



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Maria Eduarda Scordamaia Lopes

**Influência da obesidade na progressão da doença periodontal experimental
induzida em ratos: análise histológica, microtomográfica e proteômica**

Araraquara

2021



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Maria Eduarda Scordamaia Lopes

**Influência da obesidade na progressão da doença periodontal experimental
induzida em ratos: análise histológica, microtomográfica e proteômica**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

Araraquara

2021

L864i

Lopes, Maria Eduarda Scordamaia

Influência da obesidade na progressão da doença periodontal experimental induzida em ratos: análise histológica, microtomográfica e proteômica / Maria Eduarda Scordamaia Lopes. -- Araraquara, 2021
73 f.: il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientador: Joni Augusto Cirelli

1. Obesidade. 2. Doenças periodontais. 3. Perda do osso alveolar. 4. Proteínas. 5. Ligamento periodontal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Maria Eduarda Scordamaia Lopes

**Influência da obesidade na progressão da doença periodontal experimental
induzida em ratos: análise histológica, microtomográfica e proteômica**

Comissão julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia na área de
Periodontia**

Presidente e orientador: Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli – FOAr/UNESP

2º Examinador: Prof. Dr. Fábio Renato Manzolli Leite – Aarhus University

3º Examinador: Profa. Dra. Andreia Bufalino – FOAr/UNESP

Araraquara, 23 de junho de 2021

DADOS CURRICULARES

Maria Eduarda Scordamaia Lopes

NASCIMENTO: 18/01/1996 – Santa Rita do Passa Quatro – São Paulo

FILIAÇÃO: Mario Lopes Júnior
Maria Emília Scordamaia

2014 – 2018: Curso de Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

2019 – 2021: Curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia
Nível de Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meu pais, **Mario Lopes Júnior** e **Maria Emília Scordamaia**, fonte de amor eterno e inigualável. Vocês ao meu lado me trazem coragem para seguir em frente. Obrigada por sempre me apoiarem e por não medirem esforços para que eu possa realizar meus sonhos.

À minha irmã, **Maria Gizele Scordamaia Pernassi**, por estar presente em toda a minha caminhada, por acreditar tanto em mim e no meu futuro, muitas vezes apostando mais em mim do que em si mesma. Espero um dia corresponder às suas expectativas.

À minha sobrinha e afilhada, **Marina Pernassi Abreu**, que me ensina diariamente uma nova forma de amor.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli**, por todos esses anos de orientação e conhecimento compartilhados. Obrigada pela confiança, oportunidades, incentivo e por ser exemplo de profissional e ser humano. A você minha eterna admiração e respeito.

À minha grande amiga e companheira de pesquisa, **Camila Chierici Marcantonio**. É muito gratificante poder dividir a vida e a pesquisa com alguém como você, sempre disposta, prestativa e leal. Uma amizade que levarei comigo com carinho.

Aos demais orientados do Prof. Joni, **Andressa Vilas Boas Nogueira**, **Rafael Scaf de Molon** e **Natália Leguizamon** por compartilharem seus conhecimentos e pela contribuição para a realização desse trabalho.

Aos meus amigos da Pós-Graduação, **Isabella dos Santos**, **Ísis de Fátima Balderrama**, **Fernanda Castanheira**, **Felipe Pinotti** e **José Rodolfo Spin**, por fazerem parte da minha rotina e por tornarem esses anos mais alegres e proveitosos. Agradeço toda a ajuda, carinho e momentos felizes que passamos juntos.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP**, representada por seu diretor, Prof. Dr. Edson Alves Campos e vice-diretora Profa. Dra. Patrícia P. Nordi Sasso Garcia.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pela contribuição para a minha formação profissional.

Aos **Professores da disciplina de Periodontia**, por serem inspiração, contribuírem ativamente para a minha formação, pelas orientações e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, em especial: **Ana Claudia Miranda, Suleima Ferreira, Isabela Manzoli e Antônio Medeiros Filho**, pelo suporte técnico, por sempre estarem dispostos a ajudar e por me acolherem tão bem desde o primeiro dia.

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, pelos esclarecimentos e auxílio quanto à dieta hiperlipídica.

Ao **Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP-USP)**, pela análise de Espectometria de Massas e Análise do Proteoma (BIOMASS).

À

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2018/23599-9) pelo apoio financeiro essencial para a realização dessa pesquisa.

Lopes MES. Influência da obesidade na progressão da doença periodontal experimental induzida em ratos: análise histológica, microtomográfica e proteômica [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

RESUMO

Estudos têm sido conduzidos para se entender melhor os mecanismos moleculares de progressão da doença periodontal nos diferentes tecidos periodontais. Porém, a literatura ainda é escassa sobre a influência da obesidade nesses mecanismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar in vivo o efeito da obesidade na progressão da doença periodontal. Um total de 16 ratos foram distribuídos em 2 grupos experimentais: grupo indução de doença periodontal experimental (P) e indução de obesidade seguido de indução de doença periodontal experimental (OP). A indução de obesidade foi realizada com dieta rica em gordura por 90 dias. A massa corporal dos animais foi registrada semanalmente. Após 21 dias do início da indução da doença periodontal os animais foram sacrificados e os tecidos adiposos foram removidos e pesados em balança de precisão. Análise sorológica foi realizada para observar o perfil lipídico e os níveis de glicemia. Análise microtomográfica foi realizada nas hemimaxilas para medir o percentual de volume ósseo alveolar (BVF), densidade óssea alveolar (BMD) e análise linear de perda óssea. A perda óssea alveolar foi mensurada histologicamente por histometria. A proporção dos componentes teciduais foi determinada histologicamente por estereometria. A composição proteica do ligamento periodontal foi avaliada através de análise proteômica. A partir desta análise, foram selecionadas 3 proteínas com diferenças significantes entre os grupos, e que apresentam função relevante para o processo inflamatório, para validação de sua presença no ligamento periodontal por meio de imuno-histoquímica. Foi utilizado teste estatístico t-student e adotado um nível de significância de 5%. Houve aumento significativo da massa corporal e peso dos tecidos adiposos nos animais do grupo OP. Os grupos não apresentaram diferença estatística nas análises de perda óssea. Na análise proteômica, um total de 819 proteínas foram identificadas. Na condição clínica de doença periodontal associada a obesidade, as proteínas Spondina 1, Vinculina e TRAP apresentaram-se em maior abundância e foram selecionadas por sua relevância clínica. Concluímos que embora a obesidade não tenha favorecido a progressão da doença periodontal no parâmetro de perda óssea, a caracterização proteica do ligamento periodontal em condições de doença periodontal, associado ou não à obesidade, pode ser um método auxiliar de estudo para a identificação de novos biomarcadores associados a doenças, demonstrando alterações moleculares e favorecendo estudos para alvos terapêuticos para a doença periodontal.

Palavras chave: Obesidade. Doenças periodontais. Perda do osso alveolar. Proteínas. Ligamento periodontal.

Lopes MES. Influence of obesity on the progression of induced experimental periodontal disease in rats: histological, microtomographic and proteomic analysis [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

ABSTRACT

Many studies have been conducted to understand better the molecular mechanism of periodontal disease progression in different periodontal tissues. However, the literature is limited on the influence of obesity on these mechanisms. This study aimed to evaluate in vivo the effect of obesity on periodontal disease progression. Sixteen Holtzman rats were distributed into 2 groups: ligature-induced periodontal disease (P), and obesity induction followed by ligature-induced periodontal disease (OP). Obesity was induced by a high-fat diet for 90 days. The body mass of the animals was recorded weekly. After 21 days of the induction of periodontal disease, the animals were sacrificed and the adipose tissues were removed and weighed on precision scales. Serological analysis was performed to observe the lipid profile and blood glucose levels. Microtomographic analysis was performed on the hemimaxillae to measure the percentage of alveolar bone volume (BVF), alveolar bone density (BMD), and linear analysis of bone loss. Alveolar bone loss was measured histologically by histometry. The proportion of tissue components was determined histologically by stereometry. The protein composition of the periodontal ligament was evaluated by proteomic analysis. From this analysis, three proteins with significant differences between groups and that have a relevant function in the inflammatory process were selected to validate their presence in the periodontal ligament by immunohistochemistry. The statistical t-student test was used and a 5% significance level was adopted. There was a significant increase in body mass and adipose tissue weight in the animals of the OP group. The groups showed no statistical difference in the analyses of bone loss. In the proteomic analysis, a total of 819 proteins were identified. In the clinical condition of periodontal disease associated with obesity, the proteins Spondin 1, Vinculin and TRAP were more abundant and were selected for their clinical relevance. We conclude that although obesity has not favoured the progression of periodontal disease in the alveolar bone loss parameter, the protein characterization of the periodontal ligament in periodontal disease conditions, associated or not with obesity, may be an auxiliary method of study for the identification of new disease-associated biomarkers, demonstrating molecular changes and favouring studies for therapeutic targets for periodontal disease.

Keywords: Obesity. Periodontal diseases. Alveolar bone loss. Proteins. Periodontal ligament.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específica.....	16
3 PUBLICAÇÃO	17
4 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE.....	63
ANEXO	73

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é atualmente considerada uma doença inflamatória sistêmica de baixo grau com etiologia multifatorial, onde fatores de risco como a genética, infecções ou alterações no ciclo circadiano podem contribuir à sua patogênese¹. Ocorre pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no corpo, e é definida quando o cálculo de índice de massa corporal (IMC) resulta em valor igual ou maior a 30kg/m². A causa fundamental da obesidade e do sobrepeso é um desequilíbrio energético entre as calorias consumidas e as calorias gastas. Segundo a Organização Mundial da Saúde, os índices de sobrepeso e obesidade continuam a crescer em adultos e crianças. De 1975 a 2016, a prevalência de obesidade em crianças cresceu de 4% para 18% mundialmente. Dados de 2016 revelam que 13% da população mundial era considerada obesa, tornando esse um problema de saúde pública³.

Os tecidos adiposos produzem e liberam várias citocinas conhecidas como adipocinas, por exemplo, 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 cicatrização^{4,5}. Enquanto a adiponectina exerce efeito anti-inflamatório, as demais adipocinas apresentam características pró-inflamatórias⁶.

A adiponectina é responsável por modular processos metabólicos e imunes através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α , e pelo aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a interleucina-10 (IL-10)⁷. A resistina é uma adipocina, originalmente encontrada no tecido adiposo, mas também liberada por monócitos, macrófagos e medula óssea. A característica pró-inflamatória da resistina inclui a secreção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), além de interferir nos efeitos anti-inflamatórios da adiponectina^{8,9}. Além da resistina, 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 inflamatório¹⁰⁻¹². 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*¹³. A leptina é uma adipocina secretada no tecido adiposo, e possui ação no hipotálamo modulando apetite e saciedade, regulando o peso corporal¹⁴. Além disso, atua em células imunológicas, participando em processos inflamatórios sistêmicos e locais¹⁵⁻¹⁷. Os níveis séricos dessas

adipocinas encontram-se elevados em pacientes obesos e em pacientes apresentando outras condições ou doenças inflamatórias¹⁸⁻²⁰. Na doença periodontal, as adipocinas também estão aumentadas no fluido crevicular gengival, sugerindo que estas podem contribuir com a inflamação periodontal, aumentando, portanto, o risco da doença periodontal ou o comprometimento da cicatrização periodontal^{10-12,21}.

Sobrepeso e obesidade têm sido sugeridos como associados à doença periodontal devido aos efeitos na saúde sistêmica causados pela obesidade, afetando a susceptibilidade do hospedeiro à periodontite devido à mediadores inflamatórios²². 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 periodontal²³. A periodontite é uma doença inflamatória crônica, com alta prevalência na população adulta, caracterizada por uma resposta inflamatória gengival contra uma microbiota bacteriana patogênica, resultando em perda óssea alveolar e, eventualmente, perda dentária²⁴.

A associação entre obesidade e doença periodontal foi relatada pela primeira vez em animais em 1977 por Perlstein & Bissada²⁵, e em humanos em 1998 por Saito et al²⁶.

No estudo de Perlstein & Bissada²⁵, foram utilizados ratos Zucker hereditariamente obesos e induzido doença periodontal através de ligadura. Observaram que houve maior perda óssea alveolar nos ratos obesos quando comparados aos ratos não-obesos. Também notaram que apenas a obesidade não promove alterações patológicas no periodonto quando há condição de saúde bucal; porém, na presença de fatores inflamatórios, como elevado acúmulo de placa, animais obesos apresentaram inflamação mais severa.

Saito et al²⁶ analisaram 241 pacientes portadores ou não de doença periodontal e/ou obesidade. Concluíram que a obesidade e a periodontite estão relacionadas, e que esta pode ser exacerbada por algumas condições associadas à obesidade, como por exemplo, resistência à insulina.

Estudos em animais^{1,27-32} vem sendo conduzidos para que possa haver melhor compreensão entre obesidade e doença periodontal; porém, esses estudos divergem entre si quanto à metodologia adotada e também quanto aos seus resultados.

Simch et al²⁷ utilizaram dieta de cafeteria por 120 dias, com indução de doença periodontal com ligadura nos segundos molares superiores por 30 dias. Concluíram que o estabelecimento e progressão da perda óssea alveolar não foi influenciada pela

obesidade. Embora Zuza et al³¹ tenham utilizado a mesma metodologia para a indução de doença periodontal, concluíram que a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura influenciou o metabolismo ósseo alveolar quando associada à periodontite experimental, e causou uma resposta inflamatória local e perda óssea alveolar mais grave. Cavagni et al³⁰ induziram a doença periodontal por um período de 30 dias, através de ligadura com fio de algodão, e também obtiveram como resultado uma maior extensão de destruição periodontal quando associada à indução de obesidade com dieta de cafeteria.

Diferente dos estudos anteriores, Virto et al¹ utilizaram dois patógenos para a indução da doença periodontal: *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, administrados através de gavagem oral por 4 dias consecutivos durante 12 semanas. Para a indução da obesidade foi utilizada uma dieta rica em gordura durante 24 semanas. Como resultados, constataram o efeito da comorbidade, demonstrando aumento da severidade periodontal e aumento da inflamação sistêmica.

A avaliação da influência da obesidade em condições de periodonto saudável também é outro ponto a ser destacado. Damanaki³³ e colaboradores em 2018 avaliaram através de microtomografia computadorizada as consequências de uma dieta rica em gorduras na maxila e mandíbula de camundongos. Como resultados constataram que não houve diferença na perda óssea alveolar na maxila de camundongos obesos, quando comparado aos animais que receberam dieta padrão para roedores. Porém, foi observada uma maior remodelação óssea na mandíbula dos animais obesos, exclusivamente na região de primeiro molar. Esses resultados corroboram os achados do nosso grupo³⁴, onde não foi observada diferença estatística na perda óssea alveolar ao analisarmos a maxila de ratos, entre os grupos controle e obesidade, em condições de saúde periodontal. Porém, no estudo de Cavagni³⁰ e colaboradores, após induzirem obesidade com dieta de cafeteria, demonstraram uma maior perda óssea alveolar na maxila de ratos obesos comparados aos animais que não sofreram indução da obesidade. Esses achados reforçam que os diferentes resultados encontrados podem estar associados às diferenças metodológicas presentes.

Estudos em humanos também estão sendo conduzidos para melhor compreensão entre obesidade e doença periodontal. Em revisão sistemática realizada por Martinez-Herrera et al³⁵, foram analisados 28 estudos: 19 estudos observacionais

e 9 estudos clínicos avaliando a resposta ao tratamento periodontal. Dentre os 19 estudos observacionais, todos avaliaram a obesidade através do índice de massa corporal, alguns associando também o valor da circunferência abdominal, relação cintura/quadril e porcentagem de gordura corporal. Para a avaliação de periodontite, parâmetros clínicos foram utilizados, dentre eles profundidade de sondagem, nível de inserção clínica, índice de placa e sangramento a sondagem. Como resultado, 17 estudos apresentaram uma associação positiva entre doença periodontal e obesidade, demonstrando que indivíduos obesos possuem maior incidência de doença periodontal comparada à população com peso normal, sugerindo que sobrepeso e obesidade possam ser um fator de risco ao desenvolvimento ou piora da periodontite.

Dos estudos clínicos encontrados na literatura e incluídos na revisão sistemática de Martinez-Herrera et al³⁵, que avaliaram o efeito da obesidade sobre a resposta clínica ao tratamento periodontal, seis concluíram que a obesidade não exerce um efeito modificador negativo sobre o resultado do tratamento periodontal não cirúrgico, demonstrando que pacientes obesos ou não obesos respondem de maneira similar ao tratamento periodontal. Em contraste, três artigos sugeriram que a obesidade exerce um efeito negativo sobre a resposta ao tratamento periodontal não cirúrgico no parâmetro de profundidade de sondagem.

Além dos parâmetros clínicos analisados na progressão da doença periodontal, biomarcadores estão sendo amplamente estudados com o objetivo de auxiliar o diagnóstico precoce e tratamentos para a doença periodontal ³⁶. Os biomarcadores de proteínas podem ser aplicados na prática a muitas fases da periodontite, desde o início da doença até seu desfecho clínico³⁷. Com isso, estudos moleculares focados na caracterização do proteoma na doença periodontal vem sendo amplamente realizados, como demonstrado na recente revisão sistemática de Rizal e colaboradores em 2020³⁸. A espectrometria de massa permite a caracterização do proteoma e correlações de condições clínicas. Também é indicado para o estudo de doenças multifatoriais, como a periodontite³⁷. A análise proteômica nos traz informações acerca dos mecanismos reguladores celulares sobre o nível proteico em grande escala ³⁹. Associado à análise de bioinformática, nos proporciona uma visão global e integrada de um conjunto de proteínas, onde podemos analisar suas interações, modificações, localizações e funções⁴⁰. Através da análise de ontologia gênica (Gene Ontology) visualizamos os resultados como redes, divididos entre os

termos Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular, que são agrupados com base no seu papel biológico⁴¹. Dessa forma, sugerimos que um estudo avaliando as alterações proteicas em condição de doença periodontal e obesidade possa corroborar o conhecimento que temos atualmente, além de contribuir para um melhor entendimento do mecanismo de progressão da periodontite associada à obesidade.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da obesidade na progressão da doença periodontal experimental induzida em ratos.

2.2 Específicas

- Avaliar o processo inflamatório nos tecidos periodontais de dentes submetidos à indução de doença periodontal em ratos obesos ou sistemicamente saudáveis;
- Avaliar densidade óssea alveolar, volume ósseo alveolar e perda óssea alveolar linear em dentes submetidos à indução de doença periodontal em ratos obesos ou sistemicamente saudáveis;
- Avaliar a composição proteica do ligamento periodontal de ratos submetidos à indução de doença periodontal experimental associada ou não à obesidade;
- Avaliar a presença de proteínas selecionadas na análise proteômica, no ligamento periodontal de ratos sob indução de doença periodontal experimental em condição de saúde sistêmica e de obesidade.

3 PUBLICAÇÃO

O presente estudo gerou um artigo que será submetido na revista International Journal of Molecular Sciences, e será apresentado a seguir de acordo com as normas da revista.

Obesity influences the proteome of periodontal ligament tissues following periodontitis induction in rats

Maria Eduarda Scordamaia Lopes^a, Camila Chierici Marcantonio^a, Rafael Scaf de Molon^a, Paulo Sérgio Cerri^b, Cristiane Ribeiro Salmon^c, Luciana Souto Mofatto^d, Francisco Humberto Nociti Junior^{c,e}, James Deschner^f, Joni Augusto Cirelli^{a*}, Andressa Vilas Boas Nogueira^{a,f*}

^aDepartment of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brazil

^bDepartment of Morphology, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil

^cDepartment of Prosthodontics and Periodontics, Division of Periodontics, Piracicaba Dental School, University of Campinas – UNICAMP, Piracicaba, São Paulo, Brazil

^dDepartment of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

^e São Leopoldo Mandic Research Center, Campinas, São Paulo, Brazil

^f Department of Periodontology and Operative Dentistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany

*** Shared Corresponding author:**

Joni Augusto Cirelli

Department of Diagnosis and Surgery, School of Dentistry at Araraquara, São Paulo State University, UNESP

Rua Humaitá, 1680, Centro, 14801-903- Araraquara-SP, Brazil

Phone: +55 16 3301-6375, Email: joni.cirelli@unesp.br

Andressa Vilas Boas Nogueira

Department of Periodontology and Operative Dentistry, University Medical Center of the Johannes Gutenberg University

55131, Mainz, Germany, Email: a.nogueira@uni-mainz.de

ABSTRACT

Many studies have been conducted to better understand the molecular mechanism involved with periodontitis progression. There has been growing interest in the potential impact of obesity on periodontitis onset and progression, but the mechanisms involved remain to be elucidated. The present study was designed to determine the impact of obesity on experimentally-induced periodontitis in rats and identify novel pathways involved. Sixteen Holtzman rats were distributed into two groups: ligature-induced periodontitis (P), and obesity plus ligature-induced periodontitis (OP). Obesity was induced by a high-fat diet for 90 days, whereas periodontitis was induced for 21 days. Data analysis (body weight, adipose tissue weight, and blood work) confirmed obesity induction, whereas bone loss was confirmed by micro-CT and histologic analyses. Proteome analysis from the periodontal ligament tissues (PDL) identified 819 proteins, 53 exclusive to the P group, 28 exclusive to the OP group, and 738 commonly expressed. Validation was performed by immunohistochemistry for selected proteins (Spondin1, Vinculin and TRAP). Histologically, it was found that obesity did not significantly affect bone loss resulting from periodontitis. Altogether, the present study's findings indicated that obesity might impact the proteome of PDL submitted to experimental periodontitis, allowing for identifying potential targets for personalized approaches.

Keywords:

Obesity. Periodontal Diseases. Periodontitis. Proteomics. Periodontal Ligament.

INTRODUCTION

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of bacterial origin characterized by the progressive destruction of the dental supporting tissues¹. Periodontopathogens and their bacterial components, such as lipopolysaccharide and toxins found in the dental biofilm, induce an inflammatory reaction by stimulating host defense and resident cells of the periodontium to produce and release inflammatory mediators. These molecules trigger and maintain a chronic immunoinflammatory response in the periodontium, leading to tissue loss and, eventually, tooth loss². The level of several inflammatory cytokines is elevated in the blood plasma and periodontally active sites, which is reduced after periodontal treatment^{1,3-5}. The tissue damage that occurs in periodontitis is believed to be more associated with this exacerbated host immune-inflammatory response than the direct effect of bacteria⁶. Due to its inflammatory condition, periodontitis has been related to certain systemic conditions and diseases, such as cardiovascular diseases, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, obesity and metabolic syndrome, which act as modifying factors of the immune-inflammatory process through a pathogenic mechanism of interaction between these diseases^{7,8}. A systemic inflammation present in obesity may be a pathogenic connection between this disease and other chronic diseases, such as periodontitis^{9,10,11}.

Obesity is characterized by excessive accumulation of adipose tissue, which negatively impacts the individual's overall health. With the increase in the prevalence of obesity worldwide, which approximately tripled between 1975 and 2016, this systemic condition has become a major public health problem¹². Adipose tissues produce and release various cytokines known as adipokines, in addition to proinflammatory cytokines¹³. These adipokines regulate not only insulin resistance and energy expenditure, but also immune-inflammatory and healing processes¹⁴.

Periodontal ligament (PDL) is a soft connective tissue, highly vascularized and cellularized, which joins the dental cementum to the alveolar bone, attenuating the occlusal stresses. It has a high metabolic rate, cellular turnover and number of fibroblasts with an elevated level of fibre production^{15,16}. Due to the presence of mesenchymal stem cells, their capacity for regeneration has been widely studied¹⁷. Hence, the characterization of the protein profile of PDL in conditions of periodontitis, associated or not to obesity, becomes an important point for identifying possible biological markers of the association between comorbidities. Proteomic analysis has been used in oral tissues, such as enamel¹⁸, pulp^{19,20}, gingival crevicular fluid²¹,

periodontal ligament cells²², gingival tissue^{23,24}, dental cementum and alveolar bone²⁵, promoting insights into their possible pathologies.

Therefore, this study aimed to evaluate the influence of obesity on the progression of experimental periodontal disease induced in rats, emphasizing the obesity effect on the proteomic profile of the periodontal ligament tissue during the disease process.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design

Experimental procedures followed all recommendations of the ARRIVE guidelines and were approved by the Ethical Committee on Animal Experimentation of the São Paulo State University, School of Dentistry at Araraquara, Brazil (protocol number 16/2015) (APÊNDICE A). From a previous study by our research group, the sample size was calculated by analysis of variance based on microcomputed tomography (microCT) analysis²⁶. Sixteen male Holtzman rats, average weight 300g, were used. These animals were maintained in the University's animal facilities in plastic cages, under controlled temperature (22°C-25°C) with a 12-hour light/dark cycle, and received a standard laboratory diet (Labina/Purina, Ribeirão Preto, Brazil) or high-fat diet and water ad libitum. The animals were divided into two experimental groups: 1) ligature-induced periodontitis (P) and 2) obesity associated with ligature-induced periodontitis (OP).

Obesity induction

The animals in the OP group received a high-fat diet (3.82 kcal/g) to induce obesity. This diet was composed of standard rat chow plus peanuts, milk chocolate and sweet biscuits, in a 3:2:2:1 ratio, and contained 13g of protein, 19g of total fat, 40g of carbohydrate, 4g of fibre and 73mg of sodium per 100g of diet^{27,28}. The high-fat diet was provided daily and started 90 days before baseline when periodontitis induction was initiated.

Periodontitis induction

General anaesthesia was performed with intramuscular injections of ketamine hydrochloride 10% (0.08 mL/100 g body weight) and xylazine hydrochloride 2% (0.04 mL/100 g body weight). A cotton thread was placed around the upper first molars

bilaterally and kept in place for 21 days to induce periodontitis. After this period, all animals were euthanized by anaesthetic overdose.

Sample processing

The maxillary jaws were collected and separated in hemimaxillae for micro-CT, histologic and proteomic analyses. Epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissues were removed and weighed on a precision scale^{27,28}. For serum analysis, the animals fasted for 12 hours before sacrifice. Blood was collected through cardiac puncture and, after centrifugation (3000 rpm at 23°C for 10 minutes), the plasma was analyzed for total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL) and insulin.

Micro-CT analysis

The hemimaxillae of all animals were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and stored in 70% ethanol before micro-CT scanning (μ CT Skyscan 1176; Bruker, Kontich, Belgium). Scanning was performed using an x-ray generator operating at 50kVp, beam current at 500 μ A, with a 0.5mm aluminium filter and image resolution of 18 μ m. The images were reconstructed using specific software (NRecon, version 1.6.1.5; Bruker) in all three dimensions. Data Viewer (version 1.4.3.1, Skyscan; Bruker) and CTAn (CT-Analyser software, version 1.10.1.0, Skyscan; Bruker) were used for image reorientation and volumetric analysis, respectively. The volumetric measurements were performed after selecting a region of interest (ROI) delimited from the root apices of the first molar to the alveolar crest in the apical-coronal direction. In the mesial-distal direction, the limits were the mesial face of the first and second molars, and therefore all the alveolar bone around the first molars was included in the ROI. Tooth roots and PDL were excluded from the ROI. The architectural parameter evaluated were bone volume fraction (BVF) and bone mineral density (BMD). Linear bone loss was measured by calculating the distance between the cementum-enamel junction (CEJ) and the alveolar bone crest (ABC).

Histological analysis

Eight hemimaxillae per group were used to evaluate morphologic changes. Tissue blocks were fixed in 4% paraformaldehyde for 48h, decalcified in EDTA (10%, 0.5M) for three months, and embedded in paraffin. Serial parasagittal sections of 4 μ m

were obtained and stained with haematoxylin and eosin (HE). Two sections of each tooth were selected for histometric and stereometric analyses. The images from histological sections were taken using Leica DMLS microscopy (Leica DMLS; Leica/Reichert Diastar Products & Jung, Wetzlar, Germany) at a magnification of 50x for histometric analysis and 200x for stereometric analysis.

Histometric analysis was performed using an image-analysis system (Image J 1.37b; National Institutes of Health, Bethesda, Md), measuring the furcation bone area, determined in the inter-radicular area of the maxillary first molars in a 1000 μm zone under furcation²⁹. In addition, the distance between CEJ to ABC was determined on the distal surface of the maxillary first molars.

The stereometric analysis quantified the presence of fibroblasts, blood vessels, bone, collagen fibres, inflammatory cells and other structures using a point-counting technique²⁶. A grid with 252 intersection points was constructed using image editing software (Adobe Photoshop CS6; Adobe System Incorporated, San Jose, Calif) and overlaid on the digital images obtained from the histologic sections and positioned in the furcation region.

Laser capture microdissection (LCM) and protein extraction

Samples (n=5) were collected and histologically processed to obtain serial sections in a mesiodistal direction as previously described³⁰. Briefly, tissues were fixed in a 10% buffered formalin (Fisher Diagnostics, Middletown, VA, USA) at 4°C for 24h, rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS < pH 7.4, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for 30 min at 4°C and decalcified in 20% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Merck/Millipore) for 30 days at 4°C under agitation. Maxillae were trimmed, washed in PBS for 30 min at 4°C, dehydrated in 100% ethanol at 4°C for 30 min, diaphanized in xylene for 20 min at room temperature and embedded in paraffin. Blocks were stored at -20°C. Serial 5 μm thick mesiodistal sections of the first molar were obtained and mounted on polyethylene naphthalate membrane glass slides (PEN, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sections were deparaffinized and then immediately used for PDL microdissection as previously described³¹. Eight to ten sections per sample were microdissected, and the total captured area was calculated and used to normalize the amount of tissue/protein for liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. Caps containing the captured tissues were incubated at room temperature for protein

extraction. Whole protein extracts were reduced as described previously³⁰. The resulting tryptic peptide samples were equilibrated to pH 2.0 with formic acid. Peptide mixtures were desalted and purified using microcolumns ZipTip® C18, P10 Pipette Tips (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA), dried in a vacuum concentrator and reconstituted in 0.1% formic acid for analysis.

LC-MS/MS and bioinformatics analysis

Peptide mixtures were analyzed on an LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mass spectrometer coupled with Easy NanoLC II (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ion source. Raw data were accessed in the Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific) and processed using Proteome Discoverer (version 1.4.0.288, Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). The MS/MS spectra (msf) generated from raw files were searched against the UniProt *Rattus_norvegicus*_Protein Database. Proteins with at least two valid values in at least two samples were considered for further analysis. Independent samples t-test was applied to test differences in protein intensities between the P and OP sample groups. Protein ratios were calculated from the average of normalized spectral protein intensities. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of identified proteins for each experimental group was performed using the Functional Classification tool on the PANTHER Classification System data analysis platform (PANTHER version 16.0, released 2020-12-01, <http://pantherdb.org/>). The proteomic analysis of selected proteins identified in the PDL tissues was confirmed by immunohistochemical and the histochemical method of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP).

Immunohistochemistry (IHC)

Serial 4 µm thick mesiodistal sections of the first molar were obtained and mounted on silanized slides (Perfecta, Sao Paulo, SP, Brazil). IHC was performed using an avidin-biotinylated peroxidase enzyme complex (ABC) based kit (Vector Labs, Burlingame, CA, USA). The sections were incubated with the primary antibodies Spondin1 (1:200, bs-7520, Bioss) and Vinculin (1:50, LS-B5770, LifeSpan BioSciences) at 4°C overnight. Negative controls lacking primary antibodies were performed. Diaminobenzidine (DAB, Dako) was used as a chromogen substrate, and the sections were counterstained with Carrazi's hematoxylin. Representative photomicrographs of each analyzed area (mesial, distal and furcation) were taken at

400x magnification using a digital camera (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan) attached to a light microscope (BX-51, Olympus) of each sample per group. The analysis was performed by counting positive cells by an experienced researcher blinded to the experimental groups.

TRAP enzyme staining

Sections were deparaffinized and incubated at 37°C in a medium prepared by dissolving 140mg of Fast Red TR Salt (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), 20mg of Naphthol AS-BI (Sigma Chemical Company) in 500ul of N, N-dimethylformamide (Sigma Chemical Company) and 0,56g of Sodium Tartrate. Following incubation, sections were washed in distilled water, counterstained with Carazzi's hematoxylin and mounted in an aqueous medium. Photomicrographs of the mesial, distal and furcation areas were taken at 400x magnification using a digital camera (DP-71, Olympus, Tokyo, Japan) attached to a light microscope (BX-51, Olympus). TRAP-positive cells were quantified by an experienced examiner blinded to the experimental groups.

Statistical analysis

Intergroup comparisons were performed using the Student t-test (Graph-Pad Prism 8 Software; Inc, La Jolla, San Diego, CA, USA) to compare clinical, micro-CT, histological, immunohistochemistry and TRAP data at a significance level of 5%. In addition, proteome data analysis was performed by the software R (R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria) and followed by the Student t-test ($p < 0.05$).

RESULTS

Obesity induction

Data analysis showed that the OP group featured a significantly higher body weight than the P group ($p < 0.05$), as early as 1 week. Starting at three weeks after obesity induction, the OP group displayed a 15% higher body weight than the P group, with a difference of 21% at the last week, confirming the obesity induction^{32,33} (Fig. 1, A). In addition, animals that received a high-fat diet had significantly heavier epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissue than the animals from the P group (Fig.1, B). Furthermore, obese animals presented significantly increased triglyceride levels and lower HDL levels ($p < 0.05$) than non-obese animals. Data

analysis further demonstrated that blood glucose levels were below diabetes thresholds for all animals (>300 mg/dL)³⁴ (Fig.1, C).

Alveolar bone loss and stereometric analysis

Micro-CT data analysis showed similar BVF and BMD values for both groups, with no significant differences ($p= 0.20$ and $p=0.17$, respectively) (Fig.2, A). Further data analysis showed that obesity did not impact the bone loss resulting from experimental periodontitis (Fig.2, A-C, $p>0.05$) but revealed an increased number of blood vessels in the OP group, indicating a potentially more intense inflammatory response to the dental biofilm in the presence of obesity (Fig.2, D).

PDL proteome

A total of 819 proteins were detected. Of these, 53 exclusives to the P group, 28 exclusive to the OP group, and 738 proteins common to both groups. Out of these, 35 proteins presented a differential abundance between groups (Fig.3, C). The Principal Component Analysis (PCA) evaluated the intrinsic variation among samples. PDL samples from each group were homogeneous, with evident differences between groups (Fig.3, D). Proteins in differential abundance with statistical significance ($p<0.05$) in the P versus OP PDL samples were represented as Volcano plot (Fig.3 E), showing 20 proteins from the P group and 15 proteins from the OP group. The heatmap analysis illustrated the distribution of proteins in differential abundance, grouped into two clusters (Fig.3, E-G).

GO analysis was performed using PANTHER software to identify enriched GO terms and the grouping of proteins. Proteins in differential abundance identified in the OP and P groups are discriminated in Tables 1 and 2, respectively, including Uniprot accession number, gene name, the p-value (Student t-test) and fold-change. Proteins were analyzed according to three aspects: Molecular Function (MF), Biological Process (BP) and Cellular Component (CC). Proteins found exclusively in each group are described in Tables 1S and 2S. The distribution according to the MF GO term evidenced that the proteins in differential abundance of both groups are mainly involved in binding (GO: 0005488) and catalytic activity (GO: 0003824) (Fig. 4, A and Fig.5, A). In the P group, proteins are also involved in molecular adaptor activity (GO: 0060090) and transporter activity (GO: 0005215). In BP GO term, the majority of proteins are involved in biological regulation (GO: 0065007), cellular process (GO:

0009987) and metabolic process (GO: 0008152) (Fig.4, B and Fig.5, B). Intriguingly, only in the P group proteins are involved in the immune system process (GO: 0002376) and in response to stimulus (GO: 0050869). Proteins in the CC GO term are distributed similarly involving cellular anatomical entity (GO: 0110165), intracellular (GO: 0005622) and protein-containing complex (GO: 0032991) (Fig.4, C and Fig. 5C).

Subcellular localization and expression pattern of selected proteins and TRAP enzyme staining

The proteins Spondin1, Vinculin and TRAP, identified by proteomic analysis, were confirmed by IHC and TRAP enzyme staining method. Furthermore, these analyses showed a significant difference ($p < 0.05$) in the number of positive cells between the P and OP groups, as demonstrated in proteomic analysis, confirming the presence of these proteins in the periodontal ligament tissues (Fig. 6).

DISCUSSION

In the present study, the influence of obesity on periodontitis progression was assessed in rats. The results showed that obesity did not alter experimental periodontitis progression (bone loss) within the study's experimental period (21 days). In addition, the proteome signature of PDL tissues harvested from sites with periodontitis revealed distinctions between P and OP groups, suggesting a potential effect of obesity on the periodontal ligament response to the disease. To the best of our knowledge, this is the first study using LCM and proteomic methodologies to exclusively evaluate the effect of obesity, a systemic condition, on the molecular level of the periodontal ligament. More than a metric analysis, evaluating the proteomic profile allows a deeper interpretation of the potential risk of obesity for periodontal disease.

The effect of obesity on periodontal disease progression is still controversial in the literature. Some studies corroborate our findings, demonstrating that obesity has no influence on bone loss in rats with ligature-induced periodontitis^{33,35,36}. On the other hand, other studies indicate that the association of obesity with periodontal disease results in more significant bone destruction^{37–41}. This divergence in the results may be attributed mainly to the different methodologies used. Ligature-induced P promotes greater accumulation of biofilm, acting as a niche for bacterial colonization. Associated

with the local trauma caused by the insertion of the ligature, this methodology may cause a more acute deleterious effect on periodontal tissue compared to induction with oral gavage with periodontopathogens. Although it can be considered less traumatic, oral gavage has reproducibility limitations, with different concentrations and types of bacteria inoculated, and can vary from 10 days to 3 months of induction. In addition, inducing obesity with a cafeteria diet may provide greater adherence of food to the animal's tooth surface, resulting in more significant biofilm accumulation and consequent tissue destruction when compared to using a HFD.

Another important point to be evaluated is the influence of obesity on healthy periodontal conditions. In 2018, Damanaki⁴² and colleagues evaluated the effect of obesity in mice with healthy maxillary and mandibular periodontium. Through computed microtomography analysis, a decrease in the alveolar bone crest was observed only in the mandibular first molar region, showing no differences in the analyses in the maxilla. Similarly, in the study by Marcantonio et al²⁷ no differences were found in alveolar bone volume fraction in the maxilla of rats after receiving HFD compared to the standard diet group. Contrasting these findings, in 2016, Cavagni et al⁴⁰ demonstrated a greater alveolar bone loss in the maxilla of rats receiving cafeteria diet. Such facts reinforce that the divergence of results present in the literature is influenced by different methodologies adopted.

Obesity was confirmed in the animals of the OP group by the gradual and significant increase in body mass and amount of adipose tissue, analyzed at the euthanasia of the animals. In addition, the serological examination confirmed the alteration in the lipid profile by the significant increase in triglycerides in the obese group, corroborating previous studies^{27,39,43}. Since obesity is closely related to diabetes⁴⁴, and considering the previously demonstrated effects of this disease on periodontal disease^{45,46}, a blood glucose test was performed to avoid bias in this study. Both groups showed low blood glucose levels⁴⁷, confirming that they had not developed diabetes during the analyzed period, which could be a confounding factor in interpreting our results.

The induction of periodontal disease within 21 days characterizes a chronic disease. The ligature-induced P experimental model used in this study has been extensively used in the literature by many research groups^{48–55}. As previously demonstrated, the use of ligature to induce periodontitis promotes intense bone loss and inflammatory response in the initial periods (7 days) with a consequent decrease

over the days⁵⁶. This fact could explain the absence of statistical difference in the stereometric analysis of the inflammatory process since there is an immunological adaptation of the host in the chronic phase, even in the presence of obesity and its subclinical inflammation. In addition, there is an apical migration of periodontal tissues to recover the biological space, which would also explain the absence of statistical difference in the assessment of bone loss. We emphasize that our results of histometric analysis and morphometric measurements are in agreement, showing no differences between groups in the analyzed period.

The divergent results found in the literature highlight the need for further studies evaluating the influence of obesity on the progression of periodontal disease. Therefore, specific analyses considering cellular and molecular changes in periodontal tissues are helpful in the understanding of the mechanistic interaction of these diseases. In this study, the proteomic analysis showed a significant difference in the protein profile between the groups. Therefore, we directed the analysis to identify significant differences in the expression of proteins relevant to inflammation and tissue remodelling that could influence the evolution of periodontal disease. Comparing the distribution of GOs between the groups, we note that only differentially abundant proteins in the P group have a term associated with immune response, in BP GO (immune system process GO:0002376). This suggests and reinforces the hypothesis that immune system dysfunction is one of the main contributors to obesity-related changes⁵⁷. Obesity involves the impairment of both innate and adaptive immune responses. Changes in immunity are associated with a negative impact of obesity against infections, favouring the progression of chronic disease^{58,59}. Thirty-five proteins were presented in different abundance between the groups, 15 of them in the OP group. We highlighted the proteins Spondin 1, TRAP and Vinculin, due to their clinical relevance.

Spondin 1 (or F-Spondin) is a neuronal extracellular matrix glycoprotein and its function in the periodontal tissue has been studied. Previously results demonstrate its ability to promote the cementoblastic differentiation of periodontal ligament cells⁶⁰ and inhibit the differentiation of osteoclasts precursors, protecting the root surface from resorption⁶¹. Besides this anabolic effect on the cementum, a previous study has demonstrated the presence of F-spondin in osteoarthritis cartilage, activating latent TGF- β and promoting cartilage degradation through the PGE2 production mechanism⁶². A knockout mouse study pointed to Spondin1 as a negative regulator of

bone mass, showing that its deletion resulted in a local and systemic reduction of TGF- β levels, increasing bone deposition and the expression of periostin⁶³. Periostin is an extracellular matrix protein with a critical role in the maintenance of periodontal ligament. It has been shown that periostin expression is negatively regulated by F-spondin overexpression, suggesting deleterious effects on the periodontal ligament⁶⁴. In the present study, both proteomic analysis and immunolocalization of F-Spondin confirmed its presence in the periodontal ligament in periodontal disease, which was increased when associated with obesity. This fact highlights a local effects of obesity in the periodontal ligament, suggesting possible influence in the disease progression.

Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) is a metalloprotein with a relevant clinical role as an indicator of inflammatory conditions, participating in bone turnover^{65,66}. Although the morphological analyses did not show a statistical difference in the amount of alveolar bone between the groups, the difference detected in the proteomic analysis of the periodontal ligament suggests that the activity of osteoclasts in the P group may have decreased in the analyzed period, but was maintained in the OP group. This fact may be justified by the higher TRAP expression in animals that received HFD, as demonstrated in previous studies^{66,67}, which could progressively influence bone metabolism in subsequent periods.

Vinculin (VCL) is an actin-binding protein, a structural protein that participates in cell adhesion and migration⁶⁸. VCL was first associated with obesity in 2005⁶⁹, suggesting its increased abundance due to structural changes consequent to weight gain and involvement in the lipid metabolism^{69,70}. Furthermore, since bone resorption activity by osteoclasts depends on their cellular ability to organize their cytoskeleton, a study suggests that VCL regulates osteoclast function⁷¹. These results demonstrate that VCL expression increases with osteoclastogenesis, regulating osteoclast function and not formation⁷¹. Considering these previous studies and our results, we can suggest that the higher abundance of VCL in the OP group is associated with obesity and higher osteoclast activity.

Proteomic analysis studies evaluating periodontal disease are increasingly being used to find new biomarkers related to the pathogenesis of periodontal disease, expanding the knowledge of this complex process⁷². Previous proteomic studies associating periodontal disease with obesity have been conducted, analyzing changes in patient's saliva^{73,74}. However, the present study is the first to evaluate protein changes in periodontal ligament tissue in response to the association of periodontal

disease and obesity. In this way, proteomics can be an additional study to understanding the pathogenesis of diseases and their association, demonstrating molecular alterations before clinical evidence, favouring the proposition of new therapeutic strategies.

CONCLUSION

In the current study, bone loss resulting from experimental periodontitis was not affected by obesity. In contrast, our proteomic approach revealed Spondin-1, Vinculin and TRAP enzyme as potential modulators of the periodontal response to dental biofilm when obesity is present. These findings provide insights into the potential mechanisms involved with the periodontal response in obesity and shed light on these factors as potential candidates for personalized therapies.

Acknowledgments

This project was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant no. 2017/07137-2, 2014/20715-7, 2017/13851-0, 2018/23599-9) and the German Research Foundation (DFG; DE no. 1593/5-1).

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflicts of interest concerning the authorship and/or publication of this article.

REFERENCES

1. Górski R, Gregorek H, Kowalski J, Laskus-Perendyk A, Syczewska M, Madaliński K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2003 Dec;30(12):1046–52.
2. Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:57–71.
3. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of interleukin-1 beta, -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000 Oct;71(10):1535–45.
4. Zhong Y, Slade GD, Beck JD, Offenbacher S. Gingival crevicular fluid interleukin-1beta, prostaglandin E2 and periodontal status in a community population. *J Clin Periodontol*. 2007 Apr;34(4):285–93.
5. Silva N, Dutzan N, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Aguillon JC, et al. Characterization of progressive periodontal lesions in chronic periodontitis patients: levels of chemokines, cytokines, matrix metalloproteinase-13, periodontal pathogens and inflammatory cells. *J Clin Periodontol*. 2008 Mar;35(3):206–14.
6. Yu H, Li Q, Herbert B, Zinna R, Martin K, Junior CR, et al. Anti-inflammatory effect of MAPK phosphatase-1 local gene transfer in inflammatory bone loss. *Gene Ther*. 2011 Apr;18(4):344–53.
7. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2007 Oct;13 Suppl 4:3–10.
8. Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1708–24.
9. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev*. 2012 Sep;249(1):218–38.

10. Martinez-Herrera M, Silvestre-Rangil J, Silvestre F-J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017 Nov;22(6):e708–15.
11. 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.
12. WHO. World Health Organization. [Internet]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
13. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Nov;93(11 Suppl 1):S64-73.
14. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol*. 2013 Jan;33(1):2–13.
15. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:20–40.
16. de Jong T, Bakker AD, Everts V, Smit TH. The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*. 2017 Dec;52(6):965–74.
17. Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, et al. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffolds and Stem Cells. *Cells*. 2019 Jun;8(6).
18. Mangum JE, Veith PD, Reynolds EC, Hubbard MJ. Towards second-generation proteome analysis of murine enamel-forming cells. *Eur J Oral Sci*. 2006 May;114 Suppl:256-259,382.
19. Jágr M, Eckhardt A, Pataridis S, Foltán R, Myšák J, Mikšík I. Proteomic analysis of human tooth pulp proteomes - Comparison of caries-resistant and caries-susceptible persons. *J Proteomics*. 2016 Aug;145:127–36.
20. Eckhard U, Marino G, Abbey SR, Matthew I, Overall CM. TAILS N-terminomic and proteomic datasets of healthy human dental pulp. *Data Br*. 2015 Dec;5:542–8.
21. Tsuchida S, Satoh M, Takiwaki M, Nomura F. Current Status of Proteomic Technologies for Discovering and Identifying Gingival Crevicular Fluid Biomarkers for Periodontal Disease. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec;20(1).
22. Li Q, Luo T, Lu W, Yi X, Zhao Z, Liu J. Proteomic analysis of human periodontal ligament cells under hypoxia. *Proteome Sci*. 2019;17:3.

23. Bao K, Li X, Kajikawa T, Toshiharu A, Selevsek N, Grossmann J, et al. Pressure Cycling Technology Assisted Mass Spectrometric Quantification of Gingival Tissue Reveals Proteome Dynamics during the Initiation and Progression of Inflammatory Periodontal Disease. *Proteomics*. 2020 Feb;20(3–4):e1900253.
24. Yaprak E, Kasap M, Akpınar G, Kayaaltı-Yüksek S, Sinanoğlu A, Guzel N, et al. The prominent proteins expressed in healthy gingiva: a pilot exploratory tissue proteomics study. *Odontology*. 2018 Jan;106(1):19–28.
25. Salmon CR, Tomazela DM, Ruiz KGS, Foster BL, Paes Leme AF, Sallum EA, et al. Proteomic analysis of human dental cementum and alveolar bone. *J Proteomics*. 2013 Oct;91:544–55.
26. Nogueira AVB, de Molon RS, Nokhbehsaim M, Deschner J, Cirelli JA. Contribution of biomechanical forces to inflammation-induced bone resorption. *J Clin Periodontol*. 2017 Jan;44(1):31–41.
27. Marcantonio CC, Nogueira AVB, Leguizamón NDP, de Molon RS, Lopes MES, Silva RCL, et al. Effects of obesity on periodontal tissue remodeling during orthodontic movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod its Const Soc Am Board Orthod*. 2021 Apr;159(4):480–90.
28. Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani J V, et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*. 2016 Feb;146:154–62.
29. Duarte PM, Gonçalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FHJ. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res*. 2006 Dec;41(6):541–6.
30. Salmon CR, Giorgetti APO, Paes Leme AF, Domingues RR, Sallum EA, Alves MC, et al. Global proteome profiling of dental cementum under experimentally-induced apposition. *J Proteomics*. 2016 Jun;141:12–23.
31. Foster BL, Ao M, Salmon CR, Chavez MB, Kolli TN, Tran AB, et al. Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization. *Bone*. 2018 Feb;107:196–207.
32. Svensson AM, Hellerström C, Jansson L. Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: a preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *J*

- Endocrinol. 1996 Dec;151(3):507–11.
33. Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):130–4.
 34. Aral CA, Kesim S, Greenwell H, Kara M, Çetin A, Yakan B. Alveolar bone protective and hypoglycemic effects of systemic propolis treatment in experimental periodontitis and diabetes mellitus. *J Med Food*. 2015 Feb;18(2):195–201.
 35. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol*. 2010 Apr;81(4):520–6.
 36. Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rösing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(2):218–21.
 37. Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, González J, Esquifino AI, et al. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J Periodontol*. 2018 Feb;89(2):176–85.
 38. Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec;104(51):20466–71.
 39. do Nascimento CM, Cassol T, da Silva FS, Bonfleur ML, Nassar CA, Nassar PO. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013;6:365–70.
 40. Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli JA, et al. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *J Periodontol*. 2016 Feb;87(2):e9-17.
 41. Zuza EP, Garcia VG, Theodoro LH, Ervolino E, Favero LFV, Longo M, et al. Influence of obesity on experimental periodontitis in rats: histopathological, histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig*. 2018 Apr;22(3):1197–208.
 42. Damanaki A, Memmert S, Nokhbehsaim M, Sanyal A, Gnad T, Pfeifer A, et al. Impact of obesity and aging on crestal alveolar bone height in mice. *Ann Anat* =

- Anat Anzeiger Off organ Anat Gesellschaft. 2018 Jul;218:227–35.
43. Speretta GFF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino AD de S, Andre RA, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012 Dec;67(12):1469–77.
 44. Guh DP, Zhang W, Bansback N, Amarsi Z, Birmingham CL, Anis AH. The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2009 Mar;9:88.
 45. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*. 2012 Jan;55(1):21–31.
 46. Nascimento GG, Leite FRM, Vestergaard P, Scheutz F, López R. Does diabetes increase the risk of periodontitis? A systematic review and meta-regression analysis of longitudinal prospective studies. *Acta Diabetol*. 2018 Jul;55(7):653–67.
 47. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJH, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008 Nov;79(11):2156–65.
 48. Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai J V, Taba MJ, Kostenuik PJ, et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*. 2007 Jul;78(7):1300–8.
 49. Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Kim YJ, Damião de Sousa-Neto M, Chan Cirelli C, Cirelli JA. Orthodontic force increases interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α expression and alveolar bone loss in periodontitis. *J Periodontol*. 2013 Sep;84(9):1319–26.
 50. Taut AD, Jin Q, Chung J-H, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai J V, et al. Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2013 Nov;28(11):2347–56.
 51. Hiyari S, Wong RL, Yaghseizian A, Naghibi A, Tetradis S, Camargo PM, et al. Ligature-induced peri-implantitis and periodontitis in mice. *J Clin Periodontol*. 2018 Jan;45(1):89–99.
 52. O’Boyle C, Haley MJ, Lemarchand E, Smith CJ, Allan SM, Konkel JE, et al. Ligature-induced periodontitis induces systemic inflammation but does not alter acute outcome after stroke in mice. *Int J stroke*. 2020 Feb;15(2):175–87.

53. de Molon RS, Park CH, Jin Q, Sugai J, Cirelli JA. Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. *Microsc Res Tech*. 2018 Dec;81(12):1412–21.
54. Fine N, Chadwick JW, Sun C, Parbhakar KK, Khoury N, Barbour A, et al. Periodontal Inflammation Primes the Systemic Innate Immune Response. *J Dent Res*. 2021 Mar;100(3):318–25.
55. Chen Y, Yang Q, Lv C, Chen Y, Zhao W, Li W, et al. NLRP3 regulates alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis by promoting osteoclastic differentiation. *Cell Prolif*. 2021 Feb;54(2):e12973.
56. de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Campos MJ, de Andrade CR, et al. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol*. 2014 Mar;85(3):465–77.
57. de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc*. 2012 May;71(2):332–8.
58. Sanz Y, Moya-Pérez A. Microbiota, inflammation and obesity. *Adv Exp Med Biol*. 2014;817:291–317.
59. Maciel SS, Feres M, Gonçalves TED, Zimmermann GS, da Silva HDP, Figueiredo LC, et al. Does obesity influence the subgingival microbiota composition in periodontal health and disease? *J Clin Periodontol*. 2016 Dec;43(12):1003–12.
60. Kitagawa M, Kudo Y, Iizuka S, Ogawa I, Abiko Y, Miyauchi M, et al. Effect of F-spondin on cementoblastic differentiation of human periodontal ligament cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct;349(3):1050–6.
61. Oka H, Mori M, Kihara H. F-spondin inhibits migration and differentiation of osteoclastic precursors. *J Periodontol*. 2011 Dec;82(12):1776–83.
62. Attur MG, Palmer GD, Al-Mussawir HE, Dave M, Teixeira CC, Rifkin DB, et al. F-spondin, a neuroregulatory protein, is up-regulated in osteoarthritis and regulates cartilage metabolism via TGF-beta activation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2009 Jan;23(1):79–89.
63. Palmer GD, Attur MG, Yang Q, Liu J, Moon P, Beier F, et al. F-spondin deficient mice have a high bone mass phenotype. *PLoS One*. 2014;9(5):e98388.
64. Orimoto A, Kurokawa M, Handa K, Ishikawa M, Nishida E, Aino M, et al. F-

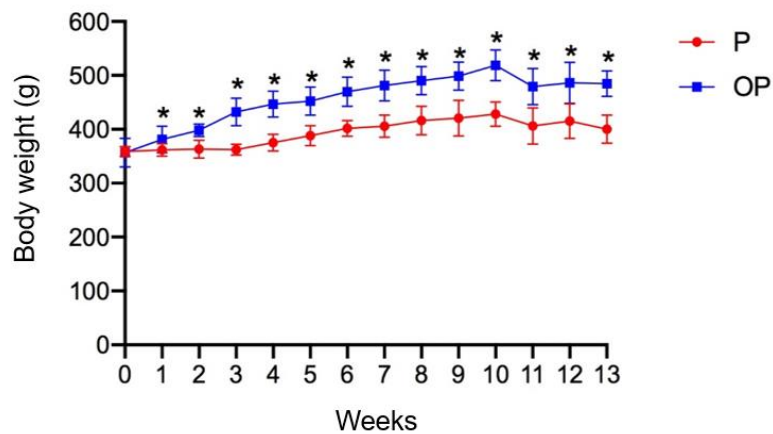
- spondin negatively regulates dental follicle differentiation through the inhibition of TGF- β activity. *Arch Oral Biol*. 2017 Jul;79:7–13.
65. Lång P, van Harmelen V, Rydén M, Kaaman M, Parini P, Carneheim C, et al. Monomeric tartrate resistant acid phosphatase induces insulin sensitive obesity. *PLoS One*. 2008 Mar;3(3):e1713.
 66. Cao JJ, Sun L, Gao H. Diet-induced obesity alters bone remodeling leading to decreased femoral trabecular bone mass in mice. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192:292–7.
 67. Lorincz C, Reimer RA, Boyd SK, Zernicke RF. High-fat, sucrose diet impairs geometrical and mechanical properties of cortical bone in mice. *Br J Nutr*. 2010 May;103(9):1302–8.
 68. Bays JL, DeMali KA. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci*. 2017 Aug;74(16):2999–3009.
 69. Barceló-Batllori S, Corominola H, Claret M, Canals I, Guinovart J, Gomis R. Target identification of the novel antiobesity agent tungstate in adipose tissue from obese rats. *Proteomics*. 2005 Dec;5(18):4927–35.
 70. Murri M, Insenser M, Bernal-Lopez MR, Perez-Martinez P, Escobar-Morreale HF, Tinahones FJ. Proteomic analysis of visceral adipose tissue in pre-obese patients with type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2013 Aug;376(1–2):99–106.
 71. Fukunaga T, Zou W, Warren JT, Teitelbaum SL. Vinculin regulates osteoclast function. *J Biol Chem*. 2014 May;289(19):13554–64.
 72. Rizal MI, Soeroso Y, Sulijaya B, Assiddiq BF, Bachtiar EW, Bachtiar BM. Proteomics approach for biomarkers and diagnosis of periodontitis: systematic review. *Heliyon*. 2020 Jun;6(6):e04022.
 73. Rangé H, Léger T, Huchon C, Ciangura C, Diallo D, Poitou C, et al. Salivary proteome modifications associated with periodontitis in obese patients. *J Clin Periodontol*. 2012 Sep;39(9):799–806.
 74. Recker EN, Brogden KA, Avila-Ortiz G, Fischer CL, Pagan-Rivera K, Dawson D V, et al. Novel biomarkers of periodontitis and/or obesity in saliva-An exploratory analysis. *Arch Oral Biol*. 2015 Oct;60(10):1503–9.

FIGURES

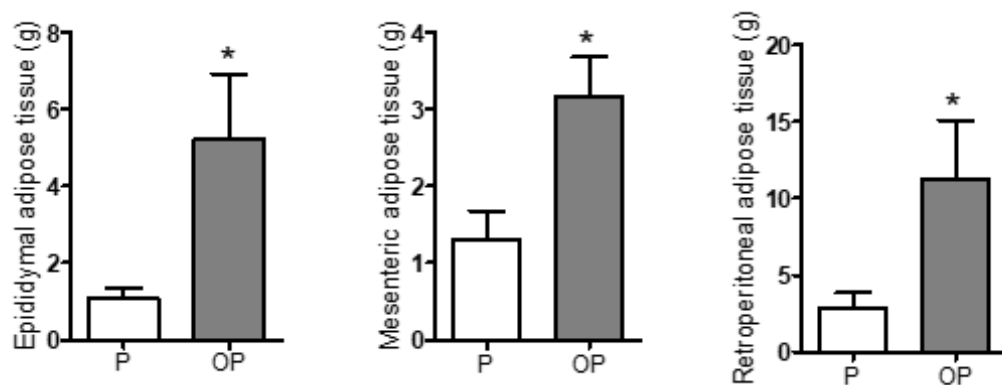
Figure 1.

A) Mean and SD of the animals' bodyweight of the in P and OP groups over the experiment. **B)** Epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissue weight of animals in P and OP groups are expressed as mean and SD. **C)** Mean and SD of lipid profile and fasting glycaemia of P and OP groups. *Significant difference between groups (t-test, $p \leq 0.05$).

A)



B)



c)

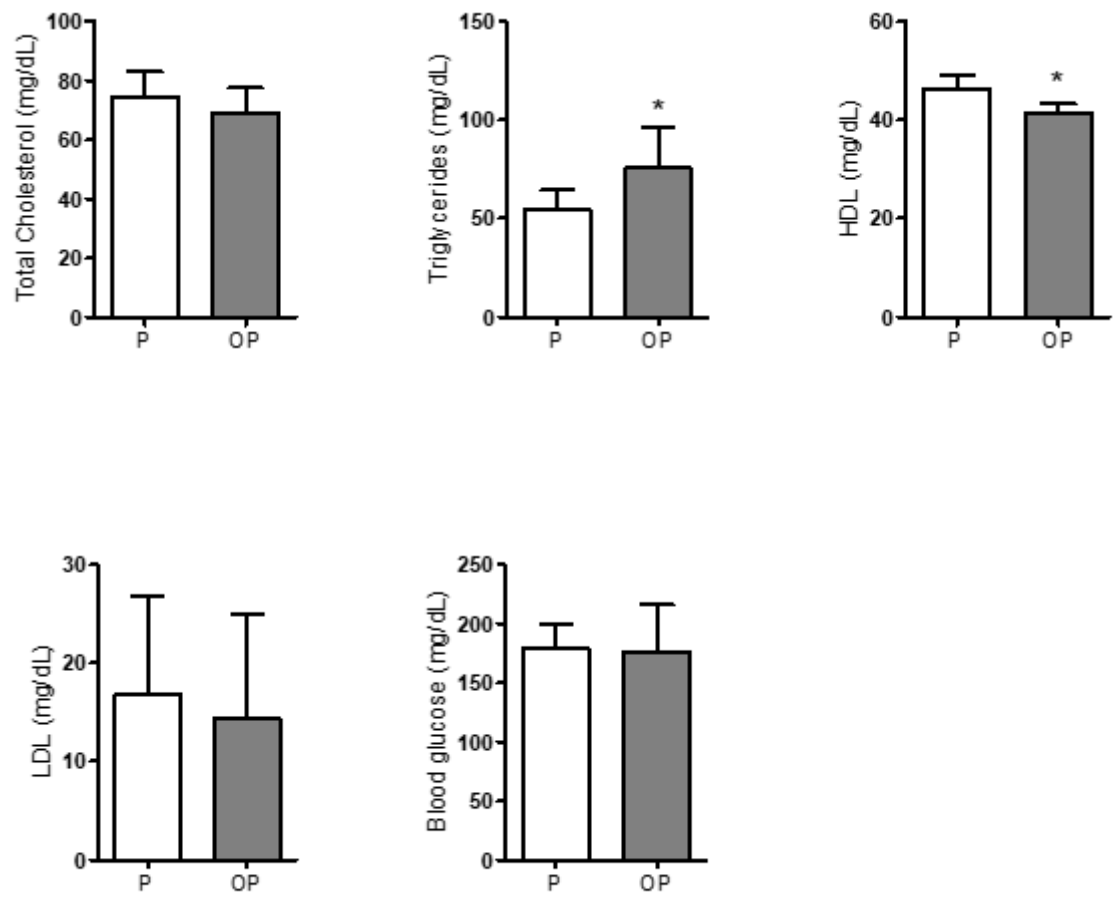
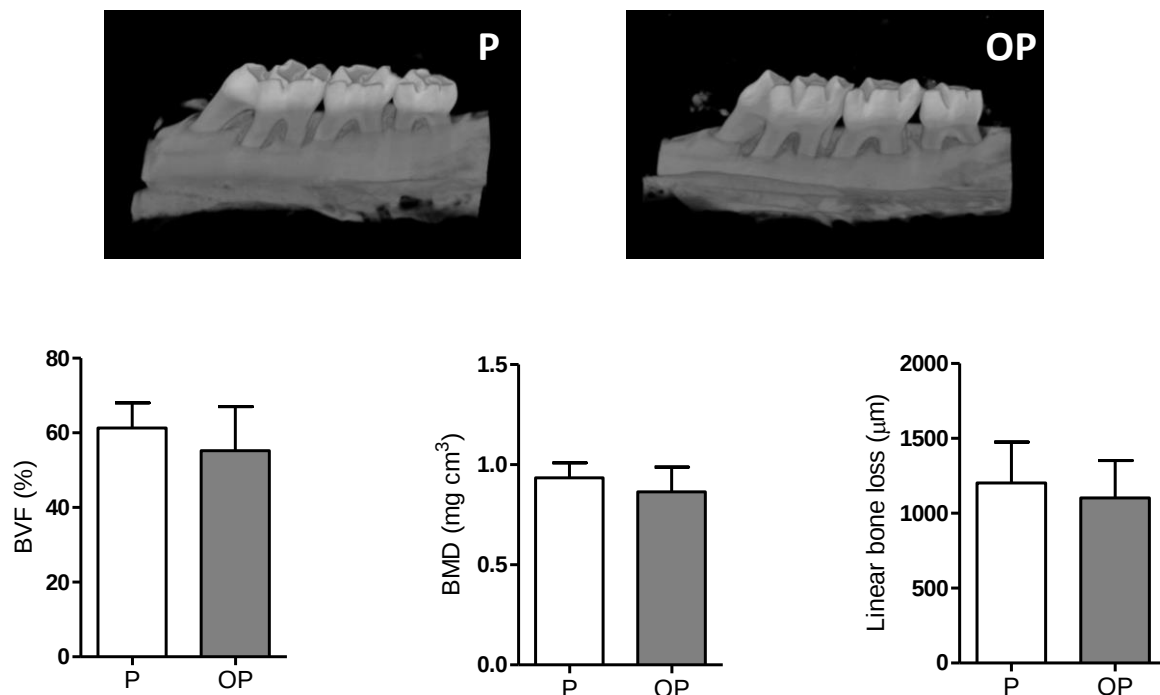
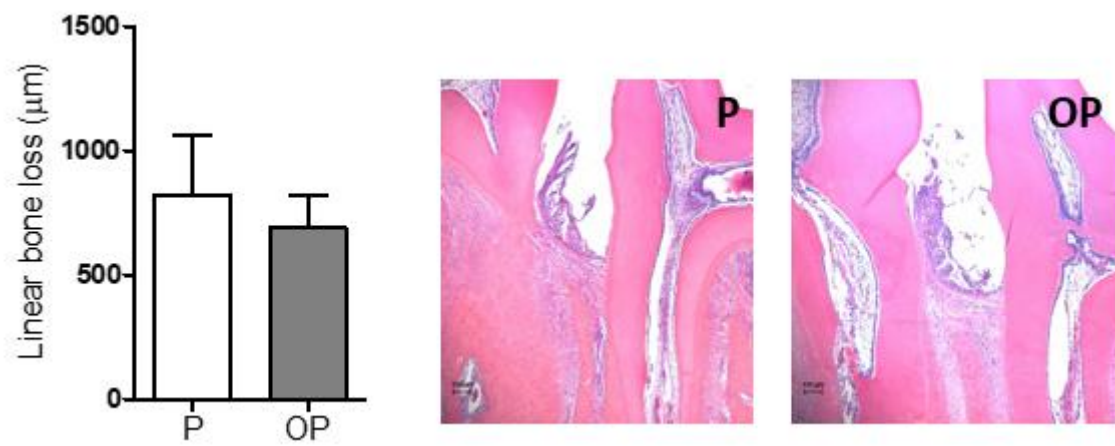


Figure 2.

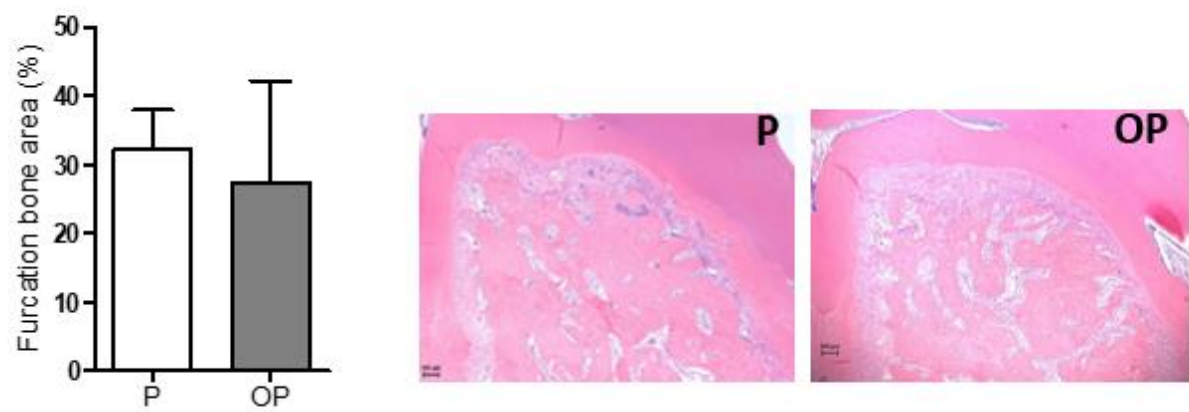
A) Representative images of three-dimensional sagittal micro-CT views of maxillary molars samples from each experimental group (P and OP). Micro-CT analyses of BVF percentage and BMD measured in a selected ROI, and linear bone loss in the maxillary first molars for each group. **B)** Mean and SD of linear bone loss measured by histomorphometric analysis. Representative photomicrographs (50x magnification) illustrating histological sections of the interproximal area between the 1st and 2nd molars of each group. **C)** Mean and SD of furcation bone area measured by histomorphometric analysis. Representative photomicrographs (50x magnification) illustrating histological sections in the furcation area of each group. **D)** Representative images used for the stereometric analysis: lower magnification (50x) image shows the selected region in the furcation area of the first maxillary molar and higher magnification (200x) image with the grid used for structures counting. Mean and SD percentage of fibroblasts, blood vessels, bone, collagen fibers, inflammatory cells and other structures. *Significant difference between groups (t-test, $p \leq 0.05$).

A)

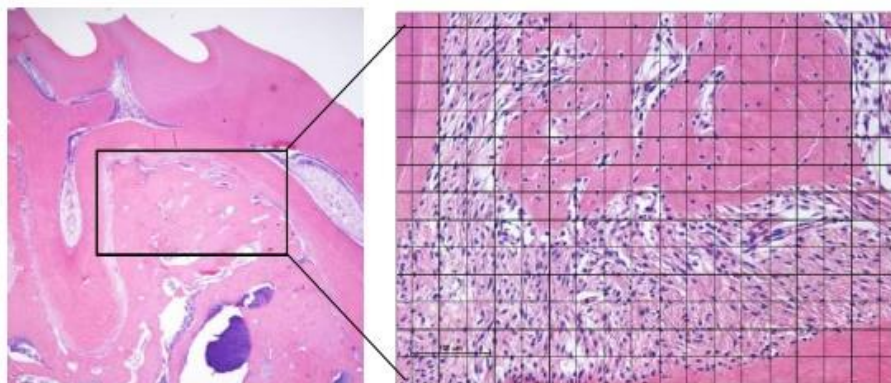
B)



C)



D)



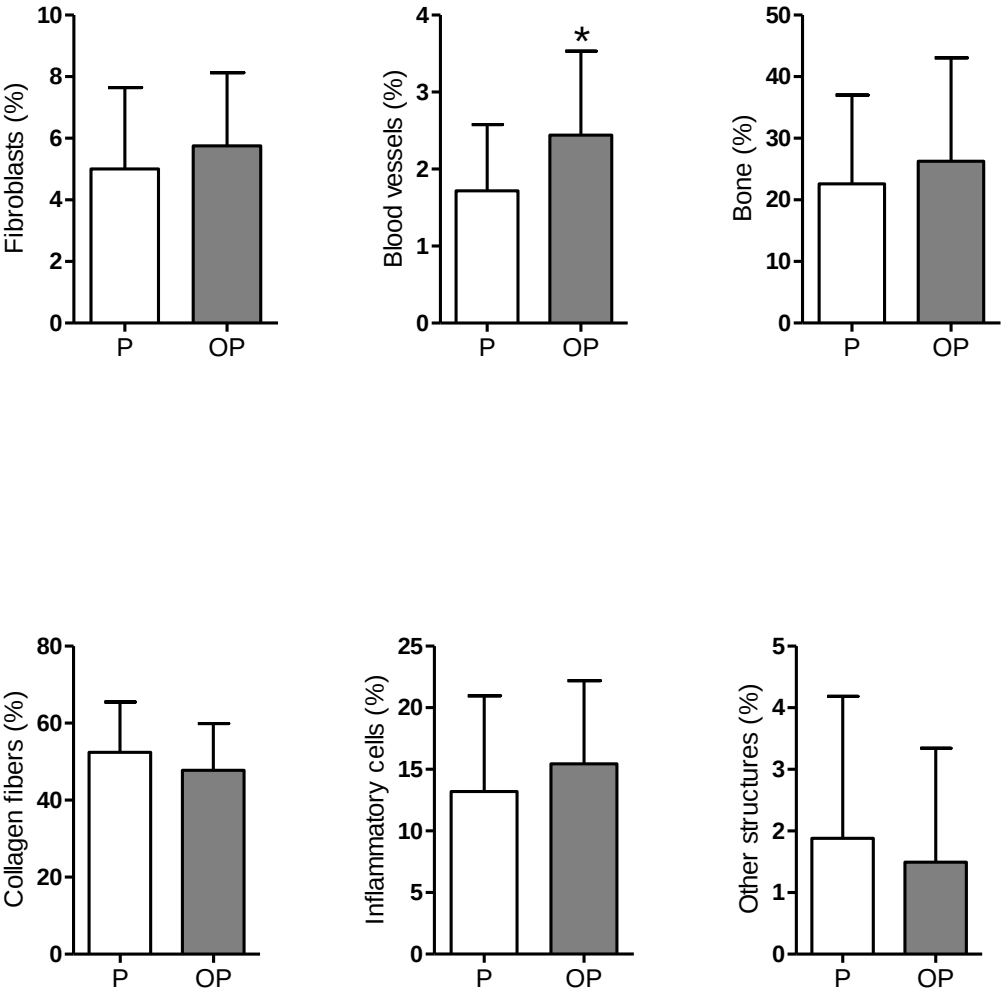
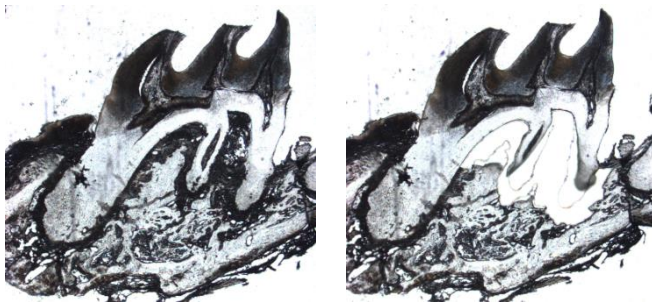
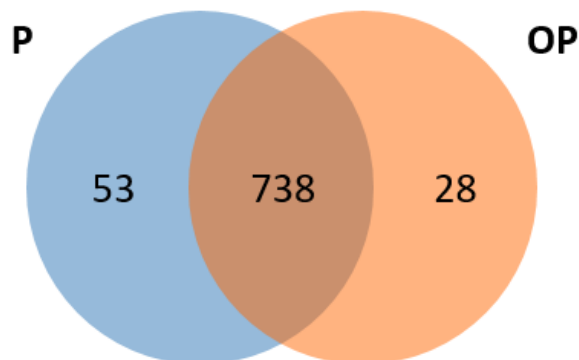
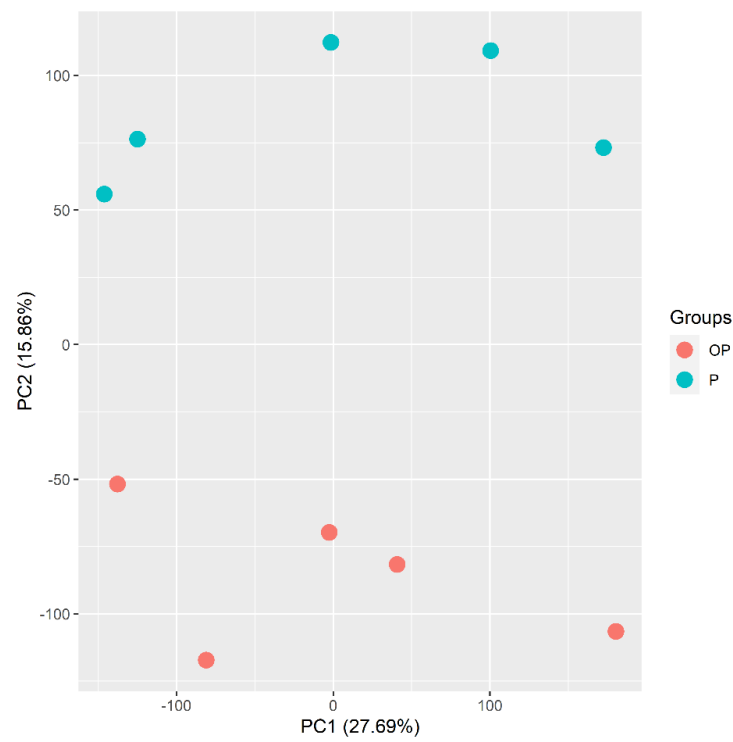


Figure 3.

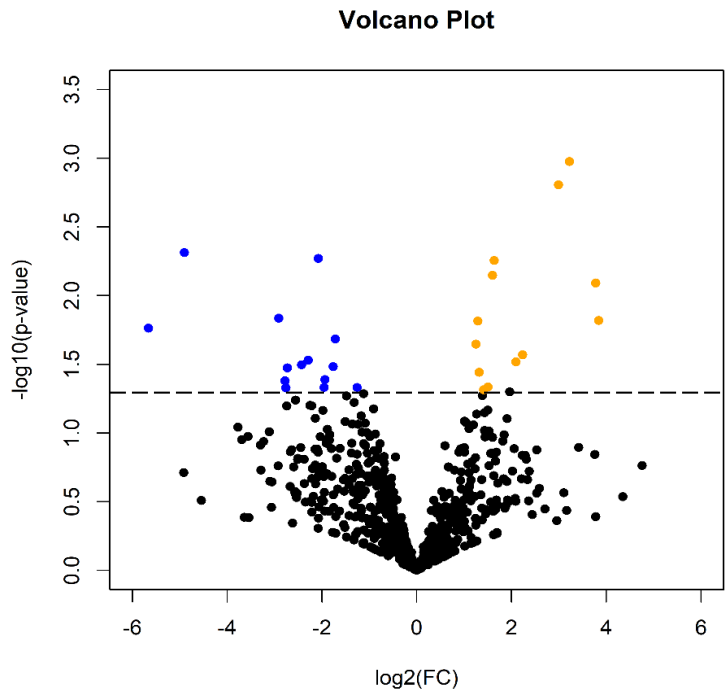
Laser Capture Microdissection (LCM) and proteomic profile of P and OP groups. **(A)** Representative histological section of rat maxillary jaw at 2x magnification before LCM and after the capture of the periodontal ligament from the first molar. **(B)** Venn diagram showing the distribution of the total proteins identified in both groups. **(C)** Principal Component Analysis (PCA) presenting the distribution of all samples based on normalized MS/MS peak area detection values from P (n=5) and OP (n=5). **(D)** Volcano plot showing the abundant proteins determined by t-test ($p \leq 0.05$). Blue and orange dots represent differentially abundant proteins in the P and OP groups, respectively. **(E)** Heatmap graphic exhibiting the expression of 35 differentially abundant proteins in each sample, grouped into two different clusters. Line graphs in **(F)** and **(G)** presenting the means and standard deviations of the z-scores of the MS/MS peak area calculation detection values for each cluster.

A)**B)**

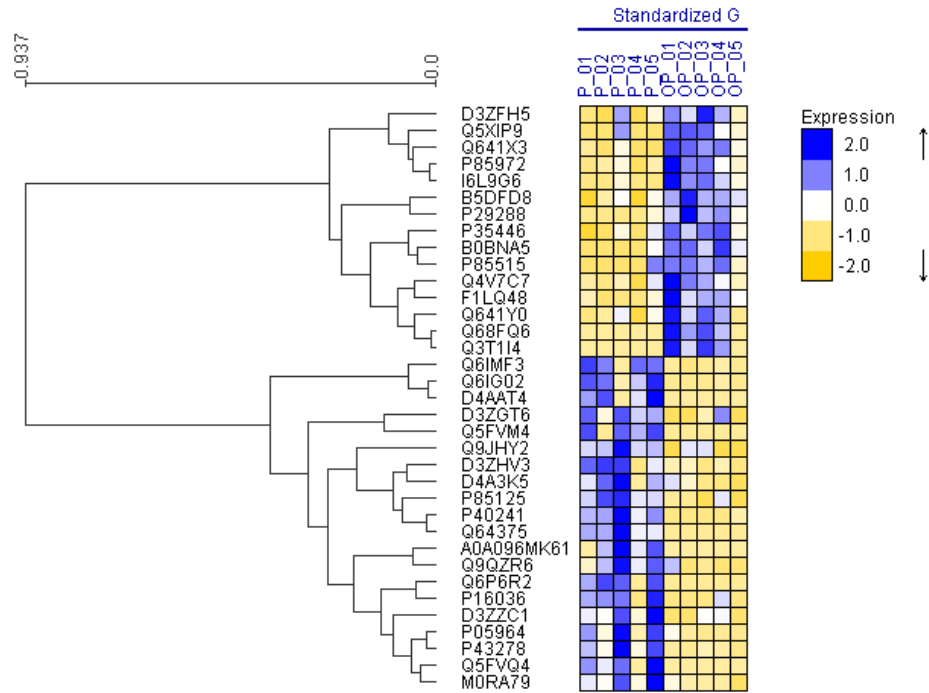
C)



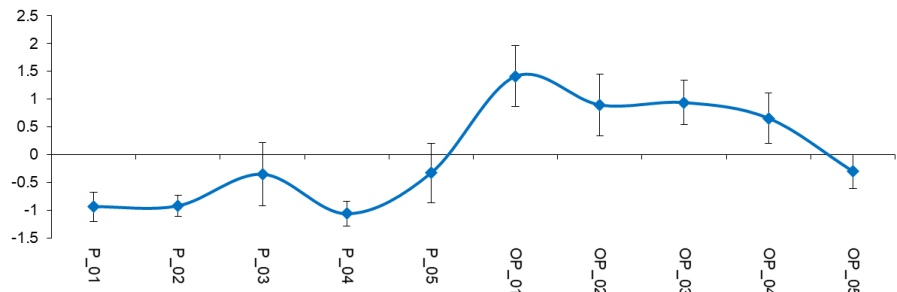
D)



E)



F)



G)

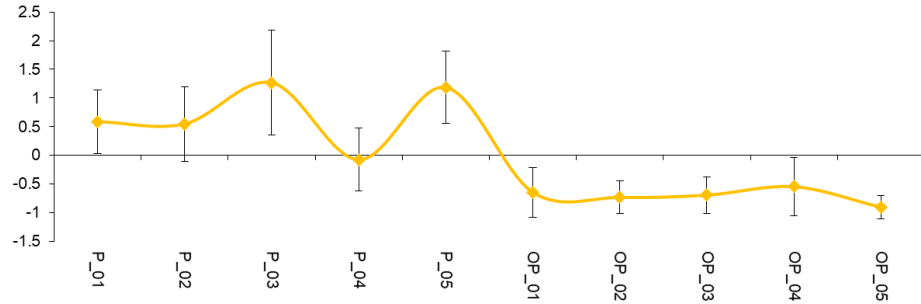


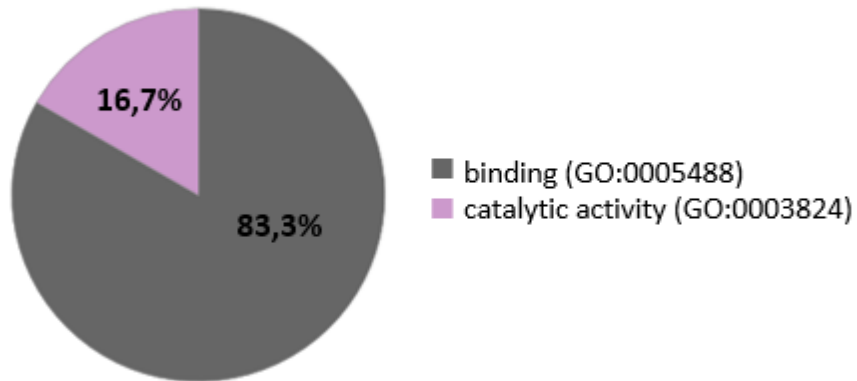
Figure 4.

Analysis of the differentially expressed proteins in the OP group. List of proteins differentially expressed, p-value and Fold-change are presented in Table 1. Pie charts showing GO-Slim: Molecular Function, Biological Process and Cellular Component of differentially expressed proteins, as a percentage of gene hit against the total number of hits, using the Panther Functional Classification System.

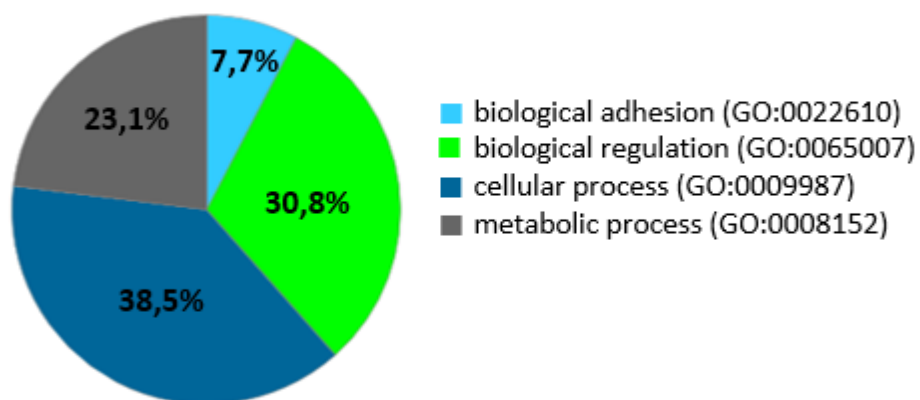
Table 1. List of differentially expressed proteins in the OP group compared to the P group.

Protein ID	Description	p-value (t-test)	Fold-change (OP/P)
B0BNA5	Coactosin-like protein	0.001	9,34
B5DFD8	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein	0.005	3,10
D3ZFH5	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	0.046	2,83
F1LQ48	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	0.015	2,44
I6L9G6	RCG31562, isoform CRA_c	0.008	13,72
P29288	Tartrate-resistant acid phosphatase type 5	0.015	14,31
P35446	Spondin-1	0.007	3,03
P85515	Alpha-centractin	0.030	4,26
P85972	Vinculin	0.022	2,37
Q4V7C7	Actin-related protein 3	0.036	2,49
Q5XIP9	Transmembrane protein 43	0.027	4,71
Q641X3	Beta-hexosaminidase subunit alpha	0.001	7,96
Q641Y0	Dolichyl-diphosphooligosaccharide	0.048	2,66

A) Panther GO-Slim Molecular Function



B) Panther GO-Slim Biological Process



C) Panther GO-Slim Cellular Component

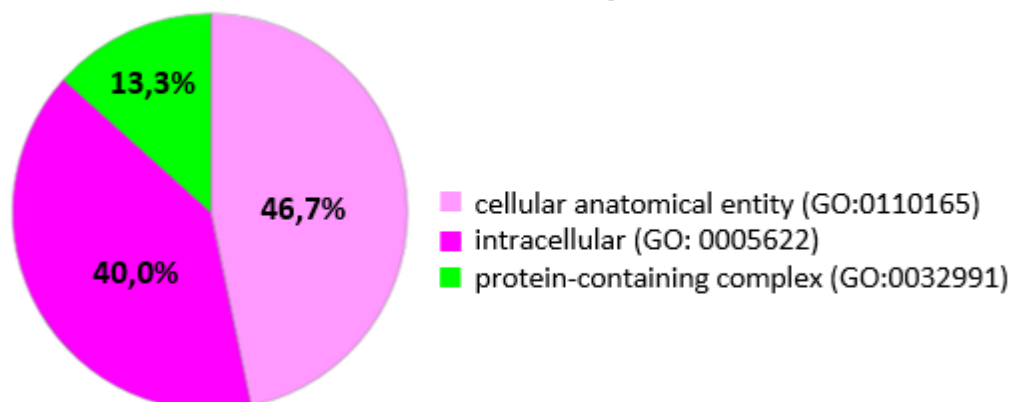


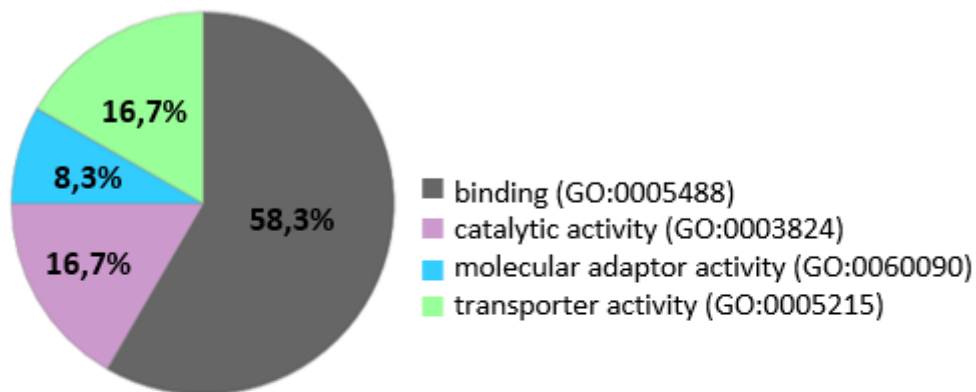
Figure 5.

Analysis of the differentially expressed proteins in the P group. List of proteins differentially expressed, p-value and Fold-change are presented in Table 2. Pie charts showing GO-Slim: Molecular Function, Biological Process and Cellular Component of differentially expressed proteins, as a percentage of gene hit against the total number of hits, using the Panther Functional Classification System.

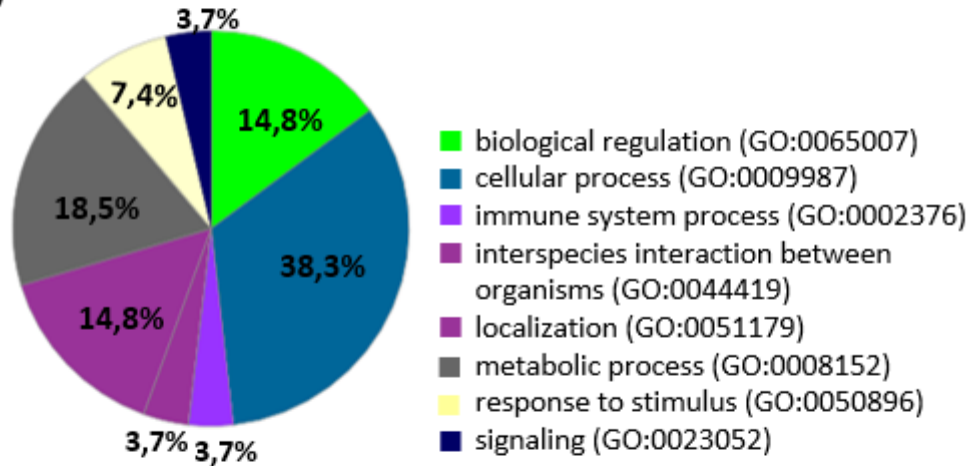
Table 2. List of differentially expressed proteins in the P group compared to the OP group.

Protein ID	Description	p-value (t-test)	Fold-change (P/OP)
D3ZGT6	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	0.032	3,38
D3ZHV3	Metallothionein	0.041	6,87
D3ZZC1	RCG43947	0.046	3,86
D4A3K5	Histone H1.1	0.046	2,39
M0RA79	Ig-like domain-containing protein	0.040	3,81
P05964	Protein S100-A6	0.047	6,77
P16036	Phosphate carrier protein, mitochondrial	0.033	6,63
P40241	CD9 antigen	0.004	29,89
P43278	Histone H1.0	0.031	5,38
P85125	Caveolae-associated protein 1	0.005	4,21
Q6IG02	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	0.017	50,61
Q6IMF3	Keratin, type II cytoskeletal 1	0.014	7,52
Q9JHY2	Sideroflexin-3	0.020	3,28
Q9QZR6	Septin-9	0.029	4,89

A) Panther GO-Slim Molecular Function



B) Panther GO-Slim Biological Process



C) Panther GO-Slim Cellular Component

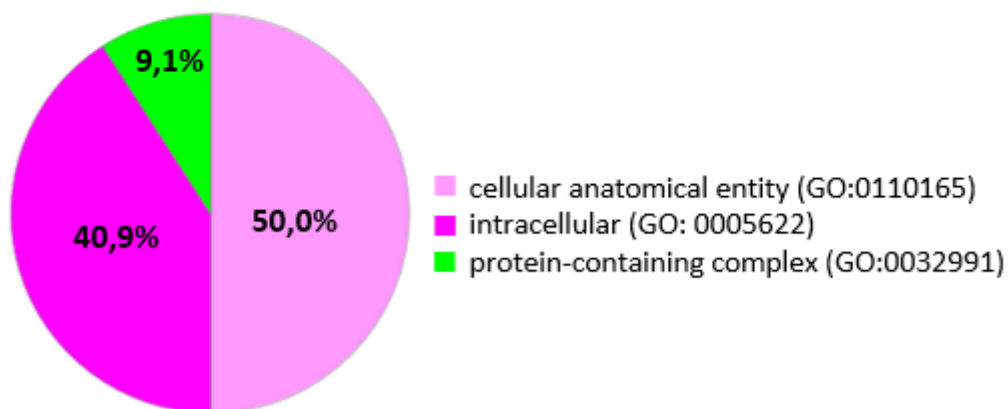
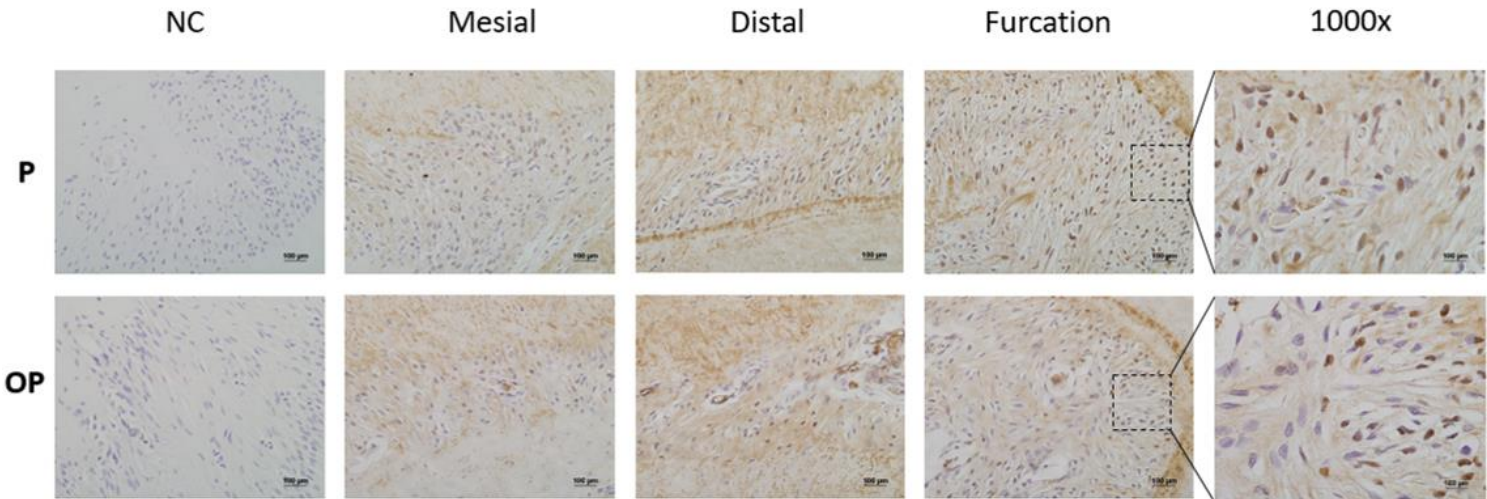
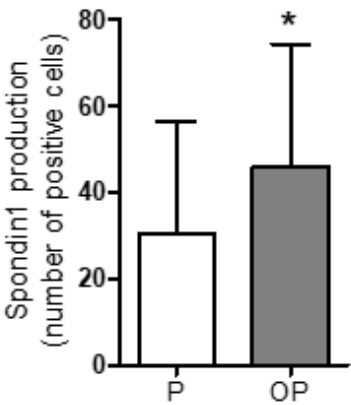


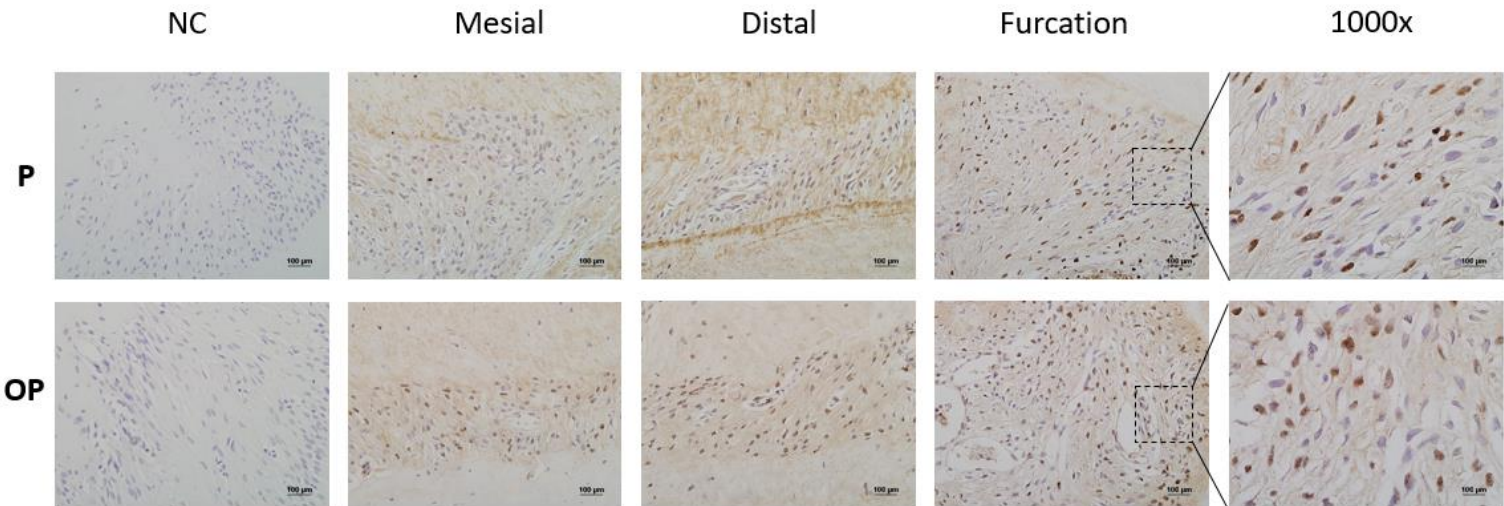
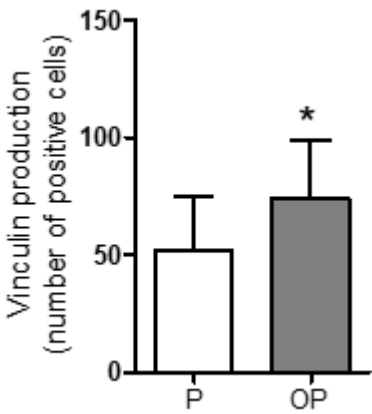
Figure 6.

Validation of selected proteins identified by the proteomic analysis through immunohistochemistry and TRAP staining analyses. Graphs of mean and SD showing the number of positive cells for Spondin1 **(A)** and Vinculin **(B)** IHC staining, and TRAP staining **(C)** ($p \leq 0.05$). Representative images (400x magnification) of negative control, furcation area, mesial and distal proximal periodontal tissues of the first molars in tissue sections from the P and OP groups.

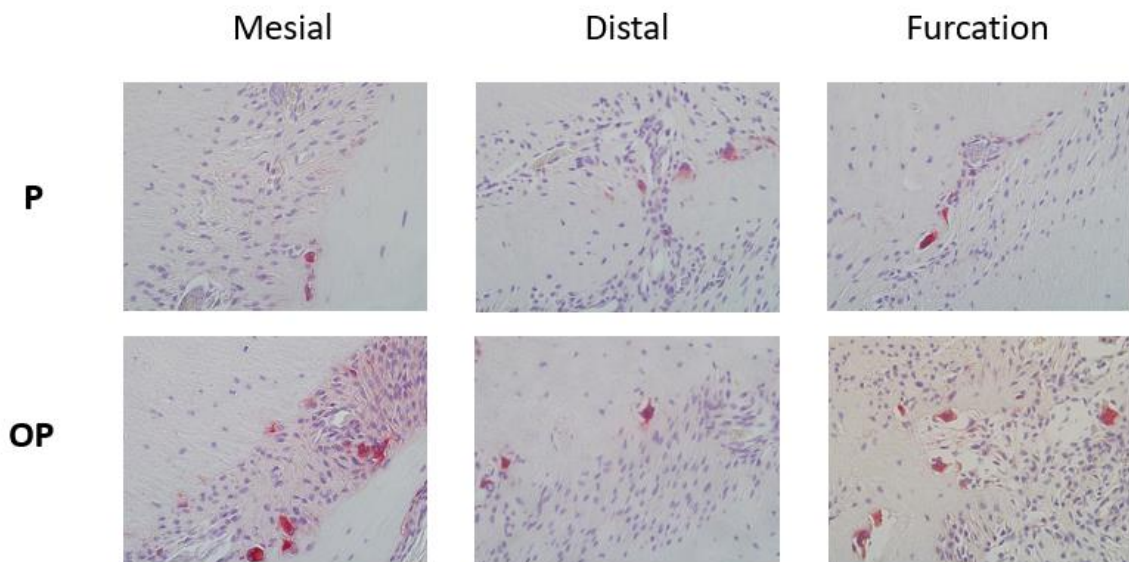
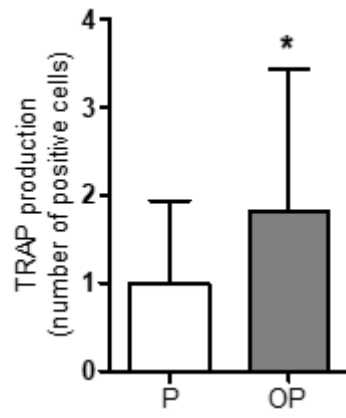
A)



B)



C)



Supplementary Material

Table S1: List of exclusive proteins identified in the OP group.

Protein ID	Description
A0A0G2JUD2	Inorganic pyrophosphatase 1
A0A0G2JX36	Ig-like domain-containing protein
A0A0G2K7F0	FA complementation group M
B2RZ08	RGD1563325 protein
B2RZ77	Dermatopontin
D3ZQX3	Mitochondrial ribosomal protein S12
D3ZSE6	Gasdermin domain-containing protein
D3ZW78	F5/8 type C domain-containing protein
G3V735	Angiotensin-like protein 2
P01015	Angiotensinogen
P04762	Catalase
P08461	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
P15178	Aspartate--tRNA ligase, cytoplasmic
P45479	Palmitoyl-protein thioesterase 1
P62198	26S proteasome regulatory subunit 8
Q01205	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex,
Q3T1I4	Protein PRRC1
Q4G061	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B
Q4KM38	RRM domain-containing protein
Q4V797	IRG-type G domain-containing protein
Q63270	Cytoplasmic aconitate hydratase
Q63357	Unconventional myosin-IId
Q63797	Proteasome activator complex subunit 1
Q64724	IGv domain-containing protein
Q68FQ6	IF rod domain-containing protein
Q6AY23	Pyrroline-5-carboxylate reductase 2
Q6P7C7	Transmembrane glycoprotein NMB
Q8CG08	Collagen triple helix repeat-containing protein 1

Table S2: List of exclusive proteins identified in the P group.

Protein ID	Description
A0A096MK61	Cartilage-associated protein-like 1
A0A0G2JW60	Utrophin
A0A0G2K6I4	WH1 domain-containing protein
B2GV06	Succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial
B4F7A5	CD99 molecule (Xg blood group)
B5DFD2	Ttll13 protein
D3ZEP5	Ig-like domain-containing protein
D3ZHG3	Protein tyrosine kinase 7
D3ZK86	Uncharacterized protein
D3ZM69	FERM domain-containing protein
D3ZMY8	PACT_coil_coil domain-containing protein
D3ZY51	Plakophilin 1
D4A5F0	Family with sequence similarity 114, member A1-like 1
D4AAR7	Coiled-coil domain-containing 136
D4AAT4	Sm domain-containing protein
D4AAZ6	60S ribosomal protein L37a
F1LMV6	SH3 domain-containing protein
F1LYI5	60S ribosomal protein L29
F1M9V7	Aminopeptidase
F1MAH6	Cadherin 11
F7F1J0	Lipocln_cytosolic_FA-bd_dom domain-containing protein
G3V6S7	IL6Ra-bind domain-containing protein
G3V816	Nucleoside diphosphate kinase
M0RBK4	Ig-like domain-containing protein
O35179	Endophilin-A1
P02764	Alpha-1-acid glycoprotein

P08934	Kininogen-1
P13086	Succinate--CoA ligase [ADP/GDP-forming] subunit alpha, mitochondrial
P15800	Laminin subunit beta-2
P17220	Proteasome subunit alpha type-2
P17764	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial
P21575	Dynamin-1
P22509	rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarin
P23562	Band 3 anion transport protein
P43138	DNA-(apurinic or apyrimidinic site) lyase
P43244	Matrin-3
P47967	Galectin-5
P49432	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta, mitochondrial
P97536	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
P97586	Cell growth regulator with EF hand domain protein 1
Q4KLL4	Transmembrane 9 superfamily member 4
Q5FVM4	Non-POU domain-containing octamer-binding protein
Q5FVQ4	Malectin
Q60587	Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial
Q64057	Alpha-amino adipic semialdehyde dehydrogenase
Q64375	Endoplasmic reticulum protein SC65
Q6AXQ0	SUMO-activating enzyme subunit 1
Q6JE36	Protein NDRG1
Q6MG60	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2
Q6P6R2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial
Q99NA5	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial
Q9ES21	Phosphatidylinositol phosphatase SAC1
Q9WU82	Catenin beta-1

4 CONCLUSÃO

Através das análises de massa corporal, peso dos tecidos adiposos e análise sorológica, podemos concluir que o método de indução de obesidade através de uma dieta rica em gordura é eficaz, promovendo alterações teciduais e no perfil lipídico dos animais que receberam essa dieta.

Nos parâmetros de destruição tecidual, analisados por microtomografia computadorizada e análise histométrica, não observamos um efeito negativo da obesidade na progressão da doença periodontal experimental, caracterizado pela perda óssea alveolar, através do modelo de indução utilizado.

Na análise de inflamação tecidual, realizada por análise estereométrica, foi observada uma maior quantidade de vasos sanguíneos no grupo com indução de obesidade, sugerindo uma maior inflamação na área analisada.

A análise proteômica permitiu uma identificação das diferenças no perfil proteico do ligamento periodontal em condição de doença associada à obesidade. Os resultados fornecem dados importantes para futuros estudos visando um melhor entendimento da progressão da doença periodontal em indivíduos sistemicamente saudáveis ou com obesidade. No presente trabalho, as proteínas pró-inflamatórias Spondina-1, Vinculina e a enzima TRAP apresentaram produção aumentada no ligamento periodontal de animais obesos com doença periodontal, sugerindo um aumento do risco de destruição periodontal e progressão da doença na presença da obesidade, embora esse potencial agravamento não tenha se confirmado nas condições clínicas estudadas.

REFERÊNCIAS*

1. Virto L, Cano P, Jiménez-Ortega V, Fernández-Mateos P, González J, Esquifino AI, et al. Obesity and periodontitis: an experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J Periodontol*. 2018;89(2):176–85.
2. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11 Suppl 1):S64-73.
3. WHO. World Health Organization. [Internet]. Obesity and overweight. {Acesso em 20/05/21}. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
4. Adamczak M, Wiecek A. The adipose tissue as an endocrine organ. *Semin Nephrol*. 2013;33(1):2–13.
5. Kawai T, Autieri M V., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2021;320(3):C375–91.
6. Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, et al. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors*. 2011;37(6):413–20.
7. 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.
8. Suresh S, Mahendra J, Singh G, Pradeep Kumar AR, Thilagar S, Rao N. Effect of nonsurgical periodontal therapy on plasma-reactive oxygen metabolite and gingival crevicular fluid resistin and serum resistin levels in obese and normal weight individuals with chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2018;22(4):310–6.

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

9. Nogueira AVB, Nokhbehsaim M, Tekin S, de Molon RS, Spolidorio LC, Memmert S, et al. Resistin is increased in periodontal cells and tissues: in vitro and in vivo studies. *Mediators Inflamm.* 2020;2020:9817095.
10. Pradeep AR, Raghavendra NM, Prasad MVR, 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.
11. 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.
12. 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.
13. Nogueira AVB, Nokhbehsaim 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine.* 2017;98:51–8.
18. Taşkesen D, Kirel B, Us T. Serum visfatin levels, adiposity and glucose metabolism in obese adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2012;4(2):76–81.

19. Chang Y-H, Chang D-M, Lin K-C, Shin S-J, Lee Y-J. 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.
20. Zhang LQ, Heruth DP, Ye SQ. Nicotinamide phosphoribosyltransferase in human diseases. *J Bioanal Biomed.* 2011;3:13–25.
21. Suvan JE, Finer N, D'Aiuto F. Periodontal complications with obesity. *Periodontol 2000.* 2018;78(1):98–128.
22. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol.* 2005;76(11 Suppl):2075–84.
23. Jagannathachary S, Kamaraj D. Obesity and periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14(2):96–100.
24. Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med.* 1990;322(6):373–82.
25. 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.
26. Saito T, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *New England J Med.* 1998; 339: 482–3.
27. Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand.* 2008;66(3):130–4.
28. Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, et al. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol.* 2010;81(4):520–6.
29. Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rösing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci.* 2012;20(2):218–21.

30. Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli JA, et al. Obesity and hyperlipidemia modulate alveolar bone loss in wistar rats. *J Periodontol*. 2016;87(2):e9-17.
31. Zuza EP, Garcia VG, Theodoro LH, Ervolino E, Favero LFV, Longo M, et al. Influence of obesity on experimental periodontitis in rats: histopathological, histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig*. 2018;22(3):1197–208.
32. do Nascimento CM, Cassol T, da Silva FS, Bonfleur ML, Nassar CA, Nassar PO. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligature-induced periodontal disease. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013;6:365–70.
33. Damanaki A, Memmert S, Nokhbehsaim M, Sanyal A, Gnad T, Pfeifer A, et al. Impact of obesity and aging on crestal alveolar bone height in mice. *Ann Anat = Anat Anzeiger*. 2018;218:227–35.
34. Marcantonio CC, Nogueira AVB, Leguizamón NDP, de Molon RS, Lopes MES, Silva RCL, et al. Effects of obesity on periodontal tissue remodeling during orthodontic movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2021;159(4):480–90.
35. Martinez-Herrera M, Silvestre-Rangil J, Silvestre F-J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(6):e708–15.
36. Trindade F, Oppenheim FG, Helmerhorst EJ, Amado F, Gomes PS, Vitorino R. Uncovering the molecular networks in periodontitis. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(9–10):748–61.
37. Guzman YA, Sakellari D, Arsenakis M, Floudas CA. Proteomics for the discovery of biomarkers and diagnosis of periodontitis: a critical review. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(1):31–41.
38. Rizal MI, Soeroso Y, Sulijaya B, Assiddiq BF, Bachtiar EW, Bachtiar BM. Proteomics approach for biomarkers and diagnosis of periodontitis: systematic review. *Heliyon*. 2020;6(6):e04022.

39. Bao K, Bostanci N, Selevsek N, Thurnheer T, Belibasakis GN. Quantitative proteomics reveal distinct protein regulations caused by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* within subgingival biofilms. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119222.
40. Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):39–63.
41. Mlecnik B, Galon J, Bindea G. Comprehensive functional analysis of large lists of genes and proteins. *J Proteomics*. 2018;171:2–10.

APÊNDICE A

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

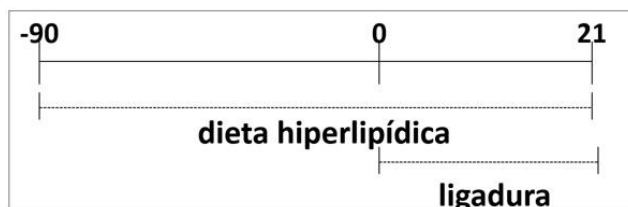
Foram utilizados 16 ratos Holtzman machos (aprovação da comissão de ética - CEUA nº16/2015, ANEXO A), com peso médio de 300g, mantidos no biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, seguindo normas locais. Os animais foram distribuídos em 2 grupos experimentais:

- 1- Grupo P (n=8): os animais foram submetidos à indução de doença periodontal experimental;
- 2- Grupo OP (n=8): os animais foram submetidos à indução de obesidade e doença periodontal experimental.

Indução de obesidade

Os animais do grupo OP receberam uma dieta hiperlipídica (3,82 kcal/g) para a indução de obesidade. A dieta hiperlipídica consistiu de uma ração especial preparada manualmente, composta por ração padrão para roedores, amendoim, chocolate ao leite e bolacha maisena numa proporção de 3:2:2:1 como descrito anteriormente¹. Essa ração contém 13g de proteínas, 40g de carboidratos, 19g de lipídios, 4g de fibras e 73mg de sódio por 100g de ração. O valor calórico da dieta hiperlipídica é de aproximadamente 3,82 kcal/g. A ração preparada foi repostada diariamente. A indução da obesidade ocorreu 90 dias antes do momento zero (período de início da indução de doença periodontal) conforme timeline apresentado na Figura A1.

Figura A1 – Descrição do modelo experimental.



Fonte: Elaboração própria.

Indução de doença periodontal experimental

Foi utilizado o modelo de indução de doença periodontal por ligadura. Inicialmente os animais foram submetidos à anestesia geral (0,08 mL de 10% ketamina e 0,04 mL de 2% cloridrato de xilasina por 100g de peso corporal) intramuscular na pata posterior e foram posicionados em mesa operatória. O modelo de ligadura foi obtido com a colocação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares superiores, bilateralmente (Figura A2). Após 21 dias, os animais foram sacrificados por overdose anestésica.

Figura A2 – Ligadura de fio de algodão ao redor dos primeiros molares superiores, bilateralmente.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Massa corporal

A massa corporal (em gramas) dos animais foi registrada semanalmente com o auxílio de uma balança de pesagem apropriada.

Tecidos adiposos

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

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 foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da UNESP, onde foi realizada 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 glicemia em jejum.

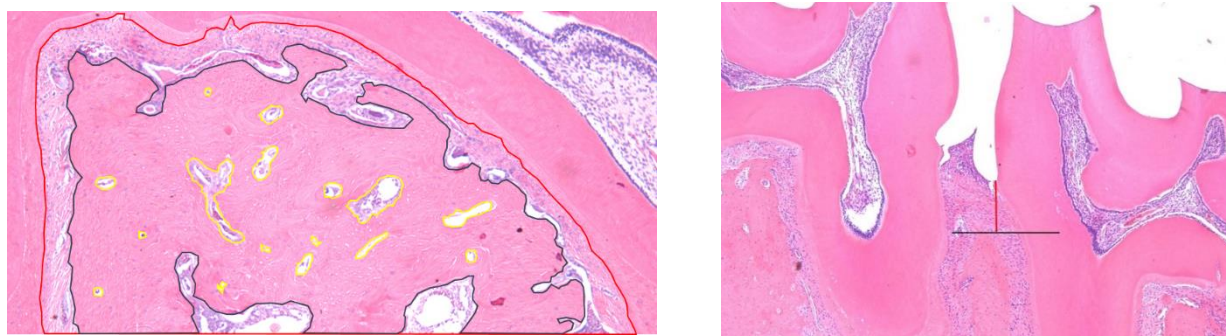
Análise histológica

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 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 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*).

Histometria

A análise histométrica foi realizada com o auxílio do software de imagem *Image J* versão 1.37b. (*National Institutes of Health, USA*, <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs>). Um total de 2 cortes foi avaliado por dente, representativos da região vestibular e central da área de furca. A área analisada compreendeu o espaço inter-radicular delimitado pelas raízes mesial e distal dos primeiros molares, até uma distância apical de 1000 µm abaixo do teto da furca² (Figura A3). A área total da região inter-radicular e a área com tecido ósseo presente foram medidas, e a subtração desses valores determinou a perda óssea alveolar, posteriormente transformada em porcentagem da área total. Para mensuração da perda óssea linear, traçou-se uma linha reta da crista óssea do processo alveolar à junção cimento-esmalte, na face distal do 1º molar.

Figura A3 – Imagens demonstrando a mensuração da área total e da área óssea na região de furca (à esquerda) e da perda óssea na região interproximal na distal do 1º molar (à direita).

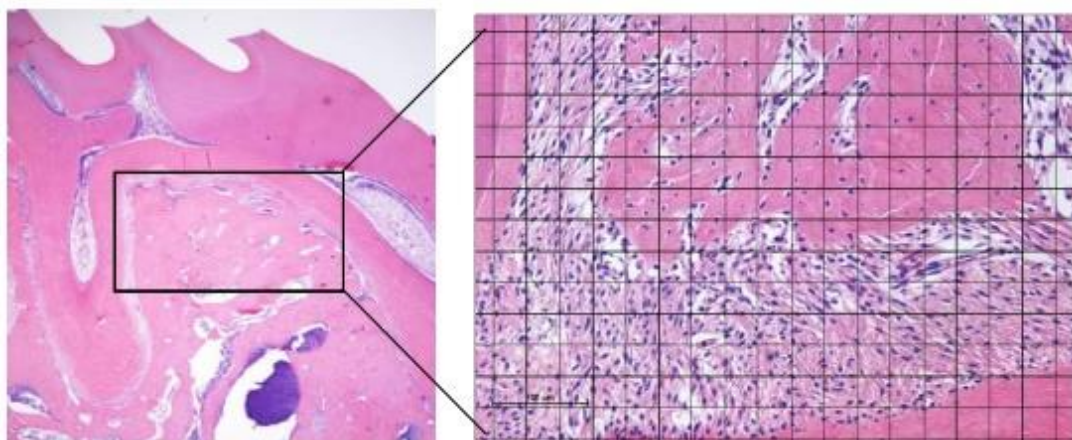


Fonte: Elaboração própria.

Estereometria

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 representativos da região vestibular e central da área de furca, foi avaliado por dente. 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 às imagens digitalizadas dos cortes de H/E, na região de furca dos primeiros molares superiores, para avaliação da proporção dos componentes teciduais coincidentes com os pontos de intersecção, em um plano bidimensional por microscopia (Figura A4). Este procedimento permite a avaliação quantitativa do quadro inflamatório no ligamento periodontal. Desta forma, foi determinada a densidade volumétrica relativa (ou proporção) dos seguintes componentes teciduais: fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos, fibras colágenas, tecido ósseo e outras estruturas. Após a análise, foi calculado o percentual de cada componente tecidual em relação número total de pontos contados por período experimental, para a representação gráfica da estereometria³.

Figura A4 – Imagem representativa da área de furca do primeiro molar superior, analisada com a grade em posição para contagem de células e de estruturas celulares.



Fonte: Elaboração própria.

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, Aartselaar, 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 μ m. As imagens foram reconstruídas com o auxílio de um software específico (NRecon 1.6.1.5 - Skyscan, 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 - Skyscan, Kontich, Bélgica). 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 molar à crista alveolar, com a exclusão das raízes e do espaço periodontal, compreendendo assim apenas o osso alveolar ao redor do primeiro molar. Isto foi realizado com uma ferramenta específica (*custom processing*) do *software* CTan (CT Analyser 1.10.1.0 - Skyscan, Kontich, Bélgica). Além disso, a densidade de osso alveolar foi medida (Figura A5).

Figura A5 A–D - Mensuração das microtomografias com os softwares: *Data Viewer*, *CTAn*.

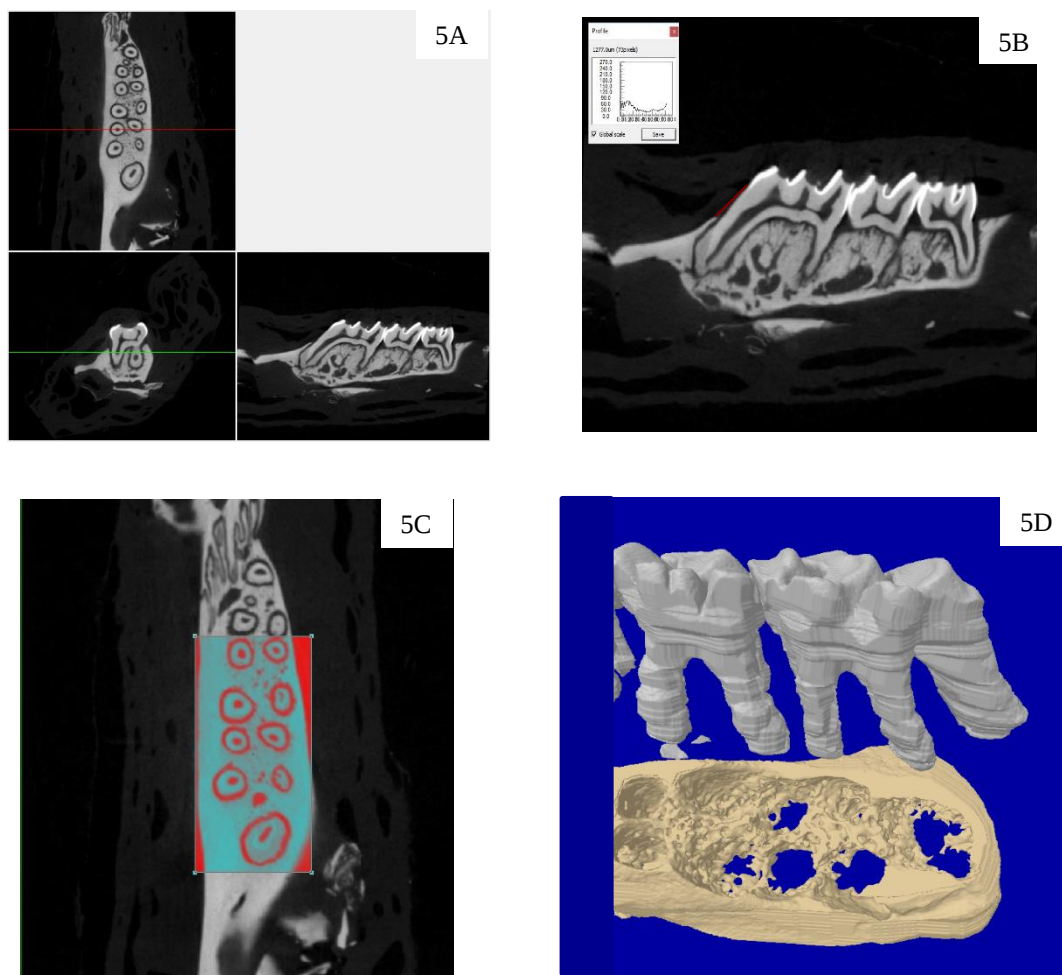


Figura A5A- Orientação dos cortes. **Figura A5B-** Distância linear da JCE-COA. **Figura A5C-** Delimitação da região de interesse (ROI). **Figura A5D-** Separação do osso alveolar das raízes e do espaço periodontal.

Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Análise Proteômica

Preparo das amostras:

Hemimaxilas (n=5/grupo) de animais dos grupos P e OP foram colocadas em cassetes plásticos, imersas e mantidas no fixador formol tamponado a 10% Protocol (Fisher Diagnostics, Midletown, VA, EUA) por 24 horas a 4°C. Após esse período, as amostras passaram por três lavagens em solução de tampão fosfato (PBS) 1X (pH 7.4, Applied Biosystem) por 30 minutos cada a 4°C e foram descalcificadas em solução de ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA, Merck/Millipore) a 20% em tampão fosfato a 0,01M, pH 7.4 e mantidas a 4°C com três trocas diárias da solução por um período de 30 dias. As hemimaxilas foram reduzidas mantendo-se a região dos molares, lavadas em PBS por 3 vezes a 4°C, desidratadas em 3 trocas de etanol absoluto por 30 minutos a 4°C, incubadas em 2 trocas de xilol por 20 minutos em temperatura ambiente, infiltradas em parafina por 4 horas e incluídas em parafina Paraplast (McCormick Scientific) a 56°C. Os blocos foram armazenados a -20°C até o uso. Cortes longitudinais aos primeiros molares foram seccionados com 5 µm de espessura na direção méso-distal, passados em H₂O MilliQ tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) a 42°C e colocados em lâminas de vidro com membrana de polietileno naftaleno (PEN membrane glass slides, Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA) para captura por microdissecção a laser (LCM). As lâminas contendo os cortes (10 cortes) foram armazenadas a -70°C até serem processadas para a microdissecção a laser.

Captura por microdissecção a laser (LCM)

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em 2 trocas de xilol por 2 minutos, desidratados em concentrações crescentes de etanol, secos em temperatura ambiente por 5 minutos e imediatamente microdissecados. A área de captura incluiu as células do ligamento periodontal (PDL), delimitadas utilizando como referência a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar no espaço interdental e por toda a região de furca, evitando as áreas adjacentes ao osso alveolar e ao cimento para excluir células do tecido ósseo, osteoblastos e osteoclastos, e cementoblastos. As células do PDL foram capturadas utilizando uma combinação de laser infravermelho (IR) e laser cortante ultravioleta (UV) do equipamento de microdissecção Arcturus XT (Applied Biosystem), usando as seguintes configurações para a captura do PDL sobre um aumento de 10x: UV *cutting speed* de 100 a 200 mm/s; IR *laser strength* de 65 a 70mW, duração de 20 ms, *spot size* de 20µm. Foram microdissecados de 8-10 cortes histológicos por amostra. O *cap* contendo os tecidos microdissecados foi adaptado a um microtubo de 0,5 mL e armazenados a -80° C.

Preparo das amostras microdissecadas para cromatografia líquida e espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS/MS)

Para o preparo das amostras para a análise por LC-MS/MS os *caps* contendo os tecidos microdissecados foram removidos do freezer e deixados para descongelar sob

gelo. As amostras foram desnaturadas por incubação em 30 µl de ureia 8 M durante 30 minutos à temperatura ambiente. As proteínas extraídas foram reduzidas por incubação com ditioneitol 0,5 M a 56° C durante 25 minutos e alquiladas por incubação com iodoacetamida 0,5 M à temperatura ambiente durante 30 minutos, e nova incubação em ditioneitol 0,5 M durante 15 minutos à temperatura ambiente. As amostras em solução foram então diluídas em bicarbonato de amônio 50 mM para uma concentração final de 1,6 M de ureia, e 0,1 M de cloreto de cálcio foi adicionado à mistura de proteínas. As amostras foram digeridas por meio de incubação com 2 µg de *sequencing grade modified trypsin* (Promega, Madison, WI, EUA) durante a noite a 37° C. Todos os passos de incubação descritas acima foram realizados com o *cap* acoplado ao microtubo colocado numa posição invertida para permitir que os reagentes entrassem em contato com os tecidos capturados. Antes de adicionar os reagentes os conjuntos de microtubo/*cap* foram centrifugados para levar a mistura de proteínas para baixo. Depois da digestão, os *caps* foram descartados e as misturas de peptídeos foram equilibradas ao pH 2,0 por adição de solução de ácido fórmico 0,1%. Em seguida as amostras foram mantidas em -20°C até a análise por LC-MS/MS no Biomass, laboratório de espectrometria de massas LC-MS/MS (ICB IV - Universidade de São Paulo-USP, São Paulo).

Análise por cromatografia líquida e espectrometria de massa de alta resolução (LC-MS/MS)

A análise de proteômica foi realizada para se avaliar o perfil da síntese proteica de marcadores da inflamação no ligamento periodontal. As análises foram realizadas no LTQ-Orbitrap Velos ETD (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) acoplado ao Easy nanoLC II (Thermo). Os peptídeos foram separados numa coluna C18RP num gradiente de 115 min. As condições instrumentais foram verificadas usando 50fmol de uma digestão triptica de BSA como padrão. O *carryover* de amostra foi completamente removido entre a execução. A busca foi realizada utilizando o banco de dados de proteínas: *Rattus norvegicus_uniprot*. Análises de quantificação foram realizadas utilizando os softwares MaxQuant (v1.4.1.2) e Perseus (v 1.6.1.0). Uma pesquisa complementar foi feita usando o Thermo Proteome Discoverer 1.4.0.288. A identificação dos componentes celulares, funções e processos biológicos foram realizados através dos bancos de dados Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) e

Protein Annotation Through Evolutionary Relationship (PANTHER) (<http://pantherdb.org/>).

Análise imuno-histoquímica

Foram utilizados cortes histológicos de 4 μ m de espessura, aderidos em lâminas silanizadas (Perfecta, São Paulo, São Paulo, Brasil). A desparafinização foi feita por meio de duas incubações de 5 minutos cada em xilol, seguidas por três lavagens em etanol absoluto. Em seguida, foi feita a re-hidratação gradual até a água destilada. A análise imuno-histoquímica foi realizada para se confirmar a detecção e localização da expressão protéica de 2 proteínas selecionadas na análise proteômica por espectrometria de massas. Essas proteínas deveriam apresentar diferença significativa entre os grupos e função relevante para o processo inflamatório. Para essa análise foi utilizado um kit baseado no complexo enzimático de peroxidase avidina-biotinilado (ABC) (Vector Labs; Burlingame, EUA). Anticorpos primários foram selecionados e suas diluições otimizadas individualmente: Spondina 1 (1:200) (bs-7520R, Bioss) e Vinculina (1:50) (LS-B5770, LSBio). O sistema de revelação utilizado foi o DAB. Os cortes foram corados com solução de hematoxilina de Carrazi para visualização dos núcleos. As imagens foram obtidas através de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus) e a intensidade e localização da coloração foram registradas por um examinador cego para os grupos experimentais.

Coloração da enzima TRAP

Após a análise proteômica, uma das proteínas selecionadas por sua relevância clínica e diferença estatística entre os grupos foi o TRAP (Tartrate Resistant Acid Phosphatase). Para coloração desta proteína, optou-se pelo método de coloração direta da enzima TRAP. Foram utilizados cortes histológicos de 4 μ m de espessura, aderidos em lâminas silanizadas (Perfecta, São Paulo, São Paulo, Brasil). A desparafinização foi feita por meio de duas incubações de 10 minutos cada em xilol, seguidas por três lavagens em etanol absoluto e feita a re-hidratação gradual até a água destilada. Em seguida, os cortes foram incubados a 38° submersos em um tampão preparado pela dissolução de Fast Red TR Salt (Sigma Chemical) e Naphton-AS-BI (Sigma Chemical) em N,N-dimethylformamide e Sodium Tartarate. Seguido da incubação, os cortes foram lavados em água destilada, corados com hematoxilina e

montados em meio aquoso. As imagens foram obtidas através de uma câmera digital (DP-71, Olympus, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio de luz (BX-51, Olympus) e a intensidade e localização da coloração foram registradas por um examinador cego para os grupos experimentais.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (Graph-Pad Prism 7 Software; Inc, La Jolla, San Diego, CA, USA). Em todos os procedimentos, foi adotado um nível de significância de 5% para a tomada da decisão quanto à validade da hipótese testada. Foi realizado o teste t-student para amostras independentes não pareadas. Na análise proteômica foi utilizado o software R (R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria) e realizado o teste t-student para amostras independentes não pareados ($p \leq 0.05$).

REFERÊNCIAS

1. Speretta GFF, Rosante MC, Duarte FO, Leite RD, Lino AD de S, Andre RA, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(12):1469–77.
2. Duarte PM, Gonçalves P, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti FHJ. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res*. 2006;41(6):541–6.
3. 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.

ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus 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 desse trabalho até 23/06/2023.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de junho de 2021.

Maria Eduarda Scordamaia Lopes