

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA – PERIODONTIA**

Linha de pesquisa:

*Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal
e Estruturas Anexas*

Tese:

**ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE DESORDENS METABÓLICAS NA
PATOGENESE DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS**

por

JULIANO CAVAGNI

**Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing
Co-orientadora: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres**

Porto Alegre

2012

JULIANO CAVAGNI

**ESTUDOS SOBRE O EFEITO DE DESORDENS METABÓLICAS NA
PATOGÊNESE DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Doutorado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica – Periodontia

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing
Co-orientadora: Profa. Dra. Iraci Lucena da Silva Torres

Porto Alegre

2012

DADOS CURRICULARES

Juliano Cavagni

Nascimento: 17 de Março de 1982

Filiação: Danilo Cavagni
Vera Maria Belaboni Cavagni

2000/2004 Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA, Canoas – RS

2005/2007 Especialização em Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS

2007/2010 Mestrado Acadêmico em Clínica Odontológica – Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, RS

2009/2010 Professor Substituto de Periodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre – RS

2010-2012 Doutorado em Clínica Clínica Odontológica – Periodontia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, RS

DEDICATÓRIA

“Você não consegue ligar os pontos olhando pra frente; você só consegue ligá-los olhando pra trás. Então você tem que confiar que os pontos se ligarão algum dia no futuro.”

- Steve Jobs -

Dedico este trabalho a meus pais Danilo e Vera Cavagni

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Provavelmente o aprendizado mais significativo de toda minha vida foi aprender a olhar a história para entender melhor aquilo e aqueles que nos cercam. Nesse sentido, gostaria de disponibilizar ao leitor desta tese um pouco de minha história, para que, ao entender quem sou eu, entenda um pouco melhor o meu trabalho. Ao longo desta história, diversos personagens surgiram e aproveito este momento para deixar escrito o que muitas vezes não conseguimos mencionar em palavras. Vamos começar...

Nasci em uma pequena cidade na serra gaúcha chamada Garibaldi. Sou filho de um diretor de empresas e uma dona de casa que, sem dúvida nenhuma, são todo o alicerce de minha vida. Passei a entender bem melhor o significado da palavra “família” nestes últimos anos ao ter que abdicar de todo o conforto que vocês sempre me proporcionaram por conta dos estudos. Felizmente, em meio a esse sentimento de saudade, surge o ponto de encontro que foi a chegada de minha irmã Valéria a Porto Alegre, provavelmente um pouco influenciada por minhas escolhas, para estudar Odontologia. Obrigado a vocês pelo amor infinito!

Minha escolha pela Odontologia se deu de uma forma bastante peculiar. Quando criança, ganhei um brinquedo chamado “consultório do Dr. Trata Dentes”. Tratava-se de uma simulação de um consultório odontológico com massas de modelar, dentes cariados, restaurações, etc... Esse foi o meu primeiro contato com a profissão e, a partir daí, nunca considerei outra atividade para minha vida. Enquanto meus colegas “sofriam” na sala da “orientação vocacional”, eu sequer precisei entrar nessa, tamanha era minha certeza. Toda essa certeza culminou com meu ingresso na Faculdade de Odontologia da Universidade Luterana do Brasil.

Muitos foram os conhecimentos adquiridos nessa fase de minha vida e, dentre estes “conhecimentos”, encontrei a pessoa que me acompanha lado a lado até os dias de hoje: minha namorada Elidiane. Eli, tenha certeza que sua presença ilumina minha vida e transforma dias nublados em tardes de setembro. Obrigado pelo amor, mas principalmente pela compreensão em especial nesses últimos meses. Te amo!!

Meu interesse pela periodontia iniciou antes mesmo de eu ter qualquer contato com a área. Ao estudar conteúdos de cariologia e farmacologia, me deparava

frequentemente com dois nomes que sabia que seriam meus professores de periodontia: Rui Vicente Oppermann e Cassiano Kuchenbecker Rösing. Ficava bastante intrigado em como pessoas que trabalhavam em uma área específica, transcendiam tão bem para outras áreas. Foi nesse momento que comecei a perceber que a periodontia talvez pudesse me fazer entender a odontologia em sua plenitude. Assim, no quinto semestre de graduação dei meus primeiros passos na periodontia e foi amor a primeira vista (ou raspagem). Procurei me inserir nas atividades vinculadas à área e passei, naquele momento, a acompanhar o atendimento clínico no curso de especialização em periodontia, lá permanecendo por dois anos graças aos professores Ronald Halla Jr. e Patrícia Weidlich por quem tenho muita admiração.

Adicionalmente, passei a me interessar sobre a pesquisa na área de periodontia, e em uma conversa com o professor Cassiano a respeito do efeito da utilização de corticóides inalatórios para os tecidos periodontais e, sem saber a resposta, ele prontamente disse: vamos estudar isso em ratos! E nesse momento passei a ler tudo a respeito do assunto, mas não encontramos naquele momento um modelo que reproduzisse o uso de corticóides inalatórios. Estudamos então o uso de antiinflamatórios esteróides injetáveis e, no dia 17 de dezembro de 2004, apresentei meu trabalho de conclusão de curso avaliando em ratos o efeito do uso de antiinflamatórios esteróides sobre a perda óssea alveolar em ratos Wistar, trabalho este que posteriormente tornou-se minha primeira publicação que muito me orgulha.

Todo esse processo só me fez ter uma certeza: quero ser periodontista e professor de periodontia. Assim, em dezembro de 2004, antes mesmo de minha formatura, prestei prova para o curso de especialização em periodontia da UFRGS e felizmente fui aprovado para início em março de 2005. Nesse momento conheci pessoas que se tornaram indispensáveis em minha vida como periodontista: Marilene Fernandes, Fernando Daudt, Cristiano Susin, além do até hoje colega José Mariano da Rocha. Muito obrigado pelos ensinamentos e pelo companheirismo!

Durante o curso de especialização tive oportunidade de poder trabalhar com o professor Cassiano novamente continuando os estudos sobre o uso de antiinflamatórios e suas repercussões nos tecidos periodontais, desta vez no formato de revisão de literatura. Ao final desta etapa, eu só aumentei minha certeza: quero ser professor de periodontia. Nesse momento prestei prova para o mestrado na UFRGS tendo sido aprovado.

Tive oportunidade de conhecer uma série de pessoas por quem guardo o mais profundo respeito e admiração: Alex Haas, Tiago Fiorini, Marta Liliana Musskopf, Marcius Wagner, Carlos Heitor Moreira, Sara Oliveira, Vicente Leitune, Fabrício Collares, Vinícius Carrard além da Adriana Soares e Edinete da Luz, funcionárias e amigas sempre dispostas a ajudar. Também surgiu a oportunidade de trabalhar mais proximamente com o professor Cristiano Susin e com o Eduardo Gaio (Duda). Entretanto, a medida que o tempo passou as dificuldades foram surgindo e quando tudo parecia andar perfeitamente (inclusive tendo o projeto da dissertação sido contemplado com um edital de pesquisa) fui surpreendido com a transferência de meu orientador para uma Universidade no exterior. Foi uma mistura de sentimentos: felicidade por ele ter tido uma oportunidade ímpar e frustração por ter sido “abandonado” no meio do caminho. Felizmente a última sensação não se concretizou e, mesmo estando distante, o professor Cristiano Susin permaneceu orientando o trabalho e pude, dessa maneira, concluir minha dissertação de mestrado. Não posso deixar de mencionar e agradecer ao professor Rui Oppermann que, frente a todos os seus afazeres como vice-reitor, prontamente aceitou o convite para assumir minha orientação tendo feito valorosas contribuições para o enriquecimento do trabalho.

Durante a fase de mestrado, tive oportunidade de trabalhar em um ensaio clínico com a temática obesidade e doença periodontal e em um de nossos seminários o professor Cristiano Susin me entregou um artigo e disse: “entenda bem o que está escrito nessa publicação, pois em algum momento você irá precisar disso”. Tratava-se de um artigo cuja temática era síndrome metabólica, assunto que passei a estudar com maior interesse. Nesse ínterim, tive oportunidade de conhecer a professora Iraci Torres (co-orientadora deste trabalho) e todas as pessoas do grupo de pesquisa de Farmacologia da Dor e Neuromodulação e em um dos seminários soube que o grupo estava trabalhando com um modelo de dieta para indução de síndrome metabólica em ratos e, nesse momento, passei a escrever um projeto de pesquisa em colaboração sobre esta temática utilizando os conhecimentos acumulados de estudos em animais. Sem dúvida nenhuma a realização deste trabalho seria impossível sem a ajuda de todas as pessoas envolvidas no grupo liderado pela professora Iraci. Destaco, nesse momento, a participação da Andressa Souza e da Isabel Macedo que foram incansáveis até o último minuto. Não posso deixar de mencionar e agradecer ao pessoal do LaMEC Luiz Carlos

Kucharski, Ana Lúcia Hoefel, Claudia Vieira Marques e Mariana Flores Linder pelo empenho nas análises de colesterol e triglicerídeos.

Antes mesmo da conclusão do mestrado, fui aprovado no processo seletivo para o Doutorado tendo apresentado o projeto anteriormente citado sobre desordens metabólicas e doença periodontal. Quis o destino que novamente o professor Cassiano fosse meu orientador e, nesse período, tive oportunidade de, além de orientado, me tornar amigo do professor Cassiano. Jamais esquecerei dos momentos de trabalho, aprendizado, “puxões de orelha” por conta de minha teimosia e perfeccionismo, muitas vezes desnecessários. Igualmente não esquecerei dos momentos de descontração com conversas sobre futuro profissional e sobre a vida. Também será impossível deixar de lembrar das viagens, com direito a longas caminhadas por Madri e Barcelona de sapato cujo solado não era mais espesso que uma folha de papel. Assistir à final da Copa do Mundo na Espanha tendo sentido a emoção de ser campeão do mundo junto com os espanhóis. E, como esquecer da travessia da ponte da amizade a pé para comprar o computador que escrevo esta tese já que, poucos meses antes, havia esquecido meu computador (entre outros objetos) em um vagão do metrô de Munique. Professor Cassiano: quando iniciei minha vida acadêmica achava a frase “ao mestre com carinho” um clichê. Hoje concluo mais essa etapa de minha vida e acho que essa afirmativa é a mais complexa em sua simplicidade. Certamente você foi o maior incentivador e exemplo de pesquisador a ser seguido. Meu eterno OBRIGADO!

Durante o doutorado tive oportunidade de conviver e aprender com uma série de professores da UFRGS a quem agradeço a cada instante de convívio e ensinamentos. Destaco a professora Sabrina Carvalho Gomes pelo reconhecimento e oportunidade de crescimento e a professora Maria Beatriz Cardoso Ferreira, por ter tornado real algo que parecia impossível até mesmo para mim: gostar de estatística e matemática. A vocês toda minha admiração e respeito pois, no meu entendimento, o verdadeiro professor não é somente aquele capaz de ensinar e sim aquele capaz de transformar o seu aluno em algo melhor.

Não posso deixar de mencionar e agradecer, nesse momento, as pessoas que caminharam ao meu lado durante essa jornada, as bolsistas de iniciação científica Carolina Azambuja e Tassiane Wagner que fielmente me ajudaram com o preparo das dietas e com o cuidado dos animais dia após dia. Ao Duda, pelo apoio sem fim, inclusive com a revisão final dessa tese. À toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à médica veterinária Fabíola Meyer e à enfermeira Marta Cioato, exemplos de profissionais dedicadas, sempre dispostas a ajudar. Aos professores Joni Cirelli, Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Élcio Marcantonio Jr., bem como ao Rafael Molon, pelo maravilhoso acolhimento e confiança depositados quando da chegada em Araraquara para execução das micro-tomografias.

Por fim, gostaria de agradecer aos amigos de Garibaldi, especialmente ao Joe e Gaia Pieta, Tiago Krob, Marcelo Vilani, Marco Antônio e Matine Andreolla, Aline Coser, Márcio Carlotto, Samuel Fanti e Franciele Piva.

Agradeço à UFRGS por me acolher durante toda minha pós-graduação e espero poder retribuir isso um dia. À FIPE, FAPESP, CAPES, e CNPq pelo apoio financeiro ao longo do doutorado.

A Deus por me dar saúde e força para seguir em frente.

RESUMO

Nos últimos anos, o corpo de evidência científica a respeito da relação entre as doenças periodontais e desordens metabólicas - como a obesidade e a síndrome metabólica - vem aumentando consideravelmente. Entretanto, estudos avaliando os mecanismos biológicos que permeiam esta associação ainda são escassos. A presente tese teve como objetivo principal avaliar, em ratos Wistar, o efeito da obesidade e da síndrome metabólica (MetS) sobre a patogênese da perda óssea alveolar. Nesse sentido, foram produzidos 4 artigos científicos, sendo 2 revisões de literatura e 2 estudos experimentais. A primeira revisão de literatura buscou avaliar a literatura disponível acerca da relação MetS e doença periodontal. Pode-se observar que poucos estudos foram localizados e, dentre aqueles avaliados, a maioria tratou-se de estudos de natureza epidemiológica transversal. Não foram localizados estudos de natureza longitudinal e apenas um estudo de intervenção piloto foi avaliado. A análise desta evidência permitiu concluir que o tópico é de interesse, porém ainda não foi explorado na perspectiva dos fatores de risco. Para o segundo e terceiro artigos, foi utilizado um modelo animal que reproduz as características de obesidade (artigo 2) e MetS (artigo 3). Para o segundo artigo, foram utilizados 28 ratos Wistar machos divididos em 2 grupos experimentais. O grupo controle recebeu ração padrão e água e o grupo teste além da ração padrão/água foi exposto a uma dieta de cafeteria (CAF) para indução de obesidade. Foi definido um ponto de corte para ocorrência de doença periodontal, sendo essa considerada positiva quando da presença de perda óssea alveolar ≥ 0.51 mm em fotografias padronizadas. Diferenças significativas para o peso e índice de Lee foram observadas no grupo exposto a dieta CAF indicando presença de obesidade neste grupo. Observou-se que os animais obesos apresentaram significativamente mais sítios positivos para doença periodontal. Portanto, pode se concluir que a obesidade aumenta a perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar. Para o terceiro artigo, 60 ratos Wistar foram divididos em 4 grupos: Controle (ração padrão e água), Doença Periodontal (DP) (ração padrão e ligadura no semana 12), MetS (dieta CAF por 17 semanas) e MetS+DP (ligadura na semana 12 e dieta CAF por 17 semanas). Dois animais foram perdidos ao longo do período experimental por razões não relacionadas ao protocolo do estudo. Diferenças significativas foram observadas para o peso, índice de Lee

colesterol total e triglicérides, indicando presença de MetS. Foram realizadas análises do percentual de perda óssea alveolar através de micro-tomografias e os níveis séricos de IL1- β e TNF- α foram avaliados por ELISA. Observou-se que os animais portadores de MetS exibiram maiores percentuais de perda óssea alveolar induzida e espontânea. Não foram observadas diferenças significativas para os níveis séricos das citocinas avaliadas. Nesse sentido, pode ser concluído que a presença de MetS modula a resposta do hospedeiro, provavelmente pela quebra da homeostase do periodonto. O artigo 4 tratou-se de uma revisão de literatura com caráter informativo alertando aos profissionais da odontologia a responsabilidade da transcender as abordagens odontológicas tradicionais colocando a profissão como parte importante e integrantes da equipe de saúde. A partir dos resultados obtidos nos artigos constituintes da presente tese e frente às reflexões realizadas, pode-se concluir que a doença periodontal é influenciada por desordens metabólicas. Recomenda-se, portanto, a inclusão de questionamentos e análises dessas condições e suas potenciais inter-relações pelos profissionais da saúde

Palavras chave: Síndrome metabólica, Síndrome X, Resistência à insulina, obesidade, doença periodontal, perda óssea alveolar, citocinas, morfometria, microtomografia.

ABSTRACT

In the last years, the body of scientific evidence relating to the relationship between periodontal diseases and metabolic disorders – like obesity and metabolic syndrome – has considerably increased. However, studies evaluating the biological mechanisms related to this association are still scarce. The present thesis had as main objective to evaluate, in Wistar rats, the effect of obesity and metabolic syndrome (MetS) on the pathogenesis of alveolar bone loss. In this respect, 4 scientific articles were written, being 2 literature reviews and 2 experimental studies. The first literature review evaluated the available literature relating MetS and periodontal disease. It can be observed that few studies were retrieved and, among those evaluated, the majority were of cross-sectional epidemiological nature. Longitudinal studies were not found and only one pilot intervention study was evaluated. The analysis of this evidence led to the conclusion that the topic is of interest, however still has not been explored in the perspective of risk factors. For the second and third articles, an animal model was used, that mimics obesity (article 2) and MetS (article 3). For the second article, 28 male Wistar rats were divided in 2 experimental groups. The control group received chow and water and the test group, besides the standard chow/water was exposed to cafeteria diet (CAF) in order to induce obesity. A cut-off point was defined for the occurrence of periodontal disease, being this considered positive when alveolar bone loss $\geq 0.51\text{mm}$ was present in standardized pictures. Significant differences for body weight and Lee Index were observed in the group exposed to CAF diet, indicating obesity. Obese animals presented significantly more sites positive for periodontal disease. Thus, it may be concluded that obesity increases spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. For the third article, 60 male Wistar rats were divided in 4 groups: Control (standard chow and water), Periodontal disease (PD) (standard rat chow and ligature on week 12), MetS (CAF diet for 17 weeks) and MetS+PD (ligature on week 12 and CAF diet for 17 weeks). Two animals were lost during the experimental period for reasons not related to the study protocol. Significant differences were observed in body weight, Lee Index, total cholesterol and triglycerides, indicating the presence of MetS. Analyses of percent alveolar bone loss were performed by microcomputer tomography and the serum levels of IL1- β and TNF- α were performed by ELISA. Animals with MetS

exhibited higher percentage of spontaneous and induced alveolar bone loss. No significant differences were observed for the serum levels of the evaluated cytokines. Thus, it may be concluded that the presence of MetS modulates the host response, probably breaking the periodontium homeostasis. Article 4 is a literature review with informative characteristics alerting the dental professionals about the responsibility of going beyond the traditional dental practices, making the profession an important component of the health team. Taking into consideration the obtained results in the articles in this thesis, and the thoughts coming from them, it may be concluded that periodontal disease is influenced by metabolic disorders. It is recommended that questions and analyzes are made about these conditions and their potential interrelationships by the health personnel.

Key Words: Metabolic syndrome, Syndrome X, Insulin resistance, obesity, periodontal disease, alveolar bone loss, cytokine, morphometric analysis, microCT.

APRESENTAÇÃO

A presente tese de Doutorado foi desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul a partir do projeto de número 110051.

O financiamento dos estudos aqui apresentados esteve sob a responsabilidade do edital Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD NF-2008 CAPES) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE-HCPA).

Os objetivos acadêmicos desta tese vinculados à produção intelectual incluem produção científica e técnica em revistas de circulação nacional e internacional. Nesse sentido, um artigo de revisão da literatura sobre o tópico foi publicado na Revista Periodontia da Sociedade Brasileira de Periodontologia – Brazilian Journal of Periodontology (ISSN 0103-9393). Adicionalmente um estudo sobre o impacto da obesidade na etiopatogênese da perda óssea espontânea em ratos está em fase de avaliação na revista Archives of Oral Biology. O estudo principal da presente tese encontra-se em fase de redação final e será submetido ao Journal of Periodontal Research. Como parte da produção técnica, um artigo foi apresentado na coluna Novas Tendências da Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry (ISSN – 1806-5015) com finalidade informativa a profissionais de todas as especialidades odontológicas e encontra-se anexo a esta tese.

Encontra-se também um detalhamento da metodologia utilizada no estudo. Ressalte-se que a presente tese está de acordo com a resolução 093/2007 da Câmara de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A lista a seguir contempla a produção intelectual vinculada a esta tese:

Artigo 1: Cavagni, J.; Rösing, C.K. Inter-relação entre síndrome metabólica e doença periodontal: uma revisão da literatura (Revista Periodontia – Brazilian Journal of Periodontology).

Artigo 2: Cavagni, J.; Wagner, T.P.; Gaio, E.J.; Rêgo, R.O.C.C.; Torres, I.L.S.; Rösing, C.K. Obesity may increase spontaneous periodontal disease in Wistar rats (Archives of Oral Biology, submitted).

Artigo 3: Cavagni, J.; Macedo, I.C.; Gaio, E.J.; Souza, A.; Molon, R.S.; Cirelli, J.A.; Torres, I.L.S.; Rösing, C.K. Metabolic syndrome modulates alveolar bone loss in Wistar rats (in manuscript).

Artigo 4: Cavagni, J.; Rösing, C.K. Síndrome Metabólica: Qual o significado para a Odontologia? (Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	SÍNDROME METABÓLICA	19
1.2	EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME METABÓLICA.....	21
1.3	DOENÇAS PERIODONTAIS.....	22
1.4	RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇA PERIODONTAL	23
2	PROPOSIÇÃO	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3	METODOLOGIA	34
3.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	34
3.2	ANIMAIS.....	34
3.3	CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA	35
3.3.1	CÁLCULO DE AMOSTRA.....	35
3.3.2	RANDOMIZAÇÃO	35
3.3.3	CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	35
3.4	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	36
3.5	INDUÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA.....	36
3.6	CÁLCULO DO ÍNDICE DE LEE	37
3.7	PESO CORPORAL DOS ANIMAIS.....	37
3.8	MODELO DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL	38
3.9	MORTE DOS ANIMAIS	38
3.10	PREPARAÇÃO DO SORO.....	38
3.11	EXCISÃO DO FÍGADO.....	39
3.12	DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA.....	39
3.13	DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL.....	39
3.14	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IL1- β E TNF- α	40
3.15	PREPARO DAS MAXILAS	40
3.16	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS MAXILAS	40
3.17	MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (μ CT).....	41
4	CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO	42
4.1	CEGAMENTO.....	42
4.2	REPRODUTIBILIDADE	42
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS	43
5	ANÁLISE DOS DADOS	43
5.1	HIPÓTESE ESTATÍSTICA	43
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
	Artigo 1	45
	Artigo 2	56
	Artigo 3	70
	Artigo 4	93
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
7	REFERÊNCIAS	103
8	ANEXOS	108

LISTA DE FIGURAS

Introdução e Metodologia

Figura 1: Fluxograma do estudo

Artigo 2

Figure 1: Study flowchart

Figure 2: Specimen and measurements on the buccal surface

Figure 3: Mean Lee Index (g/cm) at Day 110 for test and control groups

Figure 4: Median and interquartile range in millimeters (percentile 25 and 75) of alveolar bone loss for test and control groups

Artigo 3

Figure 1: Study flowchart

Figure 2: Mean weight (g \pm SD) for the groups during experimental period

Figure 3: Mean Lee Index (\pm SD) for the groups during experimental period

Figure 4: Mean \pm SD Cholesterol mg/100g of Liver according to experimental groups

Figure 5: Mean \pm SD Triglycerides mg/100g of Liver according to experimental groups

Figure 6: Median and interquartile range of serum IL1- β according to the experimental groups

Figure 7: Median and interquartile range of serum TNF- α according to the experimental groups

Anexos

Anexo 2: Exemplo de Fotografia utilizada na análise morfométrica.

Anexo 3: Análise do volume de perda óssea alveolar por micro-tomografia. (A) Reorientação da imagem no programa DataViewer (B) Definição da ROI no programa CTan

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Introdução e Metodologia

Quadro 1: Definições propostas para a síndrome metabólica

Quadro 2: Resumo dos estudos de associação entre doença periodontal e síndrome metabólica de acordo com a ordem cronológica de publicação

Tabela 1: Dieta empregada no estudo

Artigo 1

Tabela 1: Diferentes definições propostas para síndrome metabólica

Quadro 1: Achados principais dos diferentes estudos epidemiológicos que avaliaram a relação entre síndrome metabólica e doença periodontal

Artigo 2:

Table 1: Mean weight in grams (\pm SD) for groups and time periods

Table 2: Occurrence of periodontal breakdown on sites according to group

Artigo 3:

Table 1: Mean (\pm SD) percentage of alveolar bone loss for right and left sides accordingly to experimental groups

Artigo 4:

Quadro 1: Diferentes definições propostas para síndrome metabólica

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME METABÓLICA

A síndrome metabólica (MetS) é caracterizada pela ocorrência simultânea de anormalidades metabólicas incluindo obesidade (aumento da adiposidade centro visceral), resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia, sendo a última representada pelo aumento nos níveis de triglicerídeos e redução nos níveis de colesterol HDL (*High-Density Lipoprotein*), estado pró-inflamatório e pró-trombótico. A ocorrência de alguns destes fatores concomitantemente resulta em um aumento significativo na morbidade e mortalidade por afecções cardiovasculares (Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, 2002; GRUNDY, 2008). Trata-se de um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares relacionados à deposição central de gordura e a resistência à insulina (SBC, 2005). A gordura visceral, característica da MetS está relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, decorrente de ação da insulina, da leptina e de neuropeptídeos hipotalâmicos, que desempenham papel fundamental na regulação do apetite e do metabolismo de indivíduos obesos (VOLTERA, CESARETTI et al., 2008).

A associação de obesidade e desordens metabólicas com desfechos cardio/cerebrovasculares já era considerada muito antes do termo “Síndrome Metabólica” ser aceito pela comunidade científica. No entanto, somente em 1988, o Dr. Gerald Reaven, em um estudo clássico, apontou que alguns fatores de risco para doenças cardiovasculares (dislipidemia, hipertensão, hipoglicemia, por exemplo) comumente manifestavam-se em conjunto (REAVEN, 1988). A este agrupamento de fatores de risco, foi dado o nome de “Síndrome X”. Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa, postulou que resistência à insulina seria a base para a Síndrome X, renomeando esta para “Síndrome da resistência à insulina”.

Com o passar dos anos, outras anormalidades, particularmente estado pró-inflamatório crônico e estado pró-trombótico, foram adicionados ao conceito e

tornaram a definição mais complexa. Adicionalmente, a obesidade abdominal como parte fundamental na etiopatogenia da síndrome, ganhou atenção. Nesse sentido, em 2002 foi publicado o III Relatório do Painel de Especialistas para Detecção, Avaliação e Tratamento do Colesterol Alto, que definiu o termo “Síndrome Metabólica” (Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, 2002).

De acordo com essa definição, para ser diagnosticado como portador de MetS, o indivíduo deve apresentar três dentre os cinco fatores a seguir: circunferência da cintura igual ou superior a 102 cm para os homens e 88 cm para as mulheres, níveis séricos de triglicerídeos superiores a 150 mg/dl, colesterol HDL inferior a 40 mg/dl e 50 mg/dl para homens e mulheres respectivamente, pressão arterial igual ou superior a 130/85 mmHg e glicemia em jejum igual ou superior a 110 mg/dl.

Entretanto, a partir deste momento, diversas definições para a MetS foram propostas. Por exemplo, segundo a OMS, para realizar diagnóstico de MetS é necessária presença de resistência à insulina, associada a dois ou mais componentes (Quadro 1) (WHO, 1999). Ainda, a Federação Internacional do Diabetes (FID) desenvolveu novos critérios para o diagnóstico da MetS, considerando a obesidade abdominal associada a dois ou mais componentes da MetS (GUERRERO-ROMERO e RODRIGUEZ-MORAN, 2005; SBC, 2005). (Quadro 1).

A Primeira Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica [I-DBSM, 2005; SBH, 2004, SBC, 2005), segue as recomendações do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III* (NCEP, 2002) na qual o diagnóstico de MetS é firmado pela presença de três dentre quaisquer dos cinco componentes descritos anteriormente.

A patogênese da MetS não está completamente esclarecida, entretanto sugere-se a participação de três eixos etiopatogênicos, dentre eles, obesidade e desordens do tecido adiposo, resistência à insulina e alguns fatores que atuam independentemente, como moléculas de origem hepática, vascular e imunológica. Além disso, outros fatores como aumento na idade, estado pró-inflamatório e

alterações hormonais têm sido apontados como envolvidos no desenvolvimento da síndrome (GRUNDY, BREWER et al., 2004).

Quadro 1 – Diferentes definições propostas para síndrome metabólica

Componentes	NCEP-ATP Pelo menos 3 componentes	OMS Hiperglicemia/Diabetes +2 componentes	FID Obesidade abdominal +2 componentes
Obesidade abdominal circunferência da cintura		Obesidade (IMC \geq 30 kg/m ²) ou RCQ	
Homens	>102 cm	<0.9	\geq 94 cm
Mulheres	>88 cm	<0.85	\geq 80 cm
Triglicerídeos	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl
Colesterol HDL			
Homens	<40 mg/dl	<35 mg/dl	<40 mg/dl
Mulheres	<50 mg/dl	<39 mg/dl	<50 mg/dl
Pressão arterial	\geq 130 mmHg ou \geq 85 mmHg	\geq 140 mmHg ou \geq 90 mmHg ou uso de antihipertensivo	\geq 130 mmHg ou \geq 85mmHg
Glicemia de jejum	\geq 110 mg/dl	\geq 110 mg/dl	\geq 100 mg/dl
Microalbuminúria	-----	\geq 20 μ g/min ou razão albumina:creatinina \geq 30 mg/g	-----

Legenda: NCEP – ATP: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III; OMS: Organização Mundial da Saúde; FID: Federação Internacional do Diabetes; IMC: Índice de Massa Corporal; RCQ: Relação Cintura Quadril

1.2 EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME METABÓLICA

Da mesma forma com o que vem acontecendo com a obesidade, a MetS está se tornando uma condição cada vez mais prevalente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Em um estudo transversal realizado nos Estados Unidos, foi verificado que a prevalência de MetS foi de 23,7%. Quando estes dados foram estratificados para idade, houve um aumento na ocorrência de 6,7% em indivíduos de 20-29 anos para 43,5% em indivíduos de 60-69 anos (FORD, GILES et al., 2002). Da mesma maneira, Gu, Reynolds et al., (2005) avaliaram uma amostra representativa de 15.540 chineses com idade entre 35 e 74 anos em 2000 e 2001, e verificaram que a prevalência de MetS foi de 9,8 e 17,8% em homens e mulheres, respectivamente. Além disso, os autores relatam que a prevalência foi maior em regiões rurais do país

No Brasil, raros estudos avaliaram as características epidemiológicas da MetS. Salaroli, Barbosa et al., (2007) avaliaram, em um estudo transversal de base populacional, a prevalência de MetS na cidade de Vitória (ES) em indivíduos com idade de 25-64 anos e verificaram uma prevalência de 29,8%. Observaram, também, que a prevalência aumentou progressivamente com a idade (15,8% e 48,3% para os grupos de 26-34 e 55-64 anos, respectivamente) e em mulheres inversamente proporcional ao nível sócio-econômico.

Em Odontologia, tem havido por parte dos pesquisadores um crescente interesse no estudo da inter-relação da obesidade com as doenças periodontais. Essa preocupação torna-se evidente, à medida que boa parte do conhecimento científico disponível sobre esta temática foi produzido nos últimos 5 anos. Nesse sentido, a MetS, por se tratar de uma condição intimamente ligada à obesidade, também tem despertado interesse na área odontológica.

1.3 DOENÇAS PERIODONTAIS

As doenças periodontais são doenças de natureza infecto-inflamatória que acometem os periodontos de proteção e de inserção (PAGE e KORNMAN, 1997). Segundo a Academia Americana de Periodontia (AAP), as doenças periodontais se subdividem em dois grupos principais: Gengivites e Periodontites. As gengivites são caracterizadas por uma inflamação na margem gengival causada pelo biofilme supragengival. Suas características clínicas são vermelhidão e sangramento à sondagem leve, bem como edema. Seu tratamento consiste na remoção de fatores retentivos de placa (como por exemplo, cálculo dental), motivação e orientação para o controle do biofilme supragengival. Já as periodontites acometem os tecidos de sustentação dos dentes (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento) e são causadas pelo biofilme subgengival. Suas características clínicas são presença de sangramento subgengival, formação de bolsa periodontal, aumento na mobilidade dental, perda de inserção e óssea, podendo levar à perda dentária (ARMITAGE, 1999). O tratamento das periodontites consiste na remoção profissional de biofilme subgengival através de procedimentos de raspagem e alisamento radicular subgengival.

As manifestações de gengivites e periodontites são sabidamente influenciadas por alguns fatores ambientais, comportamentais, biológicos e medicamentosos. Entre eles estão alguns microrganismos componentes dos biofilmes supra e subgengival (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005), o fumo (BERGSTROM, ELIASSON et al., 2000; GEURS, LEWIS et al., 2003) e o diabetes (TAYLOR, BURT et al., 1998). Existem, ainda, outros indicadores que têm sido apontados como modificadores do processo saúde/doença periodontal, como fatores sócio-econômicos (SUSIN, DALLA VECCHIA et al., 2004), estresse (BREIVIK, THRANE et al., 1996), polimorfismos genéticos, (KINANE, SHIBA et al., 2005) osteoporose, (GEURS, LEWIS et al., 2003), consumo excessivo de álcool, (TEZAL, GROSSI et al., 2004), obesidade (DALLA VECCHIA, SUSIN et al., 2005) e uso de alguns medicamentos, como a fenitoína e ciclosporina (KINANE e MARSHALL, 2001).

É consenso na literatura a necessidade de uma infecção por bactérias para que ocorra quebra da homeostase tecidual que gerará destruição do periodonto (LINDHE, HAMP et al., 1973). Portanto, tanto em situações onde há uma hiper-resposta, quanto em casos de imunodepressão, pode ocorrer uma piora na condição periodontal (KINANE e LAPPIN, 2001). Assim, estudos que avaliem a plausibilidade biológica e os efeitos de diferentes situações que modulam a resposta do hospedeiro são necessários.

1.4 RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇA PERIODONTAL

O interesse por parte da literatura em odontologia para a relação entre MetS e doenças periodontais é notável à medida que o corpo de evidência científica publicada sobre esta temática vem aumentando consideravelmente nos últimos 5 anos (Quadro 2). A maior parte dos estudos desenvolvidos é de natureza epidemiológica e utiliza delineamento do tipo transversal sendo a maioria realizada em populações asiáticas. A análise dos dados contempla estratificações para os principais fatores de confusão envolvidos na etiopatogenia de ambas as doenças. Adicionalmente, os protocolos de exame periodontal são parciais e não são apresentados dados de reprodutibilidade dos examinadores na maioria dos estudos

avaliados. Com relação aos parâmetros da MetS, a definição mais frequentemente utilizada foi a do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III* - ATP III (NCEP, 2001).

Apesar de utilizarem delineamentos semelhantes, os resultados dos estudos apresentam-se bastante controversos. Alguns autores encontraram associações significativas para a relação entre doença periodontal e MetS (SHIMAZAKI, SAITO et al., 2007; D'AIUTO, SABBAH et al., 2008; KUSHIYAMA, SHIMAZAKI et al., 2009; LI, HE et al., 2009; MORITA, OGAWA et al., 2009; NESBITT, REYNOLDS et al., 2009; HAN, LIM et al., 2010; MORITA, YAMAZAKI et al., 2010; TIMONEN, NISKANEN et al., 2010; KWON, HA et al., 2011; FUKUI, SHIMAZAKI et al., 2012). Isso significa que indivíduos portadores de parâmetros relacionados à MetS apresentam risco aumentado de desenvolvimento de doenças periodontais. Por outro lado, Borges, Gimeno et al., (2007) e Benguigui, Bongard et al., (2010), ao avaliarem amostras de nipo-brasileiros e franceses respectivamente, não encontraram associação entre as condições supracitadas. Interessantemente, outros autores têm apontado para uma diferença nas estimativas de risco somente para mulheres (ANDRIANKAJA, SREENIVASA et al., 2010). Uma possível explicação para as diferenças existentes entre os estudos são os critérios utilizados pelos autores na classificação de ambas as doenças.

Dentre os estudos de caso-controle localizados e incluídos na presente revisão, a associação positiva entre MetS e doença periodontal foi um achado comum a todos eles (NIBALI, D'AIUTO et al., 2007; LI, HE et al., 2009; HAN, LIM et al., 2012). A principal diferença para a variabilidade dos achados, da mesma maneira que os estudos transversais, reside no fato de que diferentes classificações para as doenças periodontais, no que tange especialmente extensão e severidade, foram utilizadas. Entretanto, de uma maneira mais ampla, é possível inferir que indivíduos com MetS apresentam maiores chances de ter periodontite que indivíduos saudáveis.

A influência da doença periodontal sobre os parâmetros da MetS (inverso da associação) também foi recentemente avaliada por Morita, Yamazaki et al., (2010). Os autores demonstraram que a presença de periodontite esteve relacionada a uma

piora nos parâmetros da MetS ao longo de 4 anos sugerindo que a prevenção das doenças periodontais poderia interferir em desfechos relacionados à MetS.

Apenas dois estudos foram localizados até o momento avaliando o efeito da terapia periodontal em pacientes portadores da MetS. O primeiro tratou-se de um estudo de intervenção piloto realizado na Índia com 31 indivíduos incluídos (ACHARYA, BHAVSAR et al., 2010). Foram realizadas comparações dos parâmetros de inflamação sistêmica pós-terapia periodontal, em um período de dois meses. Os resultados mostraram redução significativa nos níveis de triglicérides e aumento significativo dos níveis de colesterol HDL nos indivíduos com MetS. Quanto ao colesterol LDL, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Por tratar-se de um estudo piloto com amostra e tempo de acompanhamento reduzidos, os dados devem ser interpretados com cautela, uma vez que estudos com essa limitação apresentam poder estatístico reduzido.

O segundo tratou-se de um ensaio clínico randomizado, controlado por placebo, duplo-cego e em paralelo em um grupo de 165 pacientes chilenos por um período de 12 meses de acompanhamento (LOPEZ, QUINTERO et al., 2012). Entretanto, conclusões a respeito do impacto da MetS sobre diferentes formas de terapia periodontal no estudo supracitado tornam-se dificultadas visto que todos os participantes foram diagnosticados como sendo portadores de MetS. Um importante achado do estudo foi que nenhuma das formas de terapia periodontal oferecida aos participantes teve impacto sobre os parâmetros da MetS.

Quadro 2: Resumo dos estudos de associação entre doença periodontal e síndrome metabólica de acordo com a ordem cronológica de publicação.

Características da amostra	Exame periodontal/Desfecho	Resultados	Comentário	Autores
Estudos transversais				
Japão 584M 40-79 anos Hisayama Study	Exame parcial; PS média (≥ 2 mm) e PI média (≥ 3 mm)	MetS CC, PS ≥ 2 mm ≤ 88 >88 CC, PI ≥ 3 mm ≤ 88 >88 HDL, PI ≥ 3 mm ≥ 50 mg/dL	OR (IC 95%) 1 (referência) 1.8 (1.2-2.8) 1 (referência) 0.9 (0.4-1.9) 2.8 (1.4-5.6)	Análise ajustada para idade e fumo Shimazaki, Saito <i>et al.</i> , 2007
Brasil 1315 nipo-brasileiros 30-92 anos Japanese-Brazilian Diabetes Study Group	CPI DP Leve: 1 sítio PS4-5mm DP Severa: 1 sítio PS ≥ 6 mm	MetS (pelo menos 3) CC, homem/mulher <102/<88 IMC ≥ 25 kg/m ² TA $\geq 130/85$ mmHg HDL homem/mulher <40 e <50mg/dl TG ≥ 150 mg/dl Glicemia ≥ 110 mg/dl	OR (IC 95%) 0.44 (0.16-1.21)	Não há dados de reprodutibilidade dos examinadores; Borges, Gimeno <i>et al.</i> , 2007
EUA 13.677 indivíduos idade ≥ 17 anos NHANES III	Exame Parcial; DP moderada 2 sítios PI ≥ 4 mm DP severa 2 sítios PI ≥ 6 mm	MetS (pelo menos 3) CC, homem/mulher <102/<88 cm IMC ≥ 25 TA $\geq 130/85$ mmHg HDL homem/mulher <40 e <50mg/dl TG ≥ 150 mg/dl Glicemia ≥ 110 mg/dl	OR (IC 95%) DP Leve (referência) DP Moderada 0.91 (0.56-1.48) DP severa 2.31 (1.13-4.73)	Análise ajustada para idade, gênero, anos de educação, taxa de pobreza, etnia e condições gerais e estratificada para fumo D'aiuto, Sabbah <i>et al.</i> , 2008

<p>Japão 2478 indivíduos 24-60 anos</p>	<p>CPI CPI≤2 CPI≥3</p>	<p>MetS IMC≥25kg/m² TA≥130\85mmHg TG≥150 mg/dL HDL<40 mg/dL Glicemia≥110 mg/dL HbA1c ≥5.5</p>	<p>OR (IC 95%) 2.4 (1.7-2.7)</p>	<p>Análise ajustada para idade, gênero e fumo.</p>	<p>Morita, Ogawa <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>Japão 1070 indivíduos 40-70 anos 281H/789M Serviço de Saúde do Município</p>	<p>CPI; Código 3 ou 4 (PS≥4mm)</p>	<p>MetS IMC≥25 kg/m² TA≥130/85mmHg HDL(homem/mulher)<40 e <50mg/dl TG≥150mg/dl Glicemia≥110mg/dl</p>	<p>OR (IC 95%) 0 (referência) 1-1.34(0.9-1.8) 2-1.36(0.9-2.0) 3-2.13(1.2-3.7) 4/5- 2.34(1.08-5.08)</p>	<p>Examinadores foram treinados porém não foi realizada reprodutibilidade. Não foi realizada avaliação da CC</p>	<p>Kushiya, Shimazaki <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>França 255 indivíduos 35 a 74 anos</p>	<p>Exame completo (4 sítios) DP moderada: 2 ou mais sítios interproximais com PI ≥4 m ou PS≥5mm, não no mesmo dente DP severa: 2 ou mais sítios interproximais com PI≥6mm ou 1 ou mais com PS≥5 mm, não no mesmo dente.</p>	<p>MetS (pelo menos 3) CC, homem\ mulher ≥102cm\ ≥88cm TA≥140\90mmHg* TG≥150 mg/dl* LDL-C≥160 mg/dl* Glicemia≥126 mg/dl* *Considerou-se uso de drogas anti-hipertensivas, hipoglicêmicas e para hipocolesterolemia</p>	<p>OR (IC 95%) DP moderada 1.54 (0.59-4.01) DP severa 1.97 (0.74-5.23)</p>	<p>Examinador calibrado. Análise ajustada para idade, gênero, nível de educação, fumo, consumo de álcool, CRP e biofilme dentário.</p>	<p>Benguigui, Bongard <i>et al.</i>, 2010</p>

<p>Coréia 1046 indivíduos ≥ 18 anos</p>	<p>CPI Sem periodontite (CPI 0 a 2) Com periodontite (CPI 3 ou 4)</p>	<p>MetS (pelo menos 3) CC, homem\ mulher ≥90 cm \ ≥85cm TG> 150 mg/dL HDL,homem/mulher <40\<50mg/dl TA>130\85mmHg* Glicemia > 110mg/dL *Considerou-se uso de anti-hipertensivos.</p>	<p>OR (IC 95%) 1.7 (1.22-2.37)</p>	<p>Análise ajustada para idade, gênero, renda média da família, fumo, ingestão de álcool, frequência diária de escovação e atividade física.</p> <p>Examinadores calibrados (Kappa 0.62)</p>	<p>Han, Lim <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>EUA BLSA Study 200 indivíduos</p>	<p>Distância JAD-crista alveolar em RX panorâmicos Perda alveolar: -ausente ou leve: 1 a 2mm -moderada ou severa: ≥3mm</p>	<p>MetS (pelo menos 2) CC, homem\ mulher ≥102cm\ ≥88cm TG≥150mg/dl Glicemia≥110mg/dl TA≥130\85mmHg* *Considerou-se uso de anti-hipertensivos</p>	<p>OR (IC 95%) 2.61 (1.1 – 6.1)</p>	<p>Análise ajustada para idade, gênero, etnia e fumo. Não se realizou exame clínico periodontal.</p>	<p>Nesbitt, Reynolds <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>Finlândia Health 2000 Health Examination Survey 2050 indivíduos 30-64 anos</p>	<p>Dentes com PS≥4mm ou PS≥6mm Foram avaliados todos os dentes (exceto 3^{os} molares, porém utilizou-se o sítio com PS maior</p>	<p>MetS Presença de resistência à insulina (quartil superior dos indivíduos não-diabéticos) + 2 fatores Glicemia (110mg/dl) TA≥140/90mmHg TG≥175mg/dl HDL<40mg/dl CC, homem/mulher >94/>80cm</p>	<p>RR (IC 95%) PS≥4mm 1.19(1.01-1.42) PS≥6mm 1.50(0.96-2.36)</p>	<p>Análise ajustada para gênero, idade, educação, presença de placa, frequência de escovação, visitas ao dentista e consumo de álcool Utilizou-se o critério do Grupo Europeu para Estudo da Resistência à Insulina para diagnóstico da MetS</p>	<p>Timonen, Niskanen <i>et al.</i>, 2010</p>

<p>EUA NHANES 7431 indivíduos 20 a 90+ anos</p>	<p>Exame parcial (2 sítios por dente) Saúde: PS média ≤ 2.5mm Periodontite: PS média ≥ 2.5mm</p>	<p>MetS (pelo menos 3) CC, homem/mulher >102/>88cm TA ≥ 130/85mmHg HDL H/M < 40 e < 50mg/dl TG ≥ 150mg/dl Glicemia ≥ 110mg/dl</p>	<p>OR (IC 95%) Homens: 1.0 (0.6-1.7) Mulheres: 4.7 (2.0-11.2)</p>	<p>Análise estratificada para gênero e ajustada para idade, raça/etnia, anos de educação, histórico de doença cardiovascular e fumo</p>	<p>Andriankaja, Sreenivasa <i>et al.</i>, 2010</p>
<p>Coréia 6520 indivíduos ≥ 19 anos</p>	<p>CPI ≥ 3</p>	<p>MetS (pelo menos 3) CC, homem \ mulher ≥ 90 cm \ ≥ 85cm TG ≥ 150 mg \ dL HDL, homem / mulher < 40 \ < 50mg/dl TA ≥ 130 \ 85mmHg* Glicemia ≥ 100mg \ dL *Considerou-se uso de anti-hipertensivos e hipoglicemiantes</p>	<p>OR (IC 95%) 1.55 (1.32-1.83)</p>	<p>Análise ajustada para idade, gênero, renda familiar, nível educacional, antecedentes da infância, uso de fio dental, uso de escova interdental, álcool, fumo, CPOD, número de dentes Estratificada para idade, gênero e fumo</p>	<p>Kwon, Ha <i>et al.</i>, 2011</p>
<p>Japão 6421 indivíduos 34-77 anos</p>	<p>Exame completo (2 sítios por dente) PS/PI 3 categorias e avaliadas separadamente no modelo multivariado</p>	<p>MetS (pelo menos 3) IMC ≥ 25kg/m² TA ≥ 130 \ 85mmHg HDL, homem / mulher < 40 \ < 50mg/dl TG ≥ 150 mg / dL Glicemia ≥ 100 mg / dL</p>	<p>OR (IC95%) PS/PI moderada 1.25 (1.03-1.52) PS/PI severa 1.35 (1.03-1.77) PS moderada/PI severa 1.22 (0.84-1.79)</p>	<p>Análise ajustada para idade, gênero, fumo, álcool, escovação, PCR e número de dentes</p>	<p>Fukui, Shimazaki <i>et al.</i>, 2012</p>

Estudos de Caso-Controle					
<p>Inglaterra</p> <p>485 indivíduos</p> <p>38-48 anos</p> <p>220H/ 265M</p> <p>Amostra de conveniência</p>	<p>Exame completo;</p> <p>Pelo menos 20 dentes com 50% dos seus sítios com PS≥5mm</p>	<p>Parâmetros da MetS</p> <p>LDL, mmol/l</p> <p>HDL, mmol/l</p> <p>Triglicerídeos, mmol/l</p> <p>Glicose, mmol/l</p>	<p>Saúde vs. Periodontite, (p)</p> <p>2.8 vs. 3.1 (0.0016)</p> <p>1.6 vs. 1.5 (0.0001)</p> <p>1.3 vs. 1.4 (0.439)</p> <p>4.8 vs. 5.0 (0.0003)</p>	<p>Indivíduos diabéticos não participaram do estudo; análise ajustada para idade, gênero, fumo e etnia</p>	<p>Nibali, D'aiuto <i>et al.</i>, 2007</p>
<p>China</p> <p>208 participantes</p> <p>37-78 anos</p> <p>Comunidade Beijing Gucheng</p>	<p>Exame completo (2 sítios por dente)</p> <p>Saúde: PI 0%</p> <p>DP Leve: PI>0-33%</p> <p>DP moderada: PI>33-67%</p> <p>DP Severa: PI>67%</p>	<p>MetS (pelo menos 3)</p> <p>CC, homem/mulher <90/<80</p> <p>TA≥130/85mmHg</p> <p>HDL H/M<40 e <50mg/dl</p> <p>TG≥150mg/dl</p> <p>Glicemia≥100mg/dl</p>	<p>OR (IC 95%)</p> <p>Saúde: referência</p> <p>DP Leve: 6.9 (1.07-44.7)</p> <p>DP moderada: 9.9 (1.50-65.24)</p> <p>DP severa: 15.6 (2.20-110.43)</p>	<p>Análise ajustada para gênero, idade, e fumo</p> <p>Examinador treinado, porém não informados dados de reprodutibilidade</p>	<p>Li, He <i>et al.</i>, 2009</p>
<p>Coréia</p> <p>166 casos/166 controles</p> <p>20-60 anos</p> <p>Shiwha-Banwol Environmental Health Cohort Study (SBEHCS)</p>	<p>CPI (Periodontite classificada de 2 maneiras)</p> <p>CPI 0-2: Saúde</p> <p>CPI 3-4: Periodontite</p> <p>Saúde: 0 sextante com periodontite</p> <p>Moderada: 1-2 sextantes</p> <p>Severa: 3-6 sextantes</p>	<p>MetS (pelo menos 3)</p> <p>CC, homem/mulher <90/<85</p> <p>TA≥130/85mmHg</p> <p>HDL H/M<40 e <50mg/dl</p> <p>TG≥150mg/dl</p> <p>Glicemia≥110mg/dl</p>	<p>OR (IC 95%)</p> <p>CPI 0-2: referência</p> <p>CPI 3-4: 1.76 (1.06-2.93)</p> <p>Saúde: referência</p> <p>Moderada: 1.71 (0.94-3.14)</p> <p>Severa: 1.84 (0.91-3.70)</p>	<p>Análise ajustada para renda, fumo, álcool, atividade física, diabetes.</p>	<p>Han, Lim <i>et al.</i> 2012</p>

Legenda: CC – Circunferência da cintura; CPI – Índice periodontal comunitário; H – Homens; HDL – Lipoproteína de alta densidade; IMC – Índice de massa corporal; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; M – Mulheres; OR – Odds ratio; PI – Perda de inserção; PS – Profundidade de sondagem; MetS – Síndrome Metabólica; DP – Doença Periodontal; TA – Tensão Arterial; TG – Triglicerídeos; IC – Intervalo de Confiança; PI – Perda de Inserção; HbA1c – hemoglobina glicada; PCR – Proteína C-Reativa; RR – Risco Relativo.

Muitos são os fatores apontados pelos estudos epidemiológicos que serviriam como inferência de plausibilidade biológica para a associação entre MetS e periodontite. Dentre eles, pode-se destacar estresse oxidativo, estado pró-inflamatório sistêmico, resistência à insulina, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, entre outros. Entretanto, a dificuldade para a realização de estudos em humanos que visem constatar a plausibilidade dos possíveis processos biológicos envolvidos no processo saúde-doença periodontal é notável.

Essa necessidade tem feito crescer a procura por modelos laboratoriais e em animais, tentando reproduzir o que possivelmente ocorre no ser humano. Nesse sentido, os modelos que utilizam animais sempre tiveram grande atenção da comunidade científica. Pesa favoravelmente a esses modelos, as similaridades biológicas, que contribuem para a utilização dos modelos animais no estudo de processos fisiológicos ou patológicos no homem. Assim, da mesma forma como é difícil extrapolar os achados dos animais para o homem, visto que como afirmava Allmon, "*o homem não é um rato gigante*" (ALLMON, 1971), é igualmente imprudente ignorar as muitas similaridades que os cientistas têm demonstrado (SUSIN e RÖSING, 2002).

Nesse sentido, o rato constitui-se numa alternativa barata, de fácil obtenção e manuseio, o que propicia a utilização de grandes amostras. Adicionalmente a esse fato, existe entre esses animais e o homem uma similaridade anatômica, histológica e bioquímica dos tecidos periodontais, bem como uma similaridade histopatológica e, em parte, microbiológica no que diz respeito às doenças periodontais (MADDEN e CATON, 1994; WEINBERG e BRAL, 1999; SUSIN e RÖSING, 2002; KUHR, POPA-WAGNER et al., 2004; OZ e PULEO, 2011). As diferenças existentes entre o homem e o rato, não têm sido consideradas como um fator suficientemente importante para que esse modelo experimental seja descartado (KLAUSEN, 1991).

Considerando a relevância do tema proposto e a ausência de estudos em animais abordando a inter-relação entre doença periodontal e desordens metabólicas, um dos objetivos da presente tese foi avaliar o impacto de um modelo de MetS na ocorrência e severidade da perda óssea alveolar em ratos. A realização de um estudo dessa natureza busca auxiliar na elucidação de processos etiopatogênicos envolvidos tanto na MetS quanto na doença periodontal. Sendo a

obesidade um dos componentes importantes da MetS, que historicamente iniciou os estudos sobre a MetS, nesta tese também será avaliado o efeito da obesidade sobre a destruição periodontal espontânea em ratos Wistar.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em ratos Wistar, o efeito da presença da obesidade e da MetS sobre a patogênese da perda óssea alveolar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Com base nos objetivos específicos da presente tese foram escritos uma revisão narrativa da literatura, 2 artigos originais e um artigo de divulgação. Abaixo encontram-se descritos os objetivos referentes a cada um dos artigos.

Artigo 1

Apresentar uma revisão narrativa da literatura, direcionada aos médicos e dentistas, especialmente àqueles que se dedicam à Endocrinologia e à Periodontia, a respeito da relação entre MetS e doenças periodontais.

Artigo 2

Avaliar o efeito da obesidade sobre a ocorrência de perda óssea alveolar espontânea em ratos Wistar.

Artigo 3

Avaliar o efeito da MetS na patogênese da perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos Wistar.

Artigo 4

Divulgar a profissionais da área da saúde, em veículo de ampla circulação, as informações pertinentes a inter-relação MetS e odontologia.

3 METODOLOGIA

Todas as etapas realizadas para os artigos 2 e 3, bem como o momento de realização estão expressas na Figura 1.

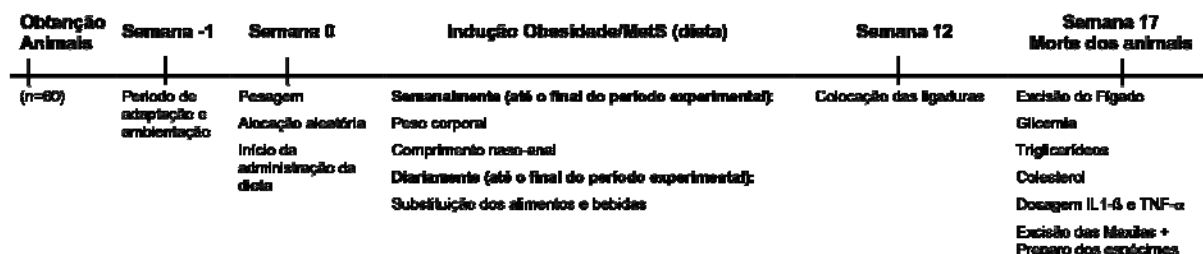


Figura 1 - Desenho esquemático das diferentes fases experimentais do estudo

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Este estudo utilizou um desenho experimental do tipo prospectivo, randomizado controlado em modelo animal.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos adultos com 60 dias de idade ($\pm 350g$) ao início do tratamento provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os animais foram mantidos na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em caixas-moradia, confeccionadas em plexiglass, medindo 65 x 25 x 15 cm, com assoalho recoberto de serragem. Esses animais permaneceram em caixas-moradias (5 animais por caixa) com ciclo claro-escuro de 12 horas, em temperatura ambiente ($22^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$) com livre acesso à água e à alimentação. Todos os procedimentos necessários para minimizar dor e desconforto foram tomados.

3.3 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

3.3.1 CÁLCULO DE AMOSTRA

O cálculo de amostra foi baseado nos resultados de um estudo realizado por Verzeletti, Gaio et al., (2012) que avaliou o efeito da obesidade sobre a perda óssea alveolar induzida por ligadura em ratos Wistar e utilizou metodologia semelhante à do presente estudo.

A perda óssea alveolar foi utilizada como desfecho primário para cálculo amostral. Estimou-se que uma amostra de 14 ratos por grupo seria necessária para atingir um poder de 80% para detecção de uma diferença de aproximadamente 0,14mm na perda óssea entre dois grupos experimentais. O nível de significância adotado foi de 5%. Baseando-se em estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa, estimou-se uma taxa de atrição de 10%. Assim, a amostra final do estudo foi de 15 ratos por grupo, totalizando 60 animais.

3.3.2 RANDOMIZAÇÃO

Os animais foram distribuídos randomicamente para seus respectivos grupos experimentais. Para isso os animais foram pesados e divididos em tertis de acordo com o peso corporal. Após, os mesmos foram sorteados para os respectivos grupos experimentais.

3.3.3 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

No macro-projeto, os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais com 15 animais em cada um deles da seguinte maneira:

Grupo 1 (Controle Total – CT): ausência de Indução de doença periodontal e ausência de indução de Obesidade/MetS.

Grupo 2 (Obesidade/MetS): Foi induzida Obesidade/MetS utilizando dieta padronizada.

Grupo 3 (Doença periodontal – DP): Indução de doença periodontal por meio de colocação de ligadura.

Grupo 4 (MetS e doença periodontal – MetS+DP): Indução de doença periodontal bem como de MetS.

3.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Para diagnóstico de MetS, é necessário preencher três componentes dos cinco estipulados pelo *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III* (Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, 2002), segundo recomendação da Primeira Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica [I-DBSM, 2005] (SBC, 2005). Durante o período experimental, foram registrados semanalmente o peso corporal e comprimento naso-anal. Após 12 semanas de exposição à dieta, nos grupos DP e MetS+DP, foi induzida doença periodontal por meio da colocação de ligaduras.

3.5 INDUÇÃO DA SÍNDROME METABÓLICA

A indução de MetS foi realizada por meio de dieta. Para isso, utilizou-se uma dieta palatável hiperlipídica e hipercalórica, composta de aproximadamente 55% de carboidratos, 20% de lipídios, 20% de proteínas e 5% de outros constituintes (sódio, cálcio, vitaminas, conservantes, minerais entre outros), adaptada de uma dieta hiperlipídica conhecida como dieta de cafeteria ou dieta ocidental, previamente descrita por Estadella, Oyama et al., (2004).

Dietas com alto teor de gorduras e carboidratos têm sido amplamente utilizadas em pesquisa para obtenção de obesidade e parâmetros de MetS em ratos, e reproduzem as refeições humanas conhecidas como *fast food* (DIETRICH, MULLER et al., 2007; KNIGHT, QUIGLEY et al., 2008; BARTOLOMUCCI, CABASSI et al., 2009). Os alimentos que compõem esta dieta adaptada são: salsicha, bolacha recheada, *wafer*, leite condensado, salgadinhos e refrigerante. A dieta foi

calculada com base nas informações fornecidas pelos fabricantes, constantes na embalagem dos alimentos.

Os alimentos oferecidos aos animais foram substituídos diariamente para permitir consumo de alimentos frescos e variados, assim como a água, o leite condensado e o refrigerante (Tabela 1). Todos os alimentos estiveram disponíveis *ad libitum* assim como a ração padrão, aos animais controles. Vale ressaltar que mesmo os grupos expostos à referida dieta receberam a ração padrão.

Tabela 1 – Dieta empregada no estudo

ALIMENTOS	MARCAS COMERCIAIS
Bolacha recheada	Trakinas [®]
Wafer	Isabela [®]
Leite condensado	Elegê [®]
Salsicha mista	Alibem [®]
Refrigerante de cola	Coca-cola [®]
Salgadinho	Elma Chips [®]

3.6 CÁLCULO DO ÍNDICE DE LEE

Os dados referentes ao peso corporal e à medida naso-anal foram usados para o cálculo do índice de Lee. O mesmo foi calculado dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em grama pelo comprimento naso-anal em centímetros e multiplicando-se por dez (BERNARDIS e PATTERSON, 1968).

$$\sqrt[3]{\text{peso corporal}(g) / \text{comprimento nasoanal}(cm)} \cdot 10$$

3.7 PESO CORPORAL DOS ANIMAIS

Para a pesagem dos animais foi utilizada balança eletrônica e os dados expressos em grama (g) de peso corporal. Essa verificação foi realizada semanalmente durante todo o período experimental.

3.8 MODELO DE INDUÇÃO DE DOENÇA PERIODONTAL

Após o curso de 12 semanas de exposição à dieta, com diagnóstico de obesidade e o estabelecimento da MetS, foi induzida doença periodontal, por meio da colocação de ligadura. A mesma trata-se de um fio de seda 4-0 (Ethicon[®], Johnson & Johnson, São Paulo, SP, Brasil) no segundo molar superior direito do rato, sendo os segundos molares contralaterais controle intra-grupo. A colocação da ligadura foi feita mediante anestesia geral, sob supervisão de médico-veterinário. Para esse procedimento utilizou-se anestésico inalatório isoflurano (Isoforine[®] 100ml, Cristália, São Paulo, SP, Brasil) vaporizado em 100% de oxigênio por meio de máscara facial. Para a indução anestésica utilizou-se isoflurano 5V% e para manutenção 2-3V%.

Os procedimentos para a colocação das ligaduras seguiram metodologia já descrita na literatura (SALLAY, SANAVI et al., 1982; GALVAO, CHAPPER et al., 2003). O fio de seda (4-0) foi colocado com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo nos espaços interproximais sendo o nó realizado na face vestibular.

3.9 MORTE DOS ANIMAIS

Os animais foram mortos 17 semanas após o início do período experimental (5 semanas após a colocação das ligaduras) por decapitação, 24 horas após a última avaliação *in vivo* e após jejum de 12 horas. Este método foi utilizado com o intuito de permitir a coleta de maiores volumes de sangue para as análises sorológicas. É importante salientar que o modelo prevê a verificação dos efeitos bioquímicos, o que também impossibilita a utilização de anestésicos. A decapitação foi realizada por experimentador treinado. Após a morte e obtenção dos espécimes, as carcaças dos animais foram colocadas em sacos plásticos adequados e encaminhadas para descarte seguindo os protocolos da Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

3.10 PREPARAÇÃO DO SORO

Imediatamente após obtenção, o sangue do tronco foi centrifugado em tubos plásticos por 5 minutos em 5000 rpm à temperatura ambiente. O soro sobrenadante

foi retirado com auxílio de pipetas e imediatamente congelado a -70°C até o momento dos ensaios laboratoriais.

3.11 EXCISÃO DO FÍGADO

A excisão do fígado foi realizada conforme metodologia descrita por *The Laboratory Rat - The Handbook of experimental Animals* (KRINKE, 2000).

3.12 DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Os níveis séricos de glicose das amostras foram determinados usando kits comerciais da marca BioClin[®]. As dosagens foram realizadas na automação de bioquímica BS-120 da Mindray[®].

3.13 DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS E COLESTEROL

Os procedimentos para determinação dos triglicerídeos e colesterol foram realizados nas dependências do LaMec (Laboratório de Metabolismo e Endocrinologia Comparada) conforme segue. Uma Amostra de tecido hepático foi homogeneizada em solução salina na proporção 20:1 (1mg de tecido para 20 μL de solução salina). O homogenato foi utilizado para dosagem de triglicerídeos por kit Bioliquid para determinação de triglicerídeos (Bio diagnóstica, Laborclin, Brasil), conforme especificações fornecidas pelo fabricante, com leitura em espectrofotômetro a 500nm.

A concentração de colesterol foi obtida a partir de 1mL do mesmo homogenato para obtenção de triglicerídeos. A este homogenato foi acrescentado 250 μL de ácido tricloro acético (TCA) 50%; com posterior centrifugação por 10min a 20000rpm. O sobrenadante retirado foi colocado para secagem e formação do *pellet*, ao qual foi acrescentado clorofórmio metanol para dissolução, com posterior centrifugação por 10min à 20000rpm. Este procedimento foi repetido por três vezes sucessivas, após foi colocado 500 μL de isopropanol. A solução foi preparada para ser medida em kit Bioliquid para determinação de colesterol total (Bio diagnóstica, Laborclin, Brasil), conforme a especificações do fabricante, com leitura em espectrofotômetro a 500nm.

3.14 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IL1- β E TNF- α

Toda avaliação das citocinas foi realizada nas dependências da Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre conforme segue. A concentração sérica de ambas citocinas foi realizada por ELISA e os valores expressos em pg/mL. Para análise do TNF- α utilizou-se o kit E91033Ra, USCN, Life Science, Inc - USA e para a IL1- β E90563Ra, USCN, Life Science, Inc – USA. As mensurações foram realizadas ao final do período experimental e seguiram todas as recomendações do fabricante de cada um dos kits adquiridos para o estudo.

3.15 PREPARO DAS MAXILAS

As maxilas dos animais foram removidas com auxílio de cinzéis e armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%, devidamente etiquetados com o número do animal e grupo ao qual pertencia.

Após este procedimento, as maxilas foram imersas em hipoclorito de sódio a uma concentração de 9% de cloro ativo (Mazarollo[®], Gravataí, RS, Brasil), durante duas horas e os tecidos moles cuidadosamente removidos. Passado este período, os espécimes foram lavados e secos. Para uma melhor visualização da junção amelo-cementária, foram corados com azul de metileno a 1% durante um minuto.

3.16 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DAS MAXILAS

Os procedimentos de preparo dos espécimes bem como de análise morfométrica foram realizados no Setor de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seguiram a metodologia proposta por Fernandes, Gaio et al., (2007). Para a tomada das fotografias, foi utilizada uma câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100mm (Nikon[®] Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que a lente ficasse o mais paralela possível em relação ao solo.

Foi confeccionado um aparato utilizando pasta pesada de Silicona de Adição (Express[®], 3M do Brasil, SP, Brasil) para promover fixação de uma régua

endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. Os espécimes foram fixados à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo (Anexo 2). Foram realizadas tomadas fotográficas das faces vestibular e palatina de cada uma das hemimaxilas sendo que a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea foi mensurada em *pixels* sendo esta posteriormente convertida para milímetros por meio do programa Adobe Photoshop® CS4 (Adobe Systems Inc., San Jose, EUA) em cinco locais distintos do segundo molar nas faces vestibular e palatina sendo a média destas mensurações considerada para análise. A mensuração da perda óssea alveolar foi realizada por um examinador treinado, calibrado e que desconhecia a que grupo experimental pertenciam os espécimes.

3.17 MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)

Toda a análise de μ CT foi realizada nas dependências da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr) de acordo com as normas locais. As maxilas secas foram escaneadas utilizando equipamento de microtomografia computadorizada (SkyScan, 1176, Aartselaar, Bélgica). A fonte de raios X foi operada a 50 kVp, corrente do feixe 500 μ A, filtro de alumínio 0,5mm e uma resolução de imagem de 12,45 μ m. As imagens foram reconstruídas por meio de um software (NRecon 1.6.1.5, SkyScan, Bélgica) em todas as dimensões espaciais. As imagens foram reorientadas e salvas em cortes sagitais (2000 x 1336) com o software DataViewer 1.4.3.1, SkyScan, Bélgica) (Anexo 3A). As mensurações de volume foram realizadas após a seleção da região de interesse (ROI) em 3 dimensões, com o software CTan (CT Analyser 1.10.1.0, SkyScan, Bélgica) (Anexo 3B). Para a demarcação da ROI, um examinador treinado, baseou-se em pontos de referência anatômicos. A ROI foi delimitada a partir da raiz mesial do terceiro molar até a raiz distal do primeiro molar, uma vez que a destruição periodontal e a maior parte da perda óssea alveolar foram evidentes na região da bifurcação das raízes e nas áreas interproximais do segundo molar. Após a delimitação dos pontos de referência, os contornos da ROI foram estabelecidos em intervalos regulares a cada 10 planos, resultando em uma inclusão mínima de dentes e raízes e máxima quantificação do osso alveolar. Todos os contornos foram desenhados iniciando-se imediatamente abaixo da junção amelo-cementária, movendo-se 3mm em direção

apical. Portanto, toda a área de osso da região interproximal e de bifurcação das raízes foi englobada pela ROI. Por fim, na imagem tridimensional original, os índices foram calculados por meio da ROI binária. O parâmetro avaliado foi o percentual de volume ósseo (%BV) que representa o volume de tecido mineralizado ao redor do defeito.

4 CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO

4.1 CEGAMENTO

O cegamento do pesquisador ocorreu no momento da análise morfométrica. Os espécimes foram codificados, por um examinador externo ao estudo e nomeados de acordo com esse código, de modo que o examinador responsável pela análise das fotografias desconhecia a que grupo cada espécime pertencia.

4.2 REPRODUTIBILIDADE

A avaliação do peso e mensuração do comprimento naso-anal foram realizados por experimentador treinado. Vale ressaltar que o examinador responsável por essas análises participou recentemente de um experimento com metodologia semelhante à do presente estudo. A reprodutibilidade para o peso e comprimento naso-anal foi realizada semanalmente através da dupla mensuração de ambos parâmetros em 10% da amostra. Os resultados mantiveram-se sempre próximos de 0,99 para o peso e variaram de 0,80 a 0,92 para o comprimento naso-anal.

Durante a análise morfométrica, 20 espécimes foram aleatoriamente sorteados para serem duplamente mensurados, com intervalo de uma semana, sendo os valores comparados através do coeficiente de correlação intra-classe (CCI). Obteve-se, para esta análise, um valor de 0,98.

Considerando a análise das microtomografias computadorizadas, as mesmas foram realizadas por um examinador treinado e calibrado. O treinamento ocorreu previamente ao início da avaliação e a reprodutibilidade foi realizada durante a fase de avaliação das microtomografias. Para isto, 20% das imagens foram selecionadas

de maneira aleatória para serem duplamente mensuradas. O CCI calculado foi de 0,99.

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

As análises bioquímicas e de citocinas foram realizadas seguindo as normas da UAMP respeitando todas as recomendações do fabricante, por um examinador externo ao estudo e experiente na dosagem deste tipo de marcador.

5 ANÁLISE DOS DADOS

5.1 HIPÓTESE ESTATÍSTICA

A hipótese de nulidade testada estatisticamente é a de ausência de diferença entre os grupos experimentais para os desfechos primários e secundários avaliados. A hipótese alternativa é de que pelo menos um dos grupos é estatisticamente diferente dos demais.

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada um dos parâmetros estudados, a normalidade dos dados foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk e o teste estatístico selecionado conforme segue. Para dados com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos e para dados com distribuição não normal foram utilizados testes de distribuição livre. Abaixo está descrita a estratégia de análise utilizada para os artigos 2 e 3. Todas as análises foram realizadas por meio dos softwares SPSS versão 20 (IBM, Japão) e Stata versão 10.1 (StataCorp, College Station, USA) para Macintosh. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

Artigo 2

Foram calculadas médias e desvio padrão da diferença de peso final e inicial e do índice de Lee ao final do experimento para os grupos teste e controle e comparados por meio do teste t para amostras independentes.

Foram calculadas mediana e intervalo interquartil para as medidas da distância da junção amelo-cementária até a crista óssea alveolar para as faces vestibular e palatina e comparadas através do teste de Mann Whitney. A definição de periodontite espontânea baseou-se no percentil 75 da distribuição da média da perda óssea alveolar dos grupos experimentais de modo que o valor calculado foi de 0,51mm. Os sítios foram dicotomizados como positivos ou negativos para periodontite e comparados por meio do teste do qui-quadrado.

Artigo 3

Média e desvio-padrão do peso e do índice de Lee para cada um dos grupos experimentais foram geradas e comparadas por meio de análise de variância de medidas repetidas de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

A comparação da média e o desvio-padrão dos dados bioquímicos (colesterol e triglicerídeos) bem como para o percentual de perda óssea alveolar (desfecho principal) para cada um dos grupos experimentais foi realizada por meio de análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Os níveis séricos de citocinas foram apresentados como medianas e intervalos interquartis e comparados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Artigo 1

Inter-relação entre Síndrome Metabólica e Doença
Periodontal: Uma Revisão da Literatura

Revista Periodontia – Braz J Periodontol v.22, Março 2012, p. 45-52



INTER-RELAÇÃO ENTRE SÍNDROME METABÓLICA E DOENÇA PERIODONTAL: UMA REVISÃO DA LITERATURA

Interrelationship between Metabolic Syndrome and Periodontal Disease: A Literature Review

Juliano Cavagni¹, Cassiano Kuchenbecker Rösing²

¹*Doutorando em Clínica Odontológica – Periodontia na Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

²*Professor Associado de Periodontia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

Recebimento: 28/11/11 - Correção: 20/12/11 - Aceite: 03/02/12

RESUMO

O presente estudo fez uma revisão da literatura sobre aspectos relacionados à inter-relação entre síndrome metabólica e doenças periodontais. Estudos de associação são demonstrados e uma reflexão sobre o que existe de evidências até o momento foi realizada para orientar profissionais da Medicina e da Odontologia. Dentre os principais achados, são destacados que estudos, especialmente em populações orientais, demonstram associação epidemiológica entre doenças periodontais e síndrome metabólica. Ensaios clínicos controlados com validade interna e externa ainda não existem, o que sugere aos profissionais da Medicina e da Odontologia a necessidade de manterem-se alertas para a possível associação, até que causalidade possa ou não ser estabelecida. Nesse sentido, é importante que sejam divulgadas à comunidade a informação e as hipóteses em estudo, para que se tenha uma abordagem interdisciplinar e multiprofissional na atenção ao portador de síndrome metabólica.

UNITERMS: Medicina periodontal, periodontite, resistência à insulina, revisão. *R Periodontia 2012; 22:45-52.*

INTRODUÇÃO

A Medicina Periodontal caracteriza-se por uma abordagem ampliada da Periodontia, contemplando inter-relações entre doenças periodontais e outras doenças e condições sistêmicas. Nesse sentido, um grande número de estudos, tanto em nível epidemiológico [incluindo delineamentos transversais, longitudinais e caso-controle] quanto em termos de pesquisa clínica [desde séries de casos até ensaios clínicos controlados] tem procurado demonstrar relações de causalidade entre as associações estudadas.

A inter-relação entre doenças periodontais e síndrome metabólica (SM) tem recebido destaque nos últimos anos e contempla dois problemas prevalentes. Nesse sentido, é importante que se tenham estudos com diferentes capacidades de gerar evidência, realizados em diferentes partes do mundo, para que se elucidem as possibilidades, até que se tenha o estabelecimento de uma como fator de risco para outra. A literatura, ainda que incipiente, tem gerado informações valiosas para a compreensão dos problemas e os profissionais da Medicina e da Odontologia necessitam estar alerta das evidências demonstradas até o momento. O objetivo deste artigo é apresentar uma revisão

narrativa da literatura, direcionada aos médicos e dentistas, especialmente aqueles que se dedicam à Endocrinologia e à Periodontia, a respeito da inter-relação entre SM e doenças periodontais.

Síndrome Metabólica

A SM é caracterizada pela ocorrência simultânea de anormalidades metabólicas incluindo obesidade com aumento da adiposidade centro visceral, resistência à insulina, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia, sendo a última representada pelo aumento nos níveis de triglicérides e redução nos níveis de colesterol HDL, as quais resultam em um aumento significativo na morbidade e mortalidade por afecções cardiovasculares [Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report, 2002]. Trata-se de um transtorno complexo representado por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares relacionados à deposição central de gordura e a resistência à insulina (SBC, 2005). A gordura visceral, característica da SM está relacionada ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, decorrente de ação da insulina, da leptina



e de neuropeptídeos hipotalâmicos, que desempenham papel fundamental na regulação do apetite e do metabolismo de indivíduos obesos [Voltera, Cesaretti *et al.*, 2008].

A associação de obesidade e desordens metabólicas com desfechos cardio/cerebrovasculares já era considerada muito antes do conceito "Síndrome Metabólica" ser aceito pela comunidade científica. No entanto, somente em 1988, o Dr. Gerald Reaven, em um estudo clássico, apontou que alguns fatores de risco para doenças cardiovasculares (dislipidemia, hipertensão, hipoglicemia, por exemplo) comumente manifestavam-se em conjunto (Reaven, 1988). A este agrupamento de fatores de risco, foi dado o nome de "Síndrome X". Mais tarde, o mesmo grupo de pesquisa, postulou que resistência à insulina seria a base para a Síndrome X, renomeando esta para "Síndrome da resistência à insulina".

Com o passar dos anos, outras anormalidades, particularmente estado pró-inflamatório crônico e estado pró-trombótico, foram adicionados ao conceito e tornaram a definição mais complexa. Adicionalmente, a obesidade abdominal como condição fundamental na etiopatogenia da síndrome, ganhou atenção. Nesse sentido, em 2002 foi publicado o III Relatório do Painel de Especialistas para Detecção, Avaliação e Tratamento do Colesterol Alto, que

definiu o termo "Síndrome Metabólica".

De acordo com essa definição, para ser diagnosticado como portador de SM, o indivíduo deve apresentar três dentre os cinco fatores a seguir: circunferência da cintura igual ou superior a 102 cm para os homens e 88 cm para as mulheres, níveis séricos de triglicédeos superiores a 150 mg/dl, colesterol HDL inferior a 50 mg/dl e 40 mg/dl para homens e mulheres respectivamente, pressão arterial igual ou superior a 130/85 mmHg e glicemia em jejum igual ou superior a 110 mg/dl.

Entretanto, a partir deste momento, diversas definições para a SM foram propostas. Por exemplo, segundo a OMS, para realizar diagnóstico de SM é necessário presença de resistência à insulina, associada a dois ou mais componentes (Tabela 1). Ainda, a Federação Internacional do Diabetes (FID) desenvolveu novos critérios para o diagnóstico da SM (Guerrero-Romero e Rodriguez-Moran, 2005), considerando a obesidade abdominal associada a dois ou mais componentes da SM (SBC, 2005). (Tabela 1).

A Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I-DBSM, 2005; SBH, 2004; SBC, 2005), segue as recomendações do *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III* (NCEP, 2002) na qual o diagnóstico de SM é firmado pela presença de três dentre quaisquer dos cinco componentes descritos

Tabela 1

DIFERENTES DEFINIÇÕES PROPOSTAS PARA SÍNDROME METABÓLICA			
Componentes	NCEP-ATP Pelo menos 3 componentes	OMS Hiperglicemia/Diabetes + 2 componentes	FID Obesidade abdominal + 2 componentes
Obesidade abdominal (CC)		Obesidade (IMC \geq 30 kg/m²) ou RCQ	
Homens	>102 cm	<0.9	> 94 cm
Mulheres	>88 cm	<0.85	\geq 80 cm
Triglicédeos	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl
Glicemia de jejum	\geq 110 mg/dl	\geq 110 mg/dl	\geq 100 mg/dl
Colesterol HDL			
Homens	<40 mg/dl	<35 mg/dl	<40 mg/dl
Mulheres	<50 mg/dl	<39 mg/dl	<50 mg/dl
Tensão arterial	\geq 130 mmHg ou \geq 85 mmHg	\geq 140 mmHg ou \geq 90 mmHg ou uso de anti-hipertensivo	\geq 130 mmHg ou \geq 85 mmHg
Microalbuminúria	---	\geq 20 μ g/min ou razão albumina:creatinina \geq 30 mg/g	---

Legenda: NCEP - ATP: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III; OMS: Organização Mundial da Saúde; FID: Federação Internacional do Diabetes; CC: Circunferência da Cintura; IMC: Índice de Massa Corporal; RCQ: Relação Cintura Quadril.



anteriormente.

A patogênese da Síndrome Metabólica não está completamente esclarecida, entretanto sugere-se a participação de três eixos etiopatogênicos, dentre eles, obesidade e distúrbios do tecido adiposo, resistência à insulina e alguns fatores que atuam independentemente, como moléculas de origem hepática, vascular e imunológica. Além disso, outros fatores como aumento na idade, estado pró-inflamatório e alterações hormonais têm sido apontados como envolvidos no desenvolvimento da síndrome (Grundy, Brewer *et al.*, 2004).

Epidemiologia da Síndrome Metabólica

Da mesma forma com o que vem acontecendo com a obesidade, a síndrome metabólica está se tornando uma condição cada vez mais prevalente tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Em um estudo transversal realizado nos Estados Unidos, foi verificado que a prevalência de SM foi de 23,7%. Quando estes dados foram estratificados para idade, houve um aumento na ocorrência de 6,7% em indivíduos de 20-29 anos para 43,5% em indivíduos de 60-69 anos (Ford, Giles *et al.*, 2002). Da mesma maneira, (Gu, Reynolds *et al.*, 2005) avaliaram uma amostra representativa de 15.540 chineses com idade entre 35 e 74 anos em 2000 e 2001, e verificaram que a prevalência de SM foi de 9,8 e 17,8% em homens e mulheres, respectivamente. Além disso, os autores relatam que a prevalência foi maior em regiões rurais do país.

No Brasil, raros estudos avaliaram as características epidemiológicas da síndrome metabólica. (Salaroli, Barbosa *et al.*, 2007) avaliaram, em um estudo transversal de base populacional, a prevalência de Síndrome Metabólica na cidade de Vitória (ES) em indivíduos com idade de 25-64 anos e verificaram uma prevalência de 29,8%. Observaram, também, que a prevalência aumentou progressivamente com a idade (15,8% e 48,3% para os grupos de 26-34 e 55-64 anos, respectivamente) e em mulheres de acordo com a redução no nível sócio-econômico.

Em Odontologia, tem havido por parte dos pesquisadores um crescente interesse no estudo da inter-relação da obesidade com as doenças periodontais. Essa preocupação torna-se evidente, à medida que boa parte do conhecimento científico disponível sobre esta temática foi produzido nos últimos 5 anos. Nesse sentido, a SM, por se tratar de uma condição intimamente ligada à obesidade, também tem despertado interesse na área odontológica.

Doenças Periodontais

As doenças periodontais são doenças de natureza infecto-

inflamatória que acometem os periodontos de proteção e de inserção (Page e Kornman, 1997). Segundo a Academia Americana de Periodontia (AAP), as doenças periodontais se subdividem em dois grupos principais: Gingivites e Periodontites. As gengivites são caracterizadas por uma inflamação na margem gengival causada pelo biofilme supragengival. Suas características clínicas são vermelhidão e sangramento à sondagem leve, bem como edema. Seu tratamento consiste na remoção de fatores retentivos de placa (como por exemplo, cálculo dental), motivação e orientação para o controle do biofilme supragengival. As periodontites acometem os tecidos de sustentação dos dentes (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento) e são causadas pelo biofilme subgengival. Suas características clínicas são presença de sangramento subgengival, formação de bolsa periodontal, aumento na mobilidade dental, perda de inserção e óssea, podendo levar à perda dentária (Armitage, 1999). O tratamento das periodontites consiste na remoção profissional de biofilme subgengival através de procedimentos de raspagem e alisamento radicular subgengival.

As manifestações de gengivites e periodontites são sabidamente influenciadas por alguns fatores ambientais, comportamentais, biológicos e medicamentosos. Entre eles estão alguns microrganismos componentes dos biofilmes supra e subgengival (Socransky e Hajfajee, 2005), o fumo (Bergstrom, Ellasson *et al.*, 2000; Geurs, Lewis *et al.*, 2003) e o diabetes (Taylor, Burt *et al.*, 1998). Existem ainda outros indicadores que têm sido apontados como modificadores do processo saúde/doença periodontal, como fatores socioeconômicos (Susin, Dalla Vecchia *et al.*, 2004), estresse (Brekik, Thrane *et al.*, 1996), polimorfismos genéticos (Kinane, Shiba *et al.*, 2005) osteoporose (Geurs, Lewis *et al.*, 2003), consumo excessivo de álcool (Tezal, Grossi *et al.*, 2004), obesidade (Dalla Vecchia, Susin *et al.*, 2005) e uso de alguns medicamentos, como Fenitoína e Ciclosporina (Kinane e Marshall, 2001).

É consenso na literatura a necessidade de uma infecção por bactérias para que ocorra quebra da homeostase tecidual que gerará destruição do periodonto (Lindhe, Hamp *et al.*, 1973). Portanto, tanto em situações onde há uma hiper-resposta, quanto em casos de imunossupressão, pode ocorrer uma piora na condição periodontal (Kinane e Lappin, 2001). Assim, estudos que avaliem a plausibilidade biológica e os efeitos de diferentes situações que modulam a resposta do hospedeiro são necessários.

Relação entre Síndrome Metabólica e Doença Periodontal

Poucos foram os estudos que avaliaram a relação entre



Quadro 1

ACHADOS PRINCIPAIS DOS DIFERENTES ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS QUE AVALIARAM A RELAÇÃO ENTRE SM E DP.					
Características da amostra	Exame periodontal/ Desfecho	Resultados	Comentário	Autores	
Estudos transversais					
EUA 13.677 indivíduos idade ≥ 17 anos NHANES III	Exame Parcial; DP moderada 2 sítios PI ≥ 4mm DP severa 2 sítios PI ≥ 6mm	SM (pelo menos 3) CC, homem/mulher < 102/ < 88 cm IMC ≥ 25 TA ≥ 130/85mmHg HDL homem/mulher < 40 e < 50mg/dl TG ≥ 150mg/dl Glicemia ≥ 110mg/dl	DP Leve (referência) DP Moderada 0.91 (0.56-1.48) DP severa 2.31 (1.13-4.73)	Análise ajustada para idade, gênero, anos de educação, taxa de pobreza, etnia e condições gerais e estratificada para fumo	D'aituto, Saibah <i>et al.</i> , 2008
Japão 1070 indivíduos 40-70 anos 281H/789M Serviço de Saúde do Município	CPI; Código 3 ou 4 (PS ≥ 4mm)	SM IMC ≥ 25 TA ≥ 130/85mmHg HDL(homem/mulher) < 40 e < 50mg/dl TG ≥ 150mg/dl Glicemia ≥ 110mg/dl	OR (IC 95%) 0 (referência) 1-1.34(0.9-1.8) 2-1.36(0.9-2.0) 3-2.13(1.2-3.7) 4/5- 2.34(1.08-5.08)	Examinadores foram treinados, porém não foi realizada reprodutibilidade. Não foi realizada avaliação da CC	Kushiya, Shimazaki <i>et al.</i> , 2009
Japão 584M 40-79 anos Hisayama Study	Exame parcial; PS média (≥ 2mm) e PI média (≥ 3mm)	SM CC, PS ≥ 2mm ≤ 88 > 88 CC, PI ≥ 3mm ≤ 88 > 88 HDL, PI ≥ 3mm ≥ 50mg/dL	OR (IC 95%) i (referência) 1.8 (1.2-2.8) i (referência) 0.9 (0.4-1.9) 2.8 (1.4-5.6)	Análise ajustada para idade e fumo	Shimazaki, Saito <i>et al.</i> , 2007
Brasil 1315 nipo-brasileiros 30-92 anos Japanese- Brazilian Diabetes Study Group	CPI DP Leve: 1 sítio PS4-5mm DP Severa: 1 sítio PS ≥ 6mm	SM (pelo menos 3) CC, homem/mulher < 102/ < 88 IMC > 25 kg/m ² TA ≥ 130/85mmHg HDL homem/mulher < 40 e < 50mg/dl TG ≥ 150mg/dl Glicemia ≥ 110mg/dl	OR (IC 95%) 0.44 (0.16-1.21)	Não há dados de reprodutibilidade dos examinadores;	Borges, Gimeno <i>et al.</i> , 2007
França 255 indivíduos 35 a 74 anos	Exame completo (4 sítios) DP moderada: 2 ou mais sítios interproximais com PI ≥ 4 mm ou PS ≥ 5mm, não no mesmo dente DP severa: 2 ou mais sítios interproximais com PI ≥ 6mm ou 1 ou mais com PS ≥ 5 mm, não no mesmo dente.	SM (pelo menos 3) CC, homem, mulher ≥ 102cm) ≥ 88cm TA ≥ 140/90mm-Hg* TG ≥ 150 mg/dl* LDL-C ≥ 160 mg/dl* Glicemia ≥ 126 mg/dl* *Considerou-se uso de drogas anti-hipertensivas, hipoglicêmicas e para hipocolesterolemia	OR DP moderada 1.54 (0.59-4.01) DP severa 1.97 (0.74-5.23)	Examinador calibrado. Análise ajustada para idade, gênero, nível de educação, fumo, consumo de álcool, CRP e biofilme dentário.	Benguigui, Bongard <i>et al.</i> , 2010



Características da amostra	Exame periodontal/ Desfecho	Resultados	Comentário	Autores	
Estudos transversais					
Coreia 1046 indivíduos ≥ 18 anos	CPI Sem periodontite (CPI 0 a 2) Com periodontite (CPI 3 ou 4)	SM (pelo menos 3) CC, homem/mulher ≥90 cm ≥85cm TG> 150 mg/dL HDL, homem/mulher <40/<50mg/dl TA>130/85mmHg* Glicemia > 110g/dL *Considerou-se uso de anti-hipertensivos.	OR (IC 95%) 1.7 (1.22-2.37)	Análise ajustada para idade, gênero, renda média da família, fumo, ingestão de álcool, frequência diária de escovação e atividade física. Examinadores calibrados (Kappa 0.62)	Han, Lim <i>et al.</i> , 2010
Japão 2478 indivíduos 24-60 anos	CPI CPI≤2 CPI≥3	SM IMC≥25kg/m ² TA≥130/85mmHg TG≥150 mg/dL HDL<40 mg/dL Glicemia≥110 mg/dL HbA1c ≥5.5	OR (IC 95%) 2.4 (1.7-2.7)	Análise ajustada para idade, gênero e fumo.	Morita, Ogawa <i>et al.</i> , 2009
EUA BLSA Study 200 indivíduos	Distância JAD-crista alveolar em RX panorâmicos <u>Perda alveolar:</u> -ausente ou leve: 1 a 2mm -moderada ou severa: ≥3mm	SM (pelo menos 2) CC, homem/mulher ≥102cm ≥88cm TG≥150mg/dl Glicemia > 110mg/dl TA≥130/85mmHg* *Considerou-se uso de anti-hipertensivos	OR(IC 95%) 2.61 (1.1 - 6.1)	Análise ajustada para idade, sexo, etnia e fumo. Não se realizou exame clínico periodontal.	Nesbitt, Reynolds <i>et al.</i> , 2009
Estudo de Caso-Controle					
China 208 participantes 37-78 anos Comunidade Beijing Gucheng	Exame completo (2 sítios por dente) Saúde: PI 0% DP Leve: PI>0-33% DP moderada: PI>33-67% DP Severa: PI>67%	SM (pelo menos 3) CC, homem/mulher <90/<80 TA≥130/85mmHg HDL homem/mulher<40 e <50mg/dl TG≥150mg/dl Glicemia≥100mg/dl	OR (IC 95%) Saúde: referência DP Leve: 6.9 (1.07-44.7) DP moderada: 9.9 (1.50-65.24) DP severa: 15.6 (2.20-110.43)	Análise ajustada para gênero, idade, e fumo Examinador treinado, porém não informados dados de reprodutibilidade	Li, He <i>et al.</i> , 2009

Legenda: CC – Circunferência da cintura; CPI – Índice periodontal comunitário; EI – Etíopes; HDL – Lipoproteína de alta densidade; IMC – Índice de massa corporal; LDL – Lipoproteína de baixa densidade; M – Mulheres; OR – Odds ratio; PI – Perda de inserção; PS – Profundidade de sondagem; SM – Síndrome Metabólica; DP – Doença Periodontal; TA – Tensão Arterial; TG – Triglicérides; IC – Intervalo de Confiança; PI – Perda de inserção; HbA1c – hemoglobina glicada.

SM e Doença Periodontal (Quadro 1). A maior parte dos estudos desenvolvidos é de natureza epidemiológica e utiliza delineamento do tipo transversal sendo a maioria realizada em populações asiáticas. A análise dos dados contempla estratificações para os principais fatores de confusão envolvidos na etiopatogenia de ambas as doenças. Adicionalmente, os

protocolos de exame periodontal são parciais e, na maioria, não são apresentados dados de reprodutibilidade dos examinadores. Com relação aos parâmetros da Síndrome Metabólica, a definição mais frequentemente utilizada foi a do National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III - ATP III (NCEP, 2001).



Apesar de utilizarem delineamentos semelhantes, os resultados dos estudos apresentaram-se bastante controversos. Alguns autores [Shimazaki, Saito *et al.*, 2007; D'Aiuto, Sabbah *et al.*, 2008; Kushiya, Shimazaki *et al.*, 2009; Li, He *et al.*, 2009; Morita, Ogawa *et al.*, 2009; Nesbitt, Reynolds *et al.*, 2009; Han, Lim *et al.*, 2010; Morita, Yamazaki *et al.*, 2010] encontraram associações significativas para a relação entre doença periodontal e síndrome metabólica. Isso significa que indivíduos portadores de parâmetros relacionados à síndrome metabólica apresentam risco aumentado de desenvolvimento de doenças periodontais. Por outro lado, [Borges, Gimeno *et al.*, 2007] e [Benguigui, Bongard *et al.*, 2010], ao avaliarem amostras de tipo-brasileiros e franceses, respectivamente, não encontraram associação entre as condições supracitadas. Uma possível explicação para as diferenças existentes entre os estudos são os critérios utilizados pelos autores na classificação de ambas as doenças.

A influência da doença periodontal sobre os parâmetros da SM também foi recentemente avaliada por Morita *et al.* 2010. Os autores demonstraram que a presença de periodontite esteve relacionada a uma piora nos parâmetros da SM ao longo de 4 anos sugerindo que a prevenção das doenças periodontais poderia interferir em desfechos relacionados à SM.

Apenas um estudo piloto foi publicado até o momento avaliando o efeito da terapia periodontal em pacientes portadores da síndrome metabólica. O mesmo tratou-se de um estudo de intervenção realizado na Índia com 31 indivíduos incluídos [Acharya, Bhavsar *et al.*, 2010]. Foram realizadas comparações dos parâmetros de inflamação sistêmica pós-terapia periodontal, em um período de dois meses. Os resultados mostraram redução significativa nos níveis de triglicérides e aumento significativo dos níveis de colesterol HDL nos indivíduos com síndrome metabólica. Quanto ao colesterol LDL, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Por tratar-se de um estudo piloto com amostra e tempo de acompanhamento reduzidos, os dados devem ser interpretados com cautela, uma vez que estudos com essa limitação apresentam poder estatístico reduzido e, portanto, baixa validade interna e externa.

Muitos são os fatores apontados pelos estudos epidemiológicos que serviram de plausibilidade biológica para a associação entre SM e periodontite. Dentre eles, pode-se destacar estresse oxidativo, estado pró-inflamatório sistêmico, resistência à insulina, hiperlipidemia, hiperinsulinemia, entre outros. Entretanto, a dificuldade para a realização de estudos em humanos que visem constatar a plausibilidade dos possíveis processos biológicos envolvidos no processo

saúde-doença é notável.

Atenção periodontal ao portador de síndrome metabólica – Considerações práticas

Como demonstrado na presente revisão, a inter-relação entre doenças periodontais e SM tem sido estudada, entretanto as evidências ainda são incipientes para a transformação na prática clínica. Entretanto, há clara indicação de potencial associação, tanto em termos epidemiológicos, quanto em outros desenhos experimentais. No momento, como em qualquer outro tipo de problema, é importante que os profissionais da Medicina e da Odontologia estejam alertas da associação e informem a comunidade das possíveis interações.

No que concerne a prática clínica, a atuação interdisciplinar, multiprofissional é recomendada, para que, caso haja a confirmação das hipóteses até o presente estudadas incipientemente, não se tenha perdido a oportunidade de que os indivíduos portadores dos problemas em tela fossem beneficiados por uma prática que contempla o conhecimento. Entretanto, também é importante que se tenha claro que não se pode assumir, na clínica, que a inter-relação é verdadeira e provada, evitando, assim, abordagens clínicas equivocadas. A Medicina e a Odontologia, em conjunto, poderão, unindo seus esforços e conhecimento, colaborar para que a saúde dos indivíduos e comunidades seja cada vez melhor, incluindo a relação entre SM e doenças periodontais.

ABSTRACT

The present study performed a literature review about aspects related to the interrelationship between metabolic syndrome and periodontal diseases. Association studies are demonstrated and a reflexion about the existing evidence up to date was performed in order to inform Medical and Dental professionals. Among the main findings, studies are detailed, especially in oriental populations, in which epidemiological association between metabolic syndrome and periodontal diseases is demonstrated. Controlled clinical trials with internal and external validity are inexistent, suggesting that medical and dental professionals should keep alert of the possible association until causality can or cannot be established. In this sense, it is important that the information and the hypotheses under test are spread to the community in order to emphasize an interdisciplinary and multiprofessional approach to the individual that has metabolic syndrome.

UNITERMS: periodontal medicine, periodontitis, insulin resistance, review



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) [final report]. *Circulation* 2002; 106: 3143-3421.
- 2- Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arq. Bras. Cardiol.* 2005; 84 suppl. 1
- 3- Voltera AF, Cesaretti ML, Ginoza M, Kohlmann O, Jr. [Effects of neuroendocrine obesity induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2008; 52: 47-54.
- 4- Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37: 1595-1607.
- 5- Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M. Concordance between the 2005 International Diabetes Federation definition for diagnosing metabolic syndrome with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III and the World Health Organization definitions. *Diabetes Care* 2005; 28: 2588-2589.
- 6- Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; 109: 433-438.
- 7- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-359.
- 8- Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds RF, Whelton PK, He J. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet* 2005; 365: 1398-1405.
- 9- Salaroli LB, Barbosa GC, Mill JG, Molina MC. [Prevalence of metabolic syndrome in population-based study, Vitoria, ES-Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2007; 51: 1143-1152.
- 10- Page RC, Komman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 1997; 14: 9-11.
- 11- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4: 1-6.
- 12- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005; 38: 135-187.
- 13- Bergstrom J, Eliasson S, Dock J. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 61-68.
- 14- Geurs NC, Lewis CE, Jeffcoat MK. Osteoporosis and periodontal disease progression. *Periodontol* 2000 2003; 32: 105-110.
- 15- Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Ann Periodontol* 1998; 3: 30-39.
- 16- Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol* 2004; 75: 1033-1041.
- 17- Breivik T, Thrane PS, Murison R, Gjermo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci* 1996; 104: 327-334.
- 18- Kinane DF, Shiba H, Hart TC. The genetic basis of periodontitis. *Periodontol* 2000 2005; 39: 91-117.
- 19- Tezal M, Grossi SG, Ito AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 484-488.
- 20- Dalla Vecchia CF, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol* 2005; 76: 1721-1728.
- 21- Kinane DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent J* 2001; 46: 2-12.
- 22- Lindhe J, Hamp S, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontol Res* 1973; 8: 1-10.
- 23- Kinane DF, Lippin DF. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 2001; 59: 154-160.
- 24- Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. *J Dent Res* 2007; 86: 271-275.
- 25- D'Aiuro F, Sabbah W, Netuweli G, Danos N, Hingorani AD, Deanfield J, Tsakos G. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 3989-3994.
- 26- Koshiyama M, Shimazaki Y, Yamashita Y. Relationship between metabolic syndrome and periodontal disease in Japanese adults. *J Periodontol* 2009; 80: 1610-1615.
- 27- Li P, He L, Sha YQ, Luan QX. Relationship of metabolic syndrome to chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; 80: 541-549.
- 28- Morita T, Ogawa Y, Takada K, Nishinoue N, Sasaki Y, Motohashi M, Maeno M. Association between periodontal disease and metabolic syndrome. *J Public Health Dent* 2009; 69: 248-253.
- 29- Nesbitt MJ, Reynolds MA, Shiau H, Choe K, Simonsick EM, Ferrucci L. Association of periodontitis and metabolic syndrome in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Clin Exp Res* 2009; 22: 238-242.
- 30- Han DH, Lim SY, Sun BC, Paek D, Kim HD. The association of metabolic syndrome with periodontal disease is confounded by age and smoking in a Korean population: the Shiwaha-Bamwol Environmental Health Study. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 609-616.
- 31- Morita T, Yamazaki Y, Mita A, Takada K, Seto M, Nishinoue N, Sasaki Y, Motohashi M, Maeno M. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. *J*



Periodontol 2010; 81: 512-519.

- 32- Borges PK, Gimeno SG, Tomita NE, Ferreira SR. [Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease]. *Cad Saude Publica* 2007; 23: 657-668.
- 33- Bengulguç C, Bongard V, Ruldavets AB, Chamontin B, Sixou M, Ferrières J, Amar J. Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: a cross-sectional study in a middle-aged French population. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 601-608.
- 34- Acharya A, Bhavsar N, Jadav B, Parikh H. Cardioprotective effect of periodontal therapy in metabolic syndrome: a pilot study in Indian subjects. *Metab Syndr Relat Disord* 2010; 8: 335-341.

Endereço para correspondência:

Juliano Cavagni

Av. Neusa Goulart Brizola, 555 – AP. 403

CEP: 90460-230 - Porto Alegre - Rio Grande do Sul - Brasil

Telefone: +55 51 3273 2499

E-mail: jcavagni@hotmail.com

Artigo 2

Obesity May Increase Spontaneous Periodontal Disease
in Wistar Rats

Submetido a revista Archives of Oral Biology

Obesity may increase spontaneous periodontal disease in Wistar rats

Juliano Cavagni^(a)

Tassiane Panta Wagner^(b)

Eduardo José Gaio^(a)

Rodrigo Otávio Citó César Rêgo^(c)

Iraci Lucena da Silva Torres^(d)

Cassiano Kuchenbecker Rösing^(e)

(a) PhD student, Section of Periodontology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(b) Undergraduate student, Faculty of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(c) Associate Professor, Division of Periodontics, School of Pharmacy, Dentistry and Nursing, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil;

(d) Associate Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(e) Professor of Periodontology, Section of Periodontology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

***Corresponding Author:**

Juliano Cavagni
Av. Neusa Goulart Brizola, 555/ap. 403
Porto Alegre/RS, Brazil
ZIP Code: 90460-230
Phone: +55 51 3273 2499
Email: jcavagni@hotmail.com

ABSTRACT

Objective: to evaluate the effect of body weight on the occurrence of spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.

Methods: Twenty-eight rats were randomly divided in two groups. Control group received standardized rat chow diet and water. Test group received cafeteria (CAF) diet during 17 weeks. The diet was available for both groups *ad libitum*. Body weight and Lee Index were evaluated. At the end of the experimental period, rats were killed by decapitation and maxillae were defleshed with 9% sodium hypochlorite. Morphometric analysis was performed in digital standard photographs. Presence of spontaneous periodontitis was considered when mean alveolar bone loss was $\geq 0.51\text{mm}$ (75th percentile). Statistical analysis was performed with chi-square test, Mann Whitney and independent samples t-Test (significance level $P \leq 0.05$).

Results: After 17 weeks of exposure to standard CAF diet, a statistically significant mean difference in body weight (g \pm SD) (478 \pm 43 vs. 580 \pm 60) and Lee Index (3.07 \pm 0.05 vs. 3.24 \pm 0.07) was observed between control and obesity groups, respectively. Median of alveolar bone loss (mm \pm SD) for test and control groups was 0.438 \pm 0.17 and 0.411 \pm 0.08, respectively. In animals submitted to CAF diet, 20 sites were classified as spontaneous periodontal disease, whereas in control animals, only 8 sites exhibited periodontal breakdown according cut-off point (75th percentile). A statistically significant difference between groups was detected ($P=0.009$).

Conclusions: It may be concluded that obesity increases occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats.

Key Words: Obesity, spontaneous periodontitis, cafeteria diet.

INTRODUCTION

Obesity, the major nutritional disorder in developed and developing countries, is characterized by extreme body fat accumulation related to lean body mass¹. It is known to increase risk for several chronic inflammatory diseases and conditions such as cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, and arthritis². Systematically, clinical studies demonstrated higher blood levels of proinflammatory cytokines in obese patients when compared to non-obese subjects³⁻⁵.

In the last decades, the evidence linking obesity to the occurrence of periodontal disease has grown both in epidemiological and clinical studies. Presence of worse periodontal disease parameters such as bleeding on probing, severe periodontal pockets and alveolar bone loss were noticed in individuals with higher indicators of obesity⁶⁻¹¹. It is still unclear whether obesity truly precedes periodontitis. However, the underlying biological mechanisms for the association of obesity and periodontitis most likely involve adipose tissue-derived cytokines and hormones¹². Additionally, recent studies suggest an association between obesity and putative periodontopathogens (red complex) in obese subjects¹³.

In the etiopathogenic process of periodontal diseases, the inflammatory pattern is one of the determinants of alveolar bone loss¹⁴. The production of inflammatory cytokines by the adipose tissue has also been considered important in the homeostasis of periodontal breakdown¹². In this sense, studies in animals have shown evidence that obese animals tend to respond to the challenge of inducing disease differently. The study by Verzeletti et al (2012) demonstrated increased ligature-induced bone loss in obese rats. However, Simch et al (2008) did not observe higher degrees of periodontal breakdown in overweight rats.

Studies evaluating the occurrence of spontaneous alveolar bone loss related to fat accumulation are nonexistent. Therefore, the hypothesis to be tested is that obesity increases spontaneous periodontal breakdown in rats. The aim of this study was to evaluate the effect of obesity on the occurrence of spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.

METHODS

STUDY DESIGN

This is a prospective, randomized, controlled, and blinded animal model study. The protocol followed all recommendations of the *ARRIVE* (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) guidelines for execution and submission of studies in animals¹⁵. The study protocol was submitted and approved by the Animal Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (protocol number 110051). The protocol complies with the regulations set down by the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO – January 27, 1978) and the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS). Figure 1 demonstrates the flowchart of the study.

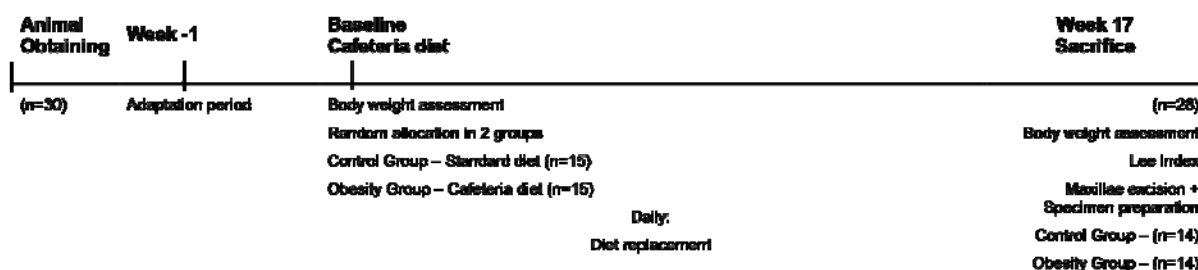


Figure 1 – Study flowchart.

ANIMALS

Twenty-eight (out of thirty), 60 days-old, male Wistar rats (weighting approximately 350g) completed the present study. Animals were housed in groups of 4-5 under a light/dark cycle of 12 hours and room temperature ($22^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) with free access to water and the allocated diet. All necessary procedures to minimize pain and discomfort were carried out by experienced researchers.

The sample size calculation was based in a study by our group, in which a significant difference was observed on spontaneous alveolar bone loss¹⁶. Taking into consideration the variability of measurements of alveolar bone loss, and accepting as significant differences among experimental groups of 0.06mm, with alpha and beta errors of 0.05 and 0.2, respectively. The estimated number of animals in each group

was 13. Based on attrition rates observed in our previous studies, 15 rats in each group were included.

RANDOMIZATION AND GROUP ALLOCATION

Animals were randomly divided into 2 experimental groups according to body weight. A stratified randomization strategy was used in order to minimize possible group impairment at baseline. Strata comprised tertiles of body weight and randomization was performed by draw within these categories in the following groups:

Control group: Standardized rat chow (Nuvilab CR-1, NUVITAL[®], Curitiba, PR, Brazil).

Obesity group (Cafeteria diet-induced obesity): High fat and hypercaloric diet.

CAFETERIA DIET-INDUCED OBESITY

A palatable hyperlipidic and hypercaloric diet consisted of 55% carbohydrates, 20% lipids, 20% proteins and 5% of other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives, minerals, etc.), adapted from a hyperlipidic diet known as cafeteria diet (CAF diet) or western diet¹⁷. The percentage of nutrients was calculated from the information provided by the manufacturer. CAF diet comprised sausage, filled cookies, wafer, condensed milk, chips and soft drink. Animals also had access to standard chow and water.

Diet was replaced daily to allow consumption of fresh and varied food, as well as water, soft drink and condensed milk. All foods were available *ad libitum* both for obesity and control groups.

BODY WEIGHT AND LEE INDEX ASSESSMENTS

Animals were weighted at baseline and at week 17. Additionally, at the end of experimental period, the naso-anal length was measured in order to calculate the Lee Index¹⁸, by means of the following formula:

$$\sqrt[3]{BW(g) / NAL(cm)}.10$$

This index corresponds to the ratio between the cube root of body weight (g) and naso-anal length (cm) of the animals multiplied by 10.

SACRIFICE

Animals were sacrificed 110 days after baseline by decapitation 24 hours after the last body weight assessment.

SPECIMEN PREPARATION

Maxillae were removed, sectioned, and defleshed in 9% sodium hypochlorite for 2 hours and the remained soft tissue was removed mechanically. After this period, specimens were washed and dried. For a better visualization of the cemento-enamel junction (CEJ), maxillae were stained with 1% methylene blue, according to Fernandes et al. (2007)¹⁹.

MORPHOMETRIC ANALYSIS

The morphometric analysis was performed by standard digital photographs. Pictures were taken using a 6.1 megapixel digital camera (Nikon™ Coolpix, Ayutthaya, Thailand) coupled to a tripod and equipped with 100mm macro-lenses with minimal focal distance. Specimens were fixed to an endodontic ruler, parallel to the ground. Photographs of the buccal and palatal aspects of right and left hemimaxillae were taken.

A calibrated examiner performed the measurements of the linear distances from the cemento-enamel junction to the bone crest, using Adobe Photoshop™ CS4 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). Group distribution was kept by an external researcher, in order to warrant blindness of the examiner. Five measurements were performed on each surface of second molar both buccally and palatally (two on the distal root, two on the mesial root and one on the furcation). The measurements in pixels were then converted into millimeters using the markings of the endodontic ruler to which the hemimaxillae were attached as reference (Figure 2).

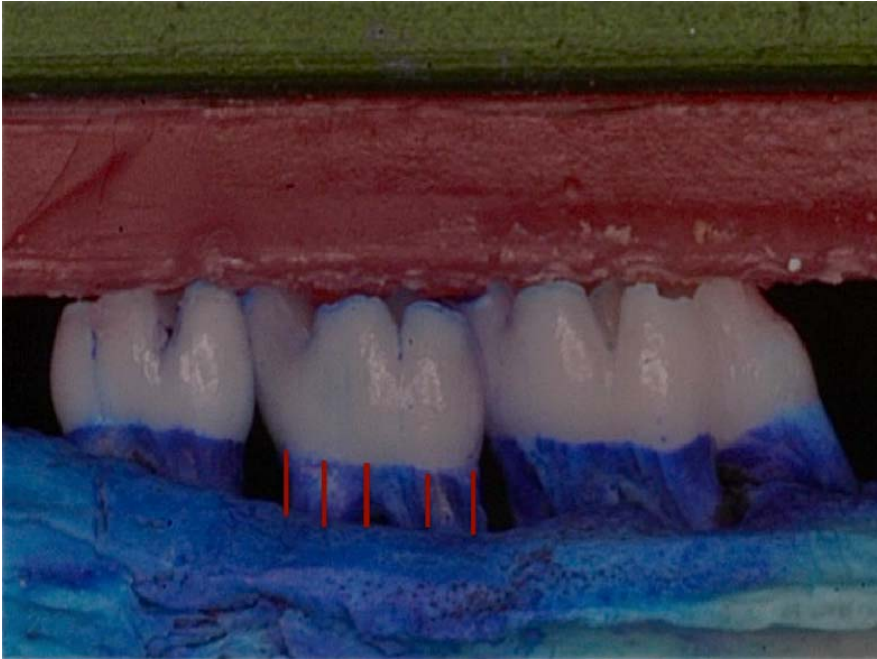


FIGURE 2 - Specimen and measurements on the buccal surface.

All procedures for specimen preparation, photographs as well as morphometric analysis were performed at the Laboratory of Periodontology of the Federal University of Rio Grande do Sul and followed the methods proposed by Fernandes et al. 2007¹⁹.

DEFINITION OF SPONTANEOUS PERIODONTITIS

The primary outcome of the present study was the occurrence of periodontitis. For that, a cut-off point was established, in order to define periodontal disease occurrence. An analysis of all measurements was performed and the 75 percentile was considered the cut-off point. Thus, measurements $\geq 0.51\text{mm}$ were considered as spontaneous periodontal breakdown.

REPRODUCIBILITY

Twenty pictures for the morphometric analysis were randomly selected to be double-measured with a one-week interval. The intra-class correlation (ICC) coefficient between measurements was 0.98

Body weight measurements were repeated in 20% of the sample at baseline and 30% at week 17. The calculated ICC was 0.87 and 0.99 at baseline and week 17, respectively.

Repeated measurements of naso-anal length was performed in 9 animals at the end of experimental period and the reproducibility of the Lee Index demonstrated an ICC of 0.94.

STATISTICAL ANALYSIS

For all evaluated parameters the normality was tested by Shapiro-Wilk test. Mean body weight and Lee Index were calculated for obesity and control groups and compared by means of independent samples t-Test.

Median and interquartile range of the distance from the CEJ to the alveolar bone crest for buccal and palatal sites were calculated and compared by means of Mann Whitney test. Sites classified as positive for periodontal disease occurrence were compared among obesity and control groups by means of chi-square test. All analyses were performed in Stata 10.1 for Macintosh (Stata™, College Station, TX). The level of significance was set as 0.05.

RESULTS

Two animals (one from the obesity and one from the control group) died during the experiment. The necropsies revealed no relationship to the protocol. Body weight of animals at baseline was of approximately 350g, with no statistically significant difference among groups. After 17 weeks of exposure to CAF or standard diet, a statistically significant difference in body weight was observed among groups and is demonstrated in Table 1. Animals exposed to the hyperlipidic and hypercaloric diet presented increased body weight as compared to controls.

Table 1 – Mean weight in grams (\pm SD) for groups and time periods.

Group	Baseline	Week 17
Control	345 \pm 37	478 \pm 43
Obesity	347 \pm 28	580 \pm 60
<i>P</i> Value*	=.8	<.01

*Independent sample t-test

Figure 3 demonstrates the Lee Index at week 17. The observed means for obesity and control groups were 3.24 ± 0.07 and 3.07 ± 0.05 , respectively. A statistically significant difference was demonstrated among groups, suggesting obesity. ($P < 0.05$).

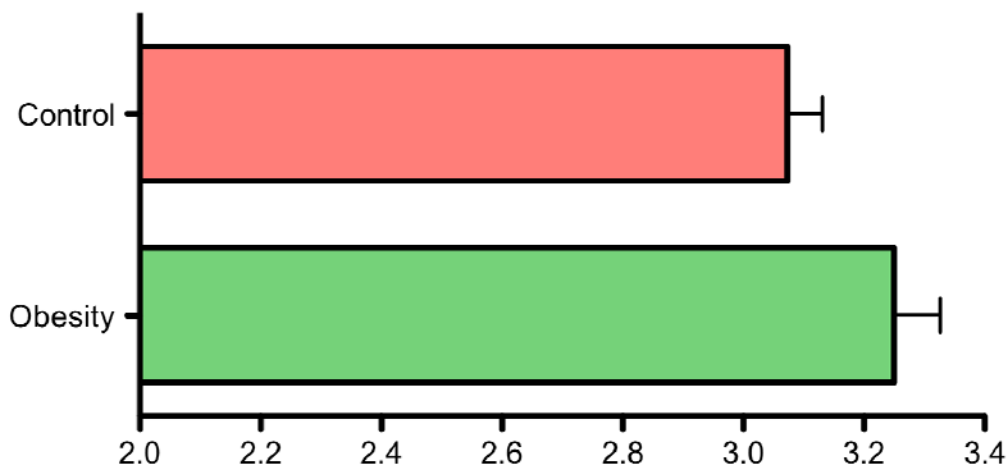
**Figure 3** – Mean Lee Index (g/cm) at week 17 for obesity and control groups.

Figure 4 shows data distribution of alveolar bone loss for both obesity and control groups at the end of experimental period. It could be observed that median (percentile 25 and 75) of alveolar bone loss was 0.438 (0.236 – 0.555) and 0.411 (0.344 – 0.499) for obesity and control groups, respectively. No significant differences were observed between groups ($P = 0.11$).

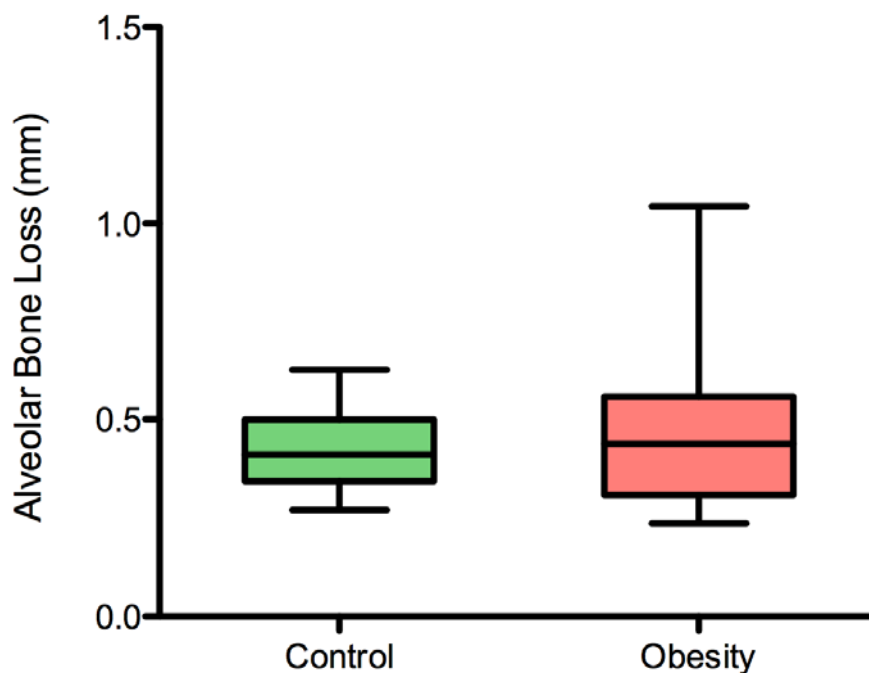


Figure 4 – Median and interquartile range (mm) of alveolar bone loss for Obesity and Control groups. Mann Whitney ($P>0.05$).

No adverse events were observed during the experiment. The main outcome of the present study is demonstrated in Table 2. In animals submitted to CAF diet, 20 sites were classified as experiencing spontaneous periodontal breakdown, whereas in control animals, only 8 sites exhibited periodontal breakdown according to the present cut-off point. A statistically significant difference among groups was detected ($P=0.009$).

Table 2 – Occurrence of periodontal breakdown on sites according to group.

Group	Sites With periodontitis	Sites Without periodontitis
Control	8	48
Obesity	20	36

Chi-square test $P=0.009$

DISCUSSION

The present animal study evaluated the effect of obesity related parameters on spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. The results showed that the CAF

diet-induced obesity was associated with an increase in occurrence of periodontal disease.

The study of pathogenesis of periodontal breakdown has experienced profound modifications in its understanding. This is related to the fact that most studies that evaluated etiopathogenic processes of periodontal diseases in rats used different disease induction models^{20, 21}. One question has always been made in these models, related to a possible excessive amount of challenge present in the models (bacteria, ligatures, incisions etc.). However, recently inquiries have been made to these models since studies demonstrated that in areas where disease was not induced, it was possible to observe periodontal breakdown^{22, 16}.

The definition of cut-off points for presence or absence of periodontal disease is a core question. However, to the best of our knowledge, there was no definition about this issue in the literature. Our study used a definition of presence of periodontal disease based on 75 percentile of all measurements of the sample. Data distribution has been used in epidemiological research for definitions of disease, based on the assumption that the continuous distribution of the outcome is an expression either of severity or of the highly affected^{23, 24}. In this sense, a cut-off point in the third quartile was determined in the present study in order to distinguish sites with the highest levels of periodontal breakdown from those experiencing limited disease.

Obesity has been considered an important risk indicator for periodontal disease⁶⁻¹¹. However, the biological mechanisms for the association remain obscure. Indirect evidence suggest that adipose tissue cytokines and hormones could play a key role as modifiers of host response contributing to periodontal breakdown. Some studies have evaluated the effect of diet-induced overweight and obesity on ligature induced alveolar bone loss in rats^{25, 26}. The results demonstrate that obesity can increase ligature induced alveolar bone loss. The present study evaluated spontaneous alveolar bone loss without any method of disease induction since the presence of a ligature, for example, could increase total amount of bacteria or represent an excessive challenge for host.

One important fact that has to be highlighted in the present study is that obesity was induced by CAF diet. Diet consistency and bedding could influence spontaneous alveolar bone loss due to attrition of chow and wooden chip on periodontal tissues²². However, in the present study, animals in obesity group

received both CAF diet and rat chow, and both groups, obesity and control, were maintained in similar cages. Therefore, the comparability of the exposures in this sense limits the possibility of bias.

The exposure variable of the present study is obesity. A difference of approximately 18% in body weight was observed among groups. This has been assumed in the literature as inferring obesity²⁷. Additionally to body weight measurements, the Lee Index was calculated and a statistically significant difference was observed in mean values. Therefore, one can assume that rats in the obesity group are obese.

CAF diet induced obesity can increase body weight, generate hyperinsulinemia, hyperglycemia, glucose intolerance and increased adiposity and hepatic steatosis^{28, 29}. Therefore, one important limitation that has to be taken into consideration is the possible effects of these problems in periodontal breakdown, especially if rats became diabetics. However, epidemiological studies have also used reported diabetes as a sole indicator of glucose intolerance^{8, 9}. The possibility of this interaction should not be ruled out. However, it is well known that obesity is strongly associated with diabetes and therefore both problems should be addressed of part of the same set of conditions.

The possible explanation for the increased periodontal breakdown in obese animals relates to the inflammatory status associated with obesity. Higher productions of pro-inflammatory cytokines such as IL-6, TNF- α , etc. have been reported in obese individuals³⁻⁵.

The study performed by Verzeletti et al (2012) encountered higher degrees of ligature-induced alveolar bone loss in obese rats, while the study by Simch et al (2008) could not demonstrate this difference in overweight rats. The classical study by Perlstein and Bissada³⁰ also demonstrated higher degrees of periodontal disease in obese rats. These findings are in accordance with epidemiological studies that have associated periodontal disease with obesity, but not with overweight^{6, 9, 31}. This study relied on a rigid quality control using all possible mechanisms to avoid bias i.e. sample size calculation, randomization, blinding and reproducibility analysis. Therefore, increased internal validity is warranted. Also, with these methodological characteristics, a reduction in the number of animals in studies is possible. It should be emphasized that animal studies are still an important part of determining causality and Wistar rats are the most used model in periodontal research, especially because

of the biological and anatomical similarities with human periodontium^{32, 21}. It can be concluded that obesity increases the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats.

REFERENCES

1. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic; 1998.
2. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
3. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res*. 2005 May 13;96(9):939-49.
4. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*. 2000 May 9;101(18):2149-53.
5. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000 Apr 18;101(15):1767-72.
6. Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawski EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *J Periodontol*. 2003 May;74(5):610-5.
7. Borges-Yanez SA, Irigoyen-Camacho ME, Maupome G. Risk factors and prevalence of periodontitis in community-dwelling elders in Mexico. *J Clin Periodontol*. 2006 Mar;33(3):184-94.
8. Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *J Periodontol*. 2006 Mar;77(3):479-89.
9. Dalla Vecchia CF, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1721-8.
10. Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study. *J Periodontol Res*. 2005 Aug;40(4):346-53.
11. Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res*. 2001 Jul;80(7):1631-6.
12. Saito T, Shimazaki Y, Sakamoto M. Obesity and periodontitis. *N Engl J Med*. 1998 Aug 13;339(7):482-3.

13. Haffajee AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):89-99.
14. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:9-11.
15. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthi I, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Vet Clin Pathol*. 2010 Mar;41(1):27-31.
16. Liberman DN, Pilau RM, Gaio EJ, Orlandini LF, Rosing CK. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral Biol*. 2011 Feb;56(2):109-13.
17. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004 Feb;20(2):218-24.
18. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*. 1968 Apr;40(4):527-8.
19. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res*. 2007 Jul-Sep;21(3):216-21.
20. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011: Article ID 754857. 8p.
21. Struillou X, Boutigny H, Soueidan A, Layrolle P. Experimental animal models in periodontology: a review. *Open Dent J*. 2010;4:37-47.
22. Bjornsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res*. 2003 Dec;38(6):543-50.
23. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR, Jr., et al. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: Results from the Continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. Publish Ahead of Print, published online July 26, 2012.
24. Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1742-9.
25. 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.

26. Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rosing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci.* 2012 Mar-Apr;20(2):218-21.
27. Svensson AM, Hellerstrom 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.
28. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012 Nov;38(1):189-96.
29. Miesel A, Muller H, Thermann M, Heidbreder M, Dominiak P, Raasch W. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab.* 2011;56(2):127-42.
30. Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977 May;43(5):707-19.
31. Linden G, Patterson C, Evans A, Kee F. Obesity and periodontitis in 60-70-year-old men. *J Clin Periodontol.* 2007 Jun;34(6):461-6.
32. Listgarten MA. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. *J Periodontol.* 1975 Nov;46(11):677-80.

Artigo 3

Metabolic Syndrome May Modulate Alveolar Bone Loss
in Wistar Rats

Em Manuscrito (submissão prevista para o Journal of Periodontal Research)

Metabolic Syndrome Modulates Alveolar Bone Loss In Wistar Rats

Juliano Cavagni^(a)

Isabel Cristina de Macedo^(b)

Eduardo José Gaio^(a)

Andressa Souza^(b)

Rafael Scaf de Molon^(c)

Joni Augusto Cirelli^(d)

Iraci Lucena da Silva Torres^(e)

Cassiano Kuchenbecker Rösing^(f)

(a) PhD student, Section of Periodontology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(b) PhD student, Department of Pharmacolgy, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(c) PhD student, Department of Diagnosis and Surgery, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil;

(d) Assistant Professor of Periodontology, Department of Diagnosis and Surgery, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, Brazil;

(e) Associate Professor of Pharmacolgy, Department of Pharmacolgy, Institute of Basic Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

(f) Professor of Periodontology, Section of Periodontology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

Running title

Metabolic Syndrome Modulates Alveolar Bone Loss In Rats

Corresponding Author:

Juliano Cavagni

Av. Neusa Goulart Brizola, 555/ap. 403

Porto Alegre/RS, Brazil

ZIP Code: 90460-230

Phone: +55 51 3273 2499

Email: jcavagni@hotmail.com (email can be published)

KEY WORDS:

Syndrome X, Insulin Resistance Syndrome, micro tomography, Obesity, Periodontal Disease.

Funding: This study was supported by the Coordination for Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES – Brazil Grant PROCAD NF – 2008) and Incentive Fund for Research and Events of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – Brazil Grant number 110051)

Conflict of interest: The authors declare not to have conflicts of interest

ABSTRACT

Background and Objective: epidemiological studies have demonstrated a positive association between Metabolic Syndrome (MetS) and periodontitis, however studies about the biologic plausibility between the two conditions are inexistent. The aim of the present study is to evaluate the role of metabolic syndrome in the pathogenesis of alveolar bone loss in Wistar rats.

Material and Methods: 60 male Wistar rats were randomly divided in four groups: control (CT), periodontal disease (PD), metabolic syndrome (MetS) and metabolic syndrome + periodontal disease (MetS+PD). Groups MetS and MetS+PD were exposed to a high fat hypercaloric diet (Cafeteria diet). At week 12, periodontal disease was induced in groups PD and MetS+PD, by placement of a silk ligature at the upper right second molar. The contralateral molar was considered intra-group control. Body weight and Lee index were evaluated weekly during the entire experimental period. Serum glucose and cholesterol/triglycerides in the liver were evaluated at week 17. Percentage of alveolar bone loss (%ABL) was measured by micro tomography (μ CT) and serum TNF- α and IL1- β evaluated by Elisa at the end of the experimental period.

Results: 58 animals completed the study. There was an increase in body weight, Lee index, cholesterol/triglycerides in the liver for groups that were exposed to cafeteria diet showing that the model was effective in reproducing MetS parameters. No significant differences in glucose levels were observed between the groups. Groups PD and MetS+PD exhibited a significant higher %ABL when compared to CT and MetS groups. The presence of MetS significantly increased %ABL in MetS+PD group as compared to PD group (53.60 ± 3.44 versus 42.78 ± 7.27 , respectively). A significant increase in %ABL was detected in groups in which metabolic syndrome was induced ($P \leq 0.01$) in sides with and without ligature. No significant differences were observed between CT and PD as well as in MetS and MetS+PD for the sides without ligature. No significant differences were observed between groups for IL1- β and TNF- α .

Conclusions: presence of MetS modulates the host response to challenges in the periodontium, probably increasing the expression of periodontal breakdown.

KEY WORDS: Syndrome X, Insulin Resistance Syndrome, microtomography, Obesity, Periodontal Disease.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by the simultaneous occurrence of metabolic abnormalities including obesity, impaired glucose tolerance or diabetes, hypertension and dyslipidemia. It has been associated with a series of negative outcomes, including from cardiovascular problems to increased inflammatory status (1).

The prevalence of MetS has increased lately both in western and eastern countries and its consequences are of public health concern (2, 3). Numerous definitions have been proposed for MetS, but the criteria proposed by the National Cholesterol Education Program's Third Adult Treatment Panel (ATPIII) (1) are actually the most used. Metabolic syndrome can be identified as the presence of three or more of the following components: obesity, elevated triglycerides levels, decreased HDL cholesterol levels, elevated fasting glucose levels and elevated blood pressure. The pathogenesis of MetS is not completely clear, although it has been suggested the involvement of three pathways: obesity and adipose tissue disorders, insulin resistance and other factor that act independently as hepatic, vascular, and immune molecules as well as pro-thrombotic and pro-inflammatory state (4).

Epidemiological studies have demonstrated that MetS is associated with higher degrees of periodontal destruction in different populations (5-10). However, while some of these studies found that individuals with MetS presented an increase of approximately twice in risk of periodontal disease, (7-10) others found no association between the conditions (5, 6). Additionally, the mechanisms related to this association are still obscure. It is possible that the inflammatory burden present in MetS is also capable of modifying the host response to the dental biofilms.

In this sense studies about the biological plausibility underlying the association of MetS and periodontal disease are lacking. The aim of the present study is to assess the role of MetS in the pathogenesis of alveolar bone loss in Wistar rats. The hypothesis to be tested is that MetS is associated with higher degrees of periodontal destruction.

MATERIAL AND METHODS

Study Design

The present study followed a randomized, prospective, controlled, animal model design. Figure 1 describes the flowchart of the study in detail.

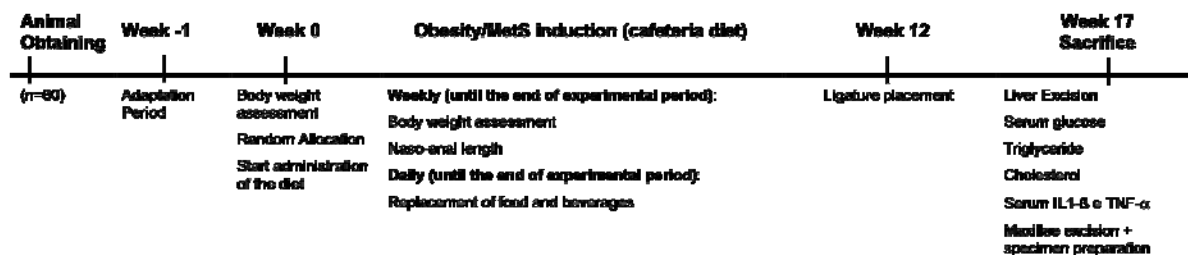


Figure 1 – Study flowchart

Animals

A total of 60 male, 60 days-old Wistar rats, weighing approximately 350g were used in the present study. Animals were housed in plexiglass cages in groups of 5 rats each. During the entire experimental period, they were kept in a silent room under a light/dark cycle of 12 hours and controlled temperature ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) with free access to water and the allocated diet. The study protocol was submitted and approved by the Animal Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (protocol number 110051). The protocol complies with the regulations set down by the Universal Declaration of Animal Rights (UNESCO – January 27, 1978) and the International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Animals (Council for International Organizations of Medical Sciences – CIOMS).

Sample Size Calculation

Sample size estimation was based in a study performed by Verzeletti et al. (2012) (11) which evaluated the effect of obesity on ligature-induced alveolar bone loss in Wistar rats using similar methods of the present experiment.

Alveolar bone loss was considered the main outcome for sample size calculation. A sample of 14 animals for each group was estimated considering a power of 80% to detect a difference of approximately 0.14mm between experimental groups. The significance level considered for the estimation was 5%. Based on previous studies performed by our research group, an attrition rate of approximately 10% was considered, totaling 60 animals.

Random Allocation

Animals were randomly divided into 4 experimental groups according to body weight. A stratified randomization strategy was used in order to minimize possible group impairment at baseline. Strata comprised tertiles of body weight and randomization was performed by draw within these categories in the following groups:

Control Group (CT): animals received standardized rat chow (Nuvilab CR-1, NUVITAL™, Curitiba, PR, Brazil). There was no induction of periodontal disease as well as metabolic syndrome.

Periodontal Disease Group (PD): periodontal disease was induced by ligature placement and animals received standardized rat chow (Nuvilab CR-1, NUVITAL™, Curitiba, PR, Brazil) during all experimental period.

Metabolic Syndrome Group (MetS): metabolic syndrome was induced by a high fat and hypercaloric diet during the entire experimental period. There was no induction of periodontal disease.

Metabolic Syndrome and Periodontal Disease Group (MetS+PD): Both, metabolic syndrome and periodontal disease were induced as described above.

Experimental Procedures

Metabolic Syndrome Model

MetS was induced through a palatable hyperlipidic and hypercaloric diet consisting of 55% carbohydrates, 20% lipids, 20% proteins and 5% of other constituents (sodium, calcium, vitamins, preservatives and minerals), adapted from a hyperlipidic diet known as cafeteria diet (CAF diet) or western diet, previously described in the literature (12-14). Cafeteria diet comprised sausage, filled cookies, wafer, condensed milk, chips and soft drink. The diet was calculated based on information provided by the manufacturer. Animals also had access to standard chow and water.

The diet was available *ad libitum* and was replaced daily to allow consumption of fresh and varied food, as well as water, soft drink and condensed milk.

Periodontal Disease Model

After a period of 12 weeks of diet exposure and the establishment of MetS, periodontal disease was induced by placement of a silk ligature (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brazil) on the right upper second molar with the knot made on

the buccal side (15, 16). The contra lateral second molar was considered the intra-group control. Ligature placement was performed under general anesthesia with inhaled 5V% isoflurane (Isoforine™ Cristália, SP, Brazil), vaporized in 100% oxygen by facemask. All anesthetic procedures were performed by a veterinarian. At this time, blood samples were collected from the retro-orbital region and centrifuged for 5 minutes in 5000 x g at room temperature and the serum obtained was frozen at -70°C.

Body Weight and Lee Index Assessments

Animals were weighted with a digital scale and the naso-anal length measured weekly, by a trained and calibrated examiner. The data was used to calculate the Lee Index (17) by means of the following formula:

$$\sqrt[3]{BW(g) / NAL(cm)}.10$$

This index corresponds to the ratio between the cube root of body weight (g) and the naso-anal length (cm) of the animals multiplied by 10.

Specimen Preparation

The animals were killed at week 17 after the baseline (30 days after placing the ligature) by decapitation 24 hours after the last evaluation *in vivo* by a trained investigator. Immediately, the trunk blood was collected and centrifuged for 5 minutes in 5000 x g at room temperature. Supernatant serum were pipetted and frozen at -70°C until the moment that laboratory assays were run.

The maxillae were removed and stored in pots containing 10% neutral buffered formalin for 24 hours. Maxillae were defleshed with 9% sodium hypochlorite for 2 hours and soft tissue removed carefully. After this period, the specimens were washed and kept in 70% ethanol until computer microtomography analysis.

Laboratory assays

Serum glucose

Serum glucose levels of the sample were measured using commercial kits brand Bioclin™. The measurements were performed in automatic biochemistry analyzer Mindray BS-120™.

Triglycerides and cholesterol

A sample of liver tissue was homogenized in saline solution (1mg liver : 20 μ L saline). The homogenate was used for triglyceride dosage by means of bioliquid kit (Bio diagnóstica, Laborclin, Brazil). The cholesterol concentration was obtained from 1mL of the same homogenate used in the measurement of triglycerides. To this homogenate 250 μ L of 50% TCA was added and the solution centrifuged in 20000rpm/10min. The supernatant was pipetted and placed for drying and pellet formation. After, it was added chloroform-methanol for dissolution and centrifuged in 20000rpm/10min. The procedure was repeated for 3 times and, following 250 μ L of isopropanol were added. The measurement was performed in kits for cholesterol evaluation (Bio diagnóstica, Laborclin, Brazil). Both, triglyceride and cholesterol dosages were performed according to manufacturer instructions in 500nm spectrophotometer.

Microtomography (μ CT) Analysis

Each hemi-maxillae (right and left) were scanned with μ CT system (Skyscan, 1176, Aartselaar, Belgium). The x-ray generator was operated at 50 kVp, beam current at 500 μ A, 0.5mm aluminum filter at an image resolution of 12.45 μ m. The images were reconstructed with specific software (NRecon1.6.1.5 – Skyscan, Belgium) in all three spatial dimensions and then, all images were orientated and saved in sagittal slices (2000 x 1336) with Skyscan software (Data Viewer 1.4.3.1 - Skyscan, Belgium). The volumetric measurements were performed after the selection of a 3-D ROI (region of interest) with CTAn program (CT Analyzer 1.10.1.0 - Skyscan, Belgium). During the drawing of the ROI the examiner was guided by morphological landmarks. The ROI was delimited from the most mesial root of third molar to the most distal root of first molar, which served as endpoint landmark borders, since the experimental periodontal destruction and the majority of the bone loss was evident on the second molar around the furcation and interproximal area. After the delimited landmark borders, the contours of the ROI were drawn at regular intervals with a slice-based method, every 10 planes, resulting in minimum inclusion of the teeth roots and maximum quantification of alveolar bone. All contours were drawn beginning immediately below the cemento-enamel junction (CEJ) and moving 3mm in the apical direction. Thus, the entire bone area of the interproximal region and the furcation

area of the second molar were involved in the ROI. Finally, on the original three-dimensional image, the indices were calculated through the binarized ROI. The architectural parameter evaluated was percentage of alveolar bone loss (%ABL) that represents the volume of the mineralized tissue around the defect.

Cytokine Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The serum TNF- α levels were measured using a commercially available ELISA kit (Catalog E91033Ra, *USCN, Life Science, Inc - USA*), and the data are expressed as pg/mL. The serum IL1- β levels were measured using a commercial Linco ELISA Kit (Catalog E90563Ra, *USCN, Life Science, Inc - USA*), and the data are expressed as ng/mL. The measurements were performed according to the instructions contained in the package insert of the kit, according to the manufacturer's guidelines.

Reproducibility

Body weight and Lee index reproducibility as evaluated weekly during the experimental period in 10% of the sample. Intra-class correlation coefficient (ICC) remained near 0.99 for body weight and varied from 0.80 to 0.92 for Lee index. Microtomography analysis was performed by one examiner and reproducibility evaluated by means of test and retest in 20% of the sample. ICC calculated was 0.99.

Cytokine and Biochemical assays were performed by a trained examiner in uni and duplicate respectively, and followed all laboratory and manufacturer's recommendations

Statistical Analysis

For each evaluated parameter the normality was tested by means of Shapiro-Wilk test and the appropriate statistical test was selected according to this assumption. Mean and standard deviation of weight and Lee index for each experimental group were generated and compared by repeated measures one-way ANOVA, followed by Bonferroni multiple comparison test.

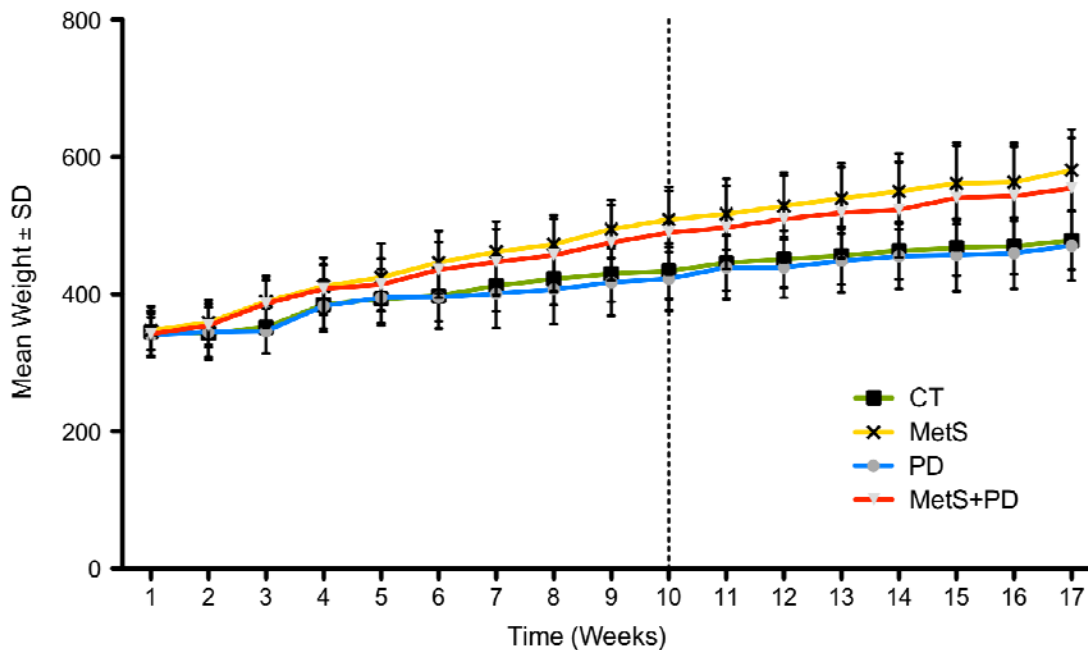
Mean and standard deviation of biochemical assays (cholesterol and triglycerides), as well as the percentage of alveolar bone loss (main outcome) for each experimental group were performed by means of one-way ANOVA, followed by Bonferroni multiple comparison test. Serum levels of cytokines were presented as

median and 25th and 75th percentiles and compared by Kruskal-Wallis test. The significance level was set at 0.05.

RESULTS

The results of the present study comprise information about the parameters related to the establishment of MetS, the main outcome and some pro-inflammatory cytokines that could help the understanding of the findings. One animal in MetS and one in the CT group were lost in the second and fourth weeks of the experimental period, respectively. The necropsy revealed that deaths occurred by mycoplasma infection, therefore not related to the protocol. A total of fifty-eight (58) animals completed the protocol and were included in analysis.

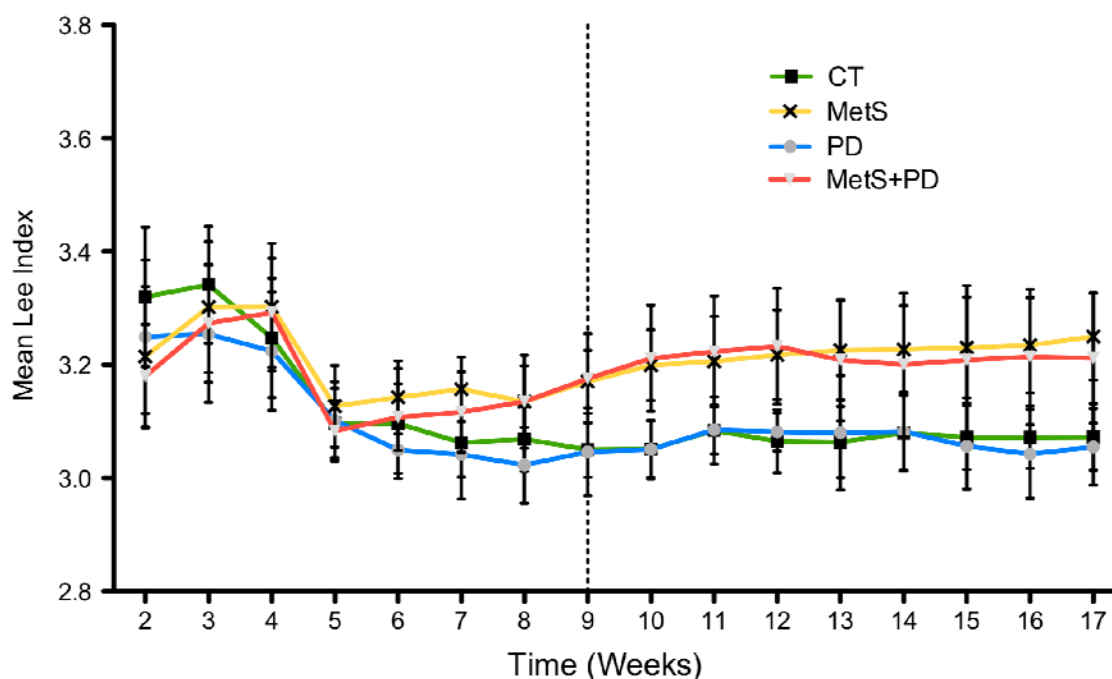
Mean weight (grams) (\pm SD) at baseline was 344.9 ± 36.9 , 340.86 ± 30.7 , 347.0 ± 28.5 and 342.2 ± 23.9 for CT, PD, MetS and MetS+PD, respectively, without statistically significant between-group differences (Figure 2). A significant increase in body weight was observed for all experimental groups over time. However, in animals receiving the cafeteria diet, an alteration in the pattern of weight gain was detected. From week 10 until the end of the experimental period, MetS and MetS+PD groups exhibited a statistically significant difference in body weight as compared to CT and PD groups. There was a significant association between time and group, which means that in animals from MetS and MetS+PD groups, weight gain was higher compared to CT and PD animals.



Dashed line indicates the moment from which significant difference occurred between groups exposed to the diet as compared to CT and PD groups.

Figure 2 - Mean weight (g \pm SD) for the groups during the experimental period

Results from the Lee Index are demonstrated in Figure 3. Similarly to body weight, in the first 5 weeks, some variation occurred in the Lee Index, without any clear tendency in the experimental groups. From week 6, mean values of Lee Index for CT and PD groups remained stable throughout the experimental period. In groups that received cafeteria diet (MetS and MetS+PD), a statistically significant increase (as compared to CT and PD) in Lee Index was observed until week 12, (moment of ligature placement). Repeated Measures ANOVA revealed a significant interaction between groups and between time and groups ($P \leq 0.01$) for Lee Index.



Dashed line indicates the moment from which significant difference occurred between groups exposed to the diet as compared to CT and PD groups.

Figure 3 - Mean Lee Index (\pm SD) for the groups during experimental period

Figures 4 and 5 illustrate cholesterol and triglycerides (mg) accumulation in 100mg of liver according to the experimental groups. There was a statistically significant increase in both cholesterol and triglycerides for groups exposed to cafeteria diet when compared to CT and PD groups. When MetS and MetS+PD groups are compared, a statistically significant higher means of cholesterol and triglycerides/100mg of liver was observed for MetS+PD group as compared to MetS group (2.04 ± 0.66 versus 1.34 ± 0.52) and (2.93 ± 0.90 versus 1.99 ± 0.61), respectively. No statistically significant differences were observed for cholesterol and

triglycerides between CT and PD groups. Mean (\pm SD) serum glucose levels in mg/dl were 131.21 ± 10.34 , 125.33 ± 14.66 , 128.76 ± 16.87 , 130.00 ± 13.23 for CT, PD, MetS and MetS+PD, respectively. No statistically significant differences were observed between experimental groups ($P=0.69$).

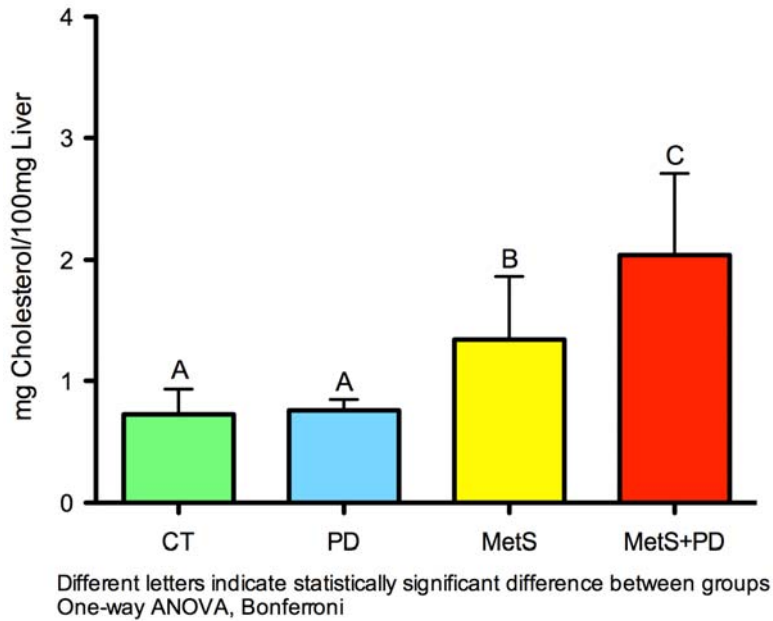


Figure 4 - Mean \pm SD Cholesterol (mg)/100 mg of liver according to experimental groups

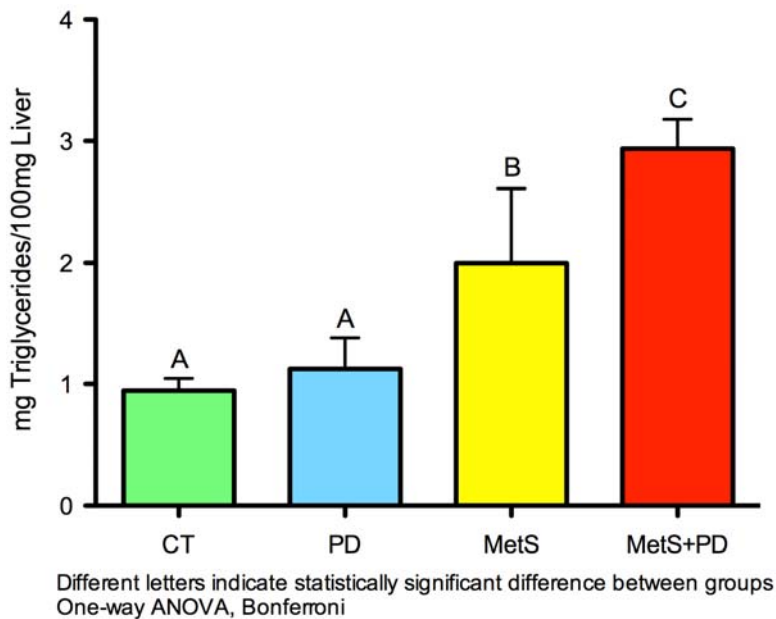


Figure 5 - Mean \pm SD Triglycerides (mg)/100 mg of liver according to experimental groups

The percentage of alveolar bone loss was analyzed separately for left and right sides according to the presence of ligature in groups PD and MetS+PD. All animals exhibited some degree of alveolar bone loss, independently of the presence of ligature. Table 1 demonstrates %ABL, according to the experimental group in right sites (with ligature) and left sites (without ligatures). For the groups in which ligature was placed (PD and MetS+PD), mean %ABL was significantly higher (42.78 ± 7.27 and 53.60 ± 3.44) when compared to groups without ligature (28.08 ± 1.97 and 33.64 ± 4.43) ($P < 0.01$). The presence of MetS significantly increased in approximately 10% alveolar bone loss in sites with ligature (PD and MetS+PD groups). Sites without ligature exhibited a significant increase in %ABL for the groups which MetS was induced ($P \leq 0.01$). No significant differences were observed between CT and PD as well as in MetS and MetS+PD on the left sites.

Table 1: Mean (\pm SD) of %ABL for right and left sites according to experimental groups.

	Right sites (with ligature in PD and MetS+PD)	Left sites (all groups without ligature)
CT	28.08 ± 1.97 A	27.68 ± 2.42 A
PD	42.78 ± 7.27 B	27.30 ± 1.76 A
MetS	33.64 ± 4.43 C	33.68 ± 7.30 B
MetS+PD	53.60 ± 3.44 D	35.13 ± 4.86 B

Means followed by different letter demonstrate statistically significant differences One-way ANOVA, Bonferroni post-Hoc test

Figures 6 and 7 demonstrate median and interquartile range of serum cytokines according to the experimental groups. No statistically significant differences were observed between groups for IL1- β and TNF- α ($P=0.35$ and $P=0.62$, respectively).

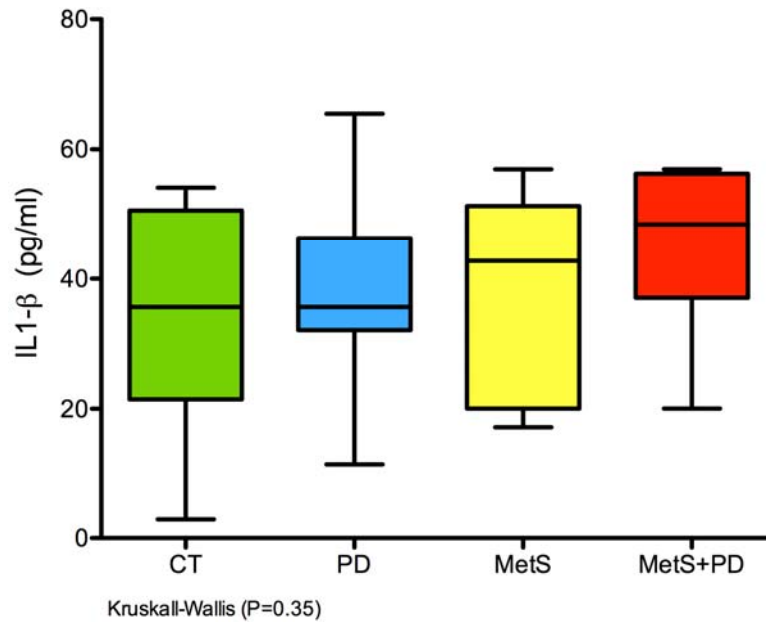


Figure 6 - Median and interquartile range of serum IL1- β according to the experimental groups

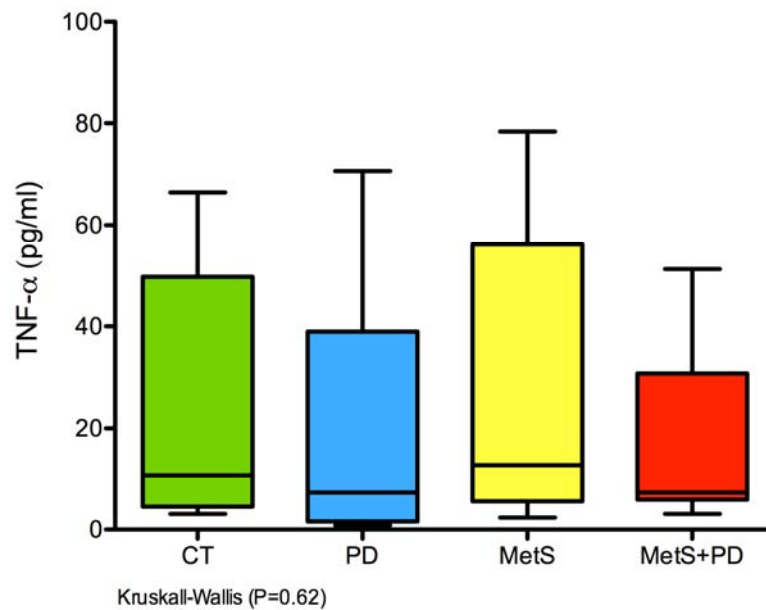


Figure 7 - Median and interquartile range of serum TNF- α according to the experimental groups

DISCUSSION

The present study aimed at assessing the role of metabolic syndrome in the establishment of periodontal breakdown in rats. In general, the presence of metabolic syndrome generated higher degrees of alveolar bone loss. In order to understand the underlying factors by which this result can be explained, it is important that the methods and outcomes are put into perspective and analyzed in the light of the current literature.

Metabolic syndrome has been characterized as the concomitant presence of hypertension, hyperlipidemia, hyperglycemia and obesity (1). This is an important and increasing problem in populations and may be responsible for death and other impacting problems (18). However, the evidence concerning MetS and different diseases should be supported by epidemiological and experimental data. In terms of epidemiology, MetS has been associated with an increase in morbidity and mortality by cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus (19, 20). The association between MetS and periodontal diseases has been demonstrated in several studies.(5, 7-9, 21-27)

To the best of our knowledge, experimental studies in animals analyzing the influence of MetS on periodontal breakdown are inexistent. The present study was performed in Wistar rats, which have been widely used in studies concerning pathogenesis of periodontal diseases, being a recognized and adequate model (28-31). Additionally, studies that have looked at the effects of MetS in other conditions were performed in Wistar rats (32, 33).

One of the key questions in trying to assess the effect of MetS on periodontal breakdown is the establishment of MetS. The present study utilized a high fat and hypercaloric diet, which is able to induce obesity and MetS (11, 13). Animals were exposed to the so-called cafeteria diet during 12 weeks before the induction of periodontal breakdown. This period has been demonstrated in the range to generate MetS (13, 14). However, one should keep in mind that it is interesting to assess the different parameters that are considered as part of MetS in the group under study. Therefore, we checked, at the end of the experiment, the parameters that allow for the classification of the test groups as having MetS. Hypertension was not evaluated in the present study, taking into consideration that the most accurate form of measuring blood pressure is invasive, and we decided not to expose the animals to this stress which could be a source of confounding bias (34).

The first component of MetS that was evaluated is obesity. For that purpose, in the present study, two ways of measuring obesity were used: body weight and Lee Index. All animals included in the present investigation were weighted at baseline and were randomly assigned to the experimental groups after stratification by weight tertiles. This strategy allowed that all groups were balanced by initial weight. Therefore, at baseline, mean weight was approximately 350g without any statistically significant difference among groups. As the experimental period progressed, mean values were increasing for all groups. However, groups that were exposed to the CAF diet (MetS and MetS+PD) gained more weight. From week 10 on, a statistically significant difference was demonstrated between groups exposed and not exposed to the diet. At week 17, the difference in body weight between groups exposed (MetS and MetS+PD) and not exposed (CT and PD) was of approximately 18%. This difference has been considered in the literature as possible to infer obesity (35).

Taking into consideration the possibilities of different interpretation of the body weight as a sole measurement of obesity, the present study also calculated the Lee Index (17). Similarly to the results of body weight, the Lee Index presented a statistically significant difference among groups exposed and not exposed to the diet. This difference started at week 9 and continued throughout the study period. It should also be emphasized that both parameters allow for a diagnosis of obesity and reproducibility tests were performed in order to check reliability, demonstrating excellent levels of reproducibility, with ICC greater than 0.80 for all measurements. Additionally to obesity, hyperlipidemia is an indicator of MetS. In the present study, two parameters of hyperlipidemia were used: triglycerides and cholesterol. Both of these measurements were performed after sacrifice in the liver. This form of evaluation has been used in the literature (36) and is considered an adequate method of analyzing hyperlipidemia. The results of the present study clearly demonstrate that the level of triglyceride is higher in animals exposed to CAF diet as compared to animals not exposed to it. In a similar way, cholesterol levels were higher after exposure to CAF diet. One intriguing and interesting finding took place in the present experiment. Both triglyceride and cholesterol levels were higher and with a statistically significant difference in animals presenting MetS and PD as compared to those without the induction of periodontal breakdown. There is a possibility that the microbial challenge present in ligature-induced periodontal disease in animals with MetS would be a potentiating factor for hyperlipidemia parameters. The literature

supports these findings from cross sectional studies (37, 38). If this is true, an important additional impact of periodontal disease is demonstrated in MetS individuals. A study by Morita (2010) demonstrated with a longitudinal design this possible role of periodontal disease in worsening MetS parameters thus suggesting that periodontal prevention and treatment may help in MetS (39).

Glucose levels were also measured in the animals, however no statistically significant differences were observed. The fasting glucose levels were of approximately 140 mg/dl. The absence of statistically significant difference does not allow that this parameter is considered in the diagnosis of the syndrome. MetS was warranted in the present study by the unequivocal differences in obesity, cholesterol and triglycerides. It has been advocated that when 3 parameters are concomitantly present, MetS is diagnosed (1). Therefore, one can assume that the groups MetS and MetS+PD harbor metabolic syndrome. The comparisons are made with animals from CT and PD groups, which do not present MetS.

The main outcome of the present study is periodontal breakdown. This was used in order to estimate the sample size. A similar study with obesity (11) was used and a minimum number of 14 animals was considered necessary. Two groups presented loss of one animal, not related to the protocol and therefore the groups of the present study comprise 14-15 animals, which allows for the minimum necessary power.

Periodontal breakdown was measured by microcomputer tomography. This is one interesting and novel form of evaluating areas and volume of bone loss (40). Previously to the initiation of measurements, reproducibility analysis was performed by the examiner and revealed high levels of reliability with an ICC of 0.99. The results of the present study were analyzed both in sites with and in sites without ligature. The former are the ones in which the challenge is higher and the latter would represent natural occurrence of periodontal breakdown.

The impact of MetS and of the presence of ligatures is demonstrated in Table 1. In sites without ligature, it was demonstrated that animals with MetS presented higher levels of periodontal breakdown as compared to animals without MetS. In the presence of ligatures, all groups presented statistically significant differences as compared to others in relation to bone loss. The lowest degree of bone loss was presented by the control group (CT), followed by the group exposed solely to the ligature (PD); the presence of metabolic syndrome (MetS) lead to higher periodontal

breakdown as compared to groups CT and PD, however with less bone loss than that presented by group MetS+PD.

The interpretation of such findings is challenging. It is clear that the presence of the ligature is capable of leading to bone loss. However, MetS seems to be a higher challenge, leading to bone loss, even in the absence of the ligature. The explanation to this fact could be related to the inflammatory burden that has been demonstrated in the literature, which includes increase in plasma secretion of TNF- α , C-Reactive Protein and IL-6 (41).

The analysis of some cytokines performed in the present study (IL-1 β and TNF- α) did not reveal statistically significant differences among groups as it could be anticipated. Several facts can contribute to this, including the expected variability in the parameter, which is of considerable size. It could be interpreted that an insufficient number of analyzes could account for the absence of differences. However, it should be kept in mind that the main outcome of the present study is periodontal breakdown and the analysis of cytokines is an explanatory variable. The benefit of including different cytokines, or increasing the number of animals is not clear and also not in line with the current principle of reducing the number of animals (42).

The findings of the present study in general support the hypothesis that metabolic syndrome is a potentiating factor for periodontal breakdown. This information adds to the epidemiological data from cross sectional studies to consider MetS as a risk indicator for periodontal diseases. However, different other study designs both from epidemiological as well as clinical points of view are necessary.

The possible explanations for the findings also need support from laboratory evidence. The eventual role of periodontal breakdown in elevating hyperlipidemia parameters should not be disregarded. However, one should keep in mind that every study has limitations and strategies to diminish flaws. One strategy that should be highlighted in the present study is that animals from all groups received standard rat chow and the MetS and MetS+PD groups received cafeteria diet in addition. This strategy was used in order to avoid that the differences in the consistency of the diets would account for the differences in the findings (43). Also, reproducibility analyses, random allocation, best laboratory practice among others were performed in order to increase the internal validity of the study.

It should be highlighted that the findings of the present animal study need to be interpreted in the perspective of the capacity of generating evidence. Rat studies are important in order to establish biological plausibility, however the translational potential is not direct. Studies in humans, under clinical settings are necessary for confirmation of the present findings.

In conclusion, the presence of MetS modulates the host response to challenges in the periodontium, probably increasing the expression of periodontal breakdown in rats.

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian National Council of Research (CAPES – Brazil Grant PROCAD NF -2008) and Research and Event Foundation of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE – Brazil Grant number 110051). The authors would like to thank the São Paulo Research foundation for support in micro-tomography analysis.

References

- 1 Anonymous. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; **106**: 3143-3421.
- 2 Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; **287**: 356-359.
- 3 Gu D, Reynolds K, Wu X, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet* 2005; **365**: 1398-1405.
- 4 Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004; **109**: 433-438.
- 5 Benguigui C, Bongard V, Ruidavets JB, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: a cross-sectional study in a middle-aged French population. *J Clin Periodontol* 2010; **37**: 601-608.
- 6 Borges PK, Gimeno SG, Tomita NE, Ferreira SR. [Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease]. *Cad Saude Publica* 2007; **23**: 657-668.
- 7 D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 3989-3994.
- 8 Han DH, Lim SY, Sun BC, Paek D, Kim HD. The association of metabolic syndrome with periodontal disease is confounded by age and smoking in a Korean

population: the Shiwha-Banwol Environmental Health Study. *J Clin Periodontol* 2010; **37**: 609-616.

9 Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. *J Dent Res* 2007; **86**: 271-275.

10 Timonen P, Niskanen M, Suominen-Taipale L, Jula A, Knuutila M, Ylostalo P. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries. *J Dent Res* 2010; **89**: 1068-1073.

11 Verzeletti GN, Gaio EJ, Linhares DS, Rosing CK. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *J Appl Oral Sci* 2012; **20**: 218-221.

12 Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004; **20**: 218-224.

13 Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011; **19**: 1109-1117.

14 Miesel A, Muller H, Thermann M, Heidbreder M, Dominiak P, Raasch W. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. *Ann Nutr Metab* 2010; **56**: 127-142.

15 Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Behling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res* 1982; **17**: 263-274.

16 Galvao MP, Chapper A, Rosing CK, Ferreira MB, de Souza MA. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003; **17**: 56-62.

17 Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol* 1968; **40**: 527-528.

18 Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, et al. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002; **288**: 2709-2716.

19 Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; **24**: 683-689.

20 Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care* 2004; **27**: 2676-2681.

21 Andriankaja OM, Sreenivasa S, Dunford R, DeNardin E. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. *Aust Dent J* 2010; **55**: 252-259.

22 Fukui N, Shimazaki Y, Shinagawa T, Yamashita Y. Periodontal status and metabolic syndrome in middle-aged Japanese. *J Periodontol* 2012; **83**: 1363-1371.

23 Kushiya M, Shimazaki Y, Yamashita Y. Relationship between metabolic syndrome and periodontal disease in Japanese adults. *J Periodontol* 2009; **80**: 1610-1615.

24 Kwon YE, Ha JE, Paik DI, Jin BH, Bae KH. The relationship between periodontitis and metabolic syndrome among a Korean nationally representative sample of adults. *J Clin Periodontol* 2011; **38**: 781-786.

25 Li P, He L, Sha YQ, Luan QX. Relationship of metabolic syndrome to chronic periodontitis. *J Periodontol* 2009; **80**: 541-549.

26 Morita T, Ogawa Y, Takada K, et al. Association between periodontal disease and metabolic syndrome. *J Public Health Dent* 2009; **69**: 248-253.

- 27 Nesbitt MJ, Reynolds MA, Shiau H, Choe K, Simonsick EM, Ferrucci L. Association of periodontitis and metabolic syndrome in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Clin Exp Res* 2010; **22**: 238-242.
- 28 Fine DH. Of mice and men: animal models of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2009; **36**: 913-914.
- 29 Madden TE, Caton JG. Animal models for periodontal disease. *Methods Enzymol* 1994; **235**: 106-119.
- 30 Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* 2011; **2011**: 754857.
- 31 Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol* 1999; **26**: 335-340.
- 32 de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA, Stevanato E, de Mello MA. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr* 2009; **101**: 1178-1184.
- 33 Kitagawa A, Ohta Y, Ohashi K. Melatonin improves metabolic syndrome induced by high fructose intake in rats. *J Pineal Res* 2012; **52**: 403-413.
- 34 Kurtz TW, Griffin KA, Bidani AK, Davissou RL, Hall JE. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: e22-33.
- 35 Svensson AM, Hellerstrom 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; **151**: 507-511.
- 36 Cahova M, Dankova H, Palenickova E, Papackova Z, Kazdova L. The opposite effects of high-sucrose and high-fat diet on Fatty Acid oxidation and very low density lipoprotein secretion in rat model of metabolic syndrome. *J Nutr Metab* 2012; **2012**: 757205.
- 37 Fentoglu O, Oz G, Tasdelen P, Uskun E, Aykac Y, Bozkurt FY. Periodontal status in subjects with hyperlipidemia. *J Periodontol* 2009; **80**: 267-273.
- 38 Lim LP, Tay FB, Sum CF, Thai AC. Relationship between markers of metabolic control and inflammation on severity of periodontal disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Periodontol* 2007; **34**: 118-123.
- 39 Morita T, Yamazaki Y, Mita A, et al. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. *J Periodontol* 2010; **81**: 512-519.
- 40 Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jr., et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol* 2007; **78**: 273-281.
- 41 Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**: 2127-2131.
- 42 Festing MF. Reduction of animal use: experimental design and quality of experiments. *Lab Anim* 1994; **28**: 212-221.
- 43 Bjornsson MJ, Velschow S, Stoltze K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontol Res* 2003; **38**: 543-550.

Artigo 4

Síndrome Metabólica: Qual é seu significado para a
Odontologia?

Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry, Out/Dez 2012, v8 n.4 p.
466-468

Novas Tendências

SÍNDROME METABÓLICA: QUAL É SEU SIGNIFICADO PARA A ODONTOLOGIA?

Metabolic syndrome: what is the meaning for dentistry?



Juliano Cavagni
Pós-graduação em Clínica Odontológica, Especialização em Periodontia, da UNICAMP



Cassiano Kuchenbecker Rosing
Professor Assessor de Periodontia da UNICAMP
Rua Dr. Welfo, 433/701, 90580-910, Porto Alegre, RS, Brasil
crosing@terra.com

RESUMO

A síndrome metabólica é definida pela ocorrência simultânea de alterações que incluem obesidade abdominal, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia. Sua prevalência tem sido considerada alta, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, e associada a um importante incremento nas alterações cardiovasculares na população. Em odontologia, raros estudos avaliaram o impacto da síndrome metabólica nas doenças de cavidade bucal, sendo a área de periodontia pioneira na demonstração da relação entre os componentes da síndrome metabólica e as doenças periodontais. Assim, é fundamental que os estudos continuem, à medida que, por se tratar de doença com forte componente comportamental, outras áreas da odontologia poderão identificar influência da síndrome metabólica nos desfechos de saúde bucal. Por ser profissão de saúde e de caráter científico, a odontologia deve levar em conta os conhecimentos gerados, sem perder de vista os conceitos de integralidade na atenção. Nesse contexto, é imperioso que o profissional da odontologia conheça os componentes da síndrome, a fim de investigar sua relação com os agravos relacionados à saúde bucal, bem como encaminhar o paciente ao adequado tratamento junto à equipe de saúde, ampliando assim o espectro de atuação da profissão.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is defined by simultaneous occurrence of alterations including abdominal obesity, glucose intolerance, hypertension and dyslipidemia. Its prevalence has been considered high both in developed and in developing countries

and associated with an important increase in cardiovascular disease in populational level. In Dentistry, few studies have assessed the impact of metabolic syndrome on oral diseases and the area of periodontology was the pioneer in demonstrating the relationship between the components of metabolic syndrome and periodontal diseases. Thus, it is critical that studies continue to be conducted, because it is a disease with a strong behavioral component and therefore other areas of Dentistry can identify influence of metabolic syndrome on oral health outcomes. Since Dentistry is a health profession with scientific characteristics, it should take into consideration the generated knowledge without ignoring the concepts of integrality in management of dental problems. In this context, it is important that the dental professional has the knowledge of the components of the syndrome in order to investigate its relationship with oral health problems, as well as to refer the patient to an adequate treatment with the health team, increasing the spectrum of the profession.

A síndrome metabólica é definida pela ocorrência simultânea de uma série de anormalidades metabólicas, que inclui obesidade abdominal, intolerância à glicose, hipertensão e dislipidemia.^{1,2} Como resultado dessa interação metabólica, há significativo aumento na morbimortalidade por doenças cardiovasculares.³ O termo síndrome metabólica surgiu a partir da observação de que boa parte dos principais fatores de risco às doenças cardiovasculares manifesta-se em conjunto, sendo a resistência à insulina elemento fundamental para o diagnóstico de síndrome metabólica.⁴

Nesse sentido, diversos critérios têm sido propostos pela literatura para a definição de síndrome metabólica, os quais estão expressos no Quadro 1.^{1,6-8} Não é objetivo da presente revisão discorrer sobre as características e limitações dos critérios diagnósticos da síndrome, mas permitir ao leitor entendimento mais amplo das consequências de tais alterações sobre as estruturas bucais.

A patogênese da síndrome metabólica ainda permanece parcialmente compreendida, mas a evidência tem apontado para a participação de três eixos etiopatogênicos, dentre os quais se destacam a obesidade, resistência à insulina e outros fatores que atuam de maneira isolada, como moléculas de origem hepática, vascular e imunológica.⁹

Considerando-se a epidemiologia da síndrome metabólica, sua prevalência tem sido considerada alta, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Estima-se que, nos Estados Unidos, aproximadamente 23% da população seja diagnosticada como sendo portadora de síndrome metabólica.⁷ Na China, as estimativas revelam 9,8% para os homens e 17,8% para as mulheres.⁸ No Brasil, raros são os estudos publicados acerca dessa temática, e eles revelam aproximadamente 30% de ocorrência da síndrome em determinadas regiões do país.⁸⁻¹⁰

Como mencionado, a área da odontologia pioneira no estudo da relação da síndrome metabólica com a cavidade bucal é a periodontia, pois as gengivites e periodontites são doenças de caráter infeccioso, representado pelo biofilme bacteriano e que envolvem aspecto inflamatório, representado pela resposta do hospedeiro. A principal ligação entre as doenças periodontais e a síndrome metabólica parece ser o componente inflamatório das doenças periodontais e da síndrome metabólica, sendo sugerida, por alguns autores, uma relação bidirecional,¹¹ uma vez que, em indivíduos portadores de síndrome metabólica, ocorre aumento da resposta inflamatória, que ocasiona hiper-resposta do indivíduo ao biofilme bacteriano e culmina com maior destruição periodontal. A outra direção da associação reside no fato de que, em um indivíduo portador de

doença periodontal, os patógenos periodontais e seus subprodutos são levados pela corrente sanguínea através do epitélio da bolsa periodontal, gerando aumento da resposta inflamatória sistêmica, o que tenderia a facilitar o desenvolvimento da síndrome metabólica.¹²

Nesse sentido, uma série de estudos, especialmente de natureza epidemiológica, que avaliaram a relação entre síndrome metabólica e doença periodontal, foi publicada nos últimos anos.¹³⁻¹⁸ Dentre as principais características desses estudos, pode-se destacar que a maioria é de natureza transversal (avaliou os participantes somente em um único momento), foi realizada no Japão e nos EUA e encontrou associações significativas entre síndrome metabólica e doenças periodontais. Isso significa que indivíduos portadores de síndrome metabólica apresentam risco aumentado de desenvolver doenças periodontais e que a presença de periodontite tem sido relacionada à piora nos parâmetros da síndrome metabólica.

Até o momento, os estudos a respeito dessa relação são incipientes, mas a profissão precisa estar alerta em relação a essa possível associação, não somente por conta da repercussão bucal, mas, também, pelos eventuais prejuízos sistêmicos. A continuidade dos estudos com acompanhamentos ao longo do tempo (estudos longitudinais) vai permitir que se obtenha uma abordagem diferenciada do paciente portador de síndrome metabólica.¹⁹

Entretanto, conforme o objetivo do presente artigo, ressalta-se a pergunta: Qual é o significado da síndrome metabólica para a odontologia? Para responder a essa questão, é necessário fazer uma reflexão sobre os objetivos e a postura da profissão. A odontologia é uma profissão da saúde, de caráter científico, e não técnico, como alguns propagam. Nesse contexto, é importante que se deixe de tratar doenças bucais, cavidades de cárie, canais com essa ou aquela característica, para fazer atenção à saúde de indivíduos. Portanto, a atenção odontológica ao portador de síndrome metabólica necessita transcender a odontologia.

Quadro 1: Diferentes definições propostas para síndrome metabólica.

COMPONENTES	NCET-ATP Pelo menos 3 componentes	OMS Hiperglicemia/Diabetes + 2 componentes	FID Obesidade abdominal + 2 componentes
Obesidade abdominal circunferência da cintura		Obesidade (IMC \geq 30 kg/m ²) ou RCQ	
• Homens	> 102 cm	> 0,9	\geq 94 cm
• Mulheres	> 88 cm	> 0,85	\geq 80 cm
Triglicérides	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl	\geq 150 mg/dl
Colesterol HDL			
• Homens	< 40 mg/dl	< 35 mg/dl	< 40 mg/dl
• Mulheres	< 50 mg/dl	< 39 mg/dl	< 50 mg/dl
Pressão arterial	\geq 130 mmHg ou \geq 85 mmHg	\geq 140 mmHg ou \geq 90 mmHg ou uso de antihipertensivo	\geq 130 mmHg ou > 85 mmHg
Glicemia de jejum	\geq 110 mg/dl	\geq 110 mg/dl	\geq 100 mg/dl
Microalbuminúria	-----	\geq 20 μ g/min ou razão albumina: creatinina \geq 30 mg/g	-----

NCET-ATP: National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III; OMS: Organização Mundial da Saúde; FID: Federação Internacional do Diabetes; IMC: Índice de Massa Corporal; RCQ: Relação Cintura Quadril.

Assim, na entrevista realizada com o paciente, a qual deve ser cada vez mais ampliada e levar em conta conceitos de integralidade da atenção, não se pode deixar de entender os aspectos sistêmicos de saúde e, em particular, nessa discussão, aqueles relativos à síndrome metabólica. Indivíduos podem, por diversas razões, ir ao dentista, e não estar sob cuidado médico. Muitas vezes, o profissional da odontologia será responsável por suspeitar de envolvimento, como a síndrome metabólica, e encaminhar o indivíduo para o tratamento dessa condição. Da mesma forma, de posse do conhecimento epidemiológico, frente a um paciente com características de síndrome metabólica, a busca por agravos bucais a ela relacionados também deve ser cuidadosa.

Ademais, é importante que se entenda que a síndrome metabólica apresenta forte componente comportamental. Frequentemente, o portador de síndrome metabólica tem hábitos alimentares pouco saudáveis, não é praticante regular de exercícios físicos, fuma, dentre outras características. Ao fazer analogia com os componentes comportamentais relacionados à saúde bucal, observa-se que vários dos comportamentos que aumentam as chances de o indivíduo apresentar síndrome metabólica também estão relacionados a maior chance de ocorrerem doenças bucais. Sendo assim, uma abordagem ampliada em saúde, com equipe multiprofissional, poderia ser a alternativa para abordar não a síndrome metabólica, tempouco a doença bucal, mas, muito mais do que isso, abordar a saúde desse indivíduo.

É lícito supor, frente às características comportamentais da síndrome metabólica, que, além das doenças periodontais e periimplantares, esses indivíduos também possam apresentar experiência de cárie diferenciada, levando-se em conta os aspectos relacionados à higiene bucal deficiente e ao consumo de carboidratos fermentáveis, o que parece ser mais frequente em portadores da síndrome metabólica. Nesse sentido, estudos nessa área, que incluam aspectos etioopatogênicos da cárie, assim como análise longitudinal dos procedimentos restauradores, são necessários, para que se possa ampliar o conhecimento das repercussões bucais desse problema, que parece aumentar ou, pelo menos, tem ocorrência significativa no Brasil e em outros países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Assim, a odontologia coloca-se mais participativa nas equipes de saúde e contribui de forma significativa para a atenção em saúde do indivíduo. Ainda, como consequência, a aquisição de hábitos saudáveis e a abordagem em saúde integral também serão responsáveis por diminuir os quadros de doenças bucais.

Não há, atualmente, como ignorar a forte inter-relação entre a boca e demais partes do organismo e, conseqüentemente, da odontologia com as demais profissões da saúde. Portanto, urge que a profissão aproveite o conhecimento pro-

duzido e realize efetivamente uma prática de saúde, ampliando seu espectro e contribuindo mais com a qualidade de vida daqueles que confiam ao dentista parte de sua saúde e que poderão usufruir mais benefícios do que os delineados em seus objetivos iniciais.

REFERÊNCIAS

1. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002 Dec;106(25):3143-421.
2. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lefkowitz C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan;109(3):433-8.
3. Grundy SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Mar;47(8):1063-100.
4. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607.
5. Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M. Concordance between the 2005 International Diabetes Federation definition for diagnosing metabolic syndrome with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III and the World Health Organization definitions. *Diabetes Care*. 2005 Oct;28(10):2588-9.
6. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1989.
7. Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA*. 2002 Jan;287(3):356-9.
8. Gu D, Reynolds K, Wu X, Chen J, Duan X, Reynolds HF, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. *Lancet*. 2005 Apr;365(9468):1398-405.
9. Oliveira EP, Souza ML, Lima MD. [Prevalence of metabolic syndrome in a semi-rural area in Bahia]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Jun;50(3):468-65.
10. Sateroli LA, Barbosa GC, Mill JG, Molina MC. [Prevalence of metabolic syndrome in population-based study, Vitória, ES-Brazil]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Oct;51(7):1143-52.
11. Han DH, Lim SY, Sun BC, Paik D, Kim HD. The association of metabolic syndrome with periodontal disease is confounded by age and smoking in a Korean population: the Shinwha-Behavioral Environmental Health Study. *J Clin Periodontol*. 2010 Jul;37(7):809-16.
12. Li X, Koltveit KM, Tienstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev*. 2000 Oct;13(4):547-68.
13. D'Alto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;92(10):3889-94.
14. Nishiyama M, Shimazaki Y, Yamashita Y. Relationship between metabolic syndrome and periodontal disease in Japanese adults. *J Periodontol*. 2009 Oct;80(10):1610-5.
15. Kwon YE, Ha JE, Paik DI, Jin BH, Bae KH. The relationship between periodontitis and metabolic syndrome among a Korean nationally representative sample of adults. *J Clin Periodontol*. 2011 Sep;38(9):781-6.
16. Li P, He L, Shi YQ, Luan QK. Relationship of metabolic syndrome to chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Apr;80(4):544-9.
17. Nestitt MJ, Reynolds MA, Shiao H, Choe K, Simonick EM, Ferrucci L. Association of periodontitis and metabolic syndrome in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Clin Exp Res*. 2009 Jun;22(3):238-42.
18. Shimazaki Y, Saito T, Yonemoto K, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. *J Dent Res*. 2007 Mar;86(3):271-5.
19. Cavignri J, Foaing CK. Inter-relação entre síndrome metabólica e doença periodontal: uma revisão da literatura. *Braz J Period*. 2012 Mar;22(1):46-62.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese objetivou investigar o possível efeito de desordens metabólicas sobre o processo etiopatogênico da doença periodontal. O interesse nessa possível relação se deu frente às evidências crescentes, advindas de diferentes estudos, com metodologias diversificadas, da associação entre obesidade e doença periodontal. Para tanto, num primeiro momento, uma revisão da literatura foi realizada (CAVAGNI e RÖSING, 2012) para que se pudesse contextualizar o problema de acordo com a literatura publicada. Nessa etapa, o foco de interesse residiu na inter-relação entre MetS e doença periodontal, uma vez que as evidências sobre obesidade e doença periodontal já eram mais consistentes e, aparentemente, a MetS não estava sendo considerada nos estudos iniciais.

Nesse sentido, uma busca foi realizada nas bases de dados disponíveis, especialmente no Pubmed, para que se pudesse construir o panorama da literatura disponível. Várias estratégias sistemáticas de busca foram testadas, entretanto, pela quantidade pequena de artigos sobre a temática inter-relacionando MetS e doença periodontal, uma opção por uma compilação narrativa da informação foi realizada, também tendo como base o fato de que, frente à literatura incipiente sobre o assunto, o objetivo inicial era dar suporte básico à divulgação às comunidades odontológica e médica da possibilidade da inter-relação.

Nessa revisão da literatura, publicada na Revista Periodontia, foram encontrados 5 estudos epidemiológicos de associação entre MetS e doença periodontal (BORGES, GIMENO et al., 2007; SHIMAZAKI, SAITO et al., 2007; D'AIUTO, SABBAH et al., 2008; KUSHIYAMA, SHIMAZAKI et al., 2009; BENGUIGUI, BONGARD et al., 2010). Desses, dois foram realizados no Japão, um nos Estados Unidos, um na França e um no Brasil. Os estudos japoneses e norte-americano encontraram associações significativas, sugerindo um incremento de chance de doença periodontal para portadores de MetS. Não foram encontrados estudos com natureza longitudinal. A busca por estudos de intervenção revelou somente um estudo piloto publicado até o momento da finalização do artigo. Assim, ficou claramente demonstrado que o tema tem potencial importância e ainda é

pouco explorado, havendo necessidade de que delineamentos diversos fossem utilizados na perspectiva de estudo de fatores de risco.

Levando-se em consideração a importância dos estudos em animais para entendimento de plausibilidade biológica (MADDEN e CATON, 1994; WEINBERG e BRAL, 1999; OZ e PULEO, 2011), um passo indispensável na caracterização de um fator de risco, constatou-se a necessidade de que a temática fosse explorada com esse tipo de modelo.

Assim, um macro-projeto de pesquisa foi delineado para tentar estabelecer o papel de desordens metabólicas na destruição periodontal. Alguns aspectos metodológicos merecem destaque no projeto, frente às demandas de qualidade de pesquisa. O primeiro aspecto envolve a escolha dos animais para estudo. Ratos Wistar foram considerados como um modelo interessante, por serem animais que têm sido sistematicamente utilizados em estudos de etiopatogenia das doenças periodontais e também em estudos de desordens metabólicas, tanto envolvendo somente obesidade, quanto MetS (ESTADELLA, OYAMA et al., 2004; CAVAGNI, SOLETTI et al., 2005; BARTOLOMUCCI, CABASSI et al., 2009; MIESEL, MULLER et al., 2010; DAUDT, CAVAGNI et al., 2011; SAMPEY, VANHOOSE et al., 2011; VERZELETTI, GAIO et al., 2012).

A indução das desordens metabólicas pode ser realizada de diferentes formas. A presente pesquisa optou por utilizar a dieta de cafeteria, que simula a dieta ocidental, justamente por sua eventual comparabilidade aos fatores que têm sido responsáveis pelo aumento da prevalência de desordens metabólicas no mundo. Experiências anteriores realizadas pelo grupo de pesquisa (SIMCH, GAIO et al., 2008; VERZELETTI, GAIO et al., 2012) já haviam trabalhado com o uso da dieta de cafeteria para indução de obesidade em ratas. No processo de construção desses estudos, dificuldades foram encontradas para que se garantisse que os grupos apresentassem diferenças que pudessem inferir obesidade. No primeiro estudo (SIMCH, GAIO et al., 2008), somente sobrepeso pode ser inferido.

Ainda merece destaque que os dois estudos iniciais foram realizados com ratas, tendo por base a associação epidemiológica encontrada na região metropolitana de Porto Alegre ser restrita às mulheres (DALLA VECCHIA, SUSIN et al., 2005). No presente estudo, frente às perguntas inerentes a aspectos hormonais

femininos frequentemente suscitadas, optou-se por utilizar ratos machos. Assim, considerou-se interessante tentar compreender se os efeitos da obesidade poderiam ser observados no sexo masculino. Também tem sido objeto de reflexão o fato de que a indução de doença periodontal por meio de ligaduras é um método incontestado de geração de destruição, entretanto, também tem despertado interesse a ocorrência de destruição periodontal sem imputar um desafio tão intenso (LIBERMAN, PILAU et al., 2011). Assim, tendo por base demonstrações da literatura e do próprio grupo que em algumas exposições é possível observar os efeitos de uma determinada exposição sobre a destruição periodontal natural, optou-se por analisar os efeitos da obesidade nos animais que não foram submetidos a indução de doença. As análises da maioria dos estudos sobre ocorrência natural de destruição são realizadas nos lados contralaterais àqueles com ligadura, o que pode representar um comportamento diferente de animais sem nenhuma ligadura.

Tendo como foco o exposto, o artigo 2 foi delineado, e está em avaliação no periódico *Archives of Oral Biology*. Os cuidados metodológicos em relação à limitação dos vieses, reprodutibilidade, boas práticas de laboratório foram tomados e, a partir de análise morfométrica, a análise inicial não demonstrou efeito da obesidade sobre a ocorrência de destruição periodontal natural em ratos Wistar. Esse resultado corrobora o achado epidemiológico em Porto Alegre. Um fato que merece destaque é que nesse estudo, diferentemente dos anteriores, também foi realizada análise do Índice de Lee (BERNARDIS e PATTERSON, 1968), que guarda semelhança com o índice de massa corporal, o qual leva em consideração a relação entre peso e altura. As diferenças encontradas tanto no peso corporal, como no Índice de Lee, permitem inferir obesidade no grupo teste.

Entretanto, em reflexões realizadas a respeito das limitações das médias como única medida de avaliação e comparação de grupos, optou-se por uma análise diferenciada dos dados, valendo-se da distribuição dos mesmos e estabelecendo-se como ponto de corte para ocorrência de destruição o percentil 75 da distribuição dos dados. Análises como essas têm sido utilizadas na avaliação de estudos com outros delineamentos, especialmente epidemiológicos, uma vez que se perdem muitas informações com a exclusiva análise das médias (XIONG, ELKIND-HIRSCH et al., 2009; DEMMER, SQUILLARO et al., 2012). Assim, um ponto de corte de 0,51mm foi considerado e, com essa análise, observou-se que os ratos obesos apresentaram

maior destruição periodontal que os não obesos. Tendo em vista que esse tipo de análise ainda é incipiente, é importante que diferentes grupos de pesquisa testem os dados nesse sentido, para que se possa confirmar que o método tem o potencial suscitado no presente estudo. Assim, pode-se inferir que os ratos obesos têm potencial de apresentar maior destruição periodontal que os não obesos.

As hipóteses de explicação biológica para esse tipo de achado em animais vinculam-se ao fato de que a expressão inflamatória no obeso é diferente do não obeso, sendo o tecido adiposo um tecido capaz de produzir citocinas e mediadores inflamatórios que possam, de alguma maneira, potencializar a destruição periodontal (BERG e SCHERER, 2005). Assim, os dados obtidos tendem a suportar os achados encontrados em ratas obesas previamente publicados, com doença periodontal induzida (VERZELETTI, GAIO et al., 2012).

Adicionalmente ao efeito da obesidade e, frente ao fato de ser a obesidade somente uma parte da MetS, o presente projeto ampliou seu espectro, analisando a presença da MetS e seus potenciais efeitos no periodonto. Para tanto, um artigo está sendo preparado para submissão ao Journal of Periodontal Research. Assim, o primeiro passo, foi identificar se os animais submetidos à dieta de cafeteria realmente haviam desenvolvido MetS. Estudos com outros objetivos já demonstraram esse fato (DIETRICH, MULLER et al., 2007; KNIGHT, QUIGLEY et al., 2008; BARTOLOMUCCI, CABASSI et al., 2009; SAMPEY, VANHOOSE et al., 2011), entretanto, para evitar dúvidas, medições de lipídios e glicose foram realizadas. Os grupos expostos à dieta demonstraram obesidade, tanto por diferença de 18% no peso corporal, quanto por diferenças estatisticamente significativas no Índice de Lee. As análises de colesterol e triglicerídeos revelaram diferenças estatisticamente entre os grupos expostos e não expostos à dieta de cafeteria. Entretanto, em relação à glicose, diferenças estatisticamente significativas não foram observadas.

A MetS é definida quando 3 parâmetros (dos 5 considerados) estão presentes. No presente estudo, a pressão arterial não foi aferida, tendo em vista que o método sugerido para estudos com dieta é invasivo (KURTZ, GRIFFIN et al., 2005) e geraria estresse, imputando uma nova variável ao presente estudo. Assim, as diferenças em termos de obesidade, colesterol e triglicerídeos suportam a presença

de MetS. Um fato extremamente instigante dentre os achados do presente estudo reside no fato de que os grupos não expostos à dieta não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no comportamento dos lipídios, entretanto, o grupo exposto à dieta concomitantemente à indução de destruição periodontal apresentou níveis mais elevados de ambos os lipídios. Esse fato sugere que a presença concomitante do desafio bacteriano periodontal pode piorar a resposta do organismo em termos de acúmulo de lipídios. Essa é uma observação ainda não explorada pela literatura que merece foco de atenção futura. Entretanto, é possível supor que o desafio microbiano e a consequente maior resposta inflamatória possa contribuir para maiores níveis de acúmulo de lipídios. Se essa suposição for confirmada, aumentam as possibilidades e impacto da condição bucal sobre outras condições sistêmicas.

Entretanto, de importância capital no presente estudo é a análise da destruição óssea, desfecho primário adotado como proxy de doença periodontal destrutiva. Essa análise foi realizada através de microtomografia computadorizada. Esse é um recurso que permite analisar tridimensionalmente, o que não é possível nem por histologia, tampouco por morfometria. Em que se pese as fortes evidências advindas de estudos morfométricos e histométricos, a real quantificação do volume de perda óssea sempre foi um objetivo a ser alcançado. Nesse sentido, o presente estudo adiciona à literatura, observando aspectos aparentemente mais acurados.

Em termos de resultados, o Artigo 3 desta tese demonstrou claramente o impacto da MetS na destruição periodontal. Isso se deu tanto nos lados sem a presença de ligadura, os grupos portadores de MetS apresentaram maiores graus de perda óssea que os animais sem a síndrome. Conforme relatado anteriormente, em que se pese não haver ligadura no sítio, o animal apresenta ligadura no lado oposto (para os grupos DP e MetS+DP). Entretanto, a comparação entre o grupo DP e MetS infere que a MetS é capaz de modular a resposta periodontal, representando um desafio maior que a própria ligadura no lado contralateral.

Por outro lado, os resultados mais interessantes são aqueles advindos das análises dos lados com ligadura nos grupos DP e MetS+DP. Nessa análise, a perda óssea maior foi observada no grupo MetS+DP, seguida pelos grupos DP, MetS e CT. Todas as análises intergrupos revelaram diferenças estatisticamente

significativas. Assim, fica claro o papel da MetS na modulação da resposta periodontal. Na busca por explicações para esse fato, a análise das citocinas TNF- α e IL1- β não permitiu, por conta da variabilidade, que diferenças fossem observadas. Análises de citocinas em ratos Wistar, frequentemente não têm conseguido diferenciar grupos, provavelmente em função de a espécie ter variadas respostas aos desafios inflamatórios (DAUDT, CAVAGNI et al., 2011). Animais isogênicos permitem com maior facilidade essas demonstrações de diferenças, entretanto sua capacidade translacional diminui, tendo em vista que os seres humanos não apresentam respostas tão similares quanto animais isogênicos (KACEW e FESTING, 1996).

Por outro lado, os mecanismos pelos quais haveria uma potencial explicação para as diferenças observadas vinculam-se aos achados da literatura que suportam que indivíduos com MetS apresentam um padrão diferenciado de resposta inflamatória, com uma resposta mais destrutiva em diferentes doenças (PISCHON, HENG et al., 2007; RITCHIE e CONNELL, 2007).

Os resultados demonstrados nesse trabalho colocam a MetS como foco de futuras pesquisas com perspectivas de, no futuro, com abordagens de fatores de risco em comum, uma maior integração entre as profissões da saúde e uma atenção integral ao indivíduo mais qualificada, efetivamente alcançando a verdadeira promoção de saúde. Nesse sentido, também como parte da presente tese, foi escrita a coluna Novas Tendências na Revista Clínica – International Journal of Brazilian Dentistry, com objetivo meramente de divulgação de informação, alertando aos profissionais da Odontologia da responsabilidade de transcender as abordagens tradicionais, intrabucais, em um modelo de atenção que não contemple a amplitude dos desafios da atenção integral de indivíduos.

A partir dos resultados obtidos, frente às reflexões realizadas, pode-se concluir que a doença periodontal é influenciada por desordens metabólicas. Recomenda-se, portanto, a inclusão de questionamentos e análises dessas condições e suas potenciais interrelações pelos profissionais da saúde.

7 REFERÊNCIAS

ACHARYA A, et al. Cardioprotective effect of periodontal therapy in metabolic syndrome: a pilot study in Indian subjects. **Metab Syndr Relat Disord**; 8: 335-341, Aug, 2010.

ALLMON HB. Man is not a giant rat. **J Public Health Dent**; 31: 218-224, Fall, 1971.

ANDRIANKAJA OM, et al. Association between metabolic syndrome and periodontal disease. **Aust Dent J**; 55: 252-259, Sep, 2010.

ARMITAGE GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**; 4: 1-6, Dec, 1999.

BARTOLOMUCCI A, et al. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. **PLoS One**; 4: e4331, 2009.

BENGUIGUI C, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: a cross-sectional study in a middle-aged French population. **J Clin Periodontol**; 37: 601-608, Jul, 2010.

BERG AH, et al. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**; 96: 939-949, May 13, 2005.

BERGSTROM J, et al. Exposure to tobacco smoking and periodontal health. **J Clin Periodontol**; 27: 61-68, Jan, 2000.

BERNARDIS LL, et al. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**; 40: 527-528, Apr, 1968.

BORGES PK, et al. [Prevalence and characteristics associated with metabolic syndrome in Japanese-Brazilians with and without periodontal disease]. **Cad Saude Publica**; 23: 657-668, Mar, 2007.

BREIVIK T, et al. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. **Eur J Oral Sci**; 104: 327-334, Aug, 1996.

CAVAGNI J, et al. Inter-relação entre síndrome metabólica e doença periodontal: uma revisão da literatura. **Braz J Periodontol**; 22: 45-52, 2012.

_____. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Braz Oral Res**; 19: 290-294, Oct-Dec, 2005.

D'AIUTO F, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. **J Clin Endocrinol Metab**; 93: 3989-3994, Oct, 2008.

DALLA VECCHIA CF, et al. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. **J Periodontol**; 76: 1721-1728, Oct, 2005.

DAUDT LD, et al. Effect of inhaled corticosteroid on TNF-alpha production and alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch Oral Biol**; 56: 1398-1403, Nov, 2011.

DEMMER RT, et al. Periodontal Infection, Systemic Inflammation, and Insulin Resistance: Results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. **Diabetes Care**; 35: 2235-2242, Nov, 2012.

DIETRICH MO, et al. Western style diet impairs entrance of blood-borne insulin-like growth factor-1 into the brain. **Neuromolecular Med**; 9: 324-330, 2007.

ESTADELLA D, et al. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**; 20: 218-224, Feb, 2004.

FERNANDES MI, et al. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**; 21: 216-221, Jul-Sep, 2007.

FORD ES, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. **JAMA**; 287: 356-359, Jan 16, 2002.

FUKUI N, et al. Periodontal status and metabolic syndrome in middle-aged Japanese. **J Periodontol**; 83: 1363-1371, Nov, 2012.

GALVAO MP, et al. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesqui Odontol Bras**; 17: 56-62, Jan-Mar, 2003.

GEURS NC, et al. Osteoporosis and periodontal disease progression. **Periodontol 2000**; 32: 105-110, 2003.

GRUNDY SM. Metabolic syndrome pandemic. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 28: 629-636, Apr, 2008.

GRUNDY SM, et al. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**; 109: 433-438, Jan 27, 2004.

GU D, et al. Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China. **Lancet**; 365: 1398-1405, Apr 16-22, 2005.

GUERRERO-ROMERO F, et al. Concordance between the 2005 International Diabetes Federation definition for diagnosing metabolic syndrome with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III and the World Health Organization definitions. **Diabetes Care**; 28: 2588-2589, Oct, 2005.

HAN DH, et al. Periodontitis could be related factors on metabolic syndrome among Koreans: a case-control study. **J Clin Periodontol**; 39: 30-37, Jan, 2012.

_____. The association of metabolic syndrome with periodontal disease is confounded by age and smoking in a Korean population: the Shihwa-Banwol Environmental Health Study. **J Clin Periodontol**; 37: 609-616, Jul, 2010.

KACEW S, et al. Role of rat strain in the differential sensitivity to pharmaceutical agents and naturally occurring substances. **J Toxicol Environ Health**; 47: 1-30, Jan, 1996.

KINANE DF, et al. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontol Scand**; 59: 154-160, Jun, 2001.

_____. Periodontal manifestations of systemic disease. **Aust Dent J**; 46: 2-12, Mar, 2001.

_____. The genetic basis of periodontitis. **Periodontol 2000**; 39: 91-117, 2005.

KLAUSEN B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**; 62: 59-73, Jan, 1991.

KNIGHT SF, et al. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. **Hypertension**; 51: 352-359, Feb, 2008.

KRINKE GJ. The Laboratory Rat: Handbook of Experimental Animals: Academic Press. 2000. 756 p.

KUHR A, et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodontal Res**; 39: 101-106, Apr, 2004.

KURTZ TW, et al. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals: part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the Subcommittee of Professional and Public Education of the American Heart Association Council on High Blood Pressure Research. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**; 25: e22-33, Mar, 2005.

KUSHIYAMA M, et al. Relationship between metabolic syndrome and periodontal disease in Japanese adults. **J Periodontol**; 80: 1610-1615, Oct, 2009.

KWON YE, et al. The relationship between periodontitis and metabolic syndrome among a Korean nationally representative sample of adults. **J Clin Periodontol**; 38: 781-786, Sep, 2011.

LI P, et al. Relationship of metabolic syndrome to chronic periodontitis. **J Periodontol**; 80: 541-549, Apr, 2009.

LIBERMAN DN, et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch Oral Biol**; 56: 109-113, Feb, 2011.

LINDHE J, et al. Experimental periodontitis in the beagle dog. **J Periodontal Res**; 8: 1-10, 1973.

LOPEZ NJ, et al. Effects of periodontal therapy on systemic markers of inflammation in patients with metabolic syndrome: a controlled clinical trial. **J Periodontol**; 83: 267-278, 2012.

MADDEN TE, et al. Animal models for periodontal disease. **Methods Enzymol**; 235: 106-119, 1994.

MIESEL A, et al. Overfeeding-induced obesity in spontaneously hypertensive rats: an animal model of the human metabolic syndrome. **Ann Nutr Metab**; 56: 127-142, 2010.

MORITA T, et al. Association between periodontal disease and metabolic syndrome. **J Public Health Dent**; 69: 248-253, Fall, 2009.

_____. A cohort study on the association between periodontal disease and the development of metabolic syndrome. **J Periodontol**; 81: 512-519, Apr, 2010.

NESBITT MJ, et al. Association of periodontitis and metabolic syndrome in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. **Aging Clin Exp Res**; 22: 238-242, Jun, 2009.

NIBALI L, et al. Severe periodontitis is associated with systemic inflammation and a dysmetabolic status: a case-control study. **J Clin Periodontol**; 34: 931-937, Nov, 2007.

OZ HS, et al. Animal models for periodontal disease. **J Biomed Biotechnol**; 2011: 754857, 2011.

PAGE RC, et al. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol 2000**; 14: 9-11, Jun, 1997.

PISCHON N, et al. Obesity, inflammation, and periodontal disease. **J Dent Res**; 86: 400-409, May, 2007.

REAVEN GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**; 37: 1595-1607, Dec, 1988.

RITCHIE SA, et al. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**; 17: 319-326, May, 2007.

SALAROLI LB, et al. [Prevalence of metabolic syndrome in population-based study, Vitoria, ES-Brazil]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**; 51: 1143-1152, Oct, 2007.

SALLAY K, et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J Periodontal Res**; 17: 263-274, May, 1982.

SAMPEY BP, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**; 19: 1109-1117, Jun, 2011.

SBC. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. **Arq. Bras. Cardiol.**; 84 suppl. 1April, 2005.

SHIMAZAKI Y, et al. Relationship of metabolic syndrome to periodontal disease in Japanese women: the Hisayama Study. **J Dent Res**; 86: 271-275, Mar, 2007.

SIMCH RP, et al. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. **Acta Odontol Scand**; 66: 130-134, Jun, 2008.

SOCRANSKY SS, et al. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**; 38: 135-187, 2005.

SUSIN C, et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**; 75: 1033-1041, Jul, 2004.

_____. O rato como modelo para estudo das repercussões do estresse nas doenças periodontais. **Revista Periodontia**; 13: 7-17, 2002, 2002.

TAYLOR GW, et al. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. **Ann Periodontol**; 3: 30-39, Jul, 1998.

TEZAL M, et al. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **J Clin Periodontol**; 31: 484-488, Jul, 2004.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**; 106: 3143-3421, Dec 17, 2002.

TIMONEN P, et al. Metabolic syndrome, periodontal infection, and dental caries. **J Dent Res**; 89: 1068-1073, Oct, 2010.

VERZELETTI GN, et al. Effect of obesity on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. **J Appl Oral Sci**; 20: 218-221, Mar-Apr, 2012.

VOLTERA AF, et al. [Effects of neuroendocrine obesity induction on systemic hemodynamics and left ventricular function of normotensive rats]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**; 52: 47-54, Feb, 2008.

WEINBERG MA, et al. Laboratory animal models in periodontology. **J Clin Periodontol**; 26: 335-340, Jun, 1999.

WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland. **World Health Organization** 1999.

XIONG X, et al. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. **J Periodontol**; 80: 1742-1749, Nov, 2009.

8 ANEXOS

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

Projeto: 110051

Data da Versão do Projeto: 26/04/2011

Pesquisadores:

CASSIANO KUCHENBECKER ROSING

JULIANO CAVAGNI

ISABEL CRISTINA DE MACEDO

IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Título: IMPACTO DA SÍNDROME METABÓLICA NA PATOGÊNESE DA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR INDUZIDA EM RATOS WISTAR

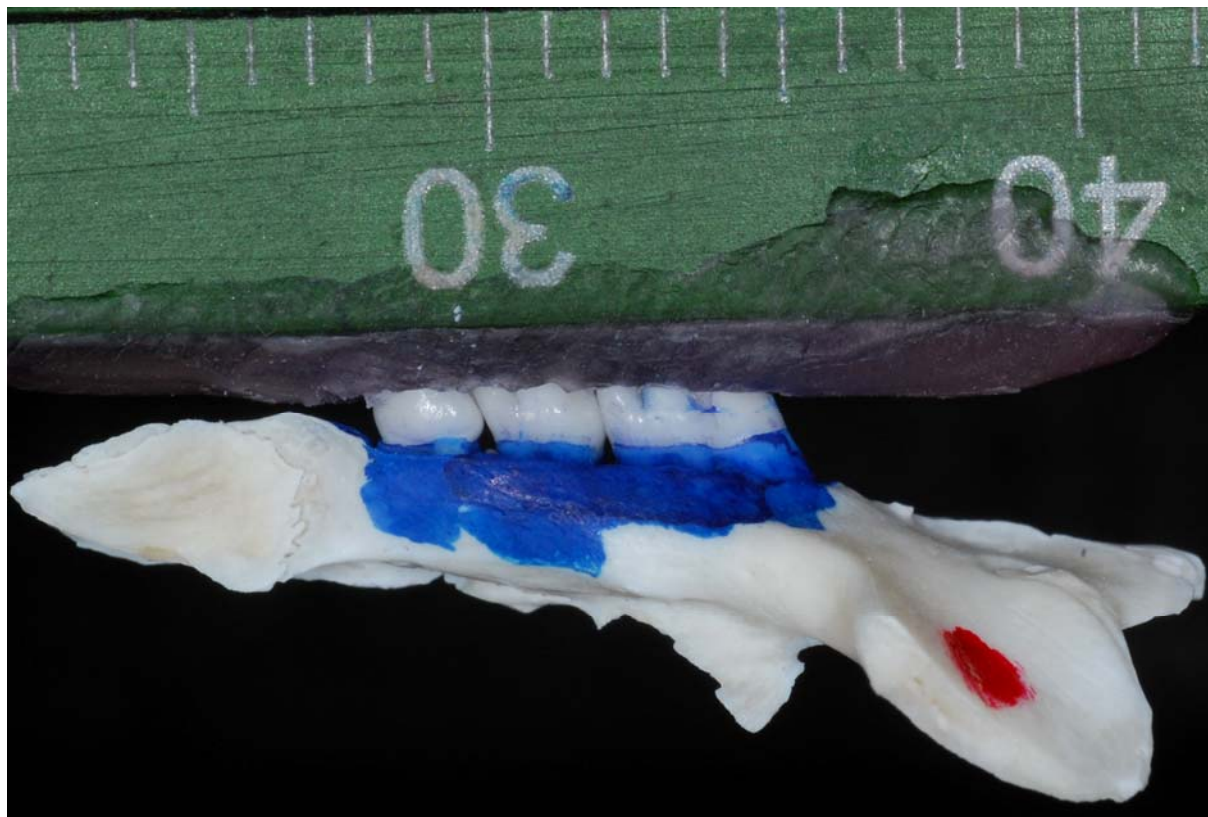
Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 25 de maio de 2011.

Dr. Alessandro Bersch Osvaldt
Coordenador da CEUA/HCPA

Anexo 2: Exemplo de Fotografia utilizada na análise morfométrica.



Anexo 3: Análise do volume de perda óssea alveolar por micro-tomografia. (A) Reorientação da imagem no programa DataViewer (B) Definição da ROI no programa CTan

