

BEATRIZ DE BRITO BEZERRA

CIRURGIÃ-DENTISTA

AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA DOENÇA PERIODONTAL
EXPERIMENTAL EM RATOS ALIMENTADOS COM UMA DIETA
HIPERLIPÍDICA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum

PIRACICABA

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

B469a Bezerra, Beatriz de Brito.
Avaliação histométrica da doença periodontal experimental em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica. / Beatriz de Brito Bezerra. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Antônio Wilson Sallum, Enilson Antônio Sallum.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontite. 2. Reabsorção óssea. 3. Ratos wistar. I. Sallum, Antônio Wilson. II. Sallum, Enilson Antônio. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Histometric evaluation of the experimental periodontal disease in rats fed a hyperlipidic diet

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Periodontitis. 2. Bone resorption. 3. Rats, wistar

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Adriana Campos Passanezi Sant'ana, Antônio Wilson Sallum, Sérgio de Toledo

Data da Defesa: 16-02-2007

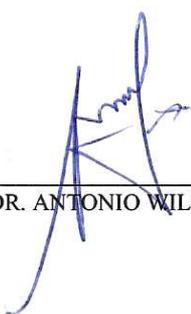
Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 16 de Fevereiro de 2007, considerou a candidata BEATRIZ DE BRITO BEZERRA aprovada.



PROF. DR. ANTONIO WILSON SALLUM



PROFa. DRa. ADRIANA CAMPOS PASSANEZI SANT'ANA



PROF. DR. SÉRGIO DE TOLEDO

Dedico este trabalho

Aos meus pais, **Maurício e Tânia**, que sempre me apoiaram
e me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos.

Ao meu irmão, **Gabriel**, por compreender a ausência e tornar meus
dias mais interessantes com sua convivência.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu excelentíssimo Reitor **José Tadeu Jorge**. À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do seu diretor, Prof. Dr. **Francisco Haiter Neto**, do coordenador geral dos programas de pós-graduação Prof. Dr. **Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**, e da coordenadora do programa de pós-graduação em Clínica Odontológica Profa. Dra. **Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**.

À **CAPES**, pelo incentivo financeiro na concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum**, meu orientador, por ter acreditado e confiado tanto em mim desde o início. Por ter me guiado nesta etapa da minha vida. Por ser capaz de me transmitir paz nos momentos em que mais precisei. Uma pessoa por quem tenho muita admiração e respeito.

Aos professores de Área de Periodontia, **Enílson Antônio Sallum**, **Francisco Humberto Nociti Jr.**, **Márcio Zaffalon Casati** e **Sérgio de Toledo**, pelos conhecimentos transmitidos nos últimos anos.

Ao prof. Dr. **Mário Saad**, da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, por ter me recebido em seu laboratório e ter compartilhado seus conhecimentos no método de indução da obesidade.

Aos profs. Drs. **Márcio Casati**, **Pedro Duarte** e **Reginaldo Gonçalves**, por terem composto minha banca de qualificação e pelas sugestões para melhoria deste trabalho.

À Prof. Dra. **Gláucia Ambrosano** e ao **Renato**, pela ajuda na análise estatística dos dados deste trabalho.

A minha avó, meus tios, tias e primos, que ficaram em Fortaleza, pelo apoio incondicional e por estarem sempre torcendo por mim.

Ao meu tio **Chico**, por ter sido meu porto seguro em Campinas nos momentos difíceis aqui em Piracicaba.

Aos meus amigos do mestrado, **Dani, Fabrícia, Fernanda, Kamille, Liana, Mauro, Renato, Thais e Wagner** pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do Doutorado, **Bruno, Cléverson, Daia, Érica, Gabriela, Goiano, Roberta, Sandro e Saulo**, por terem me acolhido e ajudado sempre que precisei.

À **PatFu, Lóci e Liana**, por terem me recebi em sua casa no primeiro mês aqui em Piracicaba. Peço desculpas por qualquer transtorno causado neste período. Serei eternamente grata a vocês.

À **Alyne**, minha companheira de casa, por ter me aturado estes dois anos, em todos os momentos de alegria, farra, estresse e abuso. Esses dois anos de convivência foram muito importantes e espero que a amizade que construímos seja para toda a vida.

À **Dani, Renato e Mauro** pelos momentos de diversão e de reflexão. Aprendi bastante com vocês e espero continuar aprendendo. Vocês são pessoas muito especiais pra mim. Muito obrigada por fazerem os dias em Piracicaba mais interessantes.

À **Regiane**, uma irmã que encontrei aqui em Piracicaba. Você é uma amiga excepcional, sempre me apoiando e incentivando a seguir meus objetivos, e sendo também um exemplo de pessoa pra mim.

A **Fikriye** e **Van Pardi**, grandes amigas com quem tive o prazer de dividir bons momentos aqui em Piracicaba. Vocês estão no meu coração.

Ao meu professor e grande amigo, **Ricardo Martins**, por acreditar e ter me incentivado a trilhar os caminhos da Periodontia.

À **Eliete**, por sempre nos contagiar com sua alegria e por estar sempre disposta a ajudar mesmo nos momentos mais caóticos na secretaria.

À **Mariana**, pela grande ajuda indispensável no laboratório e pelo seu bom humor, o que tornou os longos dias no laboratório mais divertidos.

Às minhas queridas amigas de Fortaleza, **Mirela, Cibele, Louize, Cris, Brenda, Cris, Bia e Dani** por dividirem esta alegria comigo apesar da distância.

Aos funcionários do Biotério por proporcionarem um bom ambiente de trabalho, e aos animais, pobres criaturas, por permitirem a aquisição de novos conhecimentos.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho..... Muito Obrigada!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Etiologia e patogênese da doença periodontal	5
2.2. Doença periodontal experimental	7
2.2.1. Estrutura dos tecidos periodontais no rato	8
2.2.2. Doença periodontal experimental em ratos	8
2.3. Dieta	11
3. PROPOSIÇÃO	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Animais	16
4.2. Sedação e Anestesia	16
4.3. Colocação das ligaduras	17
4.4. Delineamento do estudo	19
4.5. Preparo da dieta	19
4.6. Preparo histológico	20
4.7. Processamento histométrico	20
4.8. Análise estatística	22
5. RESULTADOS	23
5.1. Observações clínicas	23
5.2. Resultados histométricos	23
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	44

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente a influência de uma dieta hiperlipídica sobre a evolução da doença periodontal experimental em ratos. Trinta e dois ratos machos adultos, da linhagem Wistar, fizeram parte do estudo e os mesmos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: **C** (ração para animais de laboratório) e **H** (ração hiperlipídica). Uma ligadura de fio de algodão foi colocada ao redor do primeiro molar inferior esquerdo e o dente contra-lateral serviu como controle. Os animais foram sacrificados nos intervalos de 7, 14, 21 e 28 dias após a colocação da ligadura com o objetivo de avaliarmos a progressão da doença periodontal. As mandíbulas foram removidas para obtenção dos cortes histológicos dos primeiros molares. Análise histométrica foi realizada, com o auxílio do programa de avaliação de imagens ImagePro[®], para quantificar a perda óssea na região da bifurcação através da contagem de pontos. No momento do sacrifício observamos um maior acúmulo de restos alimentares nos dentes com ligadura, independente da dieta, e também um maior acúmulo de tecido adiposo na região abdominal dos animais do grupo H, devido ao tipo de dieta ingerida por estes animais, que continha maior concentração de lipídeos. Os dados foram analisados com os testes ANOVA e de Tukey ao nível de significância de 5%. A análise intergrupos não revelou diferença estatisticamente significativa na quantidade de perda óssea entre os diferentes intervalos de tempo ($p > 0,05$) tanto nos dentes com ligadura quanto nos sem ligadura. A análise intragrupo, no entanto, mostrou maior perda óssea nos dentes que receberam a ligadura, comparados aos dentes sem ligadura ($p < 0,0001$). Desta maneira podemos concluir que o consumo de uma dieta hiperlipídica não tem influência sobre a perda óssea resultante da periodontite induzida em ratos.

Palavras-chave: periodontite; dieta hiperlipídica; reabsorção óssea; ratos wistar

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate, histometrically, the influence of a hyperlipidic diet on the evolution of experimental periodontal disease. Thirty-two male Wistar rats were randomly assigned to two groups: **C** (commercial chow diet) and **H** (hyperlipidic diet). Cotton ligatures were placed around the left first mandibular molar and the contralateral tooth was used as a control. The animals were sacrificed on days 7, 14, 21 and 28 days after ligature placement for evaluation of periodontal disease progression. The specimens were routinely processed for serial decalcified sections and histometric analysis was performed to evaluate bone loss in the furcation area with the help of an image analysis software, ImagePro[®]. In the moment of the sacrifice it was noticed a greater accumulation food debris on the teeth with ligature of both groups, it was also noticed a greater accumulation of adipose tissue in group H, due to the kind of diet that the animals were fed, which has an elevated concentration of lipids. The data was analyzed using the ANOVA and Tukey's test at a significance level of 5%. Intergroup analysis did not show significant differences in relation to loss of bone volume for both the ligated and unligated teeth between time intervals ($p>0.05$). Intragroup analysis, however, showed a greater amount of bone volume loss in the ligated teeth than in the unligated ones ($p<0.0001$). It could be concluded that the consumption of a hyperlipidic diet does not influence bone loss in ligature-induced periodontal disease in rats.

Key words: periodontitis; hyperlipidic diet; bone resorption; Wistar rat

1. INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos têm mostrado que a doença periodontal vem se tornando um problema bastante significativo na população mais velha (Albandar, 2002a). De acordo com dados do NHANES III (levantamento epidemiológico dos Estados Unidos entre 1988 e 1994), a periodontite leve é mais prevalente em grupos etários mais velhos, no entanto, periodontites moderadas e severas aumentavam sua prevalência até a idade de 65 anos, a partir da qual mantinha-se estável até os 80 anos de idade, onde ocorria uma redução dessa prevalência (Albandar, 2002b).

A doença periodontal afeta as estruturas de suporte do dente e é resultado da interação entre uma microbiota patogênica e a resposta imune do hospedeiro. Para sua ocorrência é essencial que haja o acúmulo de biofilme dental, já que o fator microbiano é o iniciador da condição (Page, 1982).

Modelos experimentais da doença periodontal em roedores vêm sendo bastante utilizados devido às vantagens que oferecem como: preço, manuseio, entre outros. Além disso, os aspectos clínicos, radiográficos e histológicos da doença periodontal são bastante semelhantes aos encontrados nos humanos (Page, 1982; Galvão *et al.*, 2003).

O uso da ligadura é bastante difundido e grande parte dos trabalhos que usam este tipo de modelo experimental utiliza este método para induzir doença periodontal em animais (Gašperšič *et al.*, 2002; Duarte *et al.*, 2004; Holzhausen *et al.*, 2004; Kuhr *et al.*, 2004).

A dieta pode auxiliar no acúmulo do biofilme, no sentido de que ela fornecerá nutrientes específicos, como por exemplo, sacarose, para que as bactérias da placa possam proliferar mais intensamente, como já foi mostrado

anteriormente por Bowden & Li (1997). Alguns estudos experimentais de doença periodontal utilizaram dieta como forma de indução da doença (Keyes & Jordan, 1964; Querido *et al.*, 1971; Robinson *et al.*, 1991).

A composição da dieta, desta maneira, é bastante importante, visto que nos tempos atuais as dietas ricas em carboidratos e lipídios são bastante freqüentes no dia-a-dia da população. Dietas que proporcionem uma maior disponibilidade de nutrientes para as bactérias do biofilme oral possivelmente permitirão que estas cresçam num ritmo mais acelerado que aquelas que não estão expostas ao mesmo substrato e isto pode resultar na maior incidência e severidade das doenças da cavidade oral, como por exemplo a doença periodontal.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Etiologia e Patogênese da Doença Periodontal

A doença periodontal é uma doença crônica das estruturas de suporte do dente, resultante do acúmulo de biofilme dental. A evolução da doença periodontal está ligada ao acúmulo do biofilme dental e à ação do sistema imunológico sobre os tecidos periodontais, resultando na destruição das estruturas de suporte do dente. Experimentos clássicos têm demonstrado que o acúmulo de biofilme dental causa uma resposta inflamatória dos tecidos gengivais, de forma reprodutível (Løe *et al.*, 1965) e que a remoção deste biofilme resulta no desaparecimento dos sinais clínicos de inflamação (Theilade *et al.*, 1966).

A reação inflamatória associada à doença periodontal pode danificar as estruturas conjuntivas, incluindo o osso alveolar, levando à perda dental (Lindhe & Nyman, 1987). A principal causa da doença periodontal são as bactérias que compõem o biofilme dental. As toxinas, enzimas e metabólitos produzidos pelas bactérias apresentam papel importante na iniciação do processo inflamatório presente na doença periodontal (Listgarten, 1987).

A doença periodontal representa a causa mais importante de perda dental nos adultos (Williams, 1990). Apesar de multifatorial, a patogênese da doença periodontal envolve a presença de fatores retentivos de placa, que podem iniciar uma reação inflamatória local, em indivíduos predispostos à doença periodontal, provocando o aparecimento de edema e liberação de mediadores inflamatórios, que levam ao resultado final da perda óssea alveolar (Assuma *et al.*, 1998).

É sabido que o início e progressão da doença periodontal são dependentes da presença de microorganismos capazes de provocarem a doença periodontal (Schenkein, 1999). Mais de 500 microorganismos já foram isolados de bolsas periodontais, mas apenas uma minoria pode ser considerada como agente

etiológico das doenças periodontais (Haffajee & Socransky, 1994); estudos epidemiológicos têm associado apenas um pequeno número destas bactérias à perda óssea alveolar, entre elas *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Tannerella forsythia* (Tanner *et al.*, 1984; Machtei *et al.*, 1999) .

Para um microorganismo ser considerado agente etiológico da doença periodontal são necessárias algumas características como por exemplo ter a capacidade de colonizar o ambiente da bolsa, a habilidade de evadir as defesas do hospedeiro, e a capacidade de produzir substâncias que atuem diretamente na iniciação da destruição tecidual.

A primeira barreira de proteção, que os microorganismos encontram nos tecidos periodontais, são os neutrófilos. Os neutrófilos são considerados agentes protetores contra a doença periodontal devido à sua habilidade de fagocitar as bactérias, no entanto eles também podem ser uma fonte de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a reabsorção óssea alveolar (Baker, 2000). Eles são os responsáveis pela eliminação, através da fagocitose, dos microorganismos que conseguiram penetrar a barreira do epitélio juncional. No entanto, algumas bactérias desenvolveram mecanismos para driblar os mecanismos de defesa do hospedeiro, entre eles temos a produção de leucotoxinas pelo *A. actinomycetemcomitans* e *Campylobacter rectus*, responsáveis pela destruição dos neutrófilos (Tsai *et al.*, 1979; Gillespie *et al.*, 1993), a produção de proteases que degradam anticorpos e componentes do complemento pelo *Porphyromonas gingivalis* (Schenkein, 1989; Cutler *et al.*, 1993), entre outros.

A destruição periodontal ocorre tanto pela ação direta das bactérias sobre os tecidos periodontais quanto pela ação indireta onde há a ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. As endotoxinas foram o primeiro produto bacteriano a ser associado com a reabsorção óssea (Hausmann *et al.*, 1970),

desde então outros produtos foram observados, *in vitro*, estarem também associados à reabsorção óssea alveolar observada na doença periodontal (Baker, 2000). Além de promoverem a reabsorção óssea os produtos bacterianos também inibem a formação óssea e a síntese da matriz óssea.

Indiretamente as bactérias estimulam o recrutamento dos neutrófilos e estes, ao liberarem o conteúdo de seus grânulos para o meio extracelular (degranulação), liberam uma série de enzimas que degradam os tecidos contribuindo para a destruição tecidual. Mas a destruição que ocorre nos tecidos não é resultado somente da ação dos neutrófilos. A resposta imune é responsável pela mobilização de linfócitos, monócitos, fibroblastos entre outras células, e na presença do LPS bacteriano ocorre a ativação destas que iniciam a produção de citocinas e mediadores inflamatórios, como por exemplo PGE₂. Estes mediadores então irão promover a liberação de metaloproteinases da matriz (MMP), que irão promover a destruição da matriz extracelular e do osso (Shenker *et al.*, 1990; Birkedal-Hansen, 1993).

2.2. Doença Periodontal Experimental

O estudo da doença periodontal em humanos tem suas limitações em relação às grandes variações entre os indivíduos. Muitos estudos têm utilizado animais para o estudo da doença periodontal como o modelo em primatas (Kennedy & Polson, 1973; Heijl *et al.*, 1976), cães (Schroeder & Lindhe, 1975; Nyman *et al.*, 1979) e roedores (Keyes & Jordan, 1964; Johnson, 1975; Yamazaki, 1992; Nociti jr *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003).

As principais vantagens da utilização de roedores nos estudos da doença periodontal são o tamanho, o custo, a fácil manipulação e a acomodação dos mesmos (Jordan, 1971). Além destas vantagens os modelos animais de roedores também têm a vantagem de serem mais previsíveis no sentido de que a doença a

ser estudada é reproduzida com um alto grau de confiabilidade (Frenkel, 1969), pois os tecidos periodontais dos roedores são bastante semelhantes aos dos humanos (Page & Schroeder, 1982).

A indução da doença periodontal pode ser realizada por diversos métodos: ligaduras de algodão (Johnson, 1975; Nociti Jr *et al.*, 2000; Galvão *et al.*, 2003), ligaduras com fio de nylon (Lima *et al.*, 2000; Leitão *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2005), ligaduras de fio de seda (Kennedy & Polson, 1973, Heijl *et al.*, 1976; Grauballe *et al.*, 2005), elásticos ortodônticos (Abiko & Shimono, 1989; Groissman *et al.*, 1990; Mitsuta *et al.*, 2002), ligaduras metálicas (Perlstein & Bissada, 1977; Jain *et al.*, 2003); dieta (Keyes & Jordan, 1964; Querido *et al.*, 1971; Robinson *et al.*, 1991; Yamazaki, 1992), injeção de LPS bacteriano (Tomofuji *et al.*, 2005, 2006; Vardar-Sengül *et al.*, 2006) e inoculação de bactérias (Crawford *et al.*, 1978; Samejima *et al.*, 1990; Klausen *et al.*, 1991). Independente do método utilizado para induzir a doença periodontal, todos os estudos obtiveram como resultado a reabsorção do osso alveolar e alterações nos tecidos periodontais característicos da doença periodontal.

2.2.1. Estrutura dos Tecidos Periodontais no Rato

A estrutura da área dentogengival no rato, incluindo o epitélio juncional e sua inserção na superfície dental, a configuração e topografia dos tecidos epiteliais na margem gengival, e o sulco gengival raso com a superfície livre do epitélio juncional no fundo ou ao nível da margem gengival é bem similar ao encontrado nos humanos (Page, 1982).

2.2.2. Doença Periodontal Experimental em Ratos

O modelo experimental de doença periodontal em ratos é caracterizado pelo acúmulo de placa, achatamento e deslocamento da crista gengival, aumento da proliferação do epitélio para o interior do tecido conjuntivo, e presença de

infiltrado inflamatório, principalmente de células mononucleares, devido à presença da ligadura (Johnson, 1975; Bezerra *et al.*, 2000).

Foi observado, histologicamente, a presença de neutrófilos nas lesões iniciais, após alguns dias a lesão sofre alterações e pode-se encontrar um infiltrado mononuclear substituindo o infiltrado polimorfonuclear, o número de osteoclastos aumenta até aproximadamente o 14º dia de indução da doença e em seguida sofre um declínio (Sallay *et al.*, 1982; Abiko & Shimono, 1989; Samejima *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 2000; Kuhr *et al.*, 2004). Os osteoclastos promovem a reabsorção óssea e de cimento. As alterações inflamatórias que ocorrem podem ser explicadas pela liberação local de mediadores inflamatórios (Lima *et al.*, 2000). Ocorre ulceração do epitélio da papila interproximal, o epitélio juncional sofre ruptura e há formação de epitélio juncional longo (Galvão *et al.*, 2003).

Os dentes que não recebem ligadura apresentam um quadro de inflamação subclínica, o que é normal pois não conseguimos eliminar todos os agentes irritantes da cavidade oral (Perlstein & Bissada, 1977; Samejima *et al.*, 1990; Galvão *et al.*, 2003). O epitélio juncional e gengival encontram-se intactos, há presença de osteoclastos e lacunas de Howship, no entanto, em menor quantidade que a observada nos dentes com ligadura, o que confirma a constante remodelação óssea (Sallay *et al.*, 1982; Galvão *et al.*, 2003; Kuhr *et al.*, 2004).

Johnson, em 1975, avaliando o efeito da ligadura de fio de seda sobre o periodonto de ratos tratados com dextran sulfato observou histologicamente que, nos animais que receberam somente a ligadura, houve um aumento no número de osteoclastos adjacentes ao osso alveolar e o pico de reabsorção óssea ocorreu aos 17 dias, após este período poucas alterações puderam ser observadas; no grupo onde houve a associação da ligadura com o dextran sulfato o pico de reabsorção óssea ocorreu aos 37 dias devido à ação da droga que promove alterações na formação óssea.

Crawford *et al.* (1978) utilizando o método de indução da doença periodontal por inoculação de 3 espécies bacterianas (*S. mutans* S6715, *A. naeslundii* e *A. viscosus*), em ratos germfree, observaram que a progressão da perda óssea nos ratos infectados era semelhante a dos ratos germfree até o período de 60 dias pós-inoculação. No entanto, no período de 60 a 90 dias houve um aumento na velocidade de perda óssea, principalmente do componente vertical, nos animais infectados.

Sallay *et al.* (1982), avaliando o efeito da imunossupressão química e do uso de antibióticos sobre a reabsorção alveolar em ratos com ligadura, observaram que a associação do imunossupressor com a ligadura resultou numa maior destruição óssea, no entanto, somente o uso do agente imunossupressor não foi capaz de induzir reabsorção óssea. O imunossupressor inibiu a proliferação dos osteoblastos e desta maneira a perda óssea observada foi maior que no grupo que recebeu somente a ligadura. Eles também observaram que o antibiótico administrado preveniu a perda óssea tanto no grupo com ligadura quanto no com ligadura e imunossupressor, sugerindo que a destruição óssea neste modelo experimental é de origem bacteriana.

Samejima *et al.* (1990) investigaram o efeito da infecção por *Eikenella corrodens* na progressão da periodontite induzida por ligadura em ratos imunossuprimidos ou não. Neste estudo foi observado que tanto a imunossupressão quanto a inoculação da bactéria, sem a presença da ligadura, não resultaram na destruição do aparato periodontal. No entanto a ligadura mostrou ser um meio de implantação da *E. corrodens* na cavidade oral dos ratos e que a mesma causa reabsorção óssea neste modelo animal.

2.3. Dieta

A nutrição pode ter impacto direto ou indireto sobre o desenvolvimento e composição dos biofilmes. O efeito direto: os nutrientes da dieta fornecem energia, nitrogênio, ou carbono para os microorganismos; os metabólitos de um organismo são fonte de nutrientes para outros no mesmo ambiente; o efeito indireto: os produtos metabólicos alteram o ambiente e favorecem o crescimento de certos microorganismos; e os nutrientes da dieta fornecem substrato para a produção de polímeros específicos para as células do biofilme (Bowden & Li, 1997; Boyd & Madden, 2003).

A avaliação do efeito da dieta sobre a doença periodontal experimental é difícil. O controle da dieta pode ser mediado por efeitos sistêmicos sobre o hospedeiro, efeitos locais sobre a microbiota, ou através do trauma nos tecidos periodontais por fatores físicos da dieta (Jordan, 1971). No estudo de Mitchell & Johnson (1956) foi verificado que a doença periodontal em hamsters é favorecida por uma dieta rica em carboidratos. Dietas ricas em glicose, frutose e amido e aquelas ricas em sacarose, favorecem a implantação de *A. viscosus* e o acúmulo de placa (Jordan *et al.*, 1969).

A composição da dieta parece alterar a distribuição e metabolismo dos microorganismos na placa, no entanto a maioria destas alterações ocorre na placa supragengival. A placa subgengival parece estar protegida destas alterações devido a sua localização. O biofilme subgengival é nutrido pelo fluido crevicular e pelas células do hospedeiro, portanto o efeito da dieta parece ser mais sistêmico que local (Alfano, 1976).

Keyes & Jordan (1964), utilizando hamsters, observaram que a introdução de uma dieta rica em carboidratos (Dieta 2000) resultava no desenvolvimento espontâneo da doença periodontal. No entanto nem todos os animais

apresentavam a doença periodontal após a introdução da dieta, o que sugere que a presença de microorganismos capazes de induzir a doença periodontal é necessária e não só o acúmulo de placa. Neste estudo eles também observaram que quando havia alteração na composição da dieta (p.ex. ração comercial) a placa subgengival sofria mineralização.

Querido *et al.*, em 1971, também em estudo com hamsters, utilizou uma dieta natural (M70) para verificar sua utilidade nos estudos com roedores procurando demonstrar a participação de microorganismos na doença periodontal. Os animais além de receberem a dieta foram inoculados com *Odontomyces viscosus*. Esta dieta apresenta em seu conteúdo 56% de sacarose, o que auxilia a multiplicação e aderência das bactérias às superfícies dentais. Os animais que foram inoculados e receberam a dieta apresentaram maior acúmulo de placa dental e a formação de bolsas periodontais, destruição óssea e mobilidade dental. No entanto, os animais que receberam somente a ração M70 também apresentaram sinais de doença periodontal o que demonstra o efeito desta dieta sobre os microorganismos indígenas da cavidade oral destes animais, que também têm potencial para induzir doença periodontal quando na presença de um substrato que favoreça sua multiplicação.

Em 1989, Abiko & Shimono utilizaram uma dieta rica em sacarose (50% de sacarose) para avaliar o efeito da mesma sobre a regeneração dos tecidos periodontais. Neste estudo a doença periodontal foi induzida com bandas elásticas e as mesmas permaneceram no local por 1 semana, após este período elas foram removidas, as dietas mantidas, e os animais foram acompanhados por um período de até 8 semanas. Neste estudo não foi observada a regeneração completa do epitélio juncional o que sugere que o tempo de irritação exerce influência na regeneração dos tecidos periodontais. No entanto a dieta rica em sacarose foi capaz de sustentar um quadro inflamatório, sugerindo que esta dieta é capaz de manter o acúmulo de placa em ratos.

Robinson *et al.* (1991), em um estudo com duração de 107 semanas, testaram a indução da doença periodontal com o uso de diferentes apresentações de uma mesma dieta. Entre as observações foi verificado que a severidade das lesões aumentavam com o aumento da idade do animal e as lesões mais severas foram encontradas no grupo que recebeu a dieta na forma expandida. Também foi observado que as lesões eram mais severas na maxila que na mandíbula. A razão para a dieta na forma expandida ter resultado em maior incidência da doença periodontal nos animais pode ser pelo fato da mesma ser bastante friável, o que causaria maiores injúrias aos tecidos periodontais.

No estudo de Yamazaki (1992) foi utilizada a dieta 2000 (rica em carboidratos), a mesma utilizada no estudo de Keyes & Jordan (1964). Em seu estudo os animais foram alimentados com a dieta por um período de até 12 semanas. Na avaliação radiográfica a média do comprimento da porção erupcionada (lê-se quantidade de perda óssea na mesial) aumentou significativamente nos grupos que receberam a dieta 2000 quando comparada ao grupo que recebeu a ração normal, nos três intervalos de sacrifício ($p < 0,05$). A maior reabsorção óssea ocorreu entre os períodos de 4 a 8 semanas independente da dieta.

Galvão *et al.* (2003) em seu estudo metodológico utilizaram uma dieta rica em sacarose para avaliar se a mesma era capaz de produzir doença periodontal. Nos seus achados foi observado que tal dieta não foi capaz de induzir doença periodontal e nem a associação da dieta com a ligadura ao redor do 2º molar superior apresentou maiores perdas quando comparado ao grupo que recebeu somente a ligadura e ração comercial.

Tomofuji *et al.* (2005) avaliaram o efeito de uma dieta rica em colesterol sobre os tecidos periodontais. Neste estudo foi observado que a dieta promoveu a migração apical do epitélio juncional e a reabsorção óssea, no entanto estes

achados foram menores que no grupo onde a dieta foi associada com a doença periodontal induzida. Os autores concluíram que altos níveis de colesterol na dieta podem iniciar a periodontite e aumentar a resposta inflamatória induzida pelas bactérias já que altos níveis de colesterol no sangue aumentam os níveis das citocinas inflamatórias na circulação.

Nenhum substrato, no entanto, foi demonstrado ter influência sobre a infecção periodontal em roedores da mesma maneira como é observado com a sacarose sobre o desenvolvimento da cárie neste modelo animal (Jordan, 1971; Schefferle, 2005).

As dietas humanas são compostas, em sua maioria, por altas porções de carboidratos fermentáveis, e o consumo de dietas ricas em carboidratos está relacionado ao desenvolvimento de cáries. No entanto esta relação entre dieta e a doença periodontal ainda não foi elucidada, sendo então necessários mais estudos para entender melhor a biologia dos biofilmes orais para assim podermos verificar se existe alguma relação entre a composição da dieta e a doença periodontal (Bowden & Li, 1997).

3. PROPOSIÇÃO

O presente estudo se propôs a avaliar, histometricamente, a influência de uma dieta hiperlipídica sobre a perda óssea alveolar resultante da doença periodontal experimental em ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais:

Para este estudo foram utilizados 32 ratos adultos machos da raça Wistar, com idade média de 8 semanas pesando em média 250g, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no biotério da FOP-Unicamp durante todo o período experimental. Ao longo de todo o estudo, os animais foram mantidos sob as mesmas condições ambientais.

Todos os procedimentos executados estavam de acordo com as normas éticas regidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)-IB-UNICAMP sob o protocolo de número **980-1**.

4.2. Sedação e anestesia:

Os animais foram inicialmente pesados para o cálculo da correta dosagem do anestésico geral a ser administrada. Os animais foram anestesiados, de acordo com o peso corpóreo, com solução de ketamina (50 mg/kg IM) (Francotar[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil) e cloridrato de xylasina (15 mg/kg IM) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brasil). Nos casos em que não se obteve o efeito anestésico desejado, a dose de cloridrato de ketamina foi suplementada com metade da dose inicial, de acordo com as especificações do fabricante.

4.3. Colocação das ligaduras:

Após a anestesia, os ratos foram posicionados em aparato de Doku modificado (Doku, 1966), no qual a boca do animal é mantida aberta por meio

de bandas elásticas presas aos incisivos inferiores e a língua, tracionada com o auxílio de um fio de algodão espesso (**Figura 1**). Um afastador foi utilizado para adequada visualização da região dos molares inferiores. Uma ligadura de fio de algodão (Corrente Algodão nº. 10; Coats Corrente, SP, Brasil) foi colocada pelo espaço interproximal (**Figura 2**), em torno do primeiro molar inferior esquerdo ao nível do sulco gengival, com o objetivo de favorecer o acúmulo de biofilme nos fios (Johnson, 1975). Os dentes contralaterais, sem ligadura, serviram como controle (**Figura 3**).

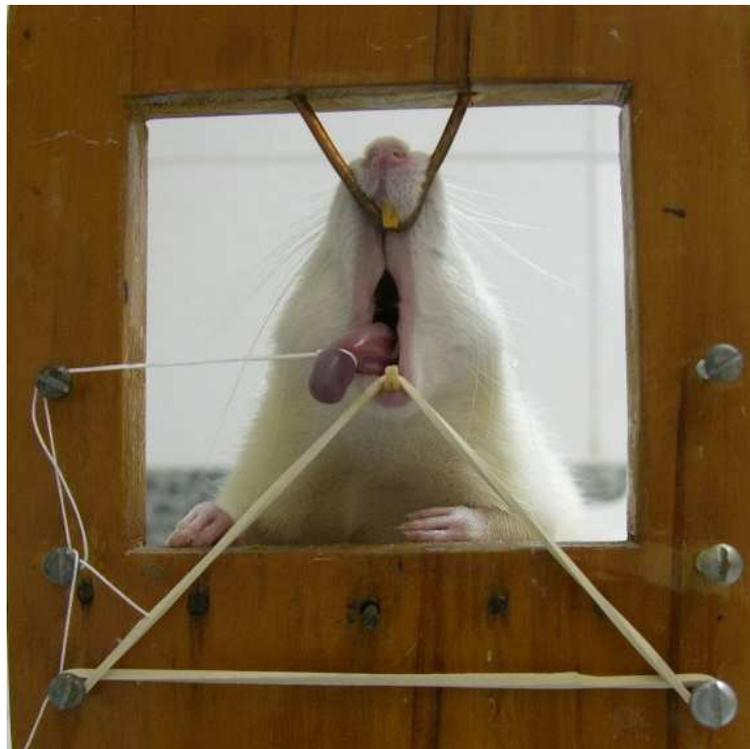


Figura 1 - Animal posicionado no aparelho de Doku (Doku, 1966), para melhor visualização do 1º molar inferior



Figura 2 - Colocação do fio de algodão ao redor do 1º molar inferior esquerdo com auxílio de um espaçador endodôntico

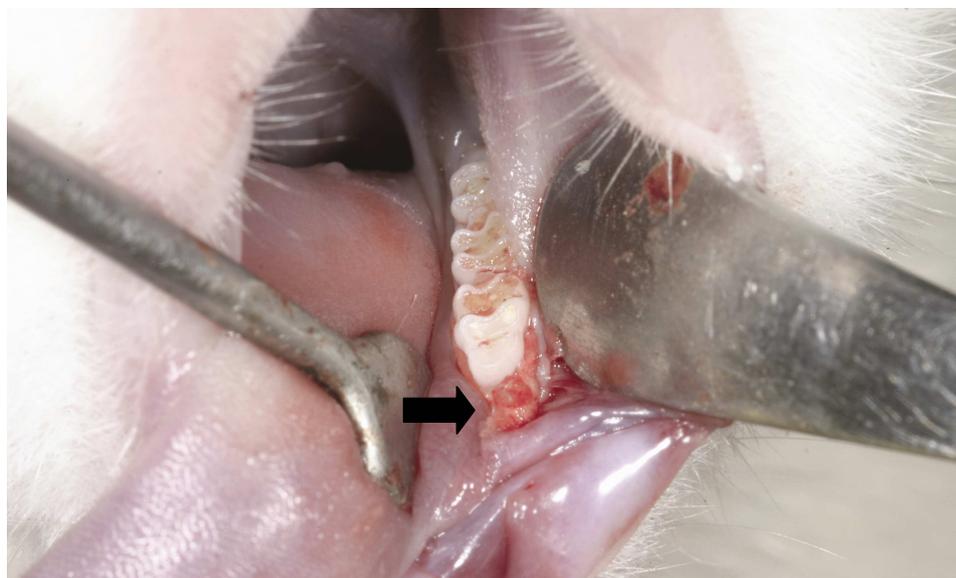


Figura 3 - Aspecto final do fio de algodão em posição (a seta indica posição do fio na mesial)

4.4. Delineamento do Estudo:

Os animais foram divididos aleatoriamente em 8 grupos, com quatro animais cada, que receberam os seguintes tratamentos:

1) **Grupo C:**

Ratos Wistar, com doença periodontal induzida em uma das hemiarcadas inferiores, com acesso à ração para animais de laboratório (Purina – Nuvilab CR-1 autoclavável; Nuvital, SP, Brasil) e água *ad libitum*

- a. **C7:** sacrifício aos 7 dias
- b. **C14:** sacrifício aos 14 dias
- c. **C21:** sacrifício aos 21 dias
- d. **C28:** sacrifício aos 28 dias

2) **Grupo H:**

Ratos Wistar, com doença periodontal induzida em uma das hemiarcadas inferiores, com acesso à dieta hiperlipídica e água *ad libitum*

- a. Grupo **H7:** sacrifício aos 7 dias
- b. Grupo **H14:** sacrifício aos 14 dias
- c. Grupo **H21:** sacrifício aos 21 dias
- d. Grupo **H28:** sacrifício aos 28 dias

4.5. Preparo da dieta

A dieta hiperlipídica foi preparada através da mistura de ração para animais de laboratório, amendoim, chocolate ao leite e biscoito na proporção de 3:2:2:1. Todos os componentes foram triturados e misturados para formar um pelete (Estadella *et al.*,2004).

Esta dieta hiperlipídica consiste de 20% de proteínas, 20% de lipídios, 48% de carboidratos e 4% de fibras. A ração comercial apresenta apenas 3% de lipídeos em sua composição.

4.6. Preparo Histológico:

Os animais foram sacrificados nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias por meio de perfusão com formol a 4% em tampão fosfato (pH 7,2-7,4) sob anestesia (Tomofuji *et al.*, 2005; 2006). As mandíbulas foram dissecadas e divididas pela sínfise mandibular em hemimandíbulas. As ligaduras de fio de algodão foram removidas e as peças identificadas. A descalcificação foi realizada em solução de EDTA a 10% em tampão fosfato (pH 7,2-7,4), de acordo com o protocolo de Tsubota *et al.* (2002), renovada diariamente por um período de 60 dias, até que as peças estivessem suficientemente descalcificadas. Ao final deste período, as peças foram desidratadas em álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Secções seriadas de 6 µm de espessura foram obtidas na direção mesio-distal e em seguida coradas por hematoxilina e eosina.

4.7. Processamento Histométrico:

Inicialmente foram separados, para cada amostra, os cortes nos quais a região da bifurcação foi claramente identificada. Foram selecionados 10 cortes, semi-seriados, de cada dente. O volume da perda óssea inter-radicular na região de bifurcação foi determinado conforme o princípio de Cavalieri (Gundersen & Jensen, 1987; Gundersen *et al.*, 1999).

As imagens da região inter-radicular dos cortes selecionados foram capturadas com o auxílio de uma câmera digital (Digital Kocam CCD câmera; DMI, São Paulo, Brasil) acoplada ao microscópio (Axioskop 2 plus®; Zeiss, Jena, Germany) utilizando a objetiva de 5x.

A área de tecido conjuntivo proveniente da destruição do tecido ósseo na região inter-radicular foi mensurada com o auxílio de um sistema de análise de imagens digitalizadas (Image Pro[®], Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) utilizando o recurso de contagem de pontos de um retículo quadriculado. O número mínimo de pontos por cortes foi calculado pela fórmula: perímetro / $\sqrt{\text{área}}$ e o nomograma de Gundersen & Jensen (1987). De acordo com o coeficiente de erro a ser calculado, o número de pontos poderá ser ampliado conforme as recomendações de Gundersen *et al.* (1999). O retículo foi posicionado incluindo sempre a dentina coronária e radicular e o tecido ósseo, computando-se os pontos que coincidem com o tecido conjuntivo frouxo presente na região inter-radicular em consequência da perda de inserção periodontal nesta região. O volume foi calculado por meio da fórmula:

$$V = t \cdot \sum_{i=1}^{m-1} a_i$$

sendo que “*t*” representa a distância entre os cortes (incluindo a espessura do próprio corte), “*m*” o número de cortes por espécimes e “*a_i*” representa a área mensurada em cada corte.

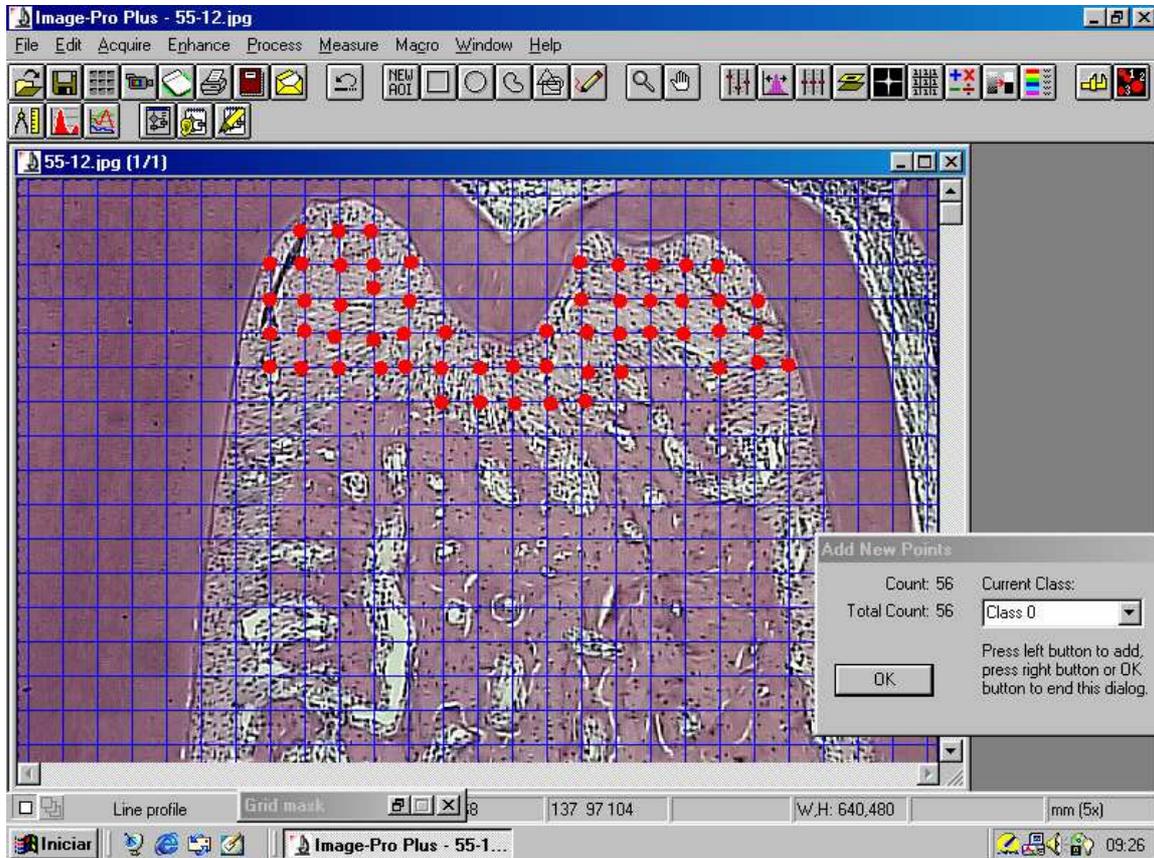


Figura 4 - Imagem digitalizada do corte histológico e retículo quadriculado sobre a região inter-radicular. Pontos vermelhos coincidem com o tecido conjuntivo.

4.8. Análise estatística:

A fim de testar a hipótese nula de que não existe diferença entre as dietas para o parâmetro volume de perda óssea inter-radicular, em diferentes intervalos de tempo, utilizamos o teste ANOVA para avaliação intra e intergrupos, quando diferenças significantes fossem detectadas o teste de Tukey foi utilizado para identificar estas diferenças. O nível de significância utilizado foi de 5%. Os valores encontram-se descritos como média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Observações Clínicas

Após a colocação das ligaduras os animais não apresentaram dificuldades para se alimentar. No local da aplicação da anestesia, em apenas alguns animais, ocorreu necrose envolvendo pele e planos musculares, no entanto isto não limitou os movimentos dos animais.

No dia do sacrifício todos os animais apresentavam-se com a ligadura em posição. Clinicamente observamos um grande acúmulo de restos alimentares na região da ligadura, independente do tipo de ração a qual o animal havia sido designado. Na região sem ligadura era visível o menor acúmulo de restos alimentares comparado à região com ligadura.

No momento do sacrifício observamos, nos ratos do grupo H, um maior acúmulo de tecido adiposo na região abdominal.

5.2. Resultados Histométricos

A análise intragrupo revelou uma diferença estatisticamente significativa no volume de perda óssea inter-radicular ($p < 0,0001$) entre os dentes com ligadura e sem ligadura independente do tempo e do grupo (**Tabela 1**). Este achado mostra que as ligaduras foram capazes de produzir a doença periodontal.

Analisando os resultados intragrupo para os diferentes intervalos de tempo observamos uma diferença estatisticamente significativa para o tempo de 21 dias ($1,44 \pm 0,2 \mu\text{m}^3$; $p < 0,05$) em comparação aos tempos 7 dias de ligadura ($4,71 \pm 0,94 \mu\text{m}^3$) no grupo da ração hiperlipídica (**H**) tanto nos dentes com quanto nos sem ligadura (**Tabela 1**).

Na comparação intergrupos não houve diferença estatisticamente significativa entre os intervalos de tempo nos parâmetros com e sem ligadura ($p > 0,05$) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Média e desvio padrão do volume de perda óssea (μm^3) inter-radicular nos dentes com e sem ligadura, de acordo com o grupo e o intervalo de tempo.

Ligadura	Grupo (dieta)	Tempo			
		7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
Com	H	4.71 ± 0.94 Aa	2.25 ± 0.47 Aab	1.44 ± 0.2 Ab	2.78 ± 0.7 Aab
	C	3.73 ± 2.4 Aa	2.99 ± 1.04 Aa	2.21 ± 1.4 Aa	1.9 ± 0.6 Aa
Sem	H	0.96 ± 0.1 Ba	0.75 ± 0.15 Bab	0.67 ± 0.2 Bb	0.93 ± 0.2 Bab
	C	0.76 ± 0.09 Ba	0.92 ± 0.18 Ba	0.81 ± 0.1 Ba	0.86 ± 0.2 Ba

Médias seguidas de letras distintas maiúsculas na vertical (dentro de cada nível do fator ligadura) e minúsculas na horizontal diferem entre si pela ANOVA e teste Tukey ($p < 0,05$). A perda óssea inter-radicular foi sempre maior no grupo com ligadura independente do grupo e do tempo ($p < 0,0001$).

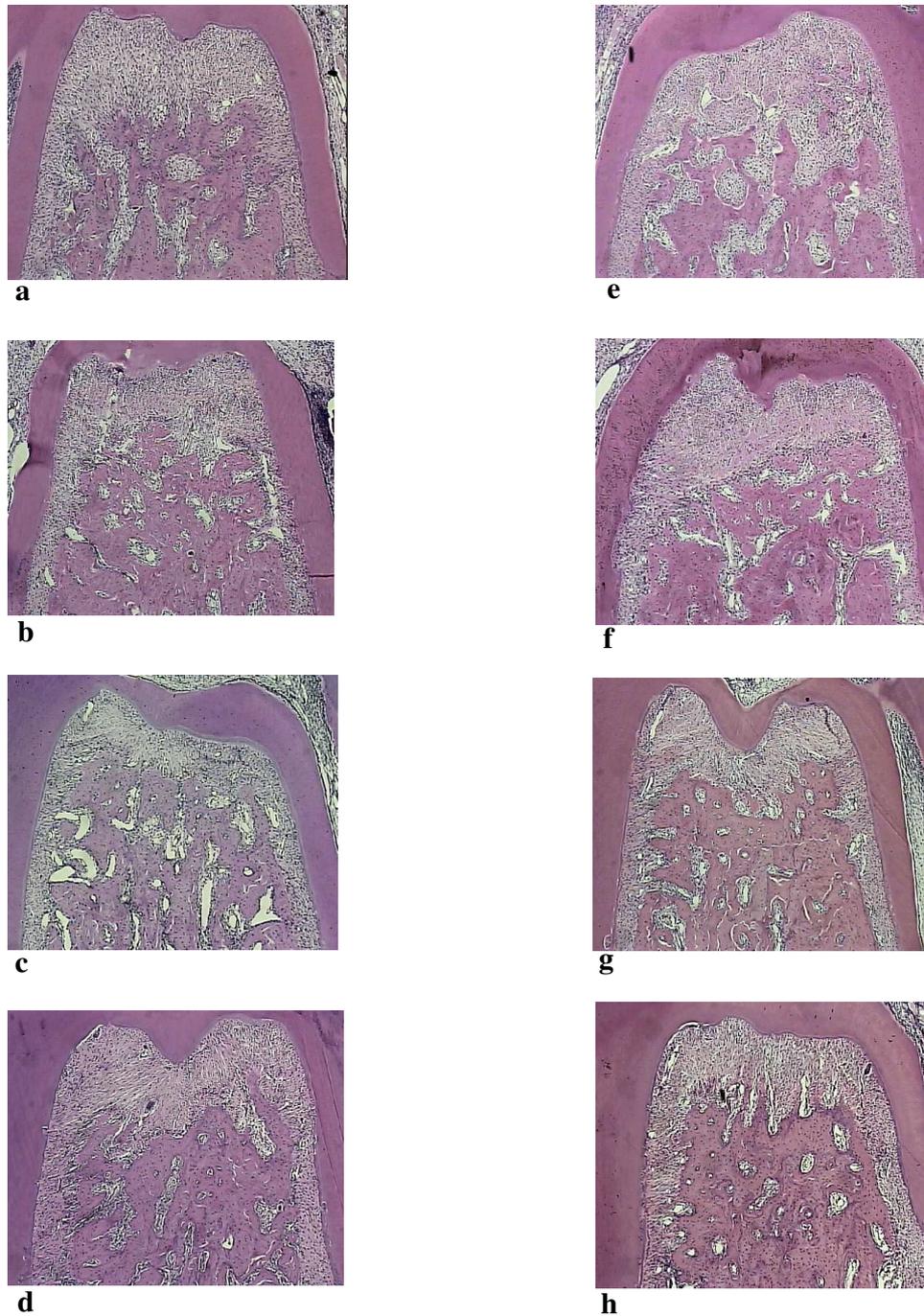


Figura 5 - Fotomicrografias ilustrando a região inter-radicular dos dentes com ligadura. Grupo H: a) 7 dias; b) 14 dias; c) 21 dias; d) 28 dias; Grupo C: e) 7 dias; f) 14 dias; g) 21 dias; h) 28 dias. Aumento original de x 50.

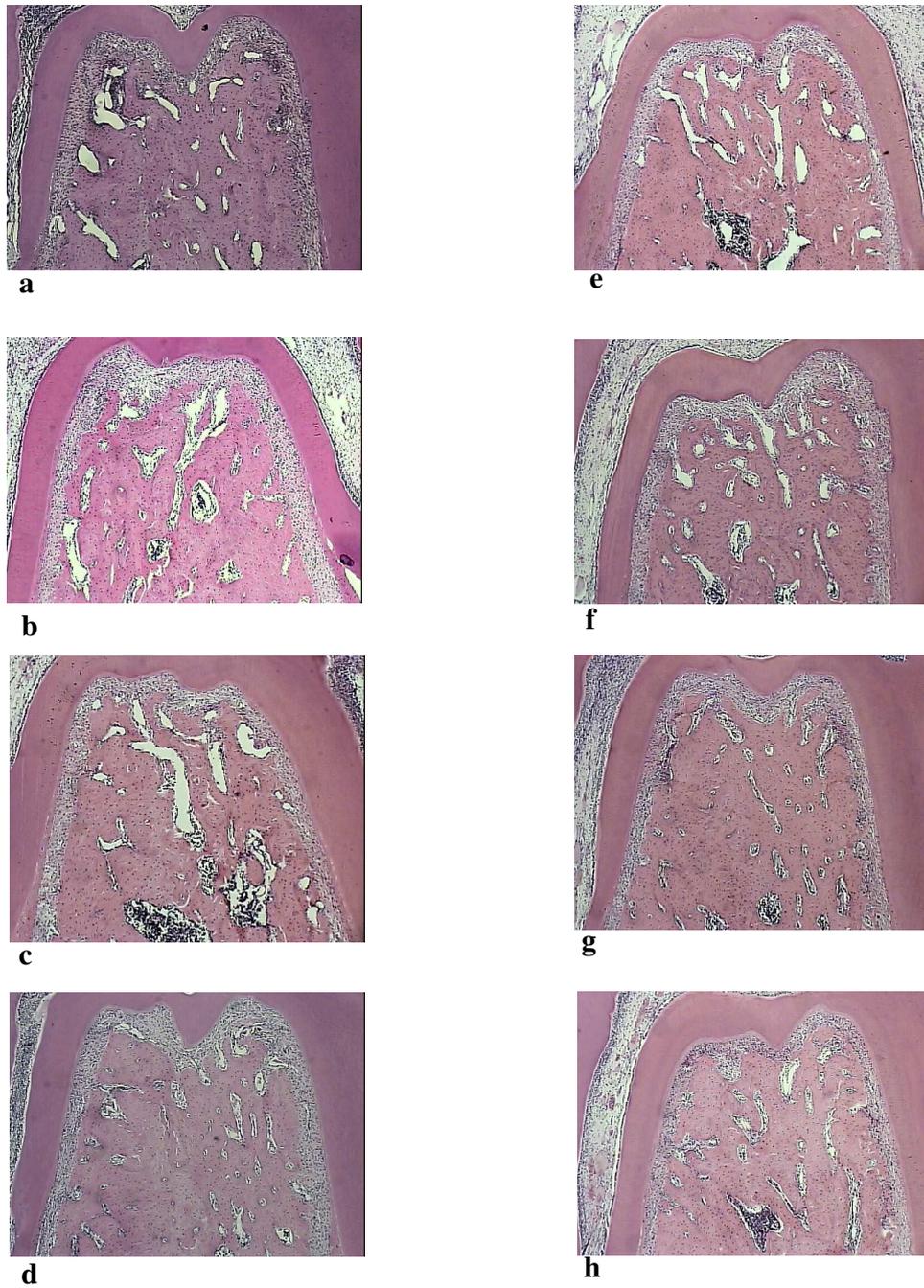


Figura 6 - Fotomicrografias ilustrando a região inter-radicular dos dentes sem ligadura. Grupo H: a) 7 dias; b) 14 dias; c) 21 dias; d) 28 dias; Grupo C: e) 7 dias; f) 14 dias; g) 21 dias; h) 28 dias. Aumento original de x 50.

6. DISCUSSÃO

O modelo de indução da doença periodontal utilizado por Johnson (1975) é comprovadamente eficiente em induzir a doença e tem sido largamente utilizado para tal fim nos modelos animais. Neste estudo, a ligadura foi capaz de causar maior perda óssea inter-radicular, em todos os períodos, em relação aos dentes controle ($p < 0,0001$), confirmando a eficiência do modelo experimental aqui utilizado.

Atualmente temos observado uma alteração na composição da dieta da população devido à facilidade apresentada pelos alimentos do tipo “fast-food”, que são ricas em carboidratos e lipídeos. No estudo de Ueno (1965), citado por Tomofuji *et al.* (2005), foi observado que altas concentrações de colesterol na dieta podem provocar alterações nas fibras do ligamento periodontal e um aumento na espessura do cemento no periodonto de ratos. Nosso estudo, diferentemente do estudo de Ueno (1965), não utilizou uma dieta rica em colesterol e sim uma dieta hiperlipídica, e foi realizada uma análise histométrica na área inter-radicular para caracterizar a perda óssea nesta região.

A dieta hiperlipídica é largamente utilizada nos estudos sobre obesidade, onde esta dieta é fornecida por um período de no mínimo 8 semanas, e em sua composição encontramos cerca de 20-60% de lipídeos, quantidade esta maior que a encontrada na ração comercial (aproximadamente 5% de lipídeos), daí a razão de nestes experimentos os animais apresentarem maior quantidade de tecido adiposo (Deshaies *et al.*, 1983; Akiyama *et al.*, 1996; Chalkley *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2003; Estadella *et al.*, 2004; de Souza *et al.*, 2005). O estudo de Margareto *et al.* (2001) utilizou a dieta hiperlipídica durante 30 dias e não observou o estabelecimento da obesidade nos animais, no entanto o pequeno acúmulo de tecido adiposo que é observado nos animais alimentados com esta dieta já é capaz de provocar alterações sistêmicas nos animais, como a ativação de genes

responsáveis pela diferenciação dos adipócitos. Nosso estudo observou que os animais do grupo H apresentavam um maior acúmulo de tecido adiposo na região abdominal, no entanto este parâmetro não foi quantificado.

Pelo fato da ração hiperlipídica ser composta, em parte por ração comercial, o animais não apresentam carência nutricional, o que poderia interferir sobre a doença periodontal já que é sabido que deficiências nutricionais podem estar relacionadas a alterações nos tecidos periodontais, como por exemplo a carência de vitamina C comprovadamente relacionada a alterações dos tecidos periodontais como gengivites e perda de integridade do ligamento periodontal (Enwonwu, 1994, 1995; Boyd & Madden, 2003; Schifferle, 2005).

Alguns estudos que utilizaram dietas como única forma de indução da doença periodontal observaram alterações nos tecidos periodontais (Keyes & Jordan, 1964; Querido *et al.*, 1971; Robinson *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 1992), no entanto estes achados foram mais comumente observados naqueles estudos que utilizaram hamsters como modelo animal (Keyes & Jordan, 1964; Querido *et al.*, 1971) e onde a dieta era rica em sacarose. O presente estudo utilizou ratos da raça Wistar e uma dieta rica em lipídeos e isto pode ter sido uma das razões para não termos encontrado sinais de doença periodontal nos molares dos animais que receberam a dieta hiperlipídica e que estavam sem ligadura. Os achados de Tomofuji *et al.* (2005, 2006), no entanto, contradizem nossos resultados, pois os mesmos utilizaram ratos Wistar e encontraram alterações nos tecidos periodontais. Esta diferença, entretanto, pode ser devido à dieta rica em colesterol utilizada no estudo, diferente da dieta hiperlipídica aqui utilizada.

Os estudos que avaliam os efeitos de dietas sobre a doença periodontal fazem a descrição das características histológicas dos tecidos periodontais (Robinson *et al.*, 1991; Tomofuji *et al.*, 2005) ou realizam a avaliação radiográfica da região interproximal (Yamazaki, 1992). Nosso estudo fez a avaliação da perda

óssea na região da bifurcação, avaliação esta semelhante aos trabalhos de Nociti Jr. *et al.* (2000), Gonçalves *et al.* (2003), Gurgel *et al.* (2004) e Goya *et al.*, (2006). Segundo Goya *et al.* (2006) a avaliação da perda óssea nesta região é mais fiel que a avaliação nas regiões proximais uma vez que esta área não sofre influência do trauma mecânico provocado pela ligadura.

Como podemos observar a perda óssea alveolar apresentou um padrão onde ocorreram maiores perdas nos períodos iniciais (7 e 14 dias) o que corrobora com os dados de Johnson (1975), Sallay *et al.* (1982) e Kuhr *et al.* (2004) que observaram maior reabsorção óssea nos períodos iniciais do estudo devido ao caráter inflamatório agudo da lesão, onde há ativação dos osteoclastos (Schroeder & Lindhe, 1975). Estudos em outros modelos animais também observaram o mesmo padrão de perda óssea. Kennedy & Polson (1973), Adams *et al.* (1975) e Fischer & Klinge (1994) fizeram as mesmas observações em macacos, onde, após 2 semanas, a velocidade de perda óssea sofria uma redução. Nyman *et al.* (1979) observou o mesmo fenômeno em cães e verificou que a posição subgingival da ligadura tinha papel essencial na eficiência deste modelo experimental. A provável razão para a redução da velocidade de perda óssea no nosso estudo pode ser pelo fato de que à medida que ocorre a perda óssea e a erupção passiva dos dentes nos ratos, observada por Kuhr *et al.* (2004), a ligadura vai perdendo o seu efeito.

No estudo de Galvão *et al.* (2003) também foi utilizada uma dieta diferenciada, no caso uma dieta rica em sacarose, e avaliada sua influência sobre a doença periodontal induzida por ligadura. Neste estudo a dieta modificada não foi capaz de promover uma doença mais severa nos animais com ligadura da mesma forma que não foi capaz de induzir a doença naqueles que não tinha ligadura. Estes resultados foram bastante semelhantes aos nossos, apesar de o tipo de avaliação realizada ter sido diferente. Podemos aqui sugerir que, talvez, o

tempo de consumo da dieta pode não ter sido suficiente para observarmos alterações nos tecidos periodontais destes animais em ambos os estudos.

Apesar de não haver diferença estatística em relação à perda óssea alveolar, nos dentes com ligadura, entre o grupo C e o grupo H no tempo 28 dias, pode-se observar uma diferença numérica bastante expressiva (**C** - $1.9 \pm 0.6 \mu\text{m}^3$ e **H** - $2.78 \pm 0.7 \mu\text{m}^3$; figuras 5d e 5h, respectivamente) entre os grupos. Provavelmente, o acúmulo de tecido adiposo observado nos animais do grupo H pode ter contribuído para a maior perda óssea nestes animais, uma vez que já foi demonstrado que, o tecido adiposo produz e secreta citocinas pró-inflamatórias (Saito *et al.*, 2001; Ritchie & Kinane, 2003), contribuindo com um quadro de inflamação crônica sistêmica, exacerbando, assim a doença periodontal produzida nestes animais.

Como já foi observado com o estudo de Perlstein & Bissada (1977), animais obesos apresentam uma doença periodontal mais severa que aqueles não-obesos devido ao espessamento dos capilares do periodonto resultante da deposição de gorduras nos mesmos, o que impede a ótima difusão de oxigênio e nutrientes para os tecidos. Nosso estudo, no entanto, não foi capaz de observar diferenças entre os grupos uma vez que não realizamos avaliações histológicas das estruturas do periodonto, apenas uma avaliação histométrica da perda óssea alveolar na região de furca.

Os dados aqui apresentados não mostraram diferenças significativas entre as dietas avaliadas em relação à iniciação ou progressão da doença periodontal experimental. No entanto, mais estudos são necessários, com um número maior de animais e um período maior de consumo da dieta, além da realização de outras avaliações, como por exemplo uma avaliação histológica dos tecidos gengivais, para verificarmos se a dieta hiperlipídica exerce alguma influência sobre os tecidos periodontais.

7. CONCLUSÃO

Dentro dos limites do presente estudo, podemos concluir que o consumo de uma dieta hiperlipídica não exerceu influência sobre a perda óssea alveolar resultante da periodontite experimental induzida por ligaduras em ratos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abiko Y, Shimono M. Regeneration of periodontal tissues following experimentally induced periodontitis in rats – a comparison of sucrose-rich and conventional diets. Bull Tokyo Dent Coll. 1989; 30(4): 195-204.

Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. Diabetes Res Clin Pract. 1996; 31: 27-35.

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000. 2002; 29: 177-206.

Albandar JM. Periodontal diseases in North America. Periodontol 2000. 2002; 29: 31-69.

Alfano MC. Controversies, perspectives and clinical implications of nutrition in periodontal disease. Dent Clin N Am 1976; 20(3): 519-48.

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J Immunol. 1998; 160: 403-409.

Baker PJ. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. Microbes Infect. 2000; 2: 1181-1192.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Baron R, Saffar J-L. A quantitative study of bone remodeling during experimental periodontal disease in the golden hamster. *J Periodont Res*, 1978; 13: 309-15.

Bezerra MM, de Lima V, Alencar VB, Vieira IB, Brito GA, Ribeiro RA, Rocha FA. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2000; 71(6): 1009-14.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue cultura. *J Periodont Res*. 1993; 28: 500-510.

Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res*. 1997; 11(1): 81-99.

Boyd LD, Madden TE. Nutrition, infection and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2003; 47: 337-54.

Bulló M, Garcia-Lorda P, Megias Salas-Salvadó J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res*. 2003; 11(4): 525-31.

Chalkley SM, Hettiarachchi M, Chisholm DJ, Kraegen EW. Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. *Am J physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282: 1231-1268.

Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodont Res*. 1978; 13: 316-325.

Curcio C, Lopes AM, Ribeiro MO, Francoso OA Jr, Carvalho SD, Lima FB, Bicudo JE, Bianco AC. Development of compensatory thermogenesis in response to overfeeding in hypothyroid rats. *Endocrinology*. 1999; 140(8): 3438-43.

Cutler CN, Arnold RR, Schenkein HA. Inhibition of C3 and IgG proteolysis enhances phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis*. *J Immunol*. 1993; 151: 7016-7029.

Cutler CW, Shinedling EA, Nunn M, Jotwani R, Kim B-O, Nares S, *et al.* Association between periodontitis and hyperlipidemia: cause or effect? *J Periodontol*. 1999; 70(12): 1429-1434.

Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol*. 2004; 25(1): 4-7.

de Souza CT, Araújo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinol*. 2005; 146: 4192-4199.

Deshaiies Y, LeBlanc J, Richard D. Influence of a palatable, high-fat diet, and exercise training on the high-density lipoprotein to total cholesterol ratio in the rat. *Metabolism*. 1983; 32(1): 62-65.

Doku HC, Shklar G, Bugbee B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966; 22(5): 569-577.

Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res*, 2004; 39: 107-110.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, do Nascimento CMO. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004; 20(2): 218-224.

Fischer RG, Klinge B. clinical and histological evaluation of ligature-induced periodontitis in the domestic ferret. *J Clin Periodontol*. 1994; 21: 230-239.

Frenkel JK. Pathology society symposium on choice of animal models for the study of disease processes in man. Introduction. *Fed Proc*. 1969; 28: 160-215.

Galvão MPA, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(1): 56-62.

Gašperšič R, Štilblar-martinčič D, Skalevič U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci*. 2002; 110: 125-129.

Gillespie MJ, Smutko J, Haraszthy CG, Zambon JJ. Isolation and partial characterization of the *Campylobacter rectus* cytotoxin. *Microb Pathog*. 1993; 14: 203-215.

Gonçalves PF, Nogueira Filho GR, Sallum EA, Sallum AW, Nociti Jr FH. Immunosuppressant therapy and bone loss in ligature-induced periodontitis—a study in rats. *Pesqui Odontol Bras*. 2003; 17(1): 46-50.

Goya JA, Paez HA, Mandalunis PM. Effect of topical administration of monosodium olpadronate on experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2006; 77(1): 1-6.

Grauballe MCB, Bentzen BH, Björnsson M, Moe D, Jonassen TEN *et al.* The effect of spironolactone on experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2005; 40: 212-217.

Groisman M, Klinge B. Clinical and histological findings in ligature-induced experimental periodontitis in dogs. *J Clin Periodontol.* 1990; 17: 186-190.

Gundersen HJG, Jensen EB. The Efficiency of Systematic Sampling in Stereology and Its Prediction. *J Microscopy.* 1987; 147: 229-263.

Gundersen HJG, Jensen EBV, Kiêu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology — reconsidered. *Journal of Microscopy.* 1999; 193(3): 199-211.

Gurgel BC, Duarte PM, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ, Sallum AW, *et al.* Impact of an anti-inflammatory therapy and its withdrawal on the progression of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2004; 75(12): 1613-8.

Györfi A, Fazekas A, Suba Zs, Ender F, Rosivall L. Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 601-5.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 1994; 5: 78-111.

Hausmann E, Raisz L, Miller WA. Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science.* 1970; 168: 862-864.

Heijl L, Rifkin BR, Zander HA. Conversion of chronic gingivitis to periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol.* 1976; 47(12): 710-6.

Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantônio Jr E. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. *J Periodont Res.* 2004; 39: 188-193.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 1995; 95: 2409-2415.

Iacopino AM, Cutler CW. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. *J Periodontol.* 2000; 71(8): 1375-1384.

Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res.* 1975; 10: 332-345.

Jordan HV, Keyes PH, Lim S. Plaque Formation and implantation of *Odontomyces viscosus* in hamsters fed different carbohydrates. *J Dent Res.* 1969; 48: 824- 831.

Jordan VH. Rodent model systems in periodontal disease research. *J Dent Res.* 1971; 50 Suppl. 2: 236-242.

Katz J, Flugelman MY, Goldberg A, Heft M. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels. *J. Periodontol.* 2002; 73(5): 494-500.

Kennedy JE, Polson AL. Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. *J Periodontol.* 1973; 44(3): 140-4.

Keyes PH, Jordan HV. Periodontal lesions in the Syrian hamster- III Findings related to an infectious and transmissible component. Arch Oral Biol. 1964; 9: 377-400.

Klausen B, Sfintescu C, Evans RT. Asymmetry in periodontal bone loss of gnotobiotic Sprague-Dawley rats. Arch Oral Biol. 1991; 36(9): 685-7.

Kopleman PG. Obesity as a medical problem. Nature. 2000; 404: 635-43.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2004; 39(2): 101-6.

Leitão RF, Ribeiro RA, Chaves HV, Rocha FA, Lima V, Brito GA. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J Periodontol. 2005; 76(6): 956-63.

Lima V, Bezerra MM, de Menezes Alencar VB, Vidal FD, da Rocha FA, Brito GAC, de Albuquerque Ribeiro R. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. Eur J Oral Sci. 2000; 108(2): 123-9.

Lindhe J, Nyman S. Clinical trials in periodontal therapy. J Periodontal Res. 1987; 22: 217-221.

Listgarten, MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. J Periodont Res. 1987; 22: 172-178.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol. 1965; 36: 177.

Löesche W, Karapetow F, Pohl A, Phol C, Kocher T. Plasma lipid and blood glucose levels in patients with destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2000; 27(8): 537-541.

Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, *et al.* Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol.* 1999; 25: 374-380.

Margareto J, Ambrosi-Gómez J, Marti A, Martinez JÁ. Time-dependent effects of a high-energy-yielding diet on the regulation of specific White adipose tissue genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 283(1): 6-11.

Menezes AM, Rocha FA, Chaves HV, Carvalho CB, Ribeiro RA, Brito GA. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005; 76(11): 1901-9.

Mikx FHM, Maltha JC, Wolters-Lutgerhorst JML, Franken HCM. Age and diet composition in relation to experimental periodontal destruction in hamsters. *J Periodont Res.* 1984; 19:51-60.

Mitchell DF, Johnson M. The nature of the gingival plaque in the hamster: production, prevention, and removal. *J Dent Res.* 1956; 35(4): 651-5.

Mitsuta T, Horiuchi H, Shinoda H. Effects of topical administration of clodronate on alveolar bone resorption in rats with experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2002; 73(5): 479-86.

Nociti Jr FH, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MAN, Tramontina VA, Barros SP *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis – a histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000; 71(9):1460-4.

Nyman S, Schroeder HE, Lindhe J. Suppression of inflammation and bone resorption by indomethacin during experimental periodontitis in dogs. *J Periodontol.* 1979; 50(9):450-61.

Page RC. *Periodontitis in man and other animals. A comparative review.* Basel; New York: Karger, 1982.

Pereira LO. Protocolo de indução de obesidade em ratas a partir do perfil de ingestão alimentar de mulheres obesas brasileiras [dissertação]. Campinas: UNICAMP/ IB, 2002.

Perlstein MI, Bissada NF. Influence of obesity and hypertension on the severity of periodontitis in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977; 43(5): 707-719.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC, Saad MJ. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005; 146(3): 1576-87.

Querido NBG, Teles JCB, Carvalho LE, Araújo WC. Doença periodontal em hamsters alimentados com a dieta natural M70. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 1971; 4 (1,2): 5-11.

Ritchie CS, Kinane DF. Nutrition, inflammation, and periodontal disease. *Nutrition.* 2003; 19: 475-476.

Robinson M, Hart D, Pigott GH. The effects of diet on the incidence of periodontitis in rats. *Lab Anim.* 1991; 25: 247-253.

Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. J Dent Res. 2001; 80(7): 1631-1636.

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

Samejima Y, Ebisu S, Okada H. Effects of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontal Res. 1990; 25: 308-315.

Schenkein HA. The pathogenesis of periodontal diseases. J Periodontol. 1999; 70(4): 457-70.

Schenkein HA. Failure of *Bacteroides gingivalis* W83 to accumulate bound C3 following opsonization with serum. J Periodont Res. 1989; 24: 20-27.

Schifferle RE. Nutrition and periodontal diseases. Dent Clin N Am. 2005; 49: 595-610.

Schroeder HE, Lindhe J. Conversion of stable established gingivitis in the dog into destructive periodontitis. Arch Oral Biol. 1975; 20: 775-82.

Shenker BJ, Vitale LA, Welham DA. Immune suppression induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: Effects on immunoglobulin production by human B cells. Infect Immun. 1990; 58: 3856-3862.

Tanner ACR, Socransky SS, Goodson JM. Microbiota of periodontal pockets losing crestal alveolar bone. J Periodontol Res, 1984; 19: 279-291.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Løe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res.* 1966; 1: 1-13.

Tomofuji T, Azuma T, Kusano H, Sanbe T, Ekuni D, Tamaki N, *et al.* Oxidative damage of periodontal tissue in the rat periodontitis model: effects of a high-cholesterol diet. *FEBS letters.* 2006; 580: 3601-4.

Tomofuji T, Kusano H, Azuma T, Ekuni D, Yamamoto T, Watanabe T. Effects of a high-cholesterol diet on cell behavior in rat periodontitis. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 752-6.

Tsai CC, McArthur WP, Baehni PC, Hammond B, Talchman N. Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun.* 1979; 25: 427-439.

Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H. Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption. *J Dent Res.* 2002; 81(10): 673-8.

Ueno K. [Histological studies on the wistar rats fed cholesterol, sodium cholate and methylthiouracil, with special reference to the changes of the periodontal tissues.] *Kokubyo Gakkai Zasshi.* 1965; 32: 368-391. *Apud* Tomofuji T, Kusano H, Azuma T, Ekuni D, Yamamoto T, Watanabe T. Effects of a high-cholesterol diet on cell behavior in rat periodontitis. *J Dent Res.* 2005; 84(8): 752-6.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature.* 1997; 389(6651): 610-614.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Vardar-Sengul S, Buduneli N, Buduneli E, Kardesler L, Baylas H, Atilla G, *et al.* Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein in rats. *J Periodontol.* 2006; 77(5): 814-20.

Williams RC. Periodontal disease. *N Engl J Med.* 1990; 322: 373-382.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003; 133: 1081-7.

Yamazaki Y. Effects of destructive periodontitis, induced by diet, on the mechanical properties of the periodontal ligament of the mandibular first molar in golden hamsters. *J Periodont Res.* 1992; 27: 149-158.

9. ANEXOS

	Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia	
UNICAMP		CEEA-IB-UNICAMP

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

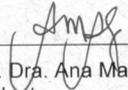
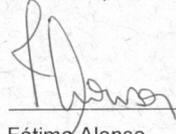
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 980-1, sobre **"EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA SOB A EVOLUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL EM RATOS - AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA"** sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Antonio Wilson Sallun / Beatriz de Brito Bezerra** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 22 de março de 2006.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 980-1, entitled **"EFFECTS OF A HIPERLIPIDIC DIET ON THE EVOLUTION OF THE EXPERIMENTAL PERIODONTAL DISEASE IN RATS – HISTOLOGICAL AND HISTOMETRIC EVALUATION"**, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on March 22, 2006.

Campinas, 22 de março de 2006.

 _____ Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo Presidente	 _____ Fátima Alonso Secretária Executiva
---	--

CEEA/IB – Unicamp Caixa Postal 6109 13063-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3788-6359 Telefax: (19) 3788-6356 E-mail: ceea@cemib.unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm
---	--

Dados do volume perda óssea na região inter-radicular

Grupo H com ligadura							
7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
12	5.5	1	2.8	42	1.2	B	3.3
52	5.0	6	1.6	57	1.6	E	3.5
64	3.7	9	2.2	58	1.3	H	2.2
14	-	43	2.4	62	1.6	M	2.1
Média	4.7		2.2		1.4		2.8
DP	0.9		0.5		0.2		0.7

Grupo H sem ligadura							
7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
4	1.04	7	0.92	44	0.98	A	1.02
11	1.04	8	0.83	46	0.51	F	0.64
41	0.93	18	0.68	60	0.59	K	0.90
48	0.83	68	0.59	63	0.60	L	1.15
Média	0.96		0.75		0.67		0.93
DP	0.10		0.15		0.21		0.22

Grupo C com ligadura							
7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
15	2.61	3	4.27	47	-	C	1.87
2	2.45	5	1.83	53	3.83	D	2.38
50	2.52	10	2.58	65	1.09	G	1.06
56	7.33	49	3.28	55	1.71	O	2.20
Média	3.73		2.99		2.21		1.88
DP	2.40		1.04		1.44		0.58

Grupo C sem ligadura							
7 dias		14 dias		21 dias		28 dias	
13	0.64	17	0.85	51	0.78	I	0.92
16	0.73	19	0.70	54	0.74	J	1.15
45	0.85	20	1.03	66	0.93	N	0.81
61	0.81	59	1.10	48	0.77	P	0.55
Média	0.76		0.92		0.81		0.86
DP	0.09		0.18		0.08		0.25