HENRIQUE DE OLIVEIRA BIANCHI

"ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DESTRUIÇÃO TECIDUAL PERIODONTAL EM RATOS OBESOS COM DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL"

CAMPINAS
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

HENRIQUE DE OLIVEIRA BIANCHI

"ANÁLISE DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA DESTRUIÇÃO TECIDUAL PERIODONTAL EM RATOS OBESOS COM DOENÇA PERIODONTAL EXPERIMENTAL"

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
HENRIQUE DE OLIVEIRA BIANCHI
Dagmar Stach Machado
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de Imunologia.

Orientador: Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado

CAMPINAS,
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

B47a

Bianchi, Henrique de Oliveira, 1988-
Análise dos mecanismos envolvidos na destruição tecidual periodontal em ratos obesos com doença periodontal experimental / Henrique de Oliveira Bianchi. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Dagmar Ruth Stach Machado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Obesidade. 2. Citocinas. 3. Doença periodontal. 4. Metaloproteinases de matriz. 5. Ligante RANK. 6. Osteoprotegerina. I. Stach-Machado, Dagmar Ruth, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Analysis of mechanisms involved in periodontal tissue destruction in obese rats with experimental periodontal disease
Palavras-chave em Inglês:
Obesity
Cytokines
Periodontal disease
Matrix metalloproteinases
RANK ligand
Osteoprotegerin
Área de concentração: Imunologia
Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Dagmar Ruth Stach Machado [Orientador]
Cristina Pontes Vicente
Luis Carlos Spolidório
Data da defesa: 13-12-2012
Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 13 de dezembro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach Machado
(Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud

Assinatura

Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório

Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

Assinatura

Profa. Dra. Maristela Ruberti

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Para ser breve, gostaria de agradecer minha família e todos meus amigos por me apoiarem durante todo o mestrado e por sempre estarem ao meu lado, nos momentos bons e ruins. Também gostaria de agradecê-los por aceitarem e compreenderem todas as vezes que eu não pude estar ao lado deles por causa do mestrado.

Agradeço à Profa. Dra. Dagmar R. Stach-Machado, toda a equipe do laboratório de Imunologia Aplicada e colaboradores de outros laboratórios por contribuírem para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos professores que aceitaram participar da banca examinadora dessa dissertação: Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud, Prof. Dr. Luis Carlos Spolidório, Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente e Profa. Dra. Maristela Ruberti.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos: 2010/02558-0 e 2011/19375-9) pelo apoio financeiro.

RESUMO

A doença periodontal (DP) é uma doença inflamatória crônica que acomete os tecidos que suportam o dente, podendo resultar na perda dentária. O agente etiológico da DP é a placa bacteriana que se forma junto ao dente, no entanto, é a resposta imune do hospedeiro que vai determinar a suscetibilidade ao desenvolvimento e a progressão da DP. Uma resposta imune com perfil pró-inflamatório, representado por linfócitos T *helper* (Th) 1 e Th17, leva à progressão da DP, enquanto que com perfil antiinflamatório, representado por linfócitos Th2 e T regulatórios, não há desenvolvimento da doença. Citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de metaloproteinases de matriz (MMP) e inibem a expressão de seus inibidores, os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMP). O desequilíbrio dos níveis de MMPs/TIMPs é responsável pela degradação da matriz extracelular, presente na DP. Essa resposta pró-inflamatória também leva os desbalanço da expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e seu inibidor, a osteoprotegerina (OPG), resultando na reabsorção do osso alveolar, o ponto chave da lesão tecidual na DP. Indivíduos obesos apresentam maior predisposição ao desenvolvimento da DP e apresentam uma maior severidade da doença. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo analisar a influência da obesidade nas alterações gênicas e proteicas associadas à resposta inflamatória e à destruição tecidual durante o desenvolvimento e progressão da DP induzida por ligadura em ratos. A obesidade induzida por dieta hiperlipídica (DHL) foi caracterizada por intolerância à glicose, glicemia elevada, elevado índice de Lee, alterações hepáticas, aumento do peso das gorduras viscerais, hiperinsulinemia e alterações nos níveis plasmáticos de colesterol. Animais do grupo DHL apresentaram uma maior expressão gênica e proteica de citocinas pró-inflamatórias no tecido gengival acometido pela DP. Em especial, a expressão da interleucina (IL) 17, da IL6 e do interferon gama (IFNG) foi significativamente maior em relação ao grupo alimentado com ração normolipídica. Não foram observadas diferenças muito significativas entre os dois grupos na expressão das citocinas antiinflamatórias IL4, IL10 e fator de transformação do crescimento beta (*Tgfb*). O grupo DHL apresentou um aumento da expressão gênica de MMPs, em especial da *Mmp13*, e uma diminuição na expressão de *Timp1*, *Timp2* e *Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs* (*Reck*). Ademais, foi observado um aumento significativo da razão *Rankl/Opg* no grupo DHL,

acompanhado de maior reabsorção do osso alveolar. A alimentação com a dieta hiperlipídica induziu alterações metabólicas características da obesidade, que resultaram na exacerbação da resposta inflamatória no tecido gengival com DP. Essa resposta pró-inflamatória, polarizada para os perfis Th1 e Th17, levou ao desbalanço da expressão gênica das razões MMPs/TIMPs e *Rankl/Opg*. Por fim, a desregulação dos mediadores da destruição tecidual e de seus inibidores resultou no agravamento da DP, com aumento da reabsorção do osso alveolar. Desse modo, esse trabalho possibilitou relacionar o estado obeso à progressão da DP.

Palavras-chave: Obesidade; Citocinas; Doença periodontal; Metaloproteinases de matriz; RANKL/OPG; Inflamação.

ABSTRACT

Periodontal disease (PD) is a chronic inflammatory disease that affects the tissues that support the teeth and can result in tooth loss. The etiological agent of PD is the dental plaque, which can be formed on the surface of the tooth. However, the host immune response is determinant for the susceptibility to development and progression of PD. Immune responses with a pro-inflammatory profile, represented by T helper (Th) 1 and Th17 cells, leads to PD progression, whereas an anti-inflammatory profile, represented by Th2 and T regulatory cells, is associated with no disease development. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrix metalloproteinases (MMP) and inhibit expression of their inhibitors, called tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP). The imbalance of MMPs/TIMPs levels is responsible for the characteristic degradation of the extracellular matrix in PD. The pro-inflammatory response also leads to expression imbalance of the receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) and its inhibitor, osteoprotegerin (OPG), resulting in alveolar bone resorption, which is the key event in tissue damage in PD. It is known that obese individuals have a higher predisposition to PD development and present a greater disease severity. Thus, the present study aimed to evaluate the influence of obesity on gene and protein changes associated with the inflammatory response and tissue destruction during the development and progression ligature-induced PD in rats. The high fat diet-induced obesity (HFD) was characterized by impaired glucose tolerance, increased blood glucose level, increased Lee index, liver alterations, increased weight of visceral fat, hyperinsulinemia and changes in plasma levels of cholesterol. Animals from HFD group showed a higher protein and gene expression of pro-inflammatory cytokines in gingival tissue affected by PD. In particular, the expression of interleukin (IL) 17, of IL6 and interferon gamma (IFNG) was significantly higher compared to the group fed a normolipidic diet. There were not much significant differences between both groups in the expression of anti-inflammatory cytokines IL4, IL10 and transforming growth factor beta (*Tgfb*). HFD group showed an increased MMPs gene expression, especially *Mmp13*, and a decrease in the expression of *Timp1*, *Timp2* and Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs (*Reck*). Moreover, we observed a significant increase in *Rankl/Opg* ratio in group HFD, followed by greater alveolar bone resorption. HFD induced metabolic changes that are characteristic of obesity, which

resulted in exacerbation of inflammatory response in gingival tissue with PD. This pro-inflammatory response, which was polarized to Th1 and Th17 profiles, led to an imbalance in MMPs/TIMPs and *Rankl/Opg* gene expression ratios. Finally, the deregulation of the mediators of tissue destruction and their inhibitors resulted in worsening of PD with increased alveolar bone resorption. Therefore, this study allowed a correlation between obesity and PD progression.

Key words: Obesity; Cytokines; Periodontal disease; Matrix metalloproteinases; RANKL/OPG; Inflammation.

ÍNDICE

ABREVIAÇÕES ..... **xi**
INTRODUÇÃO **1**
1. Doença periodontal 1
2. Metaloproteinases de matriz (MMPs) 2
3. Reabsorção óssea 4
4. Obesidade 6
OBJETIVOS **8**
MATERIAL E MÉTODOS **9**
1. Obtenção e manutenção dos animais 9
2. Delineamento experimental 9
3. Indução da obesidade 9
4. Avaliação da obesidade 10
4.1. Monitoramento do peso 10
4.2. Teste de tolerância à glicose 10
4.3. Glicemia 11
4.4. Índice de Lee 11
4.5. Peso de gorduras viscerais e órgãos 11
4.6. Níveis plasmáticos de colesterol total e insulina 11
5. Indução da doença periodontal 12
6. Obtenção das amostras 13
7. Quantificação da reabsorção óssea 13
8. Desenho de *primers* 14
9. Extração de RNA total e reação de transcrição reversa 14
10. PCR quantitativo em tempo real (qPCR) 15
11. Quantificação do nível proteico 16
12. Análise estatística 18
RESULTADOS **19**
1. Avaliação da obesidade 19
1.1. Monitoramento do peso 19
1.2. Teste de tolerância à glicose 20
1.3. Glicemia 21
1.4. Índice de Lee 22

1.5. Peso de gorduras viscerais e órgãos 22
1.6. Níveis plasmáticos de colesterol total e insulina 24
2. Quantificação da reabsorção óssea 26
3. Expressão gênica e concentração proteica nas amostras sem ligadura 26
4. Expressão gênica e concentração proteica nas amostras com ligadura 27
4.1. Expressão de citocinas pró-inflamatórias 27
4.2. Expressão de citocinas antiinflamatórias 31
4.3. Degradação da matriz extracelular 32
4.4. Reabsorção óssea 35
DISCUSSÃO 37
CONCLUSÕES 45
REFERÊNCIAS 46
ANEXO A: Ensaios de qPCR 51
ANEXO B: Material suplementar 61

ABREVIAÇÕES[1]

ΔRn	Sinal de fluorescência normalizado
ACTB	*beta-actin*
ANOVA	Teste de análise de variância Two-Way
C	Grupo controle
cDNA	DNA complementar
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
C_q	Ciclo de quantificação
DHL	Grupo alimentado com dieta hiperlipídica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
HPRT1	*Hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1*
IL1B	Interleucina 1 beta
IL4	Interleucina 4
IL6	Interleucina 6
IL10	Interleucina 10
IL11	Interleucina 11
IL12	Interleucina 12
IL13	Interleucina 13
IL17	Interleucina 17
IL18	Interleucina 18
IFNG	Interferon gama
IMC	Índice de Massa Corpórea
JEC	Junção esmalte-cemento
M	Medida de estabilidade do gene de referência
MFI	*Median Fluorescent Intensity*
MIQE	*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*
MMP	Metaloproteinase de matriz
MMP1	Metaloproteinase de matriz 1

[1] Símbolos de proteínas são representados com letras maiúsculas, enquanto símbolos de genes e RNAm são representados somente com a primeira letra maiúscula e em itálico.

MMP2	Metaloproteinase de matriz
MMP3	Metaloproteinase de matriz
MMP7	Metaloproteinase de matriz
MMP8	Metaloproteinase de matriz
MMP9	Metaloproteinase de matriz
MMP10	Metaloproteinase de matriz
MMP13	Metaloproteinase de matriz
MMP14	Metaloproteinase de matriz
MMP26	Metaloproteinase de matriz
OPG	Osteoprotegerina
PPIA	*peptidylprolyl isomerase A*
qPCR	PCR quantitativo em tempo real
r	Coeficientes de correlação de Pearson
R^2	coeficiente de determinação
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RECK	*Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs*
RNAm	RNA mensageiro
RNAr	RNA ribossômico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
SNPs	*Single nucleotide polymorphisms*
TGFB	Fator de crescimento transformador beta
Th1	T *helper* 1
Th2	T *helper* 2
Th17	T *helper* 17
Treg	T regulatório
TIMP	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz
TIMP1	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz 1
TIMP2	Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz 2
Tm	Temperatura de *melting*
TNF	Fator de necrose tumoral
UA	Unidades arbitrárias
UBC	*Ubiquitin C*

INTRODUÇÃO

1. Doença periodontal

O termo periodonto se refere aos tecidos que envolvem e sustentam o dente. O periodonto é formado por quatro componentes: gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento (Nanci & Bosshardt, 2006). A doença periodontal (DP), ou periodontite, é um termo abrangente que envolve as enfermidades que atingem os tecidos gengivais, os tecidos conjuntivos periodontais e o osso alveolar (Socransky, 1977). A DP leva à formação das bolsas periodontais, que promovem a perda de adesão entre dentes, periodonto e gengiva, e também induz a reabsorção do osso alveolar, que pode resultar na perda dentária (Nagasawa *et al.*, 2007).

O principal agente etiológico da DP é a placa bacteriana constituída, predominantemente, por microrganismos gram-negativos anaeróbicos (Feng & Weinberg, 2006; Sigusch *et al.*, 2001). Entretanto, é a resposta do hospedeiro que determina a susceptibilidade à doença, uma vez que existe um delicado equilíbrio entre os microrganismos da placa e a resposta sua resposta imune (Gemmell *et al.*, 2007; Nassar *et al.*, 2007). Embora a resposta imune do hospedeiro tenha por objetivo ser protetora, ela inicia uma cascata de eventos que pode gerar desequilíbrio de substâncias liberadas, como citocinas, quimiocinas e proteases, o que caracteriza o aspecto patológico de degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea nos tecidos periodontais (Garlet *et al.*, 2004; Kadoglou *et al.*, 2005; Taubman *et al.*, 2005).

A progressão da DP e conseqüente degradação tecidual estão diretamente relacionadas com a secreção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina 1 beta (IL1B), a interleucina (IL) 6 e a IL17. Enquanto que as citocinas antiinflamatórias como a IL4, IL10, IL13 e o fator de crescimento transformador beta (TGFB), estão associadas à supressão da reabsorção óssea (Garlet *et al.*, 2005; Garlet *et al.*, 2010).

ADP é considerada uma das doenças orais mais importantes no mundo, uma vez que apresenta uma alta prevalência em humanos, que varia de 20% a 50% na população (Suvan *et al.*, 2011). Além disso, a similaridade de seus mecanismos patogênicos com outras condições, em que a resposta

inflamatória e imune tem papel fundamental, como as artrites reumatóides, tornam as doenças periodontais modelos interessantes para o estudo dessas respostas (Bartold *et al.*, 2005).

2. Metaloproteinases de matriz (MMPs)

As respostas inflamatórias do hospedeiro aos patógenos periodontais causam destruição por ativarem os mecanismos de reabsorção óssea e por gerarem proteases como as metaloproteinases de matriz (MMPs) que degradam a matriz extracelular (Garlet *et al.*, 2004).

As MMPs fazem parte de uma família multigênica de endopeptidases dependentes de íons metálicos, zinco e cálcio. Até o momento, 26 membros foram identificados em vertebrados e 23 deles foram achados em humanos (Meng *et al.*, 2008; Visse & Nagase, 2003). Elas são expressas por leucócitos, fibroblastos, células endoteliais e epiteliais (Hannas *et al.*, 2007), funcionam em pH neutro e são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. As MMPs contribuem com muitos processos fisiológicos através de modificações da matriz extracelular, como o desenvolvimento e funcionamento normal do organismo, a cicatrização de ferimentos e uma ampla variedade de processos patológicos (Mandal *et al.*, 2003).

A subdivisão das MMPs tem sido feita de acordo com sua principal função (ou primeira a ser descoberta), sendo divididas nos seguintes grupos: colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), gelatinases (MMP2 e MMP9), estromelisinas (MMP3 e MMP10), matrilisinas (MMP7 e MMP26), MMPs associadas à membrana (MMP14 e outras) e outras MMPs (Nagase *et al.*, 2006; Pasternak & Aspenberg, 2009).

A expressão basal de MMP é baixa e sua síntese é induzida por vários estímulos, incluindo citocinas (IL1B, IL4, IL6, IL10, e TNF), fatores de crescimento e mediante interação célula com célula ou célula com a matriz extracelular (Pasternak & Aspenberg, 2009).

As MMPs são sintetizadas como pré-pró-enzimas, secretadas como pró-MMPs e ativadas pela clivagem de seu domínio hemopexina, cujo processamento pode ser realizado por outras MMPs, formando uma cascata de ativação. As atividades das MMPs podem ser reguladas em diferentes níveis: expressão gênica, ativação da pró-MMP e inibição da sua função enzimática (Meng *et al.*, 2008).

Dentre os inibidores das MMPs devem-se destacar os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs). Até o momento, existem 4 TIMPs (TIMP1 ao 4), que inibem todas as MMPs

interagindo reversivelmente com seu sítio catalítico de ligação ao íon zinco numa razão estequiométrica de 1:1 (Hannas *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008; Pasternak & Aspenberg, 2009). Os TIMPs se distinguem com relação à sua capacidade de se ligar às diferentes MMPs e, assim, mantêm o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz extracelular (Zhou & Windsor, 2006). Outro importante inibidor de MMP, o *Reversion Inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs* (RECK), atua diretamente na ação proteolítica das MMPs, mediante regulação da sua secreção celular e, possivelmente, através do seqüestro das MMPs na superfície celular. O RECK inibe a atividade de pelo menos três membros das MMPs, incluindo a MMP2, MMP9 e MMP14 (Hannas *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2008).

A composição da matriz extracelular depende do equilíbrio entre a formação e degradação tecidual. Como as MMPs estão extremamente envolvidas nesta degradação, a regulação de sua produção e atividade é essencial para a homeostase da matriz extracelular. Portanto, o equilíbrio da expressão das MMPs e de seus inibidores determina a ação proteolítica e, conseqüentemente, a degradação tecidual (Zhou & Windsor, 2006; Kadoglou *et al.*, 2005).

Para ocorrer reabsorção óssea, deve haver a degradação dos componentes orgânicos da matriz, pois a matriz óssea mineralizada ficará exposta, permitindo a diferenciação e ativação de osteoclastos no local.

Estudos mostraram que as colagenases (MMP1, MMP8 e MMP13), as gelatinases (MMP2 e MMP9) e a MMP14 estão estritamente envolvidas na destruição tecidual que leva à reabsorção óssea na DP, assim como os seus inibidores, que equilibram sua função e controlam a degradação tecidual (Kubota *et al.*, 2008; Hernandez *et al.*, 2007; Hannas *et al.*, 2007).

Acredita-se que a degradação inicial de colágeno intersticial pelas colagenases MMP1, MMP8 e MMP13 seja um passo chave para a progressão da lesão periodontal, uma vez que são as únicas enzimas capazes de realizar a degradação inicial da tripla hélice do colágeno, que posteriormente terminará de ser degradado por outras proteases (Wu *et al.*, 2005). No entanto, o TIMP1 está associado à regeneração tecidual, por inibir a ação colagenolítica das MMPs. Desse modo, o aumento da expressão dessas MMPs, em especial a MMP13, em conjunto a diminuição da expressão de TIMP1 tem sido associados com a lesão na DP (Hernandez *et al.*, 2006; Hernandez *et al.*, 2007).

Estudos sugerem que a MMP9 e a MMP14 sejam cruciais na reabsorção óssea (Delaisse *et al.*, 2003). A MMP9 parece ser especificamente necessária para o recrutamento de osteoclastos para a matriz óssea (Engsig *et al.*, 2000). Enquanto que a MMP14 está localizada na membrana externa dos osteoclastos, possivelmente contribuindo para a interação do osteoclasto com a matriz, o que controla a locomoção e a adesão do osteoclasto ao osso (Hannas *et al.*, 2007).

3. Reabsorção óssea

Todo osso, incluindo o osso alveolar, é continuamente remodelado e a homeostase óssea é mantida através de um delicado equilíbrio entre reabsorção e a síntese óssea efetuada pelos osteoclastos e osteoblastos, respectivamente (Nagasawa *et al.*, 2007). Na DP essa homeostase é perdida, havendo maior osteoclastogênese e tendo como conseqüência a reabsorção óssea aumentada, que leva à perda definitiva do osso alveolar (Cochran, 2008; Nagasawa *et al.*, 2007).

A principal via da osteoclastogênese na DP ocorre quando o receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) das células precursoras de osteoclastos interage com o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Essa ligação induz a diferenciação do precursor em uma célula multinucleada que se torna o osteoclasto ativo, levando a uma reabsorção óssea periodontal substancialmente aumentada (Cochran, 2008; Nagasawa *et al.*, 2007; Taubman *et al.*, 2005).

O RANKL, membro da família do TNF, é expresso como uma molécula de superfície por osteoblastos, células do estroma, linfócitos T e B, assim como pode estar em uma forma solúvel, quando é clivado por proteases específicas (Hikita *et al.*, 2005). A sua expressão é aumentada por citocinas pró-inflamatórias, como IL1B, IL6, IL11, IL17 e TNF, e diminuída por citocinas antiinflamatórias. Porém, este possui um inibidor solúvel, a osteoprotegerina (OPG), que se associa ao RANKL e impede sua ligação ao RANK, inibindo, assim, a osteoclastogênese via RANKL-RANK. A OPG é expressa por fibroblastos e osteoblastos e tem sua regulação mediada, principalmente, por citocinas, em que as pró-inflamatórias diminuem sua expressão e as antiinflamatórias, como IL4, IL10, IL12, IL13 e IL18, aumentam sua expressão (Cochran, 2008).

Desse modo, a homeostase do osso é regulada pelo nível dos mediadores RANKL e OPG, sendo que a formação óssea excessiva é resultante da diminuição da expressão de RANKL e aumento

da expressão de OPG, levando a diminuição da razão RANKL/OPG. No entanto, se ocorrer o contrário, aumentando a razão RANKL/OPG, ocorre a reabsorção óssea (**Figura 1**) (Cochran, 2008; Taubman *et al.*, 2005).

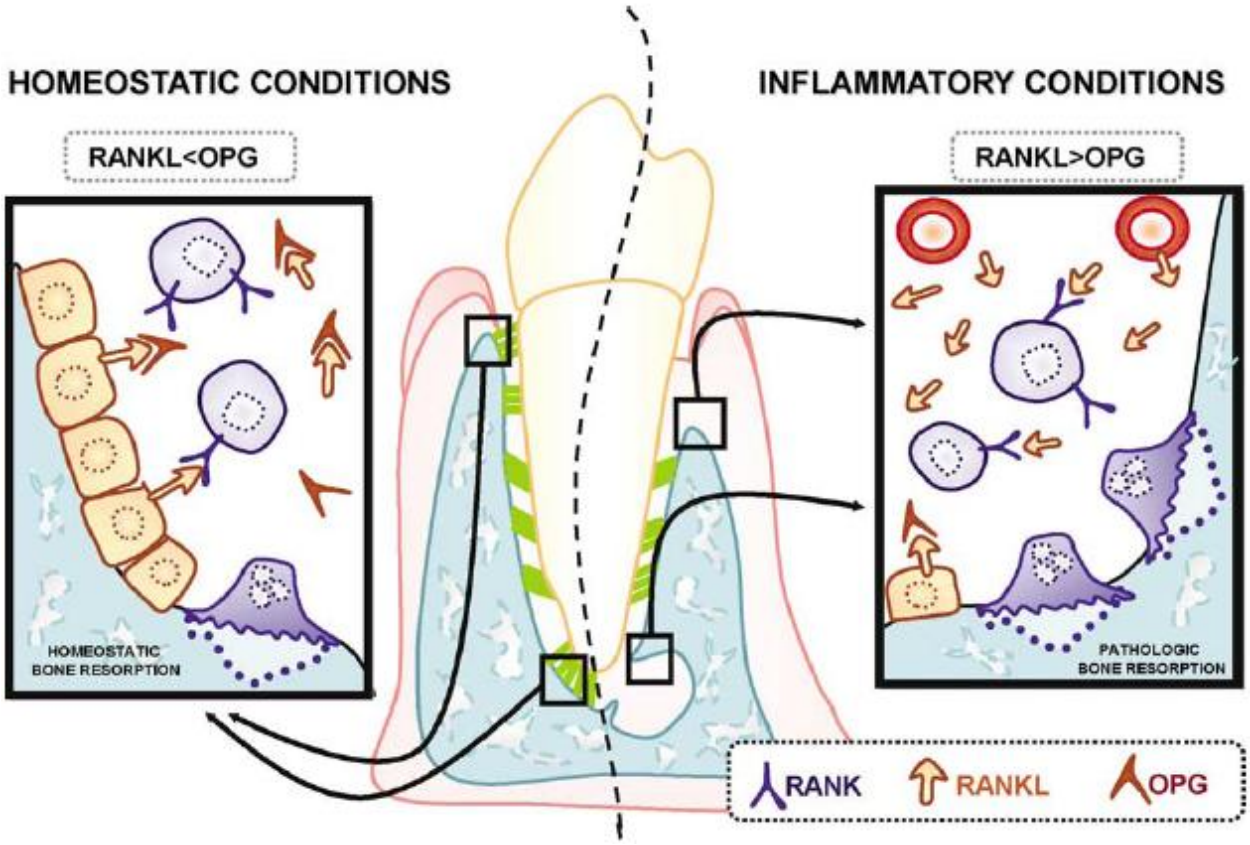

Figura 1. O equilíbrio de RANKL/OPG é um fator crucial na regulação da reabsorção do osso alveolar. A diferenciação e ativação osteoclástica são conduzidas pela interação de RANKL com seu ligante, RANKL. A OPG é um inibidor solúvel de RANKL que inibe a ligação RANK-RANKL. Em condições homeostáticas (lado esquerdo), acredita-se que os níveis de RANKL e OPG estejam em equilíbrio, de modo que a osteoclastogênese e a reabsorção óssea sejam limitadas. Com um estímulo inflamatório, a razão RANKL/OPG aumenta nos tecidos periodontais e leva a estimulação da atividade osteoclástica e reabsorção óssea patológica. Precursores de osteoclastos e osteoclastos ativos são representados por células azuis mononucleadas e multinucleadas, respectivamente (Graves *et al.*, 2011).

As citocinas dos subgrupos de linfócitos T *helper* (Th) estão envolvidas na progressão da DP, potencializando-a (Th1 e Th17) ou atenuando-a (Th2 e células T regulatórias [Treg]). Os subgrupos Th1 e Th17, caracterizados pela produção de interferon gama (IFNG) e IL17, respectivamente, estão associados a um perfil pró-inflamatório da resposta imune. Enquanto que os subgrupos Th2 e Treg, caracterizados pela produção de IL4 e IL10, respectivamente, estão associados a um perfil antiinflamatório da resposta imune Portanto, o equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias e

antiinflamatórias regulam a expressão das MMPs e seus inibidores endógenos, envolvidos na degradação do tecido conjuntivo, assim como a expressão do RANKL e OPG (como o sistema molecular chave para a remodelação óssea, em que o RANKL é o principal fator que estimula a diferenciação e ativação dos osteoclastos, neutralizado pela OPG) e, conseqüentemente, deve determinar a progressão ou estabilização da lesão (Garlet *et al.*, 2010) (**Figura 2**).

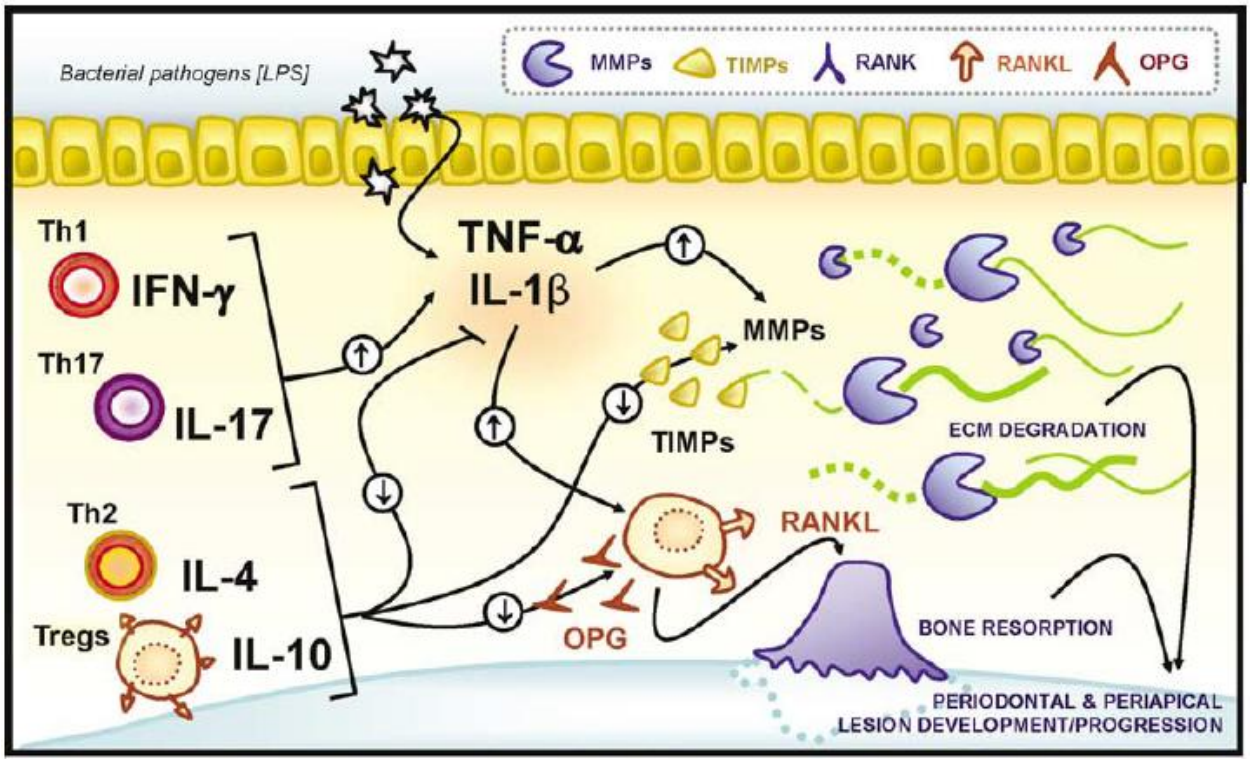

Figura 2. Perfis de resposta imune regulando a degradação da matriz extracelular e a reabsorção óssea no periodonto. A presença de patógenos no periodonto dispara uma produção inicial de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL1B, que estimulam a expressão e ativação de MMPs, que degradam a matriz extracelular. Citocinas pró-inflamatórias também estimulam a expressão de RANKL, que leva à formação e osteoclastos e à reabsorção óssea. A resposta imune tende a aumentar os níveis de inflamação e reabsorção óssea. As citocinas pró-inflamatórias geram um ciclo de amplificação da inflamação que contribui para a lesão periodontal. Por outro lado, as citocinas produzidas por células Th2 e Treg, tais como IL4 e IL10, possui efeito oposto, em parte, por estimular a produção de TIMPs e OPG, bem como inibir a produção de citocinas inflamatórias (Graves *et al.*, 2011).

4. Obesidade

A obesidade é uma doença caracterizada pelo acúmulo anormal de gordura no tecido adiposo, levando ao aumento de massa do indivíduo. Segundo a Organização Mundial de Saúde, indivíduos com Índice de Massa Corpórea (IMC) de 25,0-29,9kg/m^2 são considerados com sobrepeso e com IMC ≥ 30,0kg/m^2 são considerados obesos (Ritchie, 2007). No entanto, o IMC não afere a distribuição da

gordura no corpo. Sabe-se que a gordura abdominal, conhecida como gordura visceral, está muito mais associada ao alto índice de morbidade, do que a gordura glúteo-femoral ou a gordura subcutânea (Pischon *et al*., 2007).

A obesidade já é considerada uma epidemia. Estima-se que atualmente no mundo haja 1 bilhão dos adultos com sobrepeso e 312 milhões obesos. Ainda, em um período de tempo relativamente curto, a prevalência de obesidade entre os adultos deve duplicar (Ritchie, 2007).

A obesidade é considerada uma doença sistêmica que predispõe uma série de co-morbidades e complicações que afetam a saúde em geral e é considerada um fator de risco para várias doenças crônicas, especialmente hipertensão arterial, diabetes tipo 2, dislipidemia e doença arterial coronariana (Pischon *et al*., 2007; Ritchie, 2007). Estudos recentes têm sugerido que a obesidade também está associada com doenças bucais, especialmente com a DP (Genco *et al*., 2005; Dalla Vecchia *et al*., 2005; Saito *et al*., 2008; Suvan *et al*., 2011). Além disso, a obesidade tem sido considerada o segundo maior fator de risco para a DP, perdendo apenas para o tabagismo (Nishida *et al*., 2005).

O tecido adiposo é constituído por 3 tipos celulares, os adipócitos, os pré-adipócitos e os macrófagos, que juntos secretam mais de 50 moléculas bioativas, conhecidas como adipocinas, entre elas, se encontram proteínas semelhantes a hormônios (como adiponectina) e citocinas pró-inflamatórias (como TNF e IL6) (Ritchie, 2007). Em indivíduos obesos, há uma secreção desregulada de adipocinas pelo tecido adiposo, principalmente pela gordura visceral, causando um grande aumento nos níveis circulatórios de citocinas pró-inflamatórias e outros marcadores inflamatórios, que, por sua vez, levam esses indivíduos a um estado crônico de inflamação sistêmica (Karalis *et al*., 2009). Dessa forma, tem-se sugerido que as adipocinas pró-inflamatórias produzidas no estado obeso podem induzir uma resposta inflamatória exacerbada na DP (Pischon *et al*., 2007; Boesing *et al*., 2009).

Desse modo, a atividade imunológica do tecido adiposo pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento e agravamento da DP (Ritchie, 2007). Portanto, o presente trabalho busca acrescentar conhecimento sobre como a regulação da resposta inflamatória mediada por citocinas está regulando a expressão de mediadores da destruição tecidual no estado de obesidade, a fim de tentar esclarecer os mecanismos por trás do agravamento da DP em consequência à obesidade.

OBJETIVOS

Considerando que obesos têm maior susceptibilidade à doença periodontal e esta é mais severa, com aceleramento na reabsorção do osso alveolar, o objetivo deste projeto foi estudar influência da obesidade nas alterações gênicas e proteicas associadas ao desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

Objetivo específico 1: Analisar o padrão da expressão gênica e do nível proteico das citocinas pró- e antiinflamatórias IL1B, IL6, IL17, IL23[1], TNF[1], IFNG[2], IL4[2], IL10 e TGFB[1] na gengiva de ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica e a uma dieta normolipídica, durante a progressão da doença periodontal experimental.

Hipótese: A obesidade induz um estado sistêmico de inflamação, portanto o perfil de citocinas deve apresentar um padrão pró-inflamatório exacerbado nos animais submetidos à dieta hiperlipídica.

Objetivo específico 2: Analisar o padrão da expressão gênica dos seguintes mediadores da destruição tecidual MMP2, MMP8, MMP9, MMP13, MMP14 e RANKL, e de seus inibidores TIMP1, TIMP2, RECK e OPG na gengiva de ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica e a uma dieta normolipídica, durante a progressão da doença periodontal experimental.

Hipótese: Tendo em vista que obesos com doença periodontal podem apresentar um padrão pró-inflamatório exacerbado e uma maior destruição tecidual, é provável que haja um desbalanço na expressão gênica desses mediadores e de seus inibidores nos animais submetidos à dieta hiperlipídica.

---

[1] Quantificada somente a expressão gênica

[2] Quantificada somente o nível proteico

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção e manutenção dos animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar) machos com 3 a 4 semanas de vida e originários do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Durante a fase de experimentação os animais foram mantidos em ambiente controlado a 22±2°C com ciclo claro-escuro de 12 horas e com água e alimentação peletizada *ad libitum* no biotério do Departamento de Biologia Celular da UNICAMP. Todo procedimento experimental (protocolo nº 2451-1) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNICAMP e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o Decreto Nº 6.899, de 15 de julho de 2009.

2. Delineamento experimental

Para o cumprimento dos objetivos, foram utilizados 66 animais divididos em um grupo alimentado com dieta hiperlipídica (DHL) e um grupo normal, alimentado com dieta padrão, de modo que cada grupo foi constituído de 33 animais. Em todos os animais foi induzida a doença periodontal no primeiro molar inferior esquerdo, enquanto que o primeiro molar inferior direito, ou seja, o dente contralateral foi mantido intacto para servir como controle sadio. Os animais dos grupos DHL e normal foram divididos em três subgrupos cada, que foram sacrificados em três momentos distintos: após 5, 15 e 30 dias de ligadura. Para cada momento de ligadura, cinco ratos foram destinados à análise da expressão gênica, e os outros seis ratos foram destinados à análise do nível proteico.

3. Indução da obesidade

A obesidade foi induzida através da dieta hiperlípidica e hipercalórica (Pragsoluções) (Medeiros *et al.*, 2011), composta por 35% de lipídeo, 42% de carboidrato, 14% de proteína e contendo 5410 kcal/kg de energia metabolizante (**Tabela 1A**), que foi ministrada ao grupo DHL a partir da quarta semana de vida dos ratos até o momento de sacrifício. Os animais do grupo normal foram alimentados, durante todo decorrer do experimento, com ração padrão para ratos, normolipídica e normocalórica

(Nuvilab CR-1, Nuvital), composta por 4% de lipídeo, 53-55% de carboidrato, 22% de proteína e contendo 2980 kcal/kg de energia metabolizante (**Tabela 1B**).

Tabela 1. Composição da ração para os grupos DHL (ração hiperlipídica) e normal (ração padrão).

A: Composição da ração hiperlipídica (g/kg)			
Caseína	140	Óleo de soja	40
Amido	208,7	Mistura de sais AIN93G	35
Dextrina	100	Mistura de vitaminas AIN93G	10
Sacarose	100	Cloridrato de Colina	2,5
L-cistina	1,8	Banha Animal	312
Fibra de microcelulose	50		
B: Níveis de garantia da ração padrão (g/kg)			
Umidade (máxima)	125	Matéria gibrosa (máxima)	70
Proteína bruta (mínima)	220	Cálcio (mínimo - máximo)	10-14
Extrato etéreo (mínimo)	40	Fósforo (mínimo)	8
Matéria mineral (máximo)	90		

4. Avaliação da obesidade

4.1. Monitoramento do peso

O peso dos animais foi monitorado através da pesagem semanal e individual a partir da quarta semana de vida até o dia do sacrifício

4.2. Teste de tolerância à glicose

Com 13 semanas de vida, 10 ratos de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente para determinar o seu perfil de tolerância à glicose. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas, tiveram sua glicemia de jejum dosada e, em seguida, foram inoculados intraperitonealmente com uma solução de 0,5 g/ml de glicose (2 gramas de glicose por kilograma de massa corporal) e, precisamente após intervalos pré-determinados, a glicemia era dosada (Simmons *et al.*, 2001). Para a dosagem da glicemia, foi realizado um corte na extremidade da cauda dos ratos, permitindo a coleta do sangue proveniente da artéria caudal. Com os dedos, foi exercida uma pressão ao longo da cauda desde seu início até sua extremidade, de modo que o sangue contido na artéria cauda fosse expelido pela extremidade cortada. O sangue coletado pela primeira execução desse procedimento foi descartado e,

logo em seguida, o procedimento foi repetido para obtenção de um sangue mais fresco, o qual foi diretamente quantificado utilizando o glicosímetro *Accu-Chek Active* (*Roche Diagnosis*).

4.3. Glicemia

A glicemia dos animais em estado alimentado foi determinada no momento de sacrifício, como descrito em **4.2. Teste de tolerância à glicose.**

4.4. Índice de Lee

O índice de Lee, que é um dos preditores de obesidade em roedores e corresponde à raiz cúbica do peso (em gramas) dividido pelo comprimento nasoanal (em centímetros) (Bernardis & Patterson, 1968), foi determinado no momento de sacrifício.

4.5. Peso de gorduras viscerais e órgãos

Foram pesadas as gorduras viscerais, epididimal e retroperitoneal, e os órgãos, rins, fígado e coração dos animais no momento de sacrifício.

4.6. Níveis plasmáticos de colesterol total e insulina

No momento de sacrifício, uma alíquota do sangue dos animais foi coletada através de punção cardíaca, utilizando agulhas acopladas a tubos coletores anticoagulantes com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (VACUETTE® K3EDTA, Greiner Bio-One). O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutes a 4°C, separando a solução em fases. A fase superior, correspondente ao plasma sanguíneo, foi coletada, aliquotada e armazenada a -70°C.

A partir destas alíquotas, a concentração plasmática de colesterol total foi quantificada pelo método enzimático-colorimétrico, utilizando o kit comercial Laborlab® nº 01400, de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração plasmática de insulina foi dosada através de radioimunoensaio como previamente descrito por Scott e colaboradores (Scott *et al.*, 1981). Brevemente, insulina radioativa é incubada com uma concentração conhecida de anticorpo contra insulina e, em seguida, é adicionada a amostra com concentração desconhecida de insulina. A insulina da amostra a ser dosada compete pelo anticorpo com a insulina radioativa, liberando insulina radioativa. Assim, a insulina livre é separada da

insulina ligada ao anticorpo e é quantificada para determinar a quantidade de insulina radioativa que não se ligou ao anticorpo, quantificando de forma indireta a quantidade de insulina não radioativa. Com concentrações conhecidas de insulina não radioativa, é construída uma curva padrão, permitindo a determinação da concentração de insulina na amostra dosada.

5. Indução da doença periodontal

Com 14 semanas de idade, ou seja, após 10 semanas de dieta hiperlipídica, os ratos foram anestesiados via intramuscular com uma solução contendo cloridrato de ketamina (80 mg/Kg) e cloridrato de xilasina (10 mg/Kg). Em seguida, foram posicionados em uma estrutura de madeira, especialmente construída para o procedimento, com a cavidade oral exposta e a língua deslocada para o lado oposto à realização do procedimento (**Figura 3A**). De acordo com o procedimento inicialmente descrito por Johnson (Johnson, 1975), um fio de algodão número 10, também chamado de ligadura, foi amarrado ao redor do primeiro molar inferior esquerdo de cada rato (**Figura 3B**), levando ao acúmulo de comida e propiciando a formação da placa bacteriana, que resulta no desencadeamento da doença periodontal. O primeiro molar inferior direito, o dente contralateral, foi mantido intacto para servir como controle sadio.

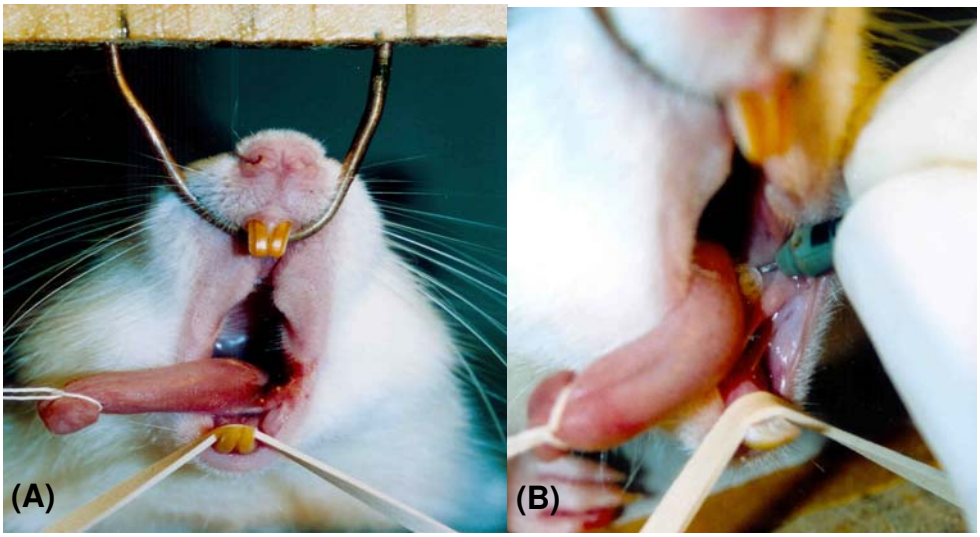

Figura 3. Indução da doença periodontal através da ligadura. **(A)** Exposição da cavidade oral e deslocamento da língua do animal. **(B)** Fixação da ligadura com o auxílio da sonda periodontal.

6. Obtenção das amostras

Após os tempos de ligadura, 5, 15 e 30 dias, os animais foram sacrificados por inalação de CO_2, tiveram a mandíbula removida e dividida ao meio em duas hemimandíbulas, uma com a doença periodontal e outra sadia (controle). Com bisturi estéril, o tecido gengival adjacente ao primeiro molar de cada hemimandíbula foi removido, congelado imediatamente em nitrogênio líquido e armazenado a -70°C para as análises futuras de expressão gênica e nível proteico. As hemimandíbulas com o tecido gengival removido foram armazenadas a -20°C para posterior quantificação da reabsorção óssea.

7. Quantificação da reabsorção óssea

A reabsorção óssea alveolar junto aos primeiro molares inferiores dos animais foi examinada morfometricamente (Verma *et al.*, 2010). As hemimandíbulas coletadas foram dissecadas mecanicamente e imersas por 48 horas em peróxido de hidrogênio 3% para remover todo tecido mole. Posteriormente foram coradas com azul de metileno 1% para delinear a junção esmalte-cemento (JEC). Imagens digitais da face lingual das hemimandíbulas foram colhidas utilizando um microscópio de dissecção com aumento e procedimentos padronizados. Através de software *Image-Pro Plus 6.0* (*MediaCybernetics*), previamente calibrado para o aumento utilizado, foi medida a área em milímetros quadrados da JEC à crista óssea alveolar do primeiro molar, que representa a área da raiz exposta (**Figura 4**). Após a quantificação da área da raiz exposta dos dentes de todos os animais (**Tabela suplementar 1**), a área da raiz exposta do dente controle foi subtraída da do dente com ligadura para cada animal, a fim de calcular a área resultante da reabsorção do osso alveolar em resposta á ligadura.

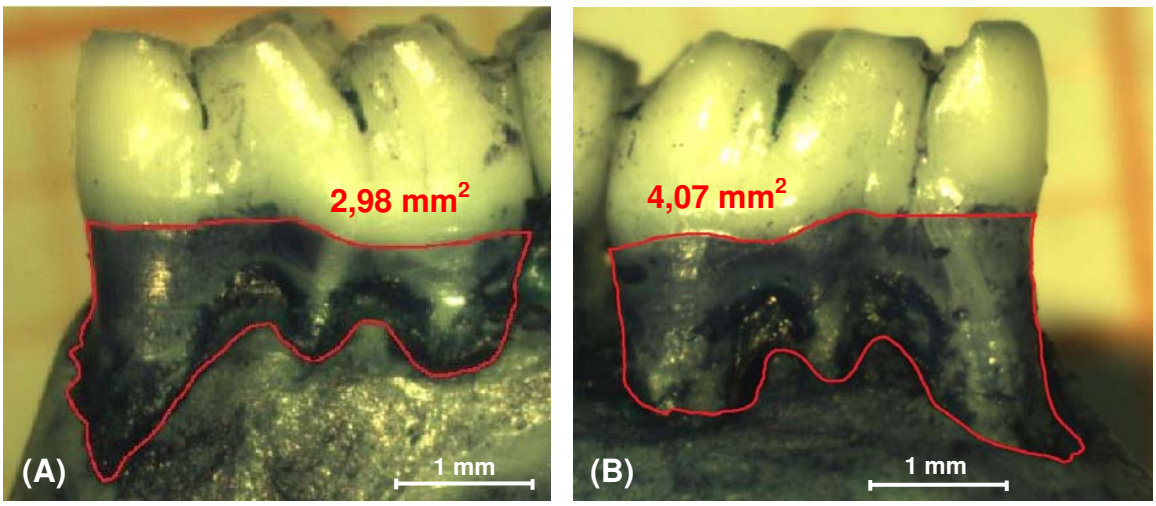

Figura 4. Primeiro molar inferior de rato do subgrupo DHL 15 dias de ligadura corados com azul de metileno, **(A)** dente controle e **(B)** dente com ligadura. A área entre a JEC e a crista óssea alveolar, contornada em vermelho, é dada em milímetros quadrados e representa a área da raiz exposta.

8. Desenho de *primers*

Para cada gene foi construído criteriosamente um par de primers específicos, de modo que este fosse o mais eficiente possível. A sequência dos RNA mensageiros (RNAm) dos genes a serem analisados foi obtida do banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Os primers foram desenhados utilizando o software *Beacon Designer v7.91* (*Premier Biosoft International*) e analisados pelo *Gene Runner v3.05* (*Hastings Software*) e pelo *Primer-blast* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), garantindo que os primers tenham %GC perto de 50%, temperatura de *melting (*Tm) adequada, sejam extremamente específicos para a sequência analisada e não formem estruturas secundárias ou dímeros; também que o *amplicon* esteja perto do porção 3' do RNAm em questão, tenha tamanho entre 75 e 150bp e não possua estruturas secundárias ou *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) nas regiões de ligação dos primers. Finalmente, foram escolhidos pares de primers que tenham a temperatura ótima de anelamento próxima de 60°C.

9. Extração de RNA total e reação de transcrição reversa

Em toda manipulação das amostras foram adotados cuidados específicos e rigorosos para evitar a degradação e contaminação dos ácidos nucléicos. O RNA total dos tecidos gengivais dos grupos normal e DHL foi extraído com o kit *RNeasy® Mini* (*Qiagen*), segundo o protocolo do fornecedor. Durante a extração, o RNA foi tratado com DNase para eliminar qualquer contaminação com DNA genômico. A

quantidade e pureza do RNA foram determinadas por espectrofotometria de luz ultravioleta (*NanoDrop 2000*, *Thermo Scientific*), sendo calculadas as razões entre as absorbâncias 260/280 nm e 260/230 nm. Também foi realizada a eletroforese em gel denaturante de agarose 1,5% (Masek *et al.*, 2005), a fim de avaliar a integridade do RNA. As amostras foram armazenadas a -70°C até o momento de sua utilização.

2 µg de cada amostra de RNA total purificado foi transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* com inibidor de RNase (*Applied Biosystems*), de acordo com modificações realizadas no protocolo do fabricante. Ao invés de *random primers*, para cada reação, foram utilizados 0,5 µg de oligo(dT)16 como *primer*, e, ainda, foi adicionada uma etapa de incubação do RNA com o primer por 10 minutos a 70°C, imediatamente seguida de resfriamento em gelo. Tal procedimento serve para linearizar as moléculas de RNA, otimizando a eficiência da transcrição reversa. Após essa etapa, seguiram-se os procedimentos do protocolo do fabricante. As amostras permaneceram e armazenadas a -70°C até o momento de sua utilização.

10. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Todo o procedimento para a quantificação da expressão gênica seguiu as orientações do *MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), que é uma série de artigos que normatiza a quantificação da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (Bustin *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010). Foram utilizadas pipetas eletrônicas para melhor precisão e ponteiras com filtro para evitar contaminação da reação com aerossóis.

As reações de qPCR foram realizados no sistema *7500 Fast Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*), utilizando placas de 96 poços . Cada reação apresentou um volume de 10 µl, contendo 1X do *master mix* Sybr Green Rox Plus (LGC Biotecnologia), uma concentração específica dos *primers forward* e *reverse*, e 2 ηg/µl de cDNA da amostra analisada. As condições de ciclagem foram: 95°C por 15 minutos; 40x (95°C por 15 segundos; **60°C por 1 minuto**); seguida da curva de *melting*: 95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; **aumento da temperatura até 95°C com 1% da velocidade da rampa**; 30 segundos a 95°C. Os dados de fluorescência foram coletados nos passos em negrito. Cada amostra foi analisada em placas separadas que contiveram, para os 22 ensaios analisados, reações em triplicata com o cDNA de interesse e uma reação em uniplicata sem o cDNA de interesse (controle negativo),

além de uma reação em triplicata de uma amostra conhecida apenas para o ensaio de *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) (controle positivo).

As replicatas com cDNA de interesse que apresentaram amplificação inespecífica, determinada por picos anormais na curva de *melting*, ou apresentaram falha na reação foram excluídas das análises. O *baseline* de cada reação foi calculado automaticamente pelo software 7500 v2.0.4 (*Applied Biosystems*) e o *threshold* para cada ensaio foi determinado manualmente, de modo que cruzasse a curva de amplificação em sua fase exponencial, e foi mantido o mesmo para todas amostras analisadas. O ponto em que a curva de amplificação alcança o sinal de fluorescência normalizado (ΔRn) determinado pelo *threshold* é denominado ciclo de quantificação (C_q). A expressão gênica de uma amostra foi quantificada em relação à média C_q do subgrupo normal 5 dias controle e os valores foram normalizados pela média aritmética do C_q de cinco genes de referência (*beta-actin* [*Actb*]*, hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1* [*Hprt1*]*, peptidylprolyl isomerase A* [*Ppia*]*, ubiquitin C* [*Ubc*] e *Gapdh*) e corrigidos pela eficiência de cada ensaio (Pfaffl, 2001). A análise da estabilidade dos genes de referência e a determinação do número ideal de genes utilizados para a normalização foi realizada pelos algoritmos *geNorm* (Vandesompele *et al.*, 2002) e *BestKeeper* (Pfaffl *et al.*, 2004).

Os resultados da validação dos ensaios de qPCR constam no anexo A.

11. Quantificação do nível proteico

Os fragmentos gengivais de dois animais foram juntados durante a extração proteica, a fim de aumentar a concentração proteica total das amostras, resultando em um n = 3 animais para cada subgrupo. Os fragmentos gengivais foram triturados com o auxílio de um homogeneizador rotativo em 300µl de tampão de lise contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 0.1% Triton, 10 mM $CaCl_2$ e 1% *protease inhibitor cocktail* (P8340, *Sigma Chemical*). Durante a homogeneização do tecido, as amostras foram mantidas no gelo e foram feitas pausas para evitar o seu aquecimento. Após completa trituração das amostras, o lisado foi incubado por 2 h a 4°C com agitações periódicas para otimizar a ação do detergente na lise celular, seguido de centrifugação a 13200 rpm por 10 minutos a 4°C e armazenamento do sobrenadante a -70°C até sua análise.

Os sobrenadantes dos lisados tiveram sua concentração protéica total quantificada utilizando o *Bio-Rad Protein* Assay (Bio-Rad), um ensaio baseando no método de Bradford (Bradford, 1976), de acordo com as instruções do fabricante. Uma curva padrão de 50 a 500 µg/ml de albumina de soro bovino foi construída, utilizando a razão da absorbância 590/450 nm pela concentração proteica (µg/ml) (**Figura suplementar 1**). A concentração proteica total dos sobrenadantes dos lisados, previamente diluídos, foi calculada a partir da interpolação de sua absorbância pela curva padrão (**Tabela suplementar 2**).

A quantificação proteica das citocinas IL1B, IL6, IL17, IFNG, IL4 e IL10 foi realizada através do imunoensaio Multiplex com o kit *Milliplex Map Rat Cytokine/Chemokine* (RCYTO-80K, *Millipore*) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação proteica pelo método Multiplex e por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) apresenta uma correlação muito alta (de Jager *et al*., 2003; Elshal & McCoy, 2006; Leng *et al*., 2008), sendo o Multiplex um método mais vantajoso devido sua capacidade de dosagem simultânea de diversos analitos em uma mesma amostra. O ensaio foi composto por dois controles positivos, pelas amostras com concentração desconhecida, pelo branco e por uma curva padrão construída com o padrão fornecido pelo kit, com o alcance de 4,88 até 20000 pg/ml para cada uma das citocinas analisadas (analitos), através de uma diluição seriada na base 4, sendo todos os componentes do ensaio analisados em duplicata. As leituras do ensaio foram realizadas pelo equipamento Luminex 100™ IS e foram dadas em mediana da intensidade de fluorescência (*Median Fluorescent Intensity*, MFI). Os dados foram analisados pelo *software MasterPlex* 2010 v2.0.0.76 (*Hitachi Solutions*) que gerou curvas padrões adequadas para todos os analitos com equações logísticas de 4 parâmetros e de 5 parâmetros (Gottschalk & Dunn, 2005), ajustando a equação da curva para o modelo de equação e o algoritmo de ponderação ideais, de forma que o erro quadrático médio fosse o menor possível (*Best-fit*). Dessa maneira, as amostras com concentração desconhecida tiveram a concentração de cada analito calculada baseada em suas curvas padrões (**Figuras suplementares 2 ao 8**). As replicatas que obtiveram uma contagem menor que 35 *beads* para um determinado analito foram removidas da análise. As replicatas cujo MFI foi menor que a média dos brancos + 3 desvios padrões e as que obtiveram uma quantificação proteica menor que o menor ponto da curva padrão (4,88 pg/ml) foram consideradas como tendo concentração abaixo do nível de

detecção. Para a realização das análises estatísticas, as amostras que possuíam uma das replicatas abaixo de nível de detecção, tiveram somente a outra replicata utilizada, já as amostras com as duas replicatas abaixo do nível de detecção tiveram sua concentração considerada como o valor médio entre zero o menor ponto da curva padrão, ou seja, 2,44 pg/ml (Uh *et al.*, 2008).

As amostras proteicas foram quantificadas sem prévia diluição, mas as concentrações das citocinas encontradas foram normalizadas pela concentração proteica total de cada amostra, previamente calculada, sendo dadas pela concentração proteica de citocina por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

Os valores encontrados para os controles positivos do kit de quantificação proteica foram comparados com os valores esperados (**Tabela suplementar 3**). Pelo menos um controle de cada analito obteve a concentração recomendada pelo kit, indicando que o ensaio realizado funcionou como esperado.

12. Análise estatística

Todos os resultados são representados como média ± erro padrão da média. Os dados foram submetidos ao teste de análise de variância *Two-Way* (ANOVA) para avaliar a variância intergrupo, considerando o fator tempo e o fator tratamento. Adicionalmente, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado para determinar as diferenças intragrupo entre os tempos de tratamento. Já para comparar os grupos normal e DHL em um determinado momento, foi realizado o teste t unicaudal. Nos casos da expressão gênica e concentração protéica, também realizou-se o teste t unicaudal para determinar a diferença entre cada subgrupo com ligadura e o grupo controle (C), que correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura. A fim de alcançar uma distribuição normal dos dados, os valores de *fold change* na avaliação da expressão gênica foram transformados em $\log_2$ para a realização das análises estatística (Derveaux *et al.*, 2010; Pfaffl *et al.*, 2004). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

1. Avaliação da obesidade

1.1. Monitoramento do peso

Os animais apresentaram um aumento gradativo e constante do peso até o momento da colocação da ligadura na 14ª semana de vida (**Figura 5**), em que houve uma diminuição do peso, que provavelmente refletiu o efeito da anestesia, ou ainda, do incômodo ou dor gerados pela colocação da ligadura, de forma que os animais ficaram períodos prolongados sem conseguir se alimentar. Entre as pesagens que antecederam e sucederam a ligadura, foi observada uma queda média de peso de 6,4 g no grupo normal e de 15.9 g no grupo DHL, mostrando que os animais do grupo DHL tiveram um efeito maior na redução do peso em decorrência da ligadura. No entanto, uma semana após a indução da ligadura, os animais recuperaram o peso perdido e continuaram a aumentá-lo gradativamente. Não encontramos diferenças estatísticas entre o peso corporal dos grupos DHL e normal, e a cinética no ganho de peso é semelhante entre os grupos.

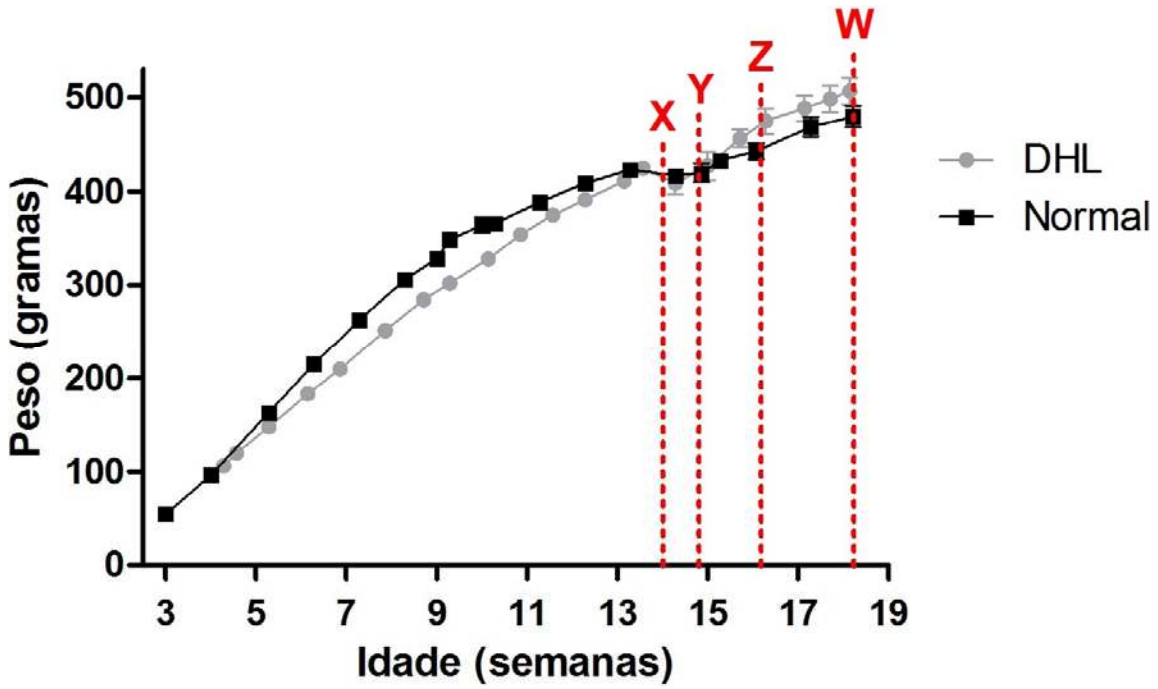

Figura 5. Cinética do peso dos ratos dos grupos DHL e normal da terceira semana de vida até o momento de sacrifício. X indica o momento da colocação da ligadura. Y, Z e W indicam, respectivamente, o sacrifício após 5, 15 e 30 dias de ligadura. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 13-49.

1.2. Teste de tolerância à glicose

Como mostra a figura 6, os animais do grupo DHL apresentaram um aumento da glicemia até 30 minutos após a inoculação de glicose, com um pico glicêmico em torno de 320 mg/dL, seguida de uma diminuição constante até 120 minutos. Enquanto que os animais do grupo normal apresentaram um pico glicêmico por volta de 250 mg/dL com 15 minutos, contudo a partir de 30 minutos sua glicemia diminuiu gradualmente e se manteve sempre menor que a do grupo DHL. Em todos os momentos após a inoculação de glicose, a glicemia é significativamente maior no grupo DHL. Até 120 minutos, ambos os grupos não restauraram a glicemia ao seu nível basal de jejum, em que o grupo DHL e normal apresentaram, respectivamente, 49,5 e 31,4 mg/dL acima da sua glicemia de jejum.

A fim de quantificar a diferença absoluta entre a cinética glicêmica dos dois grupos, foi calculada a área abaixo da curva da cinética glicêmica (**Figura 7**), mostrando que a glicemia durante o teste de tolerância a glicose é significantemente maior no grupo DHL do que no grupo normal.

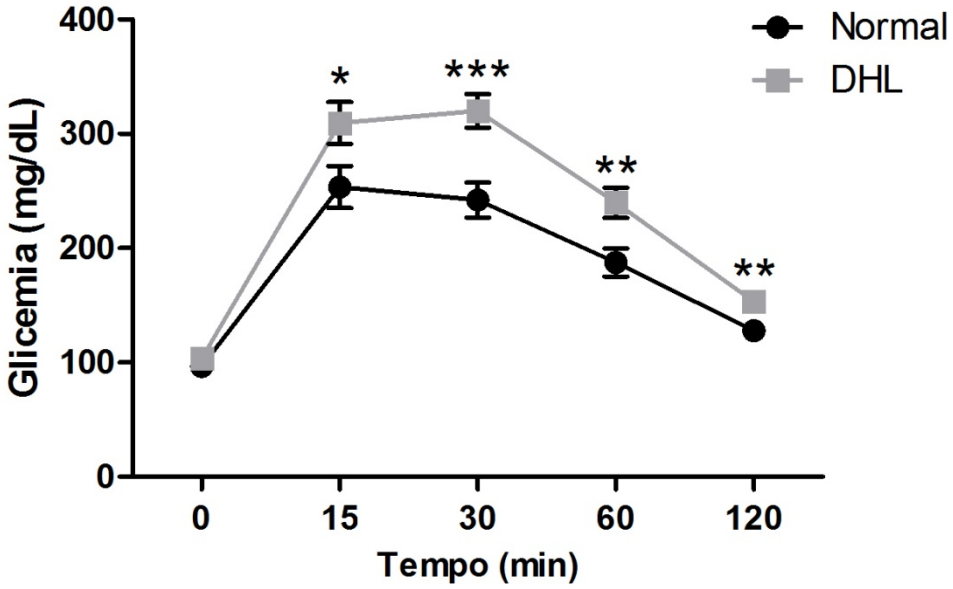

Figura 6. Cinética glicêmica dos ratos submetidos ao teste de tolerância à glicose. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 10. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

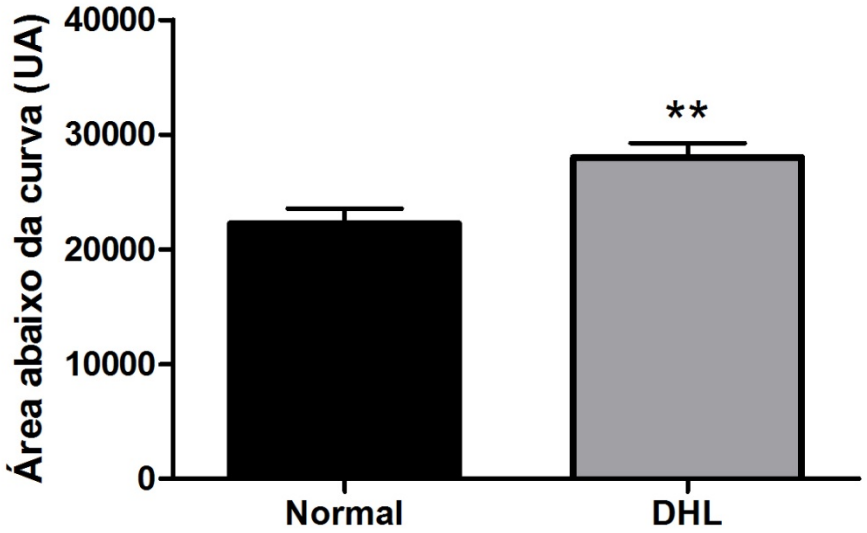

Figura 7. Função integral da cinética glicêmica dos ratos submetidos ao teste de tolerância à glicose. Os dados são resultados da área calculada entre a curva gerada pela cinética glicêmica e o eixo x. Os resultados são apresentados em unidades arbitrárias (UA) na forma de média ± erro padrão da média; n = 10. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL (**: P<0,01; teste t unicaudal).

1.3. Glicemia

A glicemia, em estado alimentado, no momento de sacrifício dos animais submetidos à dieta hiperlipídica foi significativamente maior em comparação ao grupo normal alimentado com ração padrão para todos os momentos de ligadura, chegando a 118,4 mg/dL com 5 dias de ligadura (**Figura 8**).

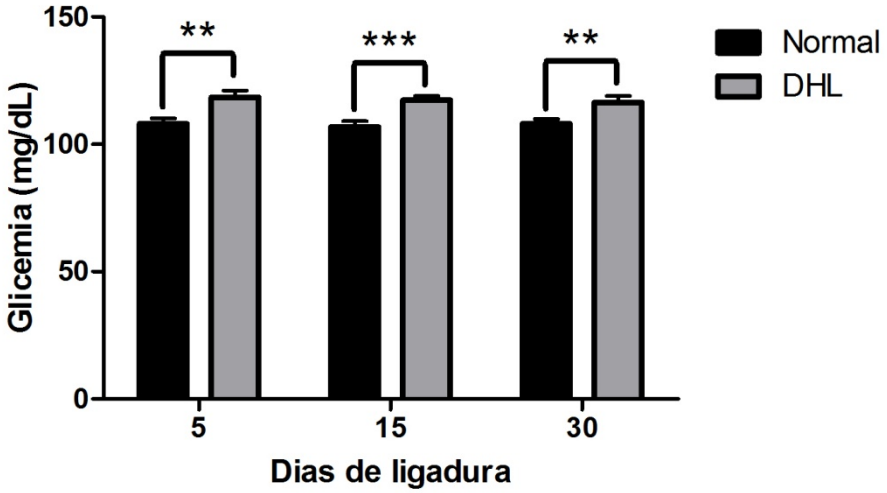

Figura 8. Glicemia em estado alimentado dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 14-16. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (**: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

1.4. Índice de Lee

Não se observou diferença estatística do índice de Lee entre os grupo nos animais com 5 dias de ligadura (**Figura 9**). No entanto, este parâmetro é significativamente maior no grupo DHL em relação ao grupo normal nos momentos 15 e 30 dias de ligadura. Também houve diferenças estatísticas dentro do grupo DHL, pois os animais nos momentos 15 e 30 dias de ligadura apresentaram um índice de Lee significativamente maior que no momento de 5 dias de ligadura. Já no grupo normal não é observada diferença no índice de Lee entre os momentos de ligadura.

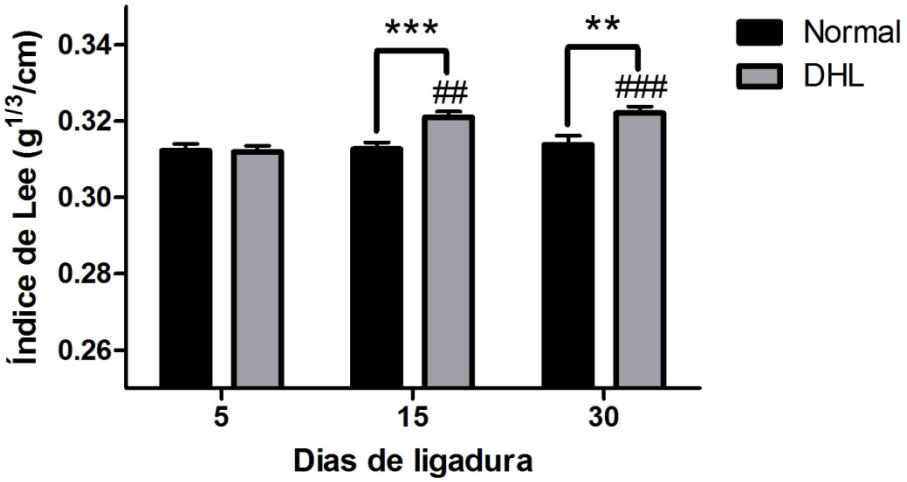

Figura 9. Índice de Lee dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 14-16. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (**: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (##: P<0,01; ###: P<0,001; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

1.5. Peso de gorduras viscerais e órgãos

Os animais do grupo DHL apresentaram um peso significativamente maior das gorduras epididimais e retroperitoneais em todos os momentos de ligadura em relação ao grupo normal (**Figuras 10 e 11**). Essa diferença foi expressiva para o peso da gordura epididimal ($p < 0,001$), pois este foi 2,8; 4,4 e 4,2 vezes maior no grupo DHL se comparado com o normal, nos momento de 5, 15 e 30 dias de ligadura respectivamente. Adicionalmente, no grupo DHL, os animais de 15 e 30 dias de ligadura apresentam um peso da gordura retroperitoneal significativamente maior que os animais de 5 dias ligadura. Tal comportamento de aumento de peso da gordura também foi observado no grupo DHL para

a gordura epididimal, visto que no momento de 30 dia os animais apresentaram valores significativamente maiores que no momento de 15 dias que, por sua vez, apresentaram valores significativamente maiores que no momento de 5 dias.

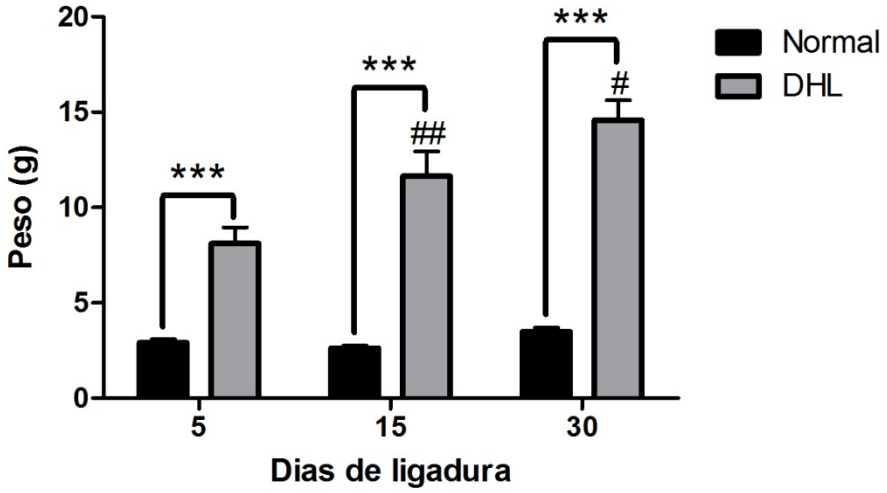

Figura 10. Peso total da gordura epididimal dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 14-16. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (**: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo DHL no momento anterior de sacrifício (#: P<0,05; ##: P<0,01; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

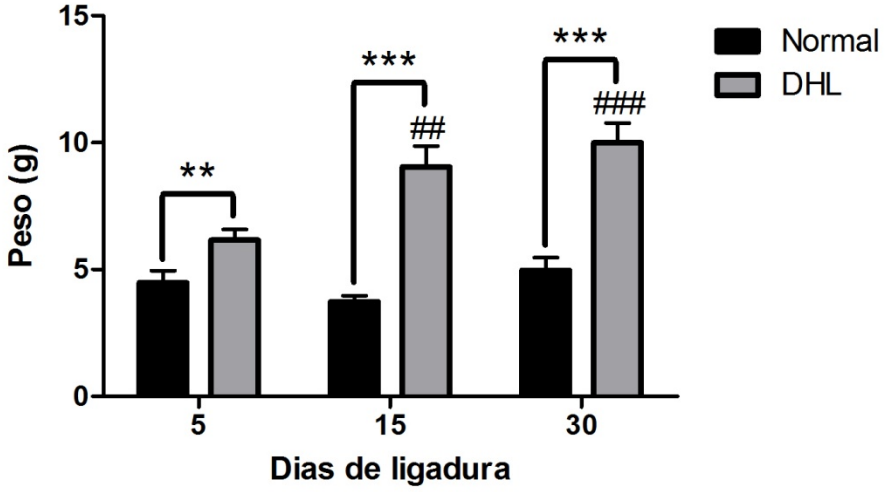

Figura 11. Peso total da gordura retroperitoneal dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 14-16. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (**: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (##: P<0,01; ###: P<0,001; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

O fígado apresentou um peso significativamente menor no grupo DHL no quinto e décimo quinto dia após a indução da DP em relação ao grupo normal (**Tabela 2**). No entanto, no grupo DHL o fígado apresentou aumento significativo do peso nos momentos 15 e 30 dias de ligadura em relação ao momento 5 dias, indicando que nesse grupo os animais apresentam aumento progressivo no tamanho do fígado, além deste apresentar uma coloração mais amarelada se comparado com o fígado do grupo normal. O peso dos rins foi significativamente menor no grupo DHL em todos os períodos analisados neste trabalho (**Tabela 2**), no entanto, este grupo apresentou um aumento significativo no peso dos rins e do coração no momento 30 dias de ligadura em relação ao momento 5 dias. Já o grupo DHL apresentou um peso significativamente maior do coração que o grupo normal com 30 dias de ligadura.

Tabela 2. Peso dos órgãos dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± desvio padrão; n = 14-16. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (#: P<0,05; ###: P<0,001; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística do peso do fígado e dos rins entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

	Fígado		**Rins**		**Coração**	
Grupo	DHL	Normal	DHL	Normal	DHL	Normal
5 dias	12.9 ± 1.9***	16,4 ± 2,1	2.5 ± 0.3***	3,1 ± 0,4	1.3 ± 0.2	1,2 ± 0,1
15 dias	14.9 ± 2.1**/#	17 ± 2,3	2.5 ± 0.3***	3,1 ± 0,4	1.3 ± 0.1	1,3 ± 0,2
30 dias	16.2 ± 2.2###	17,2 ± 2,4	2.9 ± 0.4**/#	3,3 ± 0,3	1.4 ± 0.1*/#	1,3 ± 0,1

1.6. Níveis plasmáticos de colesterol total e insulina

A concentração plasmática de colesterol total foi significativamente mais elevada no grupo DHL no quinto e no décimo quinto dia de ligadura (**Figura 12**) e apresentou uma redução no trigésimo dia de ligadura em comparação ao grupo normal.

A concentração plasmática média de insulina dos animais do grupo normal foi 4,78 ± 0,57 ng/ml. O grupo DHL apresenta uma concentração plasmática de insulina significantemente maior que o grupo normal após 5 e 15 dias de ligadura (**Figura 13**). Apesar do nível de insulina ser notadamente maior após 30 dias de ligadura no grupo DHL que no grupo normal, não foi observada diferença significativa entre esses subgrupos, possivelmente devido ao grande desvio padrão das amostras do subgrupo DHL com 30 dias de ligadura. Também se observou que a concentração plasmática de insulina aumentou

significantemente com o passar do tempo no grupo DHL, indicando uma relação entre o aumento do nível plasmático de insulina e o agravamento do estado obeso.

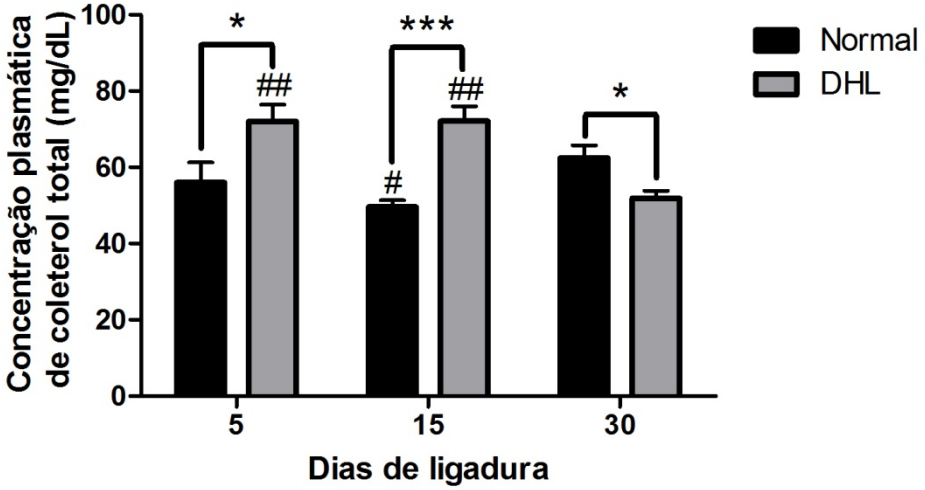

Figura 12. Nível plasmático de colesterol, determinado por método enzimático-colorimétrico, dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 7-8. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (*: P<0,05; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (#: P<0,05; ##: P<0,01; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,01; *two-way* ANOVA).

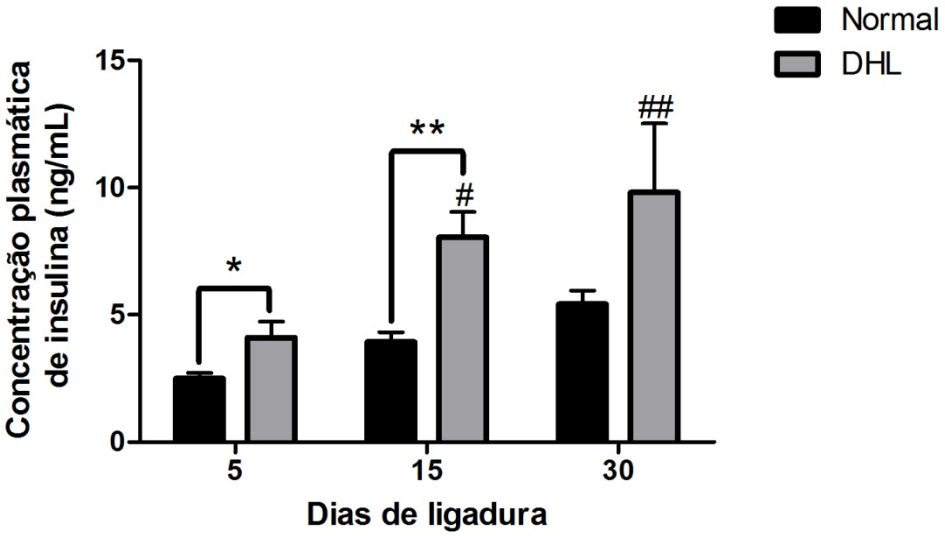

Figura 13. Nível plasmático de insulina, determinado por método radioimunoensaio, dos grupos normal e DHL no momento de sacrifício. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 6-8. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (*: P<0,05; **: P<0,01; ***: P<0,001; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (#: P<0,05; ##: P<0,01; ###: P<0,001; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,01; *two-way* ANOVA).

2. Quantificação da reabsorção óssea

A ligadura induz com sucesso a DP, pois apresenta todos os sinais clínicos de inflamação na gengiva, como edema, vermelhidão e descolamento da gengiva em relação ao dente, formando a bolsa periodontal. Além disso, os nossos resultados mostram que há reabsorção óssea e esta é progressiva (**Figura 14**), uma vez que os animais do décimo quinto e do trigésimo dia de ligadura apresentam uma área de reabsorção óssea significativamente maior comparada ao quinto dia de ligadura. Ainda, a reabsorção do osso alveolar é significantemente maior no grupo DHL em comparação com o grupo normal após 5 e 30 dias de ligadura.

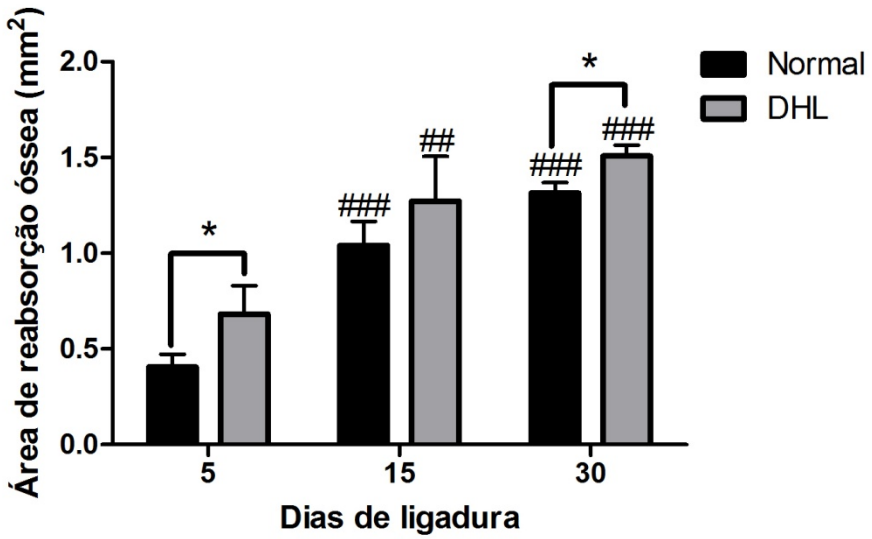

Figura 14. Área da reabsorção do osso alveolar dos grupos normal e DHL calculada pela diferença da área entre a JEC e a crista óssea alveolar do primeiro molar inferior com ligadura e do dente colateral (controle). Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média; n = 4-8. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (*: P<0,05; teste t unicaudal). #: significantemente diferente do subgrupo 5 dias de ligadura do mesmo grupo (##: P<0,01; ###: P<0,001; *two-way* ANOVA e pós-teste de Bonferroni). Há diferença estatística entre os grupos normal e DHL (P<0,05; *two-way* ANOVA).

3. Expressão gênica e concentração proteica nas amostras sem ligadura

A expressão gênica de o nível proteico de quase todos os analitos e ensaios de qPCR analisados não apresentaram diferenças significativas entre os valores das amostras controles (sem ligadura), tanto para o grupo DHL, quanto para o grupo normal. Os valores de *fold change*, para a expressão gênica, e de concentração proteica das amostras dos grupos controles são apresentados nas

tabelas suplementares 4-26. Dessa forma, esses dados demonstram a homogeneidade dos resultados para os grupos sem ligadura, mostrando que as variações de expressão gênica e proteica observadas nesse trabalho ocorrem em decorrência à ligadura, e não devido a outros fatores, como o envelhecimento do animal.

Entretanto, um único gene, o *Il17*, apresentou variações da sua expressão nas amostras controles (**Figura 15**). O *Il17* apresentou expressão significativamente maior no grupo DHL em comparação ao grupo normal em todos os momentos analisados, atingindo uma expressão gênica 10,9 vezes maior no animais com 30 dias de ligadura.

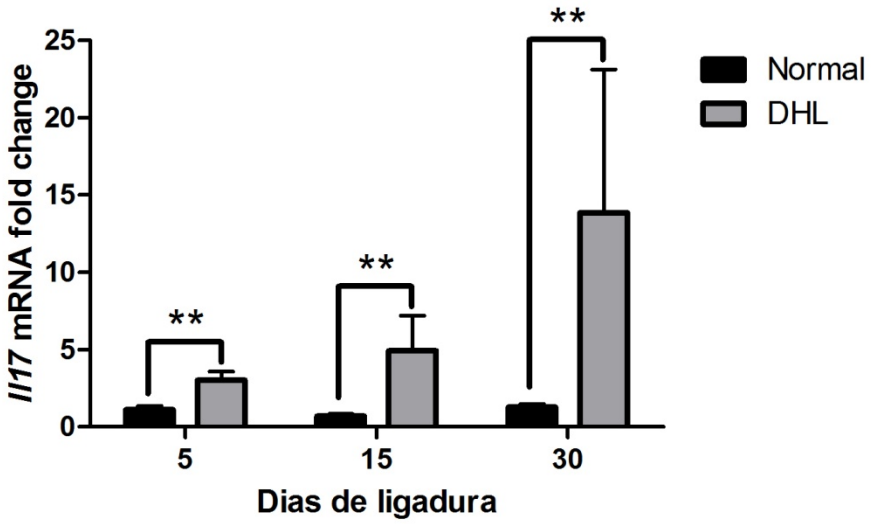

Figura 15. Expressão gênica relativa de *Il17* no tecido gengival sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 4-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado (**: P<0,01; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de *Il17* entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA).

4. Expressão gênica e concentração proteica nas amostras com ligadura

4.1. Expressão de citocinas pró-inflamatórias

Foi observada uma expressão gênica de *Il17* significativamente maior nos tecidos gengivais com ligadura comparada com a expressão no tecido controle (C) (**Figura 16**), chegando a atingir um *fold change* de 27,6 vezes no grupo DHL com 5 dias de ligadura. Além disso, a expressão gênica de *Il17* também foi significativamente maior no grupo DHL em relação ao grupo normal em todos os momentos analisados, atingindo valores 3,6 vezes maiores com 30 dias de ligadura. Do mesmo modo, a

concentração proteica de IL17 foi significativamente maior em grande parte das amostras com ligadura se comparadas com o tecido controle (**Figura 17A**). Apesar de não ser significativa, a concentração de IL17 também apresentou uma tendência a ser mais elevada no grupo DHL que no grupo normal, exceto com 30 dias de ligadura.

De maneira semelhante, *Il6* apresenta uma expressão gênica significativamente maior nos tecidos gengivais com ligadura em relação ao tecido controle (**Figura 16B**), alcançando um *fold change* de 132,9 vezes no grupo DHL com 5 dias de ligadura e *fold changes* menos extremos a partir de 15 dias com ligadura. Ademais, sua expressão foi significativamente maior no grupo DHL, em comparação ao grupo normal, em todos os momentos de ligadura, chegando a ser 5,5 vezes maior com 15 dias de ligadura. A concentração proteica de IL6 acompanhou a sua expressão gênica no momento 5 dias de ligadura do grupo DHL, pois apresentou valores extremamente altos em comparação ao grupos controle e normal (**Figura 17C**), além de apresentar concentrações elevadas com 15 dias de ligadura, mas menos extremas.

Não foi possível quantificar a expressão gênica de *Ifng*, pois os dois pares de primers testados não para o RNAm do *Ifng* não geraram amplificação. Como há altos níveis proteicos de IFNG nos tecidos gengivais analisados (**Figura 17B**), é muito provável que também haja expressão gênica de *Ifng* nesses tecidos e que sua não detecção tenha ocorrido devido ao mau funcionamento dos primers utilizados. A concentração proteica de IFNG foi significativamente maior no grupo DHL com 5 dias de ligadura em relação aos grupos controle e normal. Já para os outros momentos com ligadura não foi observada diferença entre as amostras com ligadura e o grupo controle.

Il1b apresentou uma maior expressão gênica nas amostras com 5 dias de ligadura comparadas ao grupo controle e foi diminuindo no grupo DHL com o passar do tempo, mas sempre se mantendo significativamente maior em relação ao grupo controle (**Figura 16C**). Ademais, a expressão gênica de *Il1b* foi significativamente maior no grupo DHL que no grupo normal no momento 15 dias de ligadura. O pico de expressão no momento 5 dias, seguido de diminuição até 30 dias, também foi observado na expressão proteica de IL1B (**Figura 17D**). No entanto, não foram observadas diferenças significativas da sua concentração proteica entre os grupos DHL e normal.

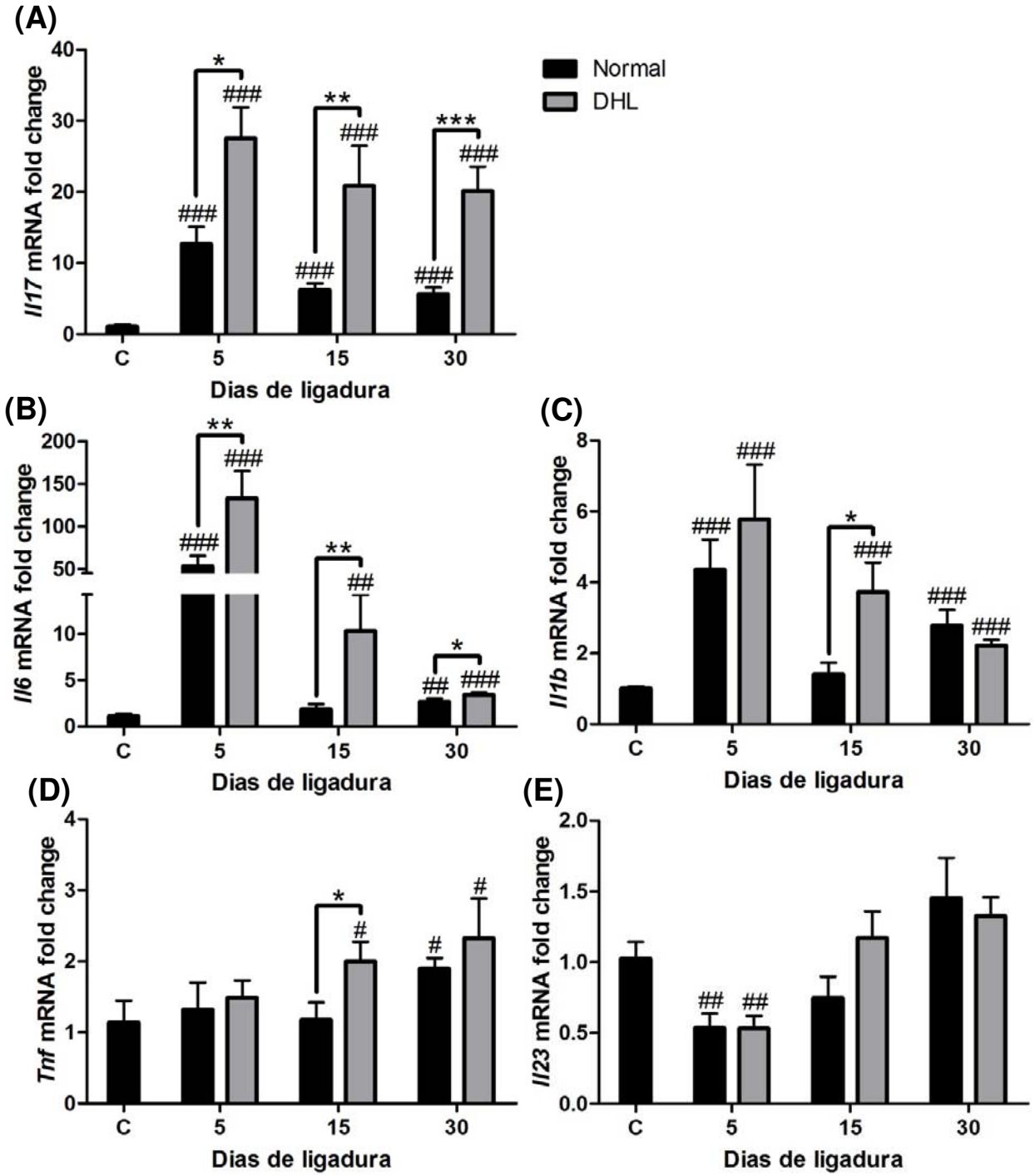

Figura 16. Expressão gênica relativa de *Il17* **(A)**, *Il6* **(B)**, *Il1b* **(C)**, *Tnf* **(D)** e *Il23* **(E)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao grupo controle (C), correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 4-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C (* e #: P<0,05; ** e ##: P<0,01; *** e ###: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de *Il17* e *Il6* entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

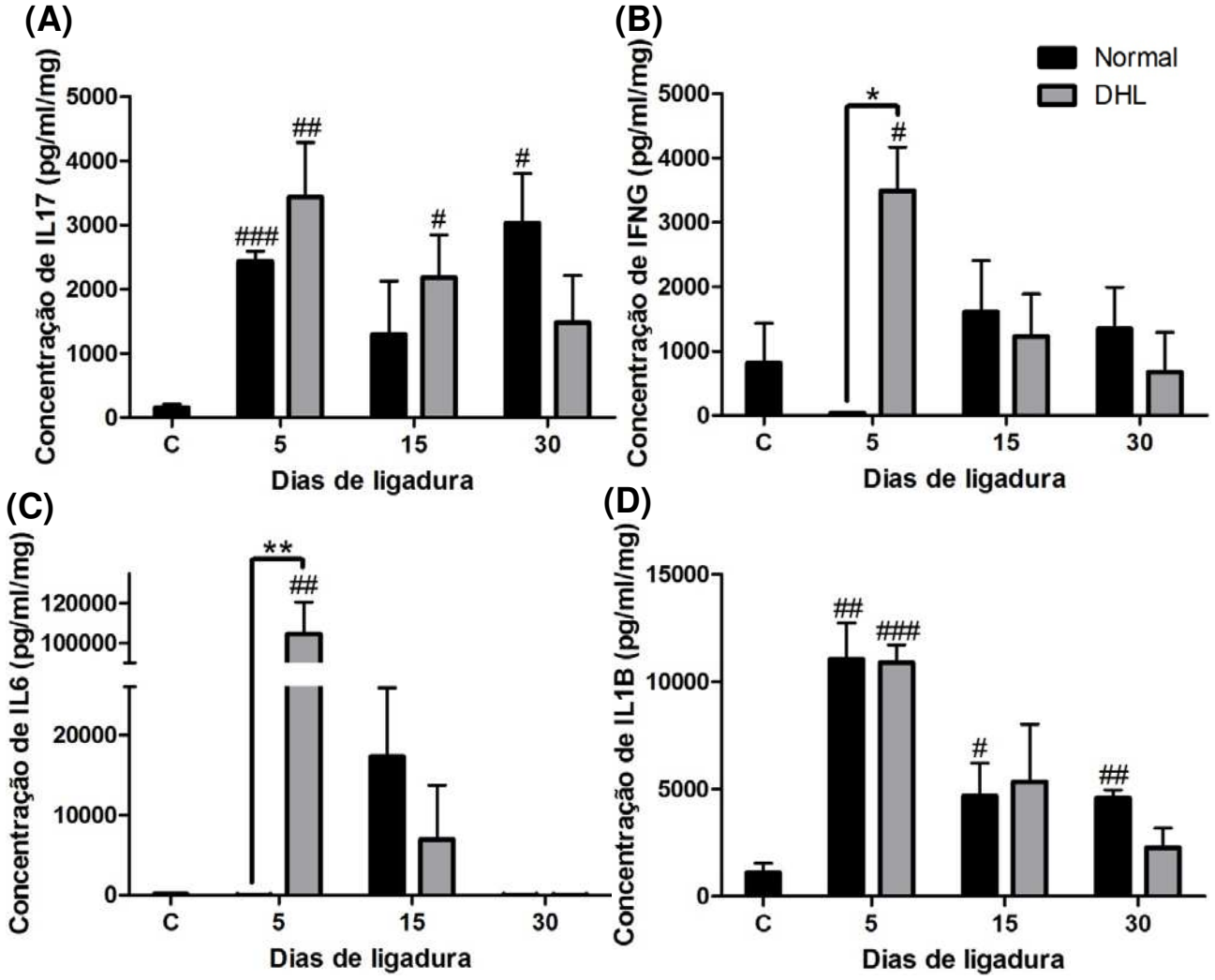

Figura 17. Concentração proteica de IL17 **(A)**, IFNG **(B)**, IL6 **(C)** e IL1B **(D)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média, normalizados pela concentração proteica total; n = 2-3. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C, que correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura (* e #: P<0,05; ** e ##: P<0,01; ###: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de IL6 entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

Opostamente, *Tnf* apresentou aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle apenas após 15 dias de ligadura no grupo DHL e após 30 dias de ligadura no grupo normal (**Figura 16D**). Adicionalmente, a expressão de *Tnf* foi significantemente maior no grupo DHL que no grupo normal após 15 dias de ligadura.

Não foi observado aumento da expressão gênica de *Il23* nas amostras com ligadura em relação ao grupo controle, apenas uma diminuição significativa no momento 5 dias de ligadura (**Figura 16E**).

4.2. Expressão de citocinas antiinflamatórias

Il10 apresentou uma expressão gênica significativamente maior nas amostras com ligadura que no grupo controle (**Figura 18A**), apresentando *fold changes* de apenas 2 a 3,5 vezes, mas sem apresentar diferenças significativas entre os grupos DHL e normal. Tal padrão se mostrou semelhante ao nível proteico, com concentrações proteicas de IL10 significativamente elevadas nas amostras com ligadura (**Figura 19A**). Apesar de não serem observadas diferenças significativas entre os grupos DHL e normal, observou-se uma tendência de aumento da concentração de IL10 com o tempo no grupo normal e de diminuição no grupo DHL.

A expressão gênica de *Tgfb* foi significativamente maior que o grupo controle somente no grupo DHL com 5 e 15 dias de ligadura, no entanto esse aumento foi bastante brando com *fold changes* de 1,3 a 2 vezes (**Figura 18B**). Também se constatou uma diferença pequena, mas significativa entre os grupos DHL e normal no momento 15 dias de ligadura.

Ademais, não foram observadas variações significativas da concentração proteica de IL4 nos tecidos gengivais em resposta à ligadura (**Figura 19B**).

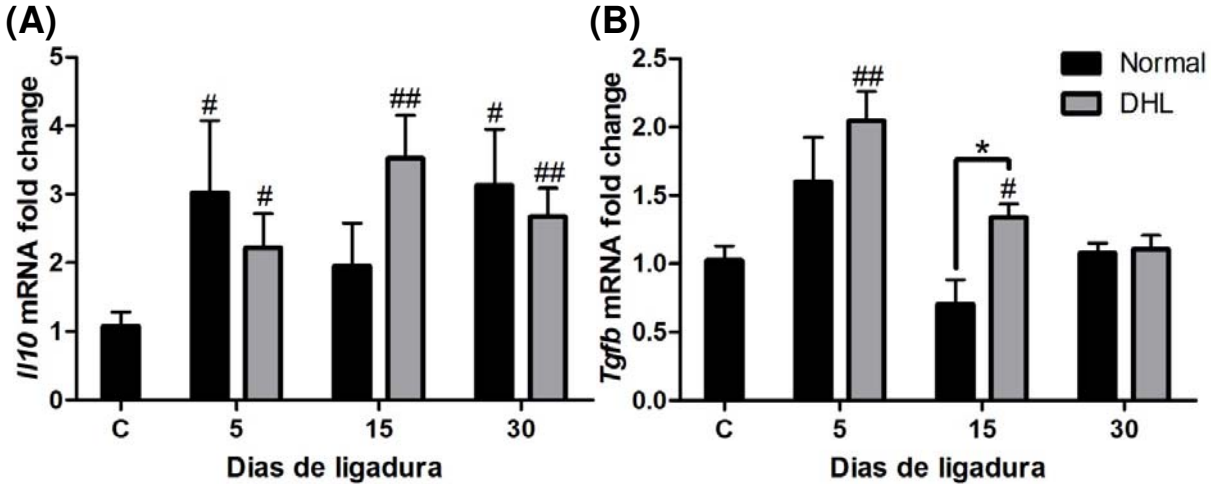

Figura 18. Expressão gênica relativa de *Il10* **(A)** e *Tgfb* **(B)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao grupo controle (C), correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 4-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C (* e #: P<0,05; ##: P<0,01; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de *Tgfb* entre os grupos normal e DHL (P<0,05; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

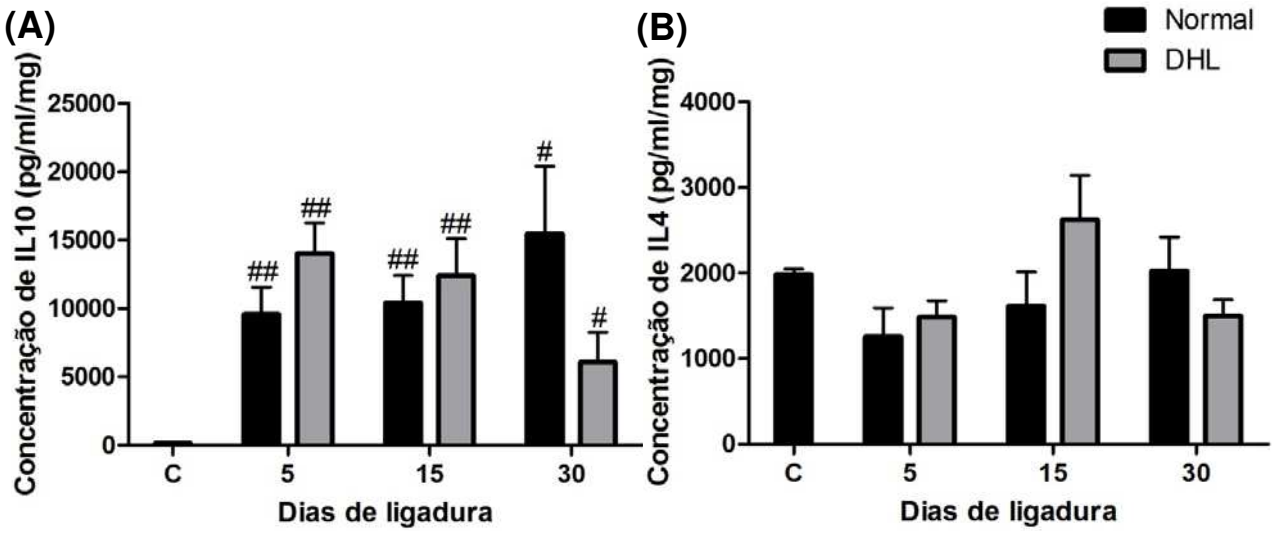

Figura 19. Concentração proteica de IL10 **(A)** e IL4 **(B)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média, normalizados pela concentração proteica total; n = 2-3. #: significantemente diferente do grupo C, que correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura (#: P<0,05; ##: P<0,01; teste t unicaudal). Os gráficos exibem escalas diferentes.

4.3. Degradação da matriz extracelular

De forma geral, há uma maior expressão gênica das MMPs analisadas nos tecidos gengivais com 5 dias de ligadura, seguida de uma diminuição com 15 dias e manutenção até 30 dias, sendo em todos os momentos maior que a expressão no grupo controle (**Figura 21**). Assim como, foi possível observar uma tendência em haver uma maior expressão gênica das MMPs nas amostras com ligadura do grupo DHL que do grupo normal, principalmente no momento 15 dias de ligadura, em que houve uma expressão significativamente maior no grupo DHL que no grupo normal em quatro das cinco MMPs analisadas. Vale enfatizar a expressão gênica de *Mmp13* (**Figura 21A**), em que o grupo DHL apresentou valores significativamente superiores em comparação com o grupo normal com 5 e 15 dias de ligadura, sendo mais de duas vezes mais expresso no grupo DHL com 5 dias de ligadura. Em contrapartida, a expressão gênica de *Mmp14* chegou a ser maior no grupo normal que no grupo DHL, em especial após 30 dias de ligadura, em que o grupo normal apresentou uma expressão significativamente maior que o grupo DHL (**Figura 21E**).

Seguindo uma cinética de expressão similar às MMPs, seus inibidores, *Timp1*, *Timp2* e *Reck*, apresentaram um pico de expressão gênica nos tecidos gengivas com 5 dias de ligadura, chegando a apresentar um *fold change* de 23 vezes na expressão de *Timp1* em relação ao grupo controle (**Figura**

20). A partir de 15 dias de ligadura, os tecidos gengivais com ligadura tiveram uma diminuição na expressão gênica desses inibidores, voltando ao nível basal em muitos casos, principalmente no grupo DHL no momento 30 dias de ligadura que apresentou expressões significativamente menores que o grupo normal para os três inibidores analisados. Dessa forma, é possível afirmar que esses inibidores de MMPs são menos expressos ao nível gênico nas amostras com ligadura do grupo DHL em comparação ao grupo normal.

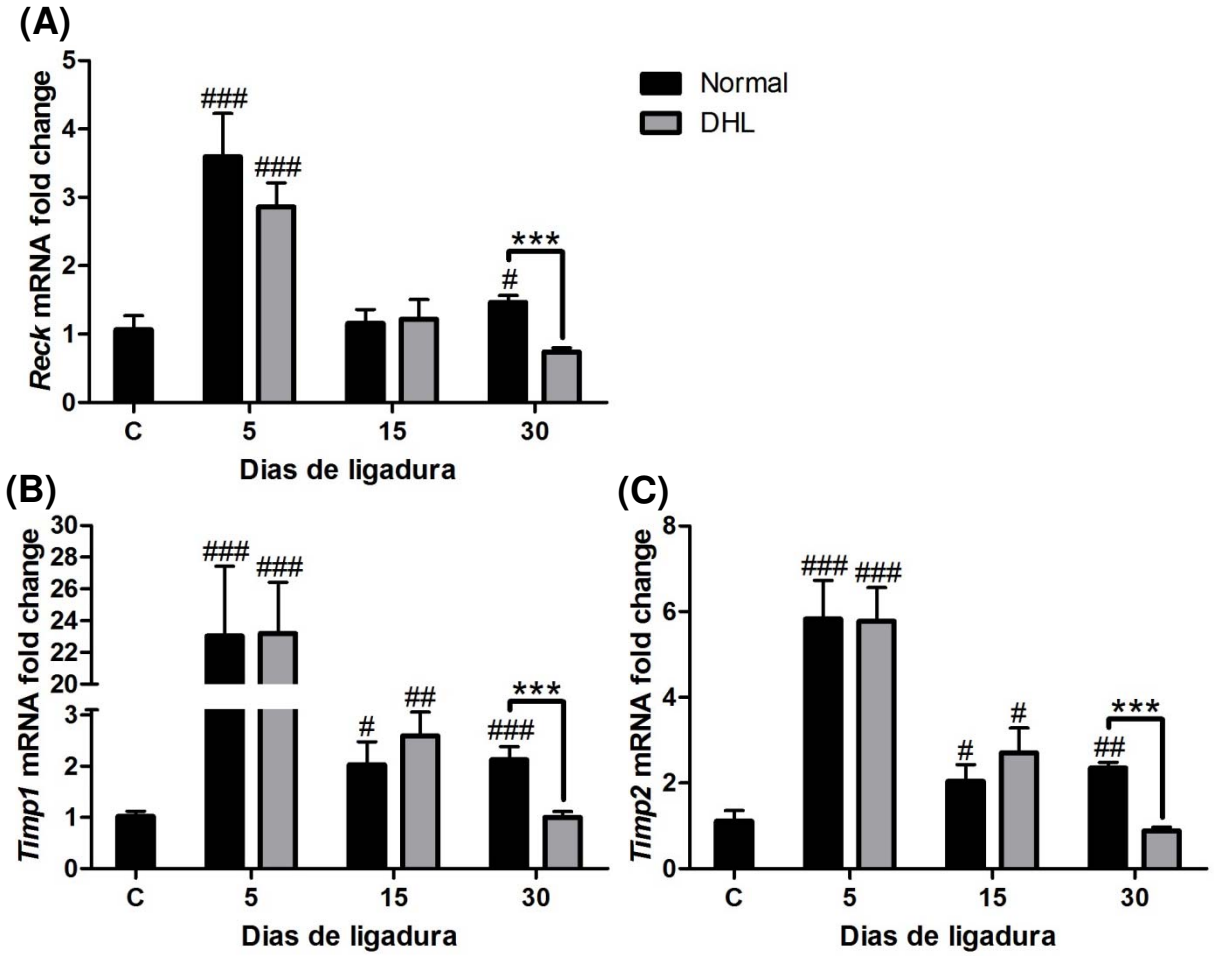

Figura 20. Expressão gênica relativa de *Reck* **(A)**, *Timp1* **(B) e** *Timp2* **(C)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao grupo controle (C), correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 4-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C (#: P<0,05; ##: P<0,01; *** e ###: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de *Reck* entre os grupos normal e DHL (P<0,05; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

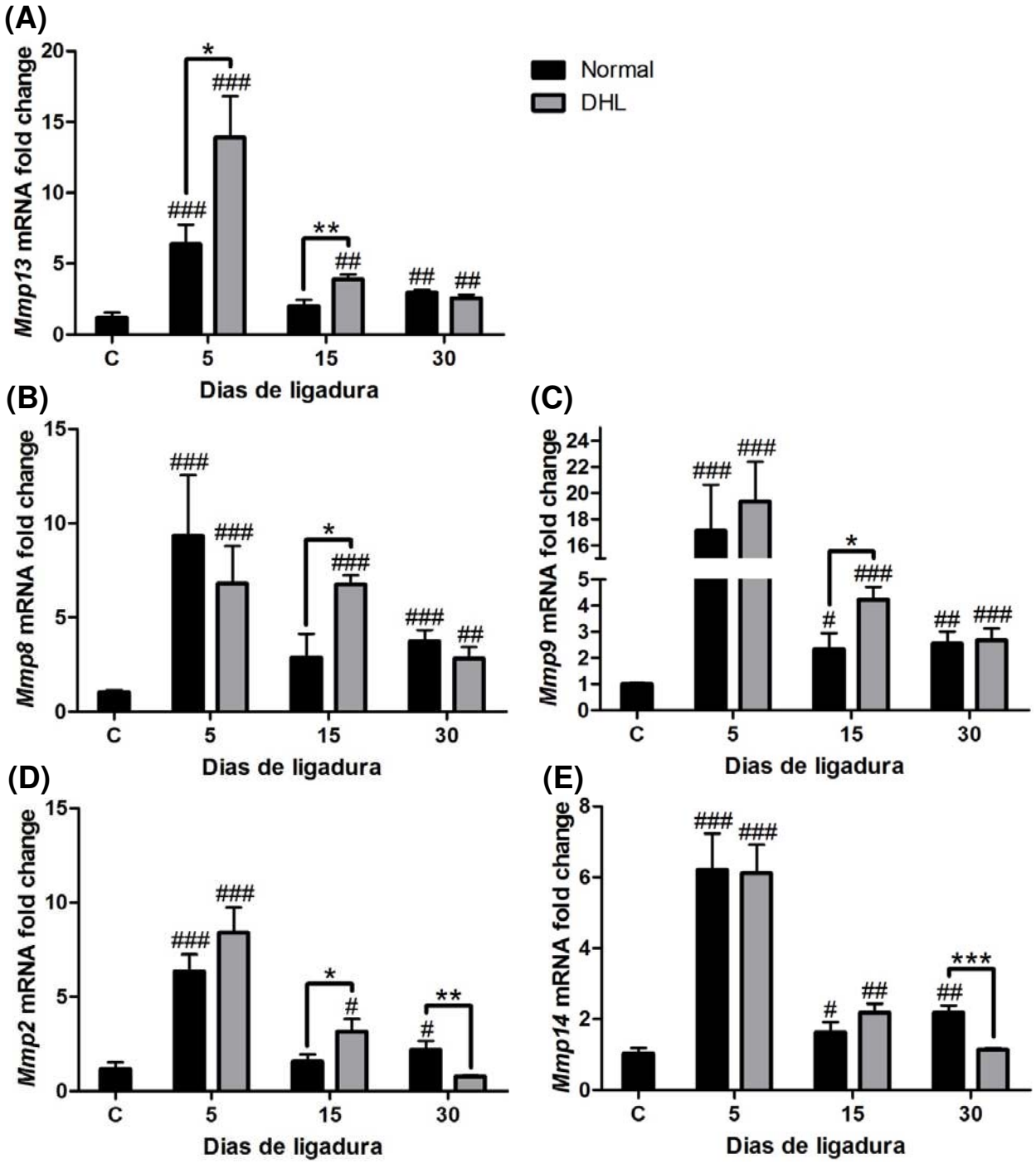

Figura 21. Expressão gênica relativa de *Mmp13* **(A)**, *Mmp8* **(B)**, *Mmp9* **(C)**, *Mmp2* **(D)** e *Mmp14* **(E)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao grupo controle (C), correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 4-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C (* e #: P<0,05; ** e ##: P<0,01; *** e ###: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística da expressão de *Mmp13* entre os grupos normal e DHL (P<0,01; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

4.4. Reabsorção óssea

As amostras com ligadura apresentaram um grande aumento na expressão gênica de *Rankl* com 5 dias de ligadura, alcançando um *fold change* de 66 vezes no grupo DHL em comparação ao grupo controle (**Figura 22B**). A partir de 15 dias de ligadura, a expressão de *Rankl* nas amostras com ligadura diminuiu até 30 dias, mas sempre se manteve significativamente maior que a expressão no grupo controle. Ainda, o grupo DHL com 15 dias de ligadura apresentou uma expressão de *Rankl* significantemente maior que o grupo normal.

Foi observado um pico de expressão gênica de *Opg* nos tecidos gengivais com 5 dias de ligadura (**Figura 22C**). Para o grupo normal, houve uma diminuição da sua expressão com 15 dias de ligadura e sua manutenção até 30 dias. Já para o grupo DHL, houve uma diminuição progressiva a partir de 15 dias de ligadura, retornando à expressão basal com 30 dias de ligadura, momento em que o grupo normal apresentou uma expressão significativamente maior que o grupo DHL.

Finalmente, ao calcular a razão da expressão gênica de *Rankl* por *Opg* (**Figura 22A**), que geralmente é utilizada para predizer o grau da inibição de RANKL pela OPG, observamos um grande pico nos tecidos gengivais com 5 dias de ligadura, seguido de uma queda a partir de 15 dias de ligadura, que se mantem, em geral, significativamente maior que a razão do grupo controle. Além disso, observamos que a razão *Rankl/Opg* foi significativamente maior no grupo DHL em relação ao grupo normal em todos os momentos de ligadura.

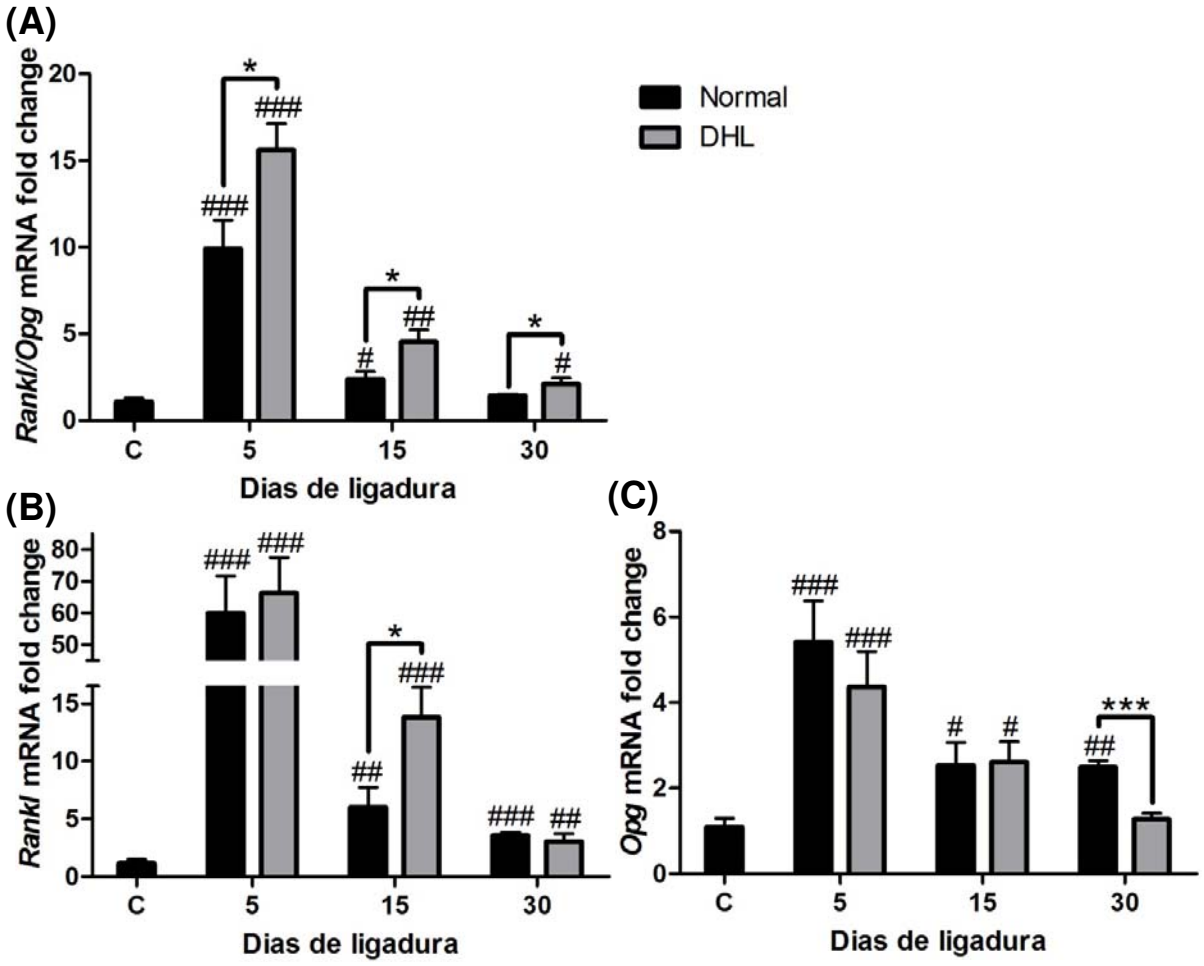

Figura 22. Expressão gênica relativa de *Rankl* **(B)**, *Opg* **(C)** e da razão *Rankl/Opg* **(A)** no tecido gengival com ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de média ± erro padrão da média do *fold change* em relação ao grupo controle (C), correspondente ao subgrupo normal 5 dias sem ligadura; n = 3-5. Asteriscos indicam diferença significante entre os grupos normal e DHL no momento indicado. #: significantemente diferente do grupo C (* e #: P<0,05; ##: P<0,01; *** e ###: P<0,001; teste t unicaudal). Há diferença estatística da razão *Rankl/Opg* entre os grupos normal e DHL (P<0,001; *two-way* ANOVA). Os gráficos exibem escalas diferentes.

DISCUSSÃO

A indução da DP em roedores apresenta diversos modelos, entre eles se encontra a indução pela inoculação/gavagem de bactérias características da DP em humanos e que são associadas ao seu desenvolvimento. No entanto, apesar de ser um modelo muito bem aceito pela comunidade científica, não representa a complexidade da DP, pois esta é composta por uma vasta comunidade bacteriana. Nesse sentido, a ligadura se encaixa como um modelo bastante aproximado da DP, por propiciar a formação de um biofilme multibacteriano e induzir alterações nos tecidos periodontais similares às alterações observadas na DP em humanos, incluindo influxo de células inflamatórias, ruptura do ligamento periodontal e perda do osso alveolar (Duarte *et al.*, 2010).

A obesidade, um dos problemas de saúde mais significativos da sociedade moderna, é agora reconhecida como uma doença crônica de etiologia multifatorial. A incidência da obesidade e do índice de massa corporal elevado aumentou dramaticamente no mundo ocidental. Embora os mecanismos fundamentais por trás deste aumento da obesidade não sejam bem compreendidos, tornou-se claro que os fatores genéticos e ambientais e influências socioeconômicas e comportamentais levam à ingestão calórica excessiva, diminuição da atividade física, além de anormalidades metabólicas e endócrinas serem fatores importantes nesse processo (Genco *et al.*, 2005).

A obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de uma série de problemas de saúde, entre eles se encontra a DP. De fato, os efeitos adversos diretos da obesidade sobre a saúde geral foram identificados e incluem pressão arterial alterada, resistência à insulina, dislipidemia e um estado de baixo grau de inflamação (Suvan *et al.*, 2011). Esse conjunto de alterações foi denominado síndrome metabólica. Entre os modelos de indução da obesidade em ratos, se encontra o modelo de alimentação hiperlipídica, que é descrito por apresentar as alterações características da obesidade (Lalli *et al.*, 2008).

Ao analisar os parâmetros da obesidade avaliados, observa-se que os animais do grupo DHL apresentaram diversos indicadores da obesidade. A glicemia elevada no grupo DHL durante todo o teste de tolerância à glicose e sua curva glicemia com uma cinética diferente do grupo normal (**Figuras 6 e 7**) indica que os animais submetidos à dieta hiperlipídica desenvolveram intolerância à glicose. Intolerância à glicose é um efeito direto da obesidade, está associada à produção de adipocinas pelo tecido adiposo (Nardelli *et al.*, 2010) e faz parte de um conjunto de alterações metabólicas desencadeadas pela

obesidade designado síndrome metabólica (Pischon *et al*., 2007; Uh *et al*., 2008). Ademais, a glicemia elevada do grupo DHL no momento de sacrifício corrobora a intolerância à glicose e mostra que esses animais não se tornaram diabéticos, uma vez que, a sua glicemia não chegou a ultrapassar a concentração de 120 mg/dL (**Figura 8**) (Chalkley *et al*., 2002).

O índice de Lee é positivamente correlacionado à porcentagem de tecido adiposo e, consequentemente, à obesidade, de modo que é comumente utilizado para predizer obesidade em roedores. Observa-se que o índice de Lee do grupo DHL foi maior que do grupo normal a partir de 15 dias de ligadura, mas não com 5 dias de ligadura (**Figura 9**). O procedimento de colocação da ligadura causou uma redução no peso dos animais, sendo a redução mais acentuada no grupo DHL, como pode ser observado na figura 5. É provável que a diminuição no peso dos animais tenha resultado do efeito da anestesia, ou ainda, do incômodo ou dor gerados pela colocação da ligadura, de forma que os animais ficaram períodos prolongados sem conseguir se alimentar. Essa grande diminuição no peso do grupo DHL pode ter diminuído temporariamente o índice de Lee, fazendo com que o grupo DHL não apresente um valor significativamente maior que o grupo normal no momento 5 dias de ligadura. No entanto, o índice de Lee significantemente maior no grupo DHL que no grupo normal nos seguintes momentos de ligadura indica que os animais do grupo normal apresentam uma maior porcentagem de gordura corpórea e, portanto, desenvolveram a obesidade.

Além disso, o grupo DHL apresentou um acúmulo muito maior de gordura visceral que o grupo normal, evidenciado pelo peso das gorduras retroperitoneais e epididimais totais (**Figuras 10 e 11**). Nota-se que o peso das gorduras também foi significantemente maior com 5 dias de ligadura, mostrando que, apesar do menor índice de Lee nesse momento, o grupo DHL apresentou indicadores positivos da obesidade. Isso porque o maior peso das gorduras viscerais, como a gordura retroperitoneais e epididimais, reflete o acúmulo de gordura total no animal, confirmando o desenvolvimento da obesidade. Ainda, o grupo DHL apresentou o aumento do peso dessas gorduras nos momentos de 15 e 30 dias de ligadura, ou seja, nos animais que consumiram por mais tempo a ração hiperlipídica, evidenciando um agravamento da obesidade nesses animais. Isso mostra que o consumo constante da dieta hiperlípidica realmente leva a um aumento contínuo do tecido adiposo visceral. Como bem descrito na literatura (Ouchi *et al*., 2011), o tecido adiposo visceral é o

compartimento adiposo mais metabolicamente ativo e, quando está com um acúmulo acentuado de gordura, passa a produzir adipocinas pró-inflamatórias de forma desregulada, resultando em alterações metabólicas nesse indivíduo obeso.

Adicionalmente a dieta hiperlipídica influenciou o peso de órgãos vitais como os rins e o fígado, induzindo uma atrofia ou hipertrofia como mostra a tabela 2. O menor peso dos rins no grupo DHL pode estar associado a uma menor taxa metabólica desses animais, refletindo uma menor necessidade de eliminação de excretas. Tal hipótese é corroborada pela observação de que os animais do grupo DHL consumiam menos água e urinavam muito menos que os animais do grupo normal (dados não quantificados).

O peso inferior do fígado no grupo DHL em momentos iniciais de ligadura pode estar relacionado ao menor tamanho desses animais em comparação aos animais do grupo normal. Enquanto que o grupo normal não apresentou variações, o grupo DHL apresentou um aumento no peso do fígado com o decorrer do tempo. Além disso, o fígado no grupo DHL mostrou alterações clínicas visíveis, como alteração na coloração do órgão que apresentou uma coloração pálida e amarelada, ao contrário da cor de sangue no grupo normal. Assim, é provável que no grupo DHL haja acúmulo progressivo de gordura no fígado ou ainda apresente um processo de necrose, devido ao menor peso do órgão observado. No entanto, para identificar quais foram as alterações morfológicas ocorridas no fígado, torna-se necessária a realização de estudos histológicos nesse órgão, a fim de avaliar um possível acúmulo de gordura ou regiões necróticas. De qualquer forma, é possível afirmar que o grupo DHL apresentou alterações significativas no fígado, que podem estar participando das alterações metabólicas observadas nesse grupo.

Embora os animais do grupo DHL apresentem parâmetros característicos da obesidade, a quantificação do colesterol total mostrou dados conflitantes. A maior concentração plasmática de colesterol total encontrada no grupo DHL com 5 e 15 dias de ligadura, talvez se deva a uma maior concentração da fração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) em comparação com o grupo normal (**Figura 12**). Assim, era de se esperar que houvesse um aumento do colesterol plasmático total no grupo DHL com 30 dias de ligadura, uma vez que no decorrer do experimento há um agravamento da obesidade com aumento do peso das gorduras viscerais. No entanto, observou-se uma queda desse

índice. Assim, é muito provável que a diminuição da concentração plasmática de colesterol total ocorra devido a uma diminuição da fração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) de colesterol nestes animais, enquanto que a fração LDL deve se manter estável, pois o teste realizado afere o colesterol como um todo, ou seja, tanto o HDL quanto o LDL. De fato, a fração HDL tende a diminuir em indivíduos obesos (Monteiro & Azevedo, 2010). Dessa forma, para melhor avaliar a variação da concentração plasmática de colesterol associada à obesidade, seria recomendável quantificar as frações HDL e LDL. Adicionalmente, a quantificação de ácidos graxos livres também é fortemente aconselhada, pois é um parâmetro intensamente associado à obesidade e ajudaria avaliar se os animais estariam desenvolvendo a síndrome metabólica.

A concentração plasmática de insulina se apresentou elevada no grupo DHL comparada ao grupo normal, assim como aumentou nesse grupo com o passar do tempo (**Figura 13**). Assim, é possível afirmar que os animais desse grupo desenvolveram hiperinsulinemia, um distúrbio metabólico caracterizada pelo aumento da produção de insulina. A hiperinsulinemia está associada à obesidade e à resistência a insulina (Weyer *et al*., 2001).

Dessa maneira, os animais alimentados com a dieta hiperlipídica, comparados com os animais alimentados com a ração padrão normolipídica, apresentaram intolerância à glicose, glicemia elevada, maior índice de Lee, alterações hepáticas, aumento do peso das gorduras viscerais, hiperinsulinemia e alterações no nível plasmático de colesterol. Com a soma de todos esses parâmetros, é possível afirmar que o grupo DHL desenvolveu com sucesso a obesidade e também apresentou uma série de alterações metabólicas, características da síndrome metabólica (Pischon *et al*., 2007; Uh *et al*., 2008).

A obesidade e principalmente a hipertrofia do tecido adiposo visceral tem sido associadas ao aumento de síntese de mediadores pró-inflamatórios pelo tecido adiposo, que se encontra inflamado (Karalis *et al*., 2009). Os adipócitos são capazes de secretar uma enorme quantidade de adipocinas pró-inflamatórias e citocinas, incluindo leptina, resistina, IL6, TNF, IL1B, *monocyte chemoattractant protein-1*, proteína C reativa, *macrophage migration inhibitory factor*, quimiocinas das famílias CC e CXC, entre outros (Monteiro & Azevedo, 2010). Assim, os níveis circulatórios de mediadores inflamatórios se tornam elevados em indivíduos obesos, de forma que estes desenvolvem um quadro de inflamação crônica sistêmica de baixo grado (Ahmed & Gaffen, 2010; Karalis *et al*., 2009).

A inflamação crônica sistêmica pode exacerbar processos inflamatórios locais, por propiciar a ativação mais intensa de células inflamatórias e também de um maior número de células. Além disso, pode influenciar o perfil de linfócitos ativados nos órgãos imunes periféricos, que migraram para o tecido inflamado, levando à polarização dos linfócitos ativados para um perfil pró-inflamatório. Essa exacerbação de processos inflamatórios locais pode ser o ponto chave da desregulação da resposta imune no periodonto, que levará ao agravamento da DP em indivíduos obesos com consequente aumento da destruição tecidual, como é frequentemente observado em estudos epidemiológicos (Pischon *et al*., 2007; Saito & Shimazaki, 2007).

No tecido gengival com ligadura do grupo DHL é realmente intensificada a produção de citocinas pró-inflamatórias (**Figuras 16 e 17**). A maior expressão de IL17 e INFG nesse grupo indica que há um aumento da atividade de linfócitos Th1 e Th17, e esse perfil de resposta inflamatória normalmente está associado à maior severidade da DP (Colic *et al*., 2009; Gaffen & Hajishengallis, 2008). Em contrapartida, a expressão de IL10 apresentou apenas uma tendência não significativa de diminuir no grupo DHL se comparado com o grupo normal, durante a progressão da DP (**Figura 18A e 19A**), significando que a proporção de células Treg ativas no grupo DHL não é maior que o grupo normal. A não alteração na produção de IL4 nos tecidos gengivais com indução da DP (**Figura 19B**) mostra que não há uma resposta intensa com o perfil Th2 no modelo de DP adotado. Tendo em vista que uma resposta imune com os perfis Th1 e Th17 está associada à exacerbação da resposta inflamatória (Preshaw & Taylor, 2011), a polarização da resposta imune para os perfis Th1 e Th17 nos tecidos periodontais com ligadura do grupo DHL, pode ter sido responsável pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias observada nesse grupo. A exacerbação da resposta inflamatória no grupo DHL foi caracterizada principalmente pela expressão notadamente mais elevada de IL6, tanto ao nível gênico, quanto ao proteico (**Figuras 16B e 17C**). Adicionalmente, também foi observada maior expressão gênica de *Il1b* e *Tnf* nesse grupo (**Figuras 16C e 17D**). Dessa forma, constatamos que a inflamação local nos indivíduos do grupo DHL realmente é exacerbada.

No entanto, não observamos aumentos significativos da expressão de *Il23* nas amostras com ligadura (**Figura 16E**), que também é uma citocina pró-inflamatória. Geralmente, a presença significativa de células Th17 é acompanhada por níveis elevados de IL23, que é uma das citocinas responsáveis

pela diferenciação, expansão e sobrevivência desse subtipo celular (Gaffen & Hajishengallis, 2008). Assim, é possível que as células Th17 não estejam se diferenciando e expandindo no periodonto, mas sim em órgãos linfóides secundários e migram para o tecido inflamado já com a capacidade de produzir e secretar IL17.

Adicionalmente, observou-se que na gengiva sem ligadura de indivíduos do grupo DHL há uma expressão gênica pronunciada de *Il17* (**Figura 15**), comparando com o grupo normal. A grande expressão de *Il17* indica que na ausência da DP, já há uma resposta imune contínua com perfil Th17 nesse grupo. Esse perfil de resposta Th17 deve estar relacionado com às desordens metabólicas encontradas no grupo DHL, principalmente com o aumento da gordura visceral. Um estudo recente mostrou que a obesidade induzida em camundongos gera um fenótipo imunológico com a expansão seletiva da linhagem Th17, em animais imunizados e não imunizados. Além disso, os animais obesos apresentaram aumento da severidade de dois modelos de doenças autoimunes com o aumento da inflamação e do *pool* de células Th17 nos tecidos afetados (Winer *et al.*, 2009). Paralelamente, foram descritos níveis circulatórios de IL17 elevados em humanos obesos (Sumarac-Dumanovic *et al.*, 2009). Adicionalmente, ao contrário de ratos magros, o tecido adiposo de ratos obesos produz IL17 (Zuniga *et al.*, 2010). Dessa forma, é provável que o tecido adiposo visceral dos ratos do grupo DHL esteja secretando desreguladamente adipocinas pró-inflamatórias, em especial, IL17. Esse cenário leva a uma resposta imune com perfil Th17 e inflamação pronunciada no tecido gengival com ligadura, resultando no agravamento da DP.

É de se esperar que indivíduos com DP que apresentem uma inflamação exacerbada, apresentem também um maior grau de desbalanço da expressão de MMPs e TIMPs, visto que citocinas pró-inflamatórias induzem a expressão de MMPs e inibem a expressão de TIMPs (Garlet, 2010). De fato, tal processo é observado em nosso modelo. Os tecidos gengivais do grupo DHL apresentaram uma maior expressão gênica das MMPs e uma menor expressão de seus inibidores em relação ao grupo normal (**Figuras 20 e 21**). O *Mmp13* e o *Reck* foram os genes que apresentaram um aumento e diminuição, respectivamente, mais significativos, indicando que estes são os mediadores que são mais expressivamente modulados ao nível transcricional em indivíduos com inflamação local mais intensa, induzida por uma alimentação hiperlipídica. Como a degradação da matriz extracelular nos tecidos

periodontais está diretamente associada ao desbalanço MMPs/TIMPs (Garlet *et al.*, 2004; Goncalves *et al.*, 2008), é de se esperar que nos indivíduos do grupo DHL haja uma destruição acelerada do tecido conjuntivo. Assim, haverá um rompimento acelerado do ligamento periodontal, com maior perda de adesão. Além disso, MMPs são de extrema importância para o acesso de osteoclastos aos sítios de reabsorção óssea, pois estão diretamente associadas à migração celular dentro do tecido (Hannas *et al.*, 2007). Ainda, as MMPs, como a MMP13, são essências para a remoção da matriz remanescente da ação osteoclástica (Everts *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2004). Dessa forma, é provável que o desbalanço entre MMPs e TIMPs contribua para uma maior reabsorção do osso alveolar.

Tendo em vista que desbalanço de MMPs/TIMPs tenha sido observado somente ao nível da expressão gênica, seria interessante aferir a atividade enzimática dessas MMPs, para podermos confirmar que a maior expressão de MMPs e menor expressão de TIMPs realmente estejam resultando em uma maior ação proteolítica nesses tecidos. Essa verificação se torna ainda mais necessária, pois as MMPs apresentam uma rede complexa de regulação, com regulações pós-transcricionais, secreção controlada, ativação de sua forma latente e inibição por proteínas endógenas (Sternlicht & Werb, 2001). Além disso, análises morfológicas por histologia poderiam ser realizadas para análise da degradação da matriz extracelular, de forma a associar a expressão e atividade das MMPs à morfologia do tecido danificado.

Paralelamente, foi observada uma alta expressão de *Rankl* no grupo DHL, juntamente com uma menor expressão de *Opg*, principalmente em estágios mais crônicos da DP (**Figura 22**). Isso resultou em uma maior desregulação da razão *Rankl/Opg*, que está diretamente associada ao perfil inflamatório do periodonto. A intensa expressão de *Rankl*, principalmente em estágios iniciais da DP, está fortemente correlacionada com a expressão das citocinas pró-inflamatórias *Il6*, *Il1b* e *Il17*. De fato, tem-se descrito que a expressão de *Rankl* é estimulada por essas citocinas e está associada a uma resposta com perfil Th1 e Th17, enquanto que a expressão de *Opg* diminui em resposta aos mesmos estímulos (Belibasakis & Bostanci, 2012; Nakashima *et al.*, 2000). Dessa forma, o perfil pró-inflamatório exacerbado durante toda a progressão da DP no grupo DHL, refletiu no maior desbalanço da razão *Rankl/Opg* em todos os momentos em relação ao grupo normal.

Ademais, a reabsorção óssea alveolar foi quantificada, a fim de analisar o dano em decorrência da DP. A reabsorção óssea do grupo DHL foi significativamente maior que do grupo normal (**Figura 14**), evidenciando que a obesidade leva a uma maior e mais precoce reabsorção óssea em decorrência à DP induzida por ligadura. A taxa de reabsorção do osso alveolar e a progressão da DP têm sido associadas com a razão *Rankl/Opg* (Cochran, 2008; Garlet *et al.*, 2006) e também com a expressão de MMPs, como já discutido. Assim, o aumento da razão *Rankl/Opg* leva ao aumento da osteoclastogênese via RANK-RANKL que, por sua vez, resulta no aumento da reabsorção do osso alveolar.

Desse modo, nosso trabalho possibilitou relacionar o estado obeso à progressão da DP. A alimentação com a dieta hiperlipídica induziu alterações metabólicas características da obesidade, que resultaram na exacerbação da resposta inflamatória no tecido gengival com DP. Essa resposta pró-inflamatória, polarizada para os perfis Th1 e Th17, levou ao desbalanço da expressão gênica das razões MMPs/TIMPs e *Rankl/Opg*. Por fim, a desregulação dos mediadores da destruição tecidual e de seus inibidores resultou no agravamento da DP, com aumento da reabsorção do osso alveolar.

CONCLUSÕES

a. A alimentação com a dieta hiperlipídica induz alterações metabólicas características da obesidade;

b. A produção de citocinas pró-inflamatórias durante o desenvolvimento e progressão da doença periodontal é exacerbada na obesidade;

c. A obesidade induz uma maior polarização da resposta imune para os perfis Th1 e Th17 durante a doença periodontal;

d. A inflamação exacerbada na obesidade leva a um maior desequilíbrio das razões MMPs/TIMPs e RANKL/OPG;

e. A desregulação dos mediadores da destruição tecidual e de seus inibidores resulta no agravamento da doença periodontal, com aumento da reabsorção do osso alveolar.

REFERÊNCIAS

Ahmed,M. and Gaffen,S.L. (2010). IL-17 in obesity and adipogenesis. Cytokine Growth Factor Rev. *21*, 449-453.

Bartold,P.M., Marshall,R.I., and Haynes,D.R. (2005). Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. J. Periodontol. *76*, 2066-2074.

Belibasakis,G.N. and Bostanci,N. (2012). The RANKL-OPG system in clinical periodontology. J. Clin. Periodontol. *39*, 239-248.

Bernardis,L.L. and Patterson,B.D. (1968). Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. J. Endocrinol. *40*, 527-528.

Boesing,F., Patino,J.S., da,S., V, and Moreira,E.A. (2009). The interface between obesity and periodontitis with emphasis on oxidative stress and inflammatory response. Obes. Rev. *10*, 290-297.

Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. *72*, 248-254.

Bustin,S.A., Benes,V., Garson,J.A., Hellemans,J., Huggett,J., Kubista,M., Mueller,R., Nolan,T., Pfaffl,M.W., Shipley,G.L., Vandesompele,J., and Wittwer,C.T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. *55*, 611-622.

Chalkley,S.M., Hettiarachchi,M., Chisholm,D.J., and Kraegen,E.W. (2002). Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab *282*, E1231-E1238.

Cochran,D.L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. J. Periodontol. *79*, 1569-1576.

Colic,M., Gazivoda,D., Vucevic,D., Vasilijic,S., Rudolf,R., and Lukic,A. (2009). Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. Mol. Immunol. *47*, 101-113.

Dalla Vecchia,C.F., Susin,C., Rosing,C.K., Oppermann,R.V., and Albandar,J.M. (2005). Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. J. Periodontol. *76*, 1721-1728.

de Jager,W., te Velthuis,H., Prakken,B.J., Kuis,W., and Rijkers,G.T. (2003). Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. Clin. Diagn. Lab Immunol. *10*, 133-139.

Delaisse,J.M., Andersen,T.L., Engsig,M.T., Henriksen,K., Troen,T., and Blavier,L. (2003). Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclastic activities. Microsc. Res. Tech. *61*, 504-513.

Derveaux,S., Vandesompele,J., and Hellemans,J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. Methods *50*, 227-230.

Duarte,P.M., Tezolin,K.R., Figueiredo,L.C., Feres,M., and Bastos,M.F. (2010). Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. Arch. Oral Biol. *55*, 142-147.

Elshal,M.F. and McCoy,J.P. (2006). Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. Methods *38*, 317-323.

Engsig,M.T., Chen,Q.J., Vu,T.H., Pedersen,A.C., Therkidsen,B., Lund,L.R., Henriksen,K., Lenhard,T., Foged,N.T., Werb,Z., and Delaisse,J.M. (2000). Matrix metalloproteinase 9 and vascular endothelial growth factor are essential for osteoclast recruitment into developing long bones. J. Cell Biol. *151*, 879-889.

Everts,V., Delaisse,J.M., Korper,W., Jansen,D.C., Tigchelaar-Gutter,W., Saftig,P., and Beertsen,W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. J. Bone Miner. Res. *17*, 77-90.

Feng,Z. and Weinberg,A. (2006). Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. Periodontol. 2000. *40*, 50-76.

Gaffen,S.L. and Hajishengallis,G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. J. Dent. Res. *87*, 817-828.

Garlet,G.P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. J. Dent. Res. *89*, 1349-1363.

Garlet,G.P., Cardoso,C.R., Silva,T.A., Ferreira,B.R., vila-Campos,M.J., Cunha,F.Q., and Silva,J.S. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. Oral Microbiol. Immunol. *21*, 12-20.

Garlet,G.P., Giozza,S.P., Silveira,E.M., Claudino,M., Santos,S.B., vila-Campos,M.J., Martins,W., Jr., Cardoso,C.R., Trombone,A.P., Campanelli,A.P., Carvalho,E.M., and Silva,J.S. (2010). Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. Clin. Infect. Dis. *50*, e11-e18.

Garlet,G.P., Martins,W., Jr., Fonseca,B.A., Ferreira,B.R., and Silva,J.S. (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. J. Clin. Periodontol. *31*, 671-679.

Garlet,G.P., vila-Campos,M.J., Milanezi,C.M., Ferreira,B.R., and Silva,J.S. (2005). Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. Microbes. Infect. *7*, 738-747.

Gemmell,E., Yamazaki,K., and Seymour,G.J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. Periodontol. 2000. *43*, 14-40.

Genco,R.J., Grossi,S.G., Ho,A., Nishimura,F., and Murayama,Y. (2005). A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. J. Periodontol. *76*, 2075-2084.

Goncalves,L.D., Oliveira,G., Hurtado,P.A., Feitosa,A., Takiya,C.M., Granjeiro,J.M., Trackman,P.C., Otazu,I., and Feres-Filho,E.J. (2008). Expression of metalloproteinases and their tissue inhibitors in inflamed gingival biopsies. J. Periodontal Res. *43*, 570-577.

Gottschalk,P.G. and Dunn,J.R. (2005). The five-parameter logistic: a characterization and comparison with the four-parameter logistic. Anal. Biochem. *343*, 54-65.

Graves,D.T., Oates,T., and Garlet,G.P. (2011). Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. J. Oral Microbiol. *3*.

Hannas,A.R., Pereira,J.C., Granjeiro,J.M., and Tjaderhane,L. (2007). The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontol. Scand. *65*, 1-13.

Hernandez,M., Martinez,B., Tejerina,J.M., Valenzuela,M.A., and Gamonal,J. (2007). MMP-13 and TIMP-1 determinations in progressive chronic periodontitis. J. Clin. Periodontol. *34*, 729-735.

Hernandez,M., Valenzuela,M.A., Lopez-Otin,C., Alvarez,J., Lopez,J.M., Vernal,R., and Gamonal,J. (2006). Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. J. Periodontol. *77*, 1863-1870.

Hikita,A., Kadono,Y., Chikuda,H., Fukuda,A., Wakeyama,H., Yasuda,H., Nakamura,K., Oda,H., Miyazaki,T., and Tanaka,S. (2005). Identification of an alternatively spliced variant of Ca2+-promoted Ras inactivator as a possible regulator of RANKL shedding. J. Biol. Chem. *280*, 41700-41706.

Johnson,I.H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. J. Periodontal Res. *10*, 332-345.

Kadoglou,N.P., Daskalopoulou,S.S., Perrea,D., and Liapis,C.D. (2005). Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. Angiology *56*, 173-189.

Karalis,K.P., Giannogonas,P., Kodela,E., Koutmani,Y., Zoumakis,M., and Teli,T. (2009). Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. FEBS J. *276*, 5747-5754.

Kubota,T., Itagaki,M., Hoshino,C., Nagata,M., Morozumi,T., Kobayashi,T., Takagi,R., and Yoshie,H. (2008). Altered gene expression levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in periodontitis-affected gingival tissue. J. Periodontol. *79*, 166-173.

Lalli,C.A., Pauli,J.R., Prada,P.O., Cintra,D.E., Ropelle,E.R., Velloso,L.A., and Saad,M.J. (2008). Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. Metabolism *57*, 57-65.

Leng,S.X., McElhaney,J.E., Walston,J.D., Xie,D., Fedarko,N.S., and Kuchel,G.A. (2008). ELISA and multiplex technologies for cytokine measurement in inflammation and aging research. J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci. *63*, 879-884.

Mandal,M., Mandal,A., Das,S., Chakraborti,T., and Sajal,C. (2003). Clinical implications of matrix metalloproteinases. Mol. Cell Biochem. *252*, 305-329.

Masek,T., Vopalensky,V., Suchomelova,P., and Pospisek,M. (2005). Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. Anal. Biochem. *336*, 46-50.

Medeiros,C., Frederico,M.J., da,L.G., Pauli,J.R., Silva,A.S., Pinho,R.A., Velloso,L.A., Ropelle,E.R., and De Souza,C.T. (2011). Exercise training reduces insulin resistance and upregulates the mTOR/p70S6k pathway in cardiac muscle of diet-induced obesity rats. J. Cell Physiol *226*, 666-674.

Meng,N., Li,Y., Zhang,H., and Sun,X.F. (2008). RECK, a novel matrix metalloproteinase regulator. Histol. Histopathol. *23*, 1003-1010.

Monteiro,R. and Azevedo,I. (2010). Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. Mediators. Inflamm. *2010*.

Nagasawa,T., Kiji,M., Yashiro,R., Hormdee,D., Lu,H., Kunze,M., Suda,T., Koshy,G., Kobayashi,H., Oda,S., Nitta,H., and Ishikawa,I. (2007). Roles of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease. Periodontol. 2000. *43*, 65-84.

Nagase,H., Visse,R., and Murphy,G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc. Res. *69*, 562-573.

Nakamura,H., Sato,G., Hirata,A., and Yamamoto,T. (2004). Immunolocalization of matrix metalloproteinase-13 on bone surface under osteoclasts in rat tibia. Bone *34*, 48-56.

Nakashima,T., Kobayashi,Y., Yamasaki,S., Kawakami,A., Eguchi,K., Sasaki,H., and Sakai,H. (2000). Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun. *275*, 768-775.

Nanci,A. and Bosshardt,D.D. (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol. 2000. *40*, 11-28.

Nardelli,T.R., Ribeiro,R.A., Balbo,S.L., Vanzela,E.C., Carneiro,E.M., Boschero,A.C., and Bonfleur,M.L. (2010). Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. Amino. Acids.

Nassar,H., Kantarci,A., and van Dyke,T.E. (2007). Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. Periodontol. 2000. *43*, 233-244.

Nishida,N., Tanaka,M., Hayashi,N., Nagata,H., Takeshita,T., Nakayama,K., Morimoto,K., and Shizukuishi,S. (2005). Determination of smoking and obesity as periodontitis risks using the classification and regression tree method. J. Periodontol. *76*, 923-928.

Ouchi,N., Parker,J.L., Lugus,J.J., and Walsh,K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. Nat. Rev. Immunol. *11*, 85-97.

Pasternak,B. and Aspenberg,P. (2009). Metalloproteinases and their inhibitors-diagnostic and therapeutic opportunities in orthopedics. Acta Orthop. *80*, 693-703.

Pfaffl,M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. *29*, e45.

Pfaffl,M.W., Tichopad,A., Prgomet,C., and Neuvians,T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. *26*, 509-515.

Pischon,N., Heng,N., Bernimoulin,J.P., Kleber,B.M., Willich,S.N., and Pischon,T. (2007). Obesity, inflammation, and periodontal disease. J. Dent. Res. *86*, 400-409.

Preshaw,P.M. and Taylor,J.J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? J. Clin. Periodontol. *38 Suppl 11*, 60-84.

Ritchie,C.S. (2007). Obesity and periodontal disease. Periodontol. 2000. *44*, 154-163.

Saito,T. and Shimazaki,Y. (2007). Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. Periodontol. 2000. *43*, 254-266.

Saito,T., Yamaguchi,N., Shimazaki,Y., Hayashida,H., Yonemoto,K., Doi,Y., Kiyohara,Y., Iida,M., and Yamashita,Y. (2008). Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. J. Dent. Res. *87*, 319-322.

Scott,A.M., Atwater,I., and Rojas,E. (1981). A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. Diabetologia *21*, 470-475.

Sigusch,B., Eick,S., Pfister,W., Klinger,G., and Glockmann,E. (2001). Altered chemotactic behavior of crevicular PMNs in different forms of periodontitis. J. Clin. Periodontol. *28*, 162-167.

Simmons,R.A., Templeton,L.J., and Gertz,S.J. (2001). Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. Diabetes *50*, 2279-2286.

Socransky,S.S. (1977). Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. J. Periodontol. *48*, 497-504.

Sternlicht,M.D. and Werb,Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *17*, 463-516.

Sumarac-Dumanovic,M., Stevanovic,D., Ljubic,A., Jorga,J., Simic,M., Stamenkovic-Pejkovic,D., Starcevic,V., Trajkovic,V., and Micic,D. (2009). Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. Int. J. Obes. (Lond) *33*, 151-156.

Suvan,J., D'Aiuto,F., Moles,D.R., Petrie,A., and Donos,N. (2011). Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. Obes. Rev. *12*, e381-e404.

Taubman,M.A., Valverde,P., Han,X., and Kawai,T. (2005). Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J. Periodontol. *76*, 2033-2041.

Taylor,S., Wakem,M., Dijkman,G., Alsarraj,M., and Nguyen,M. (2010). A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines. Methods *50*, S1-S5.

Uh,H.W., Hartgers,F.C., Yazdanbakhsh,M., and Houwing-Duistermaat,J.J. (2008). Evaluation of regression methods when immunological measurements are constrained by detection limits. BMC. Immunol. *9*, 59.

Vandesompele,J., De,P.K., Pattyn,F., Poppe,B., Van,R.N., De,P.A., and Speleman,F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol. *3*, RESEARCH0034.

Verma,R.K., Rajapakse,S., Meka,A., Hamrick,C., Pola,S., Bhattacharyya,I., Nair,M., Wallet,S.M., Aukhil,I., and Kesavalu,L. (2010). Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola Mixed Microbial Infection in a Rat Model of Periodontal Disease. Interdiscip. Perspect. Infect. Dis. *2010*, 605125.

Visse,R. and Nagase,H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ. Res. *92*, 827-839.

Weyer,C., Funahashi,T., Tanaka,S., Hotta,K., Matsuzawa,Y., Pratley,R.E., and Tataranni,P.A. (2001). Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J. Clin. Endocrinol. Metab *86*, 1930-1935.

Winer,S., Paltser,G., Chan,Y., Tsui,H., Engleman,E., Winer,D., and Dosch,H.M. (2009). Obesity predisposes to Th17 bias. Eur. J. Immunol. *39*, 2629-2635.

Wu,J., Rush,T.S., III, Hotchandani,R., Du,X., Geck,M., Collins,E., Xu,Z.B., Skotnicki,J., Levin,J.I., and Lovering,F.E. (2005). Identification of potent and selective MMP-13 inhibitors. Bioorg. Med. Chem. Lett. *15*, 4105-4109.

Zhou,J. and Windsor,L.J. (2006). Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. J. Periodontal Res. *41*, 47-54.

Zuniga,L.A., Shen,W.J., Joyce-Shaikh,B., Pyatnova,E.A., Richards,A.G., Thom,C., Andrade,S.M., Cua,D.J., Kraemer,F.B., and Butcher,E.C. (2010). IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. J. Immunol. *185*, 6947-6959.

ANEXO A: Ensaios de qPCR

1. Análise do RNA total purificado

Todas as amostras apresentaram uma concentração de RNA total satisfatória (**Tabelas 3 e 4**), exceto uma amostra controle do quinto dia de ligadura do grupo DHL (DHL5-1) que não atingiu a concentração mínima para realização da reação de transcrição reversa, desse modo, ela foi eliminada das futuras análises. A razão 260/280 ηm de todas as amostras se encontrou entre 1,97 e 2,06 (**Tabelas 3 e 4**), indicando um alto grau de pureza das amostras em relação à contaminação por DNA e proteínas. E a razão 260/230 ηm foi maior que 1,8 para todas as amostras, exceto a amostra DHL5-2, mostrando que também que não houve contaminação por solventes orgânicos.

A eletroforese em gel denaturante de agarose confirmou o alto grau de integridade do RNA de todas as amostras pelas bandas bem delimitadas de RNA ribossômico (RNAr) 28S e 18S (**Figura 23**). Assim, é possível afirmar que o RNA purificado apresentou uma ótima qualidade, estando puro e íntegro, o que permitiu sua adequada utilização para a análise da expressão gênica.

Tabela 3. Análise por espectrofotometria das amostras de RNA do grupo normal. A concentração das amostras é dada em ηg/µl e a pureza é analisada pelas razões das absorbâncias 260/280 ηm e 260/230 ηm.

Grupo normal									
Sem ligadura (controle)					Com ligadura				
Subgrupo	Amostras	ηg/µl	260/280	260/230	Subgrupo	Amostras	ηg/µl	260/280	260/230
5 dias	N5-1	191,1	2,03	1,82	5 dias	N5L-1	760	2,02	2,24
	N5-2	257,1	2,04	2,09		N5L-2	986,4	2,02	2,23
	N5-3	221,1	2,02	1,87		N5L-3	865,8	2,02	2,24
	N5-4	285,7	2,04	2,14		N5L-4	736,9	2,02	2,26
	N5-5	238,6	2,03	2,11		N5L-5	777	2,01	2,24
15 dias	N15-1	264,8	2,04	2,11	15 dias	N15L-1	790,5	2,02	2,22
	N15-2	324,5	2,04	2,15		N15L-2	678,4	1,98	2,22
	N15-3	204,7	2,03	1,89		N15L-3	727,6	2,01	2,19
	N15-4	265,1	2,04	2,04		N15L-4	641,5	1,99	2,14
	N15-5	335,9	2,04	2,13		N15L-5	581,9	1,98	2,21
30 dias	N30-1	278,1	2,04	2,08	30 dias	N30L-1	575,5	1,99	2,24
	N30-2	289,3	2,05	2,07		N30L-2	472	1,98	2,19
	N30-3	279,5	2,04	2,13		N30L-3	502,3	1,98	2,13
	N30-4	239,2	2,04	2,03		N30L-4	550,4	1,98	2,2
	N30-5	242,2	2,04	2,08		N30L-5	483	2,02	2,09

Tabela 4. Análise por espectrofotometria das amostras de RNA do grupo DHL. A concentração das amostras é dada em ηg/µl e a pureza é analisada pelas razões das absorbâncias 260/280 ηm e 260/230 ηm.

Grupo DHL									
Sem ligadura (controle)					Com ligadura				
Subgrupo	Amostras	ηg/µl	260/280	260/230	Subgrupo	Amostras	ηg/µl	260/280	260/230
5 dias	DHL5-1*	107,4	2,04	1,9	5 dias	DHL5L-1	844,9	2,03	2,22
	DHL5-2	293	2,03	1,65		DHL5L-2	849,5	2,03	2,25
	DHL5-3	262,7	2,04	1,98		DHL5L-3	881	2,05	2,22
	DHL5-4	193,6	2,01	2,15		DHL5L-4	800,5	1,99	2,1
	DHL5-5	187,8	2,03	2,14		DHL5L-5	941	2,04	2,11
15 dias	DHL15-1	196,3	2,01	2,03	15 dias	DHL15L-1	478	2	2,1
	DHL15-2	273,8	2,03	2,11		DHL15L-2	628,9	2	2,17
	DHL15-3	270,4	2	1,97		DHL15L-3	366,6	2,01	2
	DHL15-4	320,1	2,01	2,19		DHL15L-4	173,3	2,01	1,99
	DHL15-5	197,7	2,02	2,09		DHL15L-5	716,8	2,01	2,09
30 dias	DHL30-1	264,5	2,03	2,15	30 dias	DHL30L-1	306,3	2,04	2,2
	DHL30-2	177	2,02	2,23		DHL30L-2	405,9	2,02	2,14
	DHL30-3	538,9	1,98	2,17		DHL30L-3	423,7	2,01	2,14
	DHL30-4	220,7	2,03	2,18		DHL30L-4	572,4	2	2,15
	DHL30-5	246,5	2,04	1,95		DHL30L-5	591,2	1,98	2,05

*: A amostra DHL5-1 apresentou uma concentração muito baixa, e foi retirada da amostragem.

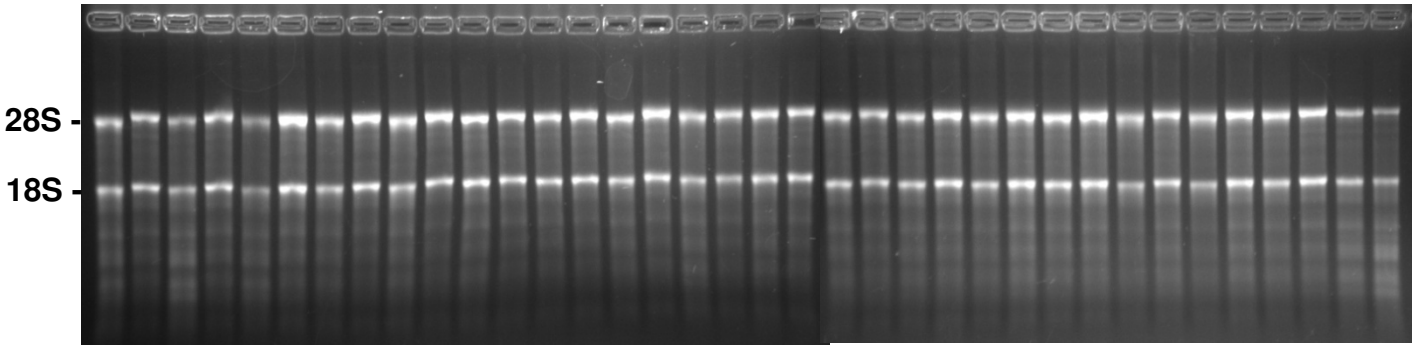

Figura 23. Análise por eletroforese das amostras de RNA em gel denaturante de agarose 1,5% com 1 µg de RNA por "*lane*". A integridade das amostras foi comprovada pela presença de duas bandas bem delimitadas, que correspondem ao RNAr 28S e 18S.

2. Validação dos ensaios de qPCR

A validação incluiu a otimização da temperatura de anelamento e da concentração de primers, seguida da construção de uma curva padrão relativa para cada ensaio. Para as reações de validação foi utilizada uma mistura entre alíquotas adicionais das amostras dos grupos normal e DHL com e sem ligadura.

A fim de confirmar que a temperatura ótima de anelamento para os ensaios era de 60°C, como calculado *in silico* para todos os pares de primer desenhados, 3 pares de primers foram testados em 6 temperaturas diferentes: 55, 60, 62, 64, 66 e 68°C. Para todos os ensaios testados, as reações com temperatura de anelamento de 60 a 64°C apresentaram o menor C_q (**Figura 24**) e apresentaram amplificação específica de seu alvo sem amplificação de dímeros de primers, como evidenciado pelo pico único nas curvas de *melting* (**Figura suplementar 9**). Assim 60 a 64°C se confirmou como a faixa ótima de temperatura anelamento para realização das reações de qPCR com esses ensaios, concordando com a temperatura calculada *in silico*. Dessa forma, 60°C foi assumida como temperatura ótima de anelamento e utilizada em todas as reações subsequentes.

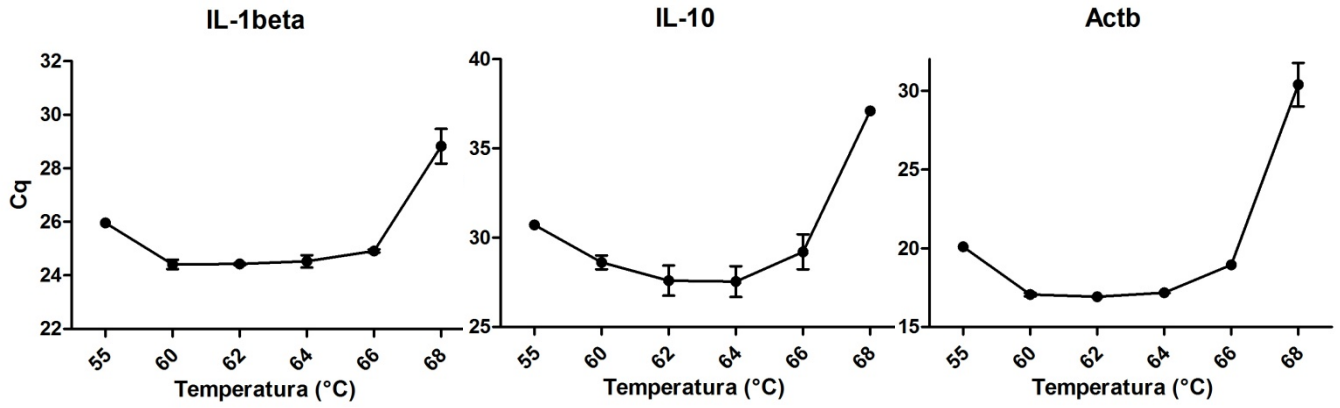

Figura 24. Otimização da temperatura de anelamento dos ensaios de qPCR *Il1b*, *Il10* e *Actb*. Os resultados são apresentados em média das replicatas ± desvio padrão. Os gráficos exibem escalas diferentes.

A concentração de primers para cada ensaio foi extensivamente padronizada. Foi observado que altas concentrações de primers, como 200 e 300 ηM na reação de qPCR, resultam na amplificação inespecífica de dímeros de primers, tanto na reação com cDNA, quanto na reação sem cDNA (controle negativo). Assim, foram testadas concentrações de primers entre 25 e 100 ηM, a fim de determinar a concentração de primers ideal, que não formasse amplificação inespecífica e resultasse em um menor Cq. Para cada em ensaio foi determinada a concentração ideal de primers (**Tabela 5**). No entanto, durante a padronização, observamos que alguns primers não amplificaram satisfatoriamente o RNAm alvo, resultando em um Cq próximo de 40 ou até maior que 40. Isso poderia ser reflexo de duas situações: não há expressão gênica suficiente nas amostras utilizadas para ser detectada pelo ensaio

ou os pares de primers não estavam amplificando eficientemente seus alvos. Dessa forma, esses primers foram descartados (**Tabela suplementar 27**) e foram desenhados e testados outros pares de primers para esses ensaios, mas escolhendo outras regiões do alvo para aumenta a chance de sua amplificação. Dos ensaios redesenhados, três não obtiveram sucesso de amplificação: *Ifng*, *Il4* e *Mmp1a*. É muito provável que esses genes sejam tão pouco expressos nas amostras testadas, que não seja possível detectá-los por qPCR. Dessa maneira, as análises prosseguiram sem esses 3 ensaios.

A partir da curva padrão relativa foi possível determinar a eficiência, o intervalo dinâmico linear, o limite de detecção e a precisão de cada ensaio. A curva padrão relativa foi construída de sete a oito diluições diferentes, iniciando com uma alta concentração final de cDNA de 5 ηg/µl e realizando diluições na base 2, 3 ou 4, dependendo de quão abundante fosse o alvo do ensaio. Dessa forma, cada ensaio apresentou um intervalo dinâmico linear diferente (**Tabela 5**). A partir da curva padrão (**Figuras 25 - 27**), cada ensaio teve sua eficiência calculada (**Tabela 5**). A amplificação específica de cada ensaio foi confirmada pelo pico único da curva de *melting* correspondente à Tm do *amplicon* calculada *in silico* (**Figuras suplementares 10 - 12**), e as sequências de seus primers são listadas na tabela 6.

Em geral, as curvas padrões apresentaram coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,99, se mostrando bastante confiáveis. A eficiência das curvas padrões se encontrou, em média, entre 90% e 100%, estando, portanto, dentro dos limites aceitáveis. Dessa forma, os 22 ensaios testados foram satisfatoriamente validados e puderam, então, ser utilizados na análise de expressão gênica por qPCR.

Tabela 5. Descrição dos parâmetros de todos os ensaios analisados. A eficiência da reação de qPCR, o coeficiente de determinação (R^2) e o intervalo dinâmico linear resultam da curva padrão relativa de cada ensaio. A concentração padronizada de primers para cada ensaio é apresentada.

Ensaio	Eficiência	R^2	Intervalo dinâmico linear (Cq)	Concentração de primers (ηM)
Il1b	93.5%	0.993	22.6 - 30.2	50
Il6	99.3%	0.997	23.5 - 29.4	100
Il17	96.2%	0.996	27.3 - 33.5	100
Il23	98.4%	0.991	25.7 - 33.0	50
Tnf	100.4%	0.985	25.4 - 34.6	100
Il10	91.1%	0.984	26.8 - 34.4	50
Tgfb	101.3%	0.998	21.6 - 28.7	50
Mmp2	94.1%	0.998	18.9 - 30.5	50
Mmp8	105.8%	0.990	27.5 - 31.5	100
Mmp9	97.6%	1.000	19.4 - 29.5	50
Mmp13	101.8%	0.998	19.3 - 31.2	100
Mmp14	92.8%	0.999	16.7 - 28.5	100
Timp1	98.3%	0.996	19.6 - 31.1	50
Timp2	92.8%	0.999	17.4 - 29.1	100
Reck	92.4%	0.993	23.4 - 31.9	100
Rankl	93.7%	0.986	24.5 - 30.9	100
Opg	95.5%	0.999	25.4 - 33.6	100
Gapdh	100.2%	1.000	14.8 - 22.8	100
Actb	90.1%	0.999	14.9 - 23.5	50
Hprt1	92.9%	0.999	19.0 - 27.5	100
Ubc	100.0%	1.000	13.9 - 27.5	100
Ppia	95.2%	0.999	15.8 - 27.3	100

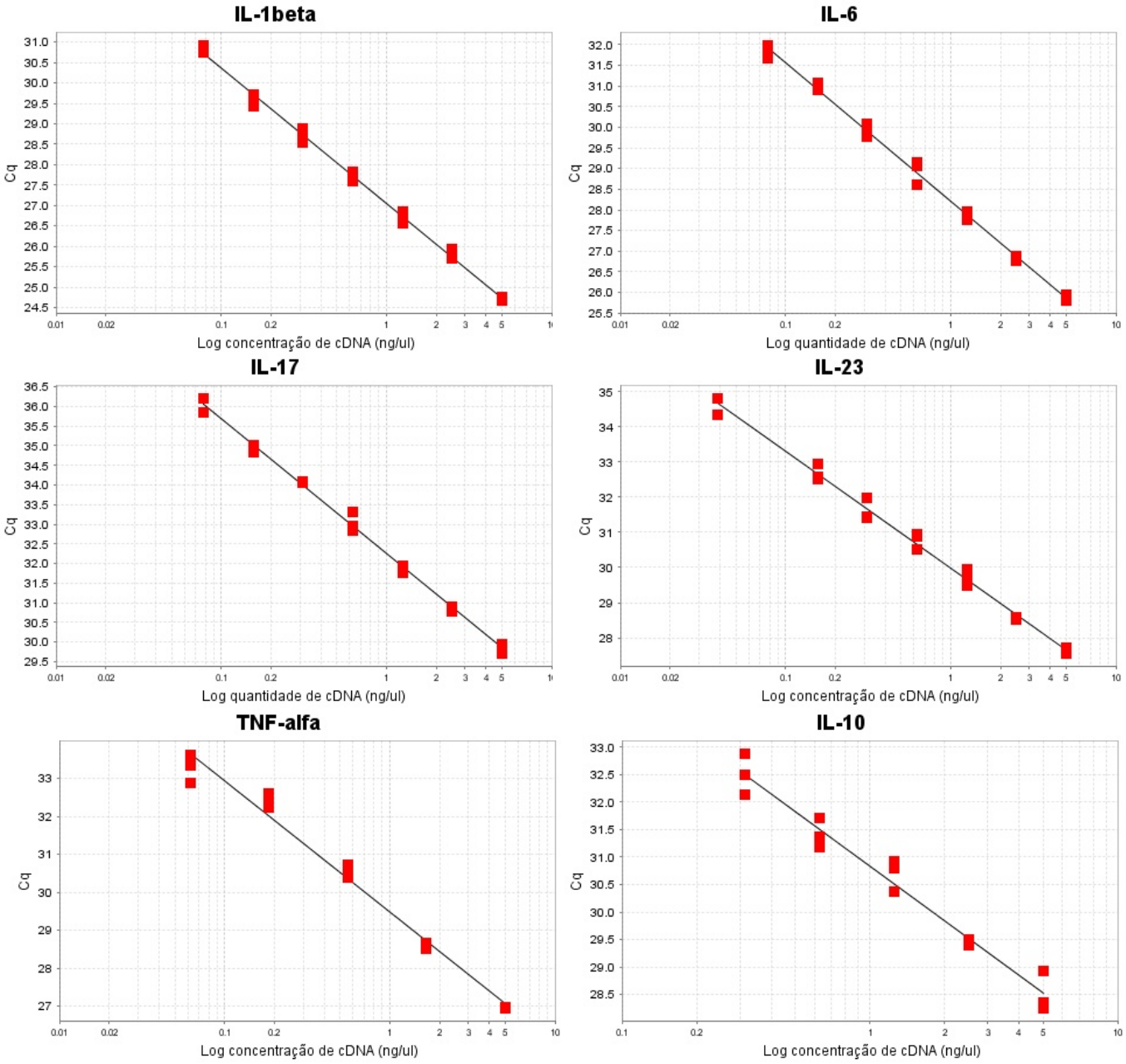

Figura 25. Curvas padrões dos ensaios de qPCR *Il1b, Il6*, *Il17*, *Il23*, *Tnf* e *Il10*. As curvas foram obtidas a partir de diferentes diluições de uma amostra padrão, constituída de um *pool* de amostras com ligadura e amostras controle. Quadrados vermelhos representam as replicatas das diluições da amostra padrão. Os gráficos exibem escalas diferentes.

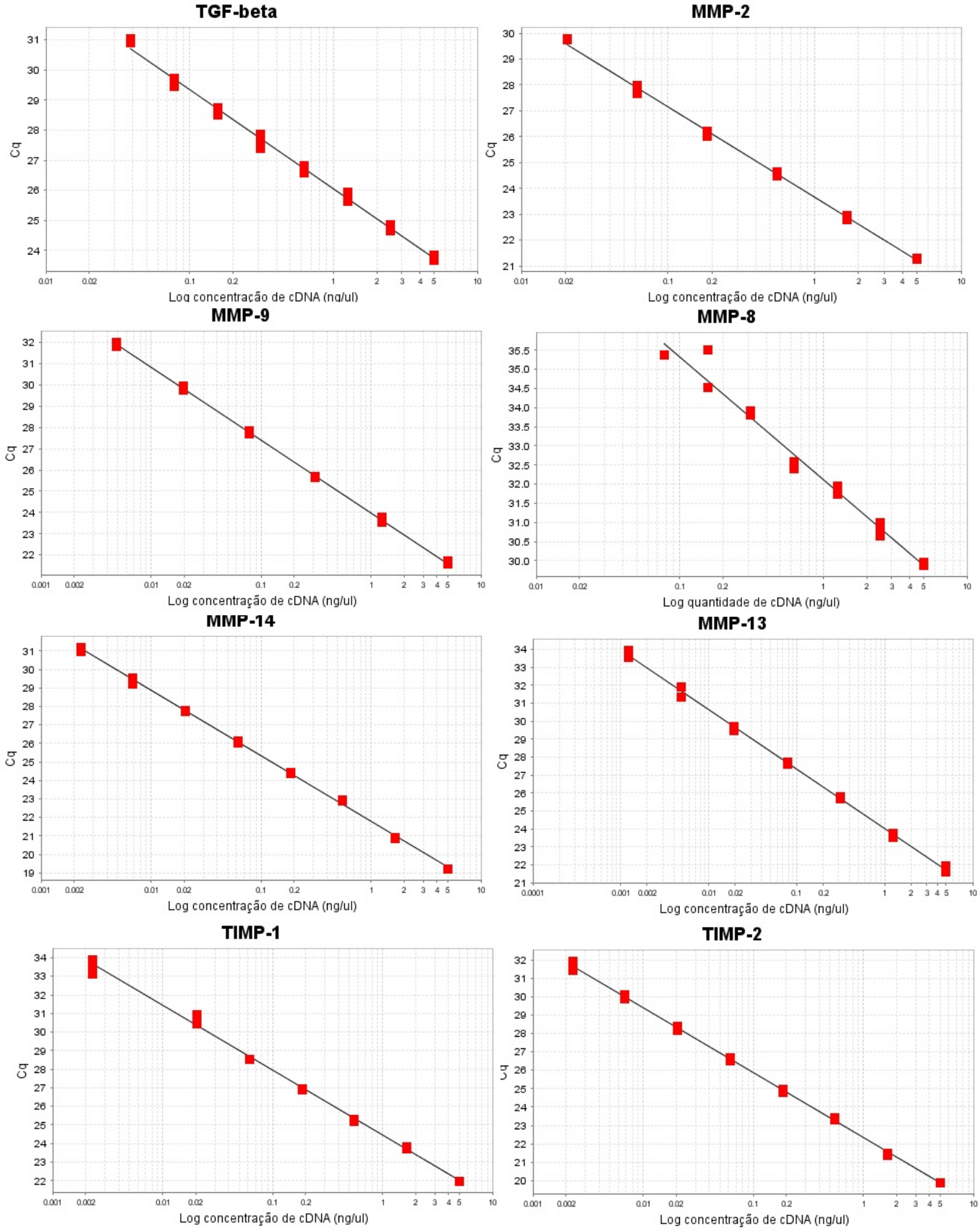

Figura 26. Curvas padrões dos ensaios de qPCR *Tgfb*, *Mmp2*, *Mmp8*, *Mmp9*, *Mmp13*, *Mmp14*, *Timp1* e *Timp2*. As curvas foram obtidas a partir de diferentes diluições de uma amostra padrão, constituída de um *pool* de amostras com ligadura e amostras controle Quadrados vermelhos representam as replicatas das diluições da amostra padrão. Os gráficos exibem escalas diferentes.

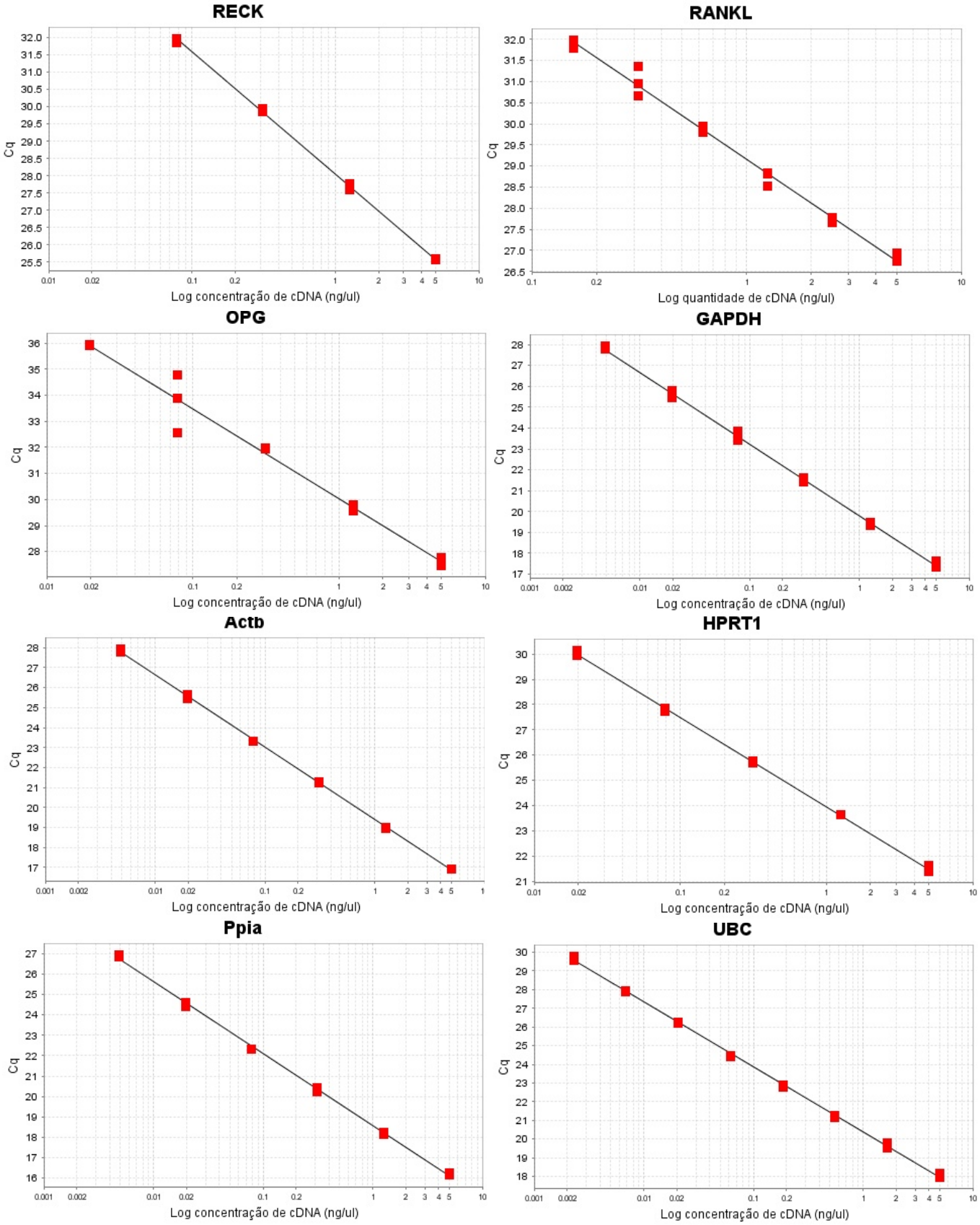

Figura 27. Curvas padrões dos ensaios de qPCR *Reck*, *Rankl*, *Opg*, *Gapdh*, *Actb*, *Hprt1*, *Ppia* e *Ubc*. As curvas foram obtidas a partir de diferentes diluições de uma amostra padrão, constituída de um *pool* de amostras com ligadura e amostras controle. Quadrados vermelhos representam as replicatas das diluições da amostra padrão. Os gráficos exibem escalas diferentes.

Tabela 6. Pares de primers de qPCR para análise da expressão gênica.

Nome do Gene	Número de acesso (NCBI)	*Primer forward*	*Primer reverse*
Genes alvos			
Mmp2	NM_031054.2	ACCCTGTCTCCTGCTCTGTAG	GCGGGAGAAAGTAGCACCTG
Mmp8	NM_022221.1	TTCAGACAATCTATGGACCTT	GTGGCAGCATCAAATCTC
Mmp9	NM_031055.1	CCCGTTTAAAGTGCATGTGTG	AAGAGTGTCCGAGGAAGATAC
Mmp13	NM_133530.1	GACAGGAGCTAAGGCAGACA	AGGGAAGGGGCTAATGAACAT
Mmp14	NM_031056.1	GTGTGTGTCCAACCCTATT	GAGGTCATAGTTCAGAGATTTAAG
Timp1	NM_053819.1	ATCACTTTGCCTGCCTGC	AAGATGGAGGAAAGGTAAACAGT
Timp2	NM_021989.2	TGATCCCATGCTACATCTC	CGCAAGAACCATCACTTC
Reck	NM_001107954.1	GCAGCCTTGGATTAGCAGAGA	AGCAAGTGGTTTAAAGCCTGAC
Rankl	NM_057149.1	ACGCCAACATTTGCTTCA	CTGACCAGTTCTTAGTGCTC
Opg	NM_012870.2	GCACGAGCCTTATCCCATTTG	AAACTACCATAACCTACCCCTGCT
Il1b	NM_031512.2	AATGCCTCGTGCTGTCTGA	TCGTTGCTTGTCTCTCCTTGT
Il6	NM_012589.1	GTCCTTCCTACCCCAACTTC	TGCCGAGTAGACCTCATAGT
Il17	NM_001106897.1	TCAAAGTTCAGTGTGTCCAAA	GGAACGGTTGAGGTAGTCT
Il23	NM_130410.2	GGGCAAGGACACCATTATTAAAGA	CTTGACTTGATTCCTCTTCTCCAT
Tnf	NM_012675.3	AGGCTGTCGCTACATCAC	TTTCTCTCAATGACCCGTAGG
Il10	NM_012854.2	CACTGCTATGTTGCCTGC	TCGGAGCATGTGGGTCTG
Tgfb	NM_021578.2	TGGAGCAACACGTAGAACT	TATTCCGTCTCCTTGGTTCA
Genes de referências			
Actb	NM_031144.2	ATGTGGATCAGCAAGCAG	GTCAAAGAAAGGGTGTAAAACG
Gapdh	NM_017008.3	AGAAACCTGCCAAGTATGATG	TGGAAGAATGGGAGTTGCT
Hprt1	NM_012583.2	AGGACCTCTCGAAGTGTTGGATAC	TTTCCACTTTCGCTGATGACACAA
Ubc	NM_017314.1	ACTCGTACCTTTCTCACCACAGT	ACTAAGACACCTCCCCATCAAACC
Ppia	NM_017101.1	CTTTGACTTGCGGGCATTT	GAACTTCAGTGAGAGCAGAGAT

3. Normalização dos ensaios de qPCR

Os cinco genes de referência, previamente selecionados por apresentarem uma teórica expressão constitutiva e estável, foram submetidos à análise de dois algoritmos diferentes para verificar a sua estabilidade através das amostras de todos os grupos estudados nesse trabalho. Segundo o algoritmo

BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), a estabilidade da expressão dos genes pode ser avaliada pelo seu desvio padrão e coeficiente de variação através de todas as amostras. Caso um gene apresente um desvio padrão maior que 1 C_q, ele não pode ser considerado um bom gene de referência. Nossos resultados mostram que os cincos genes de referência testados apresentam baixa variabilidade e podem ser considerados bons genes de referência, pois apresentam desvios padrões muito baixos (**Tabela 7**). Dessa forma, o índice de normalização, calculado pela média geométrica dos cinco genes analisados, apresentou um desvio padrão bastante baixo, de 0,28 C_q, consistente com a alta estabilidade dos genes analisados. Além disso, o *BestKeeper* realizou análises de correlação entre cada gene. Os cinco genes apresentaram correlação significante entre si ($p<0,001$) (**Tabela 8A**) . Adicionalmente, cada gene também apresentou uma forte correlação com índice de normalização ($0,817 < r < 0,943$) com alto grau de significância ($p<0,001$) (**Tabela 8B**)

Tabela 7. Análise descritiva realizada pelo algoritmo *BestKeeper* dos cinco candidatos a genes de referência e de um índice de normalização, calculado pela média geométrica dos cinco genes analisados.

	Actb	*Hprt1*	*Ppia*	*Ubc*	*Gapdh*	Índice de normalização
Numero de amostras	59	59	59	59	59	59
Média geométrica (C_q)	15.23	20.88	15.54	17.21	15.90	16.83
Média aritmética (C_q)	15.23	20.88	15.54	17.21	15.91	16.84
Valor mínimo (C_q)	14.00	20.27	14.85	16.62	14.91	16.01
Valor maximo (C_q)	16.32	21.79	16.54	18.03	16.97	17.72
Desvio padrão (C_q)	0.42	0.32	0.20	0.35	0.33	0.28
Coeficiente de variação (% C_q)	2.74	1.51	1.29	2.04	2.05	1.66

O algoritmo GeNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) calcula a medida de estabilidade do gene de referência (*M*). Genes com valores menores de *M* são considerados os mais estáveis. Genes com valor de *M* maior que 1,5 apresentam grande variabilidade, sendo genes inadequados para normalização. Os cinco genes candidatos testados apresentaram valores de *M* muito baixos (**Tabela 9**) e, portanto, são considerados bons genes de referência.

Dessa forma, os cinco genes candidatos a genes de referência foram avaliados positivamente por dois algoritmos de análise de genes de referência, mostrando que todos apresentam alta estabilidade de expressão em todos os grupos de experimentação estudados nesse trabalho. Assim, decidiu-se usar os cinco genes para normalizar os dados de expressão gênica por qPCR.

Tabela 8. Análise de correlação entre os candidatos a genes de referência. São apresentados os coeficientes de correlação de Pearson (r) e a probabilidade (p) de cada análise.

A: Análise de correlação dos genes entre si.					
vs.	*Actb*	*Hprt1*	*Ppia*	*Ubc*	*Gapdh*
Hprt1	0.655	-	-	-	-
p	< 0.001	-	-	-	-
Ppia	0.737	0.829	-	-	-
p	< 0.001	< 0.001	-	-	-
Ubc	0.614	0.747	0.668	-	-
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-	-
Gapdh	0.857	0.804	0.841	0.659	-
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	-
B: Análise de correlação dos genes com o índice de normalização.					
Índice de normalização vs.	*Actb*	*Hprt1*	*Ppia*	*Ubc*	*Gapdh*
coef. de corr. (r)	0.897	0.883	0.902	0.817	0.943
p	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

Tabela 9. Medida de estabilidade do gene de referência (*M*) calculado pelo algoritmo GeNorm para os genes candidatos a gene de referência.

	Actb	*Hprt1*	*Ppia*	*Ubc*	*Gapdh*
M	0,316	0,268	0,259	0,317	0,263

ANEXO B: Material suplementar

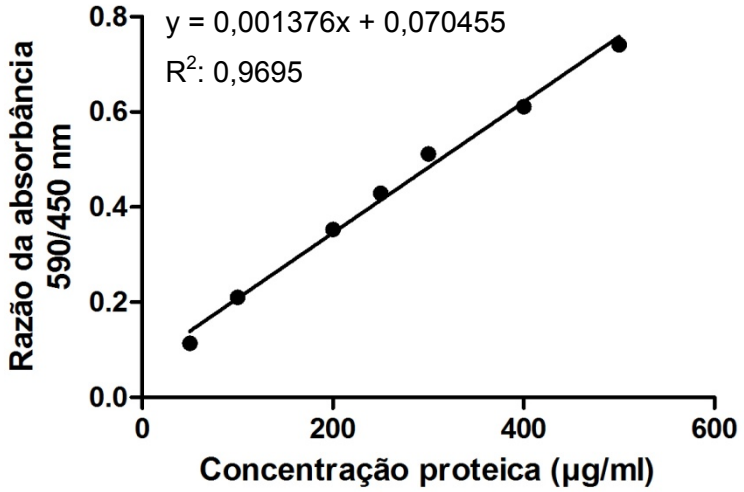

Figura Suplementar 1. Curva padrão de albumina de soro bovino gerada por regressão linear, utilizada para o cálculo da concentração proteica total das amostras proteicas.

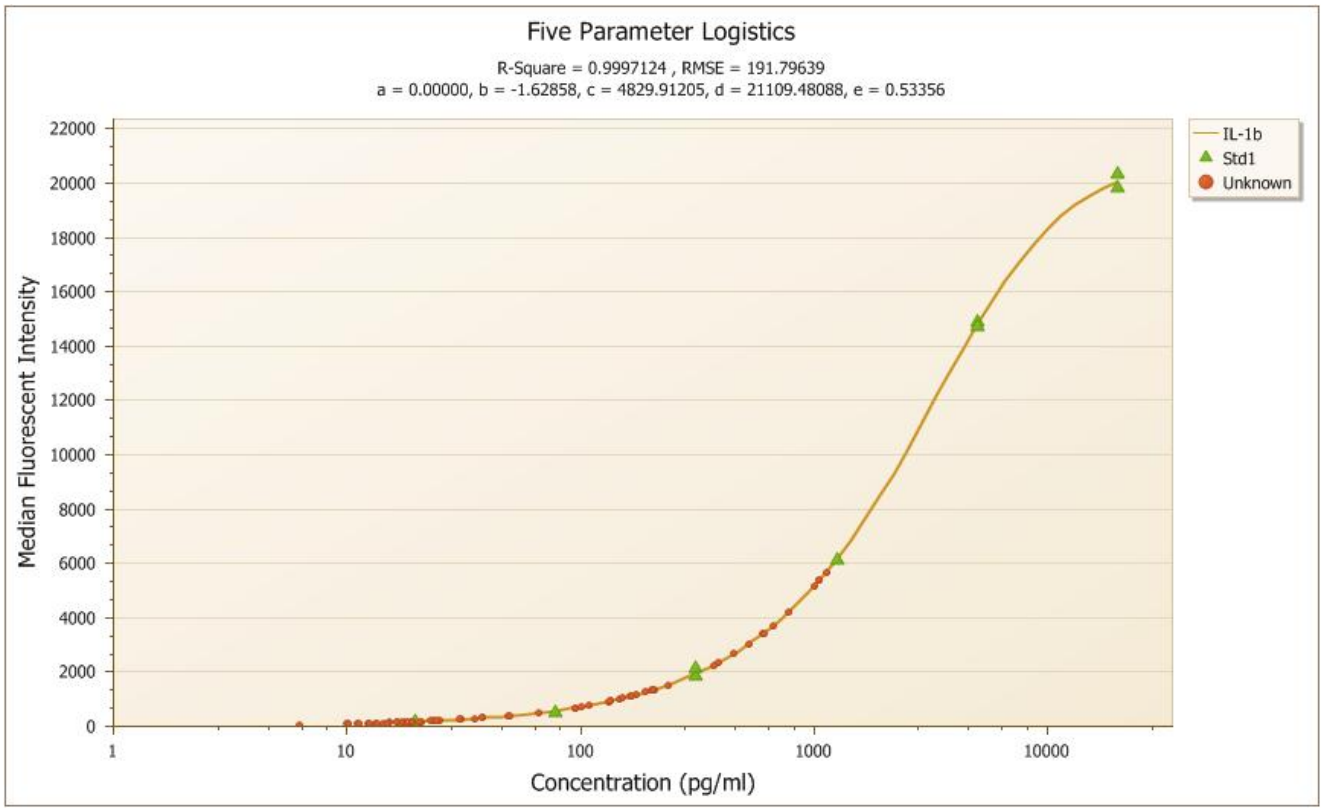

Figura Suplementar 2. Curva padrão de IL1B gerada por 5 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

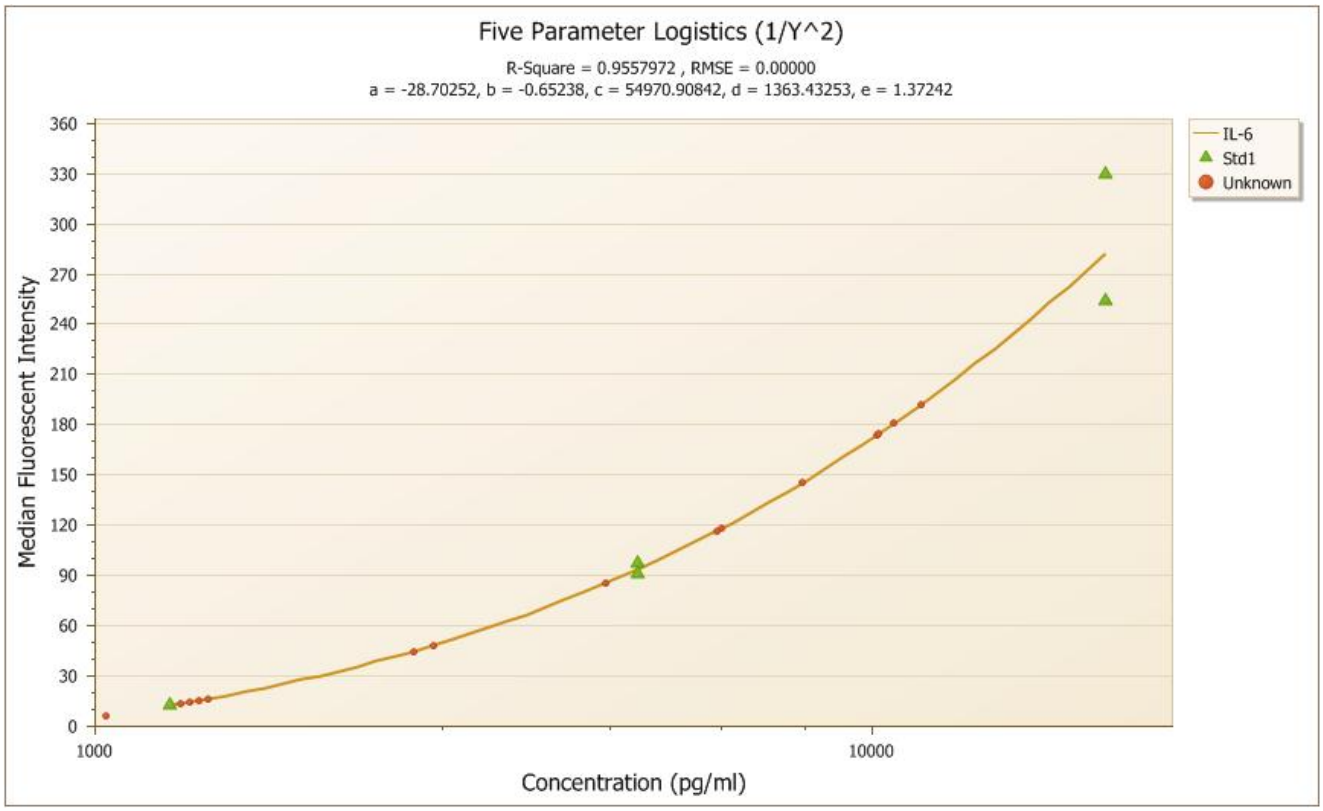

Figura Suplementar 3. Curva padrão de IL6 gerada por 5 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

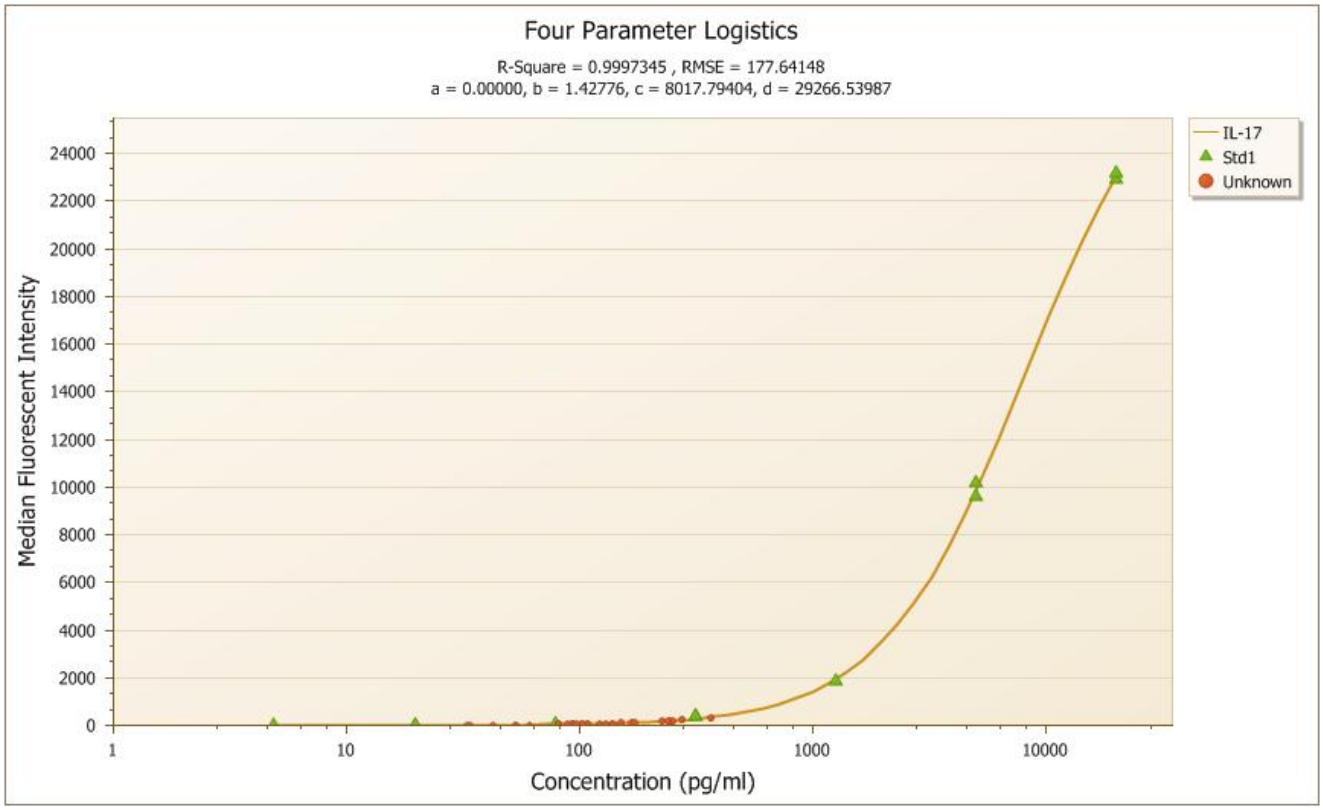

Figura Suplementar 4. Curva padrão de IL17 gerada por 4 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

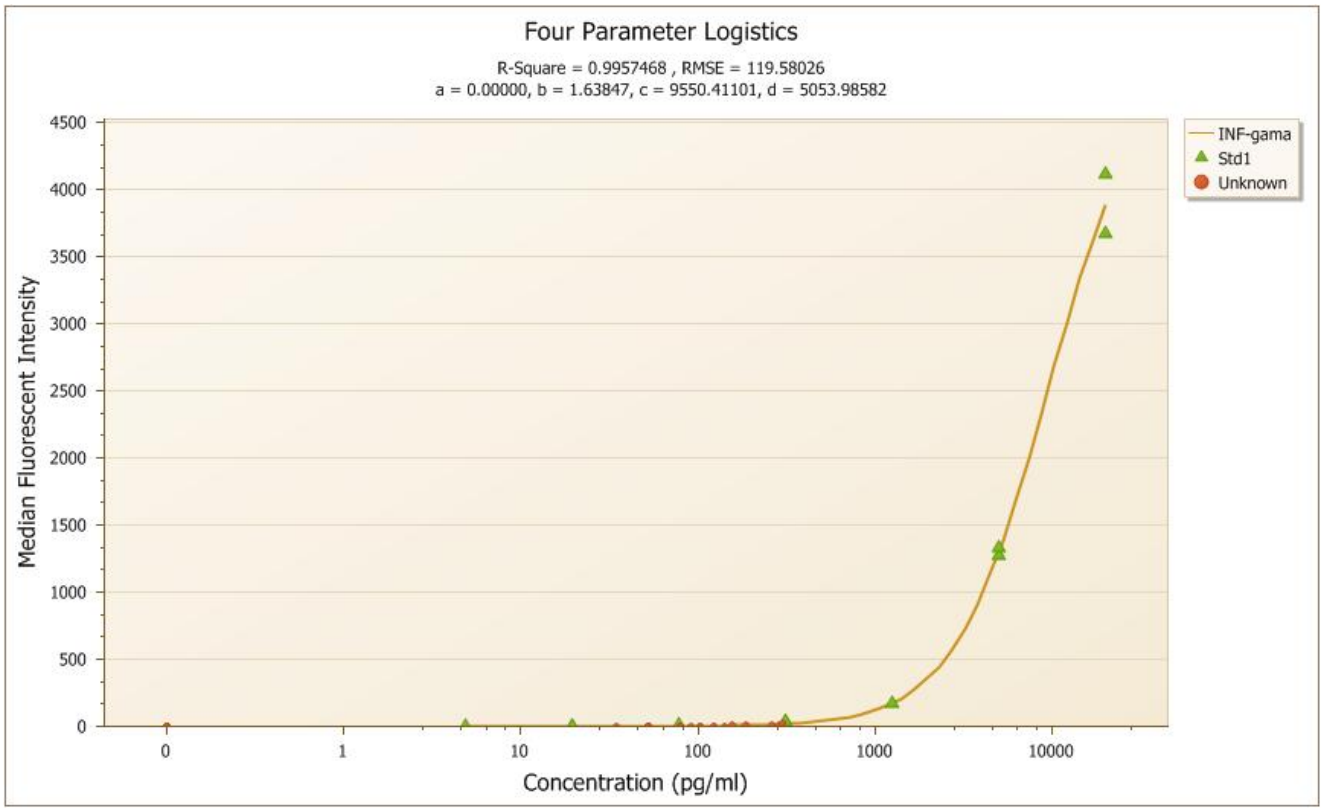

Figura Suplementar 6. Curva padrão de IFNG gerada por 4 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

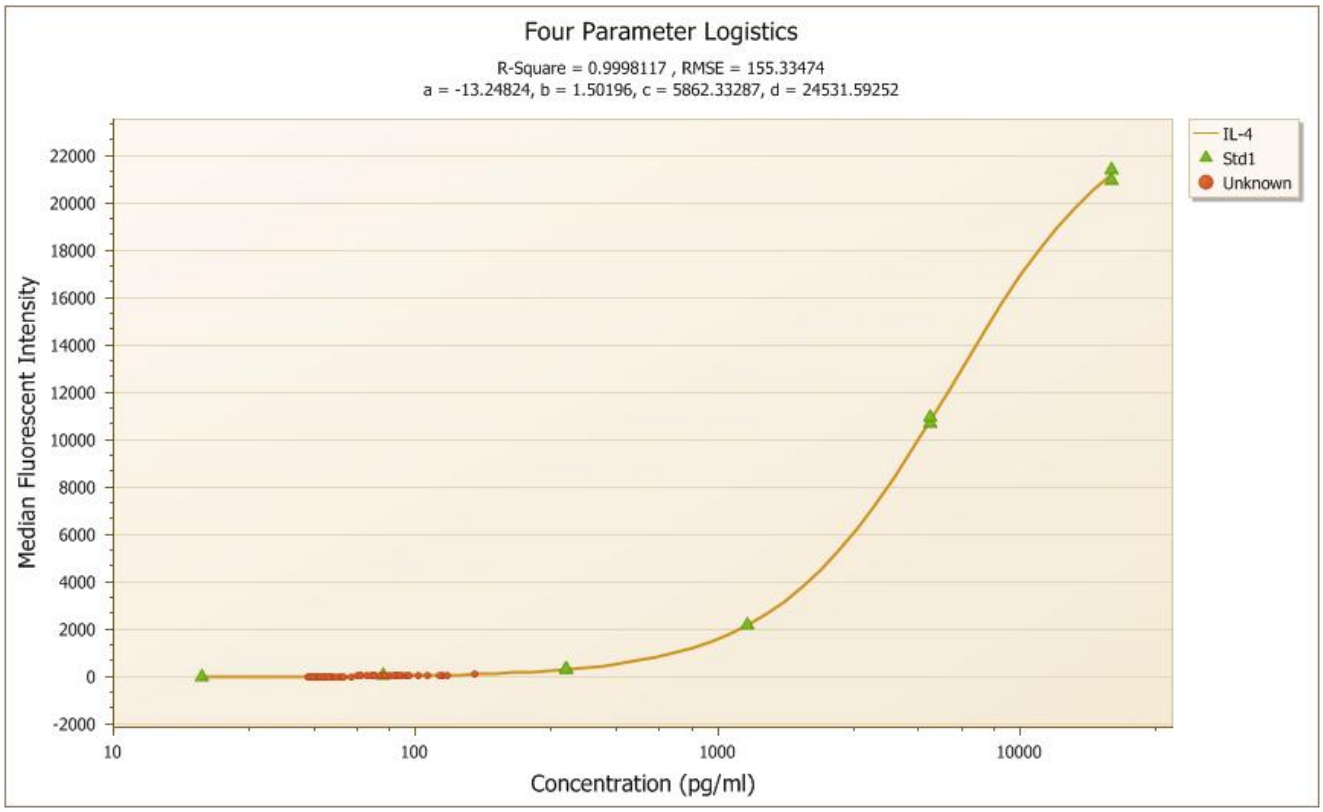

Figura Suplementar 7. Curva padrão de IL4 gerada por 4 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

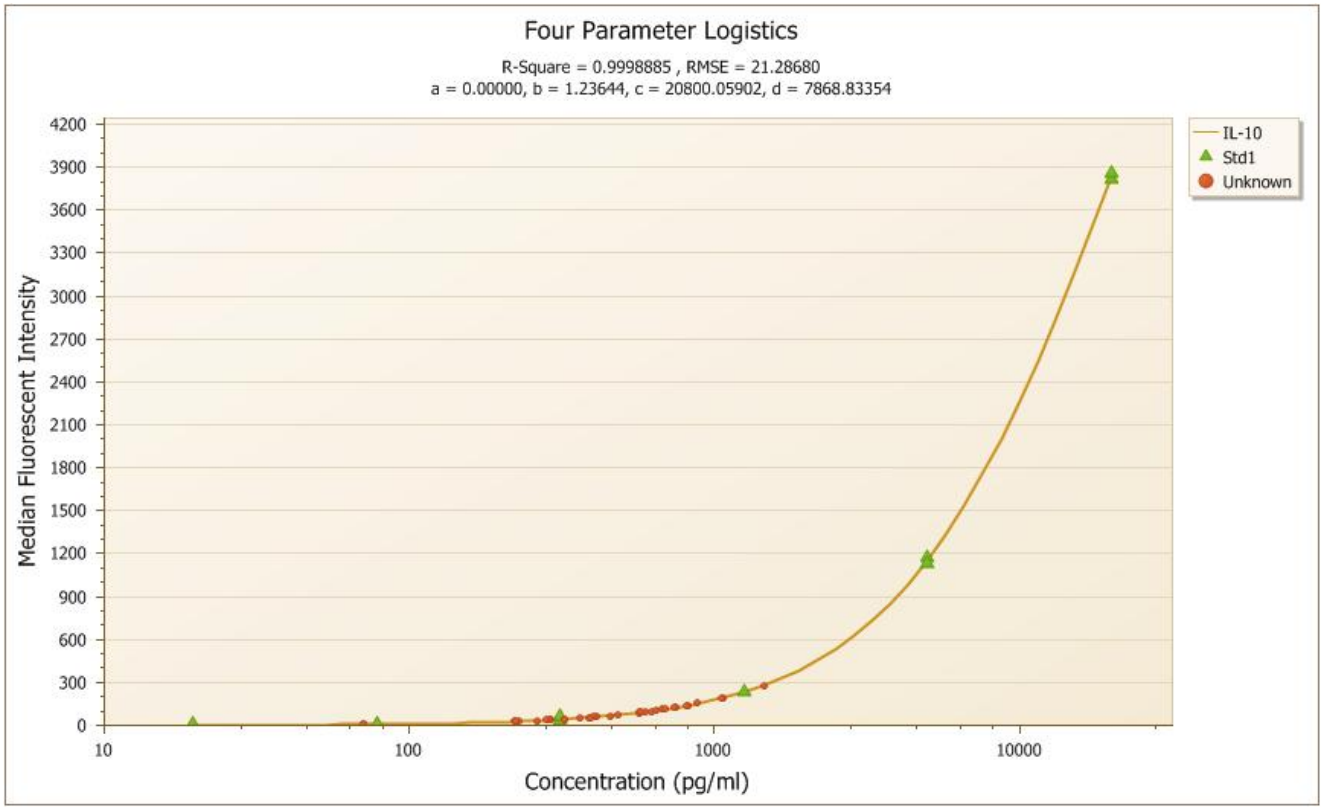

Figura Suplementar 8. Curva padrão de IL10 gerada por 4 parâmetro logística. Triângulos verdes são os pontos da curva padrão e os círculos vermelhos são as amostras com concentração desconhecidas, que tiveram sua concentração interpolada através da curva padrão.

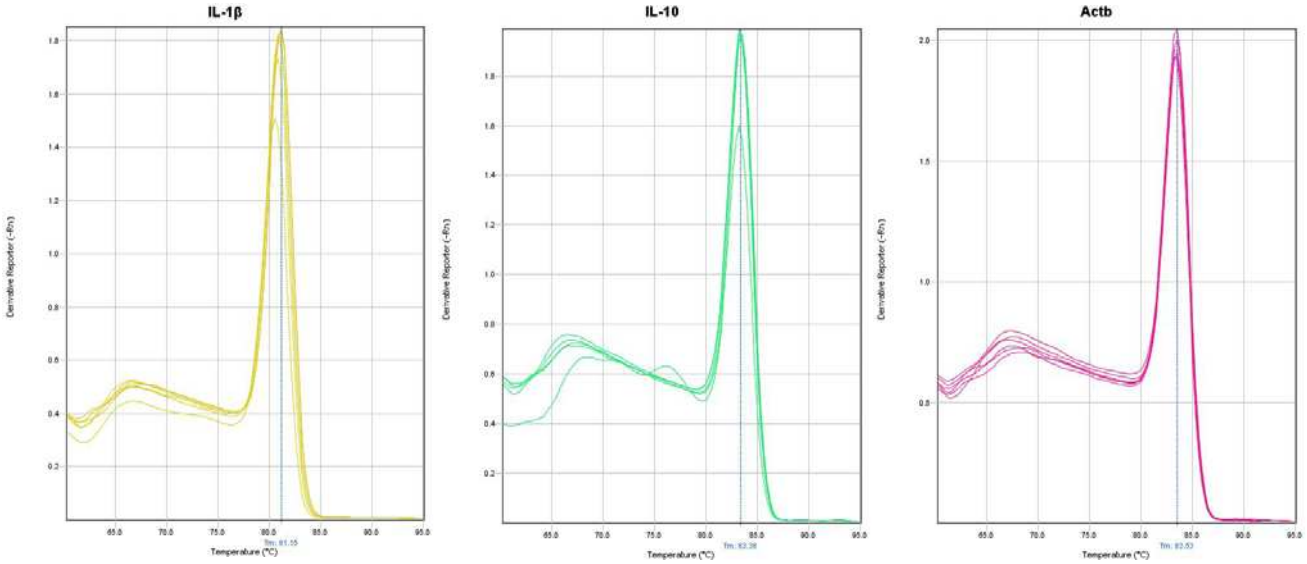

Figura Suplementar 9. Curvas de *melting* dos ensaios *Il1b*, *Il10* e *Actb* resultantes da reação de qPCR de otimização da temperatura de anelamento. Cada gráfico exibe as curva de *melting* das reações com temperatura de anelamento de 60, 62 e 64°C. Todas as curvas apresentam um único pico, confirmando a amplificação específica dos ensaios testados.

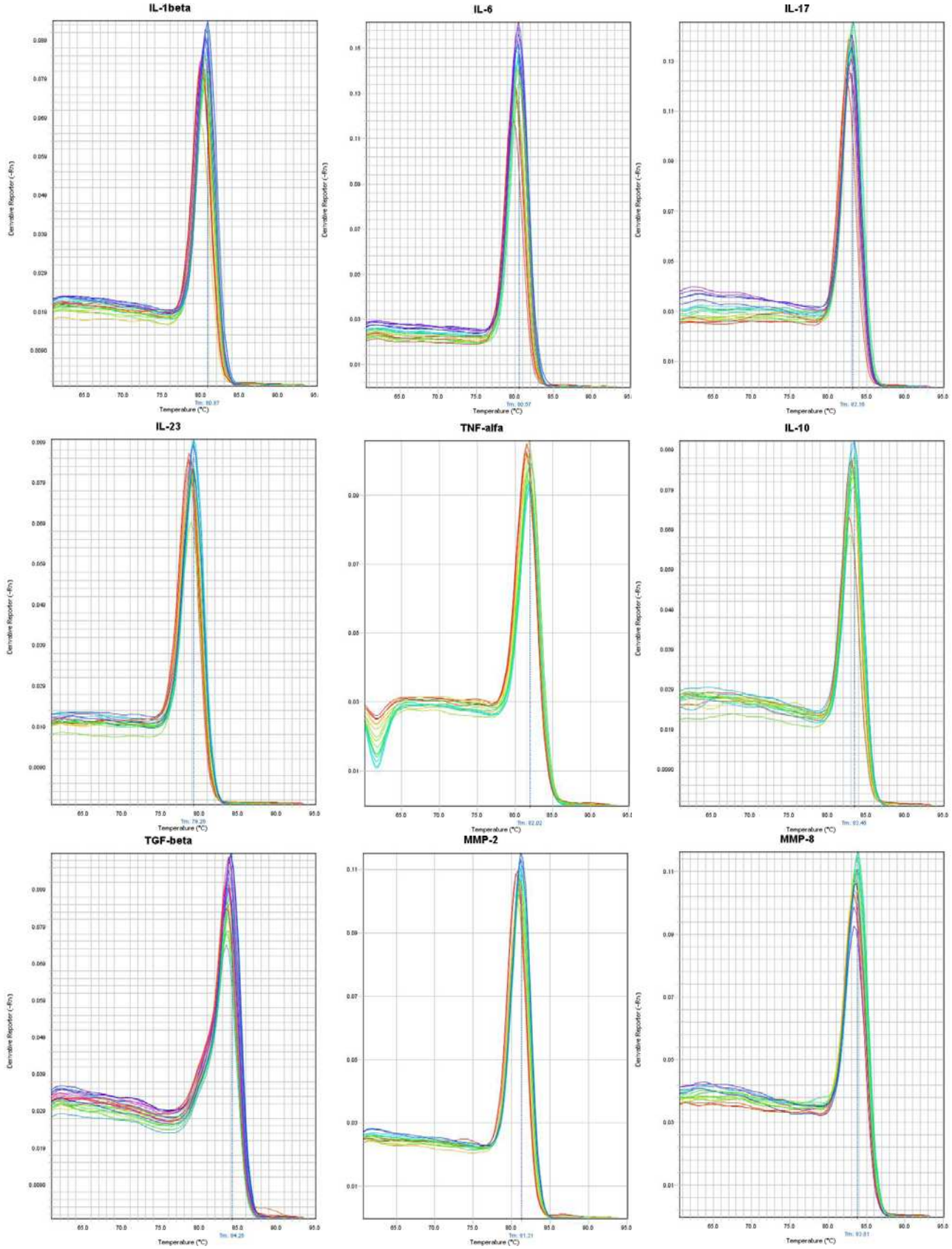

Figura Suplementar 10. Curvas de *melting* dos ensaios *Il1b*, *Il6*, *Il17*, *Il123*, *Tnf*, *Il10*, *Tgfb*, *Mmp2* e *Mmp8*, resultantes da reação de qPCR para a construção da curva padrão. Cada gráfico exibe as curva de *melting* das reações de todos os pontos da curva padrão. Todas as curvas apresentam um único pico, confirmando a amplificação específica dos ensaios testados.

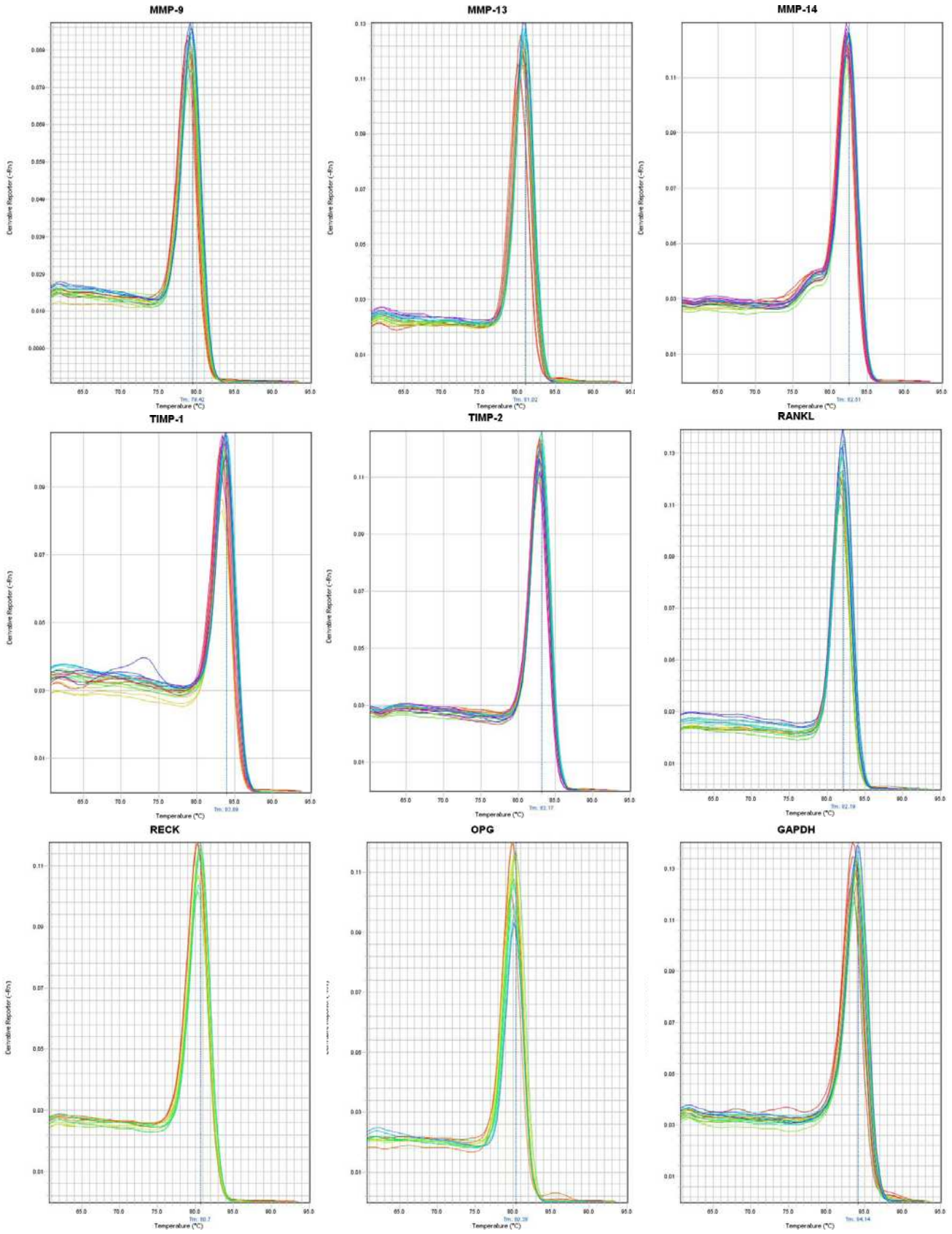

Figura Suplementar 11. Curvas de *melting* dos ensaios Mmp9, *Mmp13*, *Mmp14*, *Timp1*, *Timp2*, *Rankl*, *Reck*, *Opg* e *Gapdh*, resultantes da reação de qPCR para a construção da curva padrão. Cada gráfico exibe as curva de *melting* das reações de todos os pontos da curva padrão. Todas as curvas apresentam um único pico, confirmando a amplificação específica dos ensaios testados.

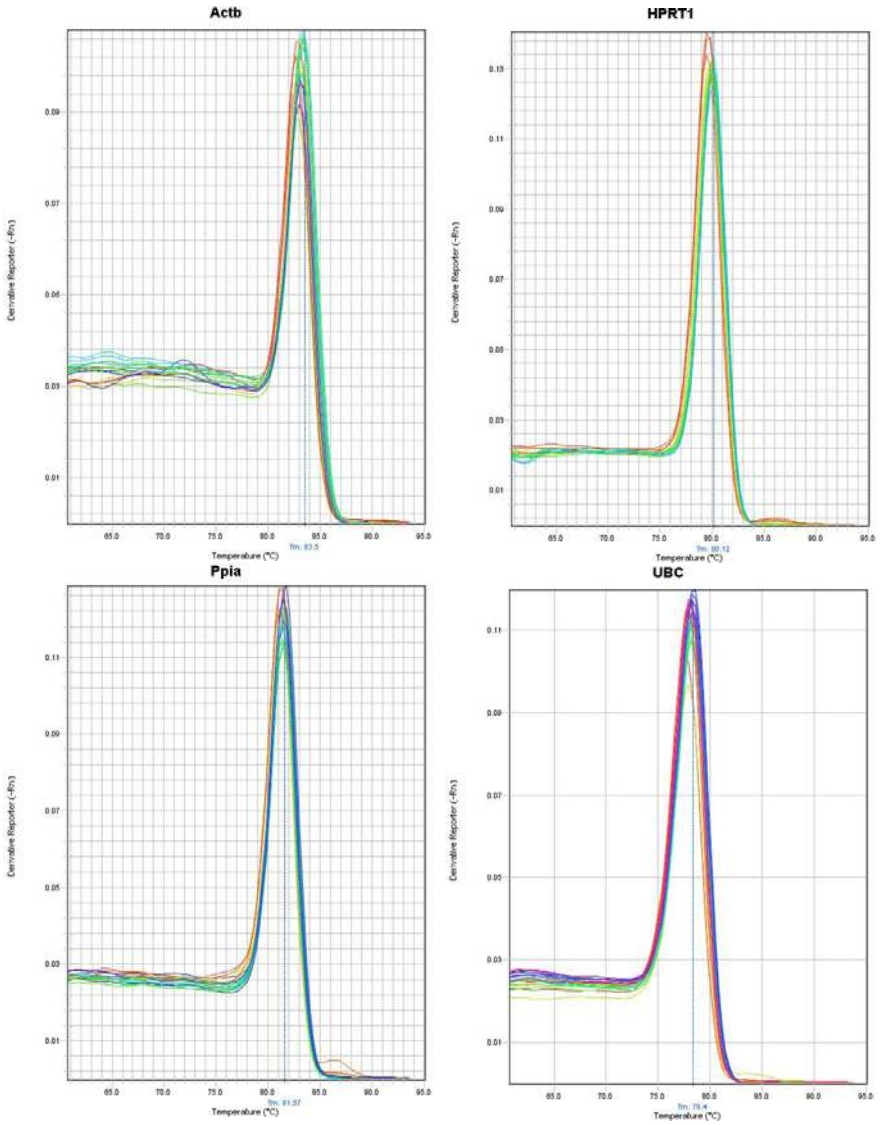

Figura Suplementar 12. Curvas de *melting* dos ensaios *Actb*, *Hprt1*, *Ppia* e *Ubc*, resultantes da reação de qPCR para a construção da curva padrão. Cada gráfico exibe as curva de *melting* das reações de todos os pontos da curva padrão. Todas as curvas apresentam um único pico, confirmando a amplificação específica dos ensaios testados.

Tabela suplementar 1. Área da raiz exposta do primeiro molar inferior com ligadura e do dente colateral (controle) dos animais normais e obesos, representada pela área entre a JEC e a crista óssea alveolar. SL: dente sem ligadura (controle); L: dente com ligadura

Grupo normal						Grupo obeso					
5 dias		15 dias		30 dias		5 dias		15 dias		30 dias	
SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L
3,11	3,27	2,94	4,15	3,19	4,39	2,68	3,61	2,54	3,67	3,41	4,97
2,9	3,03	2,82	3,6	2,63	4,07	2,86	3,81	2,98	4,07	2,66	4,06
3,04	3,51	3,04	4,36	2,54	3,82	2,47	2,85	3,2	3,87	2,84	4,27
2,58	3,1	2,94	3,49	2,67	4,06	2,7	3,18	2,93	4,33	2,91	4,56
2,59	2,88	2,61	3,73	2,24	3,76			2,2	4,27		
2,85	3,46	2,67	3,94	2,95	4,05						
2,55	3,08			2,6	3,89						
2,89	3,44										

Tabela suplementar 2. Concentração proteica total em µg/ml do lisado das amostras proteicas, determinada pela quantificação total de proteínas pelo método de Bradford, utilizando curva padrão de albumina de soro bovino. Cada amostra representa o lisado do fragmento de gengiva de dois animais. SL: fragmento de gengival proveniente do primeiro molar inferior sem ligadura; L: fragmento de gengival proveniente do primeiro molar inferior com ligadura.

Grupo normal						Grupo obeso					
5 dias		15 dias		30 dias		5 dias		15 dias		30 dias	
SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L
365,6	1746,6	1406,4	1021,6	594,3	1649,3	638,7	2862,0	742,7	604,7	821,1	1676,3
892,9	2431,5	916,1	2148,0	621,6	1529,3	740,1	2501,0	914,0	2010,0	981,6	1905,0
1023,0	3795,0	886,3	1999,0	525,3	1363,0	1197,0	3604,5	848,5	1926,0	706,1	1919,3

Tabela suplementar 3. Concentração proteica interpolada da curva padrão das amostras de controles positivo do ensaio de Multiplex para cada analito analisado. São dados os valores mínimos e máximos aceitáveis para cada controle. Asteriscos indicam que o valor interpolado é maior que o valor máximo para um dado controle.

Analitos	Controles	Mínimo (pg/ml)	Máximo (pg/ml)	Interpolado (pg/ml)
IL1B	Controle 1	140	290	253,045
	Controle 2	702	1459	1215,49
IL6	Controle 1	161	335	1033,92*
	Controle 2	760	1578	1552,185
IL17	Controle 1	145	300	372,6*
	Controle 2	683	1418	1262,785
IFNG	Controle 1	124	257	355,065*
	Controle 2	601	1248	1211,355
IL4	Controle 1	139	289	240,7
	Controle 2	671	1394	1226,885
IL10	Controle 1	136	282	347,72*
	Controle 2	675	1401	1221,75

Tabela suplementar 4. Expressão gênica relativa de *Il1b* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.04	1.09	0.99	1.14	0.78	1.52	0.99	1.05	0.94	
15 dias	1.20	0.58	0.22	1.00	1.14	1.03	1.66	1.91	1.67	1.78
30 dias	0.98	1.17	1.15	1.15	1.43	1.97	0.89	3.73	0.82	0.60

Tabela suplementar 5. Expressão gênica relativa de *Il6* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.48	1.20	1.08	0.76	2.10	0.98	1.07	1.76	0.77	
15 dias	0.10	0.09	0.27	0.66	0.47	1.63	0.40	1.37	1.52	1.10
30 dias	0.22	1.33	0.61	0.85	1.42	1.78	1.03	1.81	0.48	0.35

Tabela suplementar 6. Expressão gênica relativa de *Il23* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.96	0.71	0.97	1.04	1.44	1.03	1.25	1.22	0.94	
15 dias	1.17	0.65	0.40	1.01	0.75	1.17	1.81	1.55	1.36	1.30
30 dias	0.86	0.80	0.98	1.07	0.91	1.39	1.37	1.17	1.30	0.87

Tabela suplementar 7. Expressão gênica relativa de *Tnf* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.02	0.50	0.84	1.02	2.31	1.10	0.99	1.71	0.80	
15 dias	1.00	0.63	0.35	0.96	1.55	1.41	3.14	1.53	1.62	1.13
30 dias	0.73	1.52	0.58	1.61	1.20	3.54	0.97	2.90	1.14	0.92

Tabela suplementar 8. Expressão gênica relativa de *Il10* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.95	0.78	0.56	1.56	1.54	1.09	2.33	1.91	1.00	
15 dias	0.83	0.45	0.13	0.85	0.63	1.12	3.28	2.76	2.17	1.71
30 dias	0.68	1.07	1.17	0.79	0.41	2.23	0.62	3.36	1.12	0.74

Tabela suplementar 9. Expressão gênica relativa de *Tgfb* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					**Grupo DHL**				
5 dias	0.89	0.68	1.09	1.24	1.22	1.14	1.09	1.48	1.19	
15 dias	0.30	0.22	0.28	0.95	0.76	1.49	2.06	1.61	1.53	1.53
30 dias	0.11	0.84	0.68	0.52	0.56	1.87	0.96	1.67	0.70	0.70

Tabela suplementar 10. Expressão gênica relativa de *Mmp2* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					**Grupo DHL**				
5 dias	0.84	0.53	0.61	1.57	2.38	1.29	1.05	1.52	1.29	
15 dias	1.06	1.22	0.56	1.55	1.09	2.10	2.14	1.97	2.02	1.94
30 dias	0.46	1.13	2.20	2.09	2.24	2.24	0.38	3.25	0.45	0.55

Tabela suplementar 11. Expressão gênica relativa de *Mmp8* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					**Grupo DHL**				
5 dias	1.29	0.66	1.23	0.99	0.95	2.06	1.80	0.59	0.58	
15 dias	1.49	0.72	0.34	0.70	1.06	1.27	1.97	2.52	2.19	1.72
30 dias	0.99	1.06	0.94	1.01	1.16	2.03	0.36	2.10	1.02	0.52

Tabela suplementar 12. Expressão gênica relativa de *Mmp9* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					**Grupo DHL**				
5 dias	1.14	0.98	0.94	0.88	1.08	1.24	1.56	3.08	1.03	
15 dias	1.00	0.33	0.32	0.84	1.07	1.06	1.63	1.51	1.12	0.71
30 dias	0.90	1.12	1.60	0.90	0.65	1.62	1.66	1.01	0.97	0.79

Tabela suplementar 13. Expressão gênica relativa de *Mmp13* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					**Grupo DHL**				
5 dias	0.85	0.68	0.47	1.53	2.42	1.68	2.57	1.62	1.39	
15 dias	0.97	1.15	0.73	1.30	1.69	0.85	1.76	3.19	2.64	0.93
30 dias	0.88	1.40	1.73	1.52	1.32	2.50	0.80	2.85	0.75	0.85

Tabela suplementar 14. Expressão gênica relativa de *Mmp14* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.04	0.72	0.75	1.17	1.51	1.15	1.15	1.36	1.34	
15 dias	1.12	1.06	0.63	1.42	0.99	1.32	1.46	1.45	1.36	1.38
30 dias	0.86	1.13	1.46	1.43	1.37	1.90	0.79	1.89	0.78	0.77

Tabela suplementar 15. Expressão gênica relativa de *Timp1* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.90	0.97	0.85	0.94	1.43	0.79	1.03	1.22	0.95	
15 dias	1.14	1.19	0.42	1.27	0.77	1.22	1.20	1.20	1.16	0.91
30 dias	1.38	0.83	1.49	1.29	1.47	1.32	0.49	2.42	0.64	0.42

Tabela suplementar 16. Expressão gênica relativa de *Timp2* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.02	0.58	0.60	1.54	1.81	1.08	0.71	1.79	1.23	
15 dias	1.55	1.28	0.97	1.78	1.27	1.98	3.08	2.36	2.01	1.74
30 dias	1.21	1.65	1.56	1.47	1.73	2.13	0.58	3.32	0.57	0.53

Tabela suplementar 17. Expressão gênica relativa de *Reck* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.95	0.89	0.61	1.06	1.82	1.01	0.88	1.25	1.28	
15 dias	2.03	2.15	0.79	1.46	0.98	2.12	1.68	1.49	1.57	1.73
30 dias	2.60	1.55	2.27	2.10	1.87	1.82	0.45	2.80	0.87	0.67

Tabela suplementar 18. Expressão gênica relativa de *Rankl* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.17	1.03	0.54	0.66	2.33	1.72	1.42	1.65	1.53	
15 dias	0.72	1.17	0.58	2.50	1.34	2.79	2.02	2.96	2.02	1.82
30 dias	1.09	1.27	1.69	1.43	1.02	3.10	1.59	17.79	0.66	1.30

Tabela suplementar 19. Expressão gênica relativa de *Opg* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	0.88	0.85	0.53	1.64	1.53	1.12	1.24	1.46	0.97	
15 dias	1.38	2.70	0.50	1.40	1.66	1.69	2.12	1.43	1.16	2.04
30 dias	2.83	1.93	2.43	2.35	2.11	2.49	0.64	1.77	1.23	1.21

Tabela suplementar 20. Expressão gênica relativa da razão *Rankl/Opg* no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de *fold change* em relação à média do subgrupo normal 5 dias sem ligadura.

	Grupo normal					Grupo DHL				
5 dias	1.33	1.20	1.02	0.40	1.53	1.54	1.15	1.13	1.59	
15 dias	0.52	0.44	1.16	1.79	0.80	1.65	0.95	2.07	1.73	0.89
30 dias	0.39	0.66	0.70	0.61	0.48	1.24	2.50	10.08	0.54	1.07

Tabela suplementar 21. Concentração proteica de IL1B no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	1958.5	538.9	849.9	1196.6	849.6	1582.8
15 dias	3017.6	1052.7	1228.3	1090.1	1131.3	1359.6
30 dias	1244.2	1306.6	1836.8	1442.1	1660.8	1036.9

Tabela suplementar 22. Concentração proteica de IL6 no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	267.0	109.3	95.4	152.8	131.9	81.5
15 dias	69.4	106.5	110.1	131.4	106.8	115.0
30 dias	164.2	157.0	185.8	118.9	99.4	138.2

Tabela suplementar 23. Concentração proteica de IL17 no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	267.0	109.3	95.4	152.8	131.9	1137.2
15 dias	1984.6	106.5	110.1	131.4	106.8	115.0
30 dias	164.2	157.0	185.8	118.9	99.4	138.2

Tabela suplementar 24. Concentração proteica de IFNG no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	267.0	109.3	2050.4	152.8	131.9	2675.4
15 dias	3984.9	106.5	110.1	131.4	106.8	115.0
30 dias	3529.5	157.0	185.8	4995.5	3262.4	138.2

Tabela suplementar 25. Concentração proteica de IL4 no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	267.0	2049.6	1910.9	152.8	2521.1	1847.0
15 dias	2196.5	1957.4	2206.1	131.4	2158.4	115.0
30 dias	164.2	157.0	3821.6	2139.0	2218.0	2539.5

Tabela suplementar 26. Concentração proteica de IL10 no tecido gengival das amostras sem ligadura dos grupos normal e DHL. Os resultados são apresentados na forma de concentração proteica por miligrama de proteína total (pg/ml/mg).

	Grupo normal			Grupo DHL		
5 dias	267.0	109.3	95.4	152.8	131.9	81.5
15 dias	7709.8	106.5	3202.1	131.4	106.8	115.0
30 dias	164.2	157.0	185.8	118.9	99.4	138.2

Tabela suplementar 27. Pares de primers de qPCR que não apresentaram amplificação satisfatória do RNAm alvo e, portanto, não foram utilizados nesse trabalho. São apresentadas as sequências dos primers e o número de acesso do banco de dados do NCBI das sequência de RNAm utilizadas para o desenho dos primers.

Nome do Gene	Número de acesso (NCBI)	*Primer forward*	*Primer reverse*
Il6	NM_012589.1	GTTGCCTTCTTGGGACTGATG	GTATCCTCTGTGAAGTCTCCTCTC
Il17	NM_001106897.1	ATCAGGACGAGCGACCAT	TTTGGACACACTGAACTTTGAG
Tnf	NM_012675.3	GCGTGTTCATCCGTTCTC	CTGAGGAGTAGACGATAAAGGG
Ifng	NM_138880.2	AAAGGATCCATGAGTGCTAC	GCAGTAACAGCCAGAGAG
Ifng	NM_138880.2	ATGAGCATCGCCAAGTTC	CAGAATCAGCACCGACTC
Il4	NM_201270.1	TGTACCTCCGTGCTTGAAGA	GTGTTGTGAGCGTGGACT
Il4	NM_201270.1	GGATGTAACGACAGCCCTCT	GGTGTTCCTTGTTGCCGTAA
Mmp1a	NM_001134530.1	GGTCCTGGGCATCTCCTTT	TCTTCGTATCTGTTCCTGAGTTCA
Mmp1a	NM_001134530.1	CAGTTATTAGGCTAAGAGTCCAT	CGTATCTGTTCCTGAGTTCA
Mmp8	NM_022221.1	TGTTTCTCGTGGCTGCTCAT	AATAGGTGCTGGGTTCTCTGTAAG
Mmp14	NM_031056.1	TTTATGGAAGCAAGTCAGGGT	GTTTCTGGGCTTATCTGGGA
Rankl	NM_057149.1	CCATCGGGTTCCCATAAAGTC	GCGTACAGGTAATAGAAGCCATC
Timp2	NM_021989.2	CTCCCTCAGGTCTAAGAATTGC	CGTCTGTGGGTTCGTAGG

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "análise dos mecanismos envolvidos na destruição tecidual periodontal em ratos obesos com doença periodontal experimental" .

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. _____, Instituição: _____.

(X) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 2451-1, Instituição: IB/UNICAMP.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição: _____

** Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*

Henrique O. Bianchi
Aluno: (Henrique de Oliveira Bianchi)

Dagmar Stach-Machado
Orientador: (Profa. Dra. Dagmar R. Stach-Machado)

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
(X) Deferido ( ) Indeferido

Ana Maria A. Guaraldo
Carimbo e assinatura

Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:
( ) Deferido ( ) Indeferido

_____
Carimbo e assinatura