



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Chierici Marcantonio

**Influência da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais induzida
pela força mecânica ortodôntica**

ARARAQUARA
2018



UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL
PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Camila Chierici Marcantonio

**Influência da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais induzida
pela força mecânica ortodôntica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, para o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli
Co-orientador: Profa. Dra. Andressa Vilas Boas Nogueira

ARARAQUARA
2018

Marcantonio, Camila Chierici

Influência da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais induzida pela força mecânica ortodôntica / Camila Chierici Marcantonio. – Araraquara: [s.n.], 2018

52 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Coorientadora: Andressa Vilas Boas Nogueira

1. Técnicas de movimentação dentária 2. Obesidade 3. Inflamação
4. Adipocinas I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

Camila Chierici Marcantonio

**Influência da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais induzida
pela força mecânica ortodôntica**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli - UNESP/FOAr

2º Examinador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Junior – FOP/Unicamp

3º Examinador: Profa. Dra. Raquel Mantuaneli Scarel Caminaga - UNESP/FOAr

Araraquara, 14 de Março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Camila Chierici Marcantonio

NASCIMENTO	06 de outubro de 1992 – Araraquara, SP, Brasil
FILIAÇÃO	Elcio Marcantonio Junior Rosemary Adriana Chierici Marcantonio
2011/2015	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
2016 /2018	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia, Nível de Mestrado na Faculdade de Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Dedico este trabalho aos meus pais **Elcio e Adriana**, que nunca mediram esforços para me ajudar e que são meus maiores exemplos de vida e profissão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Joni Augusto Cirelli** pela oportunidade e confiança depositada em mim. Sempre paciente compartilhando comigo conselhos e conhecimento.

A co-orientadora **Andressa** pela atenção que sempre dedicou a mim. Por toda a amizade e auxílio durante meu Mestrado. Obrigada por ser minha companheira e por me ensinar tanto.

Aos demais orientados do Prof. Joni, em especial: **Rafael, Natália, Maria Eduarda e Renata** pela amizade, dedicação e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos meus pais **Elcio** e **Adriana** por todo o amor, dedicação e suporte oferecidos incondicionalmente tanto no âmbito pessoal como profissional. Vocês são meus maiores orgulhos e exemplos.

Às minhas irmãs **Carolina, Luiza** e **Tatiana** por todo o apoio, companheirismo e amor imensurável entre nós. Aos meus cunhados **Eduardo** e **Felipe** por todo o carinho de sempre e aos meus sobrinhos **Lucca, Laura** e **Mateus** que me ensinam diariamente quão grande e sincero pode ser o amor.

À toda minha família pela enorme importância que possuem em minha vida, por todo amor existente entre nós e por comemorarem comigo todas minhas conquistas. Em especial aos meus avós **Rose, Wamberto, Elcio** e **Marilene** que sempre deixaram transparecer seu orgulho por mim e por serem sempre tão presentes em minha vida.

Ao meu namorado **Nader** pelo amor e companheirismo ao longo de todos esses anos juntos, sempre me apoiando e incentivando em minhas decisões.

A todos companheiros de Mestrado, em especial aos que estão comigo desde a Graduação: **Fernanda, Felipe** e **José Rodolfo** pela amizade sincera, companheirismo e convivência diária. Ter vocês comigo torna a rotina muito mais prazerosa e divertida. Muito obrigada por me socorrerem e ouvirem quando precisei e por todas as risadas e momentos que compartilhamos.

Aos demais colegas da pós-graduação pela convivência e por contribuírem com a transferência de conhecimentos e experiências. Em especial aos amigos **Guilherme Oliveira, Cássio Scardueli, Mauricio Tinajero** e **Monica Tinajero** por toda ajuda e carinho que sempre tiveram por mim.

Aos amigos de Araraquara e que fiz na Graduação por compreenderem minha ausência, sempre me apoiarem e pelos momentos de descontração.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araraquara, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. **Elaine Maria Sgavioli Massucato** e de seu vice-diretor Prof. Dr. **Edson Alves de Campos** pelas condições oferecidas para a realização desta pesquisa.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara por toda contribuição para a minha formação profissional.

Aos professores desta Faculdade e àqueles que lecionaram durante o curso de Pós-Graduação, em especial aos **professores da Disciplina de Periodontia** pela formação, orientação e convivência diária.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia e da Disciplina de Periodontia, em especial: **Claudinha, Regina Lúcia, Isabela, Suleima, Luana, Toninho e Thelma**, sempre dispostos a ajudar. Obrigada por todo o carinho que sempre tiveram comigo.

Aos funcionários da Biblioteca pela atenção e ajuda na correção desta tese.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação por toda gentileza e cooperação de sempre.

Aos demais funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara/UNESP.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UNESP, em especial ao **Prof. Dr. Paulo Inácio da Costa**, por realizarem a análise bioquímica do perfil lipídico e níveis de glicemia.

À **Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari** da Disciplina de Fisiologia da FOAr/UNESP e sua aluna **Jéssica** pelos esclarecimentos e auxílio quanto à dieta hiperlipídica.

Ao **Prof. Dr. James Deschner** por disponibilizar seu laboratório e materiais para a realização do RT-qPCR.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro (Processo:2016/00732-0).

Marcantonio CC. Influência da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais induzida pela força mecânica ortodôntica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

Resumo

Citocinas e adipocinas são moléculas que se encontram em concentrações elevadas em tecidos e no soro de pacientes obesos e pacientes que apresentam condições ou doenças inflamatórias. A movimentação ortodôntica desencadeia uma sequência de eventos celulares e moleculares nos tecidos periodontais, onde há a liberação local de diversos mediadores inflamatórios. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar in vivo o efeito da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais de ratos induzida pela força mecânica ortodôntica. Um total de 32 animais foram randomicamente distribuídos em 4 grupos experimentais: C (controle), O (indução de obesidade), M (movimentação ortodôntica) e OM (indução de obesidade seguido de movimentação ortodôntica). Os animais submetidos à O receberam dieta hiperlipídica por 90 dias. A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente. Após 15 dias de movimento ortodôntico (grupos M e OM), os animais de todos os grupos foram sacrificados e os tecidos adiposos (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) foram removidos e pesados em balança de precisão. Além disso, foi feita análise sorológica para observar o perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total, HDL e LDL) e os níveis de glicemia. Análise microtomográfica realizada nas hemimaxilas para medir o percentual de volume ósseo alveolar (BVF), densidade óssea alveolar (BMD), análise linear de perda óssea e movimento dentário (nos grupos M e OM). Foi realizada também histometria para medir a perda óssea alveolar linear e estereometria para analisar a proporção dos seguintes componentes teciduais: fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Além disso, a expressão de genes no tecido gengival dos animais relacionados à obesidade como visfatina, adiponectina, IL6, TNF α e IL1 foram avaliados por RT-qPCR. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do pós teste Tukey ($p \leq 0.05$) e teste t-student (para análise da massa corporal dos animais e do movimento dentário - $p \leq 0.05$). Um aumento significativo de massa corporal e peso dos tecidos adiposos foi observado nos grupos O e OM. O grupo O apresentou também aumento do perfil lipídico e glicose sanguínea. O grupo OM apresentou menor BVF e BMD em relação aos demais grupos, uma tendência de maior movimento dentário em relação ao grupo M e uma maior perda óssea alveolar linear quando comparado ao grupo O. Na estereometria, o grupo O apresentou maior quantidade de células inflamatórias quando comparado aos demais grupos, e em relação à quantidade de fibroblastos, o grupo M foi maior do que os demais. Os grupos O e OM apresentaram maior expressão gênica de Nampt quando comparados ao grupo C e menor quando comparados ao grupo M. O grupo C apresentou maior expressão de TNF α quando comparado ao grupo M.

Palavras-chave: Técnicas de movimentação dentária. Obesidade. Inflamação. Adipocinas.

Marcantonio CC. Influence of obesity on the periodontal tissues remodeling induced by orthodontic mechanical force. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

Abstract

Cytokines and adipokines are molecules presented in high levels in tissues and serum of patients with obesity or inflammatory diseases. Orthodontic movement triggers a sequence of cellular and molecular events, resulting in local liberation of inflammatory mediators. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of obesity on rat periodontal tissues remodeling induced by mechanical orthodontic force. A total of 32 rats were randomly distributed into 4 experimental groups: C (control), O (obesity induction), M (orthodontic movement induction), and OM (obesity induction followed by orthodontic movement). Animals from O group received a high-fat diet for 90 days. The body weight was recorded weekly. After 15 days of orthodontic movement (groups M and OM), the animals from all the groups were euthanized and the adipose tissues (retroperitoneal, epididymal and mesenteric) were removed and weighed in a precision scale. In addition, serological analysis was performed to evaluate lipid profile (triglycerides, total cholesterol, HDL and LDL) and blood glucose levels. Microcomputerized tomography was performed to measure alveolar bone volume percentage (BVF), alveolar bone density (BMD), linear alveolar bone loss and tooth movement (on M and OM groups). Histological analysis was performed to evaluate linear alveolar bone loss and the proportion of tissue structures: collagens fibers, fibroblasts, inflammatory cells and blood vessels. In addition, gene expression on gingival tissue related to obesity like visfatin, adiponectin, IL6, TNF α and IL1 were evaluated by RT-qPCR. Statistical analysis was performed by ANOVA followed by post-test Tukey ($p \leq 0.05$) and t-student test (for body weight and tooth movement - $p \leq 0.05$). A significant increase of body weight and adipose tissues weight was observed in O and OM groups. O group showed an increase on lipid profile and blood glucose levels. OM group showed a decrease on BVF and BMD compared with all groups, a tendency of higher tooth movement when compared to group M and a higher alveolar bone loss when compared to O group. This group showed a higher quantity of inflammatory cells when compared to all groups, and M group showed a higher quantity of fibroblasts compared to all groups. O and OM groups showed higher Nampt expression when compared to C group and lower when compared to M group. C group showed higher TNF α expression when compared to M group.

Keywords: Tooth movement. Obesity. Inflammation. Adipokines

LISTA DE ABREVIATURAS

1M: 1º molar

2M: 2º molar

AC: área de compressão do ligamento periodontal

AT: área de tensão do ligamento periodontal

BMD: densidade óssea alveolar

BV: volume de osso alveolar

BVF: percentual de volume ósseo alveolar

C: grupo controle sem nenhuma intervenção

CI: células inflamatórias

COA: crista óssea alveolar

CrNi: níquel-cromo

D: dentina

E: espaço do esmalte

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

F: furca

FB: fibroblastos

FC: fibras colágenas

H/E: hematoxilina e eosina

HDL: lipoproteína de alta densidade

hPDL: células do ligamento periodontal

IL1: interleucina 1-beta

IL10: interleucina 10

IL6: interleucina 6

IMC: índice de massa corporal

JCE: junção cimento-esmalte

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LP: ligamento periodontal

M: grupo submetido ao movimento ortodôntico

micro-CT: microtomografia computadorizada

NAMPT: *nicotinamide phosphoribosyltransferase*

NHANES III: Nutrition Examination Survey

O: grupo submetido à indução de obesidade

OM: grupo submetido à indução de obesidade e ao movimento ortodôntico

P: polpa

PA: processo alveolar

PBEF: *pre-B-cell colony-enhancing factor 1*

RANKL: receptor ativador do fator nuclear kapa B

RELM: *Resistin-Like Molecules*

ROI: região de interesse

RT-qPCR: reverse transcription seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real

TNFa: fator de necrose tumoral alfa

TO: tecido ósseo

TV: volume tecidual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicas.....	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Obesidade e Inflamação	14
3.2 Adipocinas	15
3.3 Obesidade e Tecido Periodontal.....	16
3.4 Obesidade e Força Mecânica	17
4 MATERIAL E MÉTODO	20
4.1 Desenho Experimental.....	20
4.2 Indução da Obesidade	20
4.3 Instalação do Aparelho Ortodôntico	21
4.4 Sacrifício dos Animais	22
4.5 Massa Corporal	23
4.6 Tecidos Adiposos	23
4.7 Análise Sorológica	23
4.8 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)	23
4.9 Análise Histológica	26
4.9.1 Histometria.....	26
4.9.2 Estereometria	27
4.10 RT-qPCR.....	28
4,11 Análise Estatística.....	29
5 RESULTADOS	30
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	43

REFERÊNCIAS 44

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA..... 51

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo que resulta em impacto negativo sobre a saúde geral do indivíduo. Atualmente, com o aumento da prevalência da obesidade no mundo, que dobrou entre 1980 e 2014, essa condição sistêmica tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública¹.

Os tecidos adiposos produzem e liberam várias citocinas conhecidas como adipocinas, destacando-se dentre estas, visfatina, leptina, resistina e adiponectina, além de citocinas pró-inflamatórias consagradas como as interleucinas². Essas adipocinas não só regulam a resistência à insulina e o gasto energético, como também os processos imunoinflamatórios e de cicatrização³. Enquanto a adiponectina exerce efeito anti-inflamatório, as demais adipocinas apresentam características pró-inflamatórias⁴. A inflamação sistêmica presente na obesidade pode ser a ligação patogênica entre a obesidade e outras doenças ou condições inflamatórias³. Os níveis séricos dessas adipocinas encontram-se elevados em pacientes obesos e em pacientes apresentando outras condições ou doenças inflamatórias^{5, 6, 7}. Além disso, níveis elevados de visfatina tem sido detectado em fluido crevicular gengival e soro de pacientes com doença periodontal, sugerindo que a visfatina seja produzida no periodonto e seja regulada por processo inflamatório^{8, 9, 10}. Em um estudo in vitro do nosso grupo foi demonstrado que as células do ligamento periodontal (hPDL) produzem visfatina e que essa produção está aumentada em resposta ao estímulo bacteriano por *Fusobacterium nucleatum* e reduzida pela força biomecânica¹¹.

As forças mecânicas estão relacionadas diretamente com a condição óssea. Após a aplicação de carga mecânica ocorre a remodelação tecidual, que consiste em reabsorção e formação óssea, afetando a morfologia e massa óssea¹². Baseado nesse conhecimento, a atividade física tem mostrado reduzir o risco de fratura em pacientes com osteoporose por aumentar a densidade mineral óssea¹³. Por outro lado, estudos têm demonstrado que forças mecânicas modulam as reações imunoinflamatórias em algumas doenças inflamatórias, como a aterosclerose, a artrite reumatóide, a osteoartrite e a lesão pulmonar induzida por ventilação^{14, 15, 16}. Além disso, os efeitos benéficos ou maléficos das forças mecânicas parecem depender no tipo (compressão, tensão, tração) e magnitude (baixa, alta, fisiológica) da força.

Na Odontologia, as forças mecânicas são usadas no tratamento ortodôntico

para corrigir as más oclusões através do remodelamento dos tecidos periodontais. O movimento ortodôntico ocorre em resposta à aplicação de força mecânica externa a qual gera um desequilíbrio das forças fisiológicas que mantêm o dente em sua posição normal. Para isso, uma sequência de eventos celulares, moleculares e reações teciduais se iniciam. Esse processo é regulado por uma reação inflamatória aguda e asséptica caracterizada pela síntese e liberação local de diversos mediadores inflamatórios, destacando-se as citocinas inflamatórias, que induzem uma remodelação óssea coordenada consistindo na predominância de reabsorção óssea adjacente a áreas de compressão do ligamento periodontal (LP) e na predominância de neoformação óssea adjacente a áreas de tensão do LP, com subsequentes alterações adaptativas do LP, resultando no efeito clínico de movimento dentário^{17,18}. A presença de inflamação exacerbada pode afetar o processo de remodelação periodontal ocorrido durante a movimentação ortodôntica. Nosso grupo de pesquisa verificou in vivo que quando o movimento ortodôntico é introduzido em dentes com doença periodontal, maior perda óssea alveolar é detectada comparada aos demais grupos experimentais¹⁹. Nossos resultados também revelam maior expressão de interleucina-1b (IL1), fator de necrose tumoral-alfa (TNFa) nesses grupos amostrais, revelando a participação dessas citocinas na reabsorção óssea.

Atualmente, tem-se notado um aumento no número de pacientes obesos, crianças e adultos, procurando por tratamento ortodôntico; porém, a influência da obesidade neste tratamento carece de estudos. De acordo com alguns trabalhos, sugere-se que os tecidos ósseos e moles de indivíduos obesos apresentam alteração no desenvolvimento e crescimento, podendo afetar o tratamento ortodôntico²⁰. Além disso, foi demonstrada uma redução na concentração de leptina no fluido crevicular gengival de pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico, sugerindo que esse mediador também pode ser influenciado pela força mecânica²¹. Sabe-se, portanto, que a força mecânica modula a expressão de mediadores inflamatórios presentes na obesidade. Considerando a importância das células do ligamento periodontal no processo de reabsorção e aposição óssea durante a movimentação ortodôntica, estudos que avaliem o efeito da obesidade sobre os tecidos periodontais submetidos ao movimento ortodôntico permitirão uma melhor elucidação da possível influência desta doença sistêmica sobre o metabolismo ósseo.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

Avaliar in vivo o efeito da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais de ratos induzida pela força mecânica ortodôntica.

2.2 Específicas

- Avaliar o estabelecimento da obesidade por meio da mensuração da massa corporal, do peso dos tecidos adiposos (retroperitoneal, mesentérico e epididimal) e da análise sorológica de glicemia e perfil lipídico;

- Avaliar o deslocamento dentário ocorrido no período de estudo e o volume ósseo alveolar nos lados de pressão e tensão por microtomografia computadorizada;

- Avaliar por meio de análise histométrica as alterações ocorridas no nível ósseo alveolar;

- Avaliar por análise estereométrica o processo inflamatório nos tecidos periodontais de ratos, sob movimentação ortodôntica ou não em condições de saúde sistêmica ou obesidade, nos lados de pressão e tensão;

- Avaliar a expressão gênica de adipocinas e outros mediadores inflamatórios nos tecidos gengivais de ratos, sob ou não movimentação ortodôntica em condições de saúde sistêmica ou obesidade.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Obesidade e Inflamação

A obesidade é uma doença metabólica que afeta mundialmente 13% dos adultos¹. Ocorre pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no corpo, devido à exagerada ingestão de calorias e/ou sedentarismo, fatores genéticos e até mesmo disfunções hormonais²². É definida quando o cálculo do índice de massa corporal (IMC) resulta em valor maior ou igual a 30 kg/m². Segundo a Organização Mundial de Saúde, atualmente existem mais pessoas com sobrepeso do que abaixo do peso. Entre 1980 e 2014 dobrou-se o número de obesos, tornando-se assim um dos maiores problemas de saúde pública¹. Além disso, a obesidade está associada a diversas patologias como doença cardiovascular, artrite reumatoide, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de cânceres^{5, 6, 23}. Atualmente tem-se demonstrado a relação da obesidade com doenças inflamatórias, como a doença periodontal²⁴.

O estímulo responsável por desencadear os processos inflamatórios na obesidade ainda não foi totalmente elucidado. Entretanto, uma das hipóteses seria que o excesso de nutrientes presentes nas células metabólicas, como adipócitos, macrófagos e células T, promovem ativação de células imunes provocando um aumento na quantidade de citocinas e adipocinas^{25, 26}. Além do aumento no número de adipócitos há também aumento no volume destes. Este aumento de volume determina a secreção de citocinas inflamatórias, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF α), interleucina-6 (IL6), interleucina-1beta (IL1) e causa hipóxia. Portanto, há um aumento na inflamação local e sistêmica^{27,28}.

Os adipócitos além de secretar interleucinas são responsáveis por secretar adipocinas²⁹. Adipocinas são moléculas bioativas presentes em processos inflamatórios e metabólicos e são responsáveis por regular a resistência à insulina e o gasto energético³.

3.2 Adipocinas

As adipocinas são citocinas liberadas pelos tecidos adiposos que se apresentam por ser pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Portanto, participam de diversos processos metabólicos, incluindo resposta inflamatória². Na obesidade ocorre um aumento no número de adipocinas pró-inflamatórias e redução no número de citocinas anti-inflamatórias³⁰. Algumas adipocinas, como a adiponectina possui papel anti-inflamatório, enquanto outras, como a visfatina, leptina e resistina apresentam papel pró-inflamatório^{4,30}. Estas quatro adipocinas possuem ação importante nos tecidos periodontais, principalmente na presença de alguma inflamação, como é o caso da doença periodontal^{8,10}.

A adiponectina foi identificada em 1995 por Scherer et al.³¹ e é a adipocina mais abundante no corpo humano. Apresenta uma estrutura proteica com 224 aminoácidos e é sintetizada principalmente no tecido adiposo através dos adipócitos³². Sua atuação ocorre através de receptores transmembrana chamados AdipoR1, AdipoR2 e T-cadherin. Alguns desses receptores foram encontrados em fibroblastos de gengiva e em células do ligamento periodontal de humanos^{33,34}. A adiponectina é responsável por modular processos metabólicos³⁵ e imunes através da inibição de algumas citocinas pró-inflamatórias, como o TNFa, e pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL10)³⁶. Estimulando a proliferação e diferenciação de osteoblastos e favorecendo a diferenciação de células mesenquimais^{37,38,39}. Atua também de forma favorável sobre a regulação do metabolismo da glicose e dos ácidos graxos⁴⁰ e é encontrada em níveis baixos em doenças inflamatórias como a obesidade, resistência à insulina e a diabetes⁴¹.

A visfatina, também conhecida como *nicotinamide phosphoribosyltransferase* (NAMPT) ou *pre-B-cell colony-enhancing factor 1* (PBEF1), é uma proteína com 491 aminoácidos. Foi identificada pela primeira vez em 2005 por Fukuhara et al.⁴² Sua produção ocorre por adipócitos e principalmente por leucócitos, como os macrófagos⁴³. É sintetizada devido à presença de sinais inflamatórios. Está associada à altos valores de hemoglobina glicada, podendo levar à indução de resistência à insulina⁴⁴. É responsável pelo aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como a IL1, IL6 e TNFa⁴⁵. Nogueira et al.¹¹ demonstraram que as células do ligamento periodontal produzem visfatina e quando há presença de estímulo bacteriano por bactéria periodontopatogênica *Fusobacterium nucleatum*, está é aumentada.

A leptina é um hormônio peptídico não-glicolisado identificada em 1994 e é a adipocina mais estudada atualmente⁴⁶. É secretada no tecido adiposo e possui ação no hipotálamo modulando apetite, saciedade, aumentando do gasto energético e regulando o peso corporal⁴⁷. Atua também em células imunológicas, como células T e monócitos, participando em processos inflamatórios sistêmicos e locais^{48,49}. Níveis elevados de leptina podem afetar o sistema cardiovascular^{50,51}. Na presença de obesidade o hipotálamo apresenta resistência à insulina e à leptina, gerando perda de controle no apetite e saciedade, causando cada vez mais um maior acúmulo de tecido adiposo e conseqüentemente ganho de peso corporal⁵².

A resistina é uma proteína que possui 208 aminoácidos e pertence à família de proteínas ricas em cistina - RELM (*Resistin-Like Molecules*)⁵³. Foi identificada em 2001 em roedores demonstrando relação entre diabetes e obesidade⁵⁴. Porém, em humanos o papel da resistina ainda não é claro. É sintetizada a partir da estimulação de citocinas pró-inflamatórias, como IL6 e TNF α ⁵⁵, e seus níveis podem ser influenciados através de lipopolissacarídeos. Em ratos é sintetizada por adipócitos e em humanos por macrófagos⁴³. Portanto, sugere-se sua participação em processos inflamatórios. É comprovada sua associação com a resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, aterosclerose e doenças cardiovasculares⁵⁶.

3.3 Obesidade e Tecido Periodontal

A primeira vez que foi descrita a relação entre obesidade e doença periodontal foi em 1997 por Perlstein et al.⁵⁷, onde utilizaram ratos Zucker hereditariamente obesos e induziram doença periodontal através de ligadura. Neste estudo os autores observaram que houve maior perda óssea alveolar nos ratos obesos quando comparados aos ratos não-obesos. Observaram também que a obesidade por si só não promove alterações patológicas no periodonto quando há condição de saúde bucal, entretanto na presença de fatores inflamatórios no periodonto, como o acúmulo de placa, a obesidade causa uma destruição mais severa. Porém, somente em 1998 por Saito et al.⁵⁸ que foi demonstrada a associação da obesidade com a doença periodontal em humanos, em um trabalho onde analisaram 241 pacientes com e sem doença periodontal e com e sem obesidade. Porém, através de meta-análises que houve a confirmação da relação entre doença periodontal e obesidade^{59,60}. Uma

revisão sistemática realizada em 2015 por Keller et al.⁶³ conclui é observado em estudos longitudinais que a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento ou piora da doença periodontal.

Apesar de confirmada a associação entre obesidade e doença periodontal, seus mecanismos biológicos não são conhecidos. Uma das hipóteses é que o tecido adiposo, por ser um grande reservatório de mediadores inflamatórios, como citocinas e hormônios, participe na patogênese e modulação da doença periodontal⁵³. Citocinas pró-inflamatórias como IL1, TNF α e IL6 são encontradas elevadas em pacientes que apresentam periodontite crônica e nos tecidos adiposos de pacientes obesos⁶¹. Estudos recentes demonstraram a presença de algumas adipocinas no ligamento periodontal e no fluido crevicular gengival⁶². Suresh et al.⁶³ demonstraram altos índices de resistina em tecidos gengivais inflamados quando comparados à tecidos saudáveis. Em uma revisão sistemática e meta-análise recente, Zhu et al.⁶⁴ observaram alto nível de leptina circulante e baixo valor de adiponectina circulante em pacientes com doença periodontal, sugerindo que estas adipocinas possuem potencial biomarcador para a doença periodontal.

A obesidade modula a resposta do hospedeiro na doença periodontal, resultando em maior severidade da doença tanto na doença periodontal espontânea como na induzida por ligadura em ratos⁶⁵.

Em 2003, Al-Zharani et al.⁶⁶ analisando o Nutrition Examination Survey (NHANES III) demonstraram que quando utilizavam apenas bolsas periodontais profundas e perda de inserção como critério para a doença periodontal, a associação entre obesidade e doença periodontal era evidente em pacientes jovens.

3.4 Obesidade e Força Mecânica

Estudos indicam que a obesidade precoce pode causar aumento na densidade e tamanho ósseo vertebral, e conseqüente aceleração no crescimento esquelético. Levando à maturação precoce de maxila e mandíbula e gerando más oclusões^{22,67}. Devido a isso, é comum a necessidade de tratamento ortodôntico para correção destas más oclusões em pacientes obesos.

A força mecânica aplicada no ligamento periodontal para que ocorra o movimento dentário, gera uma área de pressão e de tensão deste. Esse processo faz

com que as células do ligamento periodontal, como fibroblastos e osteoblastos, produzam sinais biológicos através de mediadores, para que se inicie um processo inflamatório local¹⁷, a fim de promover reabsorção óssea no lado de pressão e aposição óssea no lado de tensão do periodonto. A remodelação óssea ocorre na presença de fibroblastos, osteoclastos, osteoblastos, linfócitos T e outras células imunes⁶⁸. Portanto, durante a movimentação ortodôntica, diversas citocinas pró-inflamatórias são liberadas, como IL1, IL6 e TNFa^{69,70,71}. É importante salientar que apesar do processo inflamatório causado na movimentação dentária, essa inflamação não é decorrente de uma doença como no caso da doença periodontal, e sim de fatores fisiológicos para que ocorra o deslocamento dentário, sendo assim, chamada algumas vezes de inflamação asséptica¹⁸. Nunes et al.⁷² avaliaram os níveis de citocinas no fluido crevicular gengival em pacientes sob terapia ortodôntica, sendo que os incisivos inferiores sofriam movimentação os superiores não e concluíram que havia maior presença de citocinas como, IL6 e TNFa nos dentes inferiores do que nos superiores após 7 dias, devido à presença da força mecânica. Muitos trabalhos na literatura associam a movimentação ortodôntica com processos inflamatórios como a doença periodontal demonstrando aumento na osteoclastogênese e na reação inflamatória quando há associação destes levando à uma maior destruição dos tecidos periodontais^{73,74,75}.

São escassos os trabalhos estudando a associação da obesidade e a movimentação ortodôntica. Dilsiz et al.²¹ avaliaram a concentração de leptina no fluido crevicular gengival de 22 pacientes não obesos antes, uma hora após, 24 horas após e 1 semana após o início do tratamento ortodôntico. Observaram que a concentração de leptina foi reduzida pela movimentação ortodôntica, havendo uma correlação entre estas. Jayachandram et al.⁷⁶ avaliaram mulheres obesas e não-obesas que necessitavam de tratamento ortodôntico, onde coletaram saliva para detecção de concentração de leptina antes, 1 hora após e 1 mês após o início do tratamento. Observaram que em todos os períodos, a concentração média de leptina nas pacientes obesas era duas a três vezes maior quando comparado às pacientes não obesas e concluíram que existia uma forte correlação entre leptina e a movimentação dentária. Quando há presença de força mecânica, a concentração de visfatina produzida nas células do ligamento periodontal é reduzida¹¹. Haugen et al.⁷⁷, realizaram em ratos movimentação dentária associada à aplicação de injeções submucosas de adiponectina nos dias 3, 6, 9, 12 e 14 de movimentação. Concluíram

que a injeção inibiu a movimentação dentária experimental em ratos. Saloom et al.⁷⁸ avaliaram o efeito da obesidade na movimentação ortodôntica, para isso utilizaram 55 pacientes obesos e coletaram dados antes, 1 semana após e ao término do tratamento ortodôntico. Embora não tenha diferença estatística, os autores afirmaram que pacientes obesos necessitaram menor tempo para concluir o tratamento ortodôntico do que pacientes não obesos e concluíram através das análises dos níveis de leptina, resistina e RANKL no fluido gengival crevicular que estes se diferenciavam em pacientes obesos e não obesos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Desenho Experimental

Esse estudo foi submetido e aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr Unesp) (CEUA: 16/2015) (ANEXO A). Foram utilizados 32 ratos *Holtzman* adultos, com peso médio de 300 g, que foram mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam alimentação granulada (Labina/Purina) e água *ad libitum*. Para o cálculo da amostra, foi utilizado o teste ANOVA. O cálculo da amostra foi baseado nos resultados da análise de microtomografia computadorizada (micro-CT) realizada num projeto anterior do pesquisador responsável⁷⁹. Esse trabalho foi considerado um estudo piloto do presente projeto. Para o cálculo, foi determinada uma diferença mínima entre as médias dos resultados da análise de micro-CT para se ter diferença estatística de 6,00 com desvio padrão de 2,85. Levando em consideração um poder de teste de 0,80 ($1-\beta=0,80$) e nível de significância de $\alpha=0,05$ o número mínimo de 8 amostras em cada grupo foi necessário para a execução do presente trabalho. Sendo assim, 32 animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais conforme detalhados abaixo:

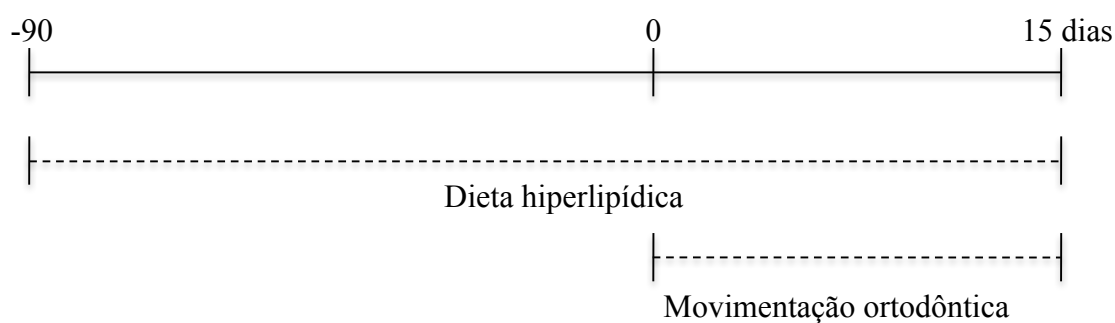
- 1- grupo C (8 animais): grupo controle sem nenhuma intervenção;
- 2- grupo O (8 animais): grupo submetido à indução de obesidade;
- 3- grupo M (8 animais): grupo submetido ao movimento ortodôntico;
- 4- grupo OM (8 animais): grupo submetido à indução de obesidade e ao movimento ortodôntico.

4.2 Indução da Obesidade

Os animais que foram submetidos à indução de obesidade (grupos O e OM) receberam dieta hiperlipídica que apresentava aproximadamente 3,82 kcal/g. Sua tabela nutricional consiste em 40 g de carboidratos, 19 g de lipídios, 13 g de proteínas, 4 g de fibras e 73 mg de sódio por 100 g de ração. A dieta hiperlipídica é composta de ração para roedores, amendoim, bolacha maizena, e chocolate ao leite em uma

proporção de 3:2:1:1⁸⁰. A ração padrão, por sua vez, contém aproximadamente 2,25 kcal/g e sua tabela nutricional consiste em 48 g carboidratos, 4 g de lipídios, 22 g de proteínas, 8 g de fibras e 200 mg de sódio por 100 g de ração. A ração foi substituída diariamente e iniciou-se 90 dias antes do tempo zero (quando foram instalados os aparelhos) conforme *timeline* apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Descrição do modelo experimental.



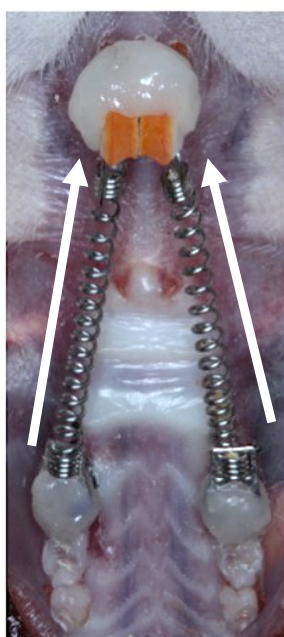
Fonte: Elaboração própria

4.3 Instalação do Aparelho Ortodôntico

Foi utilizado um modelo de movimento dentário em ratos e um tipo de aparelho previamente estabelecidos por nosso grupo⁷⁹ (Figura 2). Após os animais serem submetidos à anestesia geral (0,08 mL de ketamina e 0,04 mL de cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal, intramuscular na pata posterior) e serem posicionados em mesa operatória, uma mola fechada de níquel-titânio (*Sentalloy®*, *GAC*, *Dentsply*) foi conectada entre o primeiro molar superior e incisivo central superior com fio de amarrilho (CrNi, 0.20 mm, código 55.01.208, Morelli). Para colocação da mola nos incisivos centrais superiores, sulcos nas superfícies mesial, distal e vestibular desses dentes foram preparados para prevenir que o fio de amarrilho se soltasse devido à curvatura lingual e à erupção contínua dos incisivos. Após os fios serem amarrados, uma fina camada de resina composta foi colocada acima do fio para prevenir seu deslocamento e irritação pulpar devido à exposição dentinária. Já para colocação da mola nos primeiros molares superiores, o fio de amarrilho foi colocado na oclusal dos dentes e resina composta foi colocada sobre o fio de amarrilho para que o mesmo não

se soltasse. Para que não houvesse danos à oclusão do animal devido ao fio e à resina, o dente antagonista (primeiro molar inferior) foi extraído. A mola de níquel-titânio foi utilizada para promover uma liberação de força constante de 0.25 N durante o curso do experimento. A instalação do aparelho ortodôntico foi realizada no tempo zero.

Figura 2 - Aparelho ortodôntico instalado entre o incisivo central e o primeiro molar superior do animal (a seta indica a direção da força exercida pela mola).



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.4 Sacrifício dos Animais

Após 15 dias do tempo zero, todos os animais foram sacrificados por overdose anestésica. A seleção deste período considerou a representação do período em que já ocorre significativo movimento dentário. Após o sacrifício, a maxila de cada animal foi removida e separada em duas hemimaxilas para posterior redução e distribuição aleatória para realização de microtomografia computadorizada e histologia. Foram coletados tecidos gengivais ao redor dos primeiros molares, destinados à extração de

RNA. Imediatamente após a coleta, foram congelados em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em freezer -80 °C.

4.5 Massa Corporal

A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente durante todo o experimento.

4.6 Tecidos Adiposos

No momento da eutanásia dos animais, os tecidos adiposos: retroperitoneal, epididimal e mesentérico foram removidos e pesados em balança de precisão^{80,81}.

4.7 Análise Sorológica

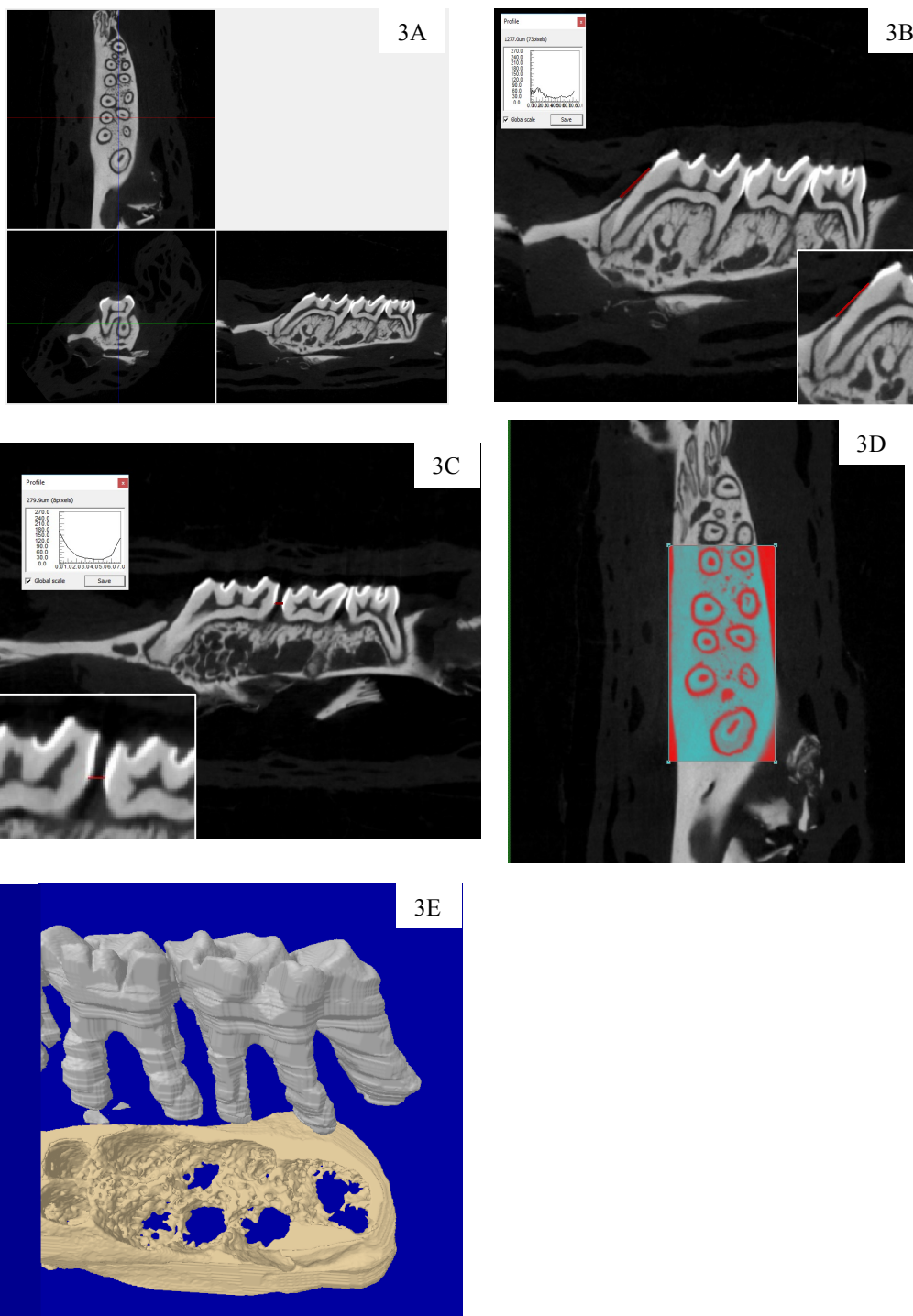
Os animais permaneceram em jejum por 12 horas antes da eutanásia para que fosse feita a coleta do sangue através de punção cardíaca. Após 20 minutos, o sangue foi centrifugado por 3.000 RPM a 23°C durante 10 min. Em seguida, o soro encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UNESP, onde foi utilizado para a análise bioquímica do perfil lipídico - triglicérides, colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) - e para os níveis de glicemia⁸¹.

4.8 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

Após o sacrifício dos animais, 8 hemimaxilas por grupo foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas, e mantidas em álcool 70% em temperatura ambiente até serem escaneadas com o auxílio do microtomógrafo computadorizado (μ CT Skyscan 1176, Bruker, Kontich, Bélgica). O gerador de raios-x foi operado a 50 kVp, com corrente do feixe em 500 μ A, filtro de alumínio de 0.5 mm

e com uma resolução de imagem de 18 μm . As imagens foram reconstruídas com o auxílio de um software específico (NRecon 1.6.1.5 - Bruker, Kontich, Bélgica) em todas as três dimensões espaciais. Em seguida, todas as imagens das hemimaxilas foram orientadas e salvas em cortes coronais (2000 x 1336) utilizando o *Data Viewer software* (*Data Viewer* 1.4.3.1 - Bruker, Kontich, Bélgica) (Figura 3A). Para medir o volume de osso alveolar (BV) e o volume tecidual (TV) a região de interesse (ROI) foi delimitada do ápice das raízes do primeiro e segundo molar à crista alveolar, com a exclusão das raízes e do espaço periodontal, compreendendo assim apenas o osso alveolar ao redor do primeiro e segundo molar (Figuras 3D e 3E). Isto foi realizado com uma ferramenta específica (*custom processing*) do software CTan (CT Analyser 1.10.1.0 - Bruker, Kontich, Bélgica). Além disso, a densidade de osso alveolar foi medida com o auxílio de phantoms com densidades previamente definidas, fornecidos pela própria empresa Bruker. Para mensuração da perda óssea linear as distâncias lineares entre a junção cimento-esmalte (JCE) à crista óssea alveolar (COA) nas faces mesial e distal do 1º molar e mesial do 2º molar foram obtidas utilizando o software *Data Viewer* (Figura 3B). O mesmo método foi empregado para a mensuração da movimentação dentária, medindo-se a distância entre as maiores convexidades das faces distal dos 1ºs molares e mesial dos 2ºs molares maxilares feita uma linha do primeiro ao segundo molar utilizando o *Data Viewer software* (Figura 3C).

Figura 3A-E – Mensuração das microtomografias com os softwares: *Data Viewer, CTAn*. **Figura 3A-** Orientação dos cortes. **Figura 3B-** Distância linear da JCE-COA. **Figura 3C-** Distância entre 1º e 2º molar. **Figura 3D-** Delimitação da região de interesse (ROI). **Figura 3E-** Separação do osso alveolar das raízes e do espaço periodontal



Fonte: Arquivo pessoal do autor

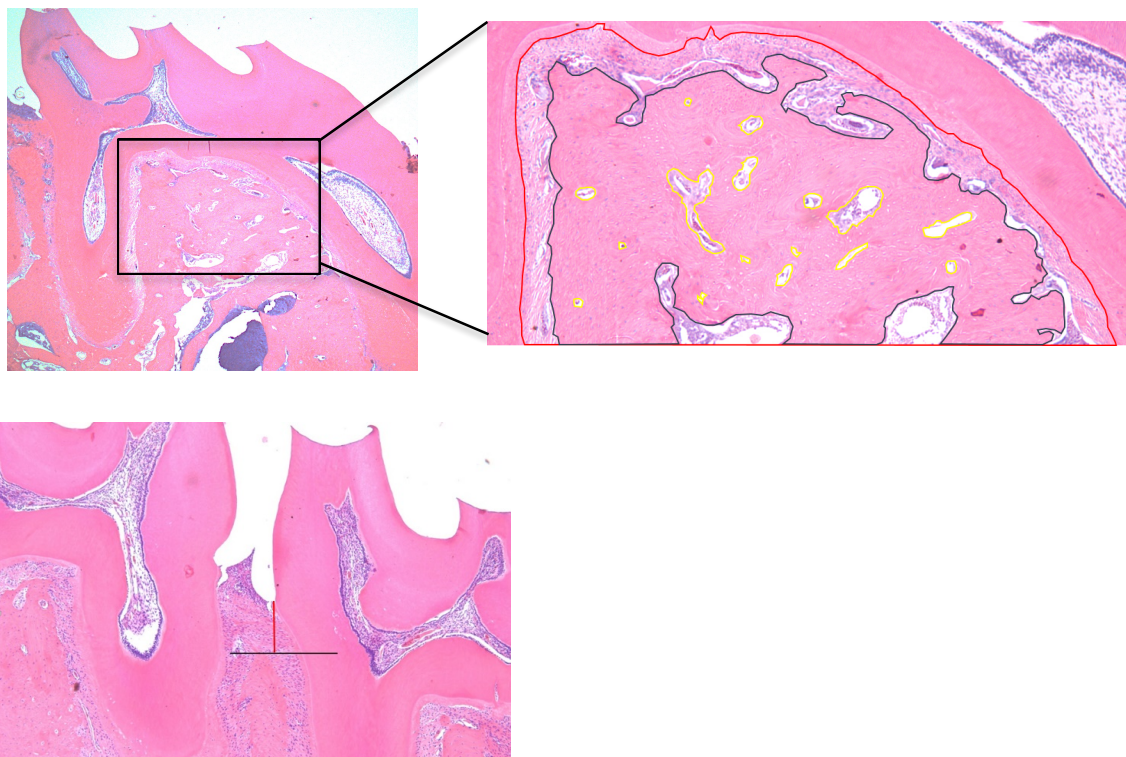
4.9 Análise Histológica

Após o sacrifício dos animais, 8 hemimaxilas por grupo foram removidas e fixadas em paraformaldeído 4% por 48 horas. Após fixação, as hemimaxilas foram desmineralizadas em solução de EDTA 10% por 60 a 90 dias para posterior inclusão em parafina. Cortes histológicos seriados de 4 μm de espessura foram obtidos no plano sagital, montados em lâminas e corados apropriadamente com hematoxilina e eosina (H/E). As secções foram utilizadas para análise histológica descritiva e avaliação histométrica e estereométrica em 2 cortes/animal. Estas análises foram realizadas por um examinador cego e calibrado, com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (Leica - Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) na magnificação de 50x para histometria e 200x para estereometria. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital Leica DFC 300 FX e as imagens capturadas foram arquivadas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

4.9.1 Histometria

A análise histométrica foi feita através do software de imagem Image J versão 1.37b. (National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs>). Na região de furca, a área analisada foi delimitada de acordo com a metodologia de Duarte et al.⁸² Esta região foi delimitada apicalmente 1000 μm abaixo do teto da furca no espaço inter-radicular dos primeiros molares superiores. A área total da região inter-radicular e a área com tecido ósseo presente foram medidas, e através da subtração desses valores foi obtida a quantidade de tecido ósseo reabsorvido. Foi feita uma porcentagem dos valores obtidos para se ter a proporção de perda óssea. Para mensuração da perda óssea linear, traçou-se uma linha reta da crista óssea do processo alveolar à junção cimento-esmalte, na distal do 1º molar^{83,84,85} (Figura 4).

Figura 4 – Imagens demonstrando a mensuração de perda óssea alveolar na região de furca e na região interproximal distal do 1º molar.



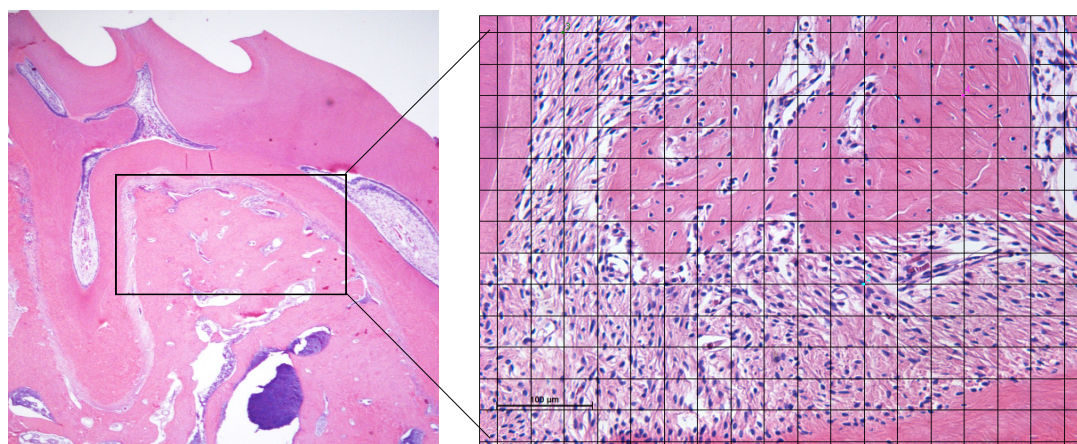
Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.9.2 Estereometria

Os cortes histológicos foram submetidos à análise quantitativa do processo inflamatório. A análise estereométrica do processo inflamatório foi realizada com o auxílio de um microscópio de luz Leica DMLS (na magnificação de 200x). Um total de 2 cortes foram avaliados por dente. A região anatômica que foi quantificada correspondeu ao ligamento periodontal delimitado coronalmente pelo teto da furca, apicalmente pelo ápice radicular e lateralmente pelo osso e pela superfície das raízes mesial e distal dos primeiros molares superiores. As áreas de interesse dos cortes pré-selecionados foram fotografadas com uma câmera digital Leica DFC 300 FX e as imagens capturadas foram arquivadas. A técnica estereométrica de contagem de

pontos foi realizada com o auxílio de uma grade com 252 pontos de intersecção, a qual foi sobreposta nas imagens digitalizadas dos cortes de H/E para avaliação da proporção de componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção, em um plano bidimensional por microscopia (Figura 5). Este procedimento permite a avaliação quantitativa do quadro inflamatório no ligamento periodontal, nos lados de pressão e tensão. Desta forma, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Após a análise, foi calculado o percentual de cada componente tecidual em relação ao número total de pontos contados por período experimental, baseado nos trabalhos de Odze et al.⁸⁶ para a representação gráfica da estereometria.

Figura 5 – Imagem representativa da área analisada com a grade em posição para contagem de células e de estruturas celulares.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

4.10 RT-qPCR

O RNA total dos tecidos gengivais coletados de 6 hemimaxilas por grupo foi extraído com o kit *RNeasy Mini* (catálogo no 74106, Qiagen), segundo as instruções do fabricante. Este kit se baseia no método de colunas de purificação e inclui tratamento com DNase (*RNase-FreeDNase Set* - catálogo no 79254) de modo a

eliminar contaminação com DNA genômico, que pode afetar os resultados da reação de PCR em tempo real (RT-qPCR). A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro de luz *NanoVue UV / Visible Spectrophotometer* (GE Healthcare, Piscataway, NJ) por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm, respectivamente. DNA complementar foi sintetizado pela transcrição reversa de 500 ng do total de RNA dos tecidos gengivais, seguindo o protocolo do fabricante (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems*). Expressão gênica de *Il1b*, *Tnfa*, *Il6*, *Leptina*, *Visfatina*, *Resistina* e *Adiponectina* e *Gapdh* foram avaliadas por RT-qPCR no aparelho *iCycler iQ* (Bio- Rad), usando *SYBR Green* (Qiagen) e primers específicos (*QuantiTect Primer Assay, Qiagen*). Um microlitro de cDNA foi amplificado em 25 µl de reação contendo 12,5 µl de 2x *QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix* (Qiagen), 2,5 µl de primer e água RNase free. A mistura foi inicialmente aquecida a 95°C por 5 min e seguida de 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s e anelamento/extensão a 60°C por 30 s. Os resultados foram analisados usando o método de comparação de *cycle threshold* (Ct).

4.11 Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram avaliados, e submetidos a um teste de normalidade. A partir disso, foram utilizados testes estatísticos apropriados para comparações entre cada grupo. Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada.

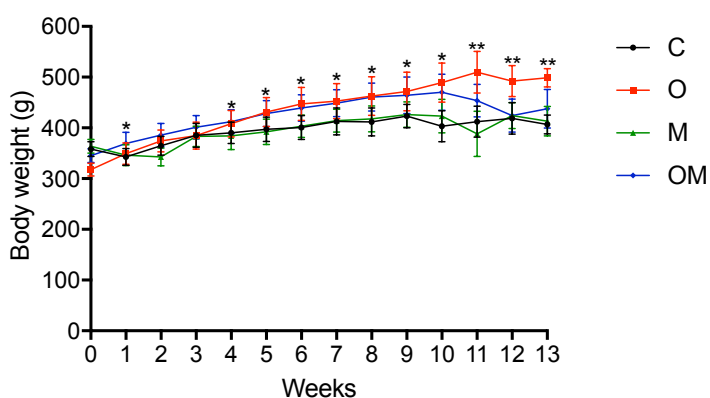
Nas análises de massa corporal, tecidos adiposos, análise de soro, análise microtomográfica, histológica e RT-qPCR foi realizado ANOVA seguido do pós teste Tukey ($p \leq 0.05$) e para análise do movimento dentário o teste t-student ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Massa Corporal

Os animais que sofreram indução da obesidade (grupos O e OM) apresentaram, a partir da 4^a semana, massa corporal significativamente maior quando comparados aos animais que não sofreram indução da obesidade (grupos C e M), como é ilustrado no gráfico da Figura 5. Porém, a partir da 11^a semana, somente os animais do grupo O apresentaram massa corporal estatisticamente maior quando comparados aos demais grupos (Figura 6).

Figura 6 - Média e desvio-padrão da massa corporal (g) dos animais dos grupos C (n=8), O (n=8), M (n=8) e OM (n=8) ao longo do experimento. *Diferença significativa dos grupos O e OM com os grupos C e M ($p \leq 0.05$). **Diferença significativa entre o grupo O e os demais grupos ($p \leq 0.05$).

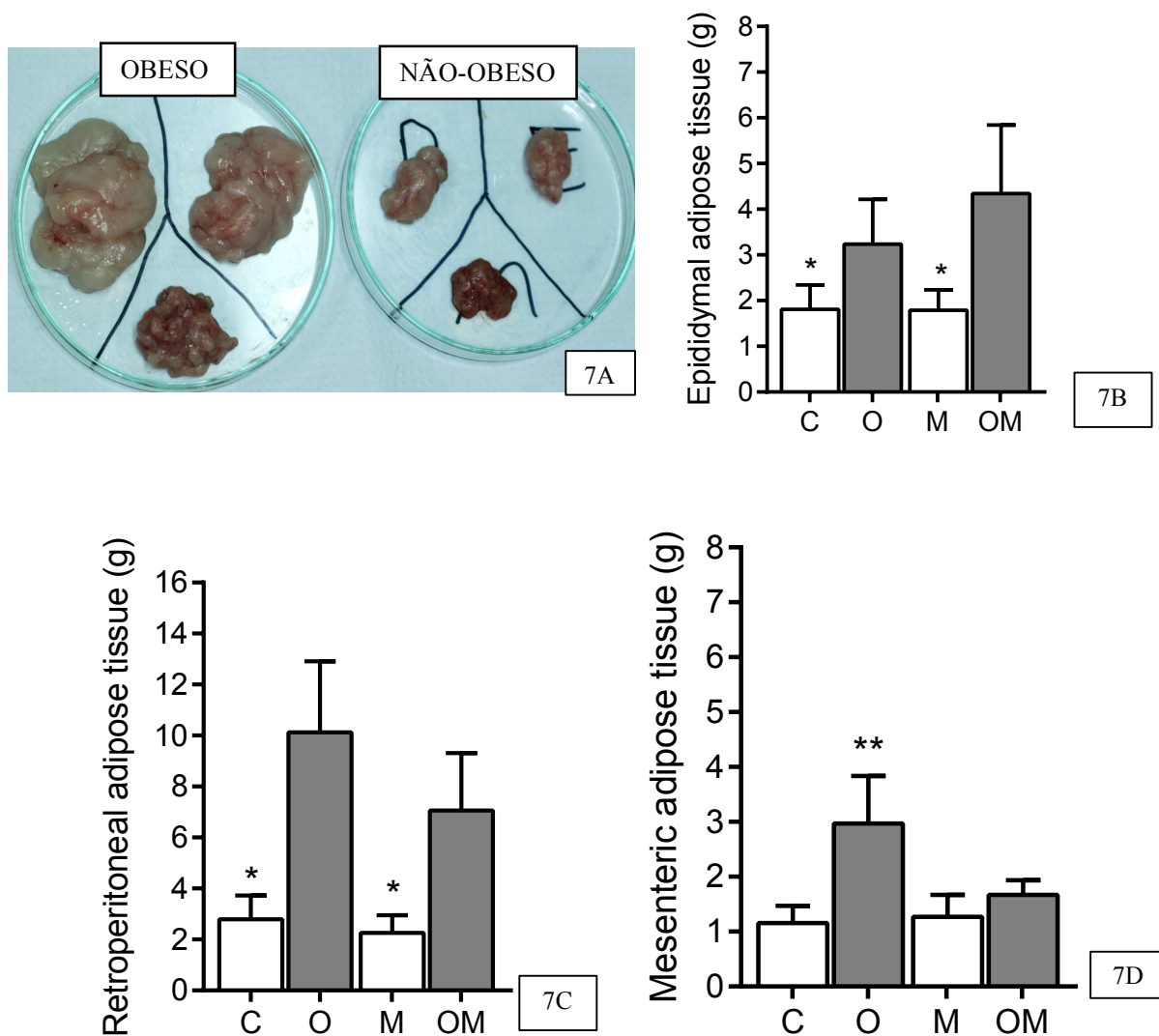


Fonte: Elaboração própria

5.2 Tecidos Adiposos

Com relação aos tecidos adiposos, os animais dos grupos que receberam a dieta hiperlipídica (O e OM - induzidos à obesidade) apresentaram maior peso de tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico quando comparados aos grupos que receberam dieta padrão (C e M – não induzidos à obesidade), como ilustrado na Figura 7A e nos gráficos de 7B-D.

Figura 7A - Imagem comparando os tecidos adiposos (epididimal, mesentérico e retroperitoneal) de ratos obesos (à esquerda) e de ratos não-obesos (à direita). **Figura 7B-7D** - Média e desvio-padrão do peso do tecido adiposo epididimal (7B), retroperitoneal (7C) e mesentérico (7D) dos animais submetidos (n=16) ou não (n=16) à indução de obesidade. *Diferença significativa dos grupos não obesos (grupos C e M) em relação os grupos obesos (grupos O e OM) ($p \leq 0.05$). **Diferença significativa do grupo obeso (grupo O) com os demais grupos ($p \leq 0.05$).



Fonte: Elaboração própria

5.3 Análise de Soro

Na análise de triglicerídeos, HDL e colesterol total, os animais do grupo O apresentaram maior valor quando comparados aos demais grupos e no LDL estes também apresentaram maior valor quando comparados ao grupo OM (Figura 8). Na análise de glicemia, nenhum grupo atingiu o valor limite que indica que os animais estejam com Diabetes (Figura 8).

Figura 8 - Média e desvio-padrão das dosagens de perfil lipídico e glicemia dos animais submetidos ou não à indução de obesidade. ^aDiferença significativa em relação aos demais grupos ($p \leq 0.05$). ^bDiferença significativa entre o grupo C e M ($p \leq 0.05$). ^cDiferença significativa entre o grupo O em relação grupo OM ($p \leq 0.05$).

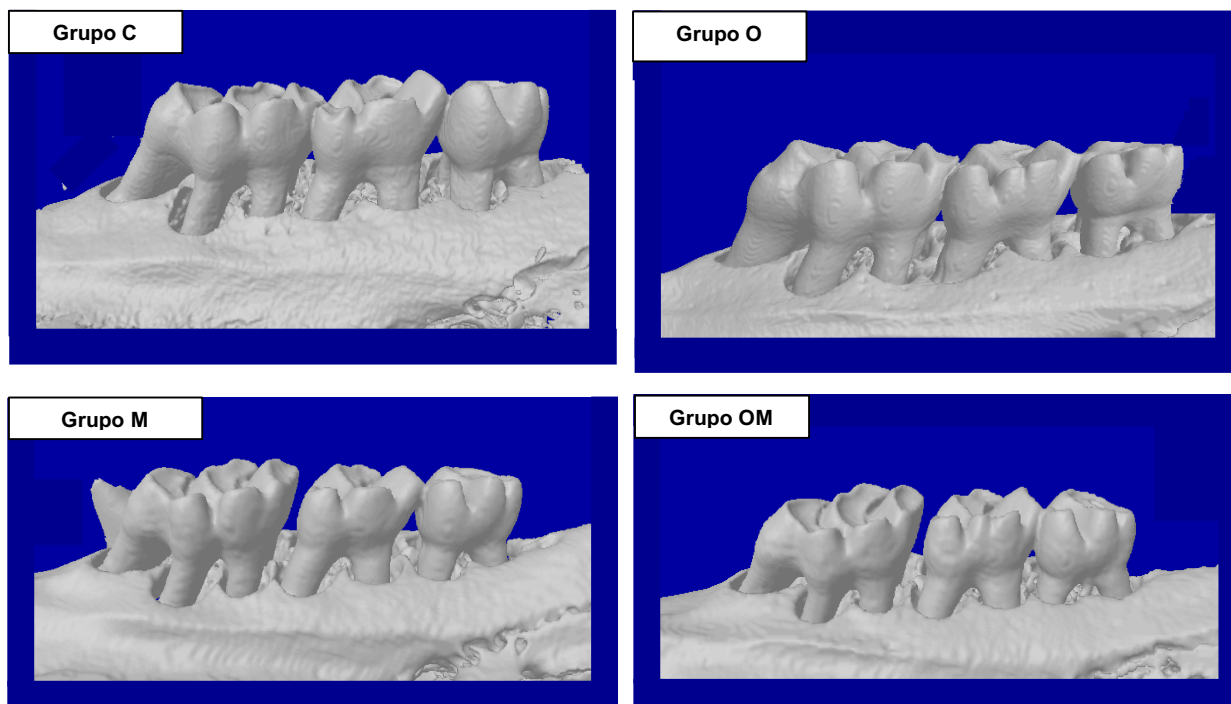
	C	O	M	OM
Total Cholesterol (mg/dL)	57,8 ± 9	78 ± 7,6 ^a	57,5 ± 8,5	54,5 ± 7,3
Triglycerides (mg/dL)	53,1 ± 5,3 ^b	76,8 ± 22,8 ^a	36,6 ± 7,6	36,1 ± 4,1
LDL (mg/dL)	11,9 ± 4,6	16,4 ± 6 ^c	12,7 ± 9,2	6,4 ± 4
HDL (mg/dL)	35,7 ± 6,4	47,1 ± 4,8 ^a	38,3 ± 5,4	41,2 ± 5,3
Blood Glucose (mg/dL)	131,8 ± 12 ^a	244,4 ± 61,5	212 ± 42	209 ± 45,1

Fonte: Elaboração própria

5.4 Microtomografia Computadorizada (Micro-CT)

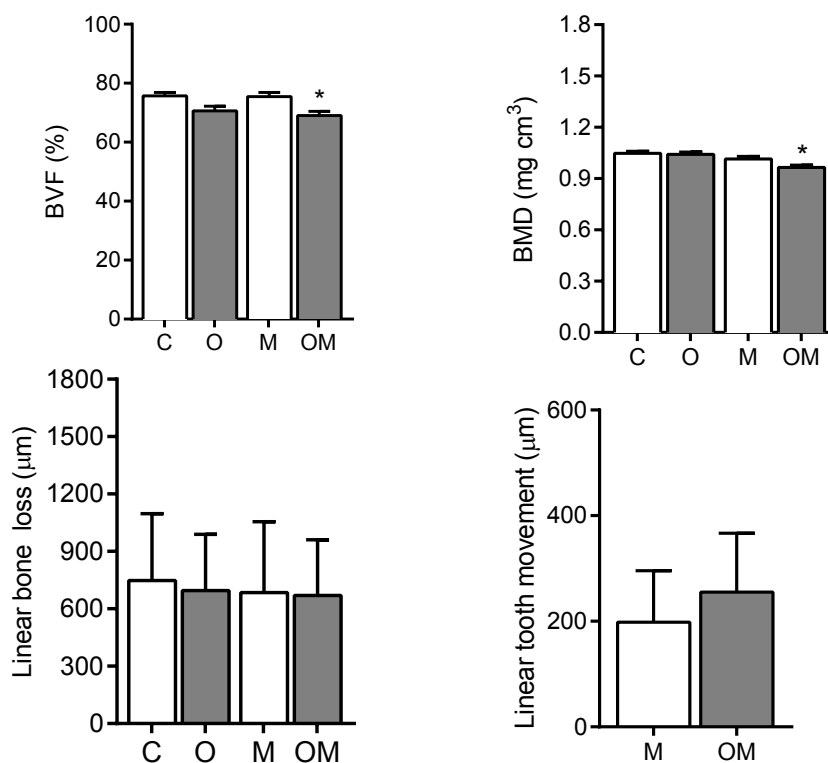
Os animais do grupo OM apresentaram menores valores no volume ósseo alveolar (BVF) e na densidade óssea alveolar (BMD) com diferenças estatisticamente significativas comparados aos demais grupos (Figuras 9 e 10). Na análise da perda óssea linear não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 10). Os primeiros molares do grupo OM tiveram uma tendência a um maior deslocamento quando comparados os primeiros molares do grupo M; porém, sem diferença significativa (Figura 10).

Figura 9 - Imagens 3D Microtomográficas dos grupos C, O, M e OM.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 10 - Média e desvio-padrão do percentual de volume ósseo alveolar (BVF), da densidade óssea alveolar (BMD), da perda óssea linear e do movimento dentário (grupos M obeso e não obeso). *Diferença significativa entre o grupo OM e os demais grupos ($p \leq 0.05$).



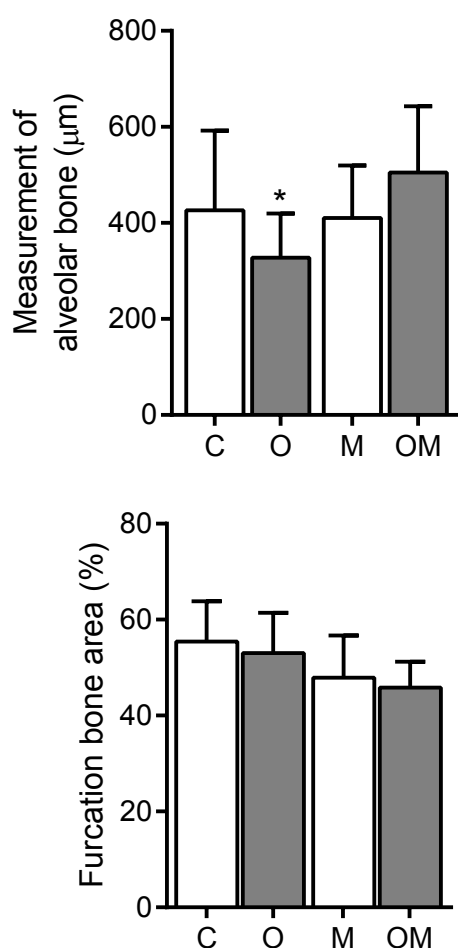
Fonte: Elaboração própria

5. 5 Análise histológica

5.5.1 Histometria

Os animais do grupo O, que sofreram indução da obesidade, apresentaram na análise histométrica, menor perda óssea linear quando comparado aos demais grupos; porém, apresentando diferença significativa apenas com o grupo OM. Com relação à área de furca não houve diferença estatística entre os grupos (Figuras 11, 12 e 13).

Figura 11 – Média e desvio-padrão da perda óssea alveolar linear e da área de furca. *Diferença significativa do grupo O com o grupo OM ($p \leq 0.05$).



Fonte: Elaboração própria

Figura 12 A-D – Fotomicrografias no aumento de 50x de cortes sagitais de maxilas mostrando o periodonto da região interproximal entre 1º (1M) e 2º molares (2M) dos animais dos grupos C (Fig. 12A), O (Fig. 12B), M (Fig. 12C) e OM (Fig. 12D). JCE, junção cimento-esmalte; PA, processo alveolar; D, dentina, P, polpa; E, espaço do esmalte; as setas nas Fig. 12C e 12D indicam a direção da força ortodôntica nos grupos M e OM. Coloração: Hematoxilina e Eosina (H/E).

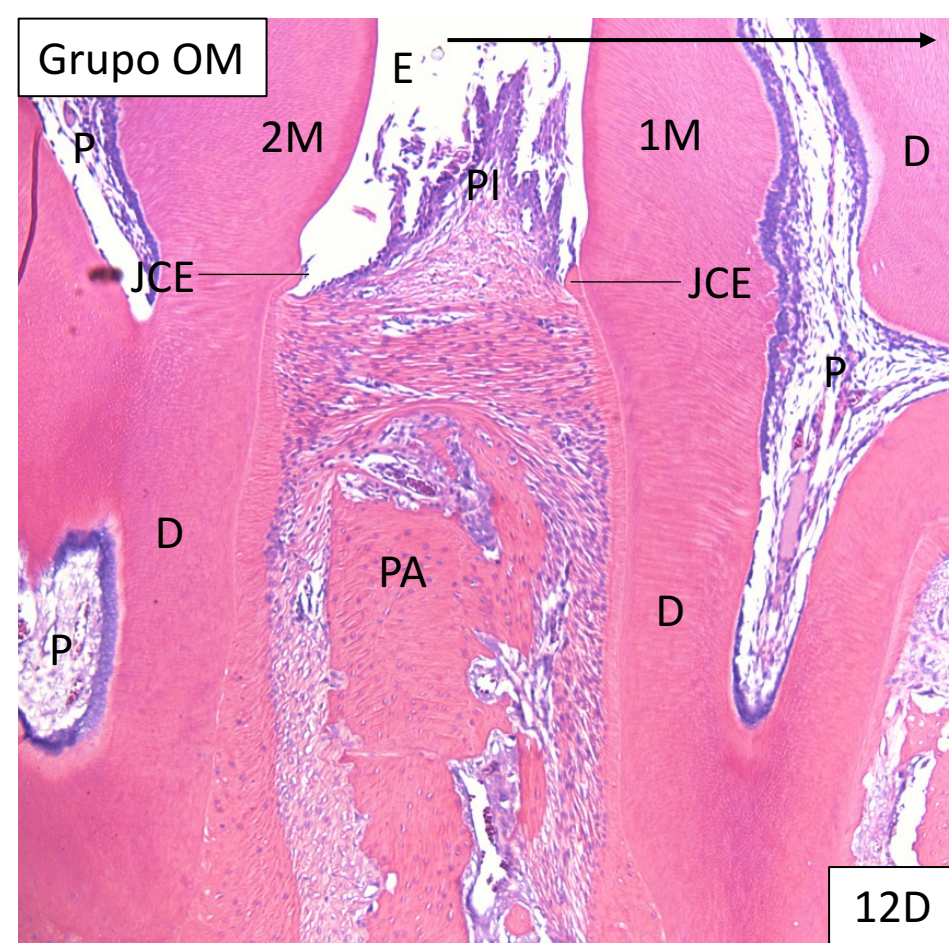
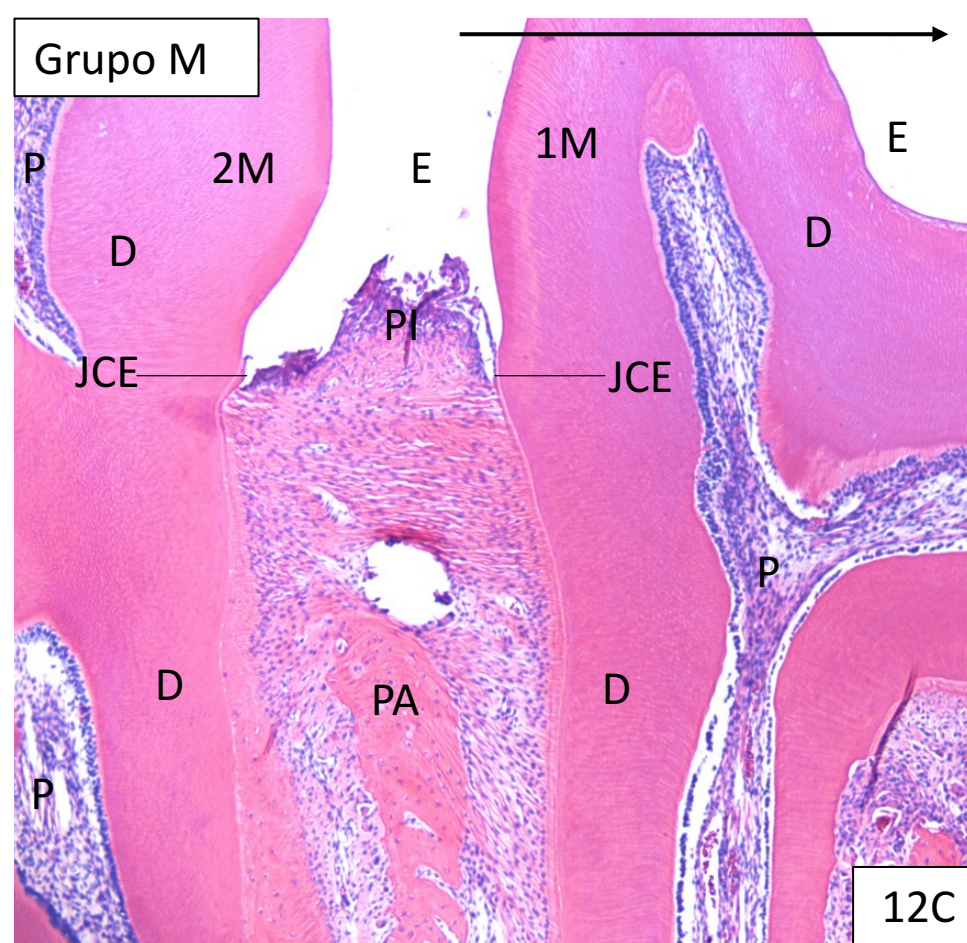
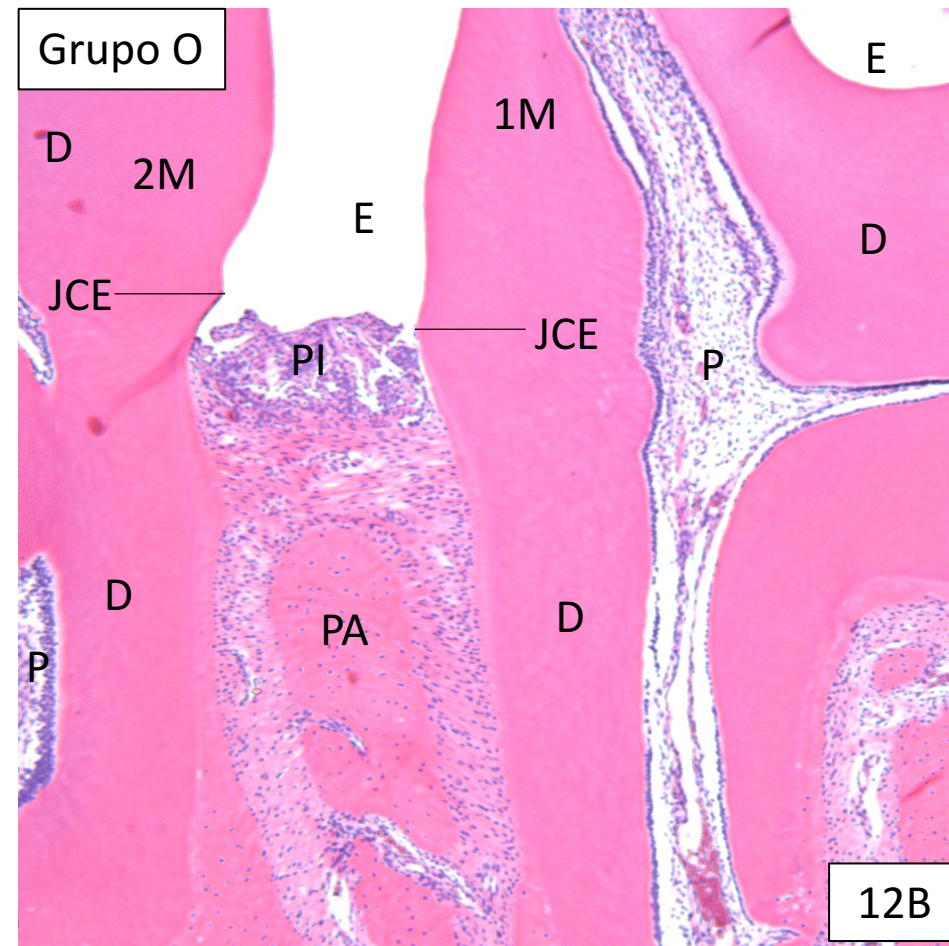
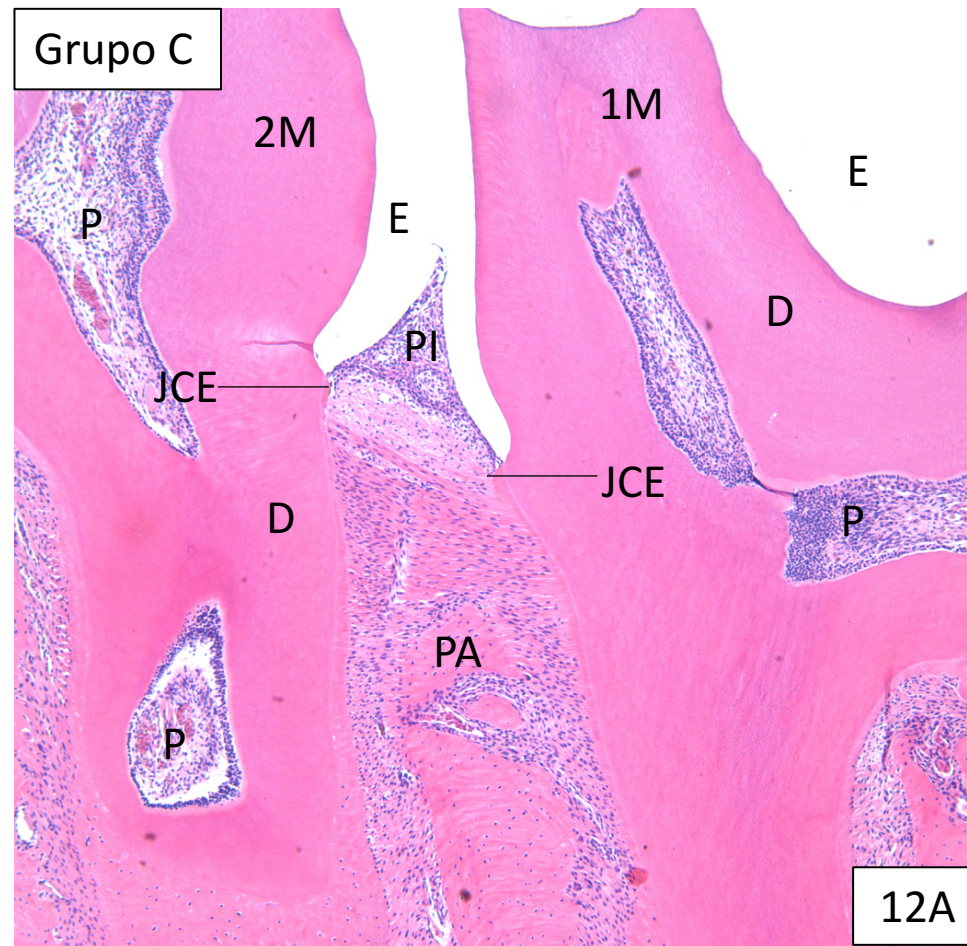
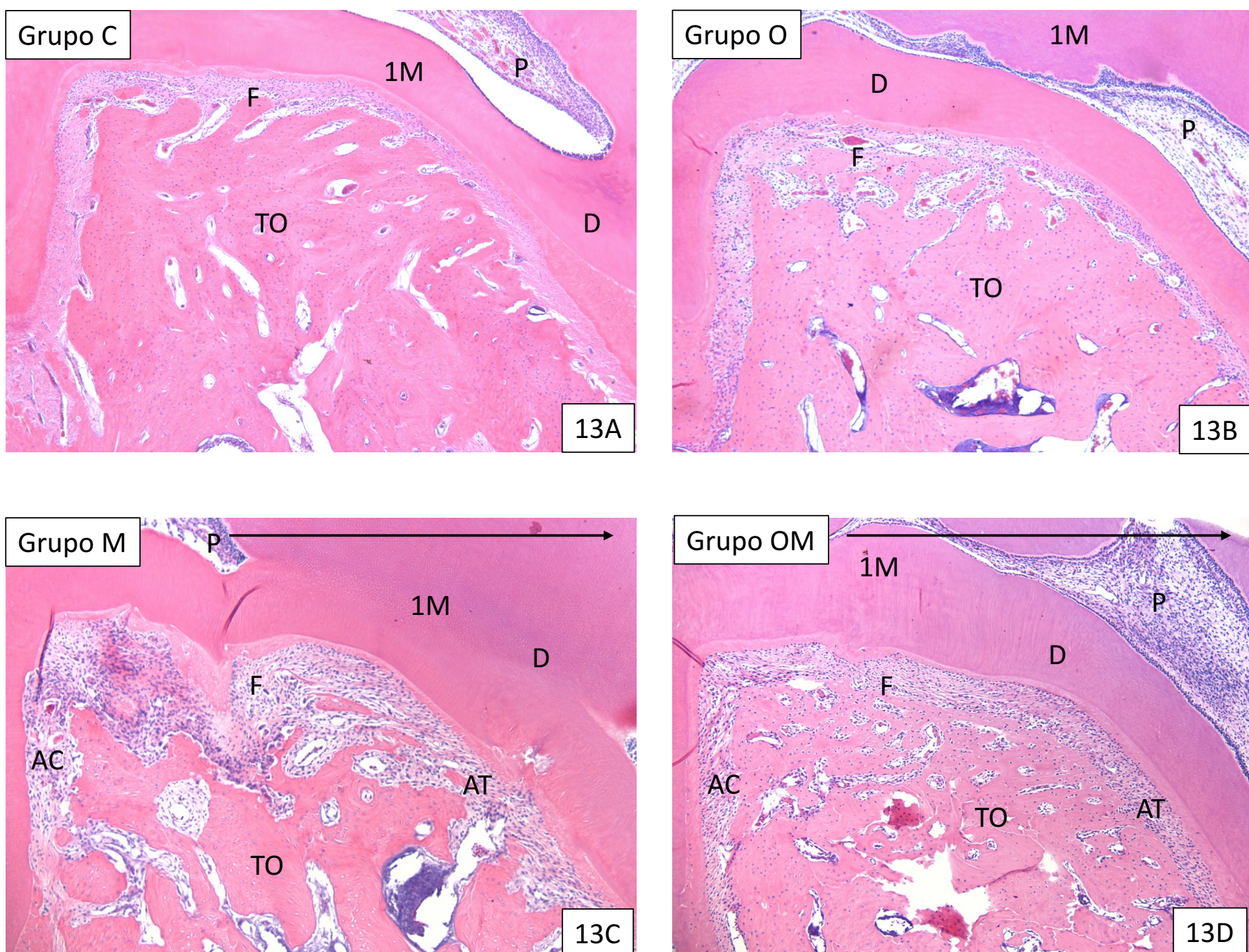


Figura 13 A-D – Fotomicrografias no aumento de 50x de cortes sagitais de maxilas mostrando a região de furca (F) dos 1º molares (1M) dos animais dos grupos C (Fig 13A), O (Fig. 13B), M (Fig. 13C) e OM (Fig 13D). D, dentina; P, polpa; TO, recido ósseo; AT, área de tensão do ligamento periodontal; AC, área de compressão do ligamento periodontal; as setas nas Fig. 13C e 13D indicam a direção da força ortodôntica nos grupos M e OM. Coloração: H/E.

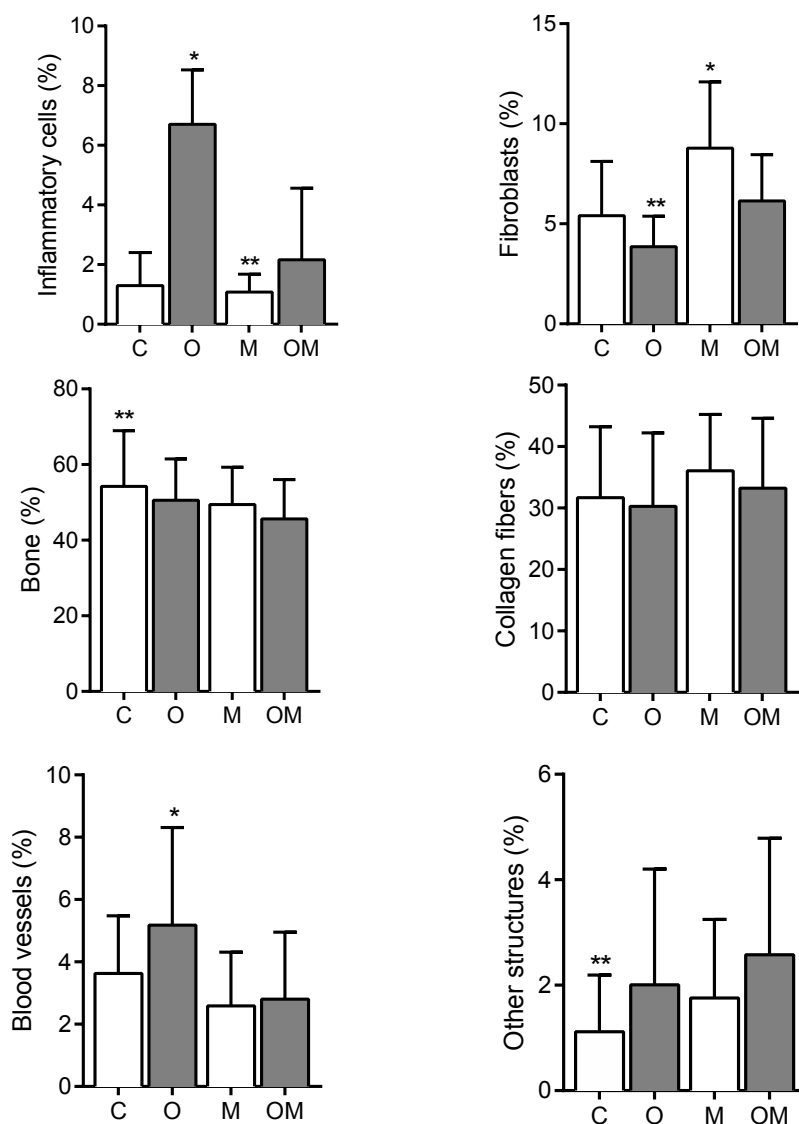


Fonte: Elaboração própria

5.5.2 Estereometria

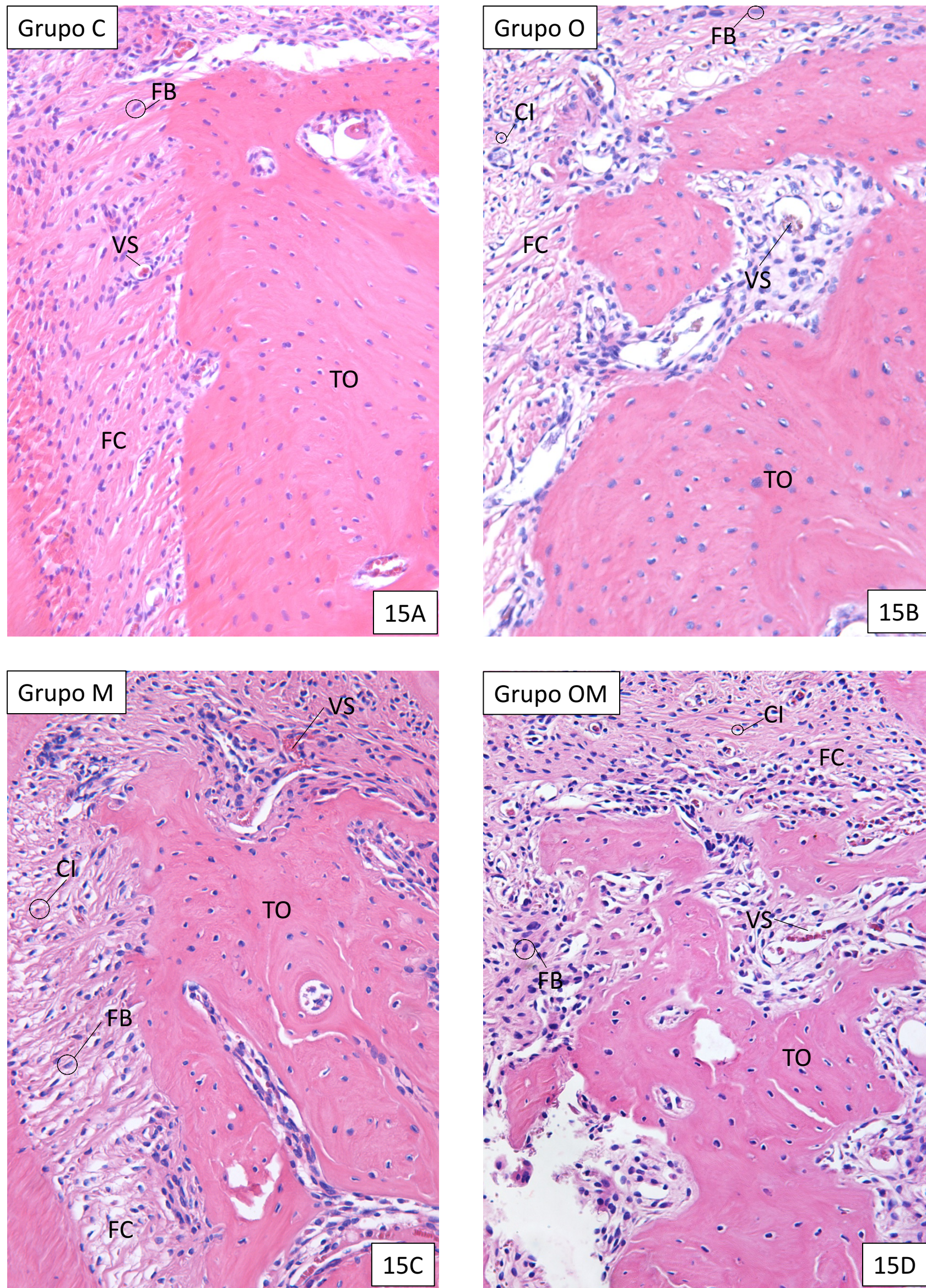
Os animais do grupo O apresentaram número estatisticamente maior de células inflamatórias e de vasos sanguíneos quando comparado aos demais grupos. E este mesmo grupo também apresentou um menor número significativo de fibroblastos em relação ao grupo OM (Figura 14). O grupo M apresentou maior quantidade significativa de fibroblastos quando comparado aos demais grupos (Figuras 14 e 15).

Figura 14 – Média e desvio-padrão da porcentagem de células inflamatórias, fibroblastos, fibras colágenas, osso, vasos sanguíneos e outras estruturas. *Diferença com os demais grupos ($p \leq 0.05$). **Diferença com o grupo OM ($p \leq 0.05$).



Fonte: Elaboração própria

Figura 15 A-D – Fotomicrografias no aumento de 200x do ligamento periodontal da região de furca do 1º molar dos animais do grupo C (Fig. 15A), O (Fig. 15B), M (Fig. C) e OM (Fig 15D). Demonstrando tecido ósseo (TO), fibras colágenas (FC), fibroblastos (FB) e células inflamatórias (CI). Coloração: H/E.

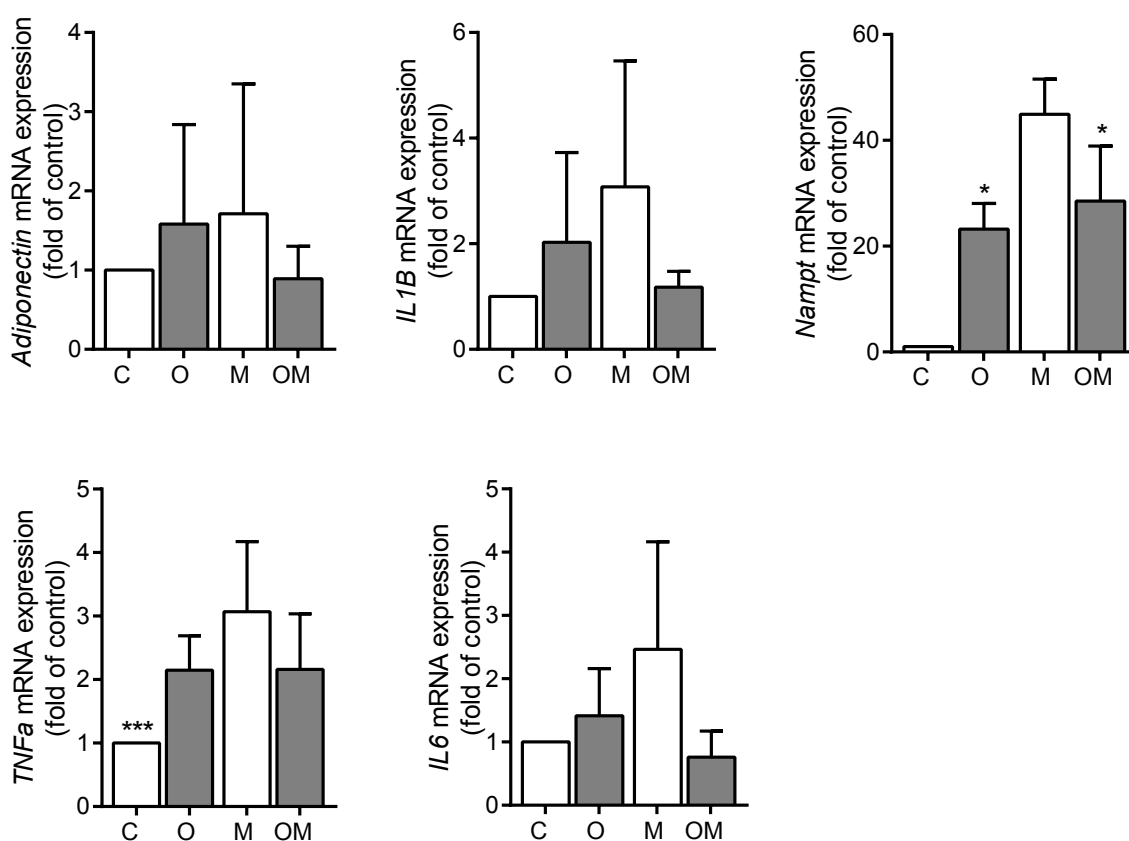


Fonte: Elaboração própria

5.6 RT-qPCR

Os animais que sofreram indução da obesidade (grupos O e OM), apresentaram maior expressão gênica de *Nampt* quando comparados ao grupo controle (grupo C) e menor expressão gênica desta quando comparados ao grupo que sofreu movimentação ortodôntica (grupo M) (Figura 16). A expressão gênica de TNF-alfa foi menor no grupo C quando comparado ao grupo M (Figura 16).

Figura 16 – Média e desvio-padrão da expressão dos genes Adiponectina, IL1b, *Nampt*, IL6 e TNFa. *Diferença significativa com todos os demais grupos, exceto entre O e OM ($p \leq 0.05$). ***Diferença significativa em grupos C e M ($p \leq 0.05$).



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Atualmente a relação da obesidade com algumas condições odontológicas como a doença periodontal^{8, 9, 10, 87} está sendo cada vez mais estudada e evidenciada. Porém, existem poucos estudos que relacionam essa condição sistêmica com a movimentação ortodôntica. Devido a esta escassez de estudos nosso trabalho tem como objetivo avaliar in vivo o efeito da obesidade na remodelação dos tecidos periodontais de ratos induzida pela força mecânica ortodôntica.

Na análise microtomográfica (microCT) os animais que foram induzidos à obesidade e à força mecânica apresentaram menor volume ósseo e menor densidade alveolar. Sabe-se que adipocinas e interleucinas são produzidas e liberadas pelos tecidos adiposos². Na condição de obesidade estes mediadores estarão sendo produzidos em grande escala e amplamente disseminados no organismo podendo assim, influenciar o metabolismo e outros eventos ocorridos em diversos tecidos dentre eles, a remodelação dos tecidos periodontais^{3, 65}. Para que ocorra a movimentação ortodôntica os tecidos periodontais submetidos à força mecânica sofrem alterações, como reabsorção óssea no lado de pressão e aposição óssea no lado de tensão^{17, 18}. Portanto, este processo pode ser alterado quando há aumento de fatores pró-inflamatórios devido a uma condição sistêmica como observamos em nossos resultados de estereometria. Isso pode também ser confirmado na análise histométrica, onde os animais obesos que foram submetidos à força ortodôntica apresentaram maior perda óssea alveolar linear do que os animais obesos que não foram submetidos a esta. Na literatura são poucos os estudos que avaliaram o efeito da obesidade na movimentação ortodôntica, mas todos demonstram haver alguma relação das adipocinas com as respostas teciduais. No estudo de Haugen et al.⁷⁷ foi administrado adiponectina sob diferentes concentrações em ratos submetidos à força ortodôntica por 14 dias. A adiponectina é uma adipocina anti-inflamatória e neste artigo os autores concluíram que esta inibe a movimentação dentária estando então, relacionada ao movimento ortodôntico. Jayachandram et al.⁷⁶ avaliaram a concentração de leptina, uma adipocina pró-inflamatória, em mulheres obesas e não obesas que seriam submetidas ao tratamento ortodôntico. Foram coletadas amostras de saliva antes, 1 hora após e 1 mês após o início do tratamento. Concluíram que há uma forte correlação positiva entre a concentração de leptina e a média de movimento

dentário demonstrando assim, que a leptina apresenta papel nesse processo. Dilsiz et al.²¹ avaliaram a concentração de leptina no fluido crevicular gengival de pacientes saudáveis submetidos ao tratamento ortodôntico. Porém, eles demonstraram que o movimento ortodôntico reduz a concentração de leptina no fluido crevicular gengival. Em contrapartida também afirmaram a relação da leptina com o movimento dentário.

No presente estudo, o deslocamento dentário induzido pelo aparelho ortodôntico não apresentou diferença estatística em relação aos animais obesos e não obesos. Porém, pudemos observar que na presença da obesidade o movimento dentário foi levemente maior. Esse fato é demonstrado no estudo de Saloom et al.⁷² onde avaliou-se os efeitos do movimento ortodôntico em jovens obesos e não-obesos. Não houve diferença estatística significativa com relação ao tempo no tratamento desses jovens. Porém, os autores afirmaram que pacientes obesos possuem uma tendência de maior rapidez da movimentação dentária, sugerindo que novas investigações fossem feitas nesta área.

Na análise estereométrica observamos maior presença de células inflamatórias nos animais obesos em relação aos demais grupos sugerindo assim, que a obesidade pode estar levando a um aumento no processo inflamatório. Também houve maior número de células inflamatórias nos animais obesos submetidos à força mecânica quando comparados aos não-obesos submetidos a esta mesma força, reforçando esse resultado. Com relação aos fibroblastos, os animais não-obesos que sofreram movimentação ortodôntica apresentaram maior número destes quando comparados aos demais grupos, sugerindo que esses estão em processo de maior remodelação tecidual. Porém, não encontramos na literatura estudos que tenham realizado esse tipo de análise em situações similares, que pudessem reforçar nossos dados.

Na análise de RT-qPCR observa-se aumento na expressão gênica de Namp1 nos animais obesos quando comparado aos animais não-obesos. Deschner et al.³⁰ demonstraram que há produção de Namp1 por fibroblastos da gengiva, e que na presença de inflamação, há aumento na síntese deste. A expressão de TNF α é aumentada nas primeiras horas após o início da movimentação ortodôntica, devido a este ser um mediador inicial da fase inflamatória^{72,88}. Isso está de acordo com nosso trabalho, onde a expressão de TNF α nos animais não-obesos que sofreram movimentação ortodôntica foi estatisticamente maior do que nos animais não-obesos sem intervenção. Embora sem diferença estatística, nota-se aumento na expressão

de todos os demais genes (IL1, IL6, TNFa e adiponectina) nos animais obesos sem movimentação ortodôntica quando comparados aos animais não-obesos.

Conforme descrito na metodologia, para indução da obesidade utilizamos a ração hiperlipídica. Para comprovação do desenvolvimento da obesidade, os animais foram pesados semanalmente e no momento do sacrifício os tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico e epididimal foram removidos e pesados em balança de precisão. A partir da 4ª semana os animais submetidos à indução da obesidade apresentaram maior massa corporal quando comparados aos animais que não receberam a dieta hiperlipídica. Porém na 11ª semana, os animais obesos que sofreram movimentação ortodôntica apresentaram redução significativa nesse valor. Os animais que receberam a dieta hiperlipídica apresentaram maior quantidade de tecidos adiposos. Esses dados comprovam que a metodologia empregada foi eficaz na indução da obesidade e que apesar da queda na massa corporal dos animais obesos submetidos à movimentação ortodôntica isto não influenciou no estabelecimento da obesidade. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Speretta et al.^{80,81} que utilizaram a dieta hiperlipídica demonstrando que os animais sujeitos à indução da obesidade apresentaram maior massa corporal e maior quantidade de tecidos adiposos quando comparados aos animais que receberam a dieta padrão.

Vale ressaltar, que a obesidade está relacionada a diversas doenças sistêmicas como a Diabetes. Porém, a Diabetes também tem influência em condições odontológicas como na doença periodontal⁵. Devido a isso, para que não houvesse viés em nosso estudo, realizamos o exame de glicemia para verificar se os animais foram submetidos também à indução de Diabetes. Em nossos resultados todos os grupos apresentaram valor reduzido na taxa de glicemia (<500mg/dL) confirmando que não haviam, dentro do período de análise, desenvolvido Diabetes, fato que poderia ser um fator de confundimento na interpretação de nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica foi eficaz na indução de obesidade nos animais que sofreram essa intervenção. A obesidade modulou a resposta dos tecidos periodontais à movimentação ortodôntica levando à maior perda do volume e densidade do osso alveolar devido à maior quantidade de células inflamatórias e aumento na expressão de citocinas inflamatórias.

REFERÊNCIAS*

1. World Health Organization. WHO. Obesity and overweight. 2017 [acesso em 2017 dez 20]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en>
2. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(11 Suppl 1): S64-73.
3. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol.* 2013; 33(1): 2-13.
4. Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F et al. Adipokines: biofactors from the white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors.* 2011; 37(6): 413-20.
5. Taskesen D, Kirel B, Us T. Serum visfatin level, adiposity and glucose metabolism in obese adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012; 4(2): 76-8.
6. Chang YH, Chang DM, Lin KC, Shin SJ, Lee YJ. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 27(6): 515-27.
7. Zhang LQ, Heruth DP, Ye SQ. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in human diseases. *J Bioanal Biomed.* 2011; 3: 13-25.
8. Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MV, Kathariya R, Patel SP, Sharma A. Gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration: their relationship in periodontal health and disease. *J Periodontol* 2011; 82(9): 1314-9.
9. Pradeep AR, Raghavendra NM, Sharma A, Patel SP, Raju A, Kathariya R et al. Association of serum and crevicular visfatin levels in periodontal health and disease with type 2 diabetes mellitus. *J Periodontol.* 2012; 83(5): 629-34.
10. Raghavendra NM, Pradeep AR, Kathariya R, Sharma A, Rao NS, Naik SB. Effect of non- surgical periodontal therapy on gingival crevicular fluid and serum visfatin concentration in periodontal health and disease. *Dis Markers.* 2012; 32(6): 383-8.
11. Nogueira AV, Nokhbehshaim M, Eick S, Bourauel C, Jäger A, Jepsen S et al. Regulation of visfatin by microbial and biomechanical signals in PDL cells. *Clin Oral Investig.* 2014; 18(1): 171-8.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptado das normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8: 455-98.
13. Morseth B, Emaus N, Jorgensen L. Physical activity and bone: the importance of the various mechanical stimuli for bone mineral density. A review. *Norsk Epidemiologi.* 2011; 20(2): 173-8.
14. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49(25): 2379-93.
15. Ferretti M, Gassner R, Wang Z, Perera P, Deschner J, Sowa G et al. Biomechanical signals suppress proinflammatory responses in cartilage: early events in experimental antigen-induced arthritis. *J Immunol.* 2006; 177(12): 8757-66.
16. Lionetti V, Recchia FA, Ranieri VM. Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr Opin Crit Care.* 2005; 11(1): 82-6.
17. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006; 129(4): 469 e1-32.
18. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009; 88(7): 597-608.
19. Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Kim YJ, Damiao de Sousa-Neto M, Chan Cirelli C, Cirelli JA. Orthodontic force increases interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha expression and alveolar bone loss in periodontitis. *J Periodontol.* 2013; 84(9): 1319-26.
20. Mack KB, Phillips C, Jain N, Koroluk LD. Relationship between body mass index percentile and skeletal maturation and dental development in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013; 143(2): 228-34.
21. Dilsiz A, Kiliç N, Aydın T, Ates FN, Zihni M, Bulut C. Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2010; 80(3): 504-8.
22. Giuc, MR, Pasini M Tecco, S Marchetti E, Giannotti L, Marzo G. Skeletal maturation in obese patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012; 142(6): 774-9.
23. Gregg EW, Cheng YJ, Cadwell BL, Imperatore G, Williams DE, Flegal KM et al. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. *J Am Med Assoc.* 2005; 293(15):1868-74.
24. Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol.* 2015; 86(6): 766-76.
25. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature.* 2006; 444(7121): 860-7.

26. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 415–45.
27. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes.* 2007; 56, (4): 901–11.
28. Ye J, Gao Z, Yin J, He Q. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007; 293(4): E1118–28.
29. Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004; 145(5): 2273-82.
30. Deschner J, Eick S, Damanaki A, Nokhbehshaim M. The role of adipokines in periodontal infection and healing. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29(6): 258–69.
31. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995; 270(45): 26746-9.
32. Diez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003; 148(3): 293-300.
33. Ju JH, Yoon HS, Park HJ, Kim MY, Shin HK, Park KY et al. Anti-obesity and antioxidative effects of purple sweet potato extract in 3 T3-L1 adipocytes in vitro. *J Med Food.* 2011; 14(10): 1097–106.
34. Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M et al. Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.* 2012; 47(5): 563–71.
35. Choi KM, Kim JH, Cho GJ, Baik SH, Park HS, Kim SM. Effect of exercise training on plasma visfatin and eotaxin levels. *Eur J Endocrinol.* 2007; 157(4): 437– 42.
36. Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab.* 2010; 12(5): 365-83.
37. Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, Xie H, Zhou HD, Wu XP et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2005; 309(1), 99–109.
38. Lee HW, Kim SY, Kim AY, Lee EJ, Choi JY, Kim, JB. Adiponectin stimulates osteoblast differentiation through induction of COX2 in mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells.* 2009; 27(9): 2254–62.
39. Wu Y, Tu Q, Valverde P, Zhang J, Murray D, Dong LQ et al. Central adiponectin administration reveals new regulatory mechanisms of bone metabolism in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 306(12): E1418–30.

40. Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Hormones (Athens)*. 2012; 11(1): 8-20.
41. Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Matsuzawa Y, Walsh K. Obesity, adiponectin and vascular inflammatory disease. *Curr Opin Lipidol*. 2003; 14(6): 561-6.
42. Fukuhara A, Matsuda M, Nishizawa M, Segawa K, Tanaka M, Kishimoto K et al. Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. *Science*. 2005; 307(5708): 426-30.
43. Curat CA, Wegner V, Sengenès C, Miranville A, Tonus C, Busse R et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006; 49(4): 744-7.
44. López-Bermejo A, Chico-Julià B, Fernàndez-Balsells M, Recasens M, Esteve E, Casamitjana R et al. Serum visfatin increases with progressive beta-cell deterioration. *Diabetes*. 2006; 55(10): 2871-5.
45. Tilg H, Moschen AR. Role of adiponectin and PBEF/ visfatin as regulators of inflammation: involvement in obesity-associated diseases. *Clin Sci (Lond)*. 2008; 114(4): 275-88.
46. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372(6505): 425–32.
47. Sahu A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. *Front Neuroendocrinol*. 2003; 24(4): 225-53.
48. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998; 394(6696): 897–901
49. Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *Faseb J*. 1998; 12(1): 57–65.
50. Wallace AM, McMahon AD, Packard CJ, Kelly A, Shepherd J, Gaw A et al. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Circulation*. 2001; 104(25): 3052–6
51. Leal VO, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta*. 2013; 419: 87–94.
52. Vazquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR. White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res*. 2008; 39(8): 715–28.
53. Jagannathachary S, Kamaraj D. Obesity and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol*. 2010; 14(2): 96-100.
54. Steppan CM, Brown EJ, Wright CM, Bhat S, Banerjee RR, Dai CY et al. A family of tissue-specific resistin-like molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(2): 502-6.

55. Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 309(2): 286-90.
56. Jamaluddin MS, Weakley SM, Yao Q, Chen C. Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. *Br J Pharmacol*. 2012; 165(3): 622–32.
57. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977; 43(5): 707–19.
58. Saito, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *N Engl J Med*. 1998; 339(7): 482–3.
59. Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: A systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010; 81(12): 1708-24.
60. Suvan J, D’Aiuto F, Moles DR, Petrie A, Donos N. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*. 2011; 12(5): e381-404.
61. Zuza EP, Barroso EM, Carrareto ALV, Pires JR, Carlos IZ, Theodoro LH et al. The role of obesity as a modifying factor in patients undergoing non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol*. 2011; 82(5): 676-82.
62. Nokhbehshaim M, Keser S, Nogueira AV, Cirelli JA, Jepsen S, Jager A et al. Beneficial effects of adiponectin on periodontal ligament cells under normal and regenerative conditions. *J Diabetes Res*. 2014; 2014: 796565.
63. Suresh S, Mahendra J, Singh G, Pradeep AR, Sundaravikram, Sekar H. Comparative analysis of GCF resistin levels in obese subjects with and without periodontal disease. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(5): ZC71-4.
64. Zhu J, Guo B, Gan X, Zhang L, He Y, Liu B et al. Association of circulating leptin and adiponectin with periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2017; 17(1): 104.
65. Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli AL et al. Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in wistar rats. *J Periodontol*. 2016; 87(2): e9-17.
66. Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawskit EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *J Periodontol*. 2003; 74(5): 610-5.
67. Leonard MB, Shults J, Wilson BA, Tershakovec AM, Zemel BS. Obesity during childhood and adolescence augments bone mass and bone dimensions. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(2): 514-23.
68. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006; 28(3): 221–40.

69. Grieve WG 3rd, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994; 105(4): 369–74
70. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiat M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001; 119(3): 307-12.
71. Lee KJ, Park YC, Yu HS, Choi SH, Yoo YJ. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin 1b and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004; 125(2): 168–77.
72. Nunes L, Quintanilha L, Perinetti G, Capelli Junior J. Effect of orthodontic force on expression levels of ten cytokines in gingival crevicular fluid. *Arch Oral Biol.* 2017; 76: 70-5.
73. Yamamoto T, Kita M, Yamamoto K, Akamatsu Y, Oseko F, Kanamura N. Mechanical stress enhances production of cytokines in human periodontal ligament cells induced by *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol.* 2011; 56(3): 251–7.
74. Römer P, Köstler J, Koretsi V, Proff P. Endotoxins potentiate COX-2 and RANKL expression in compressed PDL cells. *Clin Oral Investig.* 2013; 17(9): 2041-8.
75. Proff P, Reicheneder C, Faltermeier A, Kubein-Meesenburg D, Römer P. Effects of mechanical and bacterial stressors on cytokine and growth-factor expression in periodontal ligament cells. *J Orofac Orthop.* 2014; 75(3): 191–202.
76. Jayachandran T, Srinivasan B, Padmanabhan S. Salivary leptin levels in normal weight and overweight individuals and their correlation with orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2017; 87(5): 739-44.
77. Haugen S, Aasarød KM, Stunes AK, Mosti MP, Franzen T, Vandevska-Radunovic V et al. Adiponectin prevents orthodontic tooth movement in rats. *Arch Oral Biol.* 2017; 83: 304-11
78. Saloom HF, Papageorgiou SN, Carpenter GH, Cobourne MT. Impact of obesity on orthodontic tooth movement in adolescents: a prospective clinical cohort study. *J Dent Res.* 2017; 96(5): 547-54.
79. Nogueira AVB, de Molon RS, Nokhbehshaim M, Deschner J, Cirelli JA. Contribution of biomechanical forces to inflammation-induced bone resorption. *J Clin Periodontol.* 2017; 44(1): 31-41.
80. Speretta GF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino AD, Andre RA et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (São Paulo).* 2012; 67(12): 1469-77.
81. Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani JV et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci.* 2016; 146:154-62.

82. Duarte PM, Gonçalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FH Jr. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontol Res*. 2006; 41(6): 541-6.
83. Kimura S, Nagai A, Onitsuka T, Koga T, Fujiwara T, Kaya H et al. Induction of experimental periodontitis in mice with *porphyromonas gingivalis*-adhered ligatures. *J Periodontol*. 2000; 71(7): 1167-73.
84. Pacheco CMF, Queiroz-Junior CM, Maltos KLM, Caliari MV, Pacheco DF, Duarte IDG et al. Crucial role of peripheral κ -opioid receptors in a model of periodontal disease in rats. *J Periodontol Res*. 2008; 43(6): 730-6.
85. Ekuni D, Firth JD, Nayer T, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K et al. Lipopolysaccharide-induced epithelial monoamine oxidase mediates alveolar bone loss in rat chronic wound model. *Am J Pathol*. 2009; 175(4): 1398-409.
86. Odze RD, Marcial MA, Antonioli D. Gastric fundic gland polyps: a morphological study including mucin histochemistry, stereometry, and MIB-1 immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1996; 27(9): 896-903.
87. Johnson AR, Justin Milner J, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012; 249(1): 218–38.
88. Grant M, Wilson J, Rock P, Chapple I. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod*. 2013; 35(5): 644-51.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 16/2015

Araraquara, 21 de fevereiro de 2017.

Senhor Pesquisador:

A Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado **"INFLUÊNCIA DO MOVIMENTO ORTODÔNTICO NA PROGRESSÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EM CONDIÇÕES DE SAÚDE SISTÊMICA OU OBESIDADE"** (Proc. CEUA nº 16/2015), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia da pesquisa e prorrogação de prazo.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **JUNHO/2018**.

Atenciosamente.

Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE
Coordenadora da CEUA

Ao
Prof. Dr. JONI AUGUSTO CIRELLI
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

**Não autorizo a publicação deste trabalho até 14 de março de 2020.
(Direitos de publicação reservados ao autor)**

Araraquara, 14 de março de 2018.

Camila Chierici Marcantonio