

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARÍLIA RIZZI

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASEÍNA SOBRE O PERIODONTO E
OSSO MANDIBULAR DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA
DE CAFETERIA.

PONTA GROSSA – PR

2021

MARÍLIA RIZZI

AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASEÍNA SOBRE O PERIODONTO E
OSSO MANDIBULAR DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA
DE CAFETERIA.

Dissertação apresentada para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde, área de concentração
Atenção Interdisciplinar à Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Dionízia Xavier Scomparin.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Marcela Claudino.

PONTA GROSSA

2021

Rizzi, Marília

R627

Avaliação da suplementação com caseína sobre o periodonto e osso mandibular de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria / Marília Rizzi. Ponta Grossa, 2021.

36 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Atenção Interdisciplinar em Saúde), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Dionízia Xavier Scomparin.

Coorientadora: Profa. Dra. Marcela Claudino.

1. Dieta de cafeteria. 2. Proteína láctea. 3. Caseína. 4. Reabsorção óssea alveolar. 5. Periodonto. I. Scomparin, Dionízia Xavier. II. Claudino, Marcela. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Atenção Interdisciplinar em Saúde. IV. T.

CDD:617.6

MARILIA RÍZZI

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASEÍNA SOBRE O PERIODONTO E
PARÂMETROS SOMATOMÉTRICOS DA MANDÍBULA DE RATOS OBESOS
ALIMENTADOS COM DIETA DE CAFETERIA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde na
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Área de Atenção Interdisciplinar em Saúde.

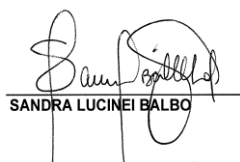
Ponta Grossa, 13 de abril de 2021.



Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin – Orientadora
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gilson Cesar Nobre Franco
Doutor em Odontologia
Associação Brasileira do Odontologia



Profa. Dra. Sandra Lucinei Balbo
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Profa. Dra. Marcela Claudino da Silva Nardino
Doutora em Odontologia
Universidade Estadual de Ponta Grossa

AGRADECIMENTOS

Em anos tão desafiadores como os que temos vivido, agradeço a Deus a oportunidade de estar viva e com saúde. Lembrar que se tem tanto a agradecer é, de fato, reconfortante!

Agradeço à prof^a Dionízia Xavier Scomparin por aceitar ser minha orientadora, mesmo sem me conhecer previamente, e ter sido tão acessível e complacente em acatar as minhas sugestões e demandas. Também agradeço à minha coorientadora, Marcela Claudino, que foi determinante para o sucesso desse trabalho à medida que propôs alteração do objeto de estudo, em função da pandemia de COVID19 e a escassez de prazos para qualificação e defesa. Ambas pesquisadoras estiveram sempre disponíveis em me orientar e aprendi muito ao longo desse período que trabalhamos juntas.

Agradeço a Karoline Rodrigues Pasqualotto, amiga desde antes do mestrado e que foi de fundamental importância na obtenção dos materiais utilizados neste estudo.

Agradeço também a Gabrielle Delfrate, que me ajudou de maneira muito gentil em diversos os momentos desta pesquisa, às vezes respondendo mensagens tarde da noite.

São muitas as pessoas envolvidas em uma pesquisa experimental com animais, por isso deixo o meu agradecimento a todos acadêmicos e mestrandos dos laboratórios da prof^a Dionízia e Marcela que de alguma forma participaram desse estudo.

Agradeço infinitamente aos meus pais, Dirceu e Marta Rizzi, pelos valores e princípios ensinados desde muito cedo, como persistência, responsabilidade e comprometimento. Por terem investido na minha formação acadêmica desde muito pequena, e me proporcionado chegar até onde cheguei. Sem vocês, nada seria possível. Obrigada por tanto amor e dedicação!

Agradeço a minha irmã, Paula Rizzi, minha melhor amiga – obrigada por estar sempre comigo, nos momentos bons e ruins.

Ao meu amor, Thadeu Suzuki, por estar sempre comigo, mesmo com todos os percalços. Por insistir em nós, e por ser meu porto seguro. Temos muito o que nos orgulhar da nossa história e evolução.

***“It is not the strongest of the species that survives,
nor the most intelligent. It is the one that is most
adaptable to change”. (Charles Darwin)***

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre o periodonto e osso mandibular de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria. **Material e métodos:** 24 ratos Wistar, divididos em quatro grupos experimentais: dieta normal (DN), dieta normal com caseína (DNC), dieta de cafeteria (DC) e dieta de cafeteria com caseína (DCC). Os grupos DNC e DCC receberam 2 mL de caseína micelar do 60º ao 90º dia. Aos 90 dias, os animais foram ortoeutanasiados e materiais foram removidos para análise. **Resultados:** Verificou-se diferença ($p < 0,0001$) na adiposidade entre os animais DN, DNC, DC e DCC. Houve diferença para a dosagem do colesterol HDL, que foi menor no grupo DCC ($p < 0,0196$) e DCC com DN ($p < 0,0039$). Nas análises radiográficas, não houve diferença em relação à densidade de pixels, entretanto, houve diferença no tamanho da porção anterior mandibular entre DCC e DNC ($p < 0,0196$) e DCC e DN ($p < 0,0039$). Na histologia, observou-se redução de vasos sanguíneos, tanto em osso alveolar ($p = 0,0033$), osso da furca ($p < 0,0001$) e ligamento periodontal ($p = 0,0001$) em DCC. **Conclusões:** A dieta de cafeteria não aumentou a inflamação no periodonto e reabsorção óssea alveolar, e a caseína não pareceu influenciar significativamente os parâmetros analisados. Outros estudos devem ser conduzidos para o estabelecimento de estratégias terapêuticas para o manejo da obesidade.

PALAVRAS-CHAVE: Dieta de cafeteria. Proteína láctea. Caseína. Reabsorção óssea alveolar. Periodonto.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of casein supplementation on the periodontium and mandibular bone of rats fed with standard diet and a cafeteria diet. **Material and methods:** 24 Wistar rats, divided into four experimental groups: normal diet (ND), normal diet with casein (NDC), cafeteria diet (CD) and cafeteria diet with casein (CDC). The NDC and CDC groups received 2 ml of micellar casein from the 60th to the 90th day. At 90 days, the animals were ortho euthanized and materials were removed for analysis. **Results:** There was a difference ($p < 0.0001$) in the adiposity index between animals DN, DNC, DC and DCC. There was a difference for the measurement of HDL cholesterol, which was lower in the DCC group ($p < 0.0196$) and DCC with DN ($p < 0.0039$). In the radiographic analyzes, there was no difference in relation to the pixel density, however, there was a difference in the size of the mandibular anterior portion between DCC and DNC ($p < 0.0196$) and DCC and DN ($p < 0.0039$). In histology, a reduction in blood vessels was observed, both in alveolar bone ($p = 0.0033$), furcation bone ($p < 0.0001$) and periodontal ligament ($p = 0.0001$) in CDC. **Conclusions:** The cafeteria diet did not increase inflammation in the periodontium and alveolar bone resorption, and casein did not appear to significantly influence the analyzed parameters. Further studies should be conducted to establish therapeutic strategies for the management of obesity.

KEYWORDS: Cafeteria diet. Dairy protein. Casein. Alveolar resorption. Periodontium.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 RESULTADOS	11
3.1 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASEÍNA SOBRE O PERIODONTO E OSSO MANDIBULAR DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA DE CAFETERIA.....	11
3.1.1 Introdução.....	11
3.1.2 Material e Métodos.....	13
3.1.2.1 Animais de Comitê de Ética.....	13
3.1.2.2 Dieta padrão, dieta de cafeteria e desenho experimental.....	13
3.1.2.3 Avaliação da obesidade.....	15
3.1.2.4 Análises radiográficas.....	16
3.1.2.5 Análises histológicas.....	16
3.1.2.6 Análises estatísticas.....	18
3.1.3 Resultados.....	18
3.1.4 Discussão.....	24
3.1.5 Conclusões.....	27
REFERÊNCIAS.....	28
4 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	36

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como uma doença inflamatória crônica, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que frequentemente causa prejuízo aos diferentes sistemas biológicos (OMS, 2000). Dados epidemiológicos demonstram a alta prevalência da obesidade tanto na população adulta como na população infantil, sendo que esta doença é considerada uma epidemia desde 1997 pela Organização Mundial da Saúde (CABALLERO, 2007). Desde então, a prevalência vem aumentando progressivamente, sendo que no início do século XXI, pela primeira vez na história da humanidade, o número de pessoas com excesso de peso superou o número de indivíduos com baixo peso, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento (GARDNET *et al.*, 2000). Em 2016, a proporção de obesidade no mundo chegou a 13,3%, o equivalente a 672 milhões de adultos, e 124 milhões de crianças e adolescentes (FAO, 2019). A projeção para 2025 aponta que haverá mais de 2 bilhões de adultos acima do peso em todo o mundo, sendo 700 milhões obesos. Para a população infantil, essa projeção é de 75 milhões (MS, 2020).

A obesidade é uma doença multifatorial, sendo também considerada como fator de risco para outras morbidades, como hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipos 2, dislipidemias, síndrome metabólica, além de propiciar o acometimento de danos osteoarticulares decorrentes do excesso de peso corporal (BRASIL, 2014; CANELLA *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2017). Dentre estas alterações, as da homeostase do tecido ósseo também vêm sendo descritas. Embora ainda não totalmente esclarecidas, as vias pelas quais a obesidade interfere na homeostase do tecido ósseo envolvem o aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1b e 6, leptina, via RANKL/RANK/OPG, metabolismo do cálcio, vitamina D e K (ARITA *et al.*, 1999; KHOSLA *et al.*, 2001; OSHIMA *et al.*, 2005).

A expressão exacerbada de mediadores pró-inflamatórios e osteoclastogênicos como IL-1b, TNF- α , IL-6 e RANKL. Esta desregulação na resposta é capaz de induzir, e não somente agravar, doenças periodontais (CLAUDINO *et al.*, 2007; CLAUDINO *et al.*, 2012; CHAPPLE; GENCO, 2013; PRESHAW; BISSETT, 2013). Neste sentido, autores sugerem que a inflamação crônica sistêmica advinda da obesidade e de suas comorbidades relacionadas pode agravar ou, até mesmo, desencadear doenças em sítios específicos, como as doenças periodontais

(ARBOLEDA *et al.*, 2019). De fato, estudos prévios demonstraram a associação da obesidade com aumento da reabsorção óssea alveolar e com a resistência insulínica (SU *et al.*, 2013; NAZIR, 2017).

Como estratégia para minimizar os efeitos deletérios da obesidade, medidas como prática de atividades físicas e alimentação balanceada tem sido largamente indicadas. De modo complementar, a utilização de suplementos alimentares também vem sendo utilizada empiricamente, objetivando o emagrecimento. Entretanto, há divergências na literatura disponível acerca dos efeitos da caseína na obesidade. Lillefosse e colaboradores (2013) demonstrou que a caseína hidrolisada reduziu a obesidade induzida por dieta em ratos, e esses resultados são compatíveis com outros estudos (SCHOEMAKER *et al.*, 2017). CHIA e colaboradores (2018), entretanto, observaram que a caseína fração A1 pode modificar o metabolismo da glicose e induzir o acometimento da diabetes tipo 1, às vezes o efeito aparecendo em gerações futuras.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre os parâmetros somatométricos e valores de pixel da hemimandíbulas de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria, e os possíveis efeitos desta suplementação no ligamento periodontal, no osso alveolar e no tecido ósseo presente na região de furca. Também foram analisados o peso corporal, índice de adiposidade, índice de Lee e perfil bioquímico no soro destes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre os parâmetros somatométricos e valores de pixel da hemimandíbulas de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria, e os possíveis efeitos desta suplementação no ligamento periodontal, no osso alveolar e no tecido ósseo presente na região de furca.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre o peso corporal, adiposidade e índice de Lee de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria;
- Quantificar parâmetros bioquímicos (colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos, glicemia, transaminase oxaloacética, transaminase pirúvica) no soro de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria e suplementados com caseína;
- Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre os parâmetros somatométricos e valores de pixel em hemimandíbulas de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria por meio de análises radiográficas.
- Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre o ligamento periodontal de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria por meio de análises histológicas.
- Avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre o osso alveolar e o tecido ósseo da região de furca de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria por meio de análises histológicas.

3 RESULTADOS

3.1 ARTIGO: AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO COM CASEÍNA SOBRE O PERIODONTO E OSSO MANDIBULAR DE RATOS ALIMENTADOS COM DIETA PADRÃO E DIETA DE CAFETERIA

3.1.1 Introdução

A obesidade é uma doença inflamatória crônica de longa duração e caráter progressivo. São muitos os fatores que levam o indivíduo a se tornar obeso, e a mais comum é a ingestão alimentar excessiva, com alimentos hipercalóricos e ultraprocessados. Se esse comportamento é contínuo, forma-se cada vez mais tecido adiposo no organismo¹. A obesidade é um problema de saúde pública a nível mundial atualmente, já que é precursora de diversas outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, endocrinológicas e osteo metabólicas^{2,3,4}. Embora a relação entre a obesidade e o metabolismo ósseo ainda não seja totalmente elucidada, nas últimas décadas estudos têm demonstrado relação entre obesidade, osteopenia e osteoporose^{5,6}.

Hipotetizava-se que a obesidade teria um efeito protetor ósseo, devido à maior pressão sobre essa estrutura, além da proteção física proporcionada pelo tecido adiposo em possíveis quedas^{7,8,9,10}. Porém, essas premissas se mostraram cada vez mais contraditórias ao longo do tempo, já que as observações clínicas e diversos estudos têm demonstrado que pacientes obesos frequentemente apresentam osteopenia/ osteoporose e risco aumentado de fraturas em alguns sítios específicos, como tornozelo e úmero^{6,11,12}. Sawin¹³ e colaboradores (2016) verificaram que uma alimentação hiper lipídica em camundongos fêmeas aumenta a mineralização do osso, mas afeta negativamente sua qualidade, resultando em ossos fracos e quebradiços, aumentando o risco de fraturas.

Os mecanismos propostos para explicar os efeitos deletérios da obesidade no tecido ósseo são: a) quanto maior a proliferação do tecido adiposo, menos osteoblastos se formam na medula óssea, uma vez que eles são oriundos de uma célula-tronco mesenquimal multipotente comum; b) devido ao fato do maior número de citocinas pró-inflamatórias circulantes, pode haver a modulação das vias ligadas ao remodelamento ósseo, gerando maior reabsorção pela maior ativação

osteoclástica; c) mutação do gene da proteína da obesidade e de massa de gordura associada – FTO (alpha-ketoglutarate-dependente dioxigenase), levando à ganho de peso e fragilidade óssea; e d) aumento do metabolismo e senescência acelerada em células-tronco estromais^{14,15,16,17}.

O tecido adiposo contribui para integridade esquelética possivelmente devido a secreção de várias adipocinas, as quais influenciam a remodelação óssea. Da mesma forma, o tecido ósseo também desempenha função regulatória no peso corporal e homeostase da glicose através da osteocalcina e osteopontina. Embora os mecanismos ainda não estejam totalmente elucidados, o tecido adiposo e o esquelético possuem um eixo de regulação entre si^{6,18,19}.

É bem estabelecido que doenças sistêmicas têm impacto em sítios específicos do organismo, como, por exemplo, na cavidade bucal. Na obesidade já instalada, síndrome metabólica, diabetes mellitus, entre outras, ocorre o acometimento ou agravamento de doenças bucais pré-existentes, com aumento da reabsorção óssea alveolar, diminuição da densidade mineral óssea e prejuízo na estrutura óssea trabecular. Essas alterações impactam diretamente a remodelação dos ossos^{20,21}.

O consumo de suplementos alimentares para fins de emagrecimento movimentam bilhões de dólares ao ano²². Dentre estes suplementos, frações proteicas do leite, como *whey protein* e a caseína são utilizadas, muitas vezes de forma empírica. Especificamente a respeito da caseína, a premissa é que, devido à sua lenta digestão e absorção, haveria aumento da saciedade por períodos prolongados, e assim, menor ganho ponderal²³. Entretanto, há divergências na literatura disponível acerca dos efeitos da caseína na obesidade. Lillefosse²⁴ e colaboradores (2013) demonstrou que a caseína hidrolisada reduziu a obesidade induzida por dieta em ratos, e esses resultados são compatíveis com outros estudos²⁵. CHIA²⁶ e colaboradores (2018), entretanto, observaram que a caseína fração A1 pode modificar o metabolismo da glicose e induzir o acometimento da diabetes tipo 1, às vezes o efeito aparecendo em gerações futuras.

A respeito da influência destes suplementos lácteos no metabolismo ósseo, Fried²⁷ e colaboradores (2012) conduziram um estudo com ratos no qual observaram que a ingestão de leite desnatado em pó enriquecido com 2,4% de cálcio, por oito semanas, melhorou a estrutura óssea trabecular, em relação aos ratos que receberam caseína ou *whey protein*. Resultados semelhantes haviam sido encontrados por Eller

e Reimer²⁸ (2010), nos mesmos parâmetros. Entretanto, um recente estudo concluiu que ratos alimentados com leite de soja tiveram melhor qualidade óssea, em relação a ratos que ingeriram caseína²⁹.

Levando-se em consideração a escassez de estudos sobre o tema os resultados contraditórios apresentados, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre o peso corporal, índice de adiposidade, índice de Lee e perfil bioquímico no soro de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria. Também foram verificados parâmetros somatométricos e valores de pixel da hemimandíbulas, e os possíveis efeitos desta suplementação no ligamento periodontal, no osso alveolar e no tecido ósseo presente na região de furca.

3.1.2 Material e métodos

3.1.2.1 Animais e Comitê de Ética

Para este estudo foram utilizados 24 ratos, 12 machos e 12 fêmeas, da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), com 21 dias de vida. Os animais foram mantidos no Núcleo Avançado de Estudos da Vida (NAEVI-UEPG) em caixas para roedores, com cama de maravalha, em condições de temperatura controlada de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com luminosidade em ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração comercial balanceada e água potável *ad libitum*.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UEPG, processo nº 7707/2018. Foram utilizadas todas as medidas para manter o bem-estar animal e minimizar dor e desconforto dos animais, de acordo com a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008; e Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009.

3.1.2.2 Dieta padrão, dieta de cafeteria e desenho experimental

Os animais do grupo controle foram alimentados *ad libitum* com água potável e dieta padrão NUVILAB-CR1 (Nuvital - Colombo/PR, Brasil). Aos 30 dias de vida, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo dieta normal (6 machos e 6 fêmeas) e grupo dieta de cafeteria (6 machos e 6 fêmeas). Então, a partir do 60º dia, os grupos foram subdivididos, resultando em quatro grupos: grupo dieta normal

sem suplementação de caseína (DN); grupo dieta normal com suplementação de caseína (DNC); grupo dieta de cafeteria sem suplementação de caseína (DC); grupo dieta de cafeteria com suplementação de caseína (DCC).

A dieta de cafeteria foi ofertada *ad libitum* diariamente ao grupo DC e DCC, a partir do 30º dia de vida. Os itens que compõem a dieta foram agrupados em três combinações distintas ofertadas alternadamente (A, B, C – tabela 1). A dieta A era oferecida às segundas-feiras, a dieta B às quartas-feiras e a dieta C às sextas-feiras, compostas por alimentos frescos, refrigerante de cola, ração padrão e água. O cardápio de alimentos hipercalóricos para compor este modelo de dieta de cafeteria tem base nos trabalhos de DIDEK³⁰ e colaboradores (2019).

CARDÁPIO A						
ALIMENTO	Qtd (g)	Kcal/g	Carboidrato (g)	Proteína (g)	Lipídios (g)	Sódio (mg)
Ração padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Salgadinho sabor queijo	1	3,92	0,72	0,08	0,09	12,3
Bolacha wafer de chocolate	1	5,56	0,63	0,03	0,51	0,76
Refrigerante de cola	1	0,42	0,11	0,00	0,00	0,05
CARDÁPIO B						
Ração padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Marshmallow	1	3,35	0,82	0,04	0,00	0,25
Apresentado	1	1,85	0,07	0,13	0,16	11,7
Refrigerante de cola	1	0,42	0,11	0,00	0,00	0,05
CARDÁPIO C						
Ração padrão	1	2,95	0,55	0,22	0,04	0,00
Salgadinho sabor bacon	1	5,08	0,521	0,08	0,29	6,40
Bolacha maria	1	4,30	0,73	0,07	0,12	4,33
Refrigerante	1	0,42	0,11	0,00	0,00	0,05

Tabela 1 - Cardápio oferecido aos ratos pertencentes aos grupos “dieta de cafeteria” (DNC e DCC) (DIDEK³⁰ *et al.*, 2019).

Aos 60 dias de vida, os grupos DNC e DCC iniciaram a suplementação por 30 dias com caseína micelar pelo método de gavagem. Foi escolhido esse período de suplementação pois a partir do 60º dia de vida os animais já são considerados adultos jovens, e não foi objetivo do presente estudo verificar a influência da suplementação de caseína na infância. A caseína utilizada foi *Gold Standart 100% Casein* da marca

comercial *Optimum Nutrition*. A dose administrada, via gavagem, foi calculada levando-se em consideração a dose usualmente utilizada por humanos (30 a 35 gramas/dia), proporcionalmente extrapolada conforme o metabolismo dos animais. Assim, foram administrados 0,3 gramas de caseína em 2 mL de água, para cada animal, uma vez ao dia, no período da manhã, sempre no mesmo horário. Os animais que não receberam caseína, receberam 2 mL de soro fisiológico via gavagem (controle negativo). A escolha do período da manhã foi feita considerando o hábito noturno dos roedores, já que a caseína é uma proteína de absorção lenta e deve ser administrada preferencialmente antes do sono.

Então, aos 90 dias de vida, os animais foram pesados e submetidos à ortoeutanásia por decapitação e remoção de materiais para análises *post-mortem* (gorduras, sangue e hemimandíbulas). As gorduras mesentérica, perigonadal e retroperitoneal foram removidas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e pesadas em balança digital de precisão analítica (Quimis, modelo Q-500L210C).

3.1.2.3 Avaliação da obesidade

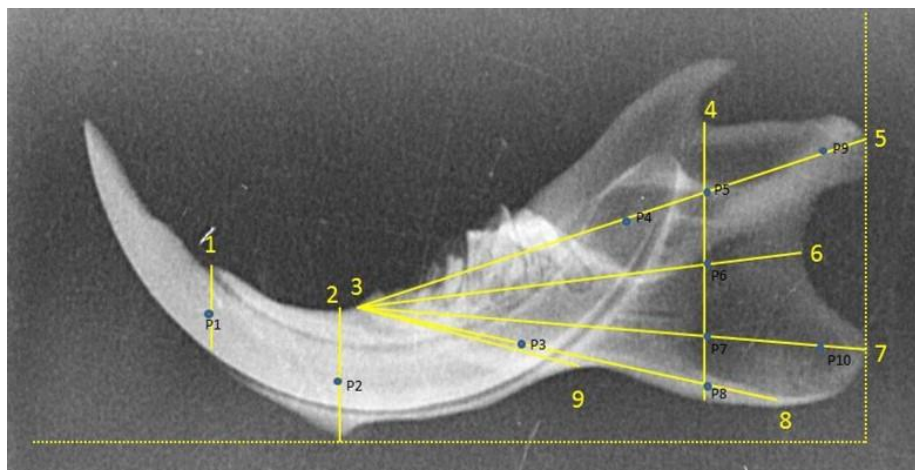
O índice de adiposidade (IA) *post-mortem* foi calculado utilizando a fórmula: $IA = [gordura\ corporal / peso\ corporal] \times 100$. A gordura corporal (g) foi calculada pela soma dos seguintes constituintes do tecido adiposo: gordura perigonadal + gordura retroperitoneal + gordura mesentérica³¹.

O sangue coletado (2 mL) foi destinado a exames laboratoriais. Após a coleta do sangue total em tubo gel ativador de coágulo (Vacuplast - Cotia/SP) foi centrifugado a 3.000 RPM por 10 minutos em centrífuga Celm LS-3 plus, para as seguintes dosagens: a) glicemia b) triglicerídeos d) colesterol total, e colesterol HDL, transaminases (TGO/TGP). Estes exames foram realizados pelo método enzimático colorimétrico no analisador bioquímico CT300i Wiener. As dosagens foram realizadas com reagentes da marca (Wiener Lab, Rosário, Argentina).

Foi medido o comprimento naso-anal (cm) e peso do animal (g) para cálculo do índice de Lee (valor preditivo de obesidade em roedores)³², de acordo com a equação: $\text{Índice de Lee} = \sqrt[3]{[Massa\ corporal\ (g)]/[Comprimento\ nasoanal\ (cm)]} \times 1000$.

3.1.2.4 Análises radiográficas

As hemimandíbulas foram dissecadas e fixadas em formol a 10% durante 24 horas, expostas durante 12 horas a solução de peróxido de hidrogênio 3%, seguido pela remoção mecânica dos tecidos moles remanescentes. As mandíbulas foram submetidas à análise radiográfica por meio de um aparelho digital (Sensor para radiografia digital, Micro Imagem, EVO/FIT, Indaiatuba, Brasil). Para a análise radiográfica, cada hemimandíbula foi posicionada paralelamente sobre o filme radiográfico com uma distância focal de 10 cm do cilindro do equipamento radiográfico. O tempo de exposição foi definido em 0,50 segundos. As medidas somatométricas foram analisadas por meio do programa ImageJ (Wayne Rasband do Research Services Branch, Bethesda, Estados Unidos), sendo elas: altura anterior (traçado 1), altura posterior (traçado 2), comprimento anterior (traçado 3), comprimento posterior (traçado 4) ângulo gonial (de 5-7/ plano mandibular) e área líquida (área da mandíbula menos a região de sulco). A análise dos valores de pixels, referente à escala de cinza, foi avaliada em 10 pontos distribuídos, nomeados de P1 a P10, em duas regiões da hemimandíbula^{33,34}. Tanto as medidas somatométricas quanto os pontos de análise de pixels estão ilustrados na figura 1.



3.1.2.5 Análises histológicas

Para as análises histológicas, foi feita a dissecação e remoção mecânica dos tecidos moles das hemimandíbulas. Em seguida, foram fixadas em formol a 10%

durante 24 horas, e descalcificadas em ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) a 9%, sob agitação constante até a completa desmineralização. O material foi processado em um histotécnico de sistema semi-fechado (Leica Microsystems, Buffalo Grove, Estados Unidos) onde passou pelas etapas de desidratação, diafanização e impregnação de parafina³⁵. As amostras foram então posicionadas num plano coronal e incluídas em blocos de parafina. Foram realizados cortes sagitais de cinco micrômetros, seguido pela desparafinização, hidratação, coloração em hematoxilina e eosina (HE), desidratação e montagem. Em cada lâmina, foram fotografadas cerca de 23 áreas com ampliação de 200x em três regiões distintas: osso alveolar, ligamento e osso da furca³⁶ por meio da plataforma Olympus CellSens (CellSens Software 1.6, Tóquio, Japão). Para análise do ligamento periodontal, foram visualizados 13 campos, contemplando todo espaço ocupado pelo ligamento periodontal - iniciando imediatamente acima da crista óssea do osso alveolar, seguindo até a proximidade com o ápice radicular. Para análise da região do osso alveolar, foram escolhidos 5 campos sequenciais a partir da crista óssea, e para a região do osso da furca, também foram selecionados 5 campos. As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do programa ImageJ (National Institute of Mental Health-Bethesda, Maryland, Estados Unidos) visando a identificação e quantificação das estruturas. Utilizou-se o plugin “Grid” que seccionada as imagens em 80 pontos equidistantes e as contagens foram realizadas com auxílio do plugin “Point tool”, onde cada estrutura era marcada e contada exatamente nestes pontos de intersecções para todos os campos. Para obtenção dos percentuais, o total das contagens desses 80 pontos foi transformado em 100%, e, de posse dessas informações para cada campo e região, os dados foram plotados em uma planilha (Windows Excel, Microsoft, Redmond, WA, Estados Unidos) para análise estatística.

REGIÃO DAS HEMIMANDÍBULAS	CAMPOS (AMPLIAÇÃO 200X)	CARACTERÍSTICAS DA REGIÃO
Ligamento periodontal	13 campos	Fibras colágenas, fibroblastos, células inflamatórias, vasos sanguíneos
Osso alveolar	5 campos	Matriz óssea, osteócitos, vasos sanguíneos, células inflamatórias
Osso da furca	5 campos	Matriz óssea, osteócitos, vasos sanguíneos, medula óssea e células inflamatórias

Tabela 2 – Regiões das hemimandíbulas e suas características avaliadas. Fonte: a autora.

3.1.2.6 Análises estatísticas

A partir dos dados obtidos, realizou-se um cálculo de poder amostral a posteriori e, para a expectativa de sucesso de 20%, o poder da amostra utilizada no presente estudo foi de 50%.

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados que apresentaram distribuição normal foram submetidos aos testes paramétricos (One-way ANOVA e teste de Tukey). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos a testes não paramétricos (One-way ANOVA e teste de Kruskal-Wallis). Todas as análises foram realizadas no software Graphpad Prisma Versão 8.0.1, com um nível de significância estabelecido em 95%, os dados apresentados são a média mais ou menos o desvio padrão médio. Foram considerados valores estatisticamente significativos $p < 0,05$.

3.1.3 Resultados

Não houve diferença estatística no peso e no índice de Lee dos quatro grupos experimentais, entretanto houve diferença significativa no índice de adiposidade entre os grupos DN e DC, DN e DCC, DNC e DC e DNC e DCC ($p < 0,0001$), com aumento expressivo de tecido adiposo nos grupos tratados com dieta de cafeteria. A intervenção com caseína não resultou em diferença estatisticamente significativa (DN em relação a DNC, e DC em relação a DCC). A figura 2 mostra os gráficos dos pesos, índice de adiposidade e índice de Lee dos quatro grupos experimentais analisados

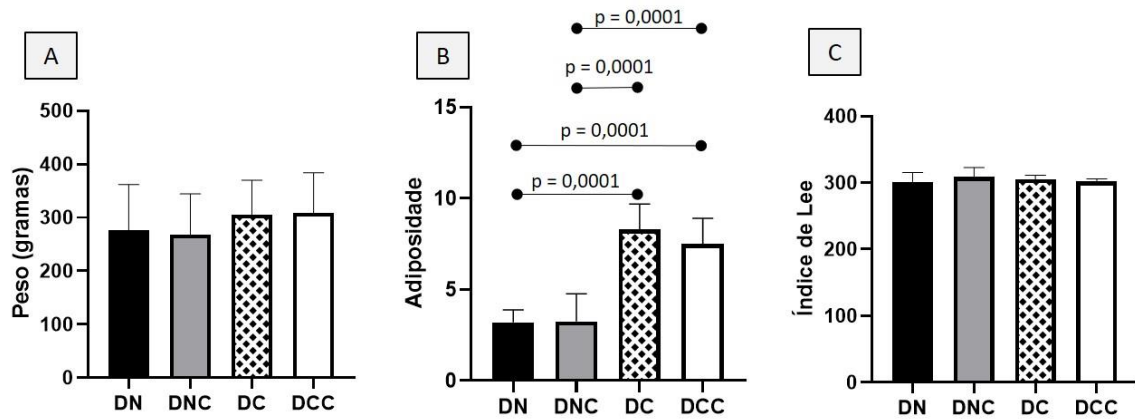


Figura 2 – Avaliação do peso (A), adiposidade (B) e índice de Lee (C) nos grupos DN, DNC, DC e DCC. Aumento na adiposidade DN e DC ($p=0,0001$), DN e DCC ($p=0,0001$), DNC e DC ($p=0,0001$) e DNC e DCC ($p=0,0001$).

Não houve diferença estatística entre os grupos nos testes bioquímicos realizados (colesterol total, triglicerídeos, glicemia, transaminase oxaloacética, transaminase pirúvica), exceto para o colesterol HDL, que apresentou diferença significativa entre os grupos DN e DCC ($p<0,0092$), com redução do valor para o grupo da dieta de cafeteria suplementado com caseína. As análises sorológicas realizadas estão esquematizadas na figura 3.

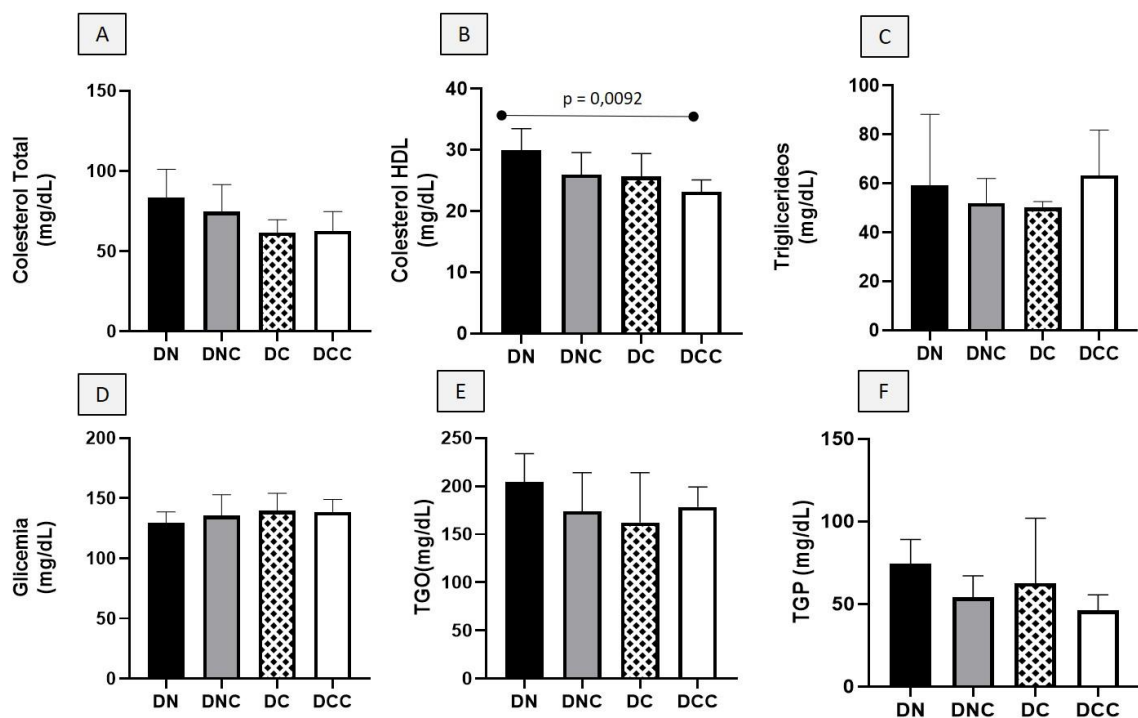


Figura 3 – Análises sorológicas. Gráfico A = colesterol total (mg/dL); gráfico B = colesterol HDL (mg/dL) – diferença significativa DN e DCC ($p=0,0092$); gráfico C = triglicerídeos (mg/dL); gráfico D = glicemia (mg/dL); gráfico E = transaminase oxaloacética - TGO (mg/dL); gráfico F = transaminase pirúvica - TGP (mg/dL).

Para as análises das medidas somatométricas mandibulares, verificou-se redução da altura anterior (traçado 1) nos grupos tratados com dieta de cafeteria, tendo diferença estatística entre os grupos DCC com DNC ($p < 0,0196$) e DCC com DN ($p < 0,0039$) (figura 4).

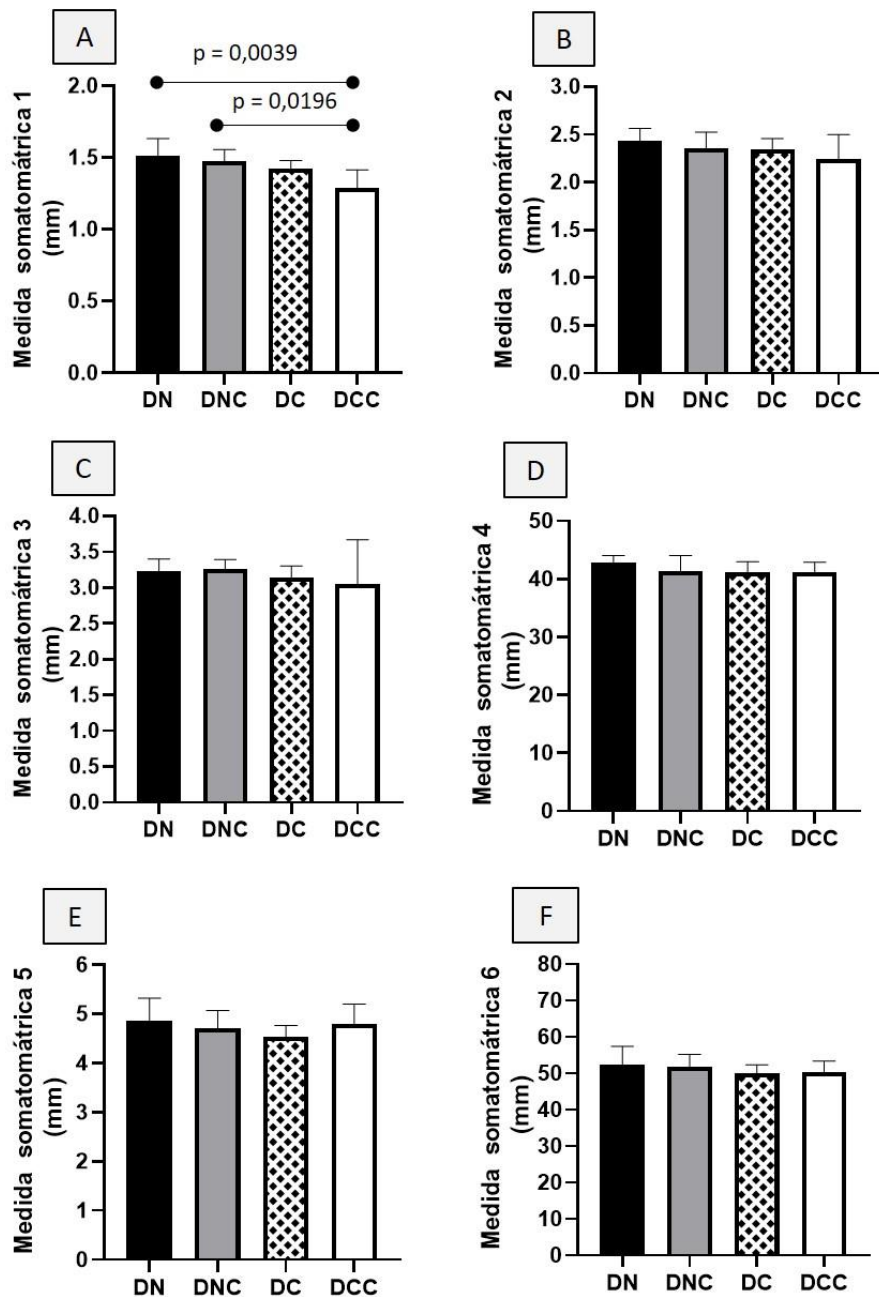


Figura 4 - Medidas somatométricas. Gráfico A = medida 1 (altura anterior) – diferença significativa DN e DCC ($p=0,0039$) e DNC e DCC ($p=0,0196$); gráfico B = medida 2 (altura posterior); gráfico C = medida 3 (comprimento anterior); gráfico D = medida 4 (comprimento posterior); gráfico E = medida 5 (ângulo goníaco); gráfico F = medida 6 (área líquida da mandíbula).

Ainda sobre as análises radiográficas, após aplicação dos testes estatísticos, verificou-se que não houve diferença significativa para nenhum dos dez pontos onde mensurou-se a densidade de pixels nas radiografias (figura 5).

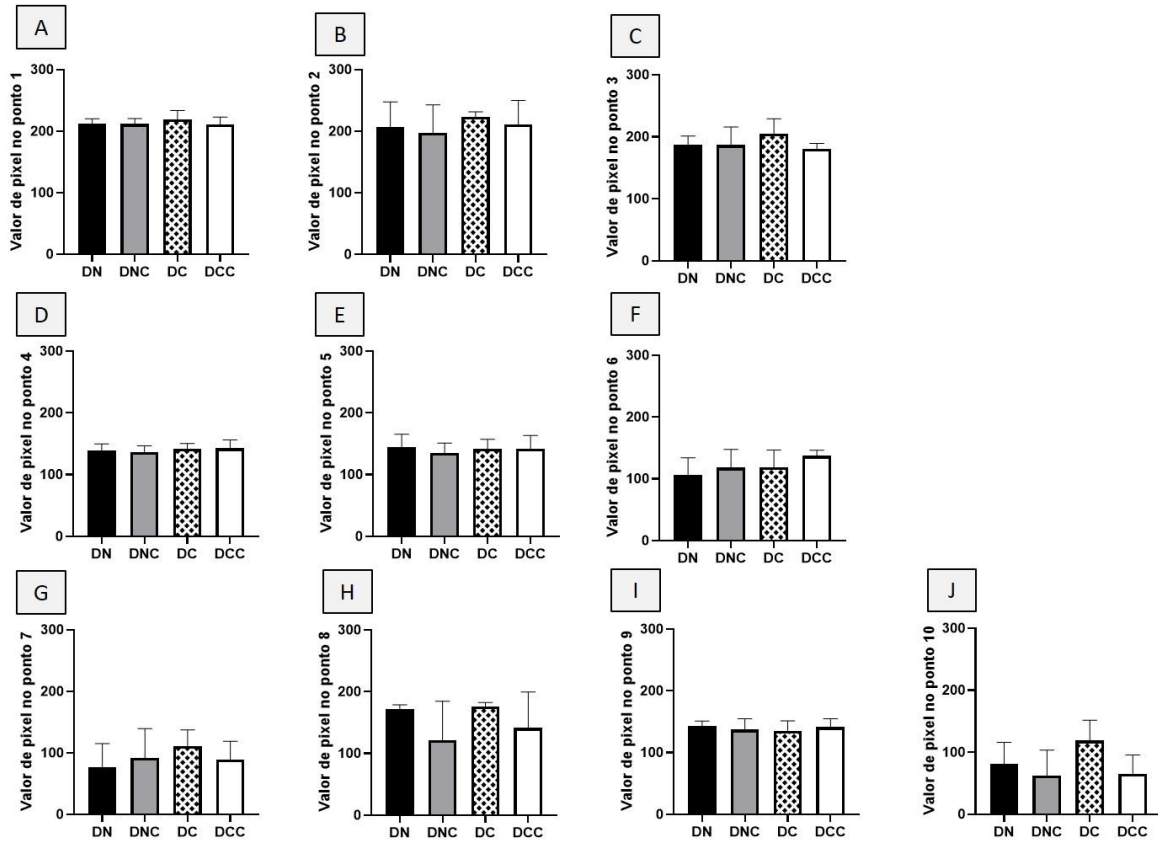


Figura 5 – Valores de pixels (melhorar o título dos gráficos). Gráfico A = ponto 1; gráfico B = ponto 2; gráfico C = ponto 3; gráfico D = ponto 4; gráfico E = ponto 5; gráfico F = ponto 6; gráfico G = ponto 7; gráfico H = ponto 8; gráfico I = ponto 9; gráfico J = ponto 10.

Nas análises histológicas realizadas, resultou em diferença significativa no osso alveolar: matriz óssea aumentada em DCC, em relação à DN ($p=0,0456$) e DCC em relação a DNC ($p=0,0029$); diminuição de osteócitos em DCC, em relação à DNC ($p=0,0198$); diminuição dos vasos sanguíneos, de DN para DCC ($p=0,0033$) e DN para DC ($p=0,0003$) (figura 6).

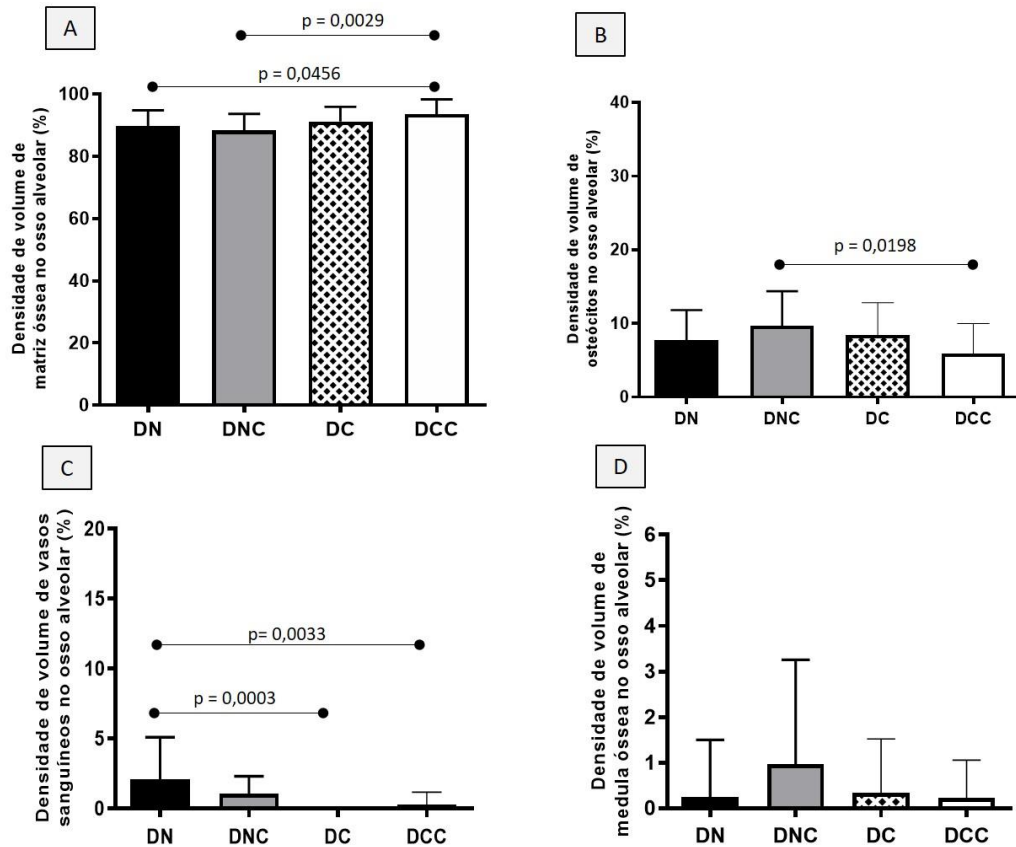


Figura 6 – Densidade de volume no osso alveolar. Gráfico A = matriz óssea (%) – diferença significativa DN e DCC ($p=0,0456$) e DNC e DCC ($p=0,0029$); gráfico B = osteócitos (%) – diferença significativa DNC e DCC ($p=0,0198$); Gráfico C = vasos sanguíneos (%) – diferença significativa DN e DCC ($p=0,0033$) e DN e DC ($p=0,0003$); e Gráfico D = medula óssea.

No osso da furca, observou-se aumento significativo da matriz óssea de DN para DC ($p=0,0049$) e DNC e DC ($p=0,0047$); e diminuição dos vasos sanguíneos, de DN para DC ($p=<0,0001$), DN para DCC ($p=<0,0001$), DNC para DC ($p=0,0001$) e DNC para DCC ($p=0,0002$) (figura 7).

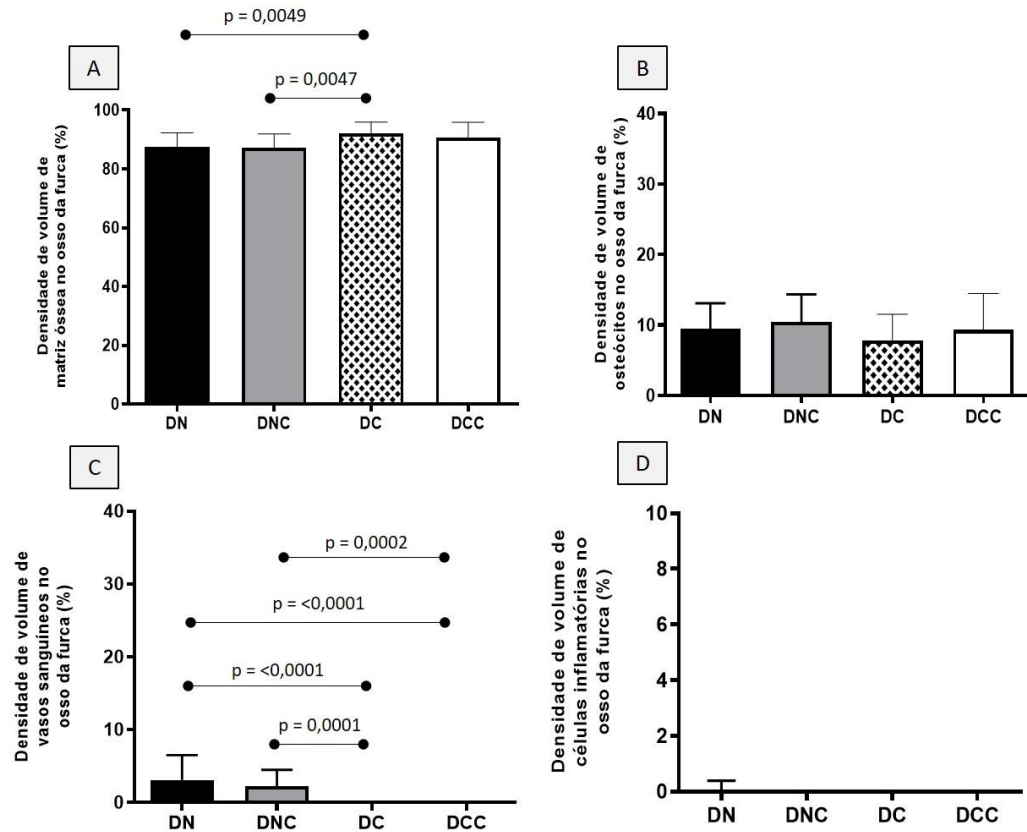


Figura 7 – Densidade de volume no osso da furca. Gráfico A = matriz óssea (%) – diferença significativa DN e DC ($p=0,0049$) e DNC e DC ($p=0,0047$); gráfico B = osteócitos (%); Gráfico C = vasos sanguíneos (%) – diferença significativa DN e DC ($p<0,0001$), DN e DCC ($p<0,0001$), DNC e DC ($p=0,0001$) e DNC e DCC ($p=0,0002$); e Gráfico D = células inflamatórias.

No ligamento periodontal, observou-se apenas diferença estatística na quantidade de vasos sanguíneos, que se mostraram aumentados em DN, em relação a DCC ($p=0,0001$) e DN e DNC ($p=0,0062$) (figura 8).

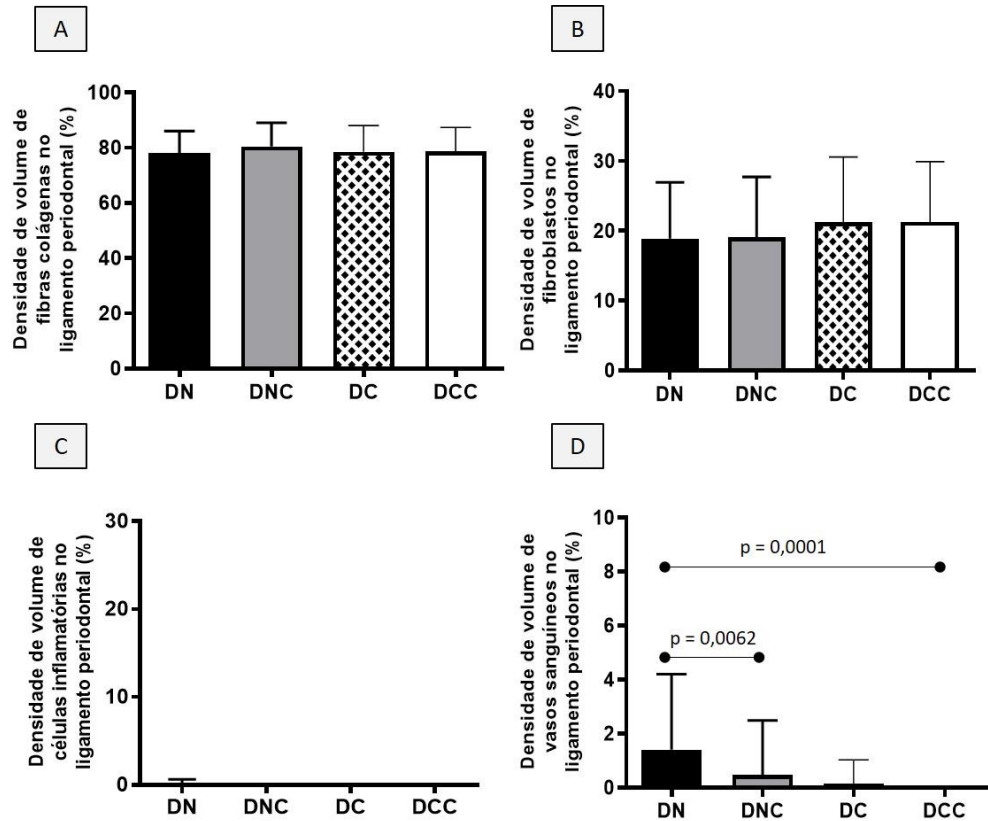


Figura 8 – Densidade de volume no ligamento periodontal. Gráfico A = fibras colágenas (%); gráfico B = fibroblastos (%); Gráfico C = células inflamatórias (%); e Gráfico D = vasos sanguíneos – diferença significativa DN e DCC ($p=0,0001$) e DN e DNC ($p=0,0062$).

3.1.4 Discussão

Embora seja uma doença prevenível com a adoção de bons hábitos de vida, como alimentação natural e prática de atividade física, a obesidade mundial triplicou desde 1975. Trata-se de uma pandemia de grande relevância na saúde pública, por estar correlacionada com doenças com altas taxas de morbimortalidade³⁷. Neste contexto, a suplementação com caseína vem sendo utilizada, empiricamente, para minimizar o ganho de peso devido ao aumento da saciedade³⁸, já que a ingesta energética excessiva é o fator mais relevante na instalação da obesidade.

Os efeitos da caseína no metabolismo ósseo em animais induzidos à obesidade são parcialmente conhecidos, e não há homogeneidade nos

resultados^{27,28,29}. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com caseína sobre os parâmetros somatométricos e valores de pixel da hemimandíbulas de ratos alimentados com dieta padrão e dieta de cafeteria. Avaliou-se também os possíveis efeitos desta suplementação no ligamento periodontal, no osso alveolar e no tecido ósseo presente na região de furca.

A pesquisa na área de obesidade envolve o uso de modelos animais para facilitar o entendimento de processos biológicos envolvidos nas doenças, e o potencial das terapias novas e já existentes. Os roedores compartilham grande similaridade e equivalência genômica com humanos³⁹. Nestes estudos, os modelos obesogênicos com oferta de dietas ricas em carboidratos e gorduras são simples e os que mais se assemelham à realidade da instalação da obesidade em humanos, sendo melhores do que a utilização de animais geneticamente modificados. Assim, são considerados melhor escolha para análise de estratégias terapêuticas⁴⁰. Particularmente a “dieta de cafeteria” condiz mais fidedignamente a situação humana, pois nestas os animais têm acesso a produtos contemporâneos⁴¹.

Dos resultados obtidos neste estudo, não houve diferença significativa no peso e índice de Lee dos animais que receberam dieta normal, balanceada e própria para roedores, e os animais que receberam a dieta de cafeteria. Entretanto, houve aumento expressivo da adiposidade entre esses grupos. Já que a obesidade é uma doença de instalação gradual e progressiva, e o fato de os animais estarem expostos à alimentação obesogênica e ultraprocessada reproduz o contexto alimentar de grande parte da população, e por isso é um modelo experimental adequado para tentar reproduzir a realidade humana atual⁴¹.

Neste trabalho, utilizou-se análises radiográficas para verificar o metabolismo ósseo, tanto em relação às dimensões (somatometria) quanto à densidade (valores de pixels). Dos resultados obtidos, verificou-se que a porção anterior da mandíbula foi maior no grupo que recebeu dieta padrão, em relação ao grupo que recebeu dieta de cafeteria). Já que essa região mandibular é a mais utilizada pelos roedores no processo alimentar, levantou-se a hipótese de que a dureza da ração padrão poderia ter provocado uma maior reabsorção óssea. Conforme explica a Lei de Wolff, os ossos sofrem remodelação óssea conforme são utilizados. Essa relação entre remodelação óssea e tensão aplicada ao osso diz que um aumento na carga fará com que a estrutura interna esponjosa se fortaleça, assim como a diminuição do estresse aplicado no osso fará com que ele enfraqueça⁴².

Quando a radiografia é exibida em uma tela, é organizada por linhas e colunas de pixels. Cada pixel possui uma cor em uma escala de cinza, entre o preto e o branco. Essa variação nos tons de cinza pode ser relacionada com a densidade mineral do osso⁴³. Nas análises de pixels do presente estudo, não houve diferença estatística entre os pontos analisados. A ausência de diferença nos valores de pixel sugere ausência de variação na densidade óssea, portanto. Contudo, a análise de pixel não é muito específica e, por este motivo, pode não se tratar da análise mais adequada neste contexto⁴⁴.

A respeito das análises histológicas, a suplementação com caseína resultou em redução na vascularização do periodonto, tanto do osso alveolar, quanto do osso da furca, quanto do ligamento periodontal. Os resultados obtidos são contrários ao esperado, pois uma maior inflamação decorrente da obesidade geraria maior quantidade de citocinas inflamatórias circulantes, com maior vascularização. Estudo realizado por Messer⁴⁵ e colaboradores (2019) demonstrou que ratos que receberam dieta rica em açúcar e caseína por 24 semanas tiveram resposta inflamatória em tecido periodontal sem qualquer intervenção mecânica. Outros estudos utilizaram dieta rica em açúcar combinada com caseína para induzir periodontite em roedores⁴⁶. Possivelmente, o tempo de exposição à dieta obesogênica do presente estudo foi menor do que o necessário, já que a inflamação advinda da obesidade é baixa e os animais eram adultos jovens, necessitando mais tempo para instalação da doença. Outra hipótese é que a caseína foi administrada via gavagem, sendo direcionada diretamente no estômago do animal, diferente dos pellets utilizados nos estudos de Messer de 2017⁴⁶ e 2019⁴⁵. Isso poderia ter minimizado a inflamação gengival nos animais do presente estudo.

A respeito da utilização da caseína em forma de suplemento como uma estratégia para minimizar os impactos negativos da obesidade no organismo, Healy⁴⁷ e col. (2016) realizaram um estudo para verificar se a caseína hidrolisada teria o potencial de minimizar a inflamação decorrente da obesidade e resistência insulínica. Quarenta camundongos machos de 30 dias de vida foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo dieta controle e água pura; dieta controle e água com caseína hidrolisada; dieta hiperlipídica e água; dieta hiperlipídica e água com caseína hidrolisada. O tratamento durou 12 semanas e os animais foram eutanasiados. Como resultado, verificaram melhora da tolerância glicêmica nos ratos tratados com dieta hiperlipídica e caseína, diminuição da secreção de citocinas pró-inflamatórias e

melhora da sinalização insulínica. A melhora do perfil inflamatório sistêmico poderia indicar menor impacto no metabolismo ósseo de pacientes obesos. Entretanto, neste estudo, não foram observadas diferenças com a utilização da caseína.

Como limitações deste estudo, é possível que o tempo de exposição dos animais à dieta de cafeteria tenha sido insuficiente para que a inflamação advinda da obesidade pudesse influenciar o tecido ósseo mandibular, e os parâmetros sorológico analisados. O tempo de suplementação de 30 dias com caseína, e o tipo de caseína utilizado (micelar, e não o hidrolisado), podem ter influenciado no resultado. Além disso, o método da gavagem restringiu o contato da caseína com a mucosa gengival, diferente dos estudos citados anteriormente. O tempo de suplementação com caseína, dos 60 aos 90 dias de vida do animal, foi escolhido levando-se em consideração que a partir do 60º dia o animal é considerado adulto. Optou-se por não avaliar a influência da caseína na infância. Contudo, outros estudos dentro desta temática devem ser conduzidos para o estabelecimento de estratégias preventivas e terapêuticas para o manejo das desordens resultantes da obesidade.

3.1.5 Conclusões

A utilização da caseína em forma de suplemento, como estratégia para minimizar os impactos negativos da ingestão de uma dieta hipercalórica e de baixa qualidade nutricional, não foi efetiva para diminuir o acúmulo de tecido adiposo nos grupos que receberam dieta de cafeteria.

O grupo que recebeu dieta de cafeteria e mais suplementação com caseína teve redução no valor do colesterol HDL, fato não observado nos outros grupos;

Nas análises radiográficas, não houve diferença significativa de valores de pixels nos dez pontos analisados, entretanto houve menor reabsorção óssea na porção anterior da mandíbula no grupo dieta de cafeteria suplementado com caseína.

Nas análises histológicas do periodonto, resultou em diferença significativa no osso alveolar: matriz óssea aumentada em DCC, em relação à DN ($p=0,0456$) e DCC em relação a DNC ($p=0,0029$); diminuição de osteócitos em DCC, em relação à DNC ($p=0,0198$); diminuição dos vasos sanguíneos, de DN para DCC ($p=0,0033$) e DN para DC ($p=0,0003$);

No osso da furca, observou-se aumento significativo da matriz óssea de DN para DC ($p=0,0049$) e DNC e DC ($p=0,0047$); e diminuição dos vasos sanguíneos, de

DN para DC ($p < 0,0001$), DN para DCC ($p < 0,0001$), DNC para DC ($p = 0,0001$) e DNC para DCC ($p = 0,0002$);

No ligamento periodontal, houve maior quantidade de vasos sanguíneos em DN, em relação a DCC ($p = 0,0001$); e DN em relação a DNC ($p = 0,0062$).

REFERÊNCIAS

1. Tappia PS, Defried D. Prevalence, Consequences, Causes and Management of Obesity. In: *Pathophysiology of Obesity-Induced Health Complications*. Springer, Cham. 2020; p. 3-22.
2. Schetz M, De Jong A, Deane AM, Druml W, Hemelaar P, Pelosi P, Pickkers P, Reintam-Blaser A, Roberts J, Sakr Y, Jaber S. Obesity in the critically ill: a narrative review. *Intensive Care Med*. 2019; 45(6):757-769.
3. Afolabi HA, bin Zakariya Z, Shokri ABA, Hasim MNBM, Vinayak R, Afolabi-Owolabi OT, Elesho RF. The relationship between obesity and other medical comorbidities. *Obesity Medicine*. 2020; 17, 100164.
4. SO I, YADAV H. Obesity and Its Complications Pathogenesis. In: *Pathophysiology of Obesity-Induced Health Complications*. Springer, Cham. 2020; p. 43-56.
5. Greco EA, Fornari R, Rossi F, Santiemma V, Prossomariti G, Annoscia C, Migliaccio S. Is obesity protective for osteoporosis? Evaluation of bone mineral density in individuals with high body mass index. *International Journal of Clinical Practice*. 2010; 64(6), 817-820.
6. Gkastaris K, Goulis DG, Potoupnis M, Anastasilakis AD, Kapetanios G. Obesity, osteoporosis and bone metabolism. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*. 2020; 20(3), 372.
7. Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The Framingham study. *J Bone Miner Res*. 1993; 8(5): 567-73.
8. CAO, J.J. Effects of obesity on bone metabolism. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*. 2011; v. 6, p. 30-36.
9. Mirzababaei A, Mirzaei K, Khorrami-Nezhad L, Maghbooli Z, Keshavarz SA. Metabolically healthy/unhealthy components may modify bone mineral density in obese people. *Archives of osteoporosis*. 2017; 12(1), 1-9.
10. Walsh JS, Vilaça T. Obesity, Type 2 Diabetes and Bone in Adults. *Calcified Tissue international*. 2017; v. 100, p. 528-35.
11. Compston JE, Watts NB, Chapurlat R, Cooper C, Boonen S, Greenspan S, Pfeilschifter J, Silverman S, Díez- Pérez A, Lindsay R, Saag KG. Obesity is not

protective against fracture in postmenopausal women: GLOW. *The American journal of medicine*. 2011;124(11):1043-50.

12. Compston JE, Flahive J, Hosmer DW, Watts NB, Siris ES, Silverman S. Relationship of Weight, Height, and Body Mass Index With Fracture Risk at Different Sites in Postmenopausal Women: The Global Longitudinal Study of Osteoporosis in Women (GLOW). *J Bone Miner Res*. 2014; 29(2): 487–93.

13. Sawin E, Stroup B, Murali S, O'Neill L, Ntambi J, Ney D. Differential Effects of Dietary Fat Content and Protein Source on Bone Phenotype and Fatty Acid Oxidation in Female C57Bl/6 Mice. *PLOS ONE*. 2016; pg. 32/33.

14. BENAYAHU D, WIESENFELD Y, SAPIR-KOREN R. How is mechanobiology involved in mesenchymal stem cell differentiation toward the osteoblastic or adipogenic fate?. *Journal of Cellular Physiology*. 2019; v. 234, n. 8, p. 12133-12141.

15. Rauch A, Haakonsson AK, Madsen JGS, Mandrup S. Osteogenesis depends on commissioning of a network of stem cell transcription factors that act as repressors of adipogenesis. *Nat Genet*. 2019; 51, 716–727.

16. Zhou M, Li S, Pathak JL. Pro-inflammatory Cytokines and Osteocytes. *Curr Osteoporos*. 2019; Rep 17, 97–104.

17. PROIETTO J. Obesity and Bone. *F1000Research*.2020; v. 9.

18. Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Catalan V, Frühbeck G. The bone-adipose axis in obesity and weight loss. *Obesity Surgery*. 2008; v. 18, n. 9, p. 1134-1143.

19. Kim SP, Frey JL, Li Z, Kushwaha P, Zoch ML, Tomlinson RE, Riddle RC. Sclerostin influences body composition by regulating catabolic and anabolic metabolism in adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017; v. 114, n. 52, p. E11238-E11247.

20. Ramos-Junior ES, Leite GA, Carmo-Silva CC, Taira TM, Neves KB. Adipokine chemerin bridges metabolic dyslipidemia and alveolar bone loss in mice. *J Bone Miner Res*. 2017; 32(5): 974-984.

21. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. Effects of metabolic syndrome on bone mineral density, histomorphometry and remodelling markers in male rats. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192416.

22. ABIAD. Pesquisa: Hábitos de consumo de Suplementos Alimentares no Brasil. Consulta em <https://abiad.org.br/pb/pesquisa-de-mercado-suplementos-alimentares>.

23. Kouw IW, Holwerda AM, Trommelen J, Kramer IF, Bastiaanse J, Halson SL, van Loon LJ. Protein ingestion before sleep increases overnight muscle protein synthesis rates in healthy older men: a randomized controlled trial. *The Journal of nutrition*. 2017; 147(12), 2252-2261.

24. Lillefosse HH, Tastesen HS, Du ZY, Ditlev DB, Thorsen FA, Madsen L, Liaset B. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. *The Journal of nutrition*. 2013, 143(9), 1367-1375.
25. Schoemaker MH, Kleemann R, Morrison MC, et al. A casein hydrolysate based formulation attenuates obesity and associated non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis in LDLr^{-/-}.Leiden mice. *PLoS One*, 12(7):e0180648, 2017.
26. Chia JSJ, McRae JL, Enjapoori AK, Lefèvre CM, Kukuljan S, Dwyer KM. Dietary Cows' Milk Protein A1 Beta-Casein Increases the Incidence of T1D in NOD Mice. *Nutrients*. 10(9):1291, 2018.
27. Fried, A; Manske, S; Eller, L, Lorincz, C; Reimer, R; Zernicke, R. Skim milk powder enhances trabecular bone architecture compared with casein or whey in diet-induced obese rats. *Nutrition* 28 (2012) 331–335.
28. Eller, L and Reimer, R. Dairy Protein Attenuates Weight Gain in Obese Rats Better Than Whey or Casein Alone. *Obesity* (2010) 18, 704–711.
29. Duque, G; Ahmed Al Saedi, PhD, Daniel Rivas, MSSc, Stéphanie Miard, PhD, Guylaine Ferland, PhD, Frederic Picard, PhD, Pierrette Gaudreau, PhD, Differential Effects of Long-Term Caloric Restriction and Dietary Protein Source on Bone and Marrow Fat of the Aging Rat, *The Journals of Gerontology: Series A*, Volume 75, Issue 11, November 2020, Pages 2031–2036, <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa093>
30. DIDEK, D. et al. Association Between Exercise and Treatment with Liraglutide in Obese Rats by Cafeteria Diet. *Braz. arch. biol. technol.*, Curitiba, v.62, e19180563, 2019.
31. Jacobsen, B. B., Leopoldo, A. P. L., Cordeiro, J. P., Campos, D. H. S. D., Nascimento, A. F. D., Sugizaki, M. M., ... & Leopoldo, A. S. Cardiac, metabolic and molecular profiles of sedentary rats in the initial moment of obesity. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 109(5), 432-439, 2017.
32. BERNARDIS, L. L., PATTERSON, BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*, 40:527–8, 1968.
33. DALMOLIN, A. C. et al. Mineral Contents and Somatometric Parameters in the Hemimandible, Tibia and Incisor of Rats Submitted to a Hypothalamic Obesity Condition. *J Obes Chronic Dis*, v. 2, n. 2, p. 57-61, out. 2018.
34. BRIN, I.; MICHAELI, Y.; STEIGMAN, S. Long-term Effects of Orthodontic Forces on the Morphology of the Rat-incisor Socket and its Location in the Mandible. *J Dent Res*, n.69, v.12, p.1834-1838, dez. 1990.
35. HOWIE, R. N. et al. A Model for Osteonecrosis of the Jaw with Zoledronate Treatment following Repeated Major Trauma. *Plos One*, v. 10, n. 7, p.1-16, 2015.

36. PACHECO, V. N. et al. Nitrogen-containing bisphosphonate therapy: assessment of the alveolar bone structure in rats—a blind randomized controlled trial. *International Journal of Experimental Pathology*, v. 96, n. 4, p. 255-260, 2015.
37. Organização Mundial da Saúde (OMS). Obesity and overweight. Fevereiro, 2018. Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
38. Hall, W., Millward, D., Long, S., & Morgan, L. (2003). Casein and whey exert different effects on plasma amino acid profiles, gastrointestinal hormone secretion and appetite. *British Journal of Nutrition*, 89(2), 239–248.
39. COLTRI, Brenda Mendes et al. Avaliação morfométrica da influência da obesidade sobre o tecido gengival de ratos com periodontite experimental. *Rev. bras. ciênc. saúde*, p. 127-132, 2017.
40. Barrett, P., J. G. Mercer, et al. Preclinical models for obesity research. *Dis Model Mech*, v.9, n.11, Nov 1, p.1245-1255. 2016.
41. Marine-Casado, R., C. Domenech-Coca, et al. Intake of an Obesogenic Cafeteria Diet Affects Body Weight, Feeding Behavior, and Glucose and Lipid Metabolism in a Photoperiod-Dependent Manner in F344 Rats. *Front Physiol*, v.9, p.1639. 2018.
42. ROWE, Paul; KOLLER, Adam; SHARMA, Sandeep. Physiology, Bone Remodeling. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2020.
43. Mundim MBV, Dias DR, Costa RM, Leles CR, Azevedo-Marques PM, RibeiroRotta RF. Intraoral radiographs texture analysis for dental implant planning. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*. 2016;36:89-96.
44. Khojastepour L, Mohammadzadeh S, Jazayeri M, Omid M. In vitro Evaluation of the Relationship between Gray Scales in Digital Intraoral Radiographs and Hounsfield Units in CT Scans. *Journal of Biomedical Physics and Engineering*. 2017;7(3):1-10
45. MESSER, Jonathan G. et al. Diet-induced Generalized Periodontitis in Lewis Rats. *Comparative medicine*, v. 69, n. 5, p. 384-400, 2019.
46. MESSER, Jonathan G. et al. Prevalence of food impaction-induced periodontitis in conventionally housed marsh rice rats (*Oryzomys palustris*). *Comparative medicine*, v. 67, n. 1, p. 43-50, 2017.
47. Healy NP, Kirwan AM, McArdle MA, et al. A casein hydrolysate protects mice against high fat diet induced hyperglycemia by attenuating NLRP3 inflammasome-mediated inflammation and improving insulin signaling. *Mol Nutr Food Res*. 60(11):2421-2432, 2016.

4 CONCLUSÕES

A utilização da caseína em forma de suplemento, como estratégia para minimizar os impactos negativos da ingestão de uma dieta hipercalórica e de baixa qualidade nutricional, não foi efetiva para diminuir o acúmulo de tecido adiposo nos grupos que receberam dieta de cafeteria;

O grupo que recebeu dieta de cafeteria e mais suplementação com caseína teve redução no valor do colesterol HDL, fato não observado nos outros grupos;

Nas análises radiográficas, não houve diferença significativa de valores de pixels nos dez pontos analisados, entretanto houve menor reabsorção óssea na porção anterior da mandíbula entre DCC e DNC ($p < 0,0196$) e DCC e DN ($p < 0,0039$);

Nas análises histológicas do periodonto, resultou em diferença significativa no osso alveolar: matriz óssea aumentada em DCC, em relação à DN ($p = 0,0456$) e DCC em relação a DNC ($p = 0,0029$); diminuição de osteócitos em DCC, em relação à DNC ($p = 0,0198$); diminuição dos vasos sanguíneos, de DN para DCC ($p = 0,0033$) e DN para DC ($p = 0,0003$);

No osso da furca, observou-se aumento significativo da matriz óssea de DN para DC ($p = 0,0049$) e DNC e DC ($p = 0,0047$); e diminuição dos vasos sanguíneos, de DN para DC ($p < 0,0001$), DN para DCC ($p < 0,0001$), DNC para DC ($p = 0,0001$) e DNC para DCC ($p = 0,0002$);

No ligamento periodontal, houve maior quantidade de vasos sanguíneos em DN, em relação a DCC ($p = 0,0001$); e DN em relação a DNC ($p = 0,0062$).

REFERÊNCIAS

- ARBOLEDA, S., VARGAS, M., LOSADA, S., Pinto, A. Review of obesity and periodontitis: an epidemiological view. **British Dental Journal**, v. 227, n. 3, p. 235-239, ago. 2019.
- ARITA, Y., KIHARA, S., OUCHI, N., TAKAHASHI, M., MAEDA, K., MIYAGAWA, J. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 257, n. 1, p. 79–83, abr. 1999.
- BOHL, M., BJORNHAVE, A., GREGERSEN, S., HERMANSEN, K. Whey and Casein Proteins and Medium-Chain Saturated Fatty Acids from Milk Do Not Increase Low-Grade Inflammation in Abdominally Obese Adults. **Rev Diabet Stud**, v. 13, n. 2-3, p. 148-157, mar. 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Estratégias para o cuidado da pessoa com doença crônica: obesidade** / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 212 p. : il. – (Cadernos de Atenção Básica, n. 38), 2014.
- CABALLERO, B. The global epidemic of obesity: An overview. **Epidemiol Ver**, v. 29, p. 1–5, jun. 2007.
- CANELLA, D. S. Influência do excesso de peso e da obesidade nos gastos em saúde nos domicílios brasileiros. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 11, p. 2331-2341, nov. 2015.
- CHAPPLE, I.L., GENCO, R. Working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: Consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. **J Periodontol**, v. 84, n. 4S, p. S106-112, abr. 2013.
- CHIA, J. S. J., MCRAE, J.L., ENJAPOORI, A. K., LEFÈVRE, C. M., KUKULJAN, S., DWYER, K. M. Dietary Cows' Milk Protein A1 Beta-Casein Increases the Incidence of T1D in NOD Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1291, set. 2018.
- CLAUDINO, M., CEOLIN, D. S., ALBERTI, S., CESTARI, T. M., SPADELLA, C. T., RUBIRA-BULLEN, I. R. F., DE ASSIS, G. F. Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. **PloS One**, v. 2, n. 12, p. 1320, dez. 2007.
- CLAUDINO, M., GENNARO, G., CESTARI, T. M., SPADELLA, C. T., GARLET, G. P., & Assis, G. Spontaneous periodontitis development in diabetic rats involves an unrestricted expression of inflammatory cytokines and tissue destructive factors in the absence of major changes in commensal oral microbiota. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, maio 2012.
- DIAS, P. C. Obesidade e políticas públicas: concepções e estratégias adotadas pelo governo brasileiro. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 7, jul. 2017.

DURSUN, E., AKALIN, F. A., GENÇ, T., CINAR, N., EREL, O., YILDIZ, B. O. Oxidative stress and periodontal disease in obesity. **Medicine**, v. 95, n. 12, p. 3136, mar. 2016.

FAO (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura). **Dia Mundial da Alimentação faz alerta para o crescimento da obesidade e destaca a alimentação saudável**. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1238905/>. Acesso em: 02 ago. 2020.

GARDNER, G., HALWEIL, B. Underfed and overfed: the global epidemic of malnutrition. **Washington, DC: Worldwatch Institute**, nº 150, 2000.

HELMI, M., GOODSON, J.M., HASTURK, H. Annual alveolar bone loss in subjects with cardiovascular disease adjusting for associated systemic diseases and risk factors: a retrospective study. **BMC Oral Health**, v. 20, n. 28, p. 1-10, jan. 2020.

KINSEY, A.W., CAPPADONA, S.R., PANTON, L.B. The Effect of Casein Protein Prior to Sleep on Fat Metabolism in Obese Men. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 452, jul. 2016.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050–5055, dez. 2001.

LILLEFOSSE, H. H.; TASTESEN, H. S.; DU, Z. Y.; DITLEV, D. B.; THORSEN, F. A.; MADSEN, L. Hydrolyzed casein reduces diet-induced obesity in male C57BL/6J mice. **The Journal of Nutrition**, v. 143, n. 9, p. 1367-1375, set. 2013.

MARTINEZ-HERRERA, M., SILVESTRE-RANGIL, J., SILVESTRE, F. J. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 22, n. 6, p. 708-15, nov. 2017.

NAZIR, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. **Int J Health Sci (Qassim)**, v. 1, n. 2, p. 72-80, jun. 2017.

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Obesity and overweight Fact sheet nº 311**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 02 ago. 2020.

OMS (Organização Mundial da Saúde). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: World Health Organization; 2000. (**WHO Technical Report Series, 894**).

OSHIMA, K., NAMPEI, A., MATSUDA, M., IWAKI, M., FUKUHARA, A., HASHIMOTO, J. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 331, n. 2, p. 520–6, jun. 2005.

MS (Ministério da Saúde). **Metade dos brasileiros está acima do peso e 20% dos adultos estão obesos**. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/46485-mais-da-metade-dos-brasileiros-esta-acima-do-peso>. Acesso em: 02 ago. 2020.

PRESHAW, P.M., BISSETT, S. M. Periodontitis: Oral complication of diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 42, n. 4, p. 849-67, dez. 2013.

SCHOEMAKER, M. H., KLEEMANN, R., MORRISON, M. C. A casein hydrolysate-based formulation attenuates obesity and associated non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis in LDLr^{-/-}.Leiden mice. **PLoS One**, v. 12, n. 7, jul. 2017.

SU, Y., WANG, D., XUAN, D., NI, J., LUO, S. Periodontitis as a novel contributor of adipose tissue inflammation promotes insulin resistance in a rat model. **J Periodontol** v. 84, n. 11, p. 1617-1626, nov. 2013.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo/ Process CEUA – 029/2018

Protocolo UEPG – 7707/2018

Título – . “Influência da caseína nas alterações hepáticas e cardíacas em ratos submetidos a uma dieta de cafeteria”

Interessado – Dionizia Xavier Scomparin e Karoline Rodrigues Pasqualoto

e-mail: scomparindio@hotmail.com

Data de Entrada – 24/07/2018

Resultado: Aprovado

Considerações

A comissão de Ética no Uso de animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa (CEUA-UEPG) certifica que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa acima especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA), estabelecidas pelo Conselho Nacional para fins de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal. Dessa forma, fica autorizada a utilização de 48 ratos machos e 48 ratas fêmeas de 21 dias, totalizando 96 animais para a execução desse projeto.

Ponta Grossa, 28 de agosto de 2018

Profa. Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UEPG