



**DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PERIODONTIA**

**GLAUCIA SANTOS ZIMMERMANN**

**AVALIAÇÃO DE ADIPOCITOCINAS EM PACIENTES OBESOS  
COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL**

Guarulhos

2011

**GLAUCIA SANTOS ZIMMERMANN**

**AVALIAÇÃO DE ADIPOCITOCINAS EM PACIENTES OBESOS  
COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL**

Tese apresentada à Universidade Guarulhos para obtenção do  
título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Periodontia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Poliana Mendes Duarte

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marta Ferreira Bastos

Guarulhos

2011

Z75a ZIMMERMANN, Glauca Santos  
Avaliação de adipocitocinas em pacientes obesos com e sem  
doença periodontal / Glauca Santos Zimmermann. Guarulhos,  
2011.

58 f. : il. ; 31 cm

Dissertação (Doutorado em Odontologia) - Centro de pós-  
graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, 2011.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Poliana Mendes Duarte

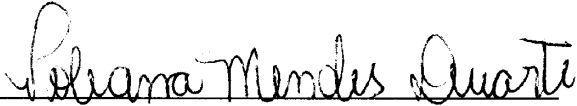
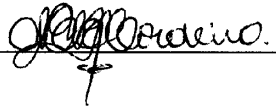
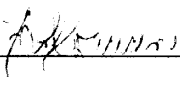
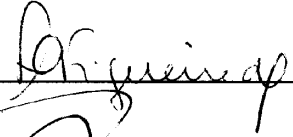
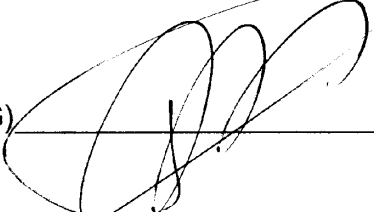
Bibliografia: 58 f.

1. obesidade; 2. periodontite crônica; 3. adipocitocinas; 4.  
leptina; 5. adiponectina; 6. resistina; 7. ensaio imunoenzimático I.  
Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD 22<sup>st</sup> 617.69

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, intitulada "NÍVEIS LOCAIS E CIRCULANTES DE ADIPOCITOCINAS EM INDIVÍDUOS OBESOS E COM PESO NORMAL PORTADORES DE PERIODONTITE CRÔNICA" em sessão pública realizada em 13 de Dezembro de 2011 considerou a candidata Glauca Santos Zimmermann aprovada.

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

1. Profa. Dra. Poliana Mendes Duarte (UnG) 
2. Profa. Dra. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro (UFSC) 
3. Profa. Dra. Marinella Holzhausen (FOUSP) 
4. Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG) 
5. Prof. Dr. Jamil Awad Shibli (UnG) 

Guarulhos, 13 de Dezembro de 2011.

**AO MEU PAI, GUIDO CARDOSO ZIMMERMANN,  
POR ME APRESENTAR A LEITURA DE FORMA APAIXONADA E SEM  
PRECONCEITOS,  
PELO MODELO DE RETIDÃO,  
E PELO CARINHO QUE SINTO SEMPRE COMIGO.**

**AO MEU SOBRINHO MATHEUS ZIMMERMANN BEPLER,  
POR TORNAR UM POR DO SOL NO TRAPICHE DO MANGUE  
UM “PESTÁCULO” AINDA MAIOR!!! TE AMO MUITO!!!**

**DEDICO CARINHOSAMENTE ESTE TRABALHO.**

**"ESPALHE QUE O AMOR NÃO É BANAL. E QUE, EMBORA ESTEJAM DISTORCENDO O  
SENTIDO VERDADEIRO DELE NOS TEMPOS MODERNOS DE HOJE, ELE EXISTE E É O  
INGREDIENTE MAIS IMPORTANTE DA VIDA, A PRÓPRIA PORÇÃO MÁGICA DA  
FELICIDADE".  
MENINO...DESEJO SEUS DESEJOS COMO MEUS DESEJOS...!!!!!!**

**MÁRIO QUINTANA**

**AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

A minha orientadora, Professora Poliana Mendes Duarte, que possui um nível de disponibilidade e dedicação aos orientados que ultrapassa, e muito, as obrigações de um orientador. Sua paixão pela ciência, senso crítico, disciplina, organização e honestidade em suas pesquisas, são contagiantes. Que todos nós, teus orientados, possamos seguir teus passos e te fazer, um dia, sentir por nós o orgulho que sentimos por ti.

Ao meu namorado Rafael Rosa, pela paciência com as minhas variações de humor, por compreender a minha ausência freqüente e pelos maravilhosos momentos juntos.

A minha mãe, Marcilani Maria Zimmermann, pelo esforço imenso em compreender e aceitar as minhas escolhas profissionais. Pelo exemplo de superação e determinação.

A minha tia Nani (Eliane Cardoso Zimmermann Michels), pela companhia agradável nas idas e vindas de carro e incentivo constante.

As minhas crianças, Gustavo, Júlia, Amanda, Maria, Gabi, por me trazerem de volta, com sua pureza, o equilíbrio que me fugiu em muitos momentos nessa etapa da minha vida. E sem cobranças. Adoro vocês.

As minhas secretárias Nete e Lele, pela maneira carinhosa e especial que cuidam de mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela vida.

A todos os professores do Centro de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão do Curso de Odontologia da Universidade Guarulhos, Magda Feres, José Augusto Rodrigues, Luciene Cristina de Figueiredo, Marcelo de Faveri, Poliana Mendes Duarte, Jamil Awad Shibli, André Figueiredo Reis, Alessandra Cassoni, Ferreira César Augusto Galvão Arrais e Marta Ferreira Bastos pelos conhecimentos repassados e pelo exemplo de condução de um programa de pós graduação com seriedade e qualidade. É de profissionais assim como vocês que nosso país precisa para ter reconhecimento no campo da ciência.

Ao aluno de iniciação científica Tiago Eduardo Dias Gonçalves, por toda a ajuda na clínica e no laboratório e pelas muitas risadas.

Aos amigos que fiz na clínica, Maria Josefa Mestnik, Rafael de Oliveira Dias, Raphael Andreto Dias, Tatiana Onuma , Luciana Aparecida de Gouveia Cardoso, Jadson Almeida Lima, Vanessa Renata Santos da Silva, Antônio Carlos Garcia de Oliveira, Lucas Furtado Hypólito Gonçalves, Joyce Pinho Bezerra e Geisla Mary Silva Soares, por terem tornado meus dias mais alegres.

A Cíntia Lobo, Cristina Zoucas, Izilvânia Quinderé Barreto, Bianca Pereira Martins, Joselmo W. Duarte e demais funcionários da UnG, pelo apoio e serviços prestados sempre com muita alegria, simpatia e amizade.

Aos colegas de turma de Doutorado, Adriana Cutrim de Mendonça, Daniel Sanchez Ferrari, Fábio Matos Chiarelli, Ivan Borges Júnior, Paulo Yataro Kawakami, Stella de Noronha Campos Mendes e Tânia Rocha Cabral Ribas, pelas opiniões expressadas, pelas críticas e pelos elogios, pelo crescimento em conjunto.

Aos pacientes que participaram desse estudo, por terem contribuído para a evolução da pesquisa científica no Brasil.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização deste projeto.

A Universidade Federal de Santa Catarina, em especial aos meus colegas de disciplina, Professores Doutores Ricardo de Souza Magini, Marco Aurélio Bianchini e Mário Vinícius Zendron, por permitirem o meu afastamento me possibilitando cursar este programa.



## RESUMO

**Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis locais e circulantes de adipocitocinas (resistina, adiponectina, leptina, fator de necrose tumoral [TNF]- $\alpha$  e interleucina [IL] -6) em indivíduos obesos e de peso normal com periodontite crônica.

**Material e métodos:** Obesos sem periodontite (n = 18), obesos com periodontite crônica (n = 20), indivíduos com peso normal sem periodontite (n = 20), e com peso normal com periodontite crônica (n = 20), foram incluídos neste estudo. Os níveis de adipocitocinas no soro e no fluido gengival foram avaliados por ELISA.

**Resultados:** No soro, os níveis de resistina foram maiores, enquanto os níveis de adiponectina foram menores nos grupos com periodontite do que nos periodontalmente saudáveis (p <0,05). Indivíduos PNPS apresentaram os menores níveis de leptina (p <0,05). Indivíduos obesos demonstraram maiores níveis de TNF- $\alpha$  em sítios rasos e profundos do que indivíduos com peso normal (p <0,05). A resistina soro estava negativamente correlacionada com a adiponectina sérica e positivamente correlacionada com parâmetros séricos de IL-6 e clínicos (p <0,05). A adiponectina sérica demonstrou correlações negativas com os parâmetros clínicos (p <0,05). A leptina sérica estava positivamente correlacionada com a concentração de resistina e TNF- $\alpha$  em sítios rasos, profundidade de sondagem e índice de massa corporal (IMC, p <0,05). O TNF- $\alpha$  no soro apresentou uma correlação positiva com o IMC (p <0,05).

**Conclusões:** A periodontite, mais que a obesidade, influenciou os níveis circulantes da maioria das adipocitocinas em favor da pró-inflamação enquanto a obesidade aumentou os níveis de TNF- $\alpha$  no fluido gengival.

**Palavras-chave:** obesidade, periodontite crônica, adipocitocinas, leptina, adiponectina, resistina, ensaio imunoenzimático.

## ABSTRACT

**Aim:** To evaluate the local and circulating levels of adipocytokines (resistin, adiponectin, leptin, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$  and interleukin [IL]-6) in obese (O) and normal weight (NW) subjects with chronic periodontitis (CP).

**Methods:** Periodontal and anthropometric measurements were obtained. NW non-periodontitis (NP) (n=20), NWCP (n=20), ONP (n=18) and OCP (n=20) subjects were enrolled in this study. Gingival crevicular fluid (GCF) and serum levels of adipocytokines were evaluated by ELISA.

**Results:** In serum, resistin levels were higher while adiponectin levels were lower in periodontitis than in non-periodontitis groups ( $p < 0.05$ ). NWNP subjects presented the lowest leptin levels ( $p < 0.05$ ). ONP and OCP subjects demonstrated higher TNF- $\alpha$  levels in periodontal sites than NWNP and NWCP subjects ( $p < 0.05$ ). Serum resistin negatively correlated with serum adiponectin and positively correlated with serum IL-6 and periodontal parameters ( $p < 0.05$ ). Serum adiponectin demonstrated negative correlations with periodontal parameters ( $p < 0.05$ ), while serum leptin positively correlated with resistin and TNF- $\alpha$  concentration in shallow sites, probing depth and body mass index (BMI;  $p < 0.05$ ). Serum TNF- $\alpha$  presented a positive correlation with BMI ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** Periodontitis rather than obesity influenced the circulating levels of the majority of the adipocytokines in favor of pro-inflammation while obesity upregulated the local levels of TNF- $\alpha$ .

**Key-words:** obesity; chronic periodontitis; adipocytokines; leptin; adiponectin; resistin; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
1.1. Relação entre obesidade e periodontite	11
1.1.1. Estudos em animais	11
1.1.2. Estudos epidemiológicos	11
1.1.3. Estudos microbiológicos	13
1.2. Adipocitocinas	13
1.3. Papel das adipocitocinas nas doenças periodontais e nas doenças periodontais associadas à obesidade	15
1.4. Justificativa	15
<b>2. PROPOSIÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>3. ARTIGO</b>	<b>19</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>50</b>
<b>ANEXO</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O perfil microbiano oral tem seu papel bem estabelecido na literatura como o fator etiológico determinante das doenças periodontais (Socransky, 1998; Socransky & Haffajee, 2005). Entretanto, a participação de outros fatores etiológicos, agindo como predisponentes e ou modificadores do curso da doença, tem sido alvo de inúmeras investigações científicas. Entre eles, podemos mencionar o fumo e diabetes *mellitus* como fatores de risco já estabelecidos (Ronderos & Ryder, 2004). Outros fatores são apontados como indicadores de risco, como, por exemplo, a obesidade (Linden et al., 2007; Saito et al., 2005; Reeves et al., 2006).

A obesidade e o sobrepeso têm sido relacionados como fatores de risco para muitas patologias como diabetes tipo 2, hiperlipidemias, hipertensão, arteriosclerose e doenças cardiovasculares e cérebro vasculares (Kopelman, 2000). O excesso de gordura corporal costuma ser medido pelo Índice de Massa Corporal (IMC), que é dado pelo peso, em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros. Indivíduos com  $IMC > 25$  são classificados como portadores de sobrepeso enquanto àqueles com  $IMC > 30$  como obesos (WHO, 2000). A relação cintura-quadril, por sua vez, parece ser mais indicada que o IMC para direcionar o prognóstico de doenças relacionadas à obesidade, como por exemplo risco de doenças cardiovasculares. O índice cintura-quadril (ICQ) é utilizado para relacionar a gordura localizada na região abdominal e no quadril e é capaz de estimar a gordura visceral.

A Organização Mundial da Saúde estimou que o sobrepeso e a obesidade envolvam 1,7 bilhões de pessoas no mundo (Deitel, 2003), o que faz com que haja um crescente interesse em estudos que envolvam uma maior compreensão sobre os danos que eles podem causar.

No Brasil, Gomes et al. (2006) publicaram os resultados de um estudo multicêntrico para avaliar a prevalência de sobrepeso e obesidade em pacientes com diabetes tipo 2. Os autores verificaram que 75% dos indivíduos estudados estavam acima do peso, sendo um terço obeso. Os dados mais recentes sobre obesidade no Brasil foram obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), por meio da Pesquisa de Orçamentos Familiares, cujo objetivo foi analisar o consumo alimentar pessoal no Brasil. O excesso de peso atingiu cerca de metade dos homens e das mulheres e, 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres eram obesos. Ambas as

condições aumentavam de frequência até a faixa de 45 a 54 anos, no caso dos homens; e de 55 a 64 anos, entre as mulheres, para depois declinarem.

### 1.1. Relação entre obesidade e periodontite

A relação entre a obesidade e a periodontite é uma linha de pesquisa que vem sendo investigada com o objetivo de estabelecer o papel da obesidade como indicador e um possível fator de risco para as doenças periodontais.

#### 1.1.1. Estudos em animais

O primeiro estudo sobre a relação obesidade e periodontite foi publicado em 1977. Os autores demonstraram, por meio de uma avaliação histopatológica, que ratos obesos e hipertensos apresentavam uma resposta periodontal mais agressiva à irritação local (Perlstein et al., 1977). Amar et al. (2007) investigaram os efeitos da obesidade induzida pela dieta na resposta imune inata em camundongos após desafio microbiano com *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados demonstraram que a obesidade interferiu na habilidade do sistema imune inato em responder ao desafio bacteriano e aumentou a perda óssea alveolar. Outros estudos também demonstraram uma associação positiva em modelos de estudo de ratos obesos com periodontite, seja por aumento do estresse oxidativo gengival (Tomofuji et al., 2009) ou por indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias no fígado e tecido adiposo branco (Endo et al., 2010). Entretanto, Simch, Gaio & Rosing (2008) não encontraram diferenças na perda óssea alveolar entre ratos obesos e não-obesos.

#### 1.1.2. Estudos epidemiológicos

Diversos estudos transversais também demonstraram uma correlação positiva entre obesidade e doença periodontal (Saito et al., 2001; Johnson & Streckfus, 2003; Nishida et al., 2005; ).

Em 2001, Saito et al. estudaram 643 indivíduos adultos japoneses e verificaram que sujeitos com maiores ICQ e IMC possuíam um risco maior à periodontite que

aqueles com menores ICQ e IMC. Wood, Johnson & Streckfus (2003), utilizando dados do Terceiro Exame Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES III) dos Estados Unidos, encontraram uma significativa correlação entre periodontite e o IMC e o ICQ. Al-Zahrani, Bissada & Borawskit (2003) relataram que o IMC e o ICQ estavam positivamente associados com a doença periodontal, especialmente em adultos jovens com idade entre 18 e 34 anos. Quatrocentos sujeitos, divididos em dois grupos - obesos e peso normal - foram incluídos em um estudo para verificar se a obesidade estava correlacionada com a periodontite crônica diagnosticada por meio de perda óssea alveolar radiográfica. A associação, verificada por um modelo de regressão logística, foi significativa, especialmente em indivíduos jovens (Alabdulkarin et al., 2005). Nishida et al. (2005), utilizando um modelo de regressão logística simples, demonstraram que o fumo e a obesidade são indicadores de risco independentes para a periodontite, mesmo após ajuste para diversas variáveis de confundimento. Ambos os parâmetros exibiram uma relação de dose-dependência em relação ao risco para periodontite. .

Mulheres brasileiras adultas obesas apresentaram uma probabilidade significativamente maior (*odds ratio* = 2.1) de apresentar periodontite quando comparadas à mulheres com peso normal. Esses dados são de um estudo com 706 indivíduos, homens e mulheres, obesos e com peso normal, realizado em 2005, por Dalla Vecchia et al. A relação entre a obesidade e a doença periodontal foi investigada por Linden et al. (2007) em homens com idade entre 60 e 70 anos. Os autores concluíram que havia uma associação positiva entre obesidade e periodontite e que altos níveis de IMC na juventude não eram bons preditores de periodontite na idade mais avançada. Outro estudo brasileiro, numa população de mulheres, foi publicado em 2011 por Pataro et al. A periodontite foi positivamente associada com obesidade e essa associação se acentuava com o aumento da severidade da obesidade.

Corroborando os trabalhos acima citados, outros ainda encontraram uma correlação positiva entre obesidade e periodontite (Reeves et al., 2006; Linden et al., 2007; Ylöstalo et al., 2008; Kumar et al., 2009; Han et al., 2010; e Kim, Jim & Bae, 2011). Em 2010, Chaffee & Weston conduziram uma revisão sistemática com meta-análise para investigar a evidência da associação obesidade-periodontite. Os autores concluíram que essa associação positiva foi consistente e coerente, entretanto, em função da pouca qualidade dos estudos longitudinais não foi possível distinguir se a obesidade é um fator de risco para a periodontite ou se a periodontite pode aumentar o risco de ganho de peso. Outra revisão sistemática foi publicada em 2011 por Suvan et

al. Os resultados deram suporte à associação entre IMC, sobrepeso e obesidade com periodontite, apesar da magnitude dessa relação ainda permanecer obscura.

### 1.1.3. Estudos microbiológicos

Um estudo de caso-controle, realizado no Instituto Forsyth, nos Estados Unidos, foi relatado por Socransky e Haffajee (2005). De acordo com estes dados, a obesidade estava relacionada com bolsas profundas, sangramento a sondagem, acúmulo de placa, perda de inserção e, também, com um aumento na contagem e proporção de alguns patógenos periodontais, como a *Tannerella forsythia*, especialmente em obesos com IMC>35. Mais tarde, em 2009, os autores publicaram um estudo que comparou as diferenças entre a condição periodontal e a composição da microbiota subgengival em indivíduos com diferentes IMC. Os resultados demonstraram que somente a *T. forsythia* diferiu significativamente entre os grupos de IMC e apresentou taxas mais elevadas em obesos periodontalmente saudáveis e com gengivite (Haffajee & Socransky, 2009).

## 1.2. Adipocitocinas

Estudos recentes têm mostrado que o tecido adiposo, especialmente o visceral, é um importante órgão de secreção de substâncias bioativas chamadas adipocitocinas, incluindo fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , adiponectina, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, resistina e leptina (Shimomura et al., 2002; Trayhurn, 2005). Algumas dessas moléculas têm relevante papel na resposta imuno-inflamatória, e já foram reconhecidas como importantes na patogênese das periodontites.

### 1.2.1. Resistina

A resistina é uma citocina secretada pelos adipócitos e células inflamatórias circulantes que apresenta potente função na regulação do processo inflamatório. As propriedades pró-inflamatórias da resistina incluem a secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Bokarewa et al., 2005) e, o comprometimento dos efeitos anti-inflamatórios da adiponectina (Kawanami et al., 2004). O balanço na concentração dessas adipocitocinas determina o estado inflamatório vascular, o que leva a arteriosclerose via síndrome metabólica (Kawanami et al., 2004).

### 1.2.2. Adiponectina

A adiponectina, por sua vez, é uma proteína sintetizada pelo tecido adiposo branco, presente em altos níveis no soro sanguíneo com funções anti-inflamatórias. O controle da concentração plasmática da adiponectina já foi sugerido como um biomarcador útil no controle da síndrome metabólica (Ryo et al., 2004). Possui papel no controle da inflamação vascular (Kumada et al., 2004). Encontra-se reduzida em sujeitos obesos, insulino-resistentes e portadores de diabetes tipo 2 (Oh, Ciaraldi & Henry, 2007). Sua produção é inibida por fatores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6. Embora modelos experimentais tenham sugerido o papel da adiponectina como mediador inflamatório, seu significado clínico nas doenças inflamatórias ainda não está totalmente elucidado (Ouchi et al., 2011).

### 1.2.3. Leptina

A leptina é uma citocina liberada por adipócitos e, em menores quantidades, pela placenta, células T, osteoblastos e células do epitélio gástrico. Indivíduos com sobrepeso e obesidade apresentam resistência a utilização de leptina e, conseqüentemente, altos níveis dessa citocina disponíveis. Esta citocina está relacionada ao controle de ingestão de comida e ao gasto calórico (Friedman & Halaas, 1998). A leptina desempenha um papel no mecanismo de defesa do hospedeiro, seus níveis plasmáticos tem se mostrado aumentados nas infecções (Liu et al. 2005) e em resposta a estímulos pró-inflamatórios, como lipopolissacarídeos e TNF- $\alpha$  (Grunfeld et al., 1996; Kim, 2010).

Dentre suas várias ações biológicas, a leptina apresenta a propriedade de indução da proliferação de células mononucleares sanguíneas, polimorfonucleares (PMN), macrófagos e secreção do antagonista da IL-1 por monócitos, sendo aceita como uma adipocitocina pró-inflamatória (Ouchi et al., 2011). Recentemente um estudo concluiu que a leptina atua como um importante modulador da diferenciação de células-tronco dentais humanas (Um et al., 2011).



#### 1.2.4. TNF- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida, principalmente, por monócitos e macrófagos e tem um papel central nas doenças autoimunes e inflamatórias. A expressão de TNF- $\alpha$  está aumentada no tecido adiposo de modelos experimentais animais de obesidade e diabetes tipo 2 (Ouchi et al., 2011). A concentração de TNF- $\alpha$  circulante é maior em indivíduos com obesidade abdominal que naqueles com obesidade periférica (Tsigos et al., 1999). A redução de peso está associada a redução dos níveis séricos de TNF- $\alpha$  (Ziccardi et al., 2002).

#### 1.2.5. IL-6

A IL-6 é também uma citocina pró-inflamatória que pode estar envolvida na obesidade relacionada a resistência a insulina. Estima-se que um terço da IL-6 circulante é produzida pelo tecido adiposo, e é possível que o aumento da sua secreção na obesidade contribua para a disfunção metabólica (Ouchi et al., 2011).

### 1.3. Papel das adipocitocinas nas doenças periodontais e nas doenças periodontais associadas à obesidade

A possível modulação da inflamação periodontal por adipocitocinas vem sendo investigada. Entretanto, o mecanismo de plausibilidade biológica que conecta a obesidade à periodontite ainda necessita de maiores investigações.

O papel da resistina no processo inflamatório periodontal ainda não está totalmente esclarecido (Pischon et al., 2007). Saito et al. (2008) avaliaram os níveis séricos de resistina e adiponectina em mulheres japonesas com e sem periodontite (moderada e avançada) e observaram que as taxas de resistina estavam associadas à presença de periodontite. Similarmente, Furugen et al. (2008) observaram que os níveis circulantes de resistina estavam positivamente associados à condição periodontal em idosos japoneses. Até o momento, não há nenhum estudo avaliando localmente os níveis de resistina no periodonto.

Yamaguchi et al. (2007), em um estudo *in vitro*, sugeriram que a adiponectina pode agir como um regulador negativo da formação de osteoclastos, estimulada pelo receptor toll 4 (TLR-4) e pelo ligante do receptor do ativador kappa- $\beta$  na doença

periodontal (RANKL). Furugen et al. (2008) e Saito et al. (2008) não encontraram diferenças significantes no nível sérico de adiponectina, IL-6 e TNF- $\alpha$  entre indivíduos com e sem periodontite, embora houvesse uma tendência para menores níveis desta adipocitocina em pacientes com periodontite.

Embora não existam adipócitos no tecido gengival, Jonhson & Serio (2001) demonstraram que altas concentrações de leptina estão presentes no tecido gengival saudável em comparação ao doente. Assim, foi sugerido que a leptina poderia ocupar um papel importante no mecanismo de defesa do tecido gengival. Bozkurt et al. (2006) sugeriram que os níveis de leptina no fluido gengival eram mais altos em sítios sem sinais clínicos de doença periodontal em indivíduos não-fumantes. Mais tarde, Karthikeyan & Pradeep (2007a) observaram que, embora exista uma menor concentração de leptina do fluido crevicular de sítios com gengivite e periodontite crônica em relação aos indivíduos saudáveis, a concentração dessa citocina é mais alta no plasma de indivíduos com doença periodontal. Em outro estudo, Karthikeyan & Pradeep (2007b) também observaram uma menor concentração de leptina no fluido crevicular de sítios com gengivite e periodontite em relação aos sítios saudáveis, corroborando os achados de Jonhson & Serio e Bozkurt et al. Shimada et al (2010) verificaram que o tratamento periodontal é capaz de reduzir os níveis séricos de leptina, IL-6 e proteína C-reativa.

Em geral, TNF- $\alpha$  tem sido encontrado em níveis elevados nos tecidos e fluido gengival de indivíduos com periodontite e, mais ainda, em grupos de riscos para as doenças periodontais como diabéticos e fumantes (Gamonal et al., 2000; Gamonal et al., 2003; Kurtiş et al., 2005). Lundin et al. (2004) estudaram em 32 indivíduos obesos jovens (13 a 24 anos) a relação entre o IMC e o nível de TNF- $\alpha$  no fluido gengival. Os autores observaram que indivíduos com  $IMC \geq 40$  kg/m<sup>2</sup> apresentavam maiores níveis de TNF- $\alpha$  em relação aos com  $IMC < 40$  kg/m<sup>2</sup>. De maneira interessante, os autores demonstraram que o nível de TNF- $\alpha$  também esteve positivamente correlacionado com o IMC mesmo em indivíduos sem presença de bolsas periodontais. Khanna & Mali (2010), ao estudar indivíduos não-diabéticos, encontraram um aumento nos níveis séricos de TNF- $\alpha$  e na severidade da doença periodontal em sujeitos com maior IMC. Entretanto, essa associação não foi verificada no trabalho de Saxlin et al. (2009).

O estudo acima citado (Saxlin et al., 2009) sugeriu que a IL-6 pode ser um potencial mediador da conexão entre o peso corporal e a infecção periodontal numa população adulta. Alguns estudos tem avaliado o comportamento dessa citocina após

tratamento periodontal e, de modo geral, tem mostrado uma diminuição nos seus níveis (Marcaccini et al., 2009; Nakajima et al., 2010; Shimada et al., 2010; Zuza et al., 2011).

#### 1.4. Justificativa

Após revisão da literatura, foi possível observar que existem poucas informações sobre o papel local e sistêmico das adipocitocinas envolvidos na inter-relação obesidade e periodontite. Embora vários estudos transversais tenham demonstrado clinicamente que a obesidade é um indicador de risco para as doenças periodontais, poucas investigações avaliaram, simultaneamente, os níveis séricos e do fluido gengival de adipocitocinas em indivíduos obesos com periodontite. A maioria dos estudos sobre os níveis de adipocitocinas em indivíduos com periodontite avaliou o soro ou o fluido gengival separadamente, o que impede uma melhor compreensão da conexão entre o componente sistêmico e local no mecanismo imuno-inflamatório envolvido nos tecidos periodontais de sujeitos obesos. Além disso, os estudos existentes avaliaram um número reduzido de adipocitocinas e, uma vez que, os mediadores inflamatórios trabalham em rede e não isoladamente, um maior entendimento do processo só é possível com a avaliação de vários biomarcadores conjuntamente. O melhor entendimento dos mecanismos imuno-inflamatórios presentes na periodontite relacionada à obesidade é importante para sugestão de futuras abordagens terapêuticas específicas voltadas a esse possível grupo de risco para as periodontites.

## **2. PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis locais e circulantes de resistina, adiponectina, leptina, TNF- $\alpha$  e IL-6 em indivíduos obesos e com peso normal portadores de periodontite crônica, comparados aos periodontalmente saudáveis.

### **3. ARTIGO**

**Local and circulating levels of adipocytokines in obese and normal weight subjects with chronic periodontitis** (artigo formatado para envio ao *Journal of Clinical Periodontology*)

**Running title:** Adipocytokines in obese subjects with periodontitis

**Aim:** To evaluate the local and circulating levels of adipocytokines (resistin, adiponectin, leptin, tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$  and interleukin [IL]-6) in obese (O) and normal weight (NW) subjects with chronic periodontitis (CP).

**Methods:** Periodontal and anthropometric measurements were obtained. NW non-periodontitis (NP) (n=20), NWCP (n=20), ONP (n=18) and OCP (n=20) subjects were enrolled in this study. Gingival crevicular fluid (GCF) and serum levels of adipocytokines were evaluated by ELISA.

**Results:** In serum, resistin levels were higher while adiponectin levels were lower in periodontitis than in non-periodontitis groups ( $p<0.05$ ). NWNP subjects presented the lowest leptin levels ( $p<0.05$ ). ONP and OCP subjects demonstrated higher TNF- $\alpha$  levels in periodontal sites than NWNP and NWCP subjects ( $p<0.05$ ). Serum resistin negatively correlated with serum adiponectin and positively correlated with serum IL-6 and periodontal parameters ( $p<0.05$ ). Serum adiponectin demonstrated negative correlations with periodontal parameters ( $p<0.05$ ), while serum leptin positively correlated with resistin and TNF- $\alpha$  concentration in shallow sites, probing depth and body mass index (BMI;  $p<0.05$ ). Serum TNF- $\alpha$  presented a positive correlation with BMI ( $p<0.05$ ).

**Conclusion:** Periodontitis rather than obesity influenced the circulating levels of the majority of the adipocytokines in favor of pro-inflammation while obesity upregulated the local levels of TNF- $\alpha$ .

**Key-words:** obesity; chronic periodontitis; adipocytokines; leptin; adiponectin; resistin; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**Conflict of interest and source of funding statement:** No conflict of interest to declare. This study was supported by São Paulo State Research Foundation (FAPESP, São Paulo, São Paulo, Brazil, # 2010/01930-3).

**Scientific rationale for study:** Although cross-sectional studies have shown an evident relationship between periodontitis and obesity, the biological molecular mechanisms involved in this link are unclear. **Principal findings:** Obesity and periodontitis can alter independently the local and systemic levels of adipocytokines, mostly in favor of pro-inflammation. Periodontitis adversely influenced the circulating levels of the majority of the adipocytokines, while obesity upregulated the periodontal levels of TNF- $\alpha$ . **Practical implications:** Periodontitis may play a role in the systemic inflammatory burden by upregulation of pro-inflammatory adipocytokines and obesity may put periodontal sites at risk of periodontitis development.

**Acknowledgements:** The authors thank São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil) for its financial support (# 2010/01930-3).

## **Introduction**

Evidence indicates that obesity, a major public-health problem, is related to a chronic low-grade systemic inflammation, which contributes to the development of obesity-linked disorders including insulin resistance, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, dyslipidaemia and metabolic syndrome (Ouchi et al. 2011). Periodontitis is an infectious-inflammatory disease that can be influenced by environmental and systemic factors such as smoking, diabetes, immune disorders and obesity. Recent meta-analyses have demonstrated a positive association of overweight/ obesity with periodontitis. The authors suggested an increase in the prevalence of obesity and a higher body mass index (BMI) in periodontitis subjects as well as greater mean clinical attachment loss in obese individuals (Chaffee & Weston 2010, Susan et al. 2011).

The mechanisms that link obesity to periodontal diseases (Chaffee & Weston 2010, Suvan et al. 2011) are probably related to exacerbated pro-inflammatory changes in periodontal tissues. White adipose tissue, especially visceral tissue, secretes adipocytokines that lead to a chronic inflammatory state and altered immune responses. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine that provides an evident link between obesity and inflammation (Hotamisligil et al. 1993) and seems to play an important role in the progression of periodontitis (Preshaw & Taylor 2011). IL-6 also has pro-inflammatory biological functions and is involved in both obesity (Ouchi et al. 2011) and periodontitis (Preshaw & Taylor 2011). Leptin is an adipose tissue-secreted protein that regulates food intake and energy spending (Friedman and Halaas 1998) and stimulates the production of other pro-inflammatory cytokines (Lord et al. 1998, Kiguchi et al. 2009, Ouchi et al. 2011). Studies have demonstrated associations between severity of periodontitis and local and circulating levels of leptin (Johnson & Serio 2001, Karthikeyan & Pradeep 2007a). Although originally identified in adipose



tissue, resistin is also produced by immune cells and, therefore, is related to the activation of inflammatory processes. The pro-inflammatory properties of resistin include the secretion of TNF- $\alpha$  and IL-6 (Bokarewa et al. 2005) and, the impairment of the anti-inflammatory effects of adiponectin (Kawanami et al. 2004). Increased resistin serum levels have been associated with periodontitis (Saito et al. 2008, Furugen et al. 2008).

In addition to the aforementioned pro-inflammatory adipocytokines, adipose tissues also secrete some anti-inflammatory factors, such as adiponectin. Plasma levels of adiponectin are decreased in obese individuals, compared with normal weight persons (Ryo et al. 2004). Furthermore, evidence suggests a trend towards decreased adiponectin serum levels (Saito et al. 2008, Furugen et al. 2008) and reduced adiponectin function in periodontitis (Yamaguchi et al. 2010).

Although cross-sectional studies have assessed the relationship between periodontitis and obesity, few investigations have evaluated the levels of adipocytokines in the gingival crevicular fluid (GCF) and serum concurrently in obese subjects with periodontitis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the local and circulating levels of adipocytokines (resistin, adiponectin, leptin, TNF- $\alpha$  and IL-6) in obese and normal weight subjects with chronic periodontitis, when compared to non-periodontitis ones. The hypothesis was that obese subjects with periodontitis would present the highest circulating and local levels of pro-inflammatory adipocytokines.

## **Material and Methods**

### **Subject population**

Seventy-eight subjects (age range: 31 to 65 years), including normal weight and obese individuals with and without chronic periodontitis, were selected among 784 subjects

screened from the population referred to the Dental Clinic of Guarulhos University, from July 2009 until July 2011. Detailed medical and dental records were obtained. Subjects who fulfilled the following inclusion/exclusion criteria were invited to participate in the study. All eligible subjects were thoroughly informed of the nature, potential risks and benefits of their participation in the study and signed their informed consent. This study protocol was previously approved by Guarulhos University's Ethics Committee in Clinical Research.

### **Inclusion and exclusion criteria**

All subjects were > 30 years old, had at least 15 teeth excluding third molars and teeth with advanced decay. Exclusion criteria were pregnancy, lactation, current and former smoking, periodontal therapy in the previous 12 months, antimicrobial, anti-inflammatory and immunosuppressive therapies during the previous 6 months, regular use of mouthrinses containing antimicrobials, systemic conditions that could affect the progression of periodontitis (e.g. diabetes, immunological disorders), presence of periapical pathology and orthodontic appliances.

### **Clinical examinations**

Clinical examinations were performed by one examiner (G. S. Z.), calibrated as previously described (Santos et al. 2010). The intra-examiner variability was 0.22 mm for probing depth (PD) and 0.26 mm for clinical attachment level (CAL). The clinical parameters registered dichotomously, i.e. bleeding on probing (BoP), suppuration (SUP) and marginal bleeding (MB) were calculated by the Kappa-Light test and the intra-examiner agreement was > 0.85. The following parameters were assessed at six sites of all teeth, excluding third molars (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual, disto-lingual), using a manual periodontal probe (UNC15,

Hu-Friedy, Chicago, IL, USA): visible plaque accumulation (PI) (Ainamo & Bay 1975; presence or absence), MB (presence or absence) BoP (presence or absence), SUP (presence or absence), PD (mm) and CAL (mm).

### **Obesity definition and experimental groups**

Anthropometric measurements included weight (kg), height (m), waist (cm) and hip circumferences (cm). Body mass index (BMI) was calculated as the weight divided by the square of height ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). The waist-hip ratio (WHR) was calculated as the ratio of waist to hip circumference. Obesity was defined as  $\text{BMI} \geq 30$  and  $< 40 \text{ kg}/\text{m}^2$  and concomitant  $\text{WHR} \geq 0.85$  for women and  $\text{WHR} \geq 0.90$  for men. Normal weight was defined as BMI ranging from 20 to  $24.9 \text{ kg}/\text{m}^2$  and WHR lower than those for obesity (WHO, 2000).

Based on periodontal and anthropometric measurements, subjects were divided into one of the following groups:

- Normal weight non-periodontitis (NWNP; n=20): Normal weight subjects with no history of periodontitis and no sites with PD and CAL  $> 3$  mm concomitantly.
- Normal weight chronic-periodontitis (NWCP; n=20): Normal weight subjects with generalized chronic periodontitis (Armitage 1999), presenting  $\geq 30\%$  of the sites with PD and concomitant CAL  $\geq 4$  mm and, a minimum of four teeth with at least one site with PD and CAL  $\geq 5$  mm.
- Obese non-periodontitis (ONP; n=18): Obese subjects with no history of periodontitis and no sites with PD and CAL  $> 3$  mm concomitantly.
- Obese chronic-periodontitis (OCP; n=20): Obese subjects with generalized chronic periodontitis (Armitage 1999), presenting  $\geq 30\%$  of the sites with PD and

concomitant  $CAL \geq 4$  mm and, a minimum of four teeth with at least one site with PD and  $CAL \geq 5$  mm.

### **GCF and serum sampling**

GCF was sampled one week after clinical examination so as not to alter the nature of the GCF. Four non-contiguous shallow (PD  $\leq$  3mm without BoP and/or MB) sites per non-periodontitis subject and two non-contiguous shallow and two non-contiguous deep sites (PD and CAL  $\geq$  5mm with BoP) per periodontitis subject were randomly chosen for GCF sampling. GCF was collected using paper strips and its volume measured as previously described (Santos et al. 2010). Two strips were inserted in each site 20 seconds apart. Strips contaminated with blood were discarded. The two strips from the same site were immediately placed into the same microcentrifuge tubes and stored at -80°C for subsequent assays. Peripheral blood samples were collected into an appropriate tube (Serum BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tubes, BD, Franklin Lakes, NJ, USA). The serum was separated from blood by centrifugation (10 min at 1,300 rpm) immediately after collection and, stored in aliquots at -80°C.

### **Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)**

GCF samples and aliquots of serum were analyzed by ELISA using commercially available kits for resistin, adiponectin, leptin (Quantikine; R&D Systems Inc., MN, USA), TNF- $\alpha$  and IL-6 (HS, Quantikine; R&D Systems Inc., MN, USA). The tubes containing GCF were vortexed for 30s and centrifuged for 5 min at 1,500 rpm in order to elute. Assays were carried out according to the manufacturer's recommendations using human recombinant standards. The optical density was measured at 450 or 490 nm, according to each adipocytokine recommendation. GCF results were reported as total amount (ng or pg/site) and concentration (total amount divided by the total volume of GCF in each site [ng or pg/ $\mu$ l]). The serum results were reported as the concentration

of each adipocytokine per milliliter of serum (ng or pg/ml). Samples with adipocytokine levels below the detection limit of the assay were scored as 0.

### **Statistical Analysis**

The statistical analysis was performed using a software program (BioEstat 5.0, Sociedade Civil Mamiarauá, CNPq, Tefé, AM, Brazil) by a blinded biostatistician. Data were examined for normality by Kolmogorov-Smirnov test. Since the data achieved normality, parametric methods were used. The percentage of sites with visible plaque accumulation, BoP and SUP, the mean PD and CAL, BMI and WHR were computed for each subject. GCF volume and levels of adipocytokines in GCF were evaluated in subsets of shallow and deep sites. Clinical parameters and adipocytokine levels were averaged across subjects. Subsequently, all data were averaged among groups. The significance of differences among the four experimental groups was compared using ANOVA. When there were significant differences by ANOVA, a pair-wise comparison was performed by Bonferroni test. The Unpaired Student t test was used to compare the levels of adipocytokines in deep sites between normal weight and obese periodontitis subjects. The Paired Student t test was used to compare the levels of adipocytokines between deep and shallow sites within normal weight and obese periodontitis subjects. The Chi-Square test was used to detect differences in the frequencies of gender between groups. Pearson correlation tested possible relationships between serum adipocytokines with their concentration in GCF and clinical parameters. The significance level was set at 5%.

## Results

### Clinical, anthropometric and demographic

There were no differences among groups for gender and number of teeth ( $p>0.05$ ). The chronic periodontitis groups presented the highest mean age ( $p<0.05$ ). As expected, all periodontal parameters were higher in periodontitis groups than non-periodontitis groups ( $p<0.05$ ). Furthermore, BMI and WHR were higher in obese groups than normal weight groups ( $p<0.05$ ; Table 1).

### Adipocytokines

#### *Serum*

Resistin serum levels were higher while adiponectin serum levels were lower in periodontitis groups than the non-periodontitis groups ( $p<0.05$ ). NWNP subjects presented the lowest levels of leptin ( $p<0.05$ ). ONP subjects exhibited the highest levels of TNF- $\alpha$  ( $p<0.05$ ). There were no differences in the serum levels of IL-6 among groups ( $p>0.05$ ; Table 2).

#### *GCF*

In shallow sites (Table 3), resistin levels were higher in NWNP subjects than those from the other groups ( $p<0.05$ ). Obese subjects with and without periodontitis demonstrated higher TNF- $\alpha$  levels than normal weight subjects ( $p<0.05$ ). The IL-6 concentration was higher in the NWNP than both obese groups ( $p<0.05$ ). There were no differences among groups in adiponectin and leptin levels in shallow sites ( $p>0.05$ ). Adiponectin and leptin were not detected in any sample of GCF of NWNP subjects (Table 3).

In deep pockets (Table 4), TNF- $\alpha$  levels were higher in OCP group than NWCP group ( $p < 0.05$ ). Adipocytokine levels did not differ between shallow and deep sites in NWCP subjects ( $p > 0.05$ ). Conversely, total amount of resistin and TNF- $\alpha$  were higher in deep than shallow sites of OCP subjects ( $p < 0.05$ ; Table 5).

#### *Correlations*

Serum resistin presented slight negative correlation with serum adiponectin and, positive correlations with serum IL-6, PD, CAL and BoP ( $p < 0.05$ ). There were slight negative correlations between serum adiponectin and periodontal parameters ( $p < 0.05$ ). Serum leptin was positively correlated with the concentration of resistin and TNF- $\alpha$  in shallow sites, PD and BMI ( $p < 0.05$ ). Serum TNF- $\alpha$  presented slight positive correlations with serum IL-6, adiponectin concentration in deep sites and BMI ( $p < 0.05$ ; Table 6).



## Discussion

The elucidation of the local and systemic roles of key adipocytokines may lead to a better understanding of the actual link between periodontitis and obesity. This study evaluated, for the first time, the local and circulating levels of resistin, adiponectin, leptin, TNF- $\alpha$  and IL-6 in a well-characterized population of obese and normal weight subjects with and without chronic periodontitis. The periodontitis subjects presented generalized chronic periodontitis and, the obese subjects were characterized based on WHR and BMI jointly, which has shown superiority to BMI alone in predicting obesity-linked disorders. Overall, the results demonstrated that the GCF and/or serum levels of some adipocytokines were altered in obese and/or periodontitis subjects when compared to NWNP subjects. These findings indicate that obesity and periodontitis can independently alter the local and systemic levels of adipocytokines, mostly in favor of pro-inflammation. Therefore, the hypothesis that obese subjects with periodontitis would present the highest circulating and local levels of pro-inflammatory adipocytokines was rejected.

In this study, serum resistin levels were upregulated in both periodontitis groups, suggesting that periodontal inflammation may modulate the systemic levels of this pro-inflammatory marker independent of obesity. Consistently, serum resistin was positively correlated with periodontal parameters and serum IL-6. These results are somewhat supported by previous studies in which subjects with periodontitis showed significantly higher serum resistin concentration (Saito et al. 2008, Furugen et al. 2008). One possible explanation for these findings is that peripheral mononuclear cells and macrophages, rather than adipocytes, release resistin in humans since this cytokine is associated with the activation of the inflammatory process and expression of IL-6 by these cells (Ouchi et al. 2011). In contrast, in this study, GCF from shallow sites of

NWNP subjects presented the highest resistin levels. Since resistin presents pro-inflammatory properties and was higher in the serum of periodontitis subjects, this is an unexpected result that should be further investigated. Unfortunately, to date, there has been no study assessing the periodontal levels of resistin. However, a similar phenomenon was observed for leptin in a previous study (Karthikeyan & Pradeep 2007a), in which leptin levels in GCF and serum presented an inverse performance.

In this study, the circulating levels of adiponectin were lower in both chronic periodontitis groups. Furthermore, serum adiponectin showed a negative association with clinical parameters. Data indicate that the circulating levels of this anti-inflammatory marker are influenced by periodontal inflammation rather than the obesity condition, as observed for resistin. These results are in line with a previous investigation that showed lower serum levels of the active form of adiponectin in subjects with periodontal pockets (Nagano et al. 2011). In addition, previous studies have demonstrated that serum adiponectin is negatively associated with attachment loss and slightly lower in periodontitis subjects than healthy controls (Saito et al. 2008, Furugen et al. 2008). Worthy of note is that serum adiponectin was negatively correlated with serum resistin. In fact, resistin directly counters the anti-inflammatory effects of adiponectin on vascular endothelial cells (Kawanami et al. 2004). Collectively, these findings reinforce the anti-inflammatory biological functions of adiponectin, which are related to the suppression of pro-inflammatory mediators, stimulation of anti-inflammatory cytokines and the control of inflammation (Kumada et al. 2004, Ouchi et al. 2011). A recent study associated periodontally-diseased tissues with a reduced expression of adiponectin receptors and, consequently, decreased adiponectin effects (Yamaguchi et al. 2010). However, in this study, no significant differences in adiponectin GCF levels were observed among groups and between

pocket categories. Therefore, it is suggested that the actual role of adiponectin in periodontitis may be assessed by means of gene expression analysis, immunohistochemistry and/or high sensitivity ELISA.

With regard to leptin, NWNP subjects showed the lowest serum levels of this pro-inflammatory adipocytokine. Furthermore, serum leptin was positively correlated with PD and BMI. Therefore, it is evident that both periodontitis and obesity could increase the circulating levels of leptin. Although leptin regulates feeding behavior, obese individuals have high levels of leptin without the expected anorexic responses, due to leptin resistance (Friedman & Halaas 1998). Furthermore, since leptin plays a role in host defense mechanisms, the plasma levels of leptin have been reported to increase in infections (Liu et al. 2005) and in response to pro-inflammatory stimuli, such as lipopolysaccharide and TNF- $\alpha$  (Grunfeld et al. 1996). This could explain the high levels of leptin observed in the serum of periodontitis subjects in this and other investigations (Karthikeyan & Pradeep 2007a, Shimada et al. 2010). In contrast with previous studies in which leptin levels decreased progressively in GCF as periodontal disease increased (Karthikeyan & Pradeep 2007a, Karthikeyan & Pradeep 2007b), in this study, there were no differences among groups regarding GCF leptin levels. The ELISA sensitivity and methods of GCF collection may explain differences among studies. Interestingly, serum leptin was positively correlated with two pro-inflammatory adipocytokines concentration in shallow pockets (e.g. resistin and TNF- $\alpha$ ). A recent investigation demonstrated that leptin is able to enhance *Prevotella intermedia* LPS-induced TNF- $\alpha$  production (Kim 2010). Therefore, it could be speculated that high circulating levels of leptin may put shallow sites at risk of further periodontal destruction via TNF- $\alpha$  and resistin production. Further analysis should be performed to confirm this hypothesis.

TNF- $\alpha$  and IL-6 are well-recognized pro-inflammatory cytokines produced by adipocytes and immune cells. Evidence indicates that the systemic levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  are increased in obese individuals (Tsigos et al. 1999, Ziccardi et al. 2002, Zuza et al. 2011), and decreased after weight loss (Ziccardi et al. 2002). In this study, the serum concentration of TNF- $\alpha$  was highest in ONP individuals and positively correlated with BMI and IL-6. However, there were no differences among groups for the serum levels of IL-6. These findings suggested that circulating TNF- $\alpha$ , but not IL-6, was to some extent associated with obesity. In support of our findings, some studies have shown a positive correlation between serum TNF- $\alpha$  and BMI (Genco et al. 2005, Khanna & Mali 2010) and, did not find any significant association between serum TNF- $\alpha$  and IL-6 levels and periodontitis (Genco et al. 2005, Saito et al. 2008, Furugen et al. 2008). Conversely, some studies have proposed an association between serum IL-6, but not TNF- $\alpha$ , and periodontitis (Saxlin et al. 2009, Shimada et al. 2010, Nakajima et al. 2010). It is possible that differences in experimental designs, including obesity characterization, periodontitis severity and ELISA sensitivity are responsible for controversies among studies regarding serum levels of these cytokines in subjects with periodontitis and/or obesity.

Overall, shallow and deep sites of obese subjects, with or without periodontitis, exhibited higher levels of TNF- $\alpha$  than normal weight individuals. Furthermore, deep sites of obese subjects showed higher amounts of TNF- $\alpha$  than shallow sites. These data reveal a local pro-inflammatory response in the periodontal tissues of obese subjects independently of the presence of already-affected periodontitis, which could negatively impact the development and severity of periodontal disease in obese individuals. Most likely, TNF- $\alpha$  in the GCF of obese subjects is partly derived from adipose tissue. Among several pro-inflammatory properties, TNF- $\alpha$  stimulates the degradation of the

connective tissue matrix and bone resorption in periodontal tissues (Kurtis et al. 2005). Since TNF- $\alpha$  can be found in GCF prior to clinically-observable disease (Rossomando et al. 1990), it could be suggested that the shallow sites of obese individuals with or without periodontitis may be susceptible to potential periodontal breakdowns. In agreement with these findings, Lundin et al. (2004) observed a positive association between TNF- $\alpha$  in GCF and BMI in non-periodontitis subjects. A similar result was reported by Khosravi et al. (2009) in overweight/obese boys. It is important to highlight that the higher concentration of IL-6 in the GCF of shallow sites of NWNP subjects is probably a negligible finding, probably attributed to the lowest GCF volume in shallow sites of this group. The total amount of this adipocytokine in shallow sites did not differ among groups.

In conclusion, periodontitis rather than obesity influenced the circulating levels of the majority of the adipocytokines in favor of pro-inflammation, suggesting a role of periodontitis in the systemic inflammatory burden. In addition, obesity upregulated the local levels of TNF- $\alpha$ .

## References

- Ainamo, J. & Bay, I. (1975) Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *International Dental Journal* **25**, 229-235.
- Armitage, G. C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology* **4**, 1-6.
- Bokarewa, M., Nagaev, I., Dahlberg, L., Smith, U., Tarkowski, A. (2005) Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *Journal of Immunology* **174**, 5789-5795.
- Chaffee B. W., Weston, S. J. (2010) Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontology* **81**, 1708-1724.
- Friedman, J. M. & Halaas, J. L. (1998) Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 763–770.
- Furugen, R., Hayashida, H., Yamaguchi, N., Yoshihara, A., Ogawa, H., Miyazaki, H. & Saito, T. (2008) The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in elderly Japanese. *Journal of Periodontal Research* **43**, 556-562.
- Genco, R. J., Grossi, S. G., Ho, A., Nishimura, F. & Murayama, Y. (2005) A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *Journal of Periodontology* **76**, 2075-2084.

Grunfeld, C., Zhao, C., Fuller, J., Pollack, A., Moser, A., Friedman, J. & Feingold, K. R. (1996) Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *The Journal of Clinical Investigation* **97**, 2152-2157.

Hotamisligil, G. S., Shargill, N. S. & Spiegelman, B. M (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**, 87–91.

Johnson, R. B. & Serio, F. G. (2001) Leptin within healthy and diseased human gingival. *Journal of Periodontology* **72**, 1254-1257.

Karthikeyan, B. V. & Pradeep, A. R. (2007a) Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *Journal of Clinical Periodontology* **34**, 467-472.

Karthikeyan, B. V. & Pradeep, A. R. (2007b) Leptin levels in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *Journal of Periodontal Research* **42**, 300-304.

Kawanami, D., Maemura, K., Takeda, N., Harada, T., Nojiri, T., Imai, Y., Manabe, I., Utsunomiya, K. & Nagai, R. (2004) Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine–endothelial cell interactions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **314**, 415-419.

Khanna, S. & Mali, A. M. (2010) Evaluation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in plasma and their correlation with periodontal status in obese and non-obese subjects. *Journal of Indian Society of Periodontology* **14**, 217-221.

Khosravi, R., Tran, S. D., Lambert, M., O'Loughlin, J., Kâ, K., Feine, J. S., Caron, C., Tremblay, A. & Nicolau, B. (2009) Adiposity and gingival crevicular fluid tumour necrosis factor-alpha levels in children. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 301-307.

Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y. & Kishioka, S. (2009) Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **384**, 311-315.

Kim, S. J. (2010) Leptin potentiates Prevotella intermedia lipopolysaccharide-induced production of TNF-alpha in monocyte-derived macrophages. *Journal of Periodontal & Implant Science* **40**, 119-124.

Kumada, M., Kihara, S., Ouchi, N., Kobayashi, H., Okamoto, Y., Ohashi, K., Maeda, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Maeda, N., Nagasawa, A., Funahashi, T. & Matsuzawa, Y. (2004) Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* **109**, 2046-2049.

Kurtiş, B., Tüter, G., Serdar, M., Akdemir, P., Uygur, C., Firatli, E. & Bal, B. (2005) Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology* **76**, 1849-1855.

Liu, Z. W., Zhang, N., Han, Q. Y., Zeng, J. T., Chu, Y. L., Qiu, J. M., Wang, Y. W., Ma, L. T. & Wang, X. Q. (2005) Correlation of serum leptin levels with anthropometric and metabolic parameters and biochemical liver function in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *World Journal of Gastroenterology* **14**, 3357-3362.



Lord G. M., Matarese G., Howard J. K., Baker R. J., Bloom S. R. & Lechler R. I. (1998) Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. **27**, 897-901.

Lundin, M., Yucel-Lindberg, T., Dahllöf, G., Marcus, C. & Modéer, T. (2004) Correlation between TNF-alpha in gingival crevicular fluid and body mass index in obese subjects. *Acta Odontologica Scandinavica* **62**, 273-277.

Nagano, Y., Arishiro, K., Uene, M., Miyake, T., Kambara, M., Notohara, Y., Shiraishi, M., Ueda, M. & Domae, N. (2011) A low ratio of high molecular weight adiponectin to total adiponectin associates with periodontal status in middle-aged men. *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals* **16**, 106-111.

Nakajima, T., Honda, T., Domon, H., Okui, T., Kajita, K., Ito, H., Takahashi, N., Maekawa, T., Tabeta, K. & Yamazaki, K. (2010) Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *Journal of Periodontal Research* **45**, 116-122.

Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J. & Walsh, K. (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews. Immunology* **11**, 85-97.

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

Rossomando, E. F., Kennedy, J. E. & Hadjimichael, J. (1990). Tumour necrosis factor alpha in gingival crevicular fluid as a possible indicator of periodontal disease in humans. *Archives of Oral Biology* **35**:431-434.

Ryo, M., Nakamura, T., Kihara, S., Kumada, M., Shibazaki, S., Takahashi, M., Nagai, M., Matsuzawa, Y. & Funahashi, T. (2004) Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circulation Journal: Official Journal of the Japanese Circulation Society* **68**, 975-981.

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

Santos, V. R., Ribeiro, F. V., Lima, J. A., Napimoga, M. H., Bastos, M. F. & Duarte, P. M. (2010) Cytokine levels in sites of chronic periodontitis of poorly controlled and well-controlled type 2 diabetic subjects. *Journal of Clinical Periodontology* **37**, 1049-1058.

Saxlin, T., Suominen-Taipale, L., Leiviskä, J., Jula, A., Knuuttila, M., Ylöstalo, P. (2009) Role of serum cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the association between body weight and periodontal infection. *Journal of Clinical Periodontology* **36**, 100-105.

Shimada, Y., Komatsu, Y., Ikezawa-Suzuki, I., Tai, H., Sugita, N., Yoshie, H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *Journal of Periodontology* **81**, 1118-1123.

Suvan, J., D'Aiuto, F., Moles, D. R., Petrie, A. & Donos, N. (2011) Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* **12**, 381-404.

Tsigos, C., Kyrou, I., Chala, E., Tsapogas, P., Stavridis, J. C., Raptis, S. A. & Katsilambros, N. (1999) Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental* **48**, 1332-1335.

WHO - World Health Organization. (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organization Technical Report Series 894, 1-253.

Yamaguchi, N., Hamachi, T., Kamio, N., Akifusa, S., Masuda, K., Nakamura, Y., Nonaka, K., Maeda, K., Hanazawa, S. & Yamashita, Y. (2010) Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *Journal of Periodontal Research* **45**, 296-300.

Ziccardi, P., Nappo, F., Giugliano, G., Esposito, K., Marfella, R., Cioffi, M., D'Andrea, F., Molinari, A. M. & Giugliano, G. (2002) Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* **105**, 804-809.

Zuza, E. P., Barroso, E. M., Carrareto, A. L., Pires, J. R., Carlos, I. Z., Theodoro, L. H. & Toledo, B. E. (2011) The role of obesity as a modifying factor in patients undergoing non-surgical periodontal therapy. *Journal of Periodontology* **82**, 676-682.

Table 1 - Periodontal, anthropometric and demographic characteristics (mean  $\pm$  SD) of the study population.

Parameters	Groups			
	Normal weight		Obese	
	Non-periodontitis (n=20)	Chronic-periodontitis (n=20)	Non-periodontitis (n=18)	Chronic-periodontitis (n=20)
<b>Age (years)</b>	42.9 $\pm$ 7.2 <sup>a</sup>	47.8 $\pm$ 7.7 <sup>b</sup>	43.2 $\pm$ 7.4 <sup>a</sup>	51.5 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup>
<b>Gender (M/F)</b>	6/14	5/15	4/14	6/14
<b>Teeth (n)</b>	21.9 $\pm$ 4.12	22.8 $\pm$ 3.21	22.2 $\pm$ 3.8	20.8 $\pm$ 3.2
<b>PI (%)</b>	18.2 $\pm$ 12.0 <sup>a</sup>	49.2 $\pm$ 32.5 <sup>b</sup>	27.5 $\pm$ 23.4 <sup>a</sup>	47.6 $\pm$ 20.2 <sup>b</sup>
<b>MB (%)</b>	13.6 $\pm$ 12.9 <sup>a</sup>	39.2 $\pm$ 24.7 <sup>b</sup>	18.9 $\pm$ 17.4 <sup>a</sup>	29.7 $\pm$ 23.9 <sup>b</sup>
<b>PD (mm)</b>	2.2 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.4 $\pm$ 0.6 <sup>b</sup>
<b>CAL (mm)</b>	2.4 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	3.8 $\pm$ 0.9 <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	3.7 $\pm$ 0.7 <sup>b</sup>
<b>BoP (%)</b>	25.3 $\pm$ 15.6 <sup>a</sup>	67.2 $\pm$ 25.0 <sup>b</sup>	26.0 $\pm$ 18.2 <sup>a</sup>	66.6 $\pm$ 19.9 <sup>b</sup>
<b>SUP (%)</b>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 2.1 <sup>ab</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>a</sup>	1.43 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23.4 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>	23.0 $\pm$ 1.8 <sup>a</sup>	33.9 $\pm$ 4.4 <sup>b</sup>	33.2 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>
<b>WHR</b>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	1.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>

Different letters indicate differences among groups (ANOVA and Bonferroni tests;  $p < 0.05$ ).

There were no differences among groups regarding gender ( $\chi^2$  test;  $p > 0.05$ ). M: male; F: female; PI: plaque index; MB: marginal bleeding; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BoP: bleeding on probing; SUP: suppuration; BMI: body mass index; WHR: waist hip ratio.

Table 2 - Serum levels of adipocytokines (mean  $\pm$  SD) for all experimental groups.

Adipocytokines	Groups			
	Normal weight		Obese	
	Non-periodontitis (n=20)	Chronic- periodontitis (n=20)	Non-periodontitis (n=18)	Chronic- periodontitis (n=20)
<b>Resistin (ng/ml)</b>	1.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	2.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup>	1.1 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>	2.25 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>
<b>Adiponectin (ng/ml)</b>	80.7 $\pm$ 40.0 <sup>a</sup>	44.2 $\pm$ 37.8 <sup>b</sup>	81.6 $\pm$ 61.5 <sup>a</sup>	44.0 $\pm$ 34.4 <sup>b</sup>
<b>Leptin (pg/ml)</b>	25.0 $\pm$ 46.2 <sup>a</sup>	294.7 $\pm$ 262.5 <sup>b</sup>	479.6 $\pm$ 253.6 <sup>c</sup>	426.8 $\pm$ 280.9 <sup>bc</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/ml)</b>	2.1 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>	3.2 $\pm$ 2.2 <sup>a</sup>	6.5 $\pm$ 6.7 <sup>b</sup>	3.3 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>
<b>IL-6 (pg/ml)</b>	2.8 $\pm$ 2.3	2.6 $\pm$ 3.1	1.1 $\pm$ 3.9	3.4 $\pm$ 1.6

Different letters indicate differences among groups (ANOVA and Bonferroni tests;  $p < 0.05$ ).

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6: interleukin-6

Table 3 - Clinical parameters of sampled sites, total amounts and concentrations (mean  $\pm$  SD) of adipocytokines in the GCF of shallow sites for all experimental groups.

Adipocytokines	Groups			
	Normal weight		Obese	
	Non-periodontitis n=20	Chronic periodontitis n=20	Non-periodontitis n=18	Chronic periodontitis n=20
<b>Resistin (ng/site)</b>	2.99 $\pm$ 2.61 <sup>a</sup>	1.70 $\pm$ 1.59 <sup>b</sup>	2.12 $\pm$ 2.54 <sup>b</sup>	1.38 $\pm$ 1.55 <sup>b</sup>
<b>Resistin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	5.58 $\pm$ 4.63 <sup>a</sup>	2.04 $\pm$ 2.79 <sup>b</sup>	2.83 $\pm$ 3.43 <sup>b</sup>	1.52 $\pm$ 2.09 <sup>b</sup>
<b>Adiponectin (ng/site)</b>	0.00 $\pm$ 0.00	1.57 $\pm$ 4.02	2.54 $\pm$ 12.32	1.27 $\pm$ 3.69
<b>Adiponectin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	0.00 $\pm$ 0.00	1.21 $\pm$ 2.62	3.40 $\pm$ 17.00	1.70 $\pm$ 6.00
<b>Leptin (pg/site)</b>	0.00 $\pm$ 0.00	0.40 $\pm$ 0.74	1.97 $\pm$ 7.54	0.74 $\pm$ 1.46
<b>Leptin (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.00 $\pm$ 0.00	0.67 $\pm$ 2.22	4.11 $\pm$ 19.04	0.71 $\pm$ 1.36
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/site)</b>	0.01 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>	0.47 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	0.42 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.20 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.32 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>
<b>IL-6 (pg/site)</b>	0.41 $\pm$ 0.59	0.65 $\pm$ 1.48	0.25 $\pm$ 0.53	0.34 $\pm$ 0.96
<b>IL-6 (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.84 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>	0.59 $\pm$ 0.87 <sup>ab</sup>	0.26 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	0.26 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup>
<b>GCF (<math>\mu</math>l)</b>	0.61 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	1.11 $\pm$ 0.56 <sup>b</sup>	0.81 $\pm$ 0.32 <sup>ac</sup>	1.03 $\pm$ 0.47 <sup>bc</sup>
<b>PD (mm)</b>	2.48 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	2.90 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>	2.72 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	2.93 $\pm$ 0.27 <sup>b</sup>
<b>CAL (mm)</b>	2.48 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup>	3.03 $\pm$ 0.62 <sup>b</sup>	2.72 $\pm$ 0.45 <sup>ac</sup>	2.98 $\pm$ 0.36 <sup>bc</sup>

Different letters indicate differences among groups (ANOVA and Bonferroni tests;  $p < 0.05$ ).

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6: interleukin-6; GCF: gingival crevicular fluid; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level

Table 4 - Clinical parameters of sampled sites, total amounts and concentrations (mean  $\pm$  SD) of adipocytokines in the GCF of deep sites for both periodontitis groups.

Adipocytokines	Groups		<i>p</i>
	Normal weight chronic periodontitis (n=20)	Obese chronic periodontitis (n=20)	
<b>Resistin (ng/site)</b>	2.49 $\pm$ 3.52	2.94 $\pm$ 3.68	0.58
<b>Resistin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	1.69 $\pm$ 2.02	1.96 $\pm$ 2.37	0.69
<b>Adiponectin (ng/site)</b>	1.71 $\pm$ 3.74	4.86 $\pm$ 25.23	0.44
<b>Adiponectin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	0.96 $\pm$ 1.93	2.37 $\pm$ 12.50	0.50
<b>Leptin (pg/site)</b>	0.45 $\pm$ 0.84	0.76 $\pm$ 1.94	0.35
<b>Leptin (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.33 $\pm$ 0.57	0.50 $\pm$ 1.42	0.27
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/site)</b>	0.05 $\pm$ 0.18	0.70 $\pm$ 0.69	<0.0001
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.04 $\pm$ 0.12	0.46 $\pm$ 0.43	0.0001
<b>IL-6 (pg/site)</b>	0.86 $\pm$ 1.91	0.96 $\pm$ 4.54	0.90
<b>IL-6 (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.63 $\pm$ 1.10	0.47 $\pm$ 2.01	0.89
<b>GCF (<math>\mu</math>l)</b>	1.45 $\pm$ 0.51	1.61 $\pm$ 0.55	0.18
<b>PD (mm)</b>	6.83 $\pm$ 0.96	7.05 $\pm$ 1.22	0.36
<b>CAL (mm)</b>	7.35 $\pm$ 1.99	7.43 $\pm$ 1.80	0.86

Unpaired Student t test;  $p < 0.05$ .

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6: interleukin-6; GCF: gingival crevicular fluid; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level.

Table 5 – Total amounts and concentrations (mean  $\pm$  SD) of adipocytokines in deep and shallow sites of periodontitis groups.

Adipocytokines	GROUPS					
	Normal weight chronic periodontitis (n=20)			Obese chronic periodontitis (n=20)		
	Shallow sites	Deep sites	p	Shallow sites	Deep sites	p
<b>Resistin (ng/site)</b>	1.70 $\pm$ 1.59	2.49 $\pm$ 3.52	0.22	1.38 $\pm$ 1.55	2.94 $\pm$ 3.68	0.01
<b>Resistin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	2.04 $\pm$ 2.79	1.69 $\pm$ 2.02	0.71	1.52 $\pm$ 2.09	1.96 $\pm$ 2.37	0.46
<b>Adiponectin (ng/site)</b>	1.57 $\pm$ 4.02	1.71 $\pm$ 3.74	0.83	1.27 $\pm$ 3.69	4.86 $\pm$ 25.23	0.38
<b>Adiponectin (ng/<math>\mu</math>l)</b>	1.21 $\pm$ 2.62	0.96 $\pm$ 1.93	0.62	1.70 $\pm$ 6.00	2.37 $\pm$ 12.5	0.76
<b>Leptin (pg/site)</b>	0.40 $\pm$ 0.74	0.45 $\pm$ 0.84	0.78	0.74 $\pm$ 1.46	0.76 $\pm$ 1.94	0.96
<b>Leptin (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.67 $\pm$ 2.22	0.33 $\pm$ 0.57	0.35	0.71 $\pm$ 1.36	0.50 $\pm$ 1.42	0.49
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/site)</b>	0.10 $\pm$ 0.23	0.05 $\pm$ 0.18	0.32	0.42 $\pm$ 0.60	0.70 $\pm$ 0.69	0.02
<b>TNF-<math>\alpha</math> (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.12 $\pm$ 0.32	0.04 $\pm$ 0.12	0.32	0.51 $\pm$ 0.91	0.46 $\pm$ 0.43	1.00
<b>IL-6 (pg/site)</b>	0.65 $\pm$ 1.48	0.86 $\pm$ 1.91	0.16	0.34 $\pm$ 0.96	0.96 $\pm$ 4.54	0.28
<b>IL-6 (pg/<math>\mu</math>l)</b>	0.59 $\pm$ 0.87	0.63 $\pm$ 1.10	0.75	0.26 $\pm$ 0.69	0.47 $\pm$ 2.01	0.26
<b>GCF (<math>\mu</math>l)</b>	1.11 $\pm$ 0.56	1.45 $\pm$ 0.51	0.004	1.03 $\pm$ 0.47	1.61 $\pm$ 0.55	<0.0001

Paired Student t test; p<0.05.

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6: interleukin-6; GCF: gingival crevicular fluid.



Table 6 - Correlation coefficients for serum adipocytokine.

		Serum				
		Resistin	Adiponectin	Leptin	TNF- $\alpha$	IL-6
Serum	Adiponectin	-0.30**				
	Leptin	-0.0009	-0.16			
	TNF- $\alpha$	-0.12	0.04	0.11		
	IL-6	0.21*	-0.13	-0.17	0.37**	
GCF (shallow sites)	Resistin	-0.21	0.06	0.24*	-0.23	-0.00
	Adiponectin	-0.17	-0.001	0.13	0.07	-0.04
	Leptin	0.10	-0.06	0.03	-0.05	-0.10
	TNF- $\alpha$	-0.19	-0.07	0.31**	-0.06	-0.16
	IL-6	-0.18	0.09	-0.04	0.02	-0.00
GCF (deep sites)	Resistin	0.05	0.21	0.04	0.16	0.20
	Adiponectin	0.09	-0.05	0.16	0.37*	0.22
	Leptin	0.21	0.06	0.02	-0.03	0.09
	TNF- $\alpha$	0.02	0.003	-0.09	-0.14	0.00
	IL-6	0.02	0.26	0.11	0.15	0.12
Clinical parameters	PD	0.27*	-0.31**	0.27*	-0.07	0.11
	CAL	0.28*	-0.35**	0.17	-0.09	0.13
	BoP	0.23*	-0.34**	0.17	-0.04	0.07
	BMI	-0.06	-0.11	0.48**	0.35**	0.06
	WHR	-0.14	-0.07	0.20	0.20	-0.06

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; IL-6: interleukin-6; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BoP: bleeding on probing; BMI: body mass index; WHR: waist hip ratio.

\* Correlation is significant at  $p < 0.05$  level (Pearson correlation coefficients).

\*\* Correlation is significant at the  $p < 0.01$  level (Pearson correlation coefficients).

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A hipótese de que a obesidade é um indicador de risco para as doenças periodontais tem sido testada por uma série de estudos clínicos. Em geral, os resultados são unânimes em demonstrar que indivíduos com elevado IMC apresentam maior gravidade e prevalência de doença periodontal (Chaffee & Weston, 2010). O anseio em realizar o presente estudo está baseado no fato de que existe uma nítida escassez de estudos clínicos com delineamento adequado que objetivaram esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos na relação periodontite e obesidade. No presente estudo, cinco adipocitocinas produzidas por adipócitos e também envolvidas no processo imune-inflamatório foram estudadas no fluido gengival e soro de quatro grupos experimentais: obesos periodontalmente saudáveis, obesos com periodontite crônica, peso normal periodontalmente saudáveis, peso normal com periodontite crônica. O principal objetivo de avaliar as adipocitocinas concomitantemente no fluido gengival e soro foi possibilitar uma visão do comportamento desses mediadores em níveis local (de tecidos periodontais) e sistêmico e, estabelecer uma correlação entre ambos. Em suma, o ineditismo desse estudo se deve aos seguintes aspectos: grupos experimentais bem caracterizados, avaliação de um número de cinco adipocitocinas sendo a adiponectina com funções anti-inflamatória e as demais com ações pró-inflamatórias e, avaliação de fluido gengival e soro simultaneamente.

Em geral, os resultados demonstraram que a periodontite, mais que a obesidade, influenciou os níveis séricos da maioria das adipocitocinas estudadas, sugerindo que a periodontite crônica exerce um papel importante na inflamação sistêmica por meio do desequilíbrio dos níveis de adipocitocinas pró- e anti-inflamatórias. Esses achados indicam que indivíduos com periodontite crônica generalizada podem apresentar um risco aumentado para desenvolver ou exacerbar doenças inflamatórias. Em nível local, a obesidade aumentou os níveis do TNF- $\alpha$  em sítios rasos e profundos. Uma vez que o TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória capaz de induzir perda tecidual e óssea e estimular a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, esse dado pode ser uma possível explicação para a maior prevalência e gravidade de doenças periodontais observadas em obesos.

É importante ressaltar que os resultados do presente estudo forneceram informações relevantes, mas não conclusivas sobre os mecanismos celulares e moleculares que conectam a obesidade à periodontite. As adipocitocinas estudadas são apenas uma modesta parte de uma complexa rede de moléculas que atuam no periodonto e no processo inflamatório geral. Outros estudos analisando uma maior gama de citocinas e outras metodologias são necessários para que seja estabelecida a plausibilidade biológica entre obesidade e periodontite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alabdulkarim M, Bissada N, Al-Zahrani M, Ficara A, Siegel B. Alveolar bone loss in obese subjects. *J Int Acad Periodontol*. 2005 Apr;7(2):34-8.

Al-Zahrani MS, Bissada NF, Borawski EA. Obesity and periodontal disease in young, middle-aged, and older adults. *J Periodontol* 2003; 74: 610–615.

Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Dec 18;104(51):20466-71.

Bokarewa M, Nagaev I, Dahlberg L, Smith U, Tarkowski A. Resistin, an adipokine with potent proinflammatory properties. *J Immunol*. 2005 May 1;174(9):5789-95.

Bozkurt FY, Yetkin Ay Z, Sütçü R, Delibaş N, Demirel R. Gingival crevicular fluid leptin levels in periodontitis patients with long-term and heavy smoking. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):634-40.

Chaffee BW, Weston SJ. Association between chronic periodontal disease and obesity: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2010 Dec;81(12):1708-24.

Dalla Vecchia CF, Susin C, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol*. 2005 Oct;76(10):1721-8.

Deitel M. Overweight and Obesity Worldwide now Estimated to Involve 1.7 Billion People. *Obesity Surgery* 2003; 13: 329-330

Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. *J Periodontol*. 2010 Apr;81(4):520-6.

Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998 Oct 22;395(6704):763-70.

Furugen R, Hayashida H, Yamaguchi N, Yoshihara A, Ogawa H, Miyazaki H, Saito T. The relationship between periodontal condition and serum levels of resistin and adiponectin in elderly Japanese. *J Periodontol Res*. 2008 Oct;43(5):556-62.

Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Levels of Interleukin- 1 $\beta$ , -8, and -10 and RANTES in gingival crevicular fluid and cell populations in adult periodontitis patients and the effect of periodontal treatment. *J Periodontol*. 2000; 10:1536-1546.

Gamonal J, Sanz M, O'Connor A, Acevedo A, Suarez I, Sanz A, Martínez B, Silva A. Delayed neutrophil apoptosis in chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2003;30:616-623.

Gomes MB, Giannella Neto D, Mendonça E, Tambascia MA, Fonseca RM, Réa RR, Macedo G, Modesto Filho J, Schmid H, Bittencourt AV, Cavalcanti S, Rassi N, Faria M, Pedrosa H, Dib SA. [Nationwide multicenter study on the prevalence of overweight and obesity in type 2 diabetes mellitus in the Brazilian population]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Feb;50(1):136-44.

Grunfeld C, Zhao C, Fuller J, Pollack A, Moser A, Friedman J, Feingold KR. Endotoxin and cytokines induce expression of leptin, the ob gene product, in hamsters. *J Clin Invest*. 1996 May 1;97(9):2152-7.

Han DH, Lim SY, Sun BC, Paek DM, Kim HD. Visceral fat area-defined obesity and periodontitis among Koreans. *J Clin Periodontol*. 2010 Feb;37(2):172-9.

Haffajee AD, Socransky SS. Relation of body mass index, periodontitis and *Tannerella forsythia*. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):89-99.

Johnson RB, Serio FG. Leptin within healthy and diseased human gingiva. *J Periodontol*. 2001 Sep;72(9):1254-7.

Khanna S, Mali AM. Evaluation of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in plasma and their correlation with periodontal status in obese and non-obese subjects. *J Indian Soc Periodontol*. 2010 Oct;14(4):217-21.

Karthikeyan BV, Pradeep AR. Gingival crevicular fluid and serum leptin: their relationship to periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 2007a; 34: 467–472

Karthikeyan BV, Pradeep AR. Leptin levels in gingival crevicular fluid in periodontal health and disease. *J Periodont Res* 2007b; 42: 300–304

Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T, Imai Y, Manabe I, Utsunomiya K, Nagai R. Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 6;314(2):415-9.

Kim EJ, Jin BH, Bae KH. Periodontitis and obesity: a study of the Fourth Korean National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2011 Apr;82(4):533-42.

Kim SJ. Leptin potentiates *Prevotella intermedia* lipopolysaccharide-induced production of TNF- $\alpha$  in monocyte-derived macrophages. *J Periodontal Implant Sci*. 2010 Jun;40(3):119-24. Epub 2010 Jun 25.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404: 635–643

Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y, Ohashi K, Maeda K, Nagaretani H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Funahashi T, Matsuzawa Y. Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation*. 2004 May 4;109(17):2046-9.

Kumar S, Dagli RJ, Dhanni C, Duraiswamy P. Relationship of body mass index with periodontal health status of green marble mine laborers in Kesariyaji, India. *Braz Oral Res.* 2009 Oct-Dec;23(4):365-9.

Kurtiş B, Tüter G, Serdar M, Akdemir P, Uygur C, Firatli E, Bal B. Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76:1849-1855.

Linden G, Patterson C, Evans A, Kee F. Obesity and periodontitis in 60–70-year-old men. *J Clin Periodontol* 2007; 34: 461–466

Liu ZW, Zhang N, Han QY, Zeng JT, Chu YL, Qiu JM, Wang YW, Ma LT, Wang XQ. Correlation of serum leptin levels with anthropometric and metabolic parameters and biochemical liver function in Chinese patients with chronic hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2005 Jun 14;11(22):3357-62.

Lundin M, Yucel-Lindberg T, Dahllöf G, Marcus C, Modéer T. Correlation between TNFalpha in gingival crevicular fluid and body mass index in obese subjects. *Acta Odontol Scand.* 2004 Oct;62(5):273-7.

Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MC, de Souza AM, Faccioli LH, Tanus-Santos JE, Novaes AB, Gerlach RF. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol.* 2009 Apr;80(4):594-602.

Nakajima T, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Ito H, Takahashi N, Maekawa T, Tabeta K, Yamazaki K. Periodontitis-associated up-regulation of systemic inflammatory mediator level may increase the risk of coronary heart disease. *J Periodontal Res.* 2010 Feb;45(1):116-22. Epub 2009 Jul 8.

Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Determination of smoking and obesity as periodontitis risks using the classification and regression tree method. *J Periodontol.* 2005 Jun;76(6):923-8.

Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000;894:i-xii, 1-253.

Oh DK, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin in health and disease. *Diabetes Obes Metab*. 2007 May;9(3):282-9.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011 Feb;11(2):85-97.

Pataro AL, Costa FO, Cortelli SC, Cortelli JR, Abreu MH, Costa JE. Association between severity of body mass index and periodontal condition in women. *Clin Oral Investig*. 2011 May 10.

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

Pischon N, Heng N, Bernimoulin JP, Kleber BM, Willich SN, Pischon T. Obesity, inflammation, and periodontal disease. *J Dent Res*. 2007 May;86(5):400-9.

Reeves AF; Rees JM; Schiff M; Hujoel P Total Body Weight and Waist Circumference Associated With Chronic Periodontitis Among Adolescents in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2006;160:894-899.

Ronderos M, Ryder MI. Risk assessment in clinical practice. *Periodontology* 2000 2004; 34: 120–135.

Ryo M, Nakamura T, Kihara S, Kumada M, Shibazaki S, Takahashi M, Nagai M, Matsuzawa Y, Funahashi T. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J*. 2004 Nov;68(11):975-81.

Saito T, Shimazaki Y, Koga T, Tsuzuki M, Ohshima A. Relationship between upper body obesity and periodontitis. *J Dent Res*. 2001 Jul;80(7):1631-6.



Saito T, Shimazaki Y, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. Relationship between obesity, glucose tolerance, and periodontal disease in Japanese women: the Hisayama study. *J Periodont Res* 2005; 40: 346–353.

Saito T, Yamaguchi N, Shimazaki Y, Hayashida H, Yonemoto K, Doi Y, Kiyohara Y, Iida M, Yamashita Y. Serum levels of resistin and adiponectin in women with periodontitis: the Hisayama study. *J Dent Res*. 2008 Apr;87(4):319-22.

Saxlin T, Suominen-Taipale L, Leiviskä J, Jula A, Knuutila M, Ylöstalo P. Role of serum cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the association between body weight and periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):100-5.

Shimada Y, Komatsu Y, Ikezawa-Suzuki I, Tai H, Sugita N, Yoshie H. The effect of periodontal treatment on serum leptin, interleukin-6, and C-reactive protein. *J Periodontol*. 2010 Aug;81(8):1118-23.

Shimomura I, Funahashi T, Kihara S, Matsuzawa Y. Central role of adipocytokine on metabolic syndrome (Japanese). *Exp Med* 2002; 20: 1762–1767.

Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2008 Jun;66(3):130-4.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr. RL: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 2005; 38: 135–187.

Suvan J, D'Aiuto F, Moles DR, Petrie A, Donos N. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*. 2011 May;12(5):e381-404.

Tomofuji T, Yamamoto T, Tamaki N, Ekuni D, Azuma T, Sanbe T, Irie K, Kasuyama K, Umakoshi M, Murakami J, Koikeguchi S, Morita M. Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *J Periodontol*. 2009 Aug;80(8):1324-9.

Trayhurn P. Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiol Scand* 2005; 184: 285–293.

Tsigos C, Kyrou I, Chala E, Tsapogas P, Stavridis JC, Raptis SA, Katsilambros N. Circulating tumor necrosis factor alpha concentrations are higher in abdominal versus peripheral obesity. *Metabolism*. 1999 Oct;48(10):1332-5.

Um S, Choi JR, Lee JH, Zhang Q, Seo B. Effect of leptin on differentiation of human dental stem cells. *Oral Dis*. 2011 Oct;17(7):662-9.

Wood N, Johnson RB, Streckfus CF. Comparison of body composition and periodontal disease using nutritional assessment techniques: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Periodontol* 2003; 30: 321–327.

[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009/POFpublicacao.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/POFpublicacao.pdf). Acesso: 05/11/2011 18:45

Yamaguchi N, Hamachi T, Kamio N, Akifusa S, Masuda K, Nakamura Y, Nonaka K, Maeda K, Hanazawa S, Yamashita Y. Expression levels of adiponectin receptors and periodontitis. *J Periodontal Res*. 2010 Apr;45(2):296-300.

Ylöstalo P, Suominen-Taipale L, Reunanen A, Knuuttila M. Association between body weight and periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2008 Apr;35(4):297-304. Epub 2008 Feb 15.

Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, Esposito K, Marfella R, Cioffi M, D'Andrea F, Molinari AM, Giugliano D. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation*. 2002 Feb 19;105(7):804-9.

Zuza EP, Barroso EM, Carrareto AL, Pires JR, Carlos IZ, Theodoro LH, Toledo BE. The role of obesity as a modifying factor in patients undergoing non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol*. 2011 May;82(5):676-82.

## ANEXO



Guarulhos, 04 de março de 2009.

Exma. Sra.  
Profa. Poliana M. Duarte

**PARECER Nº33/2009**

Referência: **Aprovação de Projeto**  
**SISNEP/417** - "Avaliação microbiológica e de fatores inflamatórios em sítios com periodontite crônica em indivíduos obesos"

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Guarulhos analisou o Projeto de Pesquisa de sua autoria "Avaliação microbiológica e de fatores inflamatórios em sítios com periodontite crônica em indivíduos obesos" - SISNEP/417, na reunião de 03.03.2009, e no uso das competências definidas na Res. CNS 196/96, considerou o Projeto acima **aprovado**.

As orientações abaixo devem ser consideradas pelo Pesquisador Responsável durante a realização da pesquisa, visando que a mesma se desenvolva respeitando os padrões éticos:

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou, aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- Eventuais modificações ou emendas e eventos adversos ao protocolo, devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Esclareçemos a necessidade da apresentação de relatório de andamento até **15.08.09** e relatório final até **01.02.11**.

Luciene Cristina de Figueiredo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa