que eles podem favorecer, por exemplo, o aumento da virulência de algum patobionte, além de exercer mecanismos de patogenicidade que favoreçam a exacerbação da resposta inflamatória e destruição tecidual (Hajishengallis, 2014).

1.1 Doença periodontal

A DP é uma doença inflamatória de origem infecciosa, caracterizada pela destruição dos tecidos de suporte dos dentes, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Savage et al., 2009). Uma nova

classificação foi adotada em 2017, na qual as formas clínicas de DP previamente denominadas como “periodontite crônica” ou “periodontite agressiva” são agora agrupadas em uma única categoria: periodontite (Papapanou et al., 2018)

A DP é um problema mundial de saúde pública (Dumitrescu, 2016), acometendo cerca de 50% de adultos acima de 30 anos nos Estados Unidos, sendo a gengivite a forma clínica mais comum (Eke et al., 2012). No Brasil, um estudo analisando artigos publicados entre 1993 e 2003, mostrou que a prevalência média da DP (incluindo gengivite e periodontite) foi de 91,4%, sendo que a maioria do grupo amostral apresentava menos de 20 anos de idade, sem distinção entre periodontite e gengivite (Chambrone, Lima, & Chambrone, 2008). Além disso, Oppermann (2007) demonstrou um aumento da prevalência e/ou gravidade da DP em relação a alguns fatores como tabagismo e baixos níveis socioeconômicos (Oppermann, 2007), além de maiores índices de DP em pacientes obesos (Al-Zahrani, Bissada & Borawski, 2003).

Apontada como a causa mais comum de perda dentária na população adulta (Gasparetto, Chavez & Campos, 2000), a DP pode prejudicar também o processamento do alimento na cavidade bucal, interferindo nos processos de mastigação e deglutição, além de trazer prejuízos à fala do indivíduo e à estética, acarretando em impactos na autoestima (Papapanou & Susin, 2017). Além de impactos locais da região periodontal, a DP está também relacionada a diversas outras condições e comorbidades como diabetes, doenças cardiovasculares, artrite reumatoide, Alzheimer e obesidade (Revisto por Garcia, Henshaw & Krall, 2001; Dominy et al., 2019).

1.1.1 Quadros clínicos da doença periodontal

A DP apresenta-se em duas principais formas clínicas: a gengivite e a periodontite (Figura 1).

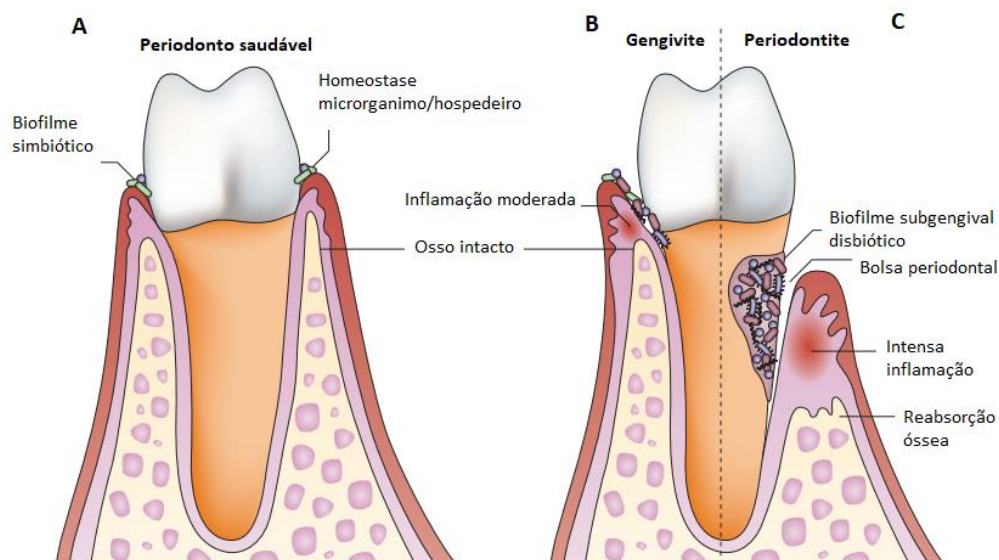


Figura 1. Representação esquemática de um tecido periodontal saudável, com gengivite ou com periodontite. (1A) tecido periodontal saudável com uma microbiota homeostática e a integridade do osso alveolar. (1B) tecido periodontal com gengivite, mostrando inflamação no tecido gengival, com a presença de uma microbiota disbiótica; (1C) tecido periodontal com periodontite: é possível observar, além da microbiota disbiótica, uma intensa inflamação gengival e reabsorção óssea alveolar. Fonte: (Modificado de Hajishengallis, 2015)

A gengivite (Fig. 1B) é o quadro clínico mais comum de DP, manifesta-se por sinais clínicos clássicos como inflamação na gengiva marginal aos dentes, causando inchaço no local e sangramento após um estímulo mecânico (Lushnikova et al., 2012). O aparecimento dos sintomas da gengivite está diretamente ligado ao acúmulo de microrganismos no biofilme subgengival, o que pode resultar em disbiose e indução dos sinais inflamatórios característicos (Eberhard et al., 2013). Os danos teciduais relacionados à gengivite são reversíveis, dependendo do controle mecânico do biofilme dental, representado principalmente por higienização regular dos dentes pela escovação e uso do fio dental (Chapple et al., 2015).

Assim como na gengivite, a periodontite (Fig. 1C) também relaciona-se à disbiose do biofilme subgengival, sendo considerada uma doença mais grave, gerando lesão nas fibras colágenas do ligamento periodontal, responsáveis pela junção da gengiva, dentes e osso alveolar (Savage et al, 2009). Além disso, a reabsorção do osso alveolar é uma condição característica da periodontite, sendo que em casos mais graves, sem tratamento e acompanhamento, pode ocorrer a perda do elemento dental (Graves &

Cochran, 2003). Tanto o tratamento quanto o acompanhamento visam o controle do biofilme subgengival com a finalidade de interrupção e controle da progressão da DP. O tratamento periodontal inclui intervenção profissional nas bolsas periodontais por procedimentos de raspagem e alisamento radicular, além de melhoria da higiene bucal (Worch, Listgarten, & Korostoff, 2001). Entretanto, não existe tratamento definitivo para a DP. O controle químico da periodontite é recomendado em casos específicos, associados a intervenções cirúrgicas ou não cirúrgicas (Worch et al., 2001).

1.1.2 Envolvimento dos microrganismos na patogênese da DP

Socransky e colaboradores (1998) classificaram as comunidades bacterianas periodontais com base em um sistema de cores, que refletiu a análise de agrupamento, a ordenação da comunidade e a gravidade da DP associada (Sigmund, Socransky & Haffajee, 2002; Socransky et al., 1998). Estes autores agruparam as bactérias relacionadas à DP nos complexos amarelo, verde, violeta e azul, formados por colonizadores iniciais; complexo laranja, composto por bactérias como *Fusobacterium nucleatum* de diferentes subespécies, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus constellatus* e três espécies do gênero *Campylobacter*. As bactérias do complexo laranja são capazes de facilitar e criar condições para a colonização de bactérias do complexo vermelho, agindo como microrganismos acessórios, estando, assim, relacionadas também à DP (Cortelli et al., 2011). Por último, as bactérias do complexo vermelho são *Porphyrononas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, que possuem uma forte relação com a DP, apontadas até então como as principais bactérias relacionadas à periodontite (Socransky et al., 1998). Além das bactérias descritas por Socransky relacionadas à DP, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), sorotipo b, é uma bactéria Gram-negativa do filo Proteobacteria, sendo um dos microrganismos mais associados à periodontite de progressão rápida, que atinge principalmente adultos jovens (Henderson, Ward & Ready, 2010).

Tem sido demonstrado, por meio de técnicas mais eficientes e mais precisas de biologia molecular, como a metagenômica e metatranscriptômica,

que a presença e atividade dos periodontopatógenos não seriam os fatores determinantes para a patogênese da DP. O contexto disbiótico do biofilme dental e a sinergia dos microrganismos do biofilme subgingival tem sido o fator determinante mais bem aceito (Hajishengallis, 2015). Neste contexto disbiótico, pacientes com periodontite possuem menor diversidade funcional e taxonômica da microbiota bucal, contendo uma microbiota disbiótica apresentando regulação positiva de diversos fatores de patogenicidade (Deng et al., 2017).

A DP, portanto, está associada à disbiose e à indução e manutenção do processo inflamatório periodontal, representando um *feedback* positivo entre ambos. Neste processo, a disbiose é capaz de gerar um processo inflamatório e, com isso, provocar alterações no tecido, que atuam na manutenção do processo disbiótico, como demonstrado na figura 2 (Hajishengallis, 2015). Assim, a resposta inflamatória representa uma fonte de nutrientes para os microrganismos do biofilme subgingival pela geração de produtos da quebra tecidual, contribuindo para a manutenção da disbiose (Hajishengallis & Lamont, 2012).

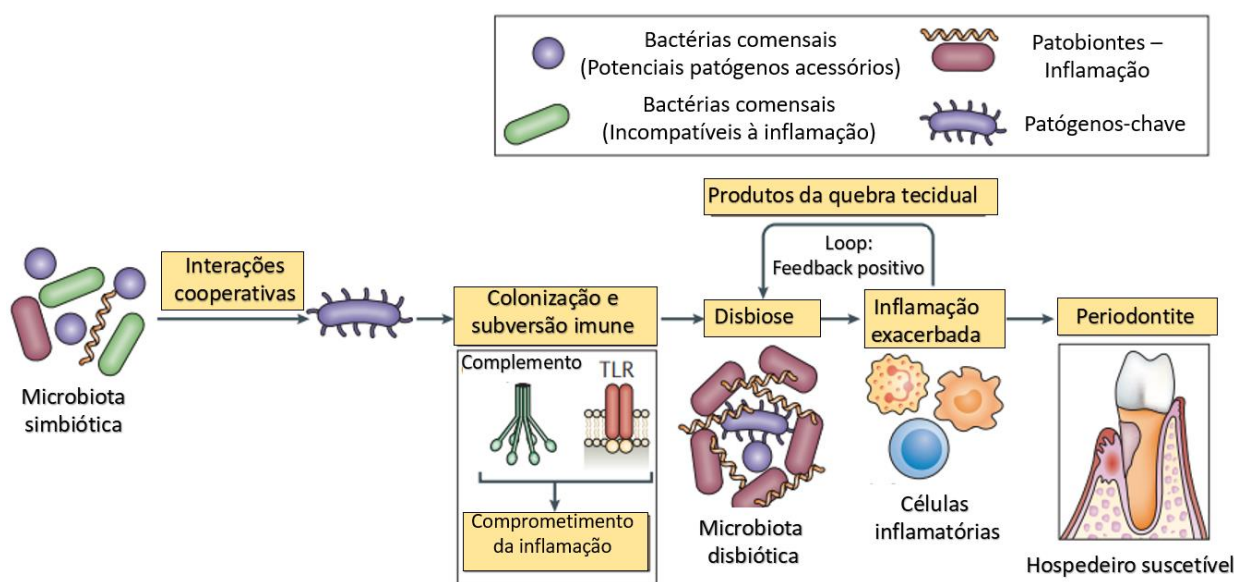


Figura 2. Sucessão de eventos que culminam em periodontite. Uma microbiota disbiótica gera um processo inflamatório exacerbado, fazendo com que ocorra uma destruição do tecido periodontal, característica principal da periodontite, incluindo a reabsorção do osso alveolar de suporte. A Inflamação e disbiose possuem um *feedback* positivo, uma vez que a microbiota disbiótica pode usar alguns produtos da quebra de tecido causada pela inflamação, como nutrientes. Fonte: (Modificado de Hajishengallis, 2015)

1.1.3 Resposta imunológica relacionada à DP

A disbiose da microbiota subgengival é um fator determinante na patogênese da DP, mas não é suficiente para o seu estabelecimento, uma vez que o processo inflamatório e o *feedback* positivo entre esses dois elementos são fundamentais para patogênese da doença (Hajishengallis, 2015).

Os processos inflamatórios possuem um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual e sistêmica. Microrganismos são reconhecidos pelo sistema imune inato de seres humanos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como, por exemplo, os receptores do tipo *Toll* (TLRs), presentes nos macrófagos residentes (Medzhitov, 2010) assim como em outros tipos celulares. Após o reconhecimento, pode ocorrer o início do processo de ativação da resposta imune inata no tecido periodontal (Darveau, 2010).

Uma importante estratégia utilizada pelo sistema imune do hospedeiro para defesa contra microrganismos potencialmente patogênicos é a produção e secreção de citocinas, que são uma família de proteínas fortemente envolvidas na regulação da resposta inflamatória (Revisto por Zhang, 2007). Já foram descritos diversos mediadores inflamatórios com papel na regulação da DP como, por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-8, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF) (Pollreisz et al., 2010; Hung et al., 2013). Na DP relacionada a *A. actinomycetemcomitans*, já foi demonstrado diferentes níveis de produção de IFN- γ , que tem uma participação neste processo (Revisto por Zadeh, Nichols & Miyasaki, 2000). Camundongos deficientes para a produção da citocina IFN- γ , por exemplo, apresentaram uma menor perda óssea alveolar, mostrando um papel significativo dessa citocina na patogênese da DP (Garlet et al., 2008). Outros mediadores inflamatórios possuem papéis importantes na patogênese da DP induzida por *A. actinomycetemcomitans*, como o fator inibidor da migração de macrófagos - MIF (Madeira et al., 2012), além dos mediadores lipídicos fator de ativação plaquetária – PAF (Madeira et al., 2013) e leucotrieno B4 (LTB4) (Madeira et al., 2017).

Em um contexto geral de inflamação não somente vinculado à DP, outras citocinas, como IL-10 e o fator de transformação de crescimento β (TGF- β), possuem caráter anti-inflamatório, ou seja, possuem papel importante na regulação negativa da resposta inflamatória (Revisto por Zhang & Na 2007). Um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e diminuição na produção de citocinas anti-inflamatórias, em determinados locais, combinados a outros fatores, podem ser fortes indicativos da progressão do processo inflamatório, no contexto da DP (Revisto por Feng & Weinberg, 2006).

A perda óssea alveolar relacionada à DP está diretamente ligada à atividade das células de reabsorção óssea, os osteoclastos. Alguns mediadores inflamatórios atuam na diferenciação e ativação de osteoclastos, como TNF, IL-1 β e IL-17, apresentando um papel essencial na patogênese da DP (Revisto Hienz, Paliwal & Ivanovski, 2015). RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand*) é expresso por osteoblastos, células estromais da medula óssea, células T ativadas, células B, fibroblastos, células endoteliais, condrócitos e células epiteliais mamárias (Kearns, Khosla, & Kostenuik, 2008). O receptor de RANKL, RANK (*Receptor activator of nuclear factor kappa- B*) é expresso nas superfícies de osteoblastos e fibroblastos (Revisto por Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015). Ambos já foram reconhecidos como importantes reguladores da formação de osteoclastos (Crotti et al., 2003). Por outro lado, a osteoprotegerina (OPG), um receptor *decoy*, liga-se ao RANKL, não permitindo a interação entre RANK e RANKL. Assim, OPG atua como um inibidor da diferenciação dos osteoclastos, contribuindo para a manutenção da homeostase óssea (Kearns, Khosla, & Kostenuik, 2018). Um aumento da razão RANKL / OPG pode ser um forte indício de sinalização celular favorecendo a atividade de osteoclastos e reabsorção óssea. Na DP já foi demonstrado níveis significativamente maiores de RANKL e significativamente menores de OPG no tecido periodontal de pacientes com periodontite (Crotti et al., 2003). Algumas citocinas pró-inflamatórias que são produzidas nos tecidos periodontais, em pacientes com periodontite, tais como TNF e IL-1 β , estão relacionadas à maior produção de RANKL (Hofbauer et al., 1999).

1.1.4 Associação de DP com outras doenças

Além dos fatores relacionados aos danos diretamente causados aos tecidos periodontais na DP, é importante destacar que existem associações descritas entre a DP e outras condições sistêmicas (Revisto por Garcia, Henshaw & Krall, 2001). Há estudos que mostram uma relação da DP com câncer (Fitzpatrick & Katz, 2010); artrite reumatoide (Detert et al., 2010; Queiroz-Junior et al., 2011), pneumonia bacteriana; diabetes (Revisto por Garcia, Henshaw & Krall, 2001); doenças cardiovasculares (Desvarieux et al., 2013; Leishman et al., 2012) e obesidade (Al-Zahrani et al., 2003). Já foi demonstrado, por exemplo, que pacientes obesos apresentam maior incidência de DP que pacientes não obesos, sugerindo que a obesidade seja um possível fator de risco para a DP (Al-Zahrani et al., 2003), sendo, posteriormente, também correlacionado como uma comorbidade (Hegde et al., 2019).

1.2 Obesidade

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um acúmulo de gordura corporal anormal ou excessiva, avaliado pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC), que pode prejudicar a saúde (WHO, 2017). Além disso, é considerada uma condição crônica, reconhecida como doença pela OMS desde 1985. O cálculo do IMC é feito individualmente, utilizando-se a fórmula $\text{peso (Kg)} / \text{altura (m)}^2$. O resultado avalia se o indivíduo está abaixo do peso, no peso “adequado” (eutrófico) ou acima do peso (obeso). Por essa definição, uma pessoa com IMC acima de 30 é definida como obesa e um resultado de IMC variando de 25 a 30 indica sobrepeso. Entretanto, o cálculo do IMC pode ser impreciso, pois não informa sobre a distribuição da gordura corporal, ou seja, não reflete o acúmulo de gordura visceral e não distingue gordura de massa magra (Gurunathan & Myles, 2016). Atletas de alto rendimento, por exemplo, com grande quantidade de massa muscular, possuem um IMC similar ao de um indivíduo obeso, mesmo tendo percentuais baixos de gordura corporal. Assim, acredita-se que o uso, em maior escala, do percentual de gordura corporal (PGC) seja um parâmetro melhor para a definição de obesidade (Güngör, 2014)

Estimativas da OMS mostram que pelo menos 2,8 milhões de pessoas no mundo morrem, a cada ano, devido ao sobrepeso ou obesidade (OMS, atualizado em outubro de 2017). No Brasil, um estudo de 2018, mostrou que o excesso de peso cresceu 30,75% em doze anos (2006 - 2018), chegando a 55,7% em 2018. Além disso, a obesidade cresceu 67,8% em doze anos, chegando a 19,8% em 2018 (Vigitel Brasil, 2019), o que mostra uma necessidade crescente de entendimento dos possíveis impactos dessa doença. Em outros países, como nos EUA, há quase 40% de adultos obesos (Hales et al., 2017).

1.2.1 Fatores que induzem a obesidade

O balanço energético positivo de um indivíduo (quando consome-se mais calorias do que se gasta, com acúmulo de energia) é um fator de grande importância no ganho de tecido adiposo e, conseqüentemente na obesidade. O acúmulo de energia nos adipócitos, pelo armazenamento de gordura, somado à alta quantidade de lipídios no plasma, são fatores responsáveis pelo aumento de tecido adiposo. Esse aumento pode estar relacionado ao aumento de tamanho e/ou do número de adipócitos (Alemanya, 2012).

O balanço energético é um reflexo da quantidade de comida e de quilocalorias ingeridas nas refeições de um indivíduo (Kral & Rolls, 2012). Uma “má” alimentação, baseada em alimentos com altas densidades de energia, como, por exemplo, com altos teores de gordura, leva a maior ingestão de quilocalorias (Rolls et al., 1999). Além disso, vale ressaltar que a ingestão de alimentos não é o único fator a ser considerado. O balanço energético do indivíduo e sua relação com a obesidade requer a avaliação de outros fatores, como a frequência da prática de atividades físicas, sono, ganho de peso induzido por drogas, disfunções endócrinas, etnia, idade, predisposições genéticas, infecções, políticas públicas, dentre outros (Wright & Aronne, 2012).

O intestino possui uma microbiota das mais diversas do corpo humano (Costello et al., 2009), modulada principalmente pela dieta (Zhang et al., 2010). Há diferenças consideráveis entre a microbiota de um indivíduo obeso em relação a um indivíduo eutrófico (Revisto por Miele et al., 2015). Já foi

demonstrado que pacientes obesos apresentam menores níveis de Bacteroidetes e maiores níveis de Firmicutes, quando comparados a pacientes eutróficos (Bessesen, 2006). Além disso, maiores níveis de enterobactérias também já foi demonstrado em pacientes obesos (Peters et al., 2018).

A microbiota intestinal tem sido considerada um importante fator relacionado à obesidade (Revisto por Zhao, 2013) e estudos mostram, por exemplo, que:

- Camundongos isentos de microbiota (*germ-free*), convencionalizados com fezes de camundongos obesos, aumentaram consideravelmente seus níveis de adiposidade, após o processo de convencionalização, sugerindo que a microbiota pode contribuir para o acúmulo de gordura (Turnbaugh et al., 2008).
- Camundongos *germ-free* apresentam resistência à indução da obesidade pelo consumo de uma dieta rica em lipídios (Backhed et al., 2007).
- Camundongos deficientes para produção de leptina (*ob/ob^{-/-}*), que desenvolvem obesidade e resistência à insulina, apresentaram reversão no fenótipo de obesidade e resistência à insulina, quando tratados com coquetel de antimicrobianos contendo ampicilina e neomicina (Cani et al., 2008).

1.2.2 Tecido adiposo e adipocinas

Existem dois principais tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo marrom e o branco. O tecido adiposo marrom é negativamente relacionado à obesidade e contribui para o gasto energético, mantendo a temperatura do corpo constante, além de possuir um papel importante na resposta a mudanças sistêmicas relacionadas ao balanço energético (González-Muniesa et al., 2017).

O tecido adiposo branco é mais conhecido por ser um órgão responsável pelo armazenamento do excesso de energia em forma de gordura (Trayhurn & Beattie, 2001). Alguns aspectos do tecido são importantes na sua avaliação como: hipertrofia (aumento em tamanho) ou hiperplasia (aumento em número) dos adipócitos, fatores regulados por condições ambientais e genéticas

(Revisto por Choe et al., 2016); infiltrado de macrófagos; ativação de células endoteliais e fibrose no tecido (Revisto por Maury & Brichard, 2010).

O tecido adiposo branco tem sido considerado um órgão endócrino, atuando também na síntese de compostos biologicamente ativos, tais como as adipocinas, que são um grupo de peptídeos ou proteínas com atividades biológicas relacionadas à imunidade e à homeostase energética e vascular (Revisto por Maury & Brichard, 2010; revisto por Coelho, Oliveira, & Fernandes, 2013). A leptina e a adiponectina são exemplos de adipocinas produzidas essencialmente pelo tecido adiposo, enquanto outras adipocinas podem ser produzidas por outros tipos celulares, incluindo macrófagos (Revisto por Maury & Brichard, 2010). A adiponectina possui caráter anti-inflamatório e é negativamente regulada na obesidade (Arita et al., 1999) Essa característica inclui o fato dessa adipocina ter ações diretas sobre macrófagos, além de efeitos indiretos na inibição da produção e ação de TNF (Yokota et al., 2000).

A leptina possui um importante papel na comunicação do estado de saciedade energética do corpo ao sistema nervoso central (SNC), que irá permitir o gasto energético e suprimir a ingestão alimentar, regulada pela fome (Revisto por Bates & Myers, 2003). Ao contrário da adiponectina, a leptina desempenha um papel pró-inflamatório, a partir da ligação ao receptor “LEPR”, pertencente à superfamília de receptores de citocinas de classe I (Revisto por Abella et al., 2017). A leptina é capaz de induzir, em monócitos, a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF e IL-6 (Revisto por Abella et al., 2017). A citocina TNF, por exemplo, é encontrada em níveis aumentados no soro de pacientes obesos, porém, em caso de perda de peso, há concomitantemente uma diminuição nos níveis de TNF (Dandona et al., 1998). Camundongos *db/db*^{-/-}, que carregam uma mutação no gene que codifica os receptores de leptina, são utilizados como modelo de obesidade sem a necessidade do uso da dieta HF (Bogdanov et al., 2014).

Foi demonstrado que outra adipocina, a quemerina, também é produzida em maior quantidade na obesidade (Bozaoglu et al., 2018). Em relação ao impacto da obesidade no metabolismo ósseo, um estudo demonstrou que a quemerina é capaz de aumentar a função de osteoclastos (Shapses &

Sukumar, 2012), com envolvimento na perda óssea alveolar em camundongos (Ramos-Junior et al., 2017). Entretanto, o papel da microbiota bucal e dos mediadores inflamatórios nos tecidos periodontais, provenientes do aumento do tecido adiposo, nos indivíduos obesos, ainda não é bem esclarecido.

2. Justificativa

Tanto a DP quanto a obesidade são doenças inflamatórias crônicas. Assim, há um crescente interesse pela identificação de mecanismos que possam esclarecer a associação entre ambas, o que mostra a necessidade de estudos mais esclarecedores com objetivo de aprimorar o entendimento dos processos patológicos envolvidos nessa comorbidade, incluindo uma possível alteração da microbiota bucal. Sabendo-se que pacientes obesos têm maior incidência de DP que pacientes eutróficos, é importante estudar e avaliar o efeito de causalidade e as relações diretas, uma vez que os mecanismos biológicos relacionados ainda não foram totalmente elucidados.

3. Hipótese

A obesidade induz perda óssea alveolar associada à produção de mediadores inflamatórios e alterações na microbiota bucal.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos periodontais induzidos pela obesidade em camundongos e avaliar o envolvimento da resposta inflamatória e da microbiota bucal nas alterações observadas.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1. Avaliar o efeito do consumo da dieta HF no osso alveolar:

- a. Caracterizar a indução da obesidade avaliando o índice de adiposidade, produção de leptina e adiponectina.

- b. Avaliar o nível ósseo alveolar e parâmetros inflamatórios nos tecidos periodontais de camundongos infectados por *A. actinomycetemcomitans*, alimentados com as dietas controle ou HF.
- 4.2.2. Avaliar parâmetros inflamatórios associados ao consumo de dieta HF no tecido adiposo e na maxila de camundongos.
- 4.2.3. Avaliar a microbiota bucal de camundongos alimentados ou não com a dieta HF.
- 4.2.4. Entender o papel da microbiota bucal na perda óssea alveolar associada ao aumento do tecido adiposo, através da depleção da microbiota com o uso de clorexidina:
- a. Avaliar o efeito da depleção da microbiota bucal na perda óssea alveolar induzida pelo consumo da dieta HF, além de parâmetros relacionados à qualidade óssea e parâmetros inflamatórios.
 - b. Avaliar alterações na microbiota intestinal induzidos pela dieta HF e o uso da clorexidina.
- 4.2.5. Avaliar alterações periodontais e sistêmicas em camundongos deficientes para o receptor de leptina (*db/db^{-/-}*).

5. Material e Métodos

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 de seis a oito semanas de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e camundongos deficientes para o receptor de leptina (*db/db^{-/-}*) fornecidos pelo Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais. Os camundongos foram mantidos em caixas apropriadas, identificadas, com livre acesso à ração e água, em ambiente com temperatura controlada e com ciclos de claro/escuro de 12 horas. Os camundongos permaneceram durante todo o período experimental no biotério do Laboratório de Interação Microrganismo-Hospedeiro, do Departamento de Microbiologia, situado no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Protocolo CEUA Protocolo nº. 272 / 2014

5.2 Protocolo de indução da obesidade

Os camundongos foram submetidos a diferentes tipos de dieta, tendo em sua composição:

Ingredientes da ração AIN-93: Amido de milho Pink®; *Butil-hidroxitolueno* (BHT) Rhoster®; Bitartarato de colina Rhoster®; Caseína Rhoster®; Celulose Synth®; Metionina Synth®; Maltodextrina Rhoster®; Mix de minerais AIN 93M Rhoster®; Mix de vitaminas AIN93M Rhoster®; Óleo de soja Liza®; Sacarose União®

Ingredientes da ração HF (modificada a partir da ração AIN-93 para conter 45% de banha de porco em sua composição): Amido de milho Pink®; Banha Sadia®; *Butil-hidroxitolueno* (BHT); Bitartarato de Colina Rhoster®; Caseína Rhoster®; Celulose Synth®; Groselha Cereser®; Metionina Synth®; Minerais AIN93M Rhoster®; Óleo de Soja Liza®; Mix de Vit. AIN93M Rhoster®

Ingredientes da ração labina Essence®: Farelo de soja*, milho integral moído, dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico. Espécies doadoras do gene: **Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.

Após o início da dieta, os camundongos foram pesados uma vez por semana. Após 5, 8 ou 12 semanas sob as dietas experimentais, os camundongos foram eutanasiados e foram coletadas amostras de sangue para análise de adipocinas, tecido adiposo epididimal (TAE), retroperitoneal (TAR) e tecido adiposo branco mesentérico (TAM). As amostras de tecido adiposo visceral (TAE, TAR e TAM) foram pesadas e o índice de adiposidade calculado utilizando a seguinte fórmula: [(TAE+TAR+TAM) / peso corporal em gramas] X

Camundongos foram separados de forma aleatória, em grupos, sendo cada grupo alimentado com dieta padrão (C) ou dieta HF (HF), por até 12 semanas. Os grupos foram mantidos em caixas separadas com água e ração *ad libitum*. Ao final de 5, 8 ou 12 semanas, a eutanásia dos camundongos foi realizada e as amostras de sangue, assim como de TAE, TAR e TAM foram utilizadas para as análises de cálculo do índice de adiposidade. Maxilas foram removidas para análises de perda óssea alveolar, produção de mediadores inflamatórios e composição microbiológica.

Foram utilizados também camundongos C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para o receptor de leptina *db/db^{-/-}*. Os camundongos foram mantidos em caixas separadas, com água e ração AIN-93 *ad libitum* a partir da 8^a semana. Após 10 semanas de experimentação, foi realizada a eutanásia dos camundongos e as amostras de sangue, assim como de TAE, TAR e TAM foram coletadas para posteriores análises e cálculo do índice de adiposidade. As maxilas também foram removidas para análises de perda óssea alveolar e produção de mediadores inflamatórios.

5.3 Abordagem experimental

Inicialmente os camundongos foram separados em dois grupos, sendo cada grupo alimentado com dieta padrão (C) ou dieta HF (HF). Os grupos foram mantidos em caixas separadas com água e ração *ad libitum*, até que ao final de 8 semanas, foi feita a infecção utilizando *A actinomycetemcomitans*. A partir de então, os grupos foram separados em grupos de animais alimentados com a dieta controle não infectados (C) ou infectados (Aa), além de grupos de animais alimentados com a dieta HF não infectados (HF) ou infectados (HF+Aa). Ao final de 12 semanas, os camundongos foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises (Fig. 3A).

Posteriormente, os camundongos foram separados em dois grupos, sendo cada grupo alimentado com dieta padrão (C) ou dieta HF (HF) e eutanasiados nos tempos de 5, 8 ou 12 semanas de experimentação, quando camundongos foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises (Fig. 3B).

Em uma próxima etapa, camundongos WT foram separados em dois grupos. Inicialmente, até as 8 semanas de experimentação, foram separados nos grupos alimentados com dieta padrão (C) ou com dieta HF (HF). Após 8 semanas, os camundongos sob dieta HF foram divididos em dois novos grupos: i) o grupo que recebeu tratamento tópico de CHX e ii) o grupo sem tratamento com CHX. Ao final de 12 semanas de experimentação os camundongos foram eutanasiados e os tecidos coletados para análises (Fig. 3C).

Posteriormente, utilizamos camundongos C57BL/6 (WT) e camundongos deficientes para o receptor de leptina *db/db^{-/-}*. Os camundongos foram mantidos em caixas separadas com água e ração *ad libitum*. Após 8 semanas, os camundongos passaram a receber a ração AIN-93, que se manteve até 10 semanas, quando foi realizada a eutanásia e os tecidos foram removidos para análises (Fig. 3D)

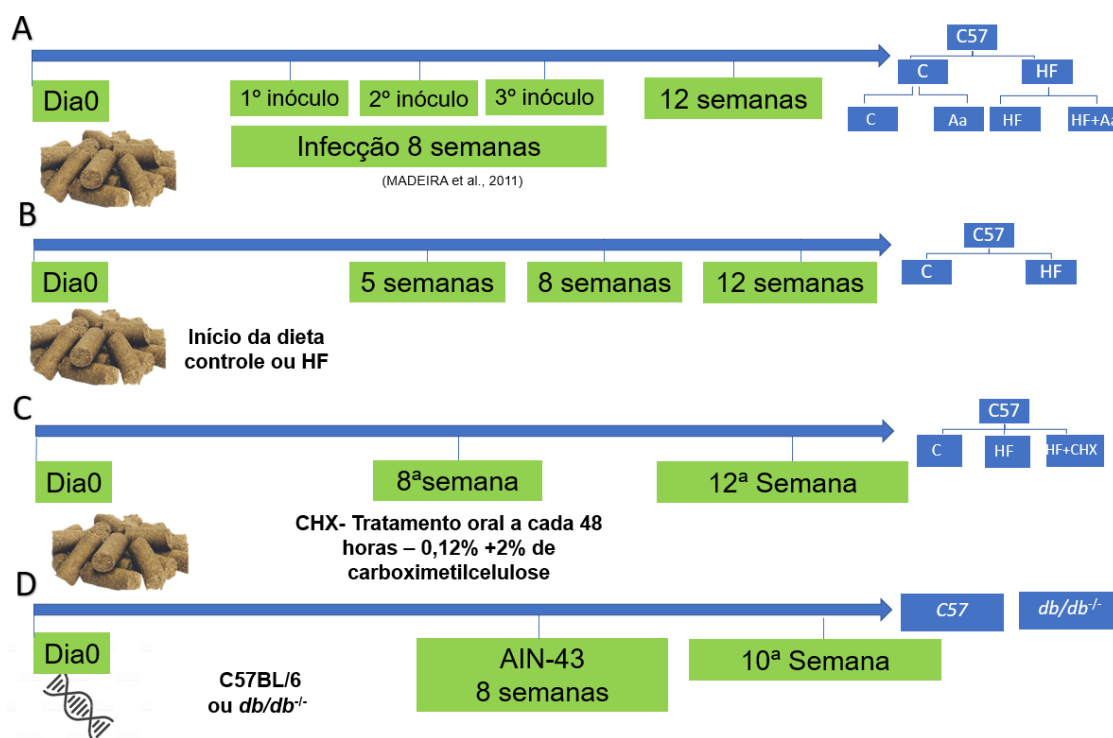


Figura 3- Esquema representativo do desenho experimental deste estudo. (A) Desenho experimental de análises dos grupos controle e HF em diferentes tempos de dieta; (B) Análises dos grupos infectados ou não com *A actinomycetemcomitans* alimentados com dieta HF ou controle. (C) Análises de animais alimentados com dieta controle, HF não tratados, ou HF tratados com CHX. (D) Análises de animais WT ou animais $db/db^{-/-}$.

5.4 Indução do modelo experimental de DP

A amostra de *A actinomycetemcomitans* FDC Y4 (ATCC 43718) sorotipo b, obtido da coleção de micro-organismos do Laboratório de Interação Microorganismo-Hospedeiro, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, foi cultivado por em meio TSA (*Tryptic Soy Agar* - Acumedia) acrescido de 0,5% de extrato de levedura, sendo incubada em microaerofilia, a 37°C por 48 horas. Posteriormente, o microrganismo foi transferido para um tubo contendo 5 mL de meio TSB (*Tryptone Soya Broth* - Oxoid®) acrescido de 0,5% de extrato de levedura (Biobrás Diagnósticos) e mantidos por mais 24 horas a 37°C, também em microaerofilia, utilizando jarras de vidro. Após 24 horas em meio TSB, as amostras foram centrifugadas (7.500 rpm/1125 g por 5 minutos a 25°C) e o sedimento suspenso em PBS para obtenção da suspensão com absorbância correspondente a 1×10^9 UFC/mL, utilizando OD de 560 nm, como descrito por

Madeira et al. (2012). Foi adicionado 1,5% de carboximetilcelulose à solução para que o líquido inoculado obtivesse um aspecto mais viscoso, facilitando a permanência e consequente colonização do microrganismo na cavidade bucal do camundongo.

Os animais receberam 100 μ L de um inóculo contendo 1×10^9 UFC/mL, diretamente em sua cavidade bucal com o auxílio de uma micropipeta. Após o procedimento, os animais foram submetidos a um jejum de 30 minutos sem água e 4 horas sem ração para que fosse facilitada a colonização do microrganismo inoculado na cavidade bucal. Este procedimento foi repetido após 48 e 96 horas, totalizando 3 dias de inoculação. Os animais do grupo controle receberam 100 μ L de PBS contendo 1,5% de carboximetilcelulose de maneira semelhante ao protocolo descrito para o grupo infectado. 30 dias após o último dia de inoculação, foi realizada a eutanásia dos camundongos.

5.5 Depleção da microbiota bucal

A depleção da microbiota bucal dos camundongos obesos foi realizada com o uso de solução de digluconato de clorexidina (CHX) 0,12%, acrescida com 2% de carboximetilcelulose, diretamente na cavidade bucal. O tratamento foi realizado de forma tópica, em camundongos alimentados com a dieta HF, e aplicado com o auxílio de um pincel. O procedimento foi realizado a cada 48 horas, tendo início na oitava semana de experimentação, sendo finalizada na 12ª semana, dois dias precedentes à eutanásia. Os grupos foram identificados como: camundongos alimentados com a dieta padrão (C), camundongos alimentados com a dieta HF (HF) e camundongos alimentados com a dieta HF sob tratamento com clorexidina (HF + CHX). Ao final do período experimental, os tecidos foram coletados para análises posteriores.

5.6 Medida da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

A avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi utilizada para avaliar indiretamente a presença de neutrófilos nos tecidos periodontais. Este protocolo foi realizado segundo descrito por Madeira et al. (2012). Para isso, hemimaxila de camundongos de cada grupo experimental foram

removidas após a eutanásia e armazenadas a -20°C , até a realização do ensaio. O tecido foi homogeneizado em tampão (19 mL para 1 g de tecido) pH 4,7 (0,1M NaCl, 0,02M NaPO_4 , 0,015M NaEDTA), centrifugado a 10.000 rpm/1500 g por 10 min, 4°C , descartando-se o sobrenadante. Após o procedimento, o precipitado foi submetido à lise hipotônica (15 mL de solução 0,2% de NaCl durante 30 segundos, seguida pela adição de igual volume da solução contendo 1,6% de NaCl e 5% de glicose). Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e o precipitado suspenso em tampão 0,05 M NaPO_4 (pH 5,4) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) e homogeneizado. Alíquotas da suspensão passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e foram, sucessivamente, centrifugadas por 15 min a 10.000 rpm/1500 g, 4°C , coletando-se o sobrenadante para o ensaio enzimático. A atividade de MPO foi medida por mudanças da densidade óptica (DO) a 450 nm usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H_2O_2 (0,5 mM). Os resultados foram expressos em unidades relativas com base em uma curva padrão de números de neutrófilos versus a densidade óptica do sobrenadante do tecido com neutrófilos do peritônio de camundongos, processados da mesma maneira.

5.7 ELISA

O ensaio imunoenzimático ELISA foi utilizado para quantificar os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17, e fator de necrose tumoral (TNF); quimiocinas CXCL1 e CCL2; além das adipocinas leptina, adiponectina, quemerina e resistina nos tecidos periodontais e no soro de camundongos. Para isso, as maxilas foram maceradas, utilizando-se um homogeneizador, em uma solução inibidora de proteases [NaCl 0,4M; Tween 20 0,05%; albumina de soro bovino 0,5%; fluoreto de fenilmetilsufonila 0,1 mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina, preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,89 g diluídos em 1 L)], na concentração de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Após a maceração, a solução resultante foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi separado para a dosagem das citocinas de interesse,

utilizando *kits* comerciais (R&D Systems Europe Ltd., Abington, UK). Foram seguidas as instruções do fabricante para a realização dos ensaios e a leitura foi feita a um comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro (Biotek mx200).

5.8 Avaliação da perda óssea alveolar

Após a eutanásia, peças cirúrgicas maxilares contendo os processos alveolares, dentes e palato duro dos animais de cada grupo foram removidas e separadas em hemiarçadas, pela ruptura da sutura palatina. As peças destinadas à avaliação da perda óssea alveolar foram mantidas em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30 volumes, diluído em igual volume de água destilada, durante 24 horas. Após este período, o tecido mole foi removido mecanicamente e as maxilas foram lavadas em água destilada e deixadas para secar em temperatura ambiente, conforme descrito por Madeira et al. (2012). Após o processamento, as maxilas foram coradas utilizando-se solução de azul de metileno 0,3%. As faces palatinas dos molares foram fotografadas utilizando-se uma lupa e uma câmera (Kodak EasyShare C743, Manaus, Brasil). A perda óssea alveolar foi mensurada, como descrito por Madeira et al. (2012). Para cada camundongo, o nível ósseo alveolar foi determinado pela demarcação da área entre a região da junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea alveolar (COA), na face palatina do primeiro molar superior, utilizando-se o *software* Image J, conforme descrito por Madeira et al. (2012). Para cada animal, a perda óssea alveolar foi analisada em duplicata, considerando a média entre duas medidas da área demarcada, em mm².

5.9 Micro tomografia computadorizada (micro-CT)

Os ossos maxilares foram escaneados usando um sistema de microCT (Skyscan 1176 X-Ray microtomograph, Aartselaar, Belgium) e um *software* CT-Analyser (Skyscan, Belgium). Escaneamentos de alta resolução foram realizados (50 kV, filtro de alumínio de 0,5 mm, ângulo de rotação de 0.5°). A área de furca da raiz do primeiro molar superior foi avaliada para análise da espessura trabecular (Tb.Th), espaçamento trabecular (Tb.Sp), densidade

mineral óssea (BMD), volume ósseo (BV) e porcentagem de volume ósseo/volume total (BV/TV%).

5.10 Avaliação de espécies bacterianas na cavidade bucal por hibridização DNA-DNA

Amostras de maxilas foram recolhidas e imediatamente colocadas em microtubos de 1,5 mL, congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C. A avaliação foi realizada em colaboração com a Profa. Poliana Mendes Duarte da Universidade de Guarulhos. Para o processamento, as amostras foram maceradas utilizando um homogeneizador, em uma solução de Tris+EDTA. O processo de extração de DNA foi realizado conforme o protocolo descrito pelo “Genomic DNA Purification kit” (Thermo Scientific). Cada amostra teve o seu DNA quantificado e enviado para análises. Sondas de DNA genômico de 40 espécies bacterianas foram hibridizadas em canaletas individuais do Miniblotter. Após a hibridização, as membranas foram lavadas e as sondas de DNA, detectadas por quimioluminescência. Nas duas últimas canaletas de cada corrida foram colocados padrões de concentrações de 10^5 e 10^6 células de cada espécie. A sensibilidade do ensaio foi ajustada para permitir a detecção de 10^4 células de uma determinada espécie, ajustando-se a concentração de cada uma das sondas de DNA. Os sinais foram convertidos em códigos por meio de comparações com as canaletas padrão na membrana. Subsequentemente, os códigos foram convertidos em contagens absolutas (Socransky et al. 1994; Mestnik et al. 2010).

5.11 Avaliação da microbiota intestinal

As amostras de fezes de camundongos foram coletadas ao final dos períodos de 8 ou 12 semanas do início do período de experimentação com a finalidade de avaliar uma possível alteração da microbiota intestinal induzida pelo consumo da dieta HF e tratamento com a CHX. As amostras coletadas foram diluídas em NaCl 0,9% p/v e cultivadas em meio MacConkey por 24h a 37°C em aerobiose. Após o tempo de incubação foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônia e multiplicado pela diluição

utilizada, para encontrar o número de unidades formadoras de colônia por grama de fezes.

5.12 Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). One way ANOVA foi empregado, seguido do teste de Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos

6. Resultados

Para caracterização do modelo de indução de obesidade pelo uso da dieta HF, foram avaliados o ganho de peso e o aumento de adiposidade, que caracterizam o modelo. Os resultados mostram que camundongos alimentados por 12 semanas com a dieta HF apresentaram ganho significativo de adiposidade quando comparado aos animais do grupo alimentado com a dieta labina (Fig. 4A). Além disso, foi possível observar também um aumento significativo de leptina (Fig. 4B) e diminuição de adiponectina no soro, induzido pelo consumo da dieta HF, durante este período (Fig. 4C).

Para avaliar o curso da DP em camundongos alimentados ou não com dieta HF, grupos de animais foram infectados com *A. actinomycetemcomitans*. Os resultados mostram que camundongos infectados com o periodontopatógeno, sob dieta padrão, apresentaram uma perda óssea alveolar significativa, quando comparados aos grupos de camundongos não infectados (Fig. 4D; 4E). Camundongos infectados e alimentados com dieta HF apresentaram perda óssea alveolar significativa, de maneira similar aos camundongos infectados, sob dieta padrão (Fig. 4D; 4E). Curiosamente, camundongos não infectados e alimentados com dieta HF apresentaram uma perda óssea alveolar significativa, quando comparados aos camundongos não infectados sob dieta padrão e de maneira similar aos animais infectados com *A. actinomycetemcomitans* (Fig. 4D; 4E).

Análises de parâmetros inflamatórios nos tecidos periodontais mostraram que os camundongos infectados, sob dieta HF, apresentaram uma maior atividade da enzima MPO (Fig. 4F) e menores níveis de IL-10 (Fig. 4G).

Não houve diferenças nas razões RANKL/OPG nos grupos avaliados (Fig. 4H), porém foi observada uma correlação positiva entre o índice de adiposidade e a perda óssea alveolar em animais não infectados (Fig. 4I)

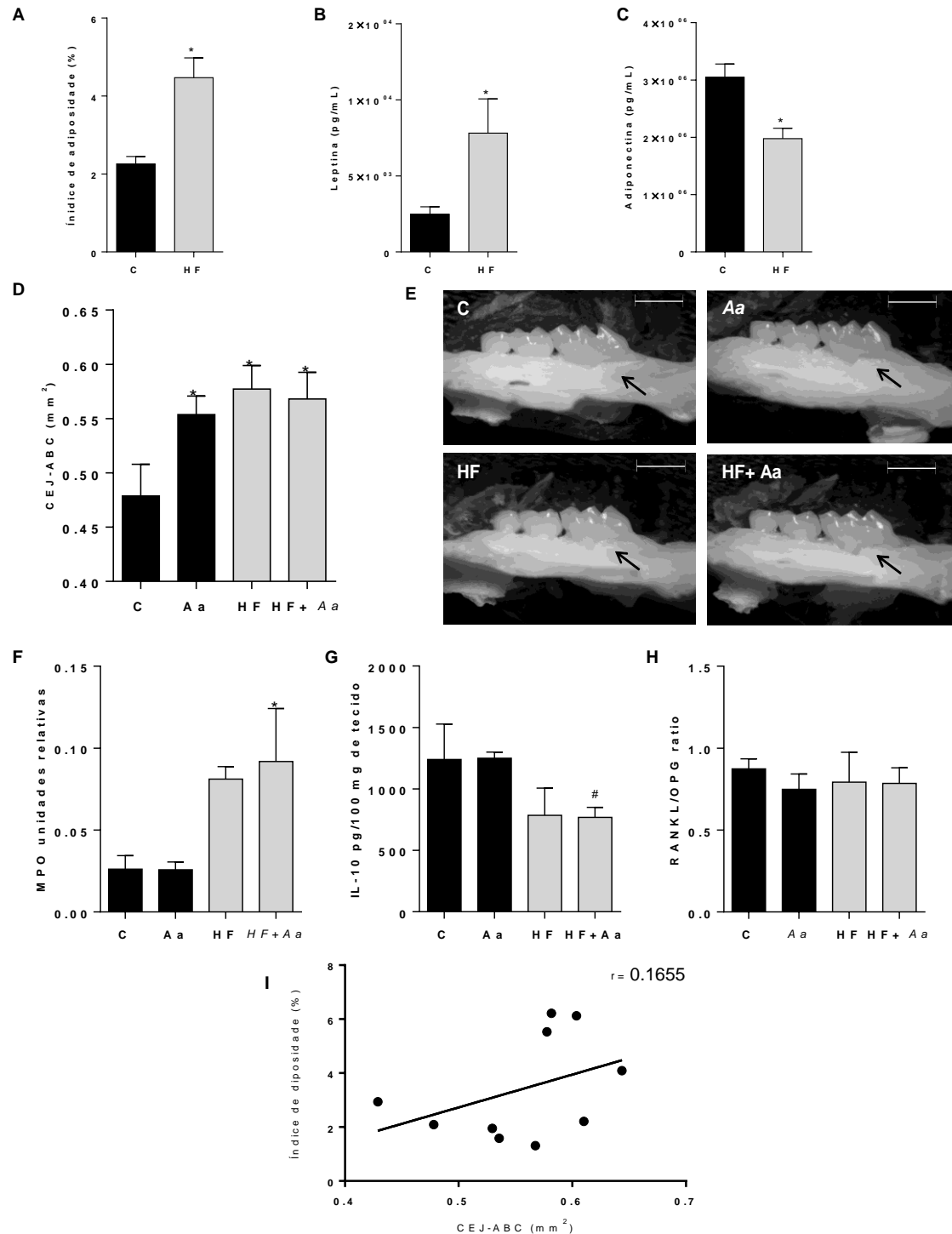


Figura 4. Avaliação de parâmetros metabólicos relacionados à dieta HF e de parâmetros periodontais relacionados à dieta HF, associada ou não à inoculação de *A. actinomycetemcomitans*. (A) Análise do índice de adiposidade associado ao consumo das dietas labina ou HF (B) Dosagem de leptina no soro de animais sob os diferentes tipos de dieta. (C) Dosagem de adiponectina no soro de animais sob os diferentes tipos de dieta. (D) Perda óssea alveolar mensurada em animais alimentados com a dieta controle não infectados (C) ou infectados (Aa), além de animais alimentados com a dieta HF não infectados (HF) ou infectados (HF+Aa). (E) Imagens representativas da perda óssea alveolar avaliada nos grupos

experimentais, em que a barra representa 1 mm. (F) Atividade da enzima mieloperoxidase (G) Quantificação da citocina IL-10. (H) Razão RANKL/OPG. (I) Correlação entre índice de adiposidade e a perda óssea alveolar em animais não infectados. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Tendo em vista que camundongos alimentados com dieta HF apresentaram perda óssea alveolar significativa e sabendo-se que a dieta HF foi padronizada a partir de uma modificação da dieta AIN-93, objetivou-se avaliar se a composição da dieta controle poderia interferir nos resultados encontrados. Para isso, grupos de camundongos foram alimentados com dieta controle, AIN-93 ou dieta HF (utilizando dieta AIN-93 como base).

Os animais alimentados com dieta HF apresentaram ganho significativo de peso quando comparados aos animais alimentados com dieta labina ou AIN-93 (Fig. 5A). Além disso, não foi observado um aumento de adiposidade entre os grupos alimentados com a dieta controle ou AIN-93 (Fig. 5B). Comparativamente, os camundongos sob dieta HF apresentaram aumento significativo no índice de adiposidade (Fig. 5B).

Nos tecidos periodontais de camundongos sob dieta HF foi observado um aumento da enzima MPO, quando comparados ao grupo alimentado com dieta controle (Fig. 5C). Não houve diferença significativa na quantificação de MPO entre os grupos alimentados com dieta controle ou AIN-93 (Fig. 5C).

Em relação a possíveis alterações sistêmicas, foi realizada a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue dos camundongos. Os resultados mostram que não houve diferenças nestes parâmetros, nos diferentes grupos experimentais (Fig. 5D, 5E e 5F). Sendo assim, a ração Labina foi utilizada como dieta controle nos demais experimentos.

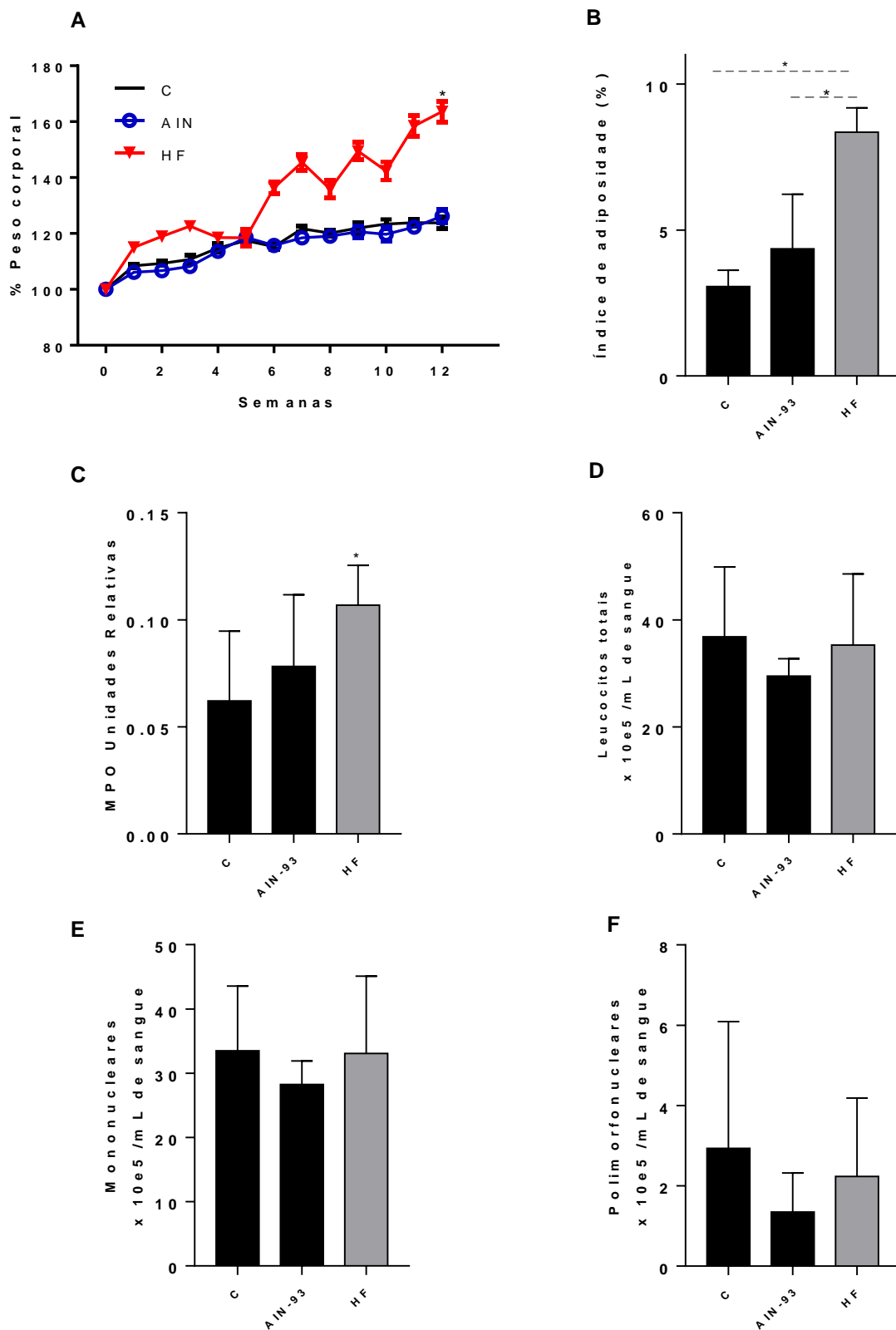


Figura 5. Comparativo de parâmetros entre animais alimentados com as dietas labina, AIN-93 ou HF. (A) Peso corporal (B) Índice de adiposidade (C) Atividade da enzima MPO, (D)

Contagem total de leucócitos. (E) Contagem diferencial de células mononucleares do sangue. (F) Contagem diferencial de células polimorfonucleares do sangue. * $p < 0,05$ em relação ao grupo de animais alimentados com dieta Labina.

Foram avaliados os efeitos sistêmicos e periodontais induzidos pelo consumo da dieta HF nos tempos de 5 ou 8 semanas. Foi observado que camundongos alimentados com a dieta HF por 5 ou 8 semanas apresentaram um aumento significativo do índice de adiposidade quando comparados aos seus respectivos controles (Fig. 6A). Além disso, após 5 semanas, a dieta HF induziu um aumento de MPO nos tecidos periodontais, quando comparado ao seu respectivo controle (Fig. 6B), não havendo diferenças neste mesmo parâmetro após 8 semanas.

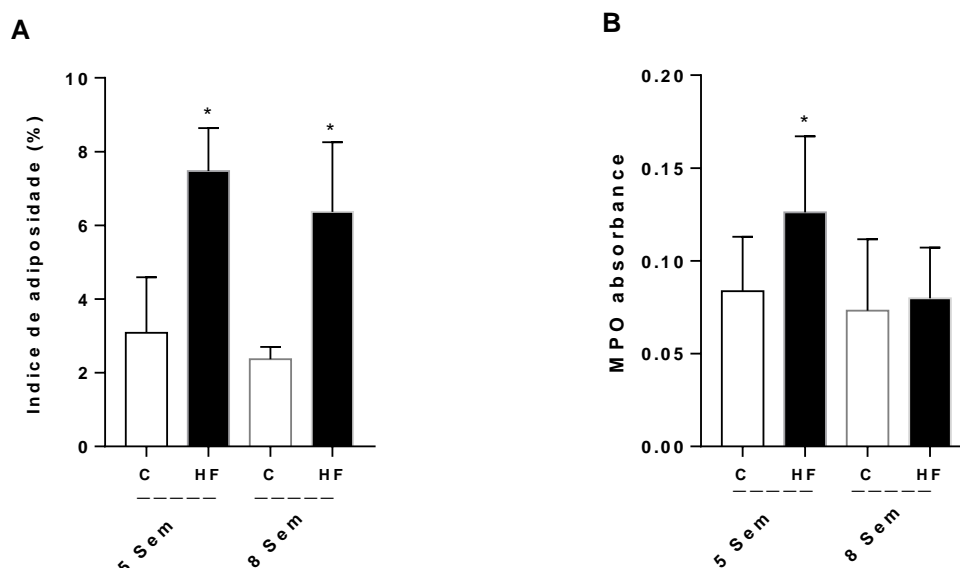


Figura 6. Índice de adiposidade e análise de MPO na maxila de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta HF (HF) nos períodos de 5 ou 8 semanas. (A) Índice de adiposidade. (B) Atividade da enzima MPO. * $p < 0,05$ com relação ao grupo de animais alimentados com dieta Labina.

Após 5 semanas, camundongos sob consumo da dieta HF apresentaram diminuição dos níveis de TNF (Fig. 7A), IL-10 (Fig. 7B) e CXCL1 (Fig. 7C) no tecido adiposo, quando comparados a camundongos alimentados com a dieta controle. Um resultado similar foi observado para as citocinas IL-10 (Fig. 7B) e CXCL1 (Fig. 7C) no tempo de 8 semanas. Neste mesmo tempo experimental,

não foi observada alteração na produção de TNF (Fig. 7A). Após 12 semanas sob dieta HF não foram observadas alterações nos níveis das citocinas avaliadas (Fig. 7A, 7B e 7C).

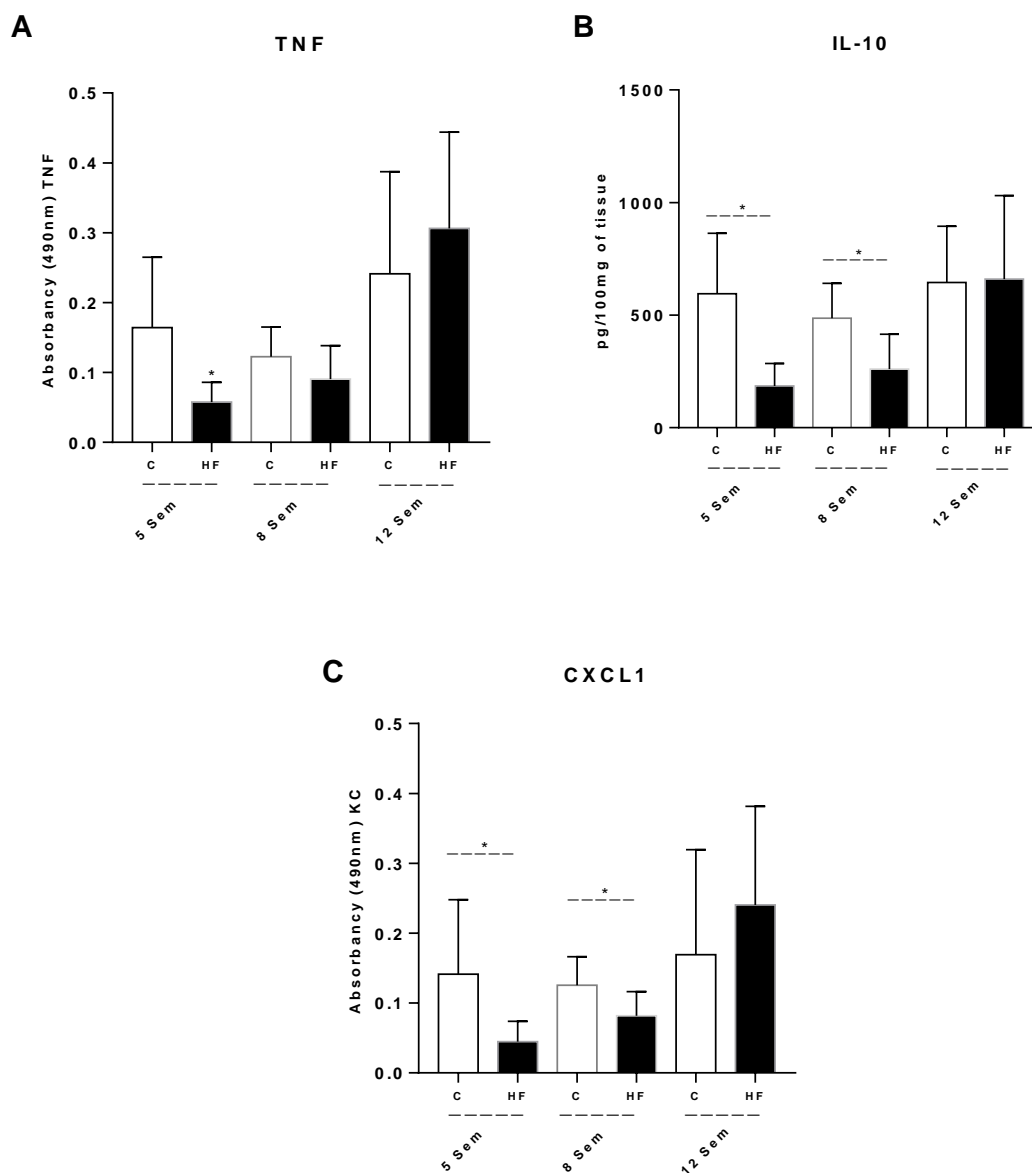


Figura 7: Alterações dos níveis de citocinas no tecido de adiposo de animais alimentados com dieta controle (C) ou dieta HF (HF) nos períodos de 5, 8 ou 12 semanas. (A) TNF, (B) IL-10 (C), CXCL1 * $p < 0,05$ com relação ao grupo de animais alimentados com dieta controle correspondente ao mesmo período analisado.

Sabe-se que alterações em parâmetros inflamatórios podem induzir mudanças na composição do biofilme bucal (Hajishengallis & Lamont, 2012). Sendo assim, avaliamos se a dieta HF poderia induzir alterações na microbiota bucal dos camundongos. A análise de 40 espécies da microbiota bucal mostrou que o consumo da dieta HF, após 12 semanas, não alterou a quantificação de bactérias dos filos Firmicutes (Fig. 8A) ou Actinobacteria (Fig. 8B). Entretanto, dentre as espécies avaliadas dos filos Fusobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria, foi possível observar um aumento significativo, respectivamente, de duas subespécies de *Fusobacterium nucleatum* (Fig. 8C); *Prevotella nigrescens* (Fig. 8D) e *Neisseria mucosa* (Fig. 8E).

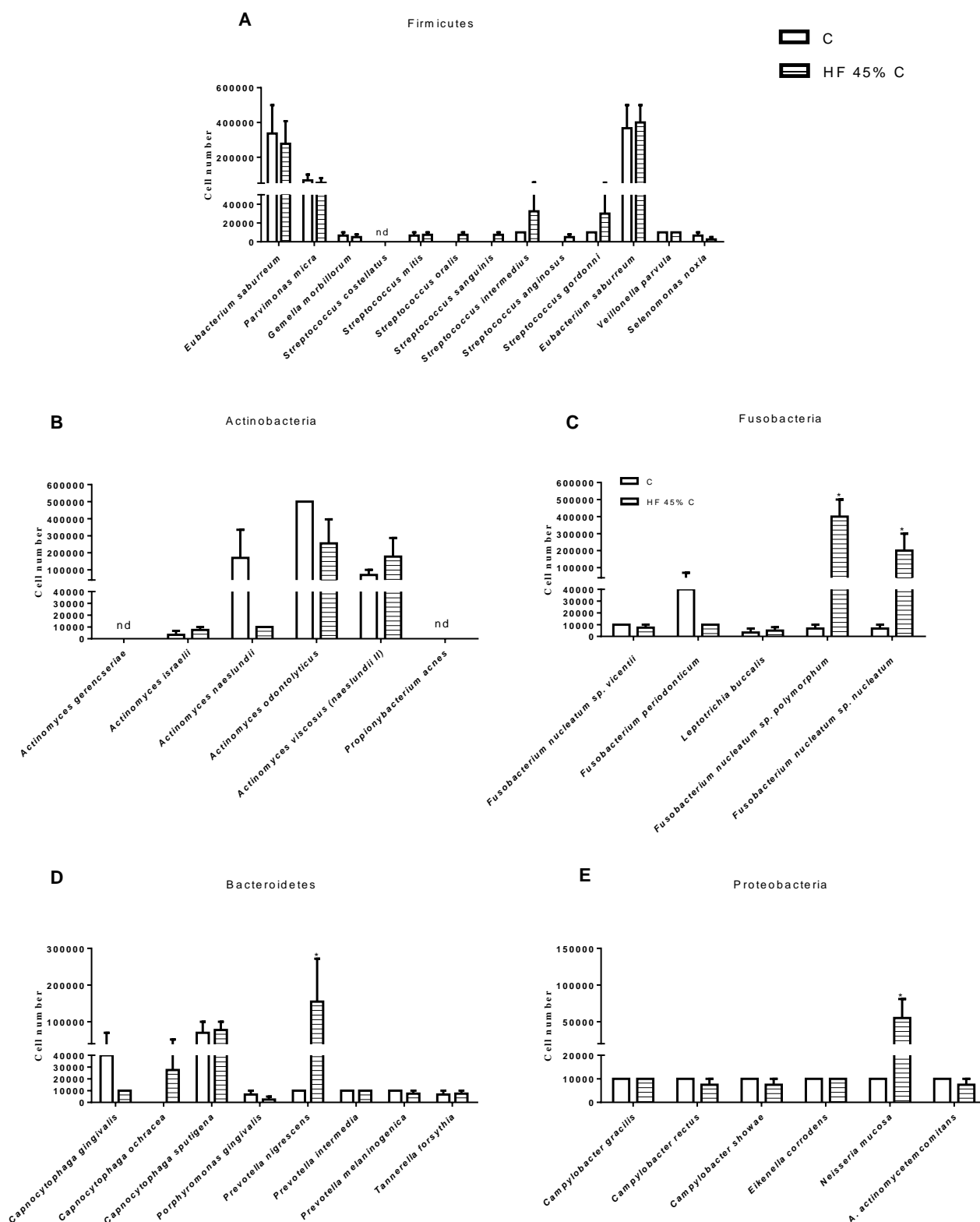


Figura 8 Análise microbiológica de tecidos periodontais de animais alimentados com dieta controle (C) ou HF (HF). (A) Espécies do filo Firmicutes; (B) Espécies do filo Actinobacteria; (C) Espécies do Fusobacteria; (D) Espécies do filo Bacteroidetes; (E) Espécies do filo Proteobacteria. * $p < 0,05$ com relação ao grupo de animais alimentados com a dieta labina correspondente ao mesmo microrganismo analisado.

Diante das alterações observadas, foi realizada a depleção da microbiota bucal de camundongos, por aplicação tópica de CHX 0,12% em gel. Os resultados mostram que o tratamento com CHX não alterou o ganho de adiposidade induzido pelo consumo de dieta HF (Fig. 9A). Por outro lado, camundongos alimentados com dieta HF e tratados com CHX não apresentaram perda óssea alveolar significativa (Fig. 9B) e não foi observado aumento do influxo de neutrófilos (MPO), quando comparados ao grupo sob dieta HF e não tratado com CHX (Fig. 9C), reforçando um importante papel da microbiota em disbiose no fenótipo de perda óssea alveolar, associado ao consumo de dieta HF.

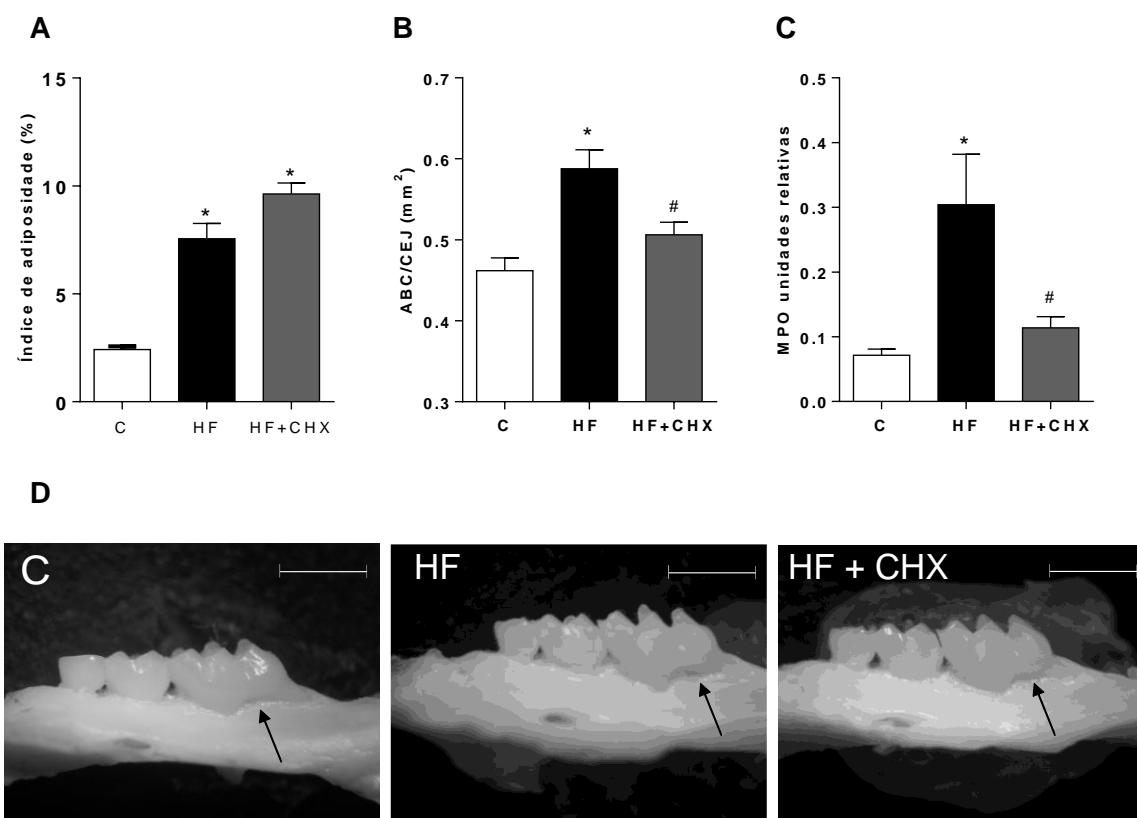


Figura 9. Parâmetros avaliados em animais sob as dietas controle (C), HF (HF) ou HF tratados com CHX (CHX). (A) Avaliação do índice de adiposidade; (B) avaliação da perda óssea alveolar; (C) avaliação da atividade da enzima MPO; (D) Imagens representativas da perda óssea alveolar. Barra = 1 mm. * $p < 0,05$ com relação ao grupo de animais alimentados com a dieta labina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HF

Os resultados das análises das maxilas por micro-CT mostram que o consumo de dieta HF por 12 semanas induziu diminuição significativa da

densidade mineral óssea, quando comparados aos camundongos alimentados com dieta controle (Fig. 10A). Camundongos sob dieta HF, que foram tratados com CHX, apresentaram níveis similares de densidade mineral óssea, quando comparados aos animais alimentados com dieta controle (Fig. 10A). Os resultados mostram também uma correlação negativa entre a densidade mineral óssea e o índice de adiposidade ($r = -0,9601$) (Fig. 10B). As análises por micro-CT mostram que o consumo de dieta HF induziu uma diminuição da relação percentual de volume ósseo comparado ao volume total da amostra (Fig. 10C), além da diminuição da espessura das trabéculas (Fig. 10D). Em contrapartida, a dieta HF induziu um aumento dos espaçamentos trabeculares quando comparado aos animais alimentados com dieta controle (Fig. 10E). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos quando foram avaliados o volume ósseo (Fig. 10F), a superfície do tecido analisado (Fig. 10G) ou o número de trabéculas (Fig. 10H).

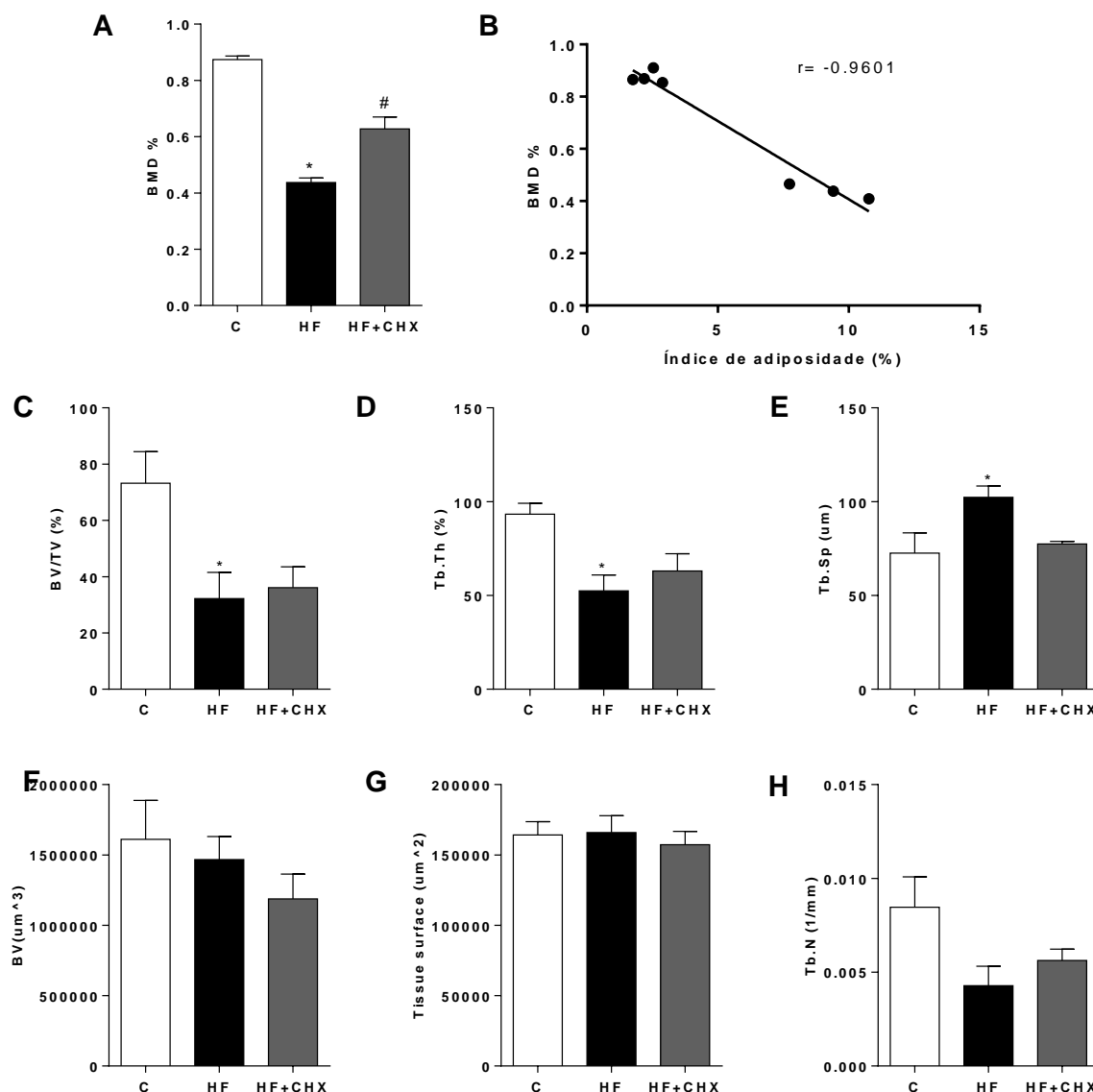


Figura 100. Análises de micro-CT da maxila de animais alimentados com dieta controle (C), HF (HF) ou HF tratados com CHX (CHX). (A) Densidade Mineral Óssea (BMD); (B) Correlação entre a densidade mineral óssea e índice de adiposidade; (C) Volume ósseo relativo ao volume total. (BV/TV); (D) Espessura trabécula (Tb.Th); (E) Espaçamento trabecular (Tb.Sp); (F) Volume ósseo; (G) Superfície do tecido; (H) Número de trabéculas (Tb.N). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Os níveis de citocinas nos tecidos periodontais foram analisados e observou-se redução dos níveis de IL-6 (Fig. 11A) e TNF (Fig. 11B) em camundongos alimentados com dieta HF, quando comparados aos animais alimentados com dieta controle. Observou-se, nos camundongos tratados com CHX, níveis similares de IL-6 e TNF, quando comparados aos animais alimentados com a dieta HF e sem tratamento (Fig. 11A; Fig. 11B). Por outro lado, somente os animais alimentados com a dieta HF e tratados com a CHX

apresentaram uma redução nos níveis das citocinas IL-17 (Fig. 11C), IL-1 β (Fig. 11D) quando comparados aos animais alimentados com dieta controle.

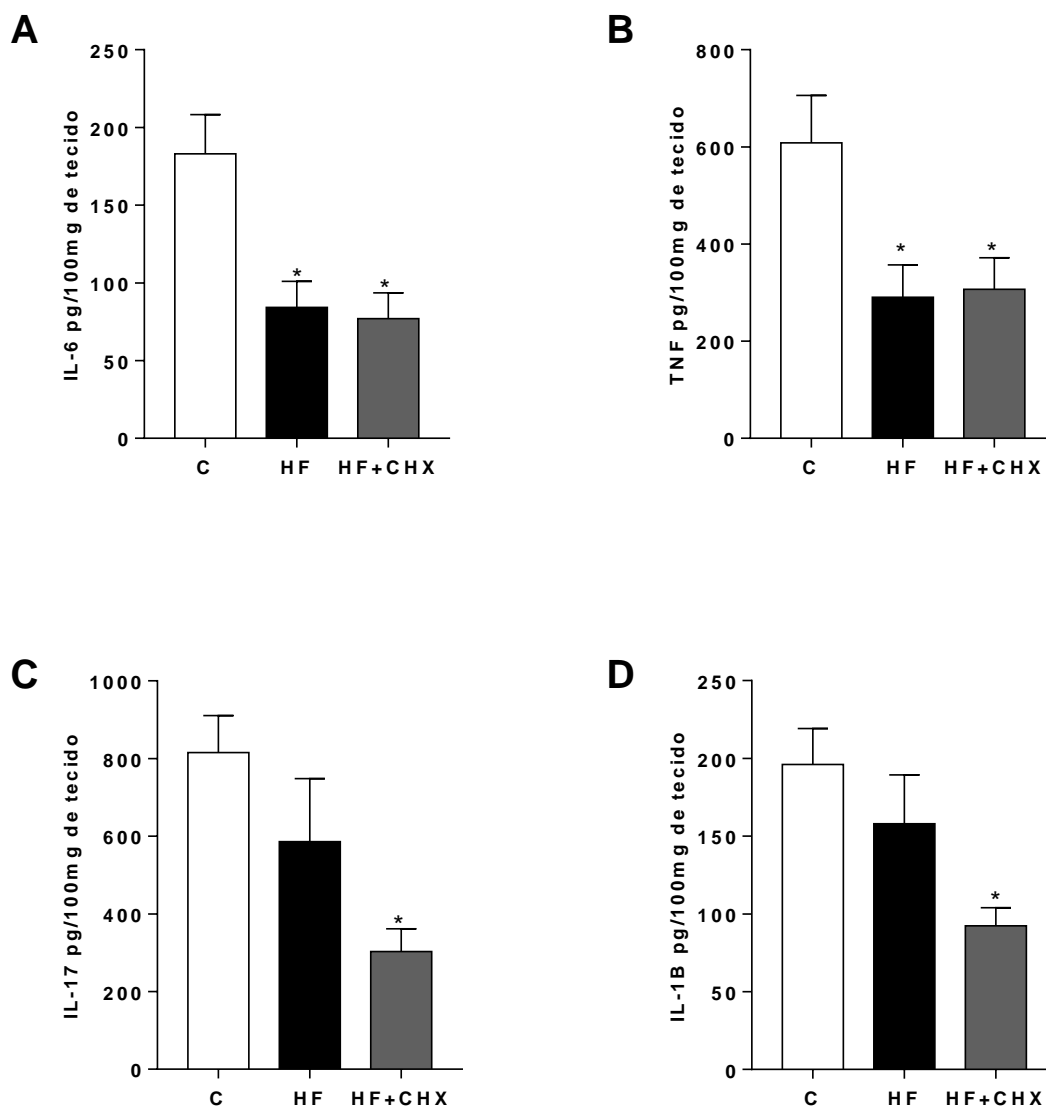


Figura 111. Quantificação de citocinas nos tecidos periodontais de animais sob dieta controle (C), HF (HF) ou HF tratados com clorexidina (CHX). (A) IL-6; (B) TNF; (C) IL-17; (D) IL-1 β . * $p < 0,05$ em relação ao grupo HF.

Tendo em vista que a microbiota intestinal possui relevante papel na obesidade (Backhed et al., 2007; Cani et al., 2008; Turnbaugh et al., 2008), foi realizada uma avaliação da microbiota intestinal, além das avaliações periodontais associadas ao consumo de dieta HF. A quantificação de enterobactérias foi utilizada como parâmetro de alteração da microbiota intestinal. Os resultados mostram que a dieta HF induziu um aumento de

enterobactérias após 8 (Fig. 12A; Fig. 12B) ou 12 semanas (Fig. 12C; Fig. 12D). O tratamento com a clorexidina diminuiu significativamente a contagem de enterobactérias induzido pela dieta HF em ambos os tempos avaliados (Fig 12A; Fig. 12B; Fig. 12C; Fig. 12D).

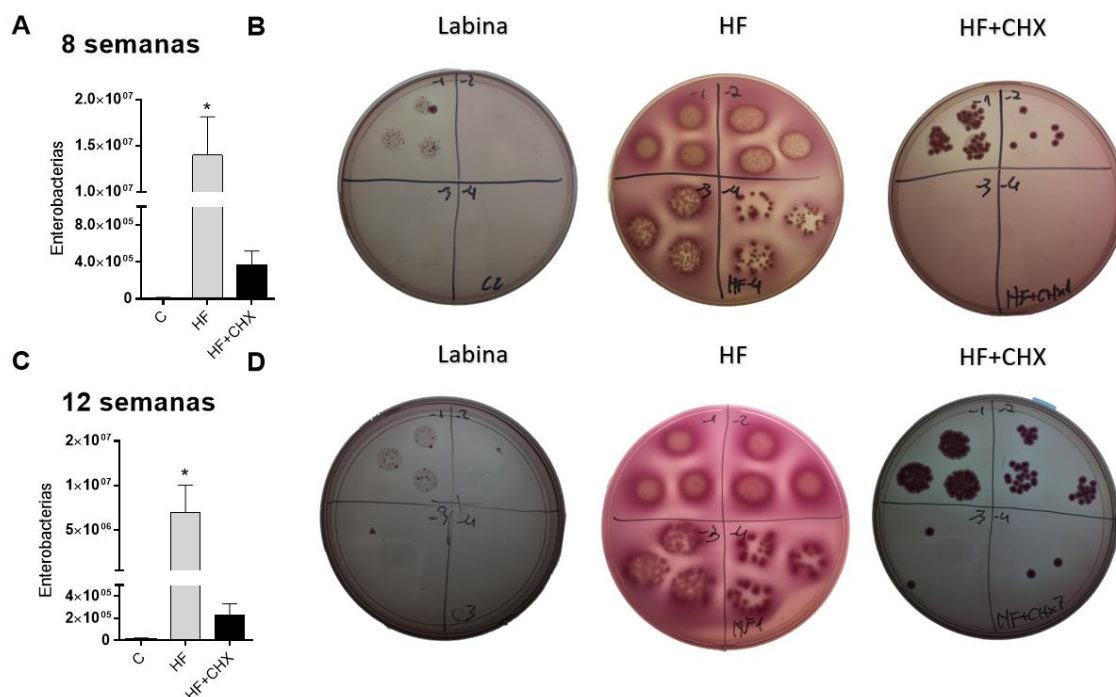


Figura 122. Contagem de enterobactérias nas fezes de animais alimentados com dieta controle (C), dieta HF (HF) ou alimentados com dieta HF tratados com CHX (CHX) nos períodos de 8 ou 12 semanas. (A) Contagem de enterobactérias em unidades formadoras de colônias (UFC) no tempo de 8 semanas após o início da dieta experimental. (B) Fotos representativas das placas de ágar MacConkey analisadas para contagem de UFC no período de 8 semanas de experimentação. (C) Contagem de UFC no tempo de 12 semanas após o início da dieta experimental. (D) Fotos representativas das placas analisadas para contagem de UFC no período de 12 semanas de experimentação. * $p < 0,05$ com relação ao grupo de animais alimentados com dieta controle correspondente ao mesmo período analisado.

Sabendo da possibilidade de alteração de parâmetros periodontais devido à composição da dieta, avaliamos, em outro modelo de obesidade, utilizando camundongos deficientes para o receptor de leptina ($db/db^{-/-}$), se o ganho de tecido adiposo, independente de dieta, poderia induzir perda óssea alveolar. Os resultados mostram que, comparativamente aos camundongos WT, animais $db/db^{-/-}$, fêmeas (Fig. 13A) ou machos (Fig. 13B) apresentaram

perda óssea alveolar significativa após 12 semanas (Fig. 13A e Fig. 13B).

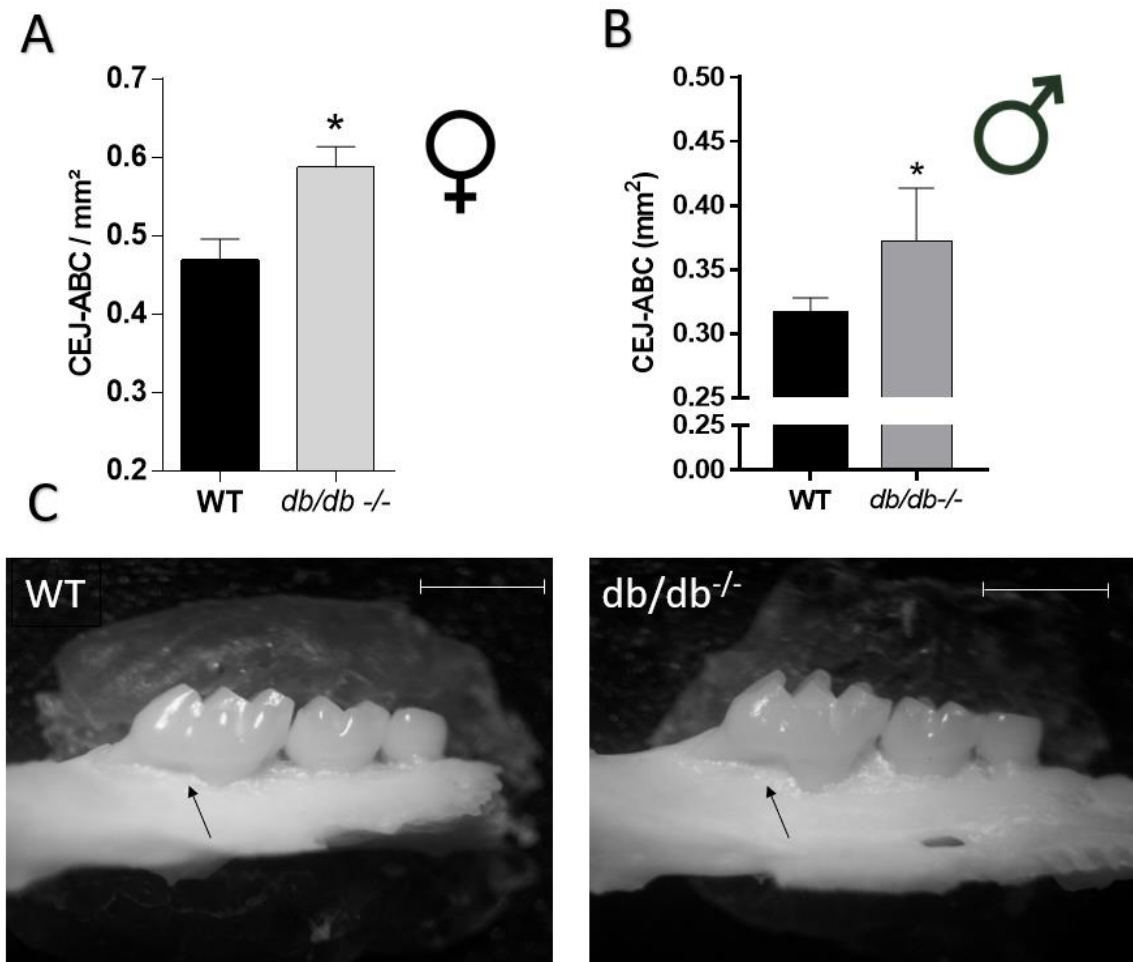


Figura 133. Análise de perda óssea alveolar de camundongos WT ou *db/db*^{-/-}. (A) Perda óssea alveolar de camundongos fêmeas WT ou *db/db*^{-/-}. **(B)** Perda óssea alveolar de camundongos machos WT ou *db/db*^{-/-}. **(C)** Imagens representativas da perda óssea alveolar apresentada pelos camundongos WT ou *db/db*^{-/-} fêmeas.

Foi possível observar também que, comparativamente aos camundongos WT, os camundongos *db/db*^{-/-} apresentaram diminuição nos níveis de resistina (Fig. 14A), das citocinas IL-6 (Fig. 14B), IL-1 β (Fig. 14C), IL-17 (Fig. 14D) e TNF (Fig. 14E) nos tecidos periodontais, em comparação aos animais WT. Por outro lado, camundongos *db/db*^{-/-} apresentaram um aumento significativo da atividade de MPO (Fig. 14F). Além disso, as análises de mediadores inflamatórios e adipocinas nos tecidos periodontais mostraram que camundongos *db/db*^{-/-} possuem maiores níveis de quemerina, quando

comparados aos animais WT neste tecido (Fig. 14G), não havendo alterações na quantificação de adiponectina (Fig. 14H).

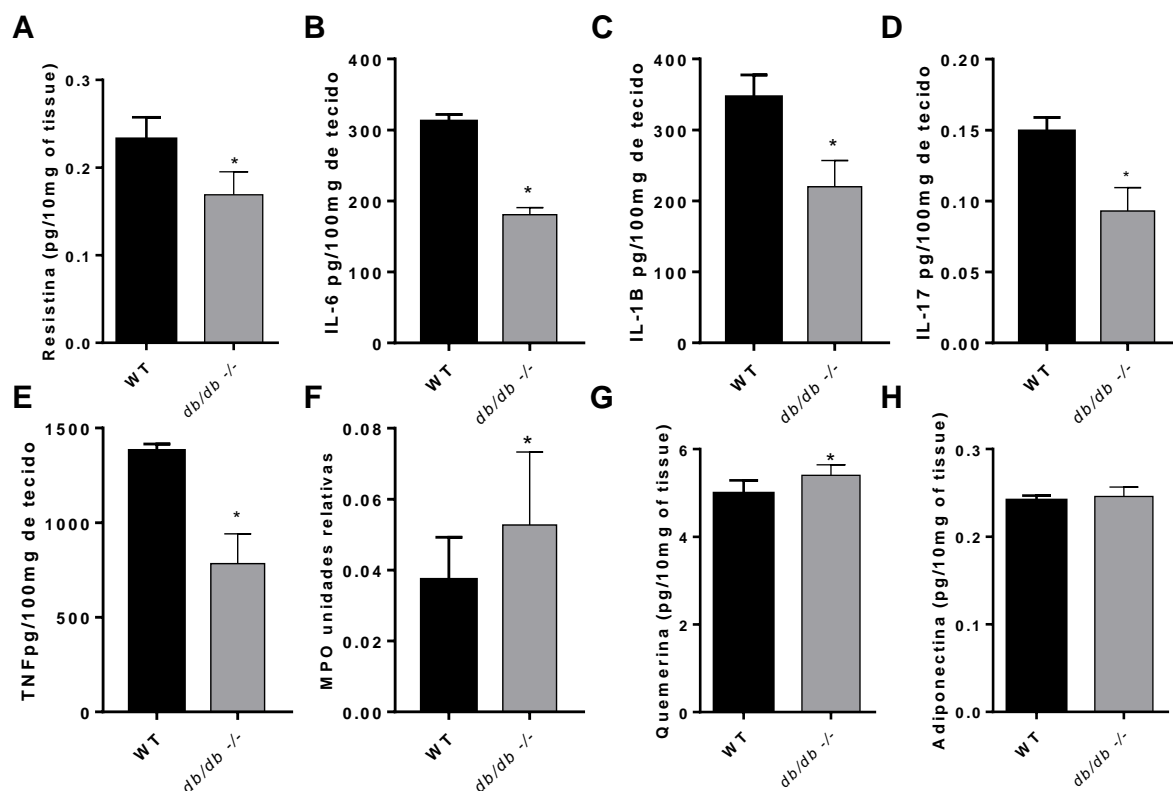


Figura 144. Parâmetros inflamatórios de citocinas e adipocinas avaliados nos tecidos periodontais de camundongos WT (WT) e animais deficientes para o receptor de leptina (*db/db*^{-/-}). (A) Resistina; (B) IL-6; (C) IL-1β; (D) IL-17; (E) TNF; (F) Atividade da enzima mieloperoxidase; (G) Quemerina; (H) Adiponectina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT.

Adicionalmente, camundongos *db/db*^{-/-} não apresentaram alterações sorológicas dos níveis de triglicérides (Fig. 15A), RANKL (Fig. 15B), adiponectina (Fig. 15C) e resistina (Fig. 15D), quando comparados aos animais WT. Por outro lado, foi possível observar um aumento dos níveis de OPG (Fig. 15E), colesterol (Fig. 15F), glicose (Fig. 15G) e quemerina (Fig. 15H) no soro dos camundongos *db/db*^{-/-} quando comparados aos animais WT.

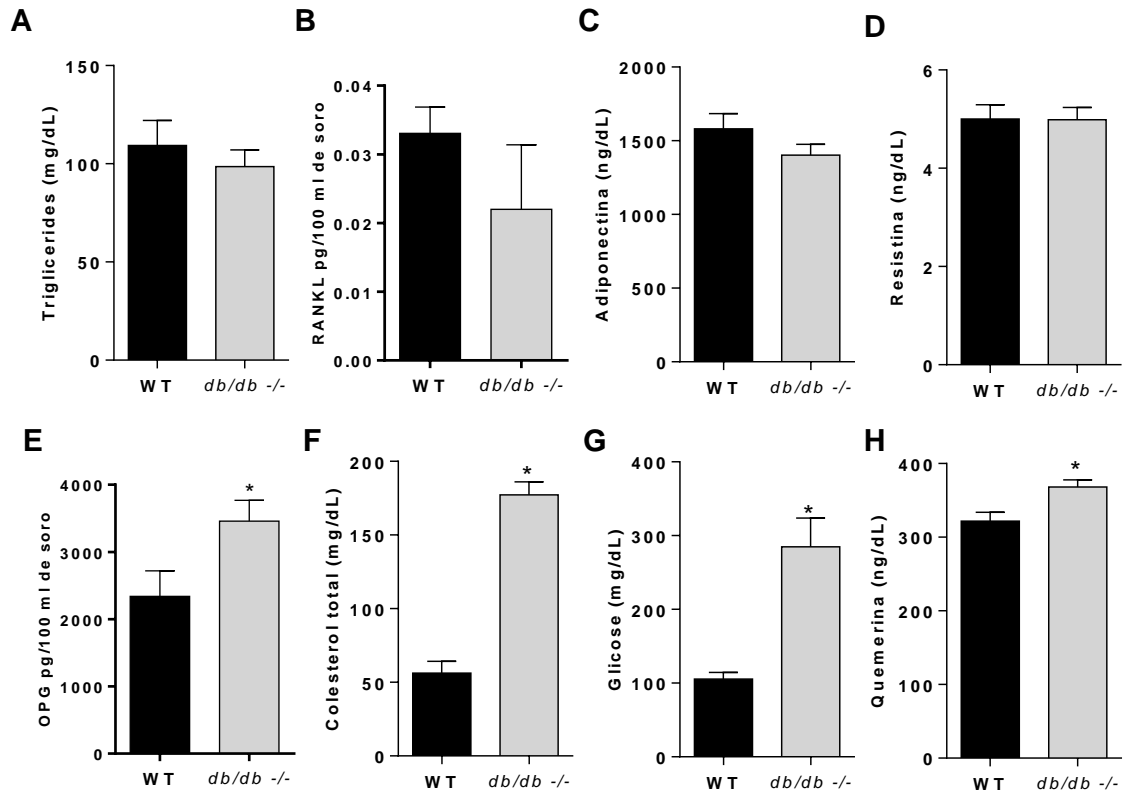


Figura 155. Parâmetros inflamatórios de citocinas e moléculas relacionadas à reabsorção óssea avaliadas no soro de animais WT (WT) e *db/db*^{-/-}. (A) triglicerides; (B) RANKL; (C) Adiponectina; (D) Resistina; (E) Osteoprotegerina; (F) Colesterol; (G) Glicose; (H) Quemerina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo WT.

7. Discussão

Alguns estudos transversais já demonstraram que existe uma associação entre a obesidade e a DP (Al-Zahrani et al., 2003; Hegde et al., 2019), porém não foi elucidado ainda um mecanismo claro desta comorbidade. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o consumo de uma dieta rica em lipídeos induz alterações em camundongos, como um aumento do índice de adiposidade, aumento sorológico de leptina e diminuição de adiponectina. Dados que corroboram características da obesidade observada em seres humanos (Considine et al., 1996; Arita et al., 1999). Tanto leptina quanto adiponectina são adipocinas com importantes papéis na resposta imune do hospedeiro, sendo que a leptina possui um papel pró-inflamatório, sendo seu receptor, pertencente à superfamília de receptores de citocinas de classe I. Além disso, já foi demonstrada a sua capacidade de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias em monócitos (Revisto por Abella et al., 2017). Por outro lado, a adiponectina desempenha um papel anti-inflamatório sobre macrófagos e possui efeitos na inibição da produção de TNF (Yokota et al., 2000).

Utilizando o modelo de DP estabelecido por Madeira et al. (2012), no qual *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* é capaz de gerar uma perda óssea alveolar, foi observado que o consumo da dieta HF, por animais não infectados, foi capaz de induzir perda óssea alveolar similar à induzida pela infecção por *A. actinomycetemcomitans*. Um estudo de Montalvany-Antonucci e colaboradores (2018) demonstrou, em um modelo de obesidade não associado à DP, fenótipos prejudiciais à microarquitetura óssea induzido pelo consumo de dieta HF em camundongos. Neste trabalho, os animais apresentaram também aumento da expressão de genes inflamatórios e associados à reabsorção óssea.

Neste presente estudo, a avaliação do consumo de uma dieta HF em diferentes tempos mostrou que houve aumento significativo de adiposidade após 5 e 8 semanas, associado a um aumento significativo de MPO nos tecidos periodontais, após 5 semanas. Sendo assim, essas alterações podem ter contribuído para a perda óssea alveolar significativa que só foi observada

após 12 semanas. Além disso, menores níveis de IL-10 foram observados no tecido adiposo de animais alimentados com a dieta HF, corroborando um estudo em que foram demonstrados menores níveis de IL-10 neste mesmo tecido, em animais alimentados com a dieta HF, diminuindo assim o fenótipo de proteção de adipócitos ao efeito de TNF (Lumeng et al., 2007). Este estudo também mostrou que o tratamento com IL-10 diminuiu a expressão de CCL2, uma quimiocina diretamente relacionada à quimiotaxia de macrófagos (Deshmane & Sergey Kremlev, Shohreh Amini, 2009).

Nos tecidos periodontais, foi observado um aumento de MPO após 5 e 12 semanas, de maneira similar ao observado nos tecidos periodontais de camundongos *db/db*^{-/-}. Sabe-se que neutrófilos possuem um importante papel na ativação e diferenciação de osteoclastos, pela produção de RANKL de membrana, cuja expressão é maior quando há uma ativação de receptores do tipo *Toll* (Chakravarti et al., 2009), podendo ser um forte indicativo de um papel do neutrófilo na perda óssea alveolar observada após 12 semanas de consumo de dieta HF.

Sabe-se que a obesidade induz um perfil pró-inflamatório ao tecido adiposo, acompanhado de hipóxia (Reilly & Saltiel, 2017). Estudos mostram um aumento de citocinas pró-inflamatórias no tecido adiposo de camundongos sob dieta HF (Reilly & Saltiel, 2017; Lumeng et al., 2007). Entretanto, no tecido adiposo, observou-se uma diminuição da produção da citocina pró-inflamatória TNF após 5 semanas de consumo da dieta HF, além da diminuição da quimiocina CXCL1 após 5 ou 8 semanas de consumo da dieta HF. As alterações nos parâmetros inflamatórios, somadas ao aumento do infiltrado neutrófilico nos tecidos periodontais, podem ter contribuído para a manutenção de uma disbiose no biofilme bucal, característica importante da patogênese da DP (Hajishengallis & Lamont, 2012).

Análises da microbiota bucal mostram que a dieta HF aumentou a contagem das espécies *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella nigrescens*, e *Neisseria mucosa*. Estudos mostram uma forte associação de *Fusobacterium nucleatum* à DP, sendo uma bactéria classificada no complexo laranja de Socransky e colaboradores (1998), ou seja, *F. nucleatum* facilita a colonização

de bactérias do complexo vermelho, tendo sua presença constantemente associada a quadros de DP (Deng et al., 2017). *P. nigrescens*, não tem sido considerado um microrganismo fortemente relacionado à DP, porém, já foi demonstrado que, em um contexto de disbiose, é capaz de mudar a expressão de fatores de virulência, tornando-se um microrganismo patogênico, porém, sem mudanças em sua abundância no biofilme (Szafran, 2015). Estudos atuais mostram que um estímulo disbiótico pode levar à alteração na diversidade da microbiota e maior expressão de fatores de patogenicidade (Deng et al., 2017).

Já é bem descrito que a microbiota intestinal possui um importante papel na obesidade (Backhed et al., 2007; Cani et al., 2008; Turnbaugh et al., 2008). Algumas alterações são consideradas marcantes como a diminuição dos níveis de Bacteroidetes e aumento de representantes do filo Firmicutes em pacientes obesos (Bessesen, 2006). Além disso, um aumento de enterobactérias foi descrito por Peters *et al.*, (2018) como associado à obesidade em seres humanos. A quantificação de bactérias nas fezes de camundongos mostrou que camundongos obesos apresentaram um aumento da contagem de enterobactérias, o que não ocorreu com o uso de CHX. Apesar disso, o tratamento com CHX não alterou o aumento no índice de adiposidade induzido pelo consumo da dieta HF. Por outro lado, o tratamento com CHX foi associado à redução na perda óssea alveolar e do infiltrado neutrofílico em animais alimentados com a dieta HF, além de melhores parâmetros ósseos. Esses resultados demonstram um importante papel da microbiota bucal disbiótica na perda óssea alveolar induzida por dieta HF. Estudos mostram que a perda óssea alveolar está associada a um perfil disbiótico (Deng et al., 2017; Hajishengallis, 2016) e pró-inflamatório nos tecidos periodontais relacionada ao aumento de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias neste tecido (Fernandes et al., 2013; Homayoun H. et al., 2000; Pollreis et al., 2010; Shan-Ling Hung et al., 2013).

As análises de citocinas em tecidos periodontais mostraram que não houve aumento das citocinas pró-inflamatórias avaliadas em camundongos obesos. Os resultados mostram uma diminuição dos níveis de IL-6 e TNF, após 12 semanas de consumo de dieta HF. Por outro lado, uma diminuição das citocinas IL-1 β e IL-17 foi observada nos camundongos sob dieta HF e trados

com CHX. Neste caso, os dados corroboram dados de um estudo que mostrou o efeito do tratamento tópico de CHX, que além de antimicrobiano, desempenha um papel na redução da resposta inflamatória local (Hourihaddad Y & Halabi A, 2008).

Sabe-se que a dieta é um fator determinante para a colonização e a manutenção da homeostase da microbiota bucal (Murtaza *et al.*, 2019). Assim, uma disbiose poderia ser induzida diretamente pela dieta HF e não um resultado do aumento do tecido adiposo. Utilizando-se camundongos *db/db*^{-/-}, foi observado uma perda óssea alveolar, além de um aumento significativo de MPO, quando comparados aos animais WT, demonstrando que ambos os fenótipos não foram dependentes do consumo da dieta HF, mas relacionado ao aumento do tecido adiposo e alterações associadas à obesidade.

Análises da maxila de camundongos *db/db*^{-/-} também mostraram uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF; além da diminuição de resistina. Resistina é uma importante adipocina com papel pró-inflamatório (Bokarewa *et al.*, 2014), na resistência à insulina (Revisto por Ouchi *et al.*, 2011), além de já ter sido correlacionada negativamente com BMD de ossos longos, em pacientes com osteoporose (Mohiti-Ardekani, J *et al.*, 2013).

As análises de soro mostraram um aumento de OPG no soro dos camundongos *db/db*^{-/-}, enquanto RANKL não apresentou alterações, sugerindo que a reabsorção óssea pode não estar relacionada a alterações sorológicas de RANKL e OPG. Assim, a presença de um infiltrado neutrofílico nos tecidos periodontais pode ter contribuído para a perda óssea alveolar induzida pelo aumento do tecido adiposo observada neste estudo. Os camundongos *db/db*^{-/-} também apresentaram um aumento de quemerina no soro e nos tecidos periodontais. Já foi demonstrado que quemerina possui um importante papel na ativação e diferenciação de osteoclastos, associada à perda óssea alveolar induzida pela dieta HF (Ramos-Junior *et al.*, 2016).

Sabendo-se da crescente importância e do interesse pela identificação de mecanismos que possam esclarecer a associação entre a DP e a obesidade, este estudo aponta para um importante papel da microbiota bucal nessa

comorbidade. Deve-se reiterar que mais estudos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos em tais processos.

Consideração finais:

Os resultados deste presente estudo mostram que o aumento de tecido adiposo, utilizando dois modelos de obesidade, induziu perda óssea alveolar em camundongos similarmente a perda óssea apresentada em um modelo de DP utilizando *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, a perda óssea alveolar esteve associada a uma disbiose na cavidade bucal com alterações na quantificação de microrganismos previamente descritos como envolvidos na DP. Foi demonstrado também que uma disbiose bucal induzida pelo consumo da dieta HF possui um importante papel na perda óssea alveolar e na diminuição de parâmetros relacionados à qualidade do osso alveolar, uma vez que o uso de CHX foi capaz de manter a saúde óssea. Adicionalmente, camundongos obesos apresentaram maior infiltrado neutrofílico nos tecidos periodontais, apontando para um possível papel do neutrófilo na perda óssea alveolar, uma vez que é uma célula envolvida na ativação de osteoclastos.

8. Referências

- Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Pino, J., Gonzalez-Gay, M. A., Gómez-Reino, J. J., ... Gualillo, O. (2017). Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nature Reviews Rheumatology*, *13*(2), 100–109. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.209>
- Al-zahrani, M. S., Bissada, N. F., & Borawski, E. A. (2003). Obesity and Periodontal Disease in Young, Middle-Aged, and Older Adults. *Journal of Periodontology*, *74*(5), 610–615. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.5.610>
- Alemanya, M. (2012). Metabolic Syndrome : A Multifaceted Disease of Affluence, *2*, 155–165.
- Arana-chavez, V. E., & Avila-campos, M. J. (2000). epiteliais bucais : estabilidade e aspectos ultra-estruturais Actinobacillus actinomycetemcomitans attached to oral epithelial cells : stability and ultrastructural aspects. *Microbiologia (Madrid)*, 311–318.
- Arita, Y., Kihara, S., Ouchi, N., Takahashi, M., Maeda, K., Miyagawa, J. I., ... Matsuzawa, Y. (1999). Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *257*(1), 79–83. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0255>
- Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F., & Gordon, J. I. (2007). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice, *104*(3).
- Bates, S. H., & Myers, M. G. (2003). The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, *14*(10), 447–452. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2003.10.003>
- Blum, H. E. (2017). The human microbiome. *Advances in Medical Sciences*, *62*(2), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.04.005>
- Bogdanov, P., Corraliza, L., Villena, J. A., Carvalho, A. R., Herna, C., & Simo, R. (2014). The db / db Mouse : A Useful Model for the Study of Diabetic Retinal Neurodegeneration, *9*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097302>
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., Tarkowski, A., Bokarewa, M., ... Tarkowski, A. (2014). Resistin, an Adipokine with Potent Proinflammatory Properties. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5789>
- Bozaoglu, K., Bolton, K., Mcmillan, J., Zimmet, P., Jowett, J., Collier, G., ... Segal, D. (2018). Chemerin Is a Novel Adipokine Associated with Obesity and Metabolic Syndrome, *148*(July), 4687–4694. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0175>
- Cani, P. D., Bibiloni, R., Knauf, C., Waget, A., Neyrinck, A. M., Delzenne, N. M., & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice, (October 2007), 1–25.
- Chakravarti, A., Raquil, M., Tessier, P., & Poubelle, P. E. (2009). Surface RANKL of Toll-like receptor 4 – stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption, *114*(8), 1633–1644. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-178301>.The
- Chambrone, L., Lima, L. a. P. a., & Chambrone, L. A. (2008). Prevalência das Doenças Periodontais no Brasil. Parte II. 1993-2003. *Revista Odonto*, *16*(31), 69–76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15603/2176-1000/odonto.v16n31p69-76>
- Chapple, I. L. C., Van Der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., ... Graziani, F. (2015). Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, *42*(S16), S71–S76. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12366>

- Chintakuntlawar, A. V., & Chodosh, J. (2009). Chemokine CXCL1 / KC and its Receptor CXCR2 Are Responsible for Neutrophil Chemotaxis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(10). <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0006>
- Choe, S. S., Huh, J. Y., Hwang, I. J., Kim, J. I., & Kim, J. B. (2016). Adipose Tissue Remodeling : its Role in energy Metabolism and Metabolic Disorders, 7(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00030>
- Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: An endocrine organ. *Archives of Medical Science*, 9(2), 191–200. <https://doi.org/10.5114/aoms.2013.33181>
- Cortelli, J. R., Fernandes, C. B., Costa, F. O., Cortelli, S. C., Kajiya, M., Howell, S. C., & Kawai, T. (2011). Detection of periodontal pathogens in newborns and children with mixed dentition, 1041–1050. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1405-9>
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science*, 326(5960), 1694–1697. <https://doi.org/10.1126/science.1177486>
- Crotti, T., Smith, M. D., Hirsch, R., Soukoulis, S., Weedon, H., Capone, M., ... Haynes, D. (2003). Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 38(4), 380–387. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2003.00615.x>
- Curtis, M. A., Zenobia, C., & Darveau, R. P. (2011). The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host and Microbe*, 10(4), 302–306. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.008>
- D. H. Bessesen, M. (2006). New Developments in Obesity, 163–165.
- Dandona, P., Weinstock, R., Thusu, K., Abdel-Rahman, E., Aljada, a, & Wadden, T. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in sera of obese patients: fall with weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(8), 2907–2910. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.8.5026>
- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 481–490. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- Deng, Z.-L., Szafranski, S. P., Jarek, M., Bhujju, S., & Wagner-Döbler, I. (2017). Dysbiosis in chronic periodontitis: Key microbial players and interactions with the human host. *Scientific Reports*, 7(1), 3703. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03804-8>
- Deshmane, S. L., & Sergey Kremlev, Shohreh Amini, and B. E. S. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 29(6). <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Desvarieux, M., Demmer, R. T., Jacobs, D. R., Papapanou, P. N., Sacco, R. L., & Rundek, T. (2013). Changes in Clinical and Microbiological Periodontal Profiles Relate to Progression of Carotid Intima-Media Thickness: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *Journal of the American Heart Association*, 2(6), e000254–e000254. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000254>
- Detert, J., Pischon, N., Burmester, G. R., & Buttgerit, F. (2010). The association between rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Arthritis Res Ther*, 12(5), 218. <https://doi.org/10.1186/ar3106>
- Dethlefsen, L., McFall-Ngai, M., & Relman, D. A. (2007). An ecological and evolutionary perspective on humang-microbe mutualism and disease. *Nature*, 449(7164), 811–818. <https://doi.org/10.1038/nature06245>

- Devine, D. A., Marsh, P. D., & Meade, J. (2015). Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *Journal of Oral Microbiology*, *7*(1), 1–4. <https://doi.org/10.3402/jom.v7.26941>
- Dominy, S. S., Lynch, C., Ermini, F., Benedyk, M., Marczyk, A., Konradi, A., ... Curtis, M. A. (2019). Porphyromonas gingivalis in Alzheimer ' s disease brains : Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *HEALTH AND MEDICINE*, 1–22.
- Dumitrescu, A. L. (2016). Editorial : Periodontal disease – a Public Health Problem, *3*(January), 2015–2017. <https://doi.org/10.1111/idj.12185>
- Eberhard, J., Grote, K., Luchtefeld, M., Heuer, W., Schuett, H., Divchev, D., ... Stiesch, M. (2013). Experimental Gingivitis Induces Systemic Inflammatory Markers in Young Healthy Individuals: A Single-Subject Interventional Study. *PLoS ONE*, *8*(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055265>
- Edlund, A., Yang, Y., Yooseph, S., He, X., Shi, W., & Mclean, J. S. (2018). Uncovering complex microbiome activities via metatranscriptomics during 24 hours of oral biofilm assembly and maturation, 1–22.
- Eke, P. I., Dye, B. A., Wei, L., Thornton-Evans, G. O., & R.J. Genco4Genco, R. J. (2012). Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States : 2009 and 2010, 914–920. <https://doi.org/10.1177/0022034512457373>
- Feng, Z., & Weinberg, a. (2006). Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*, *40*, 50–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00148.x>
- Fernandes, M., Madeira, M., Queiroz-junior, C. M., Costa, M., & Cordeiro, M. (2013). Platelet-Activating Factor Receptor Blockade Ameliorates Aggregatibacter actinomycetemcomitans -Induced Periodontal Disease, *81*(11), 4244–4251. <https://doi.org/10.1128/IAI.01046-13>
- Fitzpatrick, S. G., & Katz, J. (2010). The association between periodontal disease and cancer: A review of the literature. *Journal of Dentistry*, *38*(2), 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.10.007>
- Garcia, R. I., Henshaw, M. M., & Krall, E. a. (2001). Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontology 2000*, *25*(1), 21–36. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250103.x>
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R. B., Campanelli, A. P., Garlet, T. P., Avila-campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, S. (2008). The essential role of IFN- g in the control of lethal Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection in mice, *10*. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.01.010>
- González-Muniesa, P., Martínez-González, M.-A., Hu, F. B., Matsuzawa, Y., Loos, R. J. F., Moreno, L. A., & Martinez, J. A. (2017). Obesity. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.34>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. *Journal of Periodontology*, *74*(3), 391–401. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Güngör, Koyuncuoğlu N. (2014). Overweight and Obesity in Children and Adolescents. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, *6*(3), 129–143. <https://doi.org/10.4274/jcrpe.1471>
- Gurunathan, U., & Myles, P. S. (2016). Limitations of body mass index as an obesity measure of perioperative risk. *British Journal of Anaesthesia*, *116*(3), 319–321. <https://doi.org/10.1093/bja/aev541>
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology.

- Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity : the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology, 27, 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hajishengallis, George. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis : keystones , pathobionts , and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, George. (2015). Periodontitis: From microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785>
- Hajishengallis, George. (2016). Inflammation, 15(1), 30–44. <https://doi.org/10.1038/nri3785.Periodontitis>
- Hales, C. M., Carroll, M. D., Fryar, C. D., Ogden, C. L., & Ph, D. (2017). Prevalence of Obesity Among Adults and Youth :, (288), 2015–2016.
- Hegde, S., Chatterjee, E., Rajesh, K. S., & S, A. K. M. (2019). Obesity and its association with chronic periodontitis : A cross - sectional study, 1–5. <https://doi.org/10.4103/jehp.jehp>
- Henderson, B., Ward, J., & Ready, D. (2010). Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans : a triple A* periodontopathogen? *Periodontol 2000*, 54(1), 78–105.
- Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *Journal of Immunology Research*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/615486>
- Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (1999). Interleukin-1B and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3), 255–259. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(99\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(99)00162-3)
- Homayoun H. Zadeh, Frank C. Nichols, K. T. M. (2000). The role of the cell-mediated immune response to Actinobacillk actinomycetemcomitans and Porphyfomonas gingivalis in periodontitis, 239–288.
- Houri-Haddad Y, Halabi A, S. W. (2008). Inflammatory response to chlorhexidine , minocycline HCl and doxycycline HCl in an in vivo mouse model. *Journal of Clinical PeriodontologyClin Periodontol*, 783–788. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01290.x>
- Jun-Ming Zhang, J. A. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.*, 69(2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e.Cytokines>
- Kearns, A. E., Khosla, S., & Kostenuik, P. J. (2008). Receptor activator of nuclear factor κ B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocrine Reviews*, 29(2), 155–192. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0014>
- Kearns, A. E., Khosla, S., & Kostenuik, P. J. (2018). Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand and Osteoprotegerin Regulation of Bone Remodeling in Health and Disease, 29(July), 155–192. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0014>
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2381>
- Kral, T. V. E., & Rolls, B. J. (2012). Oxford Handbooks Online Portion Size and the Obesity Epidemic, (July 2018), 1–21. <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199736362.013.0022>

- Leishman, S. J., Ford, P. J., Do, H. L., Palmer, J. E., Heng, N. C. K., West, M. J., ... Cullinan, M. P. (2012). Periodontal pathogen load and increased antibody response to heat shock protein 60 in patients with cardiovascular disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(10), 923–930. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01934.x>
- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., Saltiel, A. R., Lumeng, C. N., Bodzin, J. L., & Saltiel, A. R. (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization Find the latest version : Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization, 117(1), 175–184. <https://doi.org/10.1172/JCI29881.both>
- Madeira F.M, Corrêa, C. M. Q. J. D., Werneck, S. M. C., Machado, F. S., Cunha, T. M., Garlet, G. P., ... Souza, D. G. (2017). The role of 5- lipoxygenase in Aggregatibacter induced alveolar bone loss, (May), 793–802. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12755>
- Madeira, M. F. M., Queiroz-Junior, C. M., Costa, G. M., Santos, P. C., Silveira, E. M., Garlet, G. P., ... Souza, D. da G. (2012). Mif induces osteoclast differentiation and contributes to progression of periodontal disease in mice. *Microbes and Infection*, 14(2), 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.09.005>
- Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38(3), 204–211. <https://doi.org/10.1159/000077756>
- Maury, E., & Brichard, S. M. (2010). Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.07.031>
- Medzhitov, R. (2010). Overview Essay Inflammation 2010 : New Adventures of an Old Flame, 771–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.006>
- Miele, L., Giorgio, V., Alberelli, M. A., Candia, E. De, Gasbarrini, A., Grieco, A., & Giorgio, V. (2015). Impact of Gut Microbiota on Obesity , Diabetes , and Cardiovascular Disease Risk. <https://doi.org/10.1007/s11886-015-0671-z>
- Mohiti-Ardekani, J., Soleymani-Salehabadi, H., Owlia, M. B., & Mohiti, A. (2013). Relationships between serum adipocyte hormones (adiponectin, leptin, resistin), bone mineral density and bone metabolic markers in osteoporosis patients J. *J. Mohiti-Ardekani (&)*. <https://doi.org/10.1007/s00774-013-0511-4>
- Montalvany-antonucci, C. C., Campos, M., Versiani, A., Ferreira, M., Macari, S., Ramos-junior, E. S., ... Aparecida, T. (2018). ScienceDirect High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 59, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.06.006>
- Murtaza, N., Burke, L. M., Vlahovich, N., Charlesson, B., Neill, H. M. O., Ross, M. L., ... Morrison, M. (2019). Analysis of the Effects of Dietary Pattern on the Oral Microbiome of Elite Endurance Athletes. *Nutrients*, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11030614>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Publishing Group*, 11(FEBRUARY). <https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., ... S., M. (2018). Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(December 2017), S219–S229. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12951>
- Papapanou, P. N., & Susin, C. (2017). Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontology 2000*, 75(1), 45–51. <https://doi.org/10.1111/prd.12200>

- Peters, B. A., Shapiro, J. A., Church, T. R., Miller, G., Trinh, C., Yuen, E., ... Ahn, J. (2018). OPEN A taxonomic signature of obesity in a large study of American adults. *Scientific Reports*, (February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28126-1>
- Pollreis, A., Huang, Y., Ga, R., Cheng, B., Kebschull, M., & Pn, P. (2010). Enhanced monocyte migration and pro-inflammatory cytokine production by Porphyromonas gingivalis infection, 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2009.01225.x>
- Queiroz-junior, C. M., Moreira, M. F., Coelho, F. M., Vasconcelos, V., Leal, R., Bessoni, C., ... Garlet, G. P. (2011). Experimental Arthritis Triggers Periodontal Disease in Mice: Involvement of TNF- α and the Oral Microbiota. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101195>
- ROBERT V. CONSIDINE, P H .D., MADHUR K. S INHA, P H .D., MARK L. H EIMAN, P H .D., AIDAS K RIAUCIUNAS, P H .D., THOMAS W. STEPHENS, P H .D., MARK R. N YCE, M.S., JOANNA P. OHANNESIAN, B.S.N., CHERYL C. MARCO, R.D., LINDA J. MC K EE, M.H.S., THOM, M. D. (1996). Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE*, 292–295.
- Ramos-junior, E. S., Leite, \tilde{A} . G. A., Carmo-silva, \tilde{A} . C. C., Taira, T. M., Neves, K. B., Ab, L., ... Cunha, F. Q. (2016). Adipokine Chemerin Bridges Metabolic Dyslipidemia and Alveolar Bone Loss in Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3072>
- Ramos-junior, E. S., Leite, \tilde{A} . G. A., Carmo-silva, \tilde{A} . C. C., Taira, T. M., Neves, K. B., Ab, L., ... Fukada, S. Y. (2017). Adipokine Chemerin Bridges Metabolic Dyslipidemia and Alveolar Bone Loss in Mice. *JBMR*. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3072>
- Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Publishing Group*, 13(11), 633–643. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>
- Rolls, B. J., Bell, E. A., Castellanos, V. H., Chow, M., Pelkman, C. L., & Thorwart, M. L. (1999). Energy density but not fat content of foods affected energy intake in lean and obese women 1 – 3, (July).
- Saúde, M. da. (2019). *VIGILÂNCIA DE FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICAS POR INQUÉRITO TELEFÔNICO*.
- Savage, A., Eaton, K. A., Moles, D. R., & Needleman, I. (2009). A systematic review of definitions of periodontitis and methods that have been used to identify this disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 36(6), 458–467. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2009.01408.x>
- Sawant, K. V, Poluri, K. M., Dutta, A. K., Sepuru, K. M., Troshkina, A., Garofalo, R. P., & Rajarathnam, K. (2016). Chemokine CXCL1 mediated neutrophil recruitment : Role of glycosaminoglycan interactions. *Nature Publishing Group*, 4–11. <https://doi.org/10.1038/srep33123>
- Shan-Ling Hung, Nin-Gi Lee, Lien-Yu Chang, Yen-Ting Chen, and Y.-L. L. (2013). Stimulatory Effects of Glucose and Porphyromonas gingivalis Lipopolysaccharide on the Secretion of Inflammatory Mediators From, 85(1). <https://doi.org/10.1902/jop.2013.130009>
- Shapses, S. A., & Sukumar, D. (2012). Bone Metabolism in Obesity and Weight Loss Sue. *Annu Rev Nutr*, (113), 287–309. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104655.Bone>
- Sigmund S., Socransky, A. D. H. (2002). Dental biofilms : *Periodontol 2000*, 28, 12–55.
- Socransky, S. S., Haffajee, a D., Cugini, M. a, Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144.

<https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>

Solano, C., Echeverez, M., & Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>

Szafran, S. P. (2015). Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; a metatranscriptome analysis, (May). <https://doi.org/10.1038/npjbio>

Turnbaugh, P. J., Backhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. (2008). Marked alterations in the distal gut microbiome linked to diet- induced, 3(4), 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.02.015>.Marked

Worch, K. P., Listgarten, M. A., & Korostoff, J. M. (2001). A Multidisciplinary Approach to the Diagnosis and Treatment of Early-Onset Periodontitis: A Case Report. *Journal of Periodontology*, 72(1), 96–106. <https://doi.org/10.1902/jop.2001.72.1.96>

Wright, S. M., & Aronne, L. J. (2012). Causes of obesity. *Abdominal Imaging*, 37(5), 730–732. <https://doi.org/10.1007/s00261-012-9862-x>

Yokota, T., Oritani, K., Takahashi, I., Ishikawa, J., Matsuyama, A., Ouchi, N., ... Matsuzawa, Y. (2000). Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 96(5), 1723–1732. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/96/5/1723.abstract>

Zhang, C., Zhang, M., Wang, S., Han, R., Cao, Y., Hua, W., ... Zhao, L. (2010). Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *The ISME Journal*, 4(2), 232–241. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.112>

Zhao, L. (2013). The gut microbiota and obesity: from correlation to causality. *Nature Publishing Group*, 11(9), 639–647. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3089>