

MARIANNE SPALDING

**EFEITOS DA REPOSIÇÃO HORMONAL COM ESTRÓGENO
EM DIFERENTES PERÍODOS APÓS A OVARIECTOMIA NA
EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Profa. Adj. Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos

2005

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E.A. **Manual para elaboração de monografias:** estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002. 82p.

SPALDING, M. **Efeitos da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da periodontite induzida em ratas.** 2005. 145f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

Para minha Família... outra vez

Mais do que nunca!

Se consegui aqui chegar é porque estive apoiada sobre ombros de gigantes.

Issac Newton

AGRADECIMENTOS

À minha estimada orientadora, Profa. Adjunta Yasmin Rodarte Carvalho, que nunca mediu esforços para me orientar, sempre com muita dedicação, competência, seriedade e humildade. Minha profunda admiração e gratidão.

Foram tantas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho que seria impraticável cita-las todas. De qualquer forma gostaria de mencionar algumas, que direta ou indiretamente foram fundamentais para que este trabalho fosse concluído.

Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, sempre solícita e disposta a ajudar, meus sinceros agradecimentos.

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, Prof. Dr. Luíz Eduardo Blumer Rosa, Profa. Dra. Mônica Fernandes Gomes, professores da Disciplina de Patologia Geral e Patologia Bucal, agradeço pelo carinho e auxílio jamais negados.

Profa. Dra. Elisabete Marostica, e Profa Dra. Catarina Segretti Porto, da Faculdade de Medicina da UNIFESP, pelo inestimável auxílio na dosagem hormonal dos animais experimentais.

Prof. Renato Zangaro da UNIVAP, por ter possibilitado a utilização do IPD-Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento.

Prof. Assistente Ivan Balducci, pelo enorme auxílio com a análise estatística.

Prof. Miguel Ângelo Castillo, da Disciplina de Histologia, pelo estímulo constante na minha formação profissional.

Professores da Disciplina de Anatomia, na pessoa do Prof. Adj. Horácio Faig Leite, pelo apoio e colaboração em diversos momentos deste curso.

A todos os professores da Disciplina de Semiologia, pelo carinho e incentivo ao longo destes anos.

Aos professores da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, pela atenção sempre dispensada.

Aos professores da Disciplina de Radiologia, na pessoa do Prof. Luis César de Moraes, e aos alunos de pós-graduação, em especial ao Gustavo Nogara Dotto, pelo auxílio na obtenção das imagens radiográficas.

Ao imprescindível auxílio das alunas do curso de Graduação de Odontologia da UNESP-SJC, Marcela de Almeida Prado, Sabrina Pinotti Ferreira Leite e especialmente à Priscila Ferreira Amschlinger, que jamais mediu esforços para tornar esse trabalho possível. Agradeço pela dedicação, pelo entusiasmo contagiante, pelo enorme auxílio e, sobretudo pela amizade. Foi muito bom trabalhar com vocês!

À Núbia Cristiane Velloso, aluna do curso de Graduação de Enfermagem da FATEA-Lorena, pela indispensável participação na fase experimental deste trabalho, agradeço pela enorme presteza e dedicação.

A todos os amigos e companheiros do Curso de Pós-Graduação, especialmente a Adriana S.F. Monteiro, Alexandre Sherma, Ana Lia Anbinder, Ângela Bolanho, André D. Monteiro, Andressa C. Pereira, Carlos E.D. Colombo, Carolina Júdice Ramos, Cristina Werkman, Elaine Dias do Carmo, Evanice M.M. Vieira, Fábio S. Matuda, Juliana C. Junqueira, Karen Cristina Yui, Luana M.R. Vasconcelos, Lúcia H.D. Roveroni, Miguel Christian Castillo Marin, Susana Ungaro Amadei, Patrícia C. Fontes, Vanessa A. S. Silveira, pelo carinho, incentivo, auxílio e alegre convivência. Jamais esquecerei vocês!

Ao Leandro P. Alves, aluno de graduação e ao Ricardo Moriyama, aluno de pós-graduação da UNIVAP, pelo imprescindível auxílio com o programa utilizado para análise histomorfométrica.

Aos funcionários do biotério Lourival Jacobs, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos, e Valdir Marques por terem se mostrado sempre solícitos.

À Clélia Aparecida P. Martins, funcionária desta faculdade, pela disponibilidade e forma prestativa com que sempre me atendeu.

Às técnicas Ana Lourdes da Silva Machado, Walter Cruz e especialmente a Maria Salete Faria, pelo carinho no preparo do material histológico.

Às secretárias do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Ivoneide Leandro e em especial à Sílvia Scarpel pela atenção, disponibilidade e auxílio imprescindíveis na formatação final desta tese.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa e Maria Aparecida Consiglio de Souza, pela disponibilidade e auxílio em todas as dúvidas.

A todos os funcionários da Biblioteca, em especial às bibliotecárias, Ângela de Brito Bellini e Silvana Alvarez, pela atenção dispensada, orientação e presteza.

À Nelyane Jorge da Cunha e Cristiane Domingues de Almeida, com quem tive o prazer de conviver durante estes anos, agradeço pelo carinho e amizade.

Aos meus pacientes, pela compreensão, apoio e incentivo.

Aos alunos de graduação da Unifenas, Fapi e Unesp, grandes motivadores para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Direção da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade do Estado de São Paulo, na pessoa do Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior.

À Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, Chefe do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal.

À Universidade de Alfenas, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de Varginha, prof. Dr. Luíz Antônio Sartori, por ter concedido meu afastamento durante o curso de doutorado.

À Faculdade de Pindamonhangaba, na pessoa do Prof. Dr. Luis Otávio Palhari, pela concessão de auxílio financeiro na etapa final do meu curso.

À Capes, pelo auxílio pecuniário durante uma etapa do curso.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Considerações sobre o tecido ósseo.....	17
2.2 Osteoporose.....	19
2.3 Estrógeno.....	25
2.4 Relação entre osteoporose e a periodontite.....	31
3 PROPOSIÇÃO.....	47
4 MATERIAL E MÉTODO.....	48
4.1 Animais experimentais.....	48
4.2 Procedimentos cirúrgicos.....	48
4.2.1 Anestesia.....	49
4.2.2 Ovariectomia.....	49
4.3 Grupos experimentais.....	51
4.4 Indução da periodontite.....	52
4.5 Massa corpórea dos animais.....	54
4.6 Sacrifício dos animais.....	54
4.7 Avaliação macroscópica.....	56
4.7.1 Grau de mobilidade dentária.....	56
4.7.2 Grau de envolvimento de furca.....	56
4.7.3 Perda óssea alveolar.....	57
4.8 Avaliação radiográfica.....	57
4.8.1 Suporte alveolar.....	57

4.9 Avaliação microscópica descritiva e histomorfométrica.....	60
4.10 Análise estatística.....	62
5 RESULTADOS.....	64
5.1 Massa corpórea.....	64
5.2 Dosagem hormonal.....	70
5.3 Avaliação macroscópica.....	75
5.3.1 Grau de mobilidade dentária.....	75
5.3.2 Grau de envolvimento de furca.....	77
5.3.3 Perda óssea alveolar.....	79
5.4 Avaliação radiográfica.....	81
5.5 Avaliação microscópica.....	84
5.6 Análise histomorfométrica.....	97
6 DISCUSSÃO.....	99
7 CONCLUSÕES.....	119
8 REFERÊNCIAS	120
ANEXO	143
<i>ABSTRACT</i>	145

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA= Análise de Variância

BMP= Proteína óssea morfogenética

BSE= *Backscattered electron microscopy*

C0, C1, C2, C3, C4= subgrupos controles que receberam placebo imediatamente, uma, duas, três e quatro semanas, respectivamente, após a ovariectomia

CT= Tomografia computadorizada

DXA= absorciometria de emissão dupla de raios X

E0, E1, E2, E3, E4= subgrupos experimentais que receberam a TRH/E imediatamente, uma, duas, três e quatro semanas, respectivamente, após a ovariectomia

EDX= *energy-dispersive X-ray*

ER α = Receptor para estrógeno α

ER β =Receptor para estrógeno β

FOSJC-UNESP= Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista

G0, G1, G2, G3, G4= Grupos que iniciaram o tratamento/placebo imediatamente, uma, duas, três e quatro semanas, respectivamente, após a ovariectomia

HE= hematoxilina e eosina

IL= interleucina

Kg= kilograma

LPS= lipopolissacarídeo

MEV= Microscopia eletrônica de varredura

mg=miligramas

OMS= Organização Mundial da Saúde

OVX= Ovariectomia

OVXs= Ovariectomizadas

pg/ml=picograma por mililitro

SERMs=Modulador seletivo de receptor de estrógeno

Sham= grupo submetido à simulação da ovariectomia

TGF β = fator de crescimento transformador β

TRH/E= Terapia de reposição hormonal estrogênica

XTM= *X-ray tomographic microscopy*

%= porcentagem

μ m=micrometro

SPALDING, M. **Efeitos da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da periodontite induzida em ratas.** 2005. 145f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

RESUMO

Este trabalho destinou-se a avaliar os efeitos dos diferentes períodos de início da terapia de reposição hormonal estrogênica na evolução da periodontite induzida em ratas ovariectomizadas. Para tanto foram utilizadas 65 ratas ovariectomizadas aos três meses de idade, compondo dois grupos, experimental e controle, que receberam 17β estradiol ou placebo respectivamente, em diferentes períodos de início; possibilitando a formação de cinco subgrupos de cada situação, de acordo com o período de início do tratamento/placebo: imediato, uma, duas, três e quatro semanas após a ovariectomia. A formação de um terceiro grupo (grupo *sham*), em que foi realizada a simulação da ovariectomia, possibilitou a comparação dos eventos ocorridos entre as ratas estrógeno deficiente com as ratas estrógeno suficiente. Após quatro semanas da ovariectomia ou de sua simulação foi colocada uma ligadura com fio de algodão ao redor da coroa dos segundos molares da maxila, mantida por cinco semanas, quando as ratas foram sacrificadas. Realizaram-se análises macroscópicas, como grau de mobilidade dentária, envolvimento de furca ou perda óssea alveolar, radiográfica, onde foi avaliado o suporte ósseo, histológica e histomorfométrica. Os resultados revelaram que a depleção do estrógeno decorrente da ovariectomia, não teve efeito direto no osso alveolar adjacente às raízes dos segundos molares da maxila. De acordo com as condições experimentais, a terapia de reposição hormonal estrogênica não retardou a progressão da periodontite induzida.

PALAVRAS-CHAVE: Estradiol, doenças periodontais; ovariectomia; osteoporose, ratos.

1 INTRODUÇÃO

À medida que a expectativa de vida da população vem aumentando, crescem também os problemas relacionados com o avanço da idade. Tanto a osteoporose quanto a doença periodontal, são patologias que apresentam ocorrência crescente com a idade (JEFFCOAT⁶⁰, 1998; LOCKER et al.⁸⁸, 1998; LASCALA & MOUSSALLI⁸⁶, 1999; PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; INAGAK et al.⁵⁷, 2001; WACTAWSKI-WENDE¹⁴⁹, 2001; GALLAGHER et al.³⁶, 2002) e ambas caracterizam-se por exibir considerável reabsorção óssea, porém influenciadas por fatores sistêmicos ou localizados, respectivamente.

A osteoporose é uma doença na qual ocorre perda da massa óssea, suscetibilizando o indivíduo a fraturas. Um dos maiores fatores de risco para a osteoporose é a deficiência de estrógeno (TURNER et al.¹⁴⁶, 1994; COMPSTON²⁰, 2001; CIVITELLI et al.¹⁸, 2002; GALLAGHER, et al.³⁶, 2002). A mulher após a menopausa apresenta grande risco de desenvolver a osteoporose, uma vez que seus ovários não produzem mais o estrógeno.

A deficiência do estrógeno promove um aumento da remodelação óssea, em que a reabsorção excede a neoformação, levando a perda óssea (WRONSKI et al.¹⁶⁰, 1988; KALU⁶⁶, 1991; KANIS⁶⁸, 1996; MOST et al.⁹⁷, 1997). A noção de que a deterioração dos ossos do sistema estomatognático acompanha a perda óssea esquelética causada pela deficiência do estrógeno, suporta-se na evidência de trabalhos realizados em humanos que apontam a relação entre a osteoporose e a perda dentária, a doença periodontal ou a densidade óssea mineral dos ossos maxilares (ELDERS et al.²⁷, 1992; NORDERYD et al.¹⁰², 1993; PAYNE et al.¹⁰⁹, 1997; MARQUES⁹⁰, 1998; PILGRAM et

al.¹¹¹, 1999; REINHARDT et al.¹¹⁷, 1999; RONDEROS et al.¹²⁰, 2000; TEZAL et al.¹⁴³, 2000; INAGAK et al.⁵⁷, 2001; CIVITELLI et al.¹⁸, 2002; MOHAMMAD et al.⁹⁵, 2003). Mulheres com osteoporose severa são três vezes mais susceptíveis a serem edêndulas que mulheres saudáveis da mesma faixa etária (PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996). A integridade do osso alveolar é fundamental para preservação do dente. Trabalhos realizados em animais experimentais são controversos quanto a relação entre a osteopenia/osteoporose causada pela deficiência do estrógeno com a destruição do osso alveolar e doença periodontal (KRIBBS⁸⁰, 1990; JOHNSON et al.⁶⁴, 1997; MARQUES⁹⁰, 1998; MORIYA et al.⁹⁶, 1998; HIDAKA et al.⁵², 2000; HARA et al.⁵⁰, 2001; TANAKA, et al.¹⁴⁰, 2002; KAWAMOTO et al.⁷⁰, 2002; YANG et al.¹⁵⁵, 2003). Embora essa relação não seja conclusiva, supõe-se que uma redução na massa óssea como resultado da osteopenia/osteoporose, torna as estruturas de sustentação do dente mais vulneráveis, aumentando a susceptibilidade do hospedeiro à periodontite (KANIS⁶⁸, 1996; WACTAWSKI-WEND et al.¹⁴⁸, 1996; LOZA et al.⁸⁹, 1996; HILDEBOLT⁵³, 1997; JEFFCOAT⁶⁰, 1998; JEFFCOAT et al.⁶², 2000; CHESNUT¹⁶, 2001; REDDY¹¹⁴, 2001; WACTAWSKI-WENDE¹⁴⁹, 2001; HARRY⁵¹, 2002; KREJCI & BISSADA⁷⁹, 2002; MATTSON et al.⁹¹, 2002; GEURS et al.⁴¹, 2003; MOHAMMAD et al.⁹³, 2003). No entanto poucos estudos avaliaram a correlação direta entre a perda óssea devido à periodontite e deficiência do estrógeno (MARQUES⁹⁰, 1998; DUARTE et al.²³, 2004).

A relação entre o período de início da terapia de reposição hormonal estrogênica (TRH/E) após a ovariectomia com a progressão da doença periodontal não foi ainda estudada. Sendo assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a relação entre a deficiência do estrógeno, bem como os diferentes tempos de início da terapia de reposição hormonal, com a evolução da periodontite induzida, em ratas ovariectomizadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações sobre o tecido ósseo

O osso é um dos tecidos mais resistentes e rígidos do corpo humano, e está constantemente em processo de remodelação. Dois tipos de tecido ósseo podem ser diferenciados: o compacto, que caracteriza a cortical dos ossos, formado microscopicamente pela presença de lamelas concêntricas formando os sistemas de *Havers*, e o esponjoso, caracterizado pela presença de trabéculas, com lamelas dispostas paralelamente. Do ponto de vista microscópico, o osso pode ainda ser primário, que representa um tecido ósseo sem presença de lamelas definidas, bastante celularizado, encontrado nos alvéolos dentários, por exemplo, e secundário, com fibras colágenas organizadas em lamelas (CATE¹⁴, 1998; KATCHBURIAN & ARANA⁶⁹, 1999).

A sua remodelação ocorre a partir da constante reabsorção e formação, que além de ser importante para a preservação da integridade óssea mecânica, este sistema é fundamental para a homeostasia do cálcio no organismo. Distúrbios no processo de remodelação determinam alterações na arquitetura óssea, podendo causar diminuição da sua densidade e acarretar em maior risco de fraturas (ERIKSEN et al.³⁰, 1993).

O osso alveolar corresponde à parte dos maxilares que constitui, com o ligamento periodontal e o cimento, o sistema de ancoragem do dente, formando a parede dos alvéolos dentários. Entre o osso alveolar e a cortical externa (vestibular) e interna (palatina) dos

maxilares, há presença de osso esponjoso. No topo das cristas alveolares, há a fusão do osso alveolar com as corticais dos maxilares, determinando pouca quantidade de osso esponjoso interposto entre eles. Do ponto de vista embriológico, o osso alveolar tem uma origem diferente dos ossos longos ou mesmo do côndilo, que apresenta ossificação endocondral. Tanto na maxila, quanto na mandíbula, ele desenvolve-se por ossificação intramembranosa. Em humanos apresenta uma espessura que varia de 0,1 a 0,4mm. Microscopicamente caracteriza-se pela presença de lamelas paralelas, onde se inserem as fibras do ligamento periodontal e mais internamente formam alguns sistemas de *Havers*, tendo continuidade com o osso esponjoso adjacente. Este osso não constitui uma camada contínua, sendo atravessado por numerosas aberturas que passam da medula óssea do osso esponjoso subjacente ao ligamento periodontal, por isso muitas vezes denominado de lâmina cribriforme (CATE¹⁴,1998; KATCHBURIAN & ARANA⁶⁹, 1999). O osso alveolar é extremamente dinâmico, respondendo rapidamente a estímulos que induzem formação e reabsorção.

No esqueleto humano, o pico de massa óssea, é alcançado por volta dos trinta anos de idade, tanto em homens quanto em mulheres. A partir desse período ocorre um balanço negativo entre a formação e reabsorção, havendo gradativa perda óssea durante o processo de remodelação (ERIKSEN et al.³⁰, 1993). Em trabalho de revisão BURR et al.⁸, em 1997 relataram que a cada ciclo de remodelação, há um decréscimo na massa óssea, levando a formação de microdefeitos no tecido ósseo. A presença desses microdefeitos, que se acumulam ao longo da vida, pode estar associada ao maior risco de fraturas em mulheres idosas (BURR et al.⁸, 1997).

Após a menopausa, com a ausência dos hormônios ovarianos, em especial o estrógeno, observa-se um aumento do ritmo de remodelação óssea, e conseqüentemente uma perda óssea gradativa,

podendo culminar com um quadro de osteoporose (NEVITT¹⁰⁰, 1994; BURR et al.⁸ 1997; GALLAGHER et al.³⁶, 2002).

2.2 Osteoporose

A osteoporose representa uma doença sistêmica progressiva, caracterizada pela diminuição da densidade óssea e deterioração da microarquitetura dos tecidos ósseos, conseqüentemente levando a um aumento da fragilidade e susceptibilidade a fraturas (GENANT et al.³⁹, 1999). Atualmente a osteoporose é considerada, nos países desenvolvidos, um dos problemas de grande ocorrência na população idosa, especialmente no sexo feminino (BANDEIRA et al.⁰⁶, 2002; SILVA¹³⁰, 2003). Na ausência de métodos práticos para mensurar clinicamente a qualidade óssea, atualmente estabelecida por meio da história clínica de fraturas não traumáticas, o diagnóstico da osteoporose tende a ser baseado em métodos que avaliam a densidade óssea (BROWN & JOSSE⁷ 2002). De acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS), a absorciometria de energia dupla de Raios x (DEXA), que mede a densidade óssea mineral, representa a base para o diagnóstico da osteoporose, sendo este estabelecido quando a densidade óssea mineral em mulheres caucasianas assume valores a partir de 2,5 desvios padrões abaixo das referências para adulto jovem saudável (GENANT et al.³⁹, 1999).

A osteoporose pode ser primária ou secundária. A primária acomete ambos os sexos em todas as idades, porém com maior freqüência ocorre em mulheres após a menopausa. A secundária é resultado de medicação (como os corticóides) e algumas condições sistêmicas ou doenças (RAISZ & SHOUKRI¹¹³, 1993; GENANT³⁹, 1999).

A osteoporose tem sido considerada pela OMS como um dos problemas merecedores de grande atenção em virtude de seu impacto social, físico e econômico (GAMBACCIANI & CIAPONI³⁷, 2000; SCARLETT-FERGUSON¹²⁴, 2002). Estudos revelam que nos EUA, dez milhões de indivíduos sofrem com essa doença, e aproximadamente 1,5 milhões de fraturas anuais são decorrentes da osteoporose (GAMBACCIANI & CIAPONI³⁷, 2000; SCARLETT-FERGUSON¹²⁴, 2002).

No Brasil, os idosos já representam 12% da população, o que corresponde a aproximadamente dez milhões de indivíduos. Estima-se que cerca de 2,5 milhões devam sofrer de osteoporose (RUIZ¹²³, 2002).

Vários são os fatores de risco para osteoporose, como a idade acima de 65 anos, mulheres com baixa estatura e baixa massa corpórea, sedentarismo, uso de corticóides por tempo prolongado, entre outros (NEVITT¹⁰⁰, 1994; GENANT et al.³⁹, 1999; BROWN & JOSSE⁷, 2002). A falência ovariana, que ocorre na mulher após a menopausa, corresponde a um dos fatores de risco mais comuns para a osteoporose. A deficiência do estrógeno provoca uma perda acentuada na massa óssea (PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; ZEEMAN et al.¹⁵⁷, 2001), devido ao rápido aumento na remodelação óssea, que culmina com a reabsorção, principalmente do osso trabecular (WRONSKI et al.¹⁵⁴, 1988; KALU⁶⁶, 1991; RAISZ & SHOUKRI¹¹³, 1993; LANE et al.⁸⁵, 1998; OMI & ELZAWA¹⁰⁶, 1995; GENG et al.⁴⁰, 2000; DEYHIM et al.²², 2003).

A ovariectomia induz perda óssea em ratas, simulando a acelerada perda óssea que ocorre na mulher após a menopausa. Assim, os modelos de estudo da perda óssea em ratas ovariectomizadas são apropriados para avaliar os problemas relativos à perda óssea pós-menopausa, devido às características similares envolvidas. Estas incluem o rápido aumento da remodelação óssea, em que a reabsorção excede a neoformação, uma fase inicial rápida seguida de uma fase mais lenta, maior perda do osso trabecular em comparação com o cortical, diminuição

da absorção intestinal de cálcio, ganho de peso, e resposta esquelética semelhantes a agentes terapêuticos (KALU⁶⁶, 1991). Tais modelos de estudo têm sido amplamente utilizados para avaliar os problemas decorrentes da deficiência do estrógeno (KALU⁶⁶, 1991; FROST & JEE³⁵, 1992; OMI & EZAWA¹⁶, 1995; JIANG et al.⁶³, 1997; LANE et al.⁸⁵, 1998; GENG et al.⁴⁰, 2000; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁹⁹ 2001; DEYHIM et al.²², 2003; BURT-PICHAT et al.⁹, 2005).

Kalu⁶⁶ (1991) propôs dois modelos de estudo em ratas para avaliar as alterações ósseas em consequência da deficiência dos hormônios ovarianos, com o objetivo de validar esses modelos para a análise e comparação das características de perda óssea em ratas, bem como suas consequências, com aquelas observadas na mulher após a menopausa. Segundo o autor, até os três meses de idade há um rápido crescimento, ganho de peso e de densidade óssea em ratas. Este crescimento é gradual até os seis meses, e a partir de então, as alterações tanto da densidade óssea quanto da concentração de cálcio são mínimas; apenas aos 12 meses a rata atinge estabilidade óssea. Dessa forma o autor sugere dois modelos de estudo, baseados na idade das ratas, *mature rat model* (três meses de idade) e *aged rat model* (12 meses de idade). Em função da disponibilidade, custo, e das similaridades das características da perda óssea no *mature rat model* com o *aged rat model*, o autor relata que a ovariectomia realizada aos três meses de idade promove alterações suficientes nos ossos, com perda drástica evidente no osso trabecular a partir da segunda semana pós-ovariectomia, atingindo o auge após um mês. Ambos os modelos são apropriados para estudar a indução da perda óssea pós-menopausa.

Para avaliar os efeitos da ovariectomia na densidade óssea mineral, nas propriedades mecânicas dos ossos em ratas com diferentes idades, Omi & Ezawa¹⁰⁶ (1995)

fêmur em três experimentos. Foram consideradas diferentes idades e dieta rica ou deficiente em cálcio. Os autores concluíram que a densidade óssea mineral dos ossos trabeculares foi significativamente mais baixa após a ovariectomia, o que foi evidenciado após o período de um mês, independente da idade da rata. A deficiência do cálcio também provocou diminuição da densidade óssea trabecular. Quanto ao osso cortical, somente foi observada diminuição da densidade óssea mineral nas ratas que sofreram a OVX aos seis meses de idade e foram sacrificadas num período maior. Os autores sugerem que a massa óssea trabecular começa a diminuir imediatamente após a OVX, no entanto, alterações no osso cortical requerem um tempo maior.

Para avaliar os efeitos da deficiência do estrógeno obtida por meio da ovariectomia, bem como da sua reposição, e os efeitos do cálcio nos ossos trabeculares e corticais, Jiang et al.⁶³ (1997), realizaram um estudo com cento e cinquenta ratas, que foram submetidas a testes biomecânicos e densitométricos das vértebras L1, L4 e do fêmur. Os animais foram divididos em grupos experimentais, um dos quais foi simplesmente ovariectomizado, sendo o outro ovariectomizado, porém, com reposição do estrógeno, e outros dois grupos ovariectomizados com dieta deficiente em cálcio, porém, com ou sem a reposição hormonal. Os autores observaram que houve uma maior perda óssea no grupo ovariectomizado com dieta deficiente em cálcio, seguido do grupo simplesmente ovariectomizado e do grupo com deficiência em cálcio. A reposição com estrógeno promoveu maior densidade óssea mineral, estatisticamente significativa em todos os locais avaliados. A resposta do osso trabecular à deficiência do estrógeno é maior que a do osso cortical. O tratamento com estrógeno após a ovariectomia em ratas promoveu uma aposição óssea na cortical, conferindo altos valores à densidade óssea, algumas vezes superior até mesmo ao grupo *sham* operado.

Lane et al.⁸⁵ (1998) monitoraram *in vivo* as alterações no osso trabecular causadas pela deficiência do estrógeno por vários

períodos após ovariectomia. Para este trabalho foram utilizadas quarenta ratas ovariectomizadas ou *sham* operadas aos seis meses de idade. Em períodos de tempo compreendidos entre cinco e cinquenta dias pós-ovariectomia, as ratas tiveram suas tíbias e fêmures analisados por meio de *X-ray tomographic microscopy* (XTM). Esta técnica foi desenvolvida pelos autores para avaliar tridimensionalmente o osso trabecular *in vivo*. Após o último período do experimento, os animais foram sacrificados para análise histomorfométrica dos ossos previamente estudados. Os autores observaram que a perda da conectividade trabecular ocorre rapidamente após a ovariectomia, com 27-31% entre os dias três-oito, 38-40% nos dias 29-33 e 50-60% no quinquagésimo dia. O volume do osso trabecular também diminuiu significativamente após a ovariectomia, numa porcentagem de 25% no dia oito e acima de 50% no 50º dia. Os animais *sham* operados não exibiram alterações significativas no osso trabecular durante o período experimental. Os autores também observaram uma excelente correlação entre a análise por XTM com a histomorfometria. Concluiu-se que períodos muito curtos após a depleção do estrógeno (menos de cinco dias) são suficientes para promover significativa deterioração estrutural do osso trabecular, havendo necessidade de considerar uma rápida intervenção com agentes que possam prevenir essas alterações.

Para evidenciar a excessiva perda óssea decorrente da depleção de estrógeno associada à dieta com baixa concentração de cálcio, Namkung-Mattai et al.⁹⁹ (2001), propuseram um modelo de estudo, com ratas ovariectomizadas aos dois meses de idade. Segundo os autores, após um mês da OVX foi confirmada a presença de osteoporose nas vértebras e fêmures. Neste mesmo trabalho, os autores avaliaram o processo de reparação óssea pós-fratura nessas ratas com osteoporose, evidenciando diminuição das propriedades mecânicas nos ossos das ratas OVX, bem como alterações qualitativas na formação do calo ósseo,

sugerindo um retardo no processo de reparo ósseo em ratas com osteoporose.

Deyhim et al.²² (2003) avaliaram a densidade óssea mineral e as propriedades mecânicas da quarta vértebra lombar, tibia e fêmur de 32 ratas submetidas à ovariectomia ou *sham* operadas. Os autores observaram que após quarenta dias da ovariectomia houve redução da densidade óssea mineral de todos os ossos estudados comparados aos do grupo controle. Por meio de testes mecânicos, foi constatada que a força necessária para promover a fratura óssea foi significativamente menor no grupo ovariectomizado comparado ao controle. Com isso os autores concluíram que após a ovariectomia há redução da densidade óssea mineral e uma maior susceptibilidade à fratura, pois os ossos tornaram-se mais frágeis.

Em modelo experimental com coelhos, Cao et al.¹², em 2004, evidenciaram os efeitos da OVX na qualidade do osso mandibular. Analisando uma região edêntula, os autores observaram alterações na estrutura do osso trabecular, com diminuição do número de trabéculas e aumento dos espaços entre as mesmas, aumento de áreas de erosão na superfície óssea, além de aumento do índice de aposição óssea. Dessa forma os autores concluíram que esse aumento no ritmo de remodelação óssea acarretou em perda de tecido ósseo trabecular, sugerindo que o mesmo pode ocorrer em mulheres após a menopausa.

A diminuição da densidade óssea mineral na tibia e fêmur de ratas OVX foi prevenida com a TRH/E (1,25mg/Kg/dia de etinilestradiol) (ARSHAD et al.⁵, 2004).

Em modelo experimental com ratas OVX, Burt-Pichar et al.⁹, em 2005, demonstraram significativa e rápida redução da massa óssea trabecular em tibias. Após 14 dias da OVX, os autores identificaram histomorfometricamente, diminuição no número de trabéculas ósseas, aumento da atividade óssea, evidenciada por maior quantidade de superfícies com osteoclastos, e parâmetros de formação óssea. Neste

mesmo trabalho os autores também avaliaram a inervação do tecido ósseo por imunohistoquímica, constatando uma dramática redução na inervação óssea decorrente da depleção do estrógeno com a OVX. Assim, os autores sugeriram a possível participação de reguladores neurais na perda óssea durante a osteoporose.

A terapia de reposição hormonal tem sido utilizada tanto na prevenção quanto no tratamento da osteoporose, exercendo uma proteção efetiva da perda óssea pós-menopausa. Tem sido demonstrado que este hormônio não somente previne a perda óssea após a menopausa, como também pode acrescentar algum ganho em pacientes com osteoporose estabelecida (TURNER et al.¹⁴⁶, 1994; MODESTO FILHO et al.⁹², 1996; GAMBACCIANI & CIAPONI³⁷, 2000).

2.3 Estrógeno

A palavra estrógeno tem origem do Latim *Oestrus* ou do Grego *Oistros*, “desejo louco”. Foi introduzida na língua inglesa em meados de 1890. (RUGGIERO & LIKIS, 2002¹²²; SHOHAM & SHACHTER¹²⁸, 1996). O estrógeno é um hormônio da classe dos esteróides, que exerce influência no crescimento, diferenciação, e função de muitos tecidos, como os que compõem o sistema reprodutor tanto feminino quanto masculino, além de desempenhar importante papel na regulação óssea e no sistema cardiovascular (KUIPER et al.⁸³, 1997; RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002). Produzido pelos ovários, pelo córtex da adrenal, e periféricamente através da conversão da gordura pela androstenediona, apresenta-se sob três principais formas. O 17 β -estradiol (estradiol ou E2), produzido pelos ovários, é o estrógeno encontrado em maior quantidade e o mais potente, pois apresenta maior afinidade pelos receptores de estrógeno. O estrone (E1) que é menos potente que o

estradiol, e o estriol (E3), produzido pela placenta durante a gravidez, no entanto, encontrado em pequena quantidade em mulheres não grávidas (RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002). Os hormônios esteróides são essenciais para o desenvolvimento esquelético e manutenção da integridade óssea ao longo da vida adulta (MUNDY⁹⁸, 1993; COMPSTON²⁰, 2001). Além de agir sobre o metabolismo ósseo, tem sido atribuída ao estrógeno uma função preventiva no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (WASSMANN et al.¹⁵¹, 2001).

Os mecanismos de ação do estrógeno na prevenção da reabsorção óssea não estão ainda totalmente esclarecidos (MUNDY⁹⁸, 1993; PAYNE et al.¹⁰⁹, 1997; COMPSTON²⁰, 2001), porém, sabe-se que os efeitos atribuídos ao estrógeno são mediados por citocinas, e envolvem a interação receptor/ligante (COMPSTON²⁰, 2001; SRIVASTAVA et al.¹³⁵, 2001).

Dois tipos de receptores para o estrógeno (ER α e ER β) têm sido identificados, tanto em mulheres quanto em homens, apresentando distribuição diferente nos tecidos (KUIPER et al.⁸³, 1997; RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002). Embora esses dois tipos de receptores compartilhem muitas funções similares há diferenças em seus mecanismos reguladores de transcrição, afinidades de ligação antagonista, e de localização (KUIPER et al.⁸³, 1997; CASSIDY¹³, 1999). O ER α é expressado no útero, ovário, glândulas mamárias, testículo, epidídimo, fígado, rim, sistema cardiovascular, sistema nervoso central, trato urogenital, adrenal e ossos, sendo o maior responsável pelos efeitos do estrógeno no osso trabecular tanto em homens quanto em mulheres (RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2005). O ER β é encontrado no trato gastrintestinal, cérebro, pulmão, sistema cardiovascular, trato urogenital, osso, e também nos tecidos do aparelho reprodutor, sendo o ovário e próstatas os tecidos que mais expressam o ER β (RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002; KUIPER et al.⁸³, 1997). A complexidade desta distribuição torna-se importante a medida que os

moduladores seletivos de receptor de estrógeno (SERMs) podem competir tanto com ER α quanto com ER β exercendo atividade agonista ou antagonista (RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002). O 17 β -estradiol é um estrógeno de ação rápida que apresenta cinco vezes mais a

das citocinas envolvidas na sua diferenciação. Outro importante mecanismo que justifica o aumento da reabsorção óssea com a deficiência do estrógeno foi relatado por Hughes et al.⁵⁵ em 1996. Os autores demonstraram que o 17 β estradiol promoveu apoptose de osteoclastos maduros bem como de seus precursores. Assim tem sido relatado que o estrógeno inibe a reabsorção óssea por induzir a apoptose, tanto direta quanto indiretamente (FOUNTAS et al.³³, 2004).

Várias citocinas estão envolvidas no processo de reabsorção óssea. Na homeostasia normal, a IL-6 produzida pelos osteoblastos estimula a reabsorção pelos osteoclastos. O estrógeno reprime a produção de IL-6, assim, há diminuição da atividade osteoclástica, e conseqüentemente a promoção de efeito benéfico na densidade óssea (REDDY¹¹⁴, 2001).

Gray⁴⁶ (1989) demonstrou a presença de receptor de estrógeno nas células da linhagem dos osteoblastos, evidenciando uma estimulação direta deste hormônio na secreção de TGF β , na concentração de IGFs e na redução da atividade da fosfatase alcalina por essas células.

Embora o tratamento com estrógeno tenha proporcionado uma redução na perda de osso trabecular, Tivesten et al.¹⁴⁵ (2004) demonstraram que este hormônio retardou o crescimento longitudinal das tíbias e fêmures de ratas OVX. Segundo os autores, os distúrbios no crescimento ósseo longitudinal estão associados com alterações nos níveis de IGF-I. Foi demonstrado pelos autores que a reposição hormonal com estrógeno, em ratas OVX, reduziu os níveis séricos de IGF-I.

Payne et al.¹⁰⁸ (1993) realizaram um estudo para verificar a presença de IL-8 e IL1 no fluido gengival de mulheres na pré-menopausa ou pós menopausa com TRH/E (grupo estrógeno suficiente), e mulheres na pós-menopausa sem reposição hormonal (grupo estrógeno deficiente), a fim de estabelecer uma correlação entre essas citocinas envolvidas na etiopatogenia da destruição periodontal com a presença do

estrógeno. Segundo os autores, a IL-8 foi detectada em 76,9% das mulheres estrógeno deficientes, e em 30,8% das mulheres estrógeno suficientes. Similarmente, a IL1 β foi detectada em 92,3% das mulheres estrógeno deficientes, e em 23,1% das mulheres estrógeno suficientes. Os autores observaram também que o nível dessas citocinas em mulheres estrógeno deficientes foi maior quando comparado às mulheres estrógeno suficientes, sugerindo que o estrógeno exerce influência na produção local de IL-8 e IL-1 β .

Reinhardt et al.¹¹⁶ (1998) fizeram um trabalho com mulheres na pós menopausa com e sem evidência de doença periodontal, para avaliar a relação entre a IL1- β , um dos mais potentes mediadores químicos relacionados com a reabsorção óssea, presente no fluido gengival, com o nível sérico de estrógeno, bem como com a progressão da doença periodontal. Segundo os autores o estrógeno reduziu a quantidade de IL-1 β presente no fluido gengival de pacientes com periodontite progressiva, sugerindo uma possível interação do estrógeno com macrófagos deprimindo a produção local de IL1- β .

Crump et al.²¹ (2002) utilizando um modelo experimental de periodontite *in vivo*, observaram que o estrógeno foi capaz de regular o efeito da estimulação dos osteoclastos por LPS de *Escherichia coli*. Lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede das bactérias Gram negativas, capaz de estimular a resposta inflamatória e a atividade osteoclástica. Esse agente pró-inflamatório quando introduzido na calvária de ratos promoveu um aumento no número de osteoclastos. Quando associado ao estrógeno, após 14 dias, houve uma diminuição no número de osteoclastos. Os autores concluíram que esse modelo experimental é efetivo para se estudar os efeitos inflamatórios da reabsorção óssea. Os resultados sugerem que o estrógeno pode inibir diretamente ou exercer influência sobre os produtos de secreção dos macrófagos.

O estrógeno também induz a produção de proteína óssea morfogenética, BMP, uma citocina da família TGF- β (Fator de crescimento

transformador β) que apresenta efeito osteoindutor (GRAY⁴⁶, 1989; COMPSTON²⁰, 2001).

A rápida perda óssea seguida da menopausa pode ser prevenida ou inibida pelo tratamento com estrógeno (MUNDY⁹⁸, 1993) que continua sendo o método mais efetivo no tratamento dos sintomas pós menopausa, bem como na prevenção da osteoporose (NORDERYD et al.¹⁰², 1993.) Tem sido sugerido que a terapia com o estrógeno pode levar a um aumento na massa óssea (MUNDY⁹⁸, 1993). Apresenta ainda como vantagens a redução dos sintomas da menopausa, a melhora no perfil lipídico, e a redução do risco de doença cardiovascular (CASSIDY¹³, 1999; WASSMANN et al.¹⁵¹, 2001). Gambacciani & Massimo³⁷ (2000) relataram que a TRH/E pode reduzir em até 60% os riscos de fratura após a menopausa.

Os efeitos da administração do estradiol imediatamente após a OVX, no processo de remodelação óssea do fêmur de ratas, foram estudados por Sims et al.¹³² em 1996. Os autores observaram inibição da perda óssea e supressão dos índices de formação e reabsorção com a administração do 17β estradiol, tanto com uma dose de $8\mu\text{g}/\text{kg}$ quanto com uma dose de $20\mu\text{g}/\text{kg}$ por dia durante um período de seis a 21 dias.

Em avaliação do processo de reparação óssea ao redor de implante de titânio colocado na tíbia de ratas OVX, Qi et al.¹¹² (2004) verificaram que a reposição estrogênica influenciou de forma positiva o processo. Assim, os autores concluíram que a TRH/E pode ser considerada uma forma efetiva de atenuar o impacto da osteoporose na osteointegração.

Os benefícios da TRH com o estrógeno parecem extrapolar para os tecidos bucais (PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; PAYNE et al.¹⁰⁹, 1997; JIANG et al.⁶³, 1997; TILAKARATNE & SOORY¹⁴⁴, 1999; CIVITELLI et al.¹⁸ 2002; YANG et al.¹⁵⁵, 2003).

Estudos têm demonstrado que o uso do estrógeno na terapia de reposição hormonal parece diminuir o risco de doença

periodontal em mulheres (GRODSTEIN et al.⁴⁷, 1996; JEFFCOAT⁶⁰, 1998; NORDERYD et al.¹⁰², 1993; RONDEROS et al.¹²⁰, 2000).

O estrógeno, ao contrário da progesterona, promove uma diminuição na síntese de prostaglandina nos tecidos gengivais, além de exercer efeitos anabólicos importante, como a estimulação do metabolismo do colágeno e estimulação da angiogênese. Em trabalho realizado com cultura de fibroblastos gengivais humanos, Tilakaratne & Soory¹⁴⁴ (1999) observaram que o estrógeno foi capaz de induzir a conversão da testosterona para sua forma biologicamente ativa (DHT- 5 α diidrotestosterona), exercendo efeitos metabólicos, contribuindo para reparação do tecido conjuntivo e exercendo funções osteogênicas. Os achados desse trabalho indicam a habilidade do estrógeno para induzir atividades anabólicas nos tecidos.

2.4 Relação entre a osteoporose e a periodontite

A periodontite caracteriza-se pela reabsorção do osso alveolar, destruição das fibras do ligamento periodontal e migração apical do epitélio juncional, em decorrência de mecanismos inflamatórios relacionados à infecção microbiana. Clinicamente caracteriza-se pela formação de bolsas periodontais, perda de inserção, sangramento à sondagem, exsudação, mobilidade dentária que pode acarretar na perda do dente (LASCALA & MOUSSALLI⁸⁶, 1999; KINANE et al.⁷¹, 2005; NYMAN & LINDHE¹⁰³, 2005).

Os conceitos atuais em relação à etiologia e à patogênese da doença periodontal são derivados, principalmente, dos resultados de estudos epidemiológicos, análises de material de autópsia e biópsia, avaliação clínica e experimentos animais. Observações resultantes de

estudos epidemiológicos indicam de forma consistente que a ocorrência e a extensão da doença periodontal aumentam com a idade (KINANE et al.⁷¹, 2005). A prevalência da periodontite aumenta em indivíduos mais velhos (PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; LASCALA & MOUSSALLI⁸⁶, 1999), que também são mais susceptíveis a doenças sistêmicas como a osteoporose.

A organização dos tecidos periodontais de ratos (epitélio gengival, epitélio sulcular, epitélio juncional, fibras colágenas, cimento e

Elovic et al.²⁸ (1994) reportaram alterações ósseas decorrentes da depleção de estrógeno nos maxilares. Os autores realizaram um trabalho com quarenta e duas ratas, ovariectomizadas ou sham operadas, não observando alterações significantes, quanto a densidade óssea mineral, área óssea ou rigidez, na mandíbula de ratas OVX ou *sham* operadas. No entanto, constatou-se que a remoção dos dentes antagonistas influenciou a resistência mecânica da mandíbula. A extração dos molares superiores resultou em uma diminuição de 25% na rigidez da mandíbula de ratas OVX, comparadas com as ratas *sham* operadas. Dessa forma os autores concluíram que a OVX combinada com a extração dos dentes antagonistas provocou alterações significantes na mandíbula.

Mediante exames radiográficos, clínicos e microscópicos, Johnson et al.⁶⁴ (1997) avaliaram a relação entre a deficiência do estrógeno com a inflamação periodontal e perda óssea alveolar em ovelhas OVX e *sham* operadas. Os autores observaram uma significativa perda de inserção e de osso alveolar após noventa dias, alterações estas, que foram mais acentuadas após um ano da ovariectomia. Concluíram que a deficiência do estrógeno pode resultar em significativa perda óssea alveolar.

Moriya et al.⁹⁶ (1998) conduziram um estudo a fim de determinar a relação entre a osteoporose experimental e a perda óssea alveolar induzida por meio da ovariectomia em ratas com dieta normal ou com deficiência de cálcio. Foram utilizadas vinte ratas, ovariectomizadas ou *sham* operadas com apenas quatro semanas de idade. Por meio de exames radiográficos, após um mês da cirurgia, os autores observaram que a densidade óssea mineral da tíbia e fêmur das ratas ovariectomizadas submetidas a uma dieta normal foi maior que das ratas ovariectomizadas ou mesmo *sham* operadas com dieta deficiente em cálcio. No osso alveolar, tanto da maxila quanto da mandíbula, os autores constataram que não houve uma diferença estatisticamente significativa

entre os grupos. Dessa forma, os autores concluíram que a osteoporose isoladamente não corresponde a um fator principal de destruição óssea periodontal.

Alterações no osso trabecular do côndilo mandibular foram observadas por Tanaka et al.¹³⁸, em 1999. Os autores avaliaram a região subcondral e central dos côndilos de sessenta e quatro ratas ovariectomizadas ou *sham* operadas, sacrificadas aos sete, 14, trinta e sessenta dias. Segundo os autores, no grupo *sham* o volume ósseo das regiões subcondral e central aumentaram com o tempo, embora a remodelação óssea tenha permanecido baixa. O volume ósseo da região subcondral do grupo OVX diminuiu aos sete dias, retornando aos níveis do *sham* a partir do décimo quarto dia. Na região central, o volume ósseo permaneceu inalterado até os sessenta dias, quando foi constatada uma diminuição estatisticamente significativa, quando comparado ao grupo *sham*. Dessa forma os autores concluíram que a deficiência de estrógeno alterou a dinâmica óssea do côndilo, induzindo uma perda óssea transitória na região subcondral, enquanto na região central inibiu o ganho ósseo.

Hidaka et al.⁵² (2000) realizaram um estudo para verificar a ocorrência de alterações no periodonto de ratas com três meses de idade, submetidas à ovariectomia ou *sham* operadas, e medicadas com estrógeno, fitoterápicos ou placebo durante um período de sete semanas. Foi analisada a densidade óssea da mandíbula, bem como o aspecto do trabeculado ósseo alveolar e espaço do ligamento periodontal por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os autores observaram que a ovariectomia induziu alterações nos tecidos periodontais e osso alveolar da mandíbula. A administração do fitoterápico não reverteu essas alterações, no entanto o 17β estradiol alterou tanto a superfície óssea alveolar quanto o ligamento periodontal, conferindo às ratas um aspecto do trabeculado ósseo semelhante ao grupo *sham* operado.

Hunziker et al.⁵⁶ (2000) conduziram um estudo para avaliar as alterações na mandíbula após a ovariectomia, bem como o efeito de agentes anti-reabsortivos. Foram avaliadas 82 ratas ovariectomizadas ou *sham* operadas aos três meses de idade, divididas em oito grupos, que receberam após o período de um ano, tratamento com diversos agentes. Os autores observaram que alguns dos agentes utilizados, entre eles o estrógeno e o paratormônio administrado em doses intermitentes, promoveram alterações na mandíbula e ossos longos.

Hara et al.⁵⁰ (2001) avaliaram as alterações ósseas do palato duro, mandíbula e tibia de ratas ovariectomizadas com dieta normal e com deficiência de cálcio. Após 14 semanas da cirurgia (ovariectomia ou *sham*) as ratas foram sacrificadas e os autores puderam observar que a ausência dos hormônios ovarianos provocou alterações na dinâmica óssea da mandíbula e tibia, porém no palato duro não foram observadas alterações significativas. Entretanto, a dieta deficiente de cálcio induziu perda óssea e aumento da remodelação óssea em todos os ossos estudados, independente da ovariectomia.

Para avaliar morfologicamente os efeitos da ovariectomia na reparação óssea alveolar pós-extração dentária, Tanaka et al.¹³⁹ (2001) realizaram um estudo com ratas de seis meses de idade, que tiveram seus primeiros molares extraídos sete dias após a OVX. A reparação do alvéolo dentário foi avaliada em MEV (microscopia eletrônica de varredura), BSE (*backscattered electron microscopy*) e EDX (*energy-dispersive X-ray*), aos sete, trinta e sessenta dias após a extração. Os autores observaram que aos trinta e sessenta dias a reabsorção óssea ao redor do alvéolo das ratas ovariectomizadas foi significativamente maior quando comparada ao grupo *sham*. No entanto, uma análise morfométrica no interior do alvéolo demonstrou que a quantidade de osso neoformado foi semelhante nos dois grupos. Da mesma forma, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na porcentagem de cálcio e fósforo entre os grupos. Os autores sugeriram

que a deficiência do estrogênio pode ser considerada um fator de risco para uma deficiente reparação óssea pós-extração dentária.

Para investigar as alterações qualitativas e quantitativas dos osteoclastos no periodonto de ratas, Kawamoto et al.⁷⁰ (2002) realizaram um trabalho com 24 ratas, concluindo que a deficiência do estrogênio, obtida por meio da ovariectomia, induziu a osteoclastogênese no periodonto desses animais. As alterações quantitativas dos osteoclastos foram prevenidas pela reposição do estrogênio.

Os efeitos da depleção do estrogênio, obtida por meio da ovariectomia, bem como do uso da sinvastatina na reparação óssea mandibular, foram avaliados por Junqueira et al.⁶⁵ em 2002. Os autores observaram que nas ratas OVXs houve uma diminuição na capacidade de reparação óssea quando comparada ao grupo controle sem o tratamento medicamentoso.

Com o objetivo de estabelecer a relação entre a deficiência de estrogênio obtida por meio da ovariectomia e a perda dentária, Tanaka et al.¹⁴⁰ (2002) realizaram um estudo com 24 ratas com quatro meses de idade. Foi analisado histomorfometricamente o aspecto estrutural do trabeculado ósseo alveolar da mandíbula após dois meses da ovariectomia. Segundo os autores, a deficiência do estrogênio causou uma significativa diminuição da massa óssea alveolar na região interradicular do primeiro molar das ratas. Os autores sugeriram que essas alterações podem acelerar a destruição do osso alveolar contribuindo para perda dentária.

Kuroda et al.⁸⁴ (2003) realizaram um trabalho comparando os efeitos da deficiência do estrogênio, obtida por meio da OVX, na densidade óssea do fêmur e da mandíbula em ratas. Após um período de 109 dias, foi observado que os fêmures das ratas OVX apresentaram maior radiolucência comparada aos do grupo controle (*sham* operadas), ao passo que na mandíbula a radiolucência foi semelhante nos dois grupos. No entanto os autores observaram que na mandíbula, houve uma

diferença regional na densidade óssea mineral; a região condilar das ratas OVX apresentaram uma densidade óssea mineral 14% menor que nas ratas *sham* operadas, e na região dos molares, embora menos evidente, também foi constatada uma maior perda óssea trabecular nas ratas OVX.

Alterações no trabeculado ósseo da região de furca do primeiro molar inferior foram observadas por Tanaka et al.¹⁴¹, em 2003. Os autores compararam por meio de imagens obtidas por micro CT e confocal *laser scanning microscope*, os aspectos histomorfométricos do trabeculado ósseo do septo inter-radicular de ratas OVX e *sham* operadas após um ano. Segundo os autores, o volume ósseo, bem como a espessura das trabéculas foi significativamente menor no grupo OVX. Dessa forma concluiu-se que houve uma perda de osso trabecular, na região do septo inter-radicular um ano após a OVX, tendo sido observada também uma fragmentação das trabéculas ósseas.

Para avaliar os efeitos da deficiência do estrógeno na micro-arquitetura da mandíbula e tíbia, Yang et al.¹⁵⁵, em 2003 realizaram um estudo com 24 ratas submetidas à ovariectomia (n=12) ou *sham* operadas (n=12). Por meio de imagens obtidas por tomografia computadorizada, verificou-se um decréscimo significativo no volume do trabeculado ósseo, e aumento dos espaços medulares nas ratas ovariectomizadas, tanto na mandíbula quanto na tíbia. Segundo os autores, houve uma correlação positiva entre esses dois ossos, no que se refere à quantidade de espaços inter-trabeculares e ao aspecto das trabéculas ósseas. Entretanto, não foi observada uma correlação estatisticamente significativa entre o volume ósseo e a espessura das trabéculas nesses dois ossos. Os autores sugerem que o padrão micro-arquitetural da mandíbula pode prever o padrão micro-arquitetural dos ossos longos.

Duarte et al.²³ (2004) avaliaram o impacto da deficiência do estrógeno, bem como da sua reposição na reabsorção óssea resultante da periodontite experimental. Cinqüenta e oito ratas foram divididas em quatro grupos, sendo o primeiro deles constituído pelas ratas *sham* operadas e os outros três formados por ratas ovariectomizadas, recebendo placebo, estrógeno ou calcitonina. Após 21 dias da ovariectomia foram colocadas ligaduras ao redor da coroa dos primeiros molares de um dos lados da mandíbula, que foram mantidas por sessenta dias. Os animais foram sacrificados e os autores analisaram os dentes com e sem a ligadura. Foi observado que nos dentes sem ligadura, as ratas com deficiência de estrógeno (grupo ovariectomizado) demonstraram perda óssea alveolar na região de furca. Este efeito negativo foi restabelecido com a terapia estrogênica. Em contrapartida, nos dentes com a ligadura a terapia com o estrógeno não foi capaz de evitar os efeitos negativos no osso alveolar. Os autores concluíram que a terapia com o estrógeno imediatamente após a ovariectomia conferiu proteção contra os efeitos negativos da deficiência do estrógeno no osso alveolar. No entanto, não foi eficaz na prevenção da reabsorção óssea induzida pela periodontite.

Em humanos, os efeitos da osteopenia/osteoporose, na perda óssea alveolar, nos tecidos periodontais e na perda dentária, têm sido estudados por diversos autores (KRIBBS et al.⁸¹, 1989; KRIBBS⁸⁰, 1990; ELDERS et al.²⁷, 1992; NORDERYD et al.¹⁰², 1993, KLEMENTTI et al.⁷⁴, 1994; PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; GRODSTEIN et al.⁴⁷, HILDEBOLT et al.⁵³⁻⁵⁴, 1997; TAGUCHI¹³⁷, 1999; PAYNE et al.¹⁰⁹, 1997; PILGRAN et al.¹¹¹, 1999; REINHARDT et al.¹¹⁷, 1999; RONDEROS et al.¹²⁰, 2000; TEZAL et al.¹⁴³, 2000, INAGAK et al.⁵⁷, 2001; CIVITELLI et al.¹⁸, 2002; OHTA et al.¹⁰⁵, 2002; GUR et al.⁴⁸, 2003; MOHAMMAD et al.⁹⁵, 2003).

Para avaliar a relação entre as massas ósseas esqueléticas e mandibulares, Kribbs et al.⁸¹ (1989) conduziram um estudo com 85 mulheres com idade variando entre os cinqüenta e 84 anos, que

apresentavam osteoporose. As condições bucais das pacientes foram avaliadas por meio de exame clínico e radiográfico. O exame clínico constava de análise de profundidade de bolsa periodontal, recessão gengival, índice de sangramento e inflamação gengival. Radiografias periapicais, com escala de alumínio, foram realizadas para determinação da massa óssea mandibular por microdensitometria; radiografias oclusais possibilitaram a determinação da espessura do rebordo alveolar, e radiografias panorâmicas, para mensuração da espessura do osso cortical no ângulo da mandíbula. Foi demonstrada uma relação significativa entre a massa óssea mandibular, densidade e espessura de cortical com a massa óssea esquelética. No entanto a perda óssea resultante da doença periodontal não esteve relacionada com a osteoporose.

Kribbs⁸⁰ (1990) realizou um estudo com 112 mulheres, com idade compreendida entre cinqüenta e 85 anos, para comparar o osso mandibular daquelas com osteoporose com o das mulheres normais. Foram avaliados a massa óssea mandibular, espessura da cortical óssea, número de dentes presentes e condição periodontal. Segundo o autor, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a população osteoporótica e a população normal, no que se refere à massa óssea mandibular, espessura da cortical e número de dentes. Quanto à condição periodontal, foram avaliados a profundidade de bolsa, recessão gengival e índice de sangramento. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as populações estudadas. O autor concluiu que embora a massa óssea da população com osteoporose tenha sido menor, a osteoporose parece não ter influência na etiopatogenia da doença periodontal.

Elders et al.²⁷ (1992) compararam as condições periodontais com a densidade óssea lombar e espessura da cortical do metacarpo, de 286 mulheres com idade compreendida entre 46 e 55 anos, que não faziam reposição hormonal. Segundo os autores, não foi observada relação entre a ocorrência de periodontite com a massa óssea

esquelética. Os autores concluíram que embora a perda da massa óssea não desempenhe papel relevante no início da doença periodontal, não pode ser excluída a possibilidade de uma vez estabelecida a periodontite, esta perda, desempenhar algum efeito na sua severidade.

NORDERYD et al.¹⁰²(1993) realizaram um estudo para determinar uma possível associação entre a terapia estrogênica e as condições gengivais e periodontais em mulheres na faixa etária compreendida entre os cinquenta e 64 anos. Foram avaliadas as condições bucais como quantidade de placa, índice de sangramento gengival, presença de cálculo subgengival, profundidade de bolsa, nível de inserção periodontal e altura do osso alveolar em 228 mulheres. Os resultados indicaram que o índice de sangramento gengival foi significativamente menor nas mulheres que faziam terapia com estrógeno; entretanto não foram constatadas diferenças estatisticamente significantes no nível de inserção periodontal e quantidade de perda óssea quando comparado ao grupo controle.

Para verificar a relação entre a periodontite avançada, profundidade de bolsa e número de dentes, com a condição mineral esquelética ou a densidade óssea da cortical da mandíbula, Klementti et al.⁷⁴ (1994) conduziram um estudo com 227 mulheres finlandesas, com idade compreendida entre os 48 e 56 anos. Embora os autores não tenham encontrado relação entre a quantidade de dentes e densidade óssea mineral esquelética, foi observado que os indivíduos que apresentaram maior densidade óssea mineral retinham mais dentes com bolsas periodontais profundas. Dessa forma os autores sugeriram que o tratamento periodontal em pessoas com uma boa densidade óssea deve ser motivado.

Mulheres com osteoporose severa apresentam três vezes mais chance de serem edêndulas, do que as mulheres sadias. Esta constatação foi feita por Paganini-Hill

anos. Foram consideradas informações quanto à história médica, estilo de vida, hábitos, uso do estrógeno para terapia de reposição hormonal, saúde dentária, número de dentes, número de visitas ao dentista, usuárias de prótese total, entre outras. Segundo o autor, o uso de prótese total foi maior em mulheres mais velhas que não faziam reposição hormonal estrogênica. A autora sugere que o estrógeno além de prevenir a osteoporose, também exibe efeitos benéficos nos ossos alveolares, estando relacionado com a diminuição de edentulismo.

Para examinar a relação entre a perda dentária e o fator hormonal, Grodstein et al.⁴⁷ (1996) realizaram um estudo em que foram acompanhadas 42.171 enfermeiras, no período pós-menopausa, durante dois anos. Foram colhidas informações quanto ao uso de hormônio, quantidade de dentes presentes e dentes perdidos. Segundo os autores o risco de perda dentária foi menor entre as mulheres que fizeram reposição hormonal, principalmente naquelas que continuavam fazendo no período em que foi realizada esta pesquisa. O uso do hormônio exibiu forte associação inversa com a perda de três dentes ou mais.

Estudando uma população de 135 mulheres na pós menopausa, Hildebolt et al.⁵⁴ (1997) não detectaram correlação significativa entre perda dentária e densidade óssea mineral vertebral.

Payne et al.¹⁰⁹ (1997) realizaram um estudo longitudinal para determinar a associação entre o nível do estrógeno, em um grupo de mulheres pós-menopausa, com a densidade óssea alveolar, durante o período de um ano. Por meio de exames radiográficos, os autores verificaram que a deficiência de estrógeno relacionou-se a uma maior diminuição da densidade óssea alveolar. Além disso, as mulheres que estavam fazendo TRH/E exibiram maior freqüência de sítios que demonstraram ganho de densidade óssea.

Em estudo com 85 mulheres pós-menopausa exibindo boa saúde bucal, Pilgram et al.¹¹¹ (1999) propuseram avaliar a relação entre a profundidade de bolsa e recessão gengival, com a altura da crista óssea

alveolar. As mulheres foram divididas em dois grupos, um dos quais fazia TRH/E e o outro recebia placebo. Os autores fizeram exames clínicos e radiográficos em períodos diferentes e observaram que após dois anos houve uma fraca correlação entre os níveis de inserção periodontal com a altura da crista óssea, concluindo que as alterações na altura do osso, bem como no nível de inserção periodontal estavam mais relacionadas com a idade do que com a resposta a TRH/E.

Com a proposição de estudar a relação entre a perda dentária e a perda óssea generalizada, Taguchi et al.¹³⁷ (1999) realizaram um estudo com 91 mulheres japonesas com idade compreendida entre os quarenta e 68 anos. Foram comparadas a densidade óssea mineral da terceira vértebra lombar, com radiografias panorâmicas, considerando-se a quantidade de dentes presentes, a largura e morfologia da cortical óssea mandibular e a perda óssea alveolar. Os autores concluíram que a perda de dentes posteriores está associada com a diminuição da altura do osso alveolar e da densidade óssea mineral, como consequência da perda óssea generalizada em mulheres idosas.

Com o propósito de avaliar a influência do estrógeno, bem como da osteopenia/osteoporose, na doença periodontal, Reinhardt et al.¹¹⁷, em 1999, realizaram um estudo longitudinal com uma população de 75 mulheres na pós-menopausa. Foram mensurados os níveis séricos de estrógeno, a densidade óssea mineral da espinha lombar para detecção da osteoporose, e avaliadas as condições periodontais, tais como índice de placa, índice de sangramento gengival, nível de inserção clínica e profundidade de bolsa, durante um período de dois anos. Os autores observaram que embora o índice de placa tenha sido maior no grupo estrógeno suficiente, a inflamação não foi tão acentuada, sugerindo que o estrógeno apresenta efeitos inibitórios na resposta inflamatória dos tecidos periodontais. Em contrapartida, o grupo de mulheres com osteopenia/osteoporose apresentou uma resposta inflamatória mais acentuada à placa bacteriana. A progressão da doença periodontal

mostrou-se numericamente maior no grupo osteopênico/ostoporótico, porém não foi estatisticamente significativa. Quando considerada a suficiência ou deficiente do estrógeno nas mulheres com osteopenia/osteoporose, os autores constataram que os indivíduos com deficiência do estrógeno apresentaram maior tendência a perda de inserção clínica. Os autores concluíram que a suplementação com estrógeno está relacionada ao menor grau de inflamação gengival e de perda de inserção clínica em mulheres osteopênicas/osteoporóticas.

Ronderos et al.¹²⁰ (2000) em estudo realizado entre 1988-1994, numa amostra de 11.655 pessoas, avaliaram a possível associação entre a doença periodontal, a densidade óssea femural e a terapia de reposição estrogênica. Como critérios utilizados para verificação da doença periodontal foram considerados a profundidade de bolsa, o nível de inserção clínica, o índice de cálculo e sangramento gengival. Segundo os autores, na presença de irritantes locais há maior perda óssea periodontal em pacientes com osteoporose do que em indivíduos normais. Os autores também observaram que as mulheres que faziam reposição estrogênica apresentaram menor perda de inserção quando comparadas àquelas que nunca tinham usado o hormônio. Dessa forma concluiu-se que na presença de grande quantidade de cálculo, as mulheres com osteoporose apresentam maior risco de perda da inserção periodontal, e este risco pode ser atenuado pela terapia de reposição estrogênica.

Tezal et al.¹⁴³ (2000) realizaram um estudo a fim de verificar a relação entre a osteoporose e a doença periodontal. Foi analisada a densidade óssea mineral do fêmur e espinha lombar, e comparada com a perda óssea da região interproximal dos dentes, com a profundidade de bolsa periodontal, inserção clínica, sangramento gengival, índice de placa e presença de cálculo, em setenta mulheres na pós-menopausa. Os autores verificaram uma relação estatisticamente significativa entre a perda óssea alveolar e a densidade óssea mineral do fêmur. Os autores concluíram que a densidade mineral óssea esquelética

está relacionada com a perda de osso alveolar inter-proximal e em menor grau com a perda de inserção clínica, o que justifica incluir a osteopenia pós-menopausa como um fator de risco para a doença periodontal.

Em estudo com cento e noventa mulheres japonesas no período de pré e pós menopausa, Inagak et al.⁵⁷ (2001) constataram uma relação significativa entre a quantidade de dentes presentes e a densidade óssea. Foi observado que a proporção de mulheres com menos de vinte dentes aumentou de 7%, naquelas que apresentaram densidade óssea normal, para 32%, quando a densidade óssea estava baixa. Também foi constatado que à medida que a densidade óssea diminui, há uma maior tendência ao desenvolvimento de periodontite moderada a grave. Esses resultados indicam que a densidade óssea sistêmica está relacionada com a doença periodontal e o risco de perda dentária.

Para determinar até quando os efeitos positivos do estrógeno observados no esqueleto podem ser obtidos nos ossos maxilares, Civitelli et al.¹⁸ (2002), realizaram um estudo com 135 mulheres entre 41 e setenta anos de idade, sem evidência de doença periodontal. Estas mulheres foram divididas em dois grupos, um deles incluindo aquelas que faziam uso diário de estrógeno conjugado (Premarim®) e/ou usavam o estrógeno combinado com o acetato de medroxiprogesterona (Prempro®) e no segundo grupo, mulheres fazendo uso de placebo. Foram avaliadas a altura da crista óssea alveolar, a massa óssea alveolar e a densidade óssea da espinha e fêmur. Após o período de três anos os autores puderam concluir que a reposição estrogênica aumentou significativamente a massa óssea alveolar comparada ao grupo placebo. Houve uma correlação positiva entre as mudanças na altura da crista óssea alveolar e densidade óssea na espinha lombar e fêmur nos pacientes tratados com estrógeno, indicando que o aumento da densidade óssea sistêmica é acompanhado de aumento na altura da crista óssea alveolar. Os autores concluíram que a terapia de reposição

estrogênica constitui fator benéfico adicional na melhora da saúde óssea dos maxilares.

Tanto a menopausa fisiológica quanto a ooforectomia representam situações de risco para a reabsorção óssea. Ohta et al.¹⁰⁵ (2002) realizaram um trabalho para verificar em qual dessas situações ocorre maior perda óssea, e se há relação entre o tempo decorrido dessas situações com a reabsorção óssea. Os autores avaliaram mulheres na pós-menopausa recente (menos de três anos), pós-menopausa por mais de três anos, e mulheres que sofreram ooforectomia nos mesmos períodos. Segundo os autores, a reabsorção óssea foi mais acentuada nas mulheres que sofreram ooforectomia, principalmente nos primeiros três anos.

Avaliando uma população de 1.171 mulheres na pós-menopausa, Gur et al.⁴⁸ (2003) verificaram uma relação entre a densidade óssea lombar com a quantidade de dentes presentes. As mulheres edêndulas apresentaram uma significativa diminuição na densidade óssea lombar quando comparadas às mulheres com mais de dez dentes. Os autores sugeriram que uma melhora no estilo de vida, nas estratégias nutricionais para prevenir e tratar a osteoporose pode ter benefício adicional na redução da perda dentária. E ainda extrapolam afirmando que a periodontia convencional em mulheres na pós menopausa somente terá resultado na prevenção da perda dentária se combinado com um tratamento efetivo para doenças ósseas.

Para investigar a relação entre a densidade óssea com a condição periodontal, Mohammad et al.⁹⁵ (2003) realizaram um estudo com trinta mulheres, duas delas exibindo osteoporose, vinte com osteopenia e oito normais. Foram realizados exames intra-bucais e avaliados a quantidade de dentes presentes, índice de placa bacteriana, profundidade de bolsa periodontal e nível de inserção clínica. Segundo os autores, houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre a densidade óssea com a perda dentária e inserção clínica, ou seja,

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da falta de estrógeno ovariano, bem como dos diferentes tempos de início da terapia de reposição hormonal, na evolução da periodontite induzida em ratas ovariectomizadas.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais experimentais

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC-UNESP (Anexo A).

Foram utilizadas 73 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, *Wistar*), com três meses de idade, peso aproximado de 250g, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. As ratas foram mantidas em gaiolas, alimentadas com ração Purina e água *ad libitum*. Os animais foram identificados com pequenas perfurações nas orelhas para controle e comparação do peso, que foi medido em gramas, e obtido imediatamente antes da ovariectomia, no dia da colocação da ligadura nos molares, e no dia do sacrifício.

4.2 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala de cirurgia do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, devidamente limpa. Utilizou-se álcool 70% para assepsia da mesa cirúrgica e os instrumentais foram devidamente

esterilizados. Os cirurgiões e auxiliares usaram avental e material de proteção como máscara e luvas descartáveis.

4.2.1 Anestesia

As ratas foram anestesiadas com solução de Rompun® (Bayer do Brasil) e Dopalen® (Agribands do Brasil Ltda.). Após pesagem, essas receberam uma mistura de 13mg/kg de Rompun® (solução aquosa a 2% de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3tiazina), que é um sedativo analgésico e relaxante muscular, e 33mg/kg de Dopalen® (ketamina base) um anestésico geral, por via intramuscular.

4.2.2 Ovariectomia

Aos três meses de idade, 65 ratas foram ovariectomizadas (Figura 1). A técnica cirúrgica consistiu em anestesia geral, conforme previamente especificado, depilação da região abdominal lateral, anti-sepsia com álcool iodado, incisão longitudinal da pele e musculatura, próxima à linha dos rins e abaixo da última costela. O ovário foi identificado, exposto, e a hemostasia foi realizada por meio da ligação da parte superior do útero com fio de seda 4-0 (Ethicon/ Johnson & Johnson). O ovário, juntamente com a gordura circundante, e pequena porção do útero foram excisados. As camadas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível Catgut 4-0 (Cirumédica) e a pele com fio de seda 4-0 (Ethicon/ Johnson & Johnson). Estes procedimentos foram realizados bilateralmente. Os oito animais restantes (grupo *sham*) sofreram a incisão cirúrgica com exposição dos ovários, porém, estes não foram extirpados, mas sim recolocados na cavidade abdominal, posteriormente suturada.

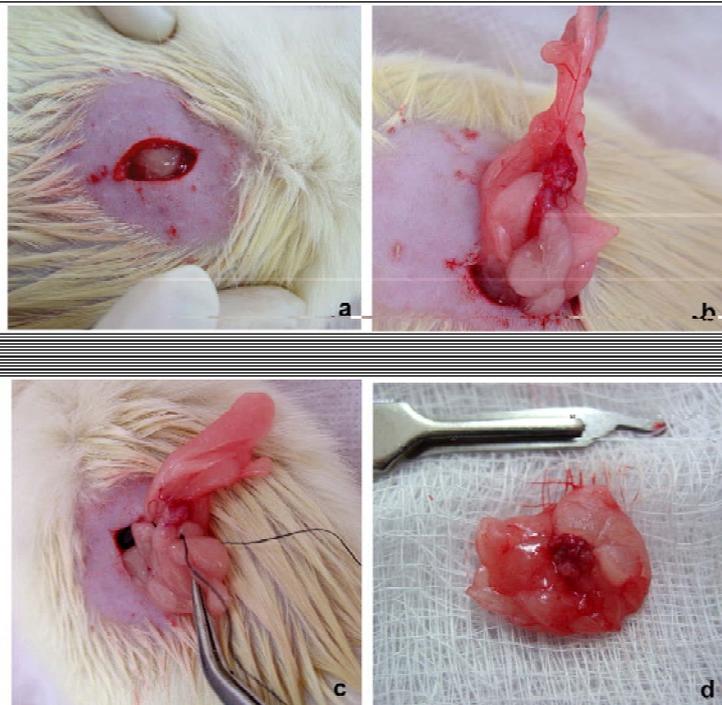


FIGURA 1 - Procedimentos para ovariectomia : a) incisão da pele e musculatura, b) identificação do ovário, c) ligadura da parte superior da trompa com fio de seda 4-0; d) aspecto macroscópico do ovário excisado juntamente com a gordura circundante.

4.3 Grupos experimentais

Após a ovariectomia, as sessenta e cinco ratas foram divididas em cinco grupos (Grupos G0, G1, G2, G3 e G4) com 13 animais em cada, e receberam o tratamento ou placebo em períodos diferentes. Cada grupo foi subdividido em dois (E0 e C0, E1 e C1, E2 e C2, E3 e C3, E4 e C4), de forma que nos animais incluídos nos subgrupos “E” (oito animais em cada) foi realizada a terapia de reposição hormonal estrogênica (TRH/E), e os dos subgrupos “C” (cinco animais em cada) corresponderam ao controle de cada período. Os subgrupos experimentais (E0, E1, E2, E3 e E4) receberam por via subcutânea, em dias alternados, uma dose de 5µg de 17 β-estradiol/100g de peso. O hormônio foi diluído em óleo de soja (Liza®), sendo injetado um volume de 0,1ml em cada animal. Os animais dos subgrupos controles (C0, C1, C2, C3, e C4) receberam por via subcutânea, em dias alternados 0,1ml de óleo de soja (placebo). Nos animais do subgrupo E0 foi iniciada a reposição hormonal estrogênica imediatamente após a ovariectomia. Os animais dos subgrupos E1, E2, E3, e E4 iniciaram o tratamento após uma, duas três e quatro semanas, respectivamente, após a ovariectomia. Esse tratamento foi mantido até a data do sacrifício. Os animais dos subgrupos C0, C1, C2, C3, e C4 receberam o placebo nos períodos correspondentes. As oito ratas incluídas no grupo *sham* não receberam qualquer tratamento (Figura 2).

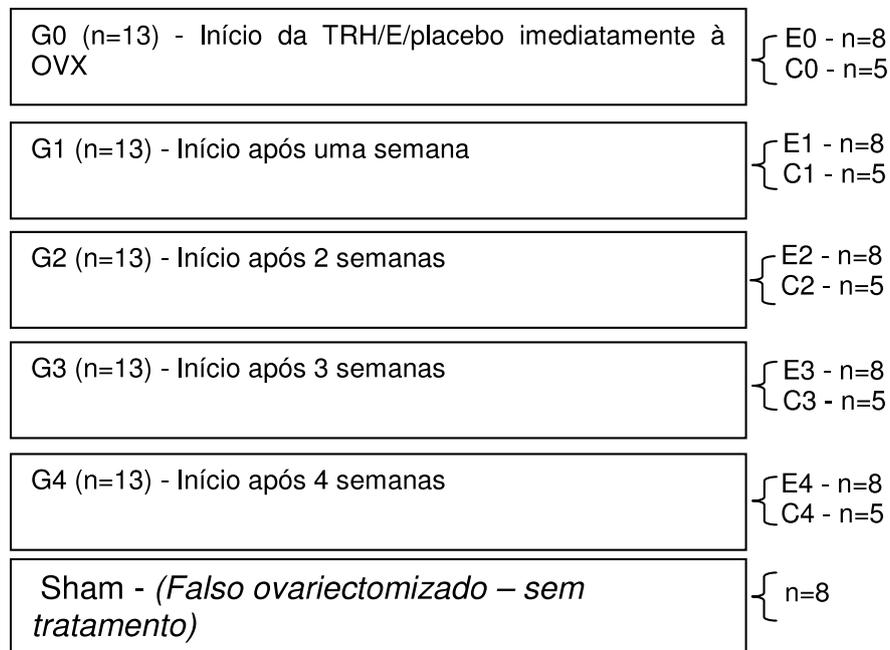
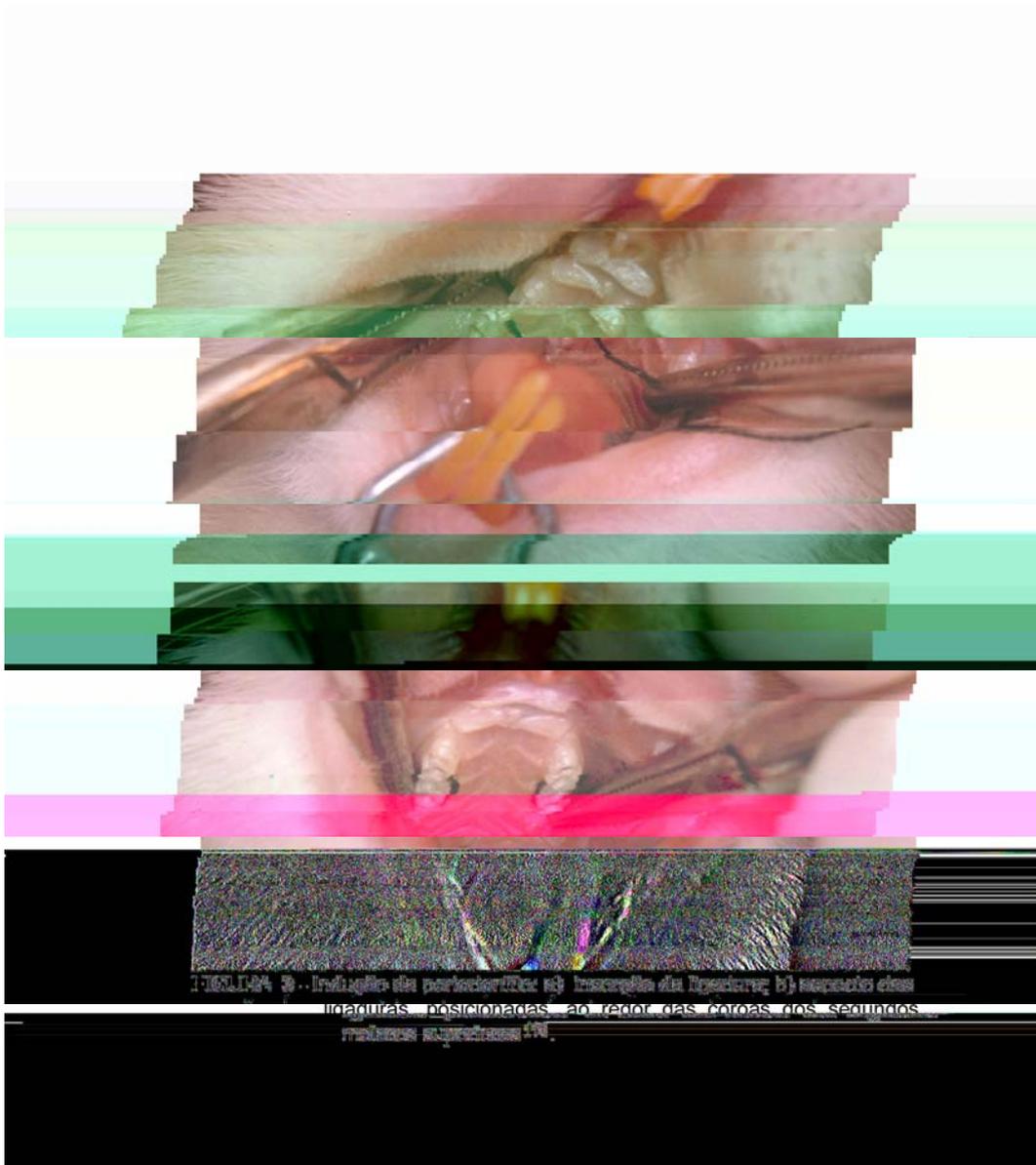


FIGURA 2 – Esquema representativo dos grupos experimentais, controles e *sham* em função do período de início do tratamento/placebo.

4.4 Indução da periodontite

Após o período de um mês da ovariectomia, todas as ratas foram anestesiadas novamente para colocação de uma ligadura com fio de algodão para costura (Coats-Corrente – São Paulo, SP, Brasil) ao redor das coroas dos segundos molares superiores de ambos os lados, na região cervical (REIS¹¹⁸, 2002; ANBINDER², 2004). Este procedimento foi realizado após imobilização dos animais em uma mesa metálica apropriada, que os manteve com a boca aberta (Figura 3). A ligadura foi mantida por cinco semanas, tempo adequado para o desenvolvimento da doença periodontal (REIS¹¹⁸, 2002; ANBINDER², 2004). Durante este

período os animais passaram por duas verificações da estabilidade da ligadura no sulco gengival.



4.5 Massa corpórea dos animais

Cinco ratas de cada grupo foram selecionadas aleatoriamente para controle da massa corpórea. Os animais foram pesados em balança digital (Micronal B600-São Paulo, SP, Brasil) em três momentos: no dia da OVX ou da cirurgia *sham*, no dia da inserção da ligadura para indução da periodontite (trigésimo dia após a OVX ou cirurgia *sham*) e no dia do sacrifício (sexagésimo quinto dia). O percentual do ganho de massa corpórea, no trigésimo e sexagésimo quinto dia, foi calculado conforme Figura 4.

$$\text{Aumento de massa corporal (\%)} = \frac{[\text{Peso final (no 30}^{\text{o}} \text{ ou 65}^{\text{o}} \text{ dia)} - \text{Peso inicial}] \times 100}{\text{Peso inicial}}$$

FIGURA 4 – Fórmula utilizada para calcular o percentual de ganho de peso das ratas, após trinta ou 65 dias das cirurgias OVX ou *Sham*.

4.6 Sacrifício dos animais

Imediatamente antes do sacrifício as ratas foram anestesiadas para verificação da mobilidade dentária, que foi realizada por dois examinadores previamente calibrados. Posteriormente foram retirados aproximadamente 3ml de sangue da artéria aorta abdominal para dosagem dos níveis de estradiol, mensurados por meio de radioimunoensaio com ¹²⁵I (Diagnostic Product Corporation, Estradiol TKE 21). A seguir os animais foram decapitados em guilhotina, para remoção

das maxilas, mandíbulas e tíbias, que foram acondicionadas em solução de formol a 10% para fixação. As maxilas foram divididas na porção mediana do palato, e o lado direito seguiu para descalcificação e posterior análise microscópica. A hemimaxila esquerda foi utilizada para avaliação macroscópica da perda óssea alveolar, do envolvimento de furca e para análise radiográfica do suporte alveolar. As tíbias e as mandíbulas não foram processadas, sendo armazenadas em formol para futuros trabalhos. O esquema dos procedimentos experimentais realizados em cada grupo, em função do tempo está ilustrado na Figura 5.

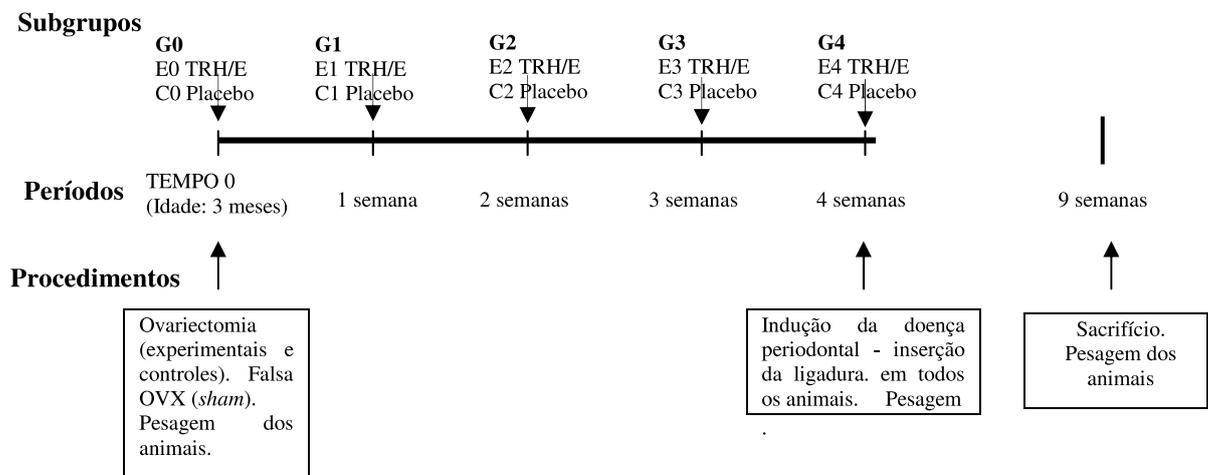


FIGURA 5 – Esquema representativo dos grupos em função do tempo e dos procedimentos experimentais.

4.7 Avaliação macroscópica:

4.7.1 Grau de mobilidade dentária.

Esta avaliação foi realizada nos segundos molares maxilares de ambos os lados. Foi avaliado por dois examinadores previamente calibrados, imediatamente antes do sacrifício:

Os escores utilizados foram:

- 0- Mobilidade ausente
- 1- Mobilidade discreta
- 2- Mobilidade moderada
- 3- Mobilidade intensa

4.7.2 Grau de envolvimento de furca.

Para visualização e estabelecimento de escores para o grau de envolvimento de furca foi realizada maceração das hemimaxilas esquerdas. O tecido mole foi separado do tecido ósseo por meio da imersão em água fervente e posterior acondicionamento das hemimaxilas em solução de papaína 1% (Sigma-Saint Louis, Missouri, EUA) por três dias. O remanescente de tecido mole foi removido mecanicamente. O grau de envolvimento de furca foi analisado nos segundos molares maxilares do lado esquerdo.

Os escores considerados foram os seguintes:

- 0- Envolvimento de furca ausente
- 1- Perda óssea horizontal não envolvendo toda a extensão da área da furca.
- 2- Perda óssea horizontal de lado a lado na área de furca.

Essa avaliação foi realizada em estereomicroscópio, com o auxílio de uma lima kerr nº 8, previamente curvada.

4.7.3 Perda óssea alveolar

Para análise da perda óssea alveolar, foi determinada a área (em mm²) entre a junção cimento-esmalte e o topo da crista óssea alveolar do segundo molar superior esquerdo. A demarcação da junção cimento-esmalte, fez-se através da imersão das hemimaxilas em solução de azul de metileno 1% (Labsynth-Diadema, SP, Brasil), de acordo com Klausen et al.⁷⁵ (1989). Posteriormente, as peças foram posicionadas com cera utilidade (Epoxiglass-Diadema, SP, Brasil) com a face vestibular voltada para cima, de modo a obter o paralelismo entre as cúspides bem como entre as raízes vestibulares e palatinas. As imagens foram obtidas em estereomicroscópio com aumento de 25x, com câmera digital, conforme Figura 6. A área (em mm²) entre a junção cimento-esmalte e o topo da crista óssea alveolar (Figura 6) foi determinada utilizando-se o programa Image J 1.31p. Todas as medidas foram tomadas por dois examinadores previamente calibrados. Para a análise estatística foi utilizada a média dos valores obtidos pelos dois examinadores para cada amostra.

4.8 Avaliação radiográfica

4.8.1 Suporte alveolar

Para avaliação do suporte ósseo alveolar foram realizadas radiografias das hemimaxilas esquerdas utilizando-se o

sistema de radiografia digital direta intrabucaI RVGui (*Trex-Trophy Radiology Inc, Marne-la-Vallée, France*), trabalhando em regime de 65KVp e 7mA, com distância foco-objeto de 30cm, tempo de exposição de 0,063s e incidência do feixe de raios X por lingual (Figura 7). As peças foram posicionadas sobre o sensor com cera utilidade (Epoxyglass-Diadema, SP, Brasil) de modo que pudesse ser obtido o paralelismo entre as cúspides linguais e vestibulares, que deveriam estar sobrepostas na imagem radiográfica, assim como as raízes. As imagens foram obtidas utilizando-se o programa de computador Trophy 2000 (*Optiview; Trex-Trophy*) que acompanha o sistema RVGui.

Foram determinadas as medidas das distâncias lineares entre o ápice radicular e o fundo do defeito ósseo (segmento AC, Figura 7), entre o ápice radicular e a ponta da cúspide (segmento AB, Figura 7) e o ângulo entre estes dois segmentos (ângulo CÂB, Figura 7), obtidas com o auxílio do programa ImageJ 1.31p (National Institute of Health – USA – http://rsb.inf.nih.gov/ij/Java1.31_03). Todas as medidas foram tomadas duas vezes, pelo mesmo examinador, em momentos distintos.

A porcentagem de suporte ósseo foi determinada conforme a fórmula ilustrada na Figura 8 (ANBINDER², 2004).

$$\text{Suporte ósseo(\%)} = \frac{AC \cos(C\hat{A}B) \times 100}{AB}$$

FIGURA 8 - Fórmula utilizada para cálculo do percentual de suporte ósseo distal.

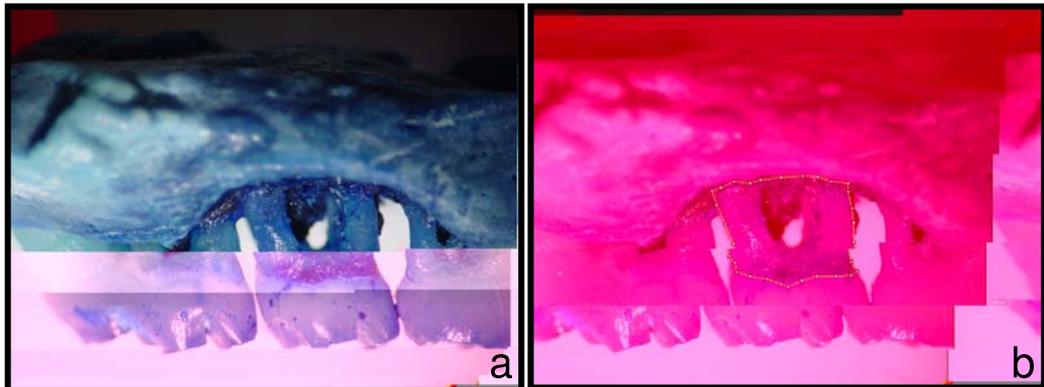


FIGURA 6 – Avaliação macroscópica da perda óssea alveolar: a) imagem obtida com câmera digital em estereomicroscópio, evidenciando o aspecto macroscópico da perda óssea alveolar; b) mesma imagem anterior com marcação da área entre a junção cimento-esmalte e o topo da crista óssea alveolar.

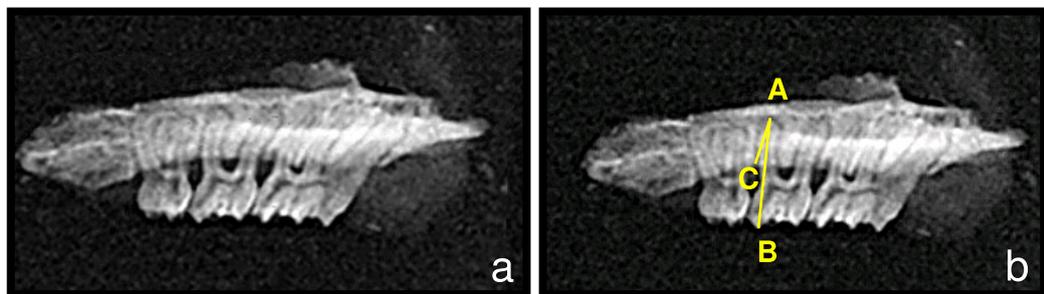


FIGURA 7 – Avaliação radiográfica do suporte ósseo alveolar: a) radiografia da hemimaxila esquerda; b) mesma imagem anterior com marcação das medidas lineares realizadas.

4.9 Avaliação microscópica descritiva e histomorfométrica

As hemimaxilas direitas, após a fixação, foram desmineralizadas em EDTA (ácido etilendinetriilo tetracético sal dissódico dihidratado - Titriplex III[®] p.a - Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) e hidróxido de sódio P.A. (Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha). As peças foram preparadas para inclusão em parafina, com a face palatina paralela ao plano de corte. Realizaram-se cortes seriados com 5 μ m de espessura, abrangendo as raízes mesiais e distais do segundo molar superior, evidenciando a região de furca. Foram obtidos aproximadamente quarenta cortes, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE), conforme Figura 9.

A análise descritiva foi realizada em microscopia óptica, com ênfase na região dos segundos molares, levando-se em consideração vários aspectos do tecido ósseo, do ligamento periodontal, presença de migração epitelial, reação inflamatória, estabelecidos conforme Quadro 1 (apêndice).

Para a análise histomorfométrica foi utilizado o software Leica Qwin (*Quantitative Imaging Solution*, Leica Microsystems). Primeiramente foram obtidas imagens digitalizadas de dez cortes separados por cerca de 20 μ m entre si, de cada hemimaxila. Com o auxílio do software Leica Qwin foi estabelecido um retângulo com uma área de 0,37mm², a partir da região mais periférica do cemento na bifurcação das raízes (Figura 10). O tecido ósseo contido nesse retângulo foi isolado com o auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0 (Figura 11) e a porcentagem de osso foi mensurada utilizando-se o software Leica Qwin (Figura 11). As medidas foram realizadas em dois momentos distintos. Para a análise

estatística considerou-se a média dos valores da percentagem da área dos dez cortes avaliados durante as duas leituras.

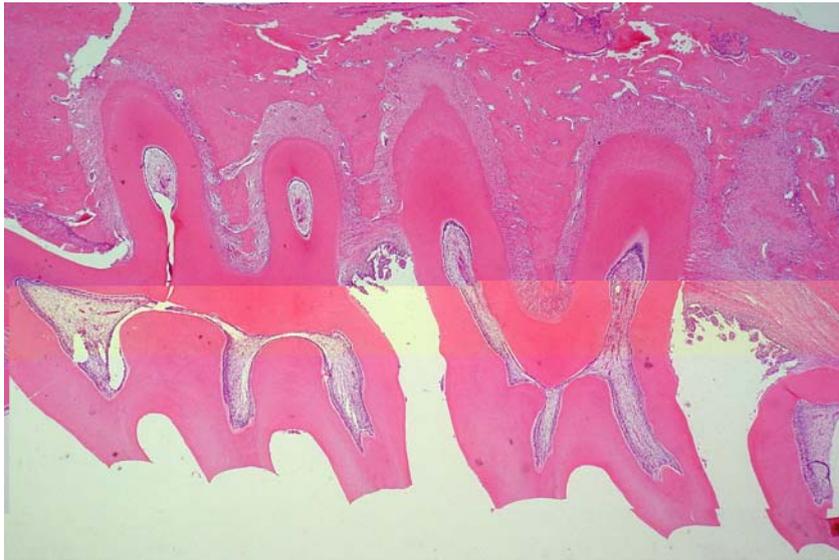


FIGURA 9 – Fotomicrografia de fragmento da hemimaxila direita; vista panorâmica dos molares. Aumento original 25x.H.E.

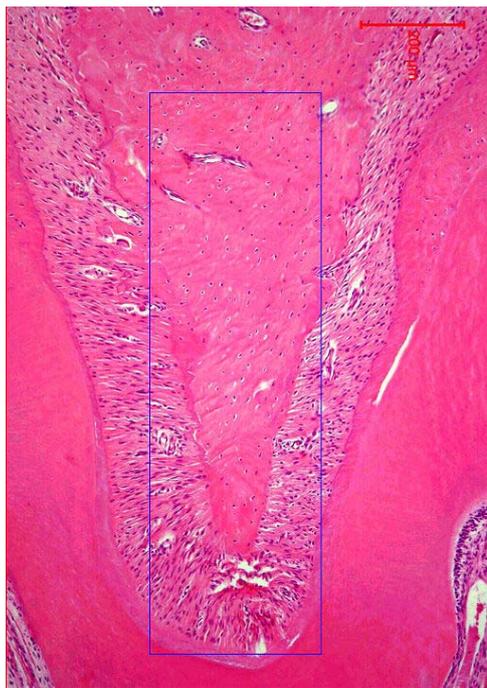


FIGURA 10 – Região de furca do segundo molar; padronização da área a partir do cimento. Aumento original 100x.H.E.

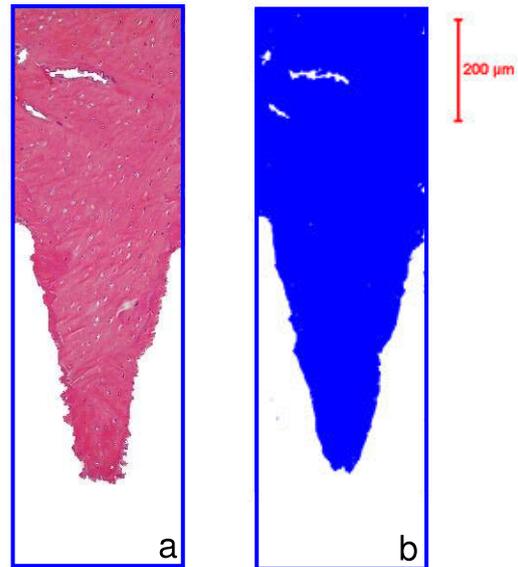


FIGURA 11 – a) tecido ósseo recortado com auxílio do programa Adobe Photoshop 7.0; b) quantificação da porcentagem de tecido ósseo com auxílio do programa Leica Qwin.

4.10 Análise estatística

Em atenção às proposições estabelecidas, a análise estatística dos dados obtidos das avaliações radiográficas, macroscópicas e histomorfométrica, foram realizadas em três partes.

Na primeira, foram considerados os efeitos dos diferentes períodos de início do tratamento/placebo. Para tal abordagem, realizou-se um experimento fatorial do tipo 2x5, cujos fatores (variáveis independentes) foram: condição experimental e períodos de início do tratamento/placebo. O primeiro fator, condição experimental, apresenta dois níveis: subgrupos experimentais (TRH/E) e subgrupos controles (placebo). O segundo fator, períodos de início do tratamento, apresenta cinco categorias: imediato, uma, duas, três, quatro semanas após a OVX ou G0, G1, G2, G3 e G4, respectivamente. Os dados foram submetidos à estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão) e inferencial: teste de análise de variância (ANOVA), teste *t*-Student, teste de Mann-Whitney e teste de comparação múltipla de Tukey.

Na segunda parte, foram considerados os efeitos da ovariectomia: presença dos ovários (*sham*) ou ausência (subgrupos experimentais) nos diferentes períodos de início da TRH/E: imediato, uma, duas, três e quatro semanas após a OVX, ou E0, E1, E2, E3, E4, respectivamente. Os dados foram submetidos à estatística descritiva (média, mediana e desvio padrão) e inferencial: teste de Dunnett, testes de Kruskal Wallis e teste de comparações Múltiplas de Dunn.

Na terceira parte, foram considerados os efeitos da ovariectomia, presença do ovário (grupo *sham*) ou ausência (subgrupos controles). Previamente foram efetuados nos subgrupos controles, os testes de análise de variância ANOVA, comparação múltipla de Tukey e Sinais de Postos de Wilcoxon. Quando não se constatava diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos controles, estes eram

agrupados em um único grupo controle, de forma que pudesse, por meio do teste *t-Student*, ser comparado com o grupo *sham*. Havendo diferença estatisticamente significativa entre os dados dos subgrupos controles, estes eram comparados separadamente com o grupo *sham* de acordo com o período de início da aplicação do placebo, através do teste de Dunnett, para valores paramétricos, ou dos testes de Kruskal Wallis e teste de Comparações Múltiplas de Dunn, para os valores não paramétricos.

Para a análise comparativa da porcentagem de ganho de massa corpórea das ratas, foi estudado também o fator tempo, com dois níveis (dia trinta e dia 65). Os dados obtidos na análise de massa corpórea foram submetidos à análise estatística descritiva e a inferencial: análise de variância, ANOVA. Após o teste ANOVA, quando necessário, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey para os efeitos que resultaram significativos.

O nível de significância (p) adotado foi o valor de 5% para todos os testes. Para a realização das análises, foram utilizados os programas computacionais MINITAB for *Windows*, versão 13.1 (2000, *Minitab Inc., State College, PA, EUA*), STATISTICA for *Windows* 5.5 (2000, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e STATISTIX for *Windows* versão 8.0 (2003- *Analytical Software-Tallahassee, FL, EUA*).

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados conforme descritos em Material e Métodos. Na primeira abordagem serão considerados os efeitos dos diferentes períodos de início do tratamento. Serão comparados os valores obtidos dos subgrupos experimentais com os subgrupos controles, nos respectivos períodos de início da TRH/E ou placebo, respectivamente. Na segunda, serão considerados os efeitos da presença dos ovários (grupo *sham*) ou ausência (subgrupos experimentais) em cada período de início da TRH/E, e numa terceira abordagem serão considerados os efeitos da presença do ovário (grupo *sham*) ou ausência (subgrupos controles).

5.1 Massa corpórea

Os valores referentes à porcentagem de ganho de massa corpórea dos animais, no trigésimo e sexagésimo quinto dia após a OVX, foram submetidos à análise estatística descritiva, e os resultados podem ser observados nas Tabelas 1 e 2.

Para o teste ANOVA, levaram-se em consideração os fatores de estudo condição experimental (subgrupos experimentais e controles), e os períodos de início do tratamento (G0, G1, G2, G3, G4). Os resultados dos dados referentes à porcentagem de ganho de peso

submetidos à ANOVA, no trigésimo e sexagésimo quinto dia, estão apresentados nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 1 – Estatística descritiva referente aos valores de porcentagem de ganho de massa corpórea no trigésimo dia

Grupos	n	Média	Desvio padrão
C0	5	15,87	0,03
C1	5	15,96	0,04
C2	5	12,60	0,04
C3	5	18,10	0,07
C4	5	13,75	0,04
E0	5	05,74	0,017
E1	5	10,02	0,19
E2	5	08,26	0,033
E3	5	06,93	0,030
E4	5	14,90	0,05
<i>Sham</i>	5	10,49	0,04

n: número da amostra

Tabela 2 – Estatística descritiva referente aos valores de porcentagem de ganho de massa corpórea no sexagésimo quinto dia

Grupos	n	Média	Desvio Padrão
C0	5	21,95	0,039
C1	5	19,03	0,063
C2	5	21,05	0,075
C3	5	19,19	0,067
C4	5	21,34	0,076
E0	5	08,22	0,048
E1	5	12,92	0,028
E2	5	14,48	0,062
E3	5	11,10	0,025
E4	5	13,58	0,037
<i>Sham</i>	5	13,57	0,028

*p,0,05

Tabela 3 – Resultado da ANOVA para os dados de porcentagem de ganho de peso no trigésimo dia

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Condição experimental	1	0.04627	0.04627	28.87	0.0001
Período	4	0.01031	0.00258	1.61	0.1912
Condição experimental/ Período*	4	0.02441	0.00610	3.81	0.0103
Resíduo	40	0.06412	0.00160		
Total	49	0.14511			

p<0,05

Tabela 4 – Resultado da ANOVA para os dados de porcentagem de ganho de peso no sexagésimo quinto dia

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	p
Condição experimental	1	0.08930	0.08930	28.95	0.0001
Período	4	0.00640	0.00160	0.52	0.7227
Condição experimental/ Período	4	0.00939	0.00235	0.76	0.5567
Resíduo	40	0.12340	0.00308		
Total	49	0.22849			

p<0,05

Os resultados para medidas de ganho de massa corpórea no trigésimo dia revelaram que os subgrupos que iniciaram a TRH/E até a terceira semana pós OVX (E0, E1, E3 e E2), tiveram menos ganho de peso que todos os subgrupos controles e o subgrupo experimental que iniciou a TRH/E na quarta semana após a OVX (Figura 12). Foi observada diferença estatisticamente significativa com relação à condição experimental, ou seja, subgrupos que realizaram a TRH/E (experimentais) ou subgrupos que receberam o placebo (controles) ($p=0,0130$). O teste de

comparação múltipla de Tukey revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos E0 com C0, C1, C3 e E4 no trigésimo dia (Tabela 5)

Com relação ao fator período de início da TRH/E não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p=0,1912$).

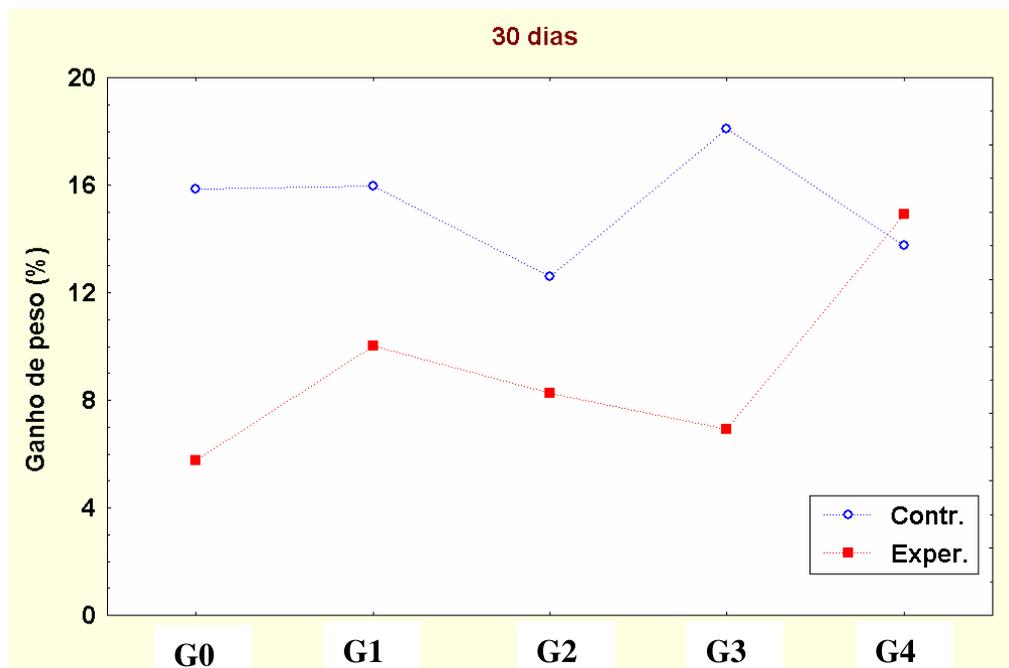


FIGURA 12 – Médias referentes à porcentagem de ganho de peso após 30 dias da OVX.

Tabela 5 - Teste de Tukey para os dados de ganho de massa corpórea no trigéssimo dia após a OVX

Subgrupos	Período de início	Média	Grupos homogêneos*			
Controle	C3	0.1811	A			
Controle	C1	0.1596	A	B		
Controle	C0	0.1587	A	B		
Experimental	E4	0.1490	A	B	C	
Controle	C4	0.1375	A	B	C	D
Controle	C2	0.1261	A	B	C	D
Experimental	E1	0.1003	A	B	C	D
Experimental	E2	0.0826		B	C	D
Experimental	E3	0.0693			C	D
Experimental	E0	0.0575				D

*médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente

No período de 65 dias após a OVX, todos os grupos que fizeram TRH/E, independente do período de início, tiveram uma porcentagem de ganho de peso menor que os grupos controle (Figura 13). Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos experimentais e controles.

O teste de Tukey revelou que a média da massa corpórea do subgrupo E0 foi estatisticamente menor que a média dos subgrupos C0, C2 e C4, no sexagésimo quinto dia pós OVX (Tabela 6).

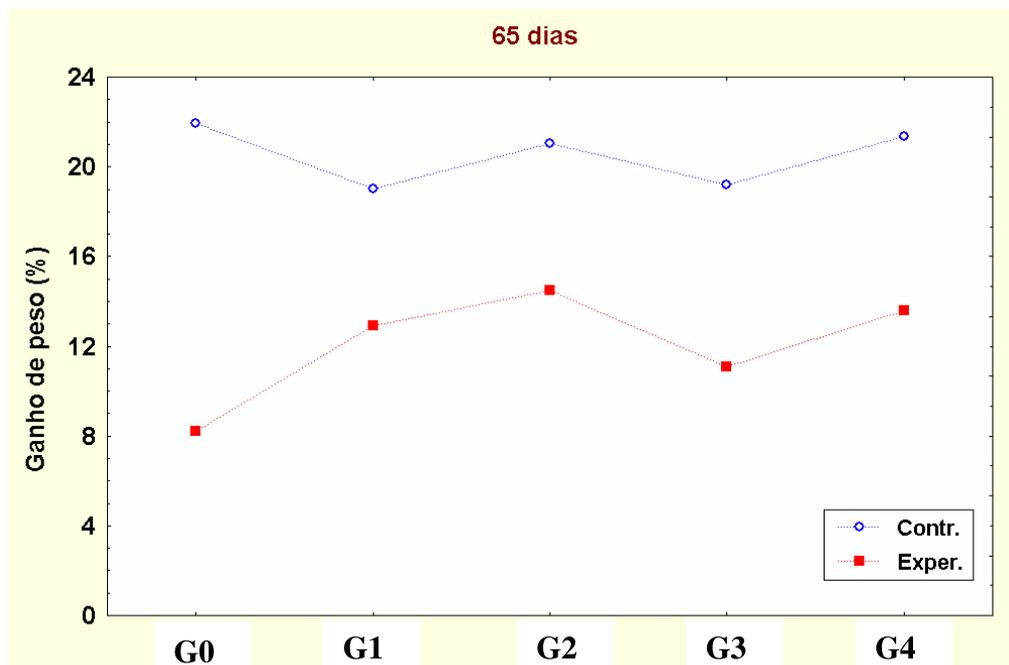


FIGURA 13 – Médias referentes à porcentagem de ganho de peso após 65 dias da OVX.

Tabela 6 - Teste de Tukey para os dados de ganho de massa corpórea no sexagésimo quinto dia

Subgrupos	Período de início	Média	Grupos homogêneos*
Controles	C0	0.2196	A
	C4	0.2134	A
	C2	0.2105	A
	C3	0.1919	A B
	C1	0.1903	A B
Experimentais	E2	0.1448	A B
	E4	0.1358	A B
	E1	0.1293	A B
	E3	0.1110	A B
	E0	0.0822	B

*médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente

Considerando-se os efeitos da ovariectomia, presença dos ovários (grupo *sham*) ou ausência (subgrupos experimentais em

diferentes períodos de início da TRH/E), foi aplicado o teste de Dunnett não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos nem no trigésimo, nem no sexagésimo quinto dia após a OVX, demonstrando que a aplicação do estrógeno, independente do período proporcionou um ganho de massa corpórea equivalente à do grupo *sham*.

De acordo com a terceira abordagem, foi previamente aplicado a análise de variância ANOVA nos subgrupos controles, e uma vez não tendo sido observada diferença estatística entre os valores, efetuou-se o teste *t*-Student, para comparar os valores do grupo *sham* com os dos subgrupos controles, que formaram um único grupo controle. Aos trinta dias após a OVX não foi observada diferença estatisticamente significativa com relação ao ganho de massa corpórea entre os grupos *sham* e controle ($p=0.095$). No entanto no sexagésimo quinto dia após a OVX os animais do grupo controle exibiram um significativo ganho de massa corpórea comparados aos do grupo *sham* ($p=0.017$)

5.2 Dosagem hormonal

Os resultados da ovariectomia foram confirmados por dois procedimentos. Primeiramente, foi realizada autópsia de alguns animais selecionados aleatoriamente de cada grupo no momento do sacrifício. O sucesso da OVX foi comprovado pela atrofia uterina e ausência dos ovários. O segundo procedimento foi a análise da concentração sérica do estradiol, realizada por radioimunoensaio.

Primeiramente, serão realizados breves comentários a respeito do aspecto uterino de algumas ratas, selecionadas aleatoriamente, no momento do sacrifício. Observou-se no grupo *sham* a presença dos dois ovários devidamente posicionados no abdômen, e o útero em forma de “V”, com aspecto bastante semelhante entre as ratas

(Figura 14), embora tenham sido notadas discretas alterações no diâmetro, entre elas. Nos subgrupos experimentais, independente do período de início da TRH/E, observaram-se as ligaduras com o fio de seda, próximas ao local em que foram excisionados os ovários; o útero apresentava-se hiperplásico em todos os animais analisados, com coloração mais avermelhada, comparado aos outros grupos (Figura 15). As ratas dos subgrupos controle também exibiram a presença da ligadura e ausência dos ovários. Atrofia uterina e uma coloração mais pálida do útero, foram características comuns observadas em todas as ratas avaliadas neste grupo (Figura 16).

A mensuração dos níveis de estradiol possibilitou uma análise comparativa entre os grupos, realizada de acordo com as três abordagens previamente citadas.

Efetuada o teste *t-Student*, foi possível identificar diferença significativa apenas entre os subgrupos experimentais e controles nos períodos G0, G1 e G2 (Tabela 7). Estes dados demonstram que os níveis séricos de estradiol nos animais que começaram a TRH/E na terceira e quarta semanas não diferiram estatisticamente dos animais que receberam apenas placebo.

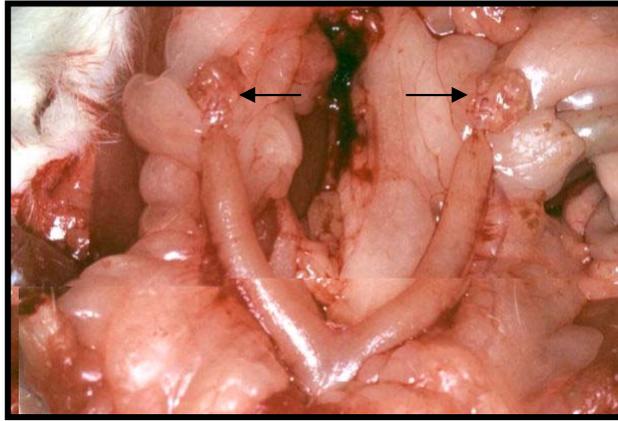


FIGURA 14 – Aspecto do útero de uma das ratas *sham* operadas; notar a presença dos ovários (→) e o aspecto do útero em forma de “V”.

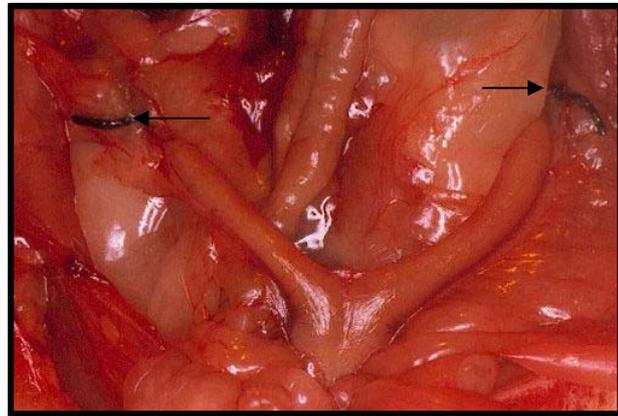


FIGURA 15 – Aspecto do útero de uma rata do subgrupo experimental; observar as ligaduras com fio de seda no local em que foram excisionados os ovários (→) .

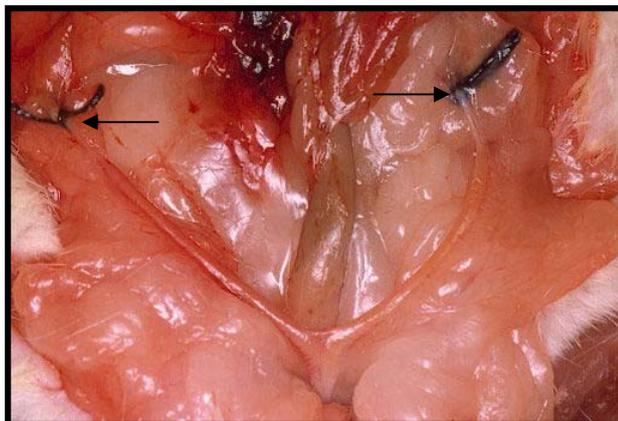


FIGURA 16 – Atrofia do útero de uma rata incluída no subgrupo controle; notar também a ausência dos ovários (→) .

Tabela 7 -Teste *t- Student* comparando o nível sérico de estradiol entre subgrupos experimentais com controle

Período	Controle (GC)	n	<i>Experimental</i> (GE)	n	<i>t(Student);</i> (gl =11) <i>T</i>	<i>p</i>
G0 - Imediato	15.06	5	31.6	8	2.65	0.022*
G1 – 1 Semana	6.68	5	38.5	8	2.49	0.030*
G2 – 2 Semana	0.45	5	12.49	8	3.63	0.004*
G3 – 3 Semana	1.41	5	8.97	8	1.72	0.114
G4 - 4 Semana	1.38	5	9.37	7	1.94	0.081

* $p < 0.05$

Os valores do grupo *sham* foram comparados com os dos subgrupos experimentais com o teste de Dunnett. (Tabela 8), não tendo sido observada diferença estatisticamente significativa entre eles.

Tabela 8 – Teste de Dunnett comparando o nível sérico de estradiol entre grupo *sham* com subgrupos experimentais

Grupos	Média	Limite inferior	Diferença	Limite superior
<i>Sham</i>	24.916			
E0	31.595	-12.276	6.679	25.633
E1	38.536	-5.334	13.620	32.574
E2	12.489	-31.382	-12.427	6.527
E3	8.968	-34.903	-15.949	3.006
E4	9.367	-35.169	-15.549	4.071

Alpha 0.05
Critical D Value 2.619

Para a terceira abordagem, como foi identificada uma diferença estatística intra subgrupos controles, estes não foram

agrupados, e por isso foi realizado o teste de Dunnett para comparar os valores do grupo *sham* com os subgrupos controles nos diferentes períodos (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de Dunnett comparando o nível sérico do estradiol do grupo *sham* com os subgrupos controles

Grupos	Média	Limite inferior	Diferença	Limite superior
<i>Sham</i>	24.916			
C0	15.062	-18.656	-9.854*	-1.053
C1	6.878	-26.840	-18.038*	-9.237
C2	0.452	-33.266	-24.464*	-15.663
C3	1.414	-32.304	-23.502*	-14.701
C4	1.380	-32.338	-23.536*	-14.735

Alpha 0.05
Critical D Value 2.707

Os dados revelaram que o nível de estradiol das ratas incluídas no grupo *sham* diferiu estatisticamente do nível dos subgrupos controles em todos os períodos.

Para analisar a possível diferença entre o nível de estradiol das ratas incluídas nos subgrupos experimentais de acordo com os diferentes períodos de início da TRH/E, foi proposta ainda, neste caso, uma quarta abordagem, comparando os valores dos subgrupos experimentais entre si. Para isto foi realizada a análise de variância – ANOVA e uma vez tendo sido os resultados significativos, aplicou-se o teste de comparação múltipla de Tukey (Tabela 10).

Tabela 10 – Teste de Tukey para os valores médios dos diferentes

Período	Média	Grupos homogêneos*	
E1	38.536	A	
E0	31.595	A	
E2	12.489	B	C
E4	9.3671	B	C
E3	8.9675		C

*médias seguidas das mesmas letras não diferem estatisticamente

Como pode ser observado, os animais que iniciaram a TRH/E imediatamente (E0) ou uma semana após a OVX (E1) exibiram nível de estradiol significativamente mais elevado que os demais subgrupos.

5.3 Avaliação macroscópica

5.3.1 Grau de mobilidade dentária

Os escores de mobilidade dentária dos segundo molares maxilares do lado direito e esquerdo de todos os grupos foram submetidos à análise estatística. A comparação entre os valores do lado direito e esquerdo, em cada grupo foi realizada utilizando-se o teste de sinais de postos de Wilcoxon. Não foi verificada diferença significativa entre os valores medianos.

Para a comparação entre os escores referentes à mobilidade dentária dos subgrupos experimentais com os respectivos controles nos diferentes períodos de início do tratamento/placebo, foram

analisados os segundo molares da maxila esquerda, sendo proposto o teste estatístico de Mann-Whitney, não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos (Tabela 11)

Tabela 11 - Teste de Mann-Whitney comparando os escores de mobilidade dentária dos subgrupos experimentais com os controles

Subgrupos	E0 x C0	E1 x C1	E2 x C2	E3 x C3	E4 x C4
P	0.71	0.62	0.94	0.72	1.00

p<0.05

Os escores referentes à mobilidade do grupo *sham* foram comparados com os dos grupos experimentais de cada período. Após o teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que os valores medianos das cinco condições não diferem (kw=4.75; gl=5; p=0.4).

Mediante o teste de comparação múltipla de Dunn (5%) não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação múltipla de Dunn analisando os valores de mobilidade dentária entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais

Grupos	Valores z	Valores críticos	p
E0	0.00000	<2.57583	1.00
E1	1.40184	< 2.57583	0.16
E2	0.00000	< 2.57583	1.00
E3	0.70092	< 2.57583	0.48
E4	1.40184	< 2.57583	0.1610

Aplicando-se o teste de Mann-Whitney verificou-se que o grupo *sham* também não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle (Tabela 13).

Tabela13 – Resultado Mann-Whitney, comparando mobilidade dentário do grupo sham com o controle

Grupos	N	Mediana
<i>Sham</i>	8	1.0000
Controle	25	1.0000

$p = 0.5932 > 0.05$

5.3.2 Grau de envolvimento de furca

Na avaliação do grau de envolvimento de furca as peças foram classificadas com scores variando apenas entre 1 e 2. Com o teste estatístico de Mann Whitney não foi estabelecida nenhuma diferença significativa entre as condições experimentais e controles nos respectivos períodos (Tabela 14).

Tabela 14- Teste de Mann Whitney, comparando os scores de envolvimento de furca entre subgrupos experimentais e controles

Subgrupos	<i>E0 x C0</i>	<i>E1 x C1</i>	E2 x C2	E3 x C3	<i>E4 x C4</i>
p	0.72	1.00	0.88	0.43	0.52

Os valores medianos do grupo *sham* foram comparados com os dos subgrupos experimentais em cada período do teste estatístico

de Kruskal-Wallis. Verificou-se que os valores medianos das cinco condições comparadas não diferem estatisticamente ($Kw=4.70$; $gl=5$; $p=0.454$).

Da mesma forma, mediante o teste de comparação múltipla de Dunn (5%) não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais, com exceção do E1, em que foi observada diferença significante quanto ao grau de envolvimento de furca (Tabela 15).

Tabela 15 – Comparação múltipla de Dunn analisando os scores de envolvimento furca entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais

Grupos	Valores z	Valores críticos	p
E0	1.32759	<2.57583	0.1843
E1	1.99139	< 2.57583	0.0464
E2	1.32759	< 2.57583	0.1843
E3	1.32759	< 2.57583	0.1843
E4	0.66380	< 2.57583	0.5068

$p<0.05$

Os scores referentes ao grau de envolvimento de furca do grupo *sham* foram também comparados com os do grupo controle, não tendo sido observada diferença significativa (Tabela 16).

Tabela 16 – Resultado Mann-Whitney comparando os scores de envolvimento furca entre o grupo *sham* e o controle

Grupos	N	Mediana
<i>Sham</i>	8	2.0000
Controle	25	2.0000

$p = 0.1161 > 0.05$

5.3.3 Perda óssea alveolar

A avaliação macroscópica dos espécimes revelou reabsorção óssea predominantemente vertical ao redor de todas as raízes do segundo molar, envolvendo também as raízes distais do primeiro e mesiais do terceiro molar. Em alguns espécimes a reabsorção óssea estendeu-se para a região de furca do primeiro e terceiro molares. Observou-se perda óssea mais acentuada na região vestibular, comparada à lingual, exibindo aspecto de uma grande concavidade, estendendo-se do primeiro ao terceiro molares. Em alguns espécimes a reabsorção apresentou-se mais horizontalizada.

Previamente à análise estatística da perda óssea alveolar, foi realizado o Teste *t* pareado para avaliar a calibração entre os dois examinadores, não tendo sido constatada diferença estatisticamente significativa entre eles. Para a análise estatística da perda óssea alveolar foi utilizada a média dos valores obtidos pelos dois calibradores para cada amostra.

A comparação entre os valores obtidos dos subgrupos experimentais e controles nos respectivos períodos foi submetida ao Teste *t* pareado (Tabela 17).

Tabela 17 - Comparação entre os subgrupos experimentais e controles, quanto a perda óssea alveolar, com o teste *t* Student

Período	Controle Média	n	Experimental Média	n	<i>t</i> (Student) p
G0 – Imediato	2.027	5	1.834	8	0.348
G1 – 1 Semana	1.609	5	1.808	8	0.291
G2 – 2 Semana	1.521	5	1.849	8	0.047
G3 – 3 Semana	1.640	5	1.973	8	0.035
G4 - 4 Semana	1.860	5	1.766	8	0.643

O grupo *sham* foi comparado com os subgrupos experimentais por meio da Comparação Múltipla de Dunnett, não tendo sido observada diferença entre os grupos (Tabela 18).

Tabela 18 – Comparação múltipla de Dunnett analisando os scores de perda óssea alveolar entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais

Subgrupos	Média	Limite superior	Diferença	Limite inferior
<i>Sham</i>	1.6741			
E0	1.8339	-0.2601	0.1598	0.5797
E1	1.8079	-0.2861	0.1338	0.5537
E2	1.8489	-0.2451	0.1748	0.5947
E3	1.9728	-0.1213	0.2986	0.7185
E4	1.7655	-0.3285	0.0914	0.5113

Alpha 0.05
Critical D Value 2.614

A comparação do grupo *sham* com os subgrupos controles foi realizada por meio do Teste *t* não pareado, que também não diferiu estatisticamente (Tabela 19).

Tabela 19 – Teste *t* não pareado

Grupos	n	Média	Desvio padrão
Controle	25	1.731	0.339
<i>Sham</i>	8	1.674	0.404

p= 0.694

5.4 Avaliação radiográfica

A avaliação radiográfica permitiu observar um mesmo padrão de reabsorção óssea entre os grupos, predominantemente vertical nas proximais do segundo molar superior, com envolvimento de furca, chegando a atingir as raízes distais do primeiro e mesiais do terceiro molar.

Calculado o suporte ósseo em dois momentos distintos, conforme a fórmula descrita em Material e Método (Figura 10) foram obtidas as médias de cada amostra para a análise estatística. A avaliação da calibração intra-examinador foi realizada utilizando-se o Teste *t* pareado para cada subgrupo. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa intra-examinador.

Considerando-se a primeira abordagem, foram comparados os valores médios de reabsorção óssea alveolar entre os subgrupos experimentais e os subgrupos controles, nos diferentes

períodos de início do tratamento/placebo, aplicando-se o Teste *t* pareado (Tabela 20).

Tabela 20 - Teste *t-Student*, comparando os valores de reabsorção óssea alveolar entre subgrupos controles versus experimentais segundo o período

Período	Controle (GC)	Experimental(GE)	<i>t(Student); (gl =11)</i>	
			<i>T</i>	<i>p</i>
G0 - Imediato	40,204	40,487	0,09	0,93
G1 – 1 Semana	43,565	43,277	0,09	0,93
G2 – 2 Semana	40,624	41,866	0,42	0,68
G3 – 3 Semana	42,157	40,932	0,35	0,73
G4 - 4 Semana	38,384	41,283	1,38	0,20

$p < 0.05$

Os dados revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa na reabsorção óssea alveolar entre os subgrupos experimentais e controles independentemente do período de início do tratamento/placebo.

Da mesma forma, na segunda abordagem, comparando-se os valores do grupo *sham* com os subgrupos experimentais em cada período, não foi constatada diferença significativa. Esta análise foi realizada utilizando-se o Teste de Comparação Múltipla de Dunnett (Tabela 21).

Tabela 21 - Teste Dunnett, comparando os valores de reabsorção óssea alveolar entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais, segundo o período

Grupos	Média	Limite inferior	Diferença	Limite superior
<i>Sham</i>	41.443			
E0	40.487	-7.219	-0.956	5.306
E1	43.277	-4.429	1.834	8.096
E2	41.866	-5.840	0.423	6.686
E3	40.932	-6.774	-0.511	5.752
E4	41.282	-6.423	0.161	6.102

Alpha 0.05
Critical D Value 2.614

Foi realizado o teste ANOVA para avaliar se havia diferença entre os subgrupos controles, e uma vez não tendo sido detectada essa diferença ($p=0.5921$) estes foram agrupados em um único grupo, possibilitando a realização do teste *t* não pareado para comparação com o grupo *sham*.

Tabela 22- Teste *t-Student*, comparando os valores de reabsorção óssea alveolar entre grupos *sham* e controle

Grupos	n	Média	Desvio padrão
Controle	25	40.99	5.09
<i>Sham</i>	8	41.44	1.87

$p = 0.81 > 0.05$
T = -0.25

Os dados revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.5 Avaliação microscópica

Durante o processo de desmineralização e preparação histológica, alguns espécimes foram perdidos, reduzindo o número de amostras. Os aspectos microscópicos da região dos segundos molares superiores, descritos de acordo com Quadro 1, revelaram características bastante semelhantes entre os grupos, e serão descritos a seguir.

Os cortes microscópicos revelaram fragmento de maxila contendo três molares seccionados no sentido mesio-distal (Figura 17). A análise foi realizada com ênfase na região dos segundos molares, que exibiram nas regiões interproximais biofilme microbiano, aderido ao cimento (Figura 18). Foram analisados os tecidos que compõem tanto o periodonto de proteção quanto o de sustentação.

A gengiva na região interproximal apresentava-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, na maioria das vezes, hiperplásico (Figura 19). Os cortes revelaram migração epitelial em direção apical, e presença de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, variando de discreto à intenso, e em localização sub-epitelial. Uma característica bastante comum observada entre os espécimes foi a presença de pêlos na região interproximal, ora incluídos no tecido conjuntivo, desencadeando uma resposta inflamatória com formação de pequenos granulomas tipo corpo estranho, ora na superfície do epitélio, muitas vezes revestidos por biofilme microbiano (Figura 20). A lâmina própria, de tecido conjuntivo fibroso, exibia densos feixes de fibras colágenas, ora dispostos aleatoriamente, ora paralelos entre si, possibilitando a identificação de grupos de fibras do ligamento gengival, como as interdentárias (Figura 21).

As cristas alveolares exibiram reabsorção óssea, apresentando-se quase sempre retificadas ou inclinadas (Figura 22), com presença de osteoclastos em lacunas de reabsorção óssea. Na região de

furca foram observadas discretas diferenças entre os subgrupos experimentais, controles e o grupo *sham*. Assim sendo, será feita uma descrição abordando as características comuns, procurando enfocar os aspectos mais relevantes e característicos de cada um deles.

Presença de epitélio na região de furca (Figura 23) foi observada em aproximadamente 56% dos espécimes dos subgrupos controles, 57% dos experimentais e 77% dos espécimes do grupo *sham*. O epitélio apresentava-se na maioria das vezes hiperplásico, com espongirose e exocitose; não raro, observava-se a presença de pêlos, ora incluídos no epitélio, ora na lâmina própria, permeados por infiltrado inflamatório predominantemente monocuclear (Figura 24). Em alguns espécimes, o epitélio apresentava-se como ilhotas ou pequenos cordões isolados, com aspecto quiescente, interpretado como resto epitelial de Malassez (Figura 25).

O aspecto das fibras do ligamento periodontal na região compreendida entre o topo do septo ósseo inter-radicular e a superfície do cimento mostrou-se bastante variado. Na maior parte dos espécimes as fibras organizavam-se em densos feixes dispostos paralelamente ao topo do septo ósseo (Figura 26). Este aspecto foi observado em aproximadamente 39% dos espécimes dos subgrupos experimentais, em 64% dos subgrupos controles, e em 44% dos espécimes do grupo *sham*. Por vezes foram observadas fibras inter-radulares preservadas, com aspecto de leque a partir do septo ósseo em direção ao cimento (Figura 26). Nos espécimes dos subgrupos experimentais, controles e grupo *sham* este aspecto foi observado em aproximadamente 33%, 17%, e 33%, respectivamente. Uma organização mais irregular, por vezes com feixes de fibras mais frouxas e dispostas de forma aleatória, foi ainda observada em aproximadamente 12%, 8,5% e 11% dos espécimes dos subgrupos experimentais, controles ou grupo *sham*, respectivamente (Figura 26). Os demais espécimes exibiram aspecto morfológico misto, com feixes de fibras colágenas ora dispostos paralelamente ao topo do

septo ósseo, ora em leque. O ligamento periodontal apresentava-se intensamente celularizado, exibindo nas porções laterais feixes de fibras oblíquas bastante espessas, inserindo-se nitidamente no cemento lateral e osso alveolar (Figura 26).

Em alguns espécimes notou-se a presença de pêlos na região de furca, com formação de granuloma tipo corpo estranho, com células gigantes multinucleadas. O septo ósseo também apresentou aspecto variado, ora exibindo contorno regular, ora irregular com áreas de reabsorção (Figura 27). Na maioria dos espécimes, tanto dos subgrupos experimentais, quanto nos controles ou grupo *sham*, foram observados poucos espaços medulares, caracterizando um tecido ósseo mais compacto (Figura 32). Em alguns espécimes, entretanto, foi observada maior presença de espaços medulares, por vezes formando amplos canais medulares de permeio à matriz óssea (Figura 27). O tecido ósseo apresentava-se revestido por osteoblastos volumosos cubóides ou com aspecto plasmocitóide (Figura 28). Maior quantidade de linhas reversas foi observada nos espécimes dos subgrupos experimentais e grupo *sham* quando comparada aos subgrupos controles (Figura 29).

O cemento na região de furca também se apresentou ora com contornos bastante regulares, ora com aspecto mais irregular, exibindo áreas de reabsorção. Presença de osteoclastos na região do septo ósseo inter-radicular foi menos pronunciada que nas regiões interproximais (Figura 28). Em alguns espécimes foi observada exuberante presença de osteoclastos, porém observou-se a formação de abscesso periapical decorrente de necrose pulpar por cárie (Figura 30).

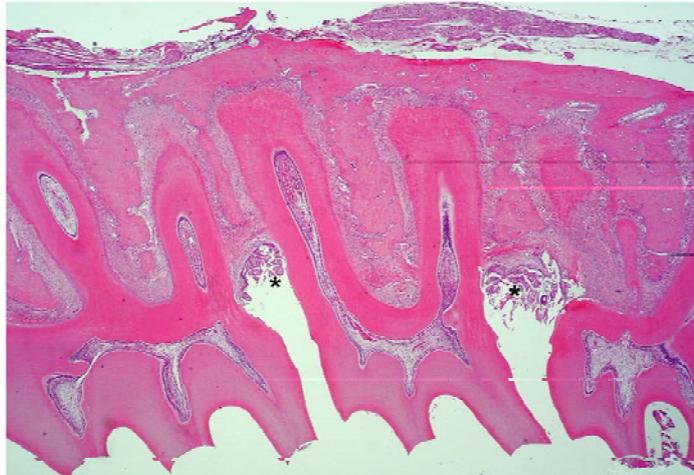


FIGURA 17 - Aspecto panorâmico do corte de maxila no sentido mesio-distal, evidenciando migração epitelial (*). Aumento original 25x. HE.

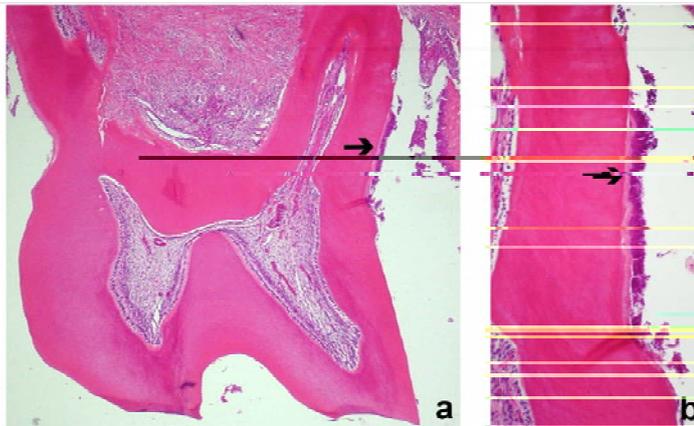


FIGURA 18 - Fotomicrografia abrangendo as regiões interproximais do segundo molar: a) biofilme bacteriano (→); b) detalhe da área evidenciando íntimo contato do biofilme com o cimento (→). Aumento original 100x e 400x, respectivamente. HE.

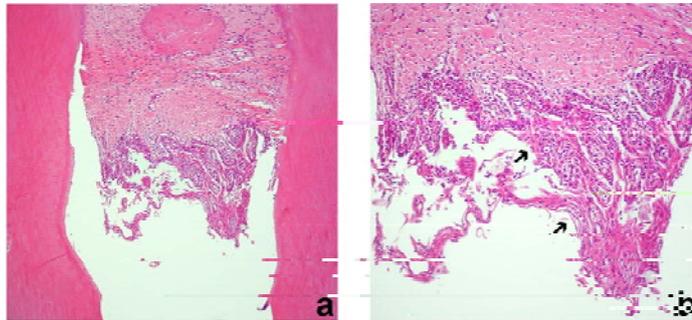


FIGURA 19 - Aspecto do epitélio gengival entre segundo e terceiro molares: a) vista panorâmica; b) detalhe da fotomicrografia anterior evidenciando hiperplasia do epitélio (→). Aumento original 100x e 200x, respectivamente. HE.

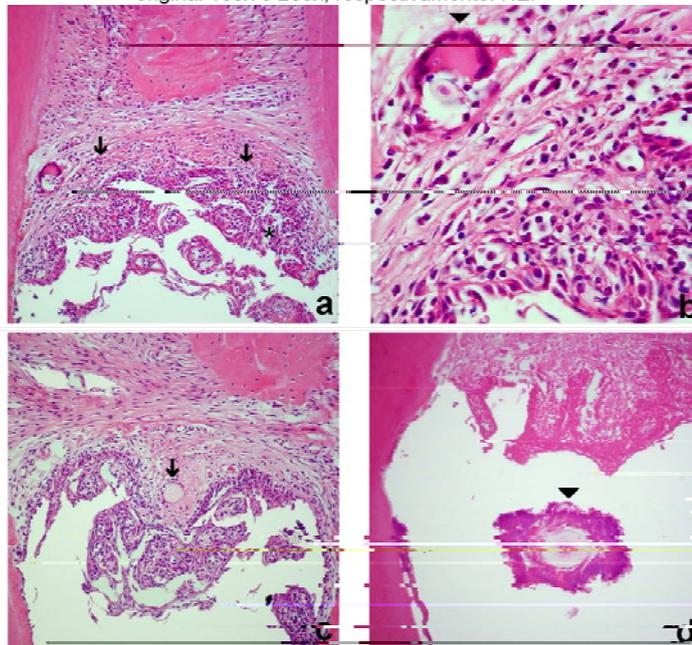


FIGURA 20 - Aspectos das regiões interproximais do segundo molar: a) hiperplasia do epitélio (*) e infiltrado inflamatório subepitelial (→); b) maior aumento da fotomicrografia anterior evidenciando granuloma tipo corpo estranho com célula gigante multinucleada envolvendo pêlo (▼); c) proliferação epitelial e presença de pêlo incluído na lâmina própria (→); d) pêlo envolvido por biofilme bacteriano (▼). Aumento original 200x, 630x, 200x e 400x, respectivamente. HE.

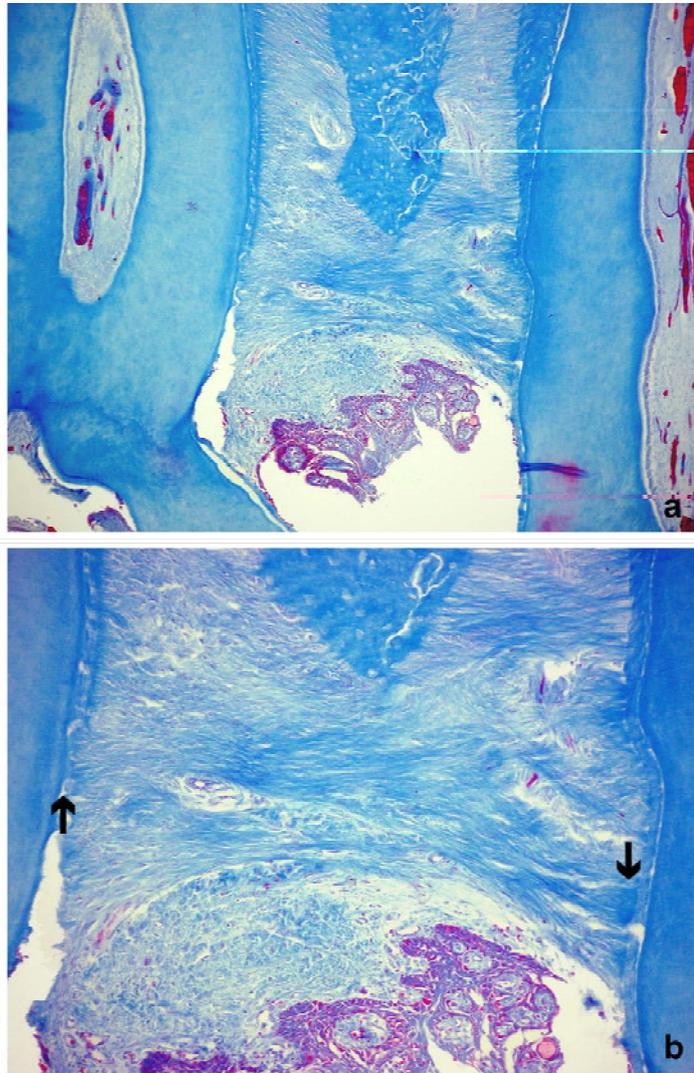


FIGURA 21 - Aspecto das fibras gengivais interdentárias: a) aspecto panorâmico das fibras e hiperplasia epitelial; b) detalhe da fotomicrografia anterior com densos feixes de fibras colágenas, inserindo-se no cimento de um dente ao outro (→). Aumento original 100x e 200x, respectivamente. Masson.

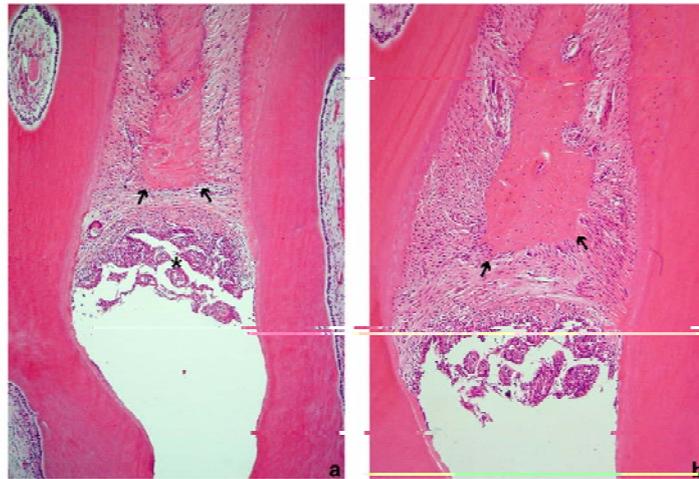


FIGURA 22 - Aspectos da região interproximal: a) reabsorção horizontal da crista óssea alveolar (→) e epitélio gengival migrado e hiperplásico (*); b) reabsorção inclinada da crista óssea alveolar (→). Aumento original 100x. HE.

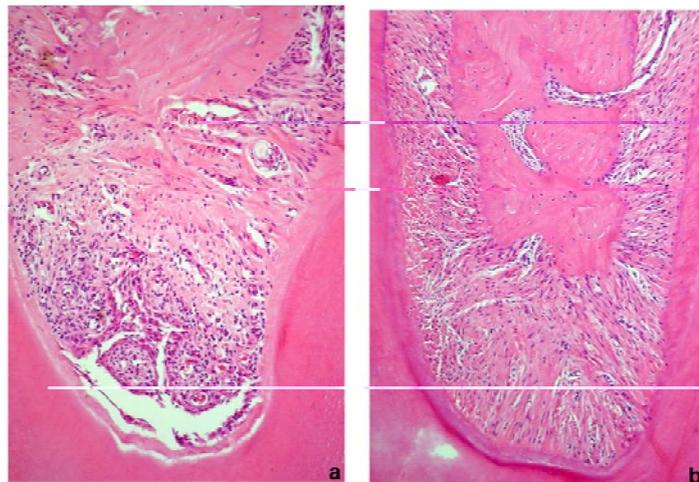


FIGURA 23 - Aspectos da região de furca: a) presença de epitélio exibindo hiperplasia; b) ausência de epitélio e fibras periodontais inserindo-se do topo do septo ósseo ao cimento. Aumento original 200x. HE.

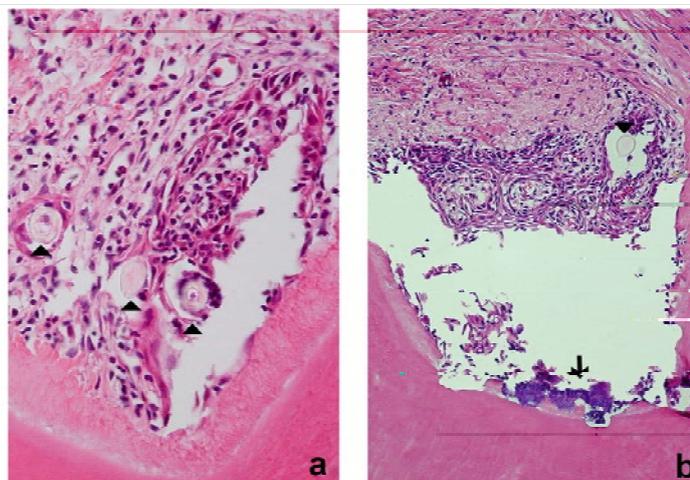


FIGURA 24 - Diferentes aspectos da migração epitelial da região de furca:

a) epitélio com espongiose, exocitose e presença de pêlos (▲) incluídos tanto no epitélio quanto na lâmina própria, que exibe infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear; b) pêlo incluído no epitélio hiperplásico (▼) e biofilme bacteriano aderido ao cimento (→). Aumento original 200x e 100x, respectivamente. HE.

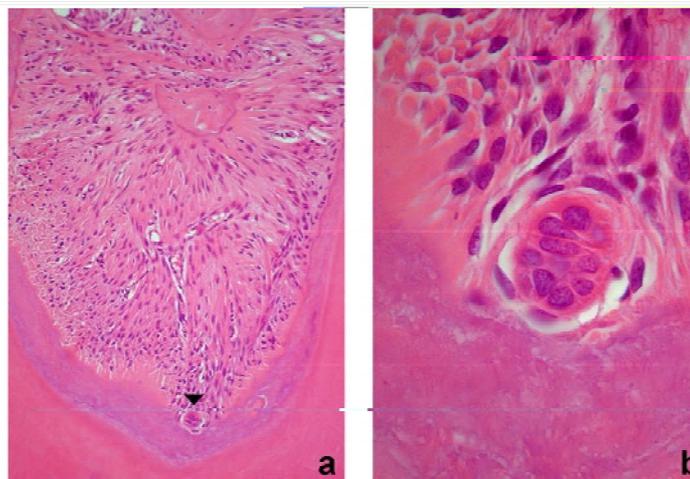


FIGURA 25 - Região de furca : a) vista panorâmica com resto epitelial de Malassez (▼); b) detalhe da fotomicrografia anterior. Aumento original 100x e 630x, respectivamente. HE

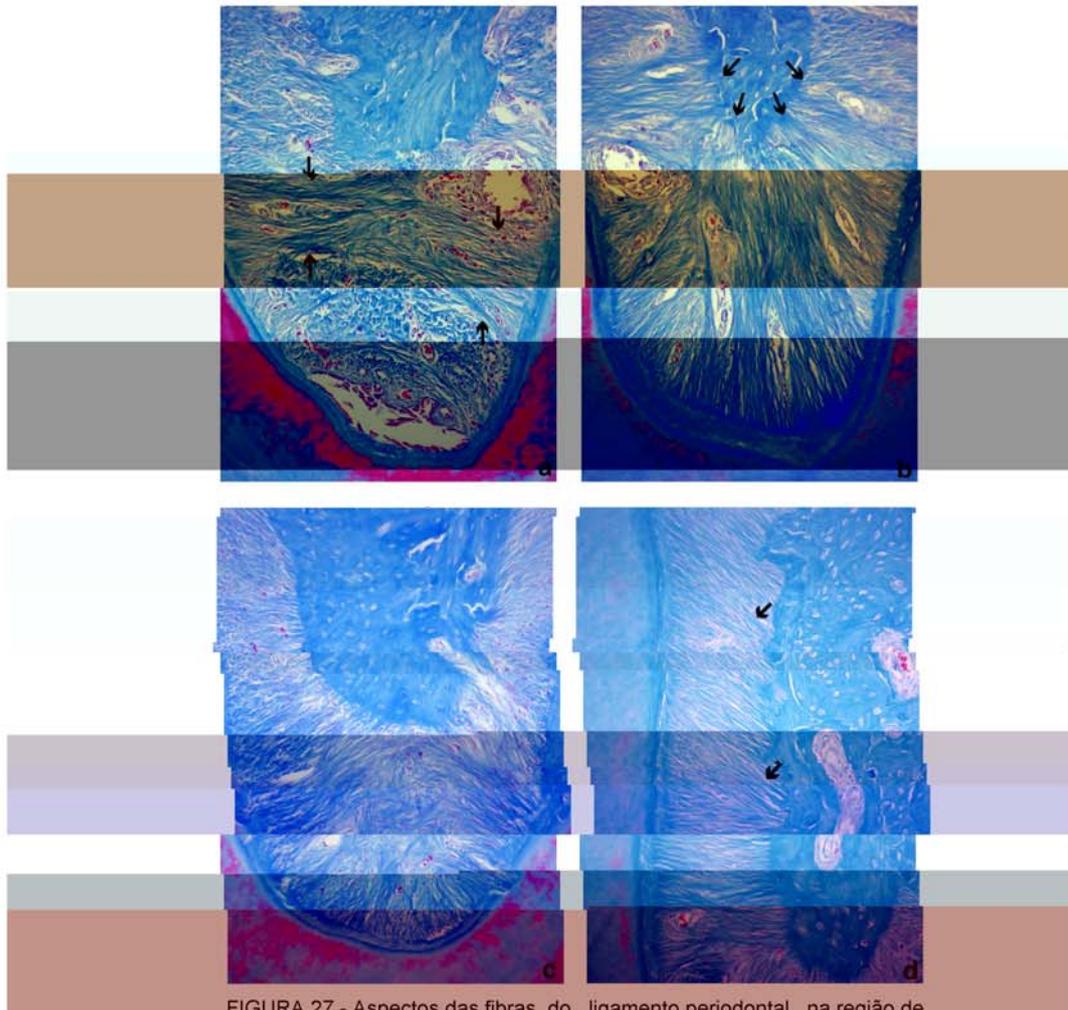


FIGURA 27 - Aspectos das fibras do ligamento periodontal na região de furca: a) fibras colágenas dispostas paralelamente ao topo do septo ósseo (→); b) fibras interradiculares dispostas em forma de leque a partir do topo do septo ósseo em direção ao cimento (→); c) densos feixes de fibras colágenas dispostos de forma irregular a partir do topo do septo ósseo;

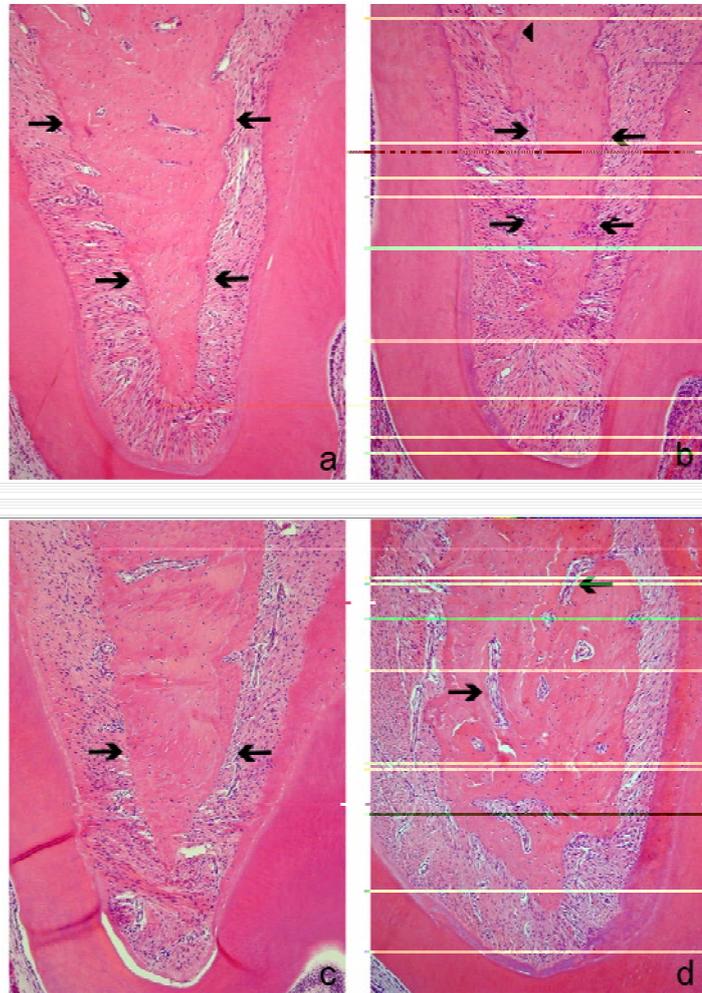


FIGURA 27 - Aspectos do septo ósseo na região de furca: a) tecido ósseo compacto exibindo contorno regular (→); b) contorno irregular do septo ósseo (→) com presença de linhas reversas (◄); c) tecido ósseo compacto (→); d) presença de espaços medulares no septo ósseo interradicular. Aumento original 100x. HE.

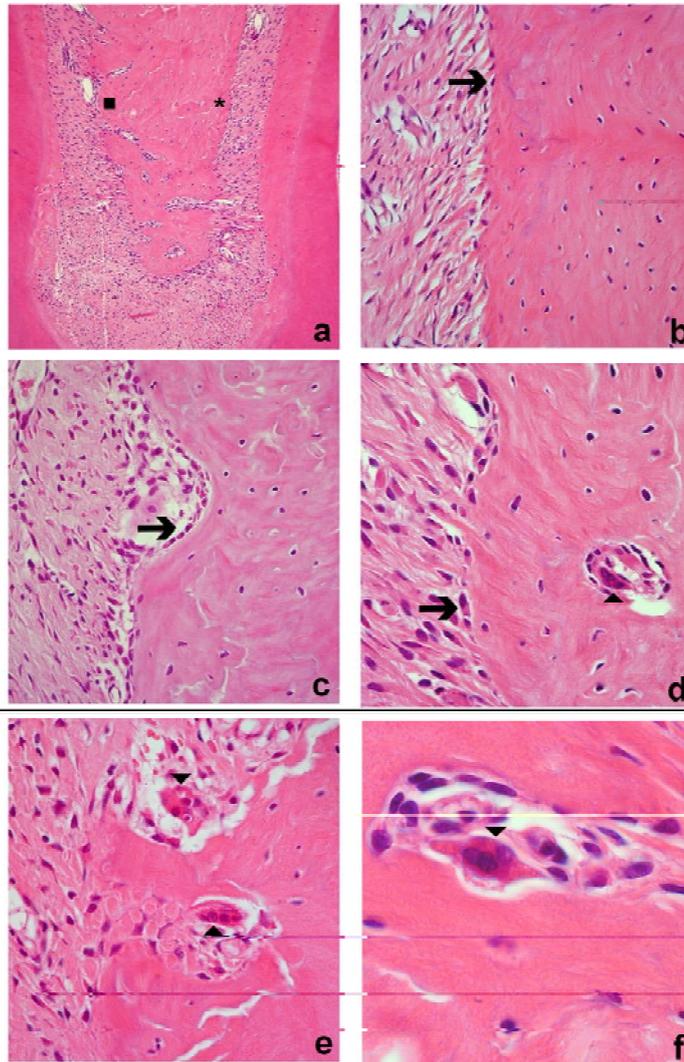


FIGURA 28 - Aspecto das células ósseas presentes no septo interradicular: a) aspecto panorâmico exibindo maior regularidade da superfície distal (*) comparada à mesial (■); b) osteoblastos cubóides (→); c) osteoblastos mais volumosos com aspecto plasmocitóide (→); d) osteoblastos com aspecto plasmocitóide (→) e osteoclasto no canal medular (↖); e) osteoclastos (↖); f) osteoclasto em lacuna de Howship (↘). Aumento original 100x, 200x, 200x, 400x, 400x, 630x, respectivamente. HE.

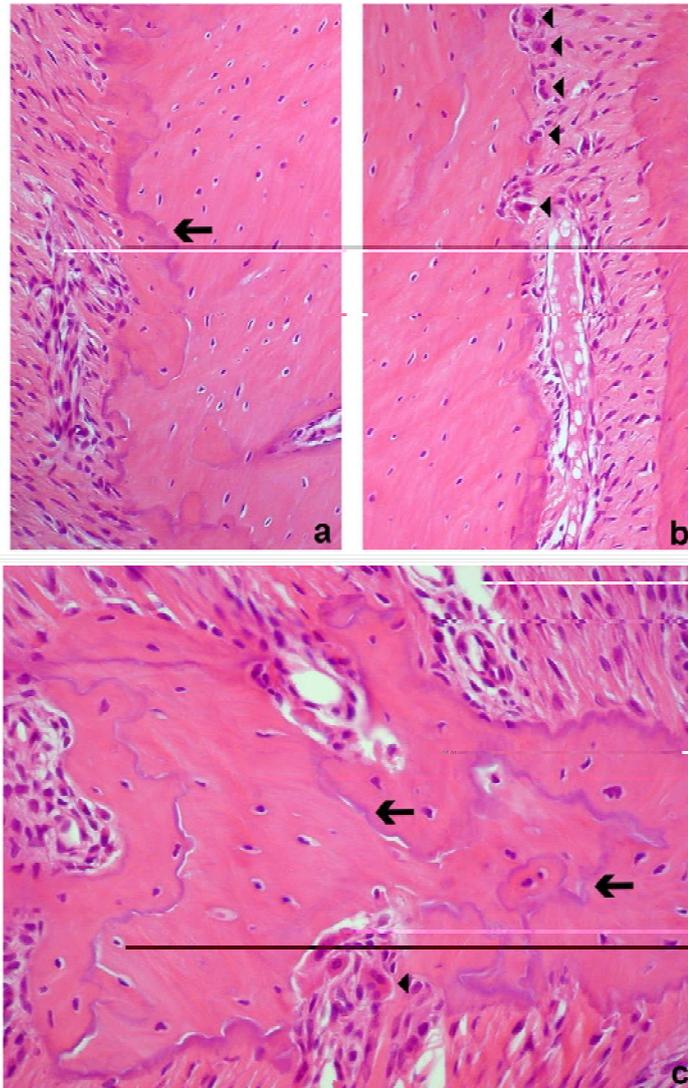


FIGURA 29 - Aspectos da remodelação no septo ósseo interdental: a) presença de linhas reversas (→); b) numerosos osteoclastos na superfície óssea (▶); c) numerosas linhas reversas (→) e osteoclastos (▶). Aumento original 200x, 200x e 400x, respectivamente. HE.

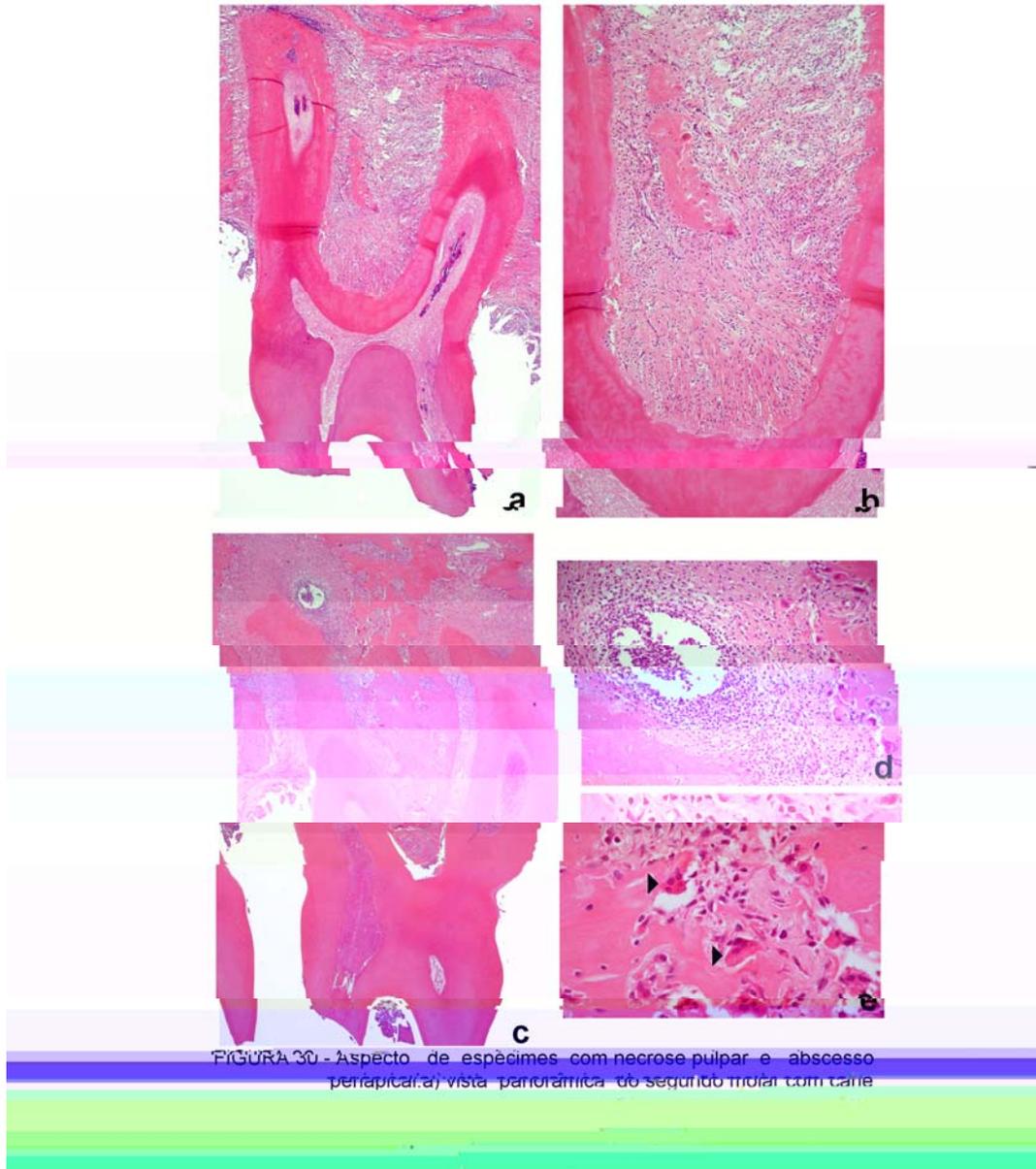


FIGURA 30 - Aspecto de espécimes com necrose pulpar e abscesso periapical: a) vista panorâmica do seguimento molar com cárie

área de ressecção do tecido de preenchimento; b) maior aumento evidenciando a presença de numerosos osteoclastos junto ao osso alveolar (▶). Aumento original 25x, 100x, 25x, 100x, 630x, respectivamente. HE.

5.6 Análise histomorfométrica

Baseado nos valores obtidos das médias realizadas nas duas leituras foi possível comparar a porcentagem de tecido ósseo na região de furca, nos subgrupos experimentais e controles, bem como entre estes e o grupo *sham*. Para a comparação entre os subgrupos experimentais e controles nos diferentes períodos de início da TRH/E ou placebo, respectivamente, foi realizado o Teste *t* de *Student* (Tabela 23).

Tabela 23 - Comparação entre os subgrupos experimentais e controles nos diferentes períodos de início do tratamento

Períodos	Controle Média	n	Experimental Média	n	<i>t(Student); (gl = 8)</i>	
					T	p
G0 - Imediato	51.54	4	52.28	6	0.16	0.880
G1 - 1ª Semana	49.6	4	61.51	6	1.62	0.144
G2 - 2ª Semana	57.72	4	52.04	6	1.11	0.301
G3 - 3ª Semana	56.87	4	53.98	6	0.64	0.538
G4 - 4ª Semana	51.44	4	55.73	6	1.03	0.334

A comparação entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais foi realizada com o auxílio do teste de Dunnett.

Tabela 24 – Comparação múltipla de Dunnett, analisando os valores de porcentagem óssea na região de furca dos segundo molares superiores. Comparação do grupo *sham* com os subgrupos experimentais

Subgrupos	Média	Lower bound	Diferença	Upper bound
<i>Sham</i>	58.343			
E0	52.283	-14.078	-6.060	1.958
E1	61.510	-4.851	3.167	11.184
E2	52.037	-14.324	-6.307	1.711
E3	53.977	-12.384	4.367	3.651
E4	55.732	-10.629	-2.612	5.406

Alpha 0.05
Critical D Value 2.657

Os valores médios da porcentagem óssea do grupo *sham* foram comparados com o controle utilizando-se o teste estatístico *t* de *Student*. Embora não tenha sido evidenciada diferença estatística entre os grupos, o nível de significância foi muito próximo (Tabela 25).

Tabela 25 – Resultados dos valores de porcentagem óssea do grupo *sham* e grupo controle, após a aplicação do teste *t*-Student

<i>Sham</i>	n	Controle	n	<i>t(Student); (gl =23)</i>	
				t	p
58.34	6	53.5	20	1.88	0.073

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram analisados os aspectos macroscópicos, radiográficos, histológicos e histomorfométricos da região periodontal dos segundos molares maxilares de sessenta e cinco ratas ovariectomizadas, submetidas à terapia de reposição hormonal com estrógeno iniciada em diferentes períodos, ou que receberam placebo nos períodos correspondentes. Mais oito ratas compuseram o grupo *sham*, onde foi realizada a simulação da OVX. Os resultados revelaram que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, com exceção da massa corpórea dos animais e quanto ao nível de estradiol sérico.

Baseado em evidências na literatura, que revelaram maior perda óssea esquelética após a menopausa, bem como nos tecidos de suporte dentário, lançou-se a hipótese que a terapia com o estrógeno, iniciada precocemente após a OVX, pudesse atenuar essa perda, e dessa forma influenciar a progressão da doença periodontal. Assim sendo, serão discutidas essas evidências encontradas na literatura e posteriormente as possíveis causas que possam justificar os achados.

Após a menopausa, com a ausência dos hormônios ovarianos, em especial o estrógeno, observa-se um aumento do ritmo de remodelação óssea, e conseqüentemente uma perda óssea gradativa, podendo culminar com um quadro de osteoporose (NEVITT¹⁰⁰, 1994; BURR et al.⁸ 1997; GALLAGHER et al.³⁶, 2002). O ritmo de remodelação óssea no osso alveolar é maior que nos ossos longos (KATBURIAN & ARANA⁶⁹, 1999). Dessa forma, é de se supor que um distúrbio sistêmico na reabsorção e formação óssea deva manifestar alterações precocemente no processo alveolar comparado a outros sítios.

Para comprovar o papel de um hormônio na patogênese ou na evolução de qualquer doença, primeiramente o hormônio deve estar presente no tecido alvo. Segundo, um receptor específico deste hormônio deve existir no tecido alvo. Terceiro, a ausência do hormônio no tecido alvo deve estar relacionada à evolução da doença. Finalmente, a reposição do hormônio deve induzir uma resposta (SEKO et al.¹²⁶, 2005).

À luz dos conhecimentos atuais, está clara a presença, bem como a participação do estrógeno no metabolismo ósseo (CANALIS¹¹, 1983; GRAY⁴⁶, 1989; MUNDY⁹⁸, 1993; HUGHES et al.⁵⁵, 1996; KUIPER et al.⁸³, 1997; COMPSTON²⁰, 2001; SRIVASTAVA et al.¹³⁵, 2001; JÄRVINEN et al.⁵⁹, 2003; ERBEN et al.²⁹, 2004; FERRARI et al.³¹, 2004; GOSS et al.⁴⁴, 2004; QI et al.¹¹², 2004; SOMJEN et al.¹³³, 2004).

Quanto à presença de um receptor específico, até o início da década de oitenta acreditava-se que o estrógeno agia no tecido ósseo indiretamente (CANALIS¹¹, 1983), pois não havia sido identificado receptor para este hormônio nas células ósseas. Em 1987, foi observado efeito direto do estrógeno em células osteoblásticas (GRAY⁴⁶, 1989) o que foi confirmado por outros autores, descrito em extenso trabalho de revisão, realizado por Compston²⁰, em 2001. Estudos recentes relataram a presença de receptor ER α e ER β no osso (FOUNTAS et al.³³, 2004), tendo sido relatada sua presença em osteoblastos e osteoclastos (COMPSTON²⁰, 2001). A presença de receptor ER α também foi demonstrada em macrófagos (VEGETO et al.¹⁴⁷, 2004).

A deficiência do estrógeno, causada principalmente pela diminuição das funções ovarianas após a menopausa, está intimamente relacionada ao desenvolvimento da osteoporose (TURNER et al.¹⁴⁶, 1994; MOST et al.⁹⁷, 1997; BANDEIRA et al.⁵, 2000.; COMPSTON²⁰, 2001; BROWN & JOSSE⁷, 2002; GALLAGER et al.³⁶, 2002;). A TRH/E tem sido demonstrada como método altamente eficaz na sua prevenção, pois exerce uma proteção efetiva da perda óssea após a menopausa (CHOW et al.¹⁷, 1992; TURNER et al.¹⁴⁶, 1994; MODESTO FILHO et al.⁹², 1996;

SIMS et al.¹³², 1996; GAMBACCIANI & CIAPONI³⁷, 2000; CIVITELLI et al.¹⁸, 2002; NIELSEN et al.¹⁰¹, 2004; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2004). Como benefícios adicionais da TRH/E estão incluídos os efeitos protetores de lesão vascular e arterioesclerose (FLORIAN et al.³², 2004), e a capacidade de reduzir os níveis séricos do colesterol (FROLIK et al.³⁴, 1996; JUNQUEIRA et al.⁶⁵, 2002), promovendo diminuição em até 50% da probabilidade de doença cardíaca após a menopausa (TURNER et al.¹⁴⁶, 1994), embora trabalhos alertem para o risco aumentado de câncer endometrial e de mama. Segundo Turner et al.¹⁴⁶ (1994) a mortalidade e morbidade decorrentes de doenças coronárias excedem amplamente às neoplasias malignas de mama e útero.

A manutenção da integridade do tecido ósseo dos maxilares, em especial do tecido ósseo do processo alveolar, é fundamental para uma adequada sustentação e suporte dos dentes. Trabalhos na literatura revelaram maior probabilidade de perda dentária em mulheres com menor densidade óssea mineral (TAGUCHI et al.¹³⁷, 1999; MOHAMMAD et al.⁹⁵, 2003), embora outros não tenham demonstrado essa relação (ERNSHAW et al.²⁵, 1998; BOLLEN et al.⁶, 2004). A hipótese de que alterações no tecido ósseo, decorrentes da depleção do estrógeno, possam afetar os ossos maxilares, e dessa forma, influenciar a evolução da doença periodontal, tem motivado a realização de várias pesquisas. No entanto, o significado clínico da perda óssea sistêmica, em contribuir com a perda óssea dos maxilares e dentes permanece incerto.

Uma associação entre a osteopenia/osteoporose e a periodontite tem sido relatada em diversos trabalhos realizados em humanos (KLEMETTI et al.⁷⁴, 1994; MOHAMMAD et al.^{93,94}, 1996 e 1997; HILDEBOLT et al.⁵³, 1997; PAYNE et al.¹¹⁰, 1999; PILGRAM et al.¹¹¹, 1999; TEZAL et al.¹⁴³, 2000; INAGAK et al.⁵⁷, 2001; MOHAMMAD et al.⁹⁵, 2003). Outros autores não encontraram esta relação (KRIBBS⁸⁰, 1990; ELDERS et al.²⁷, 1992). Associação entre a densidade óssea esquelética

e a perda de inserção clínica somente foi encontrada em mulheres com alto índice de cálculo (RONDEROS et al.¹²⁰, 2000). Os autores verificaram que na presença de fatores irritantes locais, as mulheres com osteoporeose apresentaram maior risco para perda de inserção periodontal, e que este risco pode ser atenuado com a TRH/E.

Trabalhos na literatura suportam evidências de que a TRH/E em mulheres após a menopausa pode reduzir o risco de alterações periodontais, como a gengivite (NORDERYD et al.¹⁰², 1993; REINHARDT et al.¹¹⁷, 1999), a perda de inserção clínica (RONDEROS et al.¹²⁰, 2000), e a perda óssea alveolar (PAYNE et al.¹⁰⁹, 1997; CIVITELLI et al.¹⁸, 2002). Os benefícios da TRH/E também foram evidenciados na prevenção da perda dentária (GRODSTEIN et al.⁴⁷, 1996; PAGANINI-HILL¹⁰⁷, 1996; KRALL et al.⁷⁷, 1997). No entanto, alguns autores alertam para a necessidade de mais estudos que comprovem a eficácia da TRH/E na prevenção da periodontite em mulheres na pós menopausa (KRALL⁷⁸, 2001; ZEEMAN et al.¹⁵⁷, 2001; ALBANDAR¹, 2002; HAIMOV-KOCHMAN et al.⁴⁹, 2004), uma vez que trabalhos em humanos apresentam muitas variáveis.

Modelos experimentais com ratos são extremamente pertinentes e relevantes, tanto para o estudo da osteopenia/osteoporose (KALU et al.⁶⁷, 1989; KALU⁶⁶, 1991; FROST & JEE³⁵, 1992), quanto da periodontite (KLAUSEN et al.⁷³, 1989; KLAUSEN⁷², 1991; KNUT⁷⁵, 1994; SHOJI et al.¹²⁹, 1995; KUHR et al.⁸², 2004; LISTGARTEN⁸⁷, 1975; RICARDO¹¹⁹, 2002), pois refletem aspectos muito similares destas condições em humanos.

Weinberg & Bral¹⁵² (1999), questionaram os modelos de estudo em ratos para periodontite, uma vez que os incisivos destes animais não apresentam raiz e exibem um crescimento contínuo. A arcada dentária dos ratos é constituída por um incisivo e três molares em cada quadrante; os molares guardam bastante semelhança com os dentes humanos, embora exibindo um crescimento contínuo, este é

extremamente lento comparado ao do incisivo (SCHOUR & MASSLER¹²⁵, 1993). Também foram discutidas as possíveis diferenças nos padrões da patogênese da periodontite em ratos, bem como na atuação de fatores locais, como a impactação de pêlos no periodonto, podendo contribuir para a progressão da doença (WEINBERG & BRAL¹⁵², 1999). No entanto, Klausen⁷² (1991) atestou que a estrutura e organização dos tecidos periodontais dos molares dos ratos (epitélio gengival, epitélio juncional, fibras colágenas, cemento e osso alveolar) são bastante semelhantes aos dos humanos, com exceção da presença de queratina no epitélio sulcular. Segundo o autor, considerando os aspectos anatômicos do periodonto na região dos molares, o desenvolvimento e composição da placa bacteriana e a histopatologia da periodontite, pode-se afirmar que esse modelo experimental é bastante razoável para o estudo da doença periodontal humana. O autor enfatizou, entretanto, a importância da combinação de diversos métodos diagnósticos para estudar a periodontite em ratos, uma vez que um único método isolado pode ser insuficiente para abordar todos os aspectos da periodontite animal.

Desta forma, para estudar os efeitos da TRH/E iniciada em diferentes períodos após a OVX na evolução da periodontite, foram propostas, neste trabalho, avaliações macroscópicas, como grau de mobilidade dentária, grau de envolvimento de furca e perda óssea alveolar, avaliação radiográfica, para analisar o suporte ósseo alveolar, bem como avaliação histológica e histomorfométrica.

Nos modelos experimentais para o estudo da perda óssea após a menopausa, observa-se uma rápida fase de perda óssea, que coincide com o máximo aumento do ritmo de remodelação, e posterior declínio desse ritmo (WRONSKI et al.¹⁵⁴, 1988; KALU⁶⁶, 1991; TANAKA et al.¹⁴¹, 2003), à semelhança do que ocorre com a mulher após a menopausa, que exhibe perda óssea mais acentuada no primeiro ano após a menopausa, sendo o metabolismo ósseo afetado por mais dois ou três anos (OHTA et al.¹⁰⁵, 2002).

A opção por realizar a OVX em ratas com três meses de idade, baseou-se nesses modelos experimentais. Kalu⁶⁶ (1991) observou que esse período foi adequado para o estudo da perda óssea decorrente da depleção do estrógeno. Também para a avaliação das possíveis alterações no periodonto decorrentes da falta dos hormônios ovarianos, este parece ser um período ideal (MARQUES⁹⁰, 1998). O período de sacrifício de 35 dias após a colocação da ligadura foi determinado em função de ter sido demonstrado suficiente, tanto para indução da periodontite (RICARDO¹¹⁹, 2002; REIS¹¹⁸, 2002; ANBINDER², 2004), quanto das alterações nos maxilares (MARQUES⁹⁰, 1998).

A perda óssea decorrente da deficiência do estrógeno, obtida pela OVX experimental, foi demonstrada em vários trabalhos (WRONSKI et al.¹⁵⁴, 1988; KALU et al.⁶⁷, 1989; KALU⁶⁶, 1991; FROLIK et al.³⁴, 1994; OMI & EZAWA¹⁰⁶, 1995.; ARJMANDI et al.³, 1996; WIMALAWANSA et al.¹⁵³, 1996.; JAHANGIRI et al.⁵⁸, 1997; JIANG et al.⁶³, 1997; LANE et al.⁸⁵, 1998; HARA et al.⁵⁰, 2001; HUNZIKER et al.⁵⁶, 2000; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁹⁹, 2001; TANAKA et al.¹⁴⁰, 2002; DEYHIM et al.²², 2003; KURODA et al.⁸⁴, 2003; TANAKA et al.¹⁴¹, 2003.; TEÓFILO et al.¹⁴², 2003.; YANG et al.¹⁵⁵, 2003; CAO et al.¹², 2004). São vários os mecanismos que regulam essa perda. Kalu, et al.⁶⁷, em 1989, relataram que a depleção do estrógeno provoca diminuição da absorção de cálcio pelo intestino e aumento da remodelação óssea, com a reabsorção excedendo a formação. Mais recentemente, foi sugerida a participação da regulação neural na perda óssea que caracteriza a osteoporose, visto que foi identificada significativa diminuição na inervação óssea esquelética em ratas OVX (BURT-PICHAT et al.⁹, 2005). Mecanismos moleculares e genéticos têm sido associados com a perda óssea decorrente da falta dos hormônios ovarianos (FERRARI et al.³¹, 2004).

Uma característica interessante da perda óssea observada após a menopausa, ou obtida em modelos experimentais, é a influência dos diferentes sítios do esqueleto, à maior ou menor possibilidade de perda óssea. A OVX em ratas não demonstrou alterações histomorfométricas significantes no palato duro, porém, na mandíbula e tibia estas foram observadas (HARA et al.⁵⁰, 2001). Yang et al.¹⁵⁵, em 2003, mesmo verificando alterações no osso trabecular de mandíbula e tibia de ratas OVXs, constataram diferenças no comportamento de perda óssea nestes dois sítio. Ao analisar as alterações na microarquitetura óssea decorrentes da OVX nesses ossos, os autores verificaram correlação positiva apenas entre a forma das trabéculas ósseas e a presença de espaços entre elas. O volume ósseo, bem como a espessura das trabéculas da mandíbula e tibia, não apresentaram correlação estatisticamente significativa. Da mesma forma, Teófilo et al.¹⁴², em 2003 constataram que os ossos longos são mais afetados pela deficiência do estrógeno comparados aos ossos dos maxilares.

Também parecem estar bem estabelecidas na literatura as diferentes respostas do tecido ósseo trabecular e cortical, à deficiência do estrógeno. Turner et al.¹⁴⁶ (1994) constataram que a OVX induziu uma diminuição da densidade óssea mineral, provocando rápida perda de osso trabecular, porém, as alterações no osso cortical ocorrem muito lentamente. Vários autores relataram perda de osso trabecular após a OVX experimental (KALU et al.⁶⁷, 1989; KALU⁶⁶, 1991; TURNER et al.¹⁴², 1994; FROST & JEE³⁵, 1992; HARA et al.⁵⁰, 2001; CAO et al.¹², 2004; BURT-PICHAT et al.⁹, 2005), corroborando com os trabalhos realizados em humanos, que também constatam essa característica. Hara et al.⁵² (2001) demonstraram que a depleção do estrógeno decorrente da OVX, associada a uma dieta com baixa concentração de cálcio, também provocou perda óssea cortical.

A depleção do estrógeno, decorrente da OVX também influencia o processo de reparação (JAHANGIRI et al.⁵⁸, 1997; TANAKA et

al.¹³⁹, 2001; JUNQUEIRA et al.⁶⁵, 2002; SILVEIRA¹³¹, 2004). Silveira¹³¹, em 2004, demonstrou que a OVX prejudicou a reparação de defeito ósseo realizado em tíbias de ratas; foi constatada menor densidade radiográfica nos animais OVXs bem como alterações morfométricas, que revelaram menor porcentagem de tecido ósseo neoformado, após 21 dias, nos defeitos ósseos da tíbia de ratas OVXs, comparadas às ratas *sham* operadas.

Nos ossos maxilares as alterações ósseas decorrentes da OVX experimental têm sido descritas na literatura (ELOVIC et al.²⁸, 1994; JAHANGIRI, et al.⁵⁸, 1997; JOHNSON et al.⁶⁴, 1997; MORIYA et al.⁹⁶, 1998; GOLUB et al.⁴³, 1999; TANAKA et al.¹³⁸, 1999; HIDAKA et al.⁵², 2000; HUNZIKER⁵⁶, 2000; HARA et al.⁵⁰, 2001; TANAKA et al.¹³⁹, 2001; TANAKA et al.¹⁴⁰, 2002; KAMAWOTO⁷⁰, 2002; JUNQUEIRA et al.⁶⁵, 2002; KURODA et al.⁸⁴, 2003; YANG et al.¹⁵⁵, 2003; CAO et al.¹², 2004; DUARTE et al.²³, 2004). Marques⁹⁰ (1998) encontrou características evidentes de alteração no metabolismo ósseo, na região dos molares superiores de ratas ovariectomizadas na idade de sessenta e noventa dias, analisadas após quarenta dias da OVX. Segundo o autor, a deficiência estrogênica interferiu na morfologia óssea maxilar.

Cao et al.¹² (2004) verificaram que embora o volume de tecido ósseo trabecular bem como a espessura das trabéculas ósseas na mandíbula de coelhas OVXs não tenham diferido das *sham* operadas, foram observadas diferenças histomorfométricas significantes quanto ao número de trabéculas e os espaços entre elas. Os animais OVXs apresentaram diminuição das trabéculas ósseas e aumento do espaço entre elas, demonstrando sinais de perda óssea na mandíbula decorrentes da deficiência do estrógeno. Observações semelhantes foram feitas por Yang et al.¹⁵⁵, em 2003, que ao compararem as alterações na microarquitetura óssea decorrentes da OVX na mandíbula e tíbia de ratas, verificaram correlação positiva apenas entre a forma das trabéculas ósseas e a presença de espaços entre elas. O volume ósseo, bem como

a espessura das trabéculas da mandíbula e tíbia, não apresentaram correlação estatisticamente significativa.

No presente estudo, a ausência de alterações significativas na histomorfometria óssea entre os grupos experimentais, controle e *sham*, pode ser atribuída, em parte, ao local escolhido para a análise, visto que significativa perda óssea foi observada na região inter-radicular de primeiros molares inferiores por outros autores (TANAKA et al.¹⁴¹, 2003, DUARTE et al.²³, 2004). Alterações significativas na crista óssea e septo ósseo inter-radicular do primeiro molar da maxila, foram constatadas por Marques⁹⁰, 1998. A opção pela avaliação do septo ósseo do segundo molar superior, no presente estudo, foi em função de já ter sido estabelecido um modelo experimental de periodontite eficaz nesta região, com a indução da doença por meio da inserção de ligadura com fio de algodão, em cinco semanas (RICARDO¹¹⁹, 2002; REIS¹¹⁸, 2002; ANBINDER², 2004). A escolha da área, estabelecendo-se um retângulo a partir do cemento na furca abrangendo o tecido ósseo do septo inter-radicular foi decorrente da facilidade de padronização e reprodução. No entanto, foi observado que o septo ósseo do segundo molar superior apresenta-se bastante estreito, e muitas vezes o osso alveolar adjacente à raiz distal encontrava-se bastante próximo do osso alveolar adjacente à mesial, não evidenciando a presença de tecido ósseo trabecular interposto. Dessa forma, o aspecto do septo inter-radicular do segundo molar superior muitas vezes era de tecido ósseo compacto, com poucos espaços medulares. Uma vez que os efeitos da deficiência de estrógeno são mais evidentes em tecido ósseo trabecular comparado ao tecido ósseo cortical (KURODA et al.⁸⁴, 2003), isto pode ter contribuído para os nossos achados negativos.

Moriya et al.⁹⁶, em 1998, constataram que a diminuição na densidade óssea mineral do osso alveolar de ratas está mais relacionada ao tipo de dieta (baixo teor de cálcio), do que à deficiência do estrógeno obtida pela OVX. Constatação semelhante foi realizada por Teófilo et

al.¹⁴², em 2003. Os autores observaram que um período de cinco semanas após a OVX foi insuficiente para promover alterações ósseas, tanto na maxila quanto na tíbia de ratas OVXs. No entanto, nas ratas com dieta com baixo teor de cálcio, foi constatada diminuição de 30 a 40% da massa óssea da maxila e 17% da massa óssea da tíbia, alertando novamente para a importância do tipo de dieta na indução da perda óssea nos maxilares. Estendendo-se o período para onze semanas após a OVX, foi observada em animais com dieta normal, uma perda de massa óssea de 14% nas tíbias, mas não nas maxilas. Novamente, quando da dieta pobre em cálcio, uma perda da massa óssea de 30% foi observada em ambos os ossos. Assim, o período de avaliação após a OVX também deve ser levado em consideração para obtenção das alterações. Yang et al.¹⁵⁵, em 2003, constataram alterações na microarquitetura óssea da mandíbula após quatro meses da OVX. Segundo Glikmann & Quintarelli⁴² (1960) as evidências de alterações no periodonto ocorreram após três meses da OVX. Da mesma forma, avaliando as alterações na região de septo ósseo de primeiro molar inferior, de ratas OVXs, Duarte et al.²³ (2004) encontraram alterações ósseas após oitenta e um dias da OVX. Porém, alterações significativas no periodonto de sustentação, na maxila, após 40 dias da OVX foram encontradas por Marques⁹⁰, em 1998. Na tíbia e fêmur, alterações na estrutura óssea foram demonstradas no período de apenas cinco dias após a OVX (LANE et al.⁸⁵, 1998).

Um outro fator que possivelmente possa justificar os achados do presente trabalho, fundamenta-se nas características fisiológicas adaptativas dos maxilares dos ratos. Tanaka et al.¹⁴¹, em 2003, discutiram o crescimento dos ossos dos ratos, abordando a alta atividade de formação óssea dos maxilares com a progressão do tempo, comparada a dos ossos longos. Segundo os autores, em ossos longos, o volume ósseo tende a diminuir após o período de crescimento do rato, o que não foi evidenciado nos maxilares. Ao contrário, ao longo de seis meses, os autores observaram maior atividade de formação óssea nos

maxilares de ratas normais. Este fato seria resultante da carga mecânica, decorrente dos esforços mastigatórios. Uma vez tendo sido relatada a influência de esforços oclusais na dinâmica óssea em ratas OVXs (ELOVIC et al.²⁸, 1994; TANAKA et al.¹³⁸, 1999; TANAKA et al.¹⁴¹, 2003), os resultados negativos obtidos em nosso estudo poderiam também ser justificados pela presença das forças mastigatórias, que provavelmente modularam a perda óssea freqüentemente observada após a OVX em outras partes do esqueleto. Provavelmente, este é um dos motivos que levou vários pesquisadores a não encontrar diferenças tão significativas nos ossos maxilares, comparando-os a outros ossos do esqueleto. (MORIYA et al.⁹⁶, 1998; HARA et al.⁵⁰, 2001; KURODA et al.⁸⁴, 2003; TEÓFILO et al.¹⁴², 2003; YANG et al.¹⁵⁵, 2003). Forças mecânicas aplicadas sobre o osso, influenciam o volume e estrutura óssea (KURODA et al.⁸⁴, 2003). Assim, forças oclusais podem atenuar a influência da deficiência do estrógeno no tecido ósseo dos maxilares (ELOVIC et al.²⁸, 1994). Kuroda et al.⁸⁴ (2003) detectaram diferenças regionais na densidade óssea de ratas OVXs. Na região condilar, as ratas OVXs exibiram diminuição de 14% da densidade óssea comparadas às sham operadas; no entanto, na região dos molares essa diferença foi menor, e na cortical não foi verificada diferença entre os grupos. Embora o mecanismo exato que explique essa menor susceptibilidade de perda óssea decorrente da deficiência do estrógeno na região dos molares não esteja bem esclarecido, parece clara a participação das forças oclusais na prevenção da perda óssea nesta condição patológica. Elovic et al.²⁸ (1994) realizando a extração do dente antagonista, e excluindo assim as forças oclusais mastigatórias, evidenciaram maior diminuição da rigidez mandibular em ratas OVX. Cao¹², em 2004, analisando o tecido ósseo em região edêndula da mandíbula de coelhas OVXs, ou seja, livre de esforços oclusais, também constatou alterações histomorfométricas características de perda óssea. No entanto, Duarte et al.²³, em 2004,

observaram alterações no tecido ósseo alveolar de ratas OVXs; mesmo em presença de esforços mastigatórios e dieta padrão.

Os efeitos da depleção do estrógeno no periodonto também têm sido estudados (GLICKMAN & QUINTARELLI⁴², 1960; JOHNSON et al.⁶⁴, 1997; MARQUES⁹⁰, 1998; HIDAKA et al.⁵², 2000; ANBINDER² 2004; DUARTE et al.²³, 2004). Entretanto, poucos estudos avaliaram a relação direta entre a doença periodontal e suas seqüelas após a OVX, bem como a influência da terapia de reposição hormonal nos tecidos periodontais. (ZEEMAN et al.¹⁵⁷, 2001; ANBINDER et al.², 2004; DUARTE et al.²³, 2004).

Aumento do espaço ocupado pelo ligamento periodontal foi verificado em ratas OVX, comparado com ratas *sham* operadas ou que receberam TRH/E (HIDAKA et al.⁵², 2000), porém, não foram observadas diferenças na densidade óssea mineral da região do côndilo mandibular entre os grupos. A distância entre o cemento e o osso alveolar, ou seja, a largura do ligamento periodontal em ratas *sham* foi de aproximadamente 96,8µm enquanto ratas OVX foi de 157µm (HIDAKA et al.⁵², 2000). Em ovelhas, maior profundidade do sulco gengival, bem como maior quantidade de sítios exibindo sulcos profundos (4 a 6mm) foi verificada em animais OVXs, comparada aos animais controles (JOHNSON et al.⁶⁴, 1997). Os resultados obtidos no presente estudo vão ao encontro dos resultados obtidos por Anbinder² (2004) que não observou relação entre a OVX e as alterações no tecido ósseo ou periodontal após indução da periodontite, contrariando o trabalho de Duarte et al.²³ (2004) que relataram significativa perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior após a indução da periodontite em ratas OVX, comparadas a ratas *sham* operadas. Os efeitos da TRH/E na evolução da periodontite em ratas OVXs foram recentemente descritos por Duarte et al.²³ (2004). A administração do estrógeno imediatamente após a OVX foi eficiente na proteção contra a perda óssea alveolar resultante da OVX; no entanto, uma vez induzida a periodontite, a TRH/E não foi suficiente para proteger

contra a perda óssea alveolar. Os autores concluíram que embora o tratamento com estrógeno tenha se mostrado eficaz na redução do ritmo de remodelação óssea após a OVX, uma vez existindo algum fator local predisponente para a doença periodontal, a administração do estrógeno é ineficaz para proteção da perda óssea alveolar.

Em extenso trabalho de revisão da literatura, Turner et al.¹⁴⁶, em 1994, discutiram os efeitos do estrógeno nos tecidos ósseos. Os autores chamaram a atenção para as diferentes respostas ao estrógeno nos diversos sítios do esqueleto, justificando tal diferença à atividade metabólica de cada osso, suprimento sanguíneo, população de célula osteoprogenitora, demanda de remodelação óssea ou magnitude de forças mecânicas atribuídas aos diferentes sítios. Diferentes respostas da tibia e osso alveolar de ratos, frente a administração de drogas inibidoras da reabsorção óssea, foram observadas por Gotcher & Jee⁴⁵ (1981). Embora a droga tenha prevenido a perda óssea nestes dois sítios, os efeitos na tibia foram bem mais evidentes que nos ossos alveolares. Os autores atribuem este fato aos diferentes estímulos para reabsorção em cada sítio.

Os efeitos do estrógeno na prevenção da perda óssea pós OVX são evidentes na literatura (CANALIS¹¹, 1983; GRAY⁴⁶, 1989; TURNER et al.¹⁴⁶, 1994; HUGHES et al.⁵⁵, 1996; SIMS et al.¹³², 1996; FROLIK et al.³⁴, 1996; ARJMANDI et al.³, 1996; JIANG et al.⁶³, 1997; MOST et al.⁹⁷, 1997; COMPSTON²⁰, 2001; SRIVASTAVA et al.¹³⁵, 2001; JARVINEN et al.⁵⁹, 2003; DUARTE et al.²³, 2004; ERBEN et al.²⁹, 2004; GOSS et al.⁴⁴, 2004; QI et al.¹¹², 2004; TIVESTEIN¹⁴⁵, 2004; SPALDING et al.¹³⁴, 2005). Tivestein et al.¹⁴⁵, em 2004, observaram que os efeitos de hormônios sexuais no tecido ósseo estão na dependência do parâmetro ósseo investigado, ou seja, podem ser aditivos (como ocorreu no osso trabecular), ou sem efeito (no osso cortical) ou ainda exibir um efeito antagonista (no crescimento ósseo longitudinal).

Os mecanismos envolvidos na prevenção da perda óssea atribuída ao estrógeno são complexos e controversos. Na década de oitenta os trabalhos relatavam que o estrógeno embora estando relacionado à diminuição da reabsorção óssea, não exercia efeito direto na formação óssea nem na reabsorção (CANALIS¹¹, 1983). O estrógeno é um hormônio que regula a expressão do gene da interleucina 6 (IL-6), de forma a reprimi-lo. A IL-6 é uma citocina que desempenha papel fundamental na remodelação óssea. Produzida por osteoblastos e monócitos, promove a diferenciação e ativação de osteoclastos (STEEVE et al.¹³⁶, 2004). A expressão do gene IL-6 é regulada por vários hormônios, citocinas e seus fatores de transcrição. A IL-1 e TNF α ativam sua expressão, ao passo que o estrógeno e glicocorticóide a reprimem. Desta forma, o aumento da IL-1 e TNF α observado na periodontite (OATES et al.¹⁰⁴, 2002) e a diminuição do estrógeno decorrente da OVX, promovem um aumento da expressão da IL-6, da reabsorção e da formação óssea. Reinhardt et al.¹¹⁵, em 1994, demonstraram que condições clínicas que levam a diminuição dos níveis de estrógeno, possibilitam um aumento na produção local de citocinas como a IL-1 β e IL-6.

Um dos mecanismos de ação do estrógeno na prevenção da perda óssea é através da inibição da osteoclastogênese (KAWAMOTO et al.⁷⁰, 2002). O estrógeno interfere na diferenciação dos clastos (SRIVASTAVA et al.¹³⁵, 2001) e, além disso, induz a apoptose de osteoclastos, e dessa forma pode exercer efeito preventivo na perda óssea após a menopausa (HUGHES et al.⁵⁵, 1996).

Wimalawansa et al.¹⁵³, em 1996, verificaram perda de densidade óssea mineral (*dual x-ray absorptiometry - DXA*) na vértebra, após seis semanas da OVX. O estrógeno reverteu essa perda para valores semelhantes aos do *sham*. Os efeitos da reposição estrogênica também foram avaliados por Arjmandi et al.³ (1996). Os autores

observaram diminuição da densidade óssea no fêmur e vértebra. Tanto o E2 quanto a soja preveniram essa perda (ARJMANDI et al.³, 1996).

A administração precoce de agentes que possam suprimir o aumento do ritmo de remodelação óssea, decorrente da deficiência do estrógeno, é bastante importante, uma vez que a deterioração da microarquitetura do osso trabecular em tíbias de ratas já foi detectada num período de apenas cinco dias da OVX (LANE et al.⁸⁵, 1998).

A idéia de avaliar os diferentes períodos de início da TRH/E foi baseada na hipótese de que o estrógeno talvez pudesse não apenas prevenir a perda óssea, mas talvez recuperar ao menos em parte, o osso perdido.

Os efeitos anabólicos do estrógeno no tecido ósseo foram observados por Chow et al.¹⁷ (1992). Os autores verificaram aumento do volume ósseo em tíbia de ratas OVXs tratadas com o estrógeno. Embora tenha sido demonstrado que o estrógeno proporcionou aumento de volume ósseo em ratas OVX (CHOW et al.¹⁷, 1992), alguns autores relataram que o estrógeno não apresentou capacidade de reverter a perda óssea decorrente da OVX (HUNZIKER et al.⁵⁶, 2000). A TRH/E iniciada um ano após OVX proporcionou diminuição da formação óssea, demonstrando a capacidade do estrógeno, mesmo administrado após um ano da OVX, de alterar o metabolismo ósseo. Os autores não observaram ganho de tecido ósseo, mas sim, em função da inibição da formação óssea, as ratas que receberam o hormônio apresentaram menor quantidade de osso que as ratas OVX. Embora os autores infiram que na doença periodontal, devido ao maior ritmo de remodelação óssea, o estrógeno possa ser benéfico por inibir remodelação óssea, não foram feitas considerações quanto à sua capacidade de inibir a reabsorção, efeito este, que deveria ser mais relevante no que se refere à prevenção de perda óssea (HUNZIKER et al.⁵⁶, 2000).

Em experimento paralelo, realizou-se a análise da porcentagem óssea na epífise da tíbia das ratas incluídas no presente

estudo (SPALDING et al.¹³⁴, 2005). Foi constatado que o período de 65 dias após a OVX foi suficiente para promover perda óssea na tíbia. Encontrou-se diferença significativa entre os subgrupos experimentais e controles. Os subgrupos experimentais que iniciaram a TRH/E imediatamente (E0), e uma semana após a OVX (E1), apresentaram maior porcentagem óssea comparados aos respectivos subgrupos controles. Nos subgrupos experimentais também observou-se que houve uma diminuição na porcentagem de osso de acordo com o período de início do tratamento. Dessa forma, o subgrupo que recebeu estrógeno no momento da OVX apresentou porcentagem de trabéculas ósseas significativamente maior aos 65 dias do que o subgrupo que recebeu o estrógeno a partir da quarta semana após a OVX, demonstrando que o período de início da TRH/E foi importante na preservação de tecido ósseo trabecular após a OVX.

As dosagens de estrógeno utilizadas em modelos experimentais foram bastante discrepantes na literatura, variando de 1,5µg/dia a 250µg (CHOW et al.¹⁷, 1992; FROLIK et al.³⁴, 1996; SIMS et al.¹³², 1996; JAHANGIRI et al.⁵⁸, 1997; HUNZIKER et al.⁵⁶, 2000; KAWAMOTO et al.⁷⁰, 2002; KOYAMA et al.⁷⁶, 2002; DUARTE et al.²³, 2004; ERBEN et al.²⁹, 2004; FLORIAN et al.³², 2004; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2004; SOMJEM et al.¹³³, 2004). Neste trabalho o 17β estradiol foi utilizado na dose de 5µg/100g de peso em dias alternados, injetado por via subcutânea, baseado no trabalho de Koyama et al.⁷⁶ (2002).

Erben et al.²⁹ (2004) discutiram em seu trabalho as vias de administração do estrógeno, relatando que os *pellets* de estradiol de liberação lenta, colocados subcutaneamente mostraram uma dosagem sérica hormonal não linear, e dessa forma os autores optaram pela utilização de aplicações subcutâneas do hormônio diluído em veículo oleoso. De acordo com os autores, a menor dose de estrógeno, de aplicação subcutânea, capaz de manter o peso uterino em ratas OVX foi de 1,5µm/kg. No entanto, embora efetivo para manter o peso uterino e

restaurar os níveis séricos hormonais, o tratamento com estrógeno nesta dosagem, por quatro meses, não foi eficaz em promover proteção da perda óssea tanto do osso cortical quanto trabecular.

Os efeitos da deficiência do estrógeno, bem como de sua reposição sobre a massa corpórea também foram relatados em vários estudos. Após a menopausa, com a diminuição das funções ovarianas, a mulher apresenta maior tendência a ganhar massa corpórea, o que pode acarretar o aumento no índice de hipertensão, diabetes e doenças coronárias observadas nesta população (DUBNOV et al.²⁴, 2003). Vários estudos com modelos animais comprovam que a ausência dos hormônios ovarianos está relacionada ao ganho de massa corpórea (ELOVIC et al.²⁸, 1994; ARJMANDI et al.³, 1996; WIMALAWANSA et al.¹⁵³, 1996; YONEDA et al.¹⁵⁶, 1998; CHEN & HEIMAN¹⁵, 2001; WALLEN et al.¹⁵⁰, 2002; ARSHAD et al.⁴, 2004; COLOMBO¹⁹, 2004; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2004). O ganho de massa corpórea, resultante da OVX, pode ser prevenido com a TRH/E (FROLIK et al.³⁴, 1996; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2004).

O presente estudo demonstrou que no período de trinta dias após a OVX não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de ganho da massa corpórea entre os grupos ovariectomizados que não fizeram TRH/E e sham, o que contradiz o trabalho de Chen & Heiman¹⁵ (2001) que observaram ganho de massa corpórea num período de 24 dias após a OVX. No entanto, após o período de 65 dias, observou-se maior porcentagem de ganho de massa corpórea nas ratas ovariectomizadas do grupo controle comparada ao grupo *sham*, confirmando as evidências na literatura (FROLIK et al.³⁴, 1996; COLOMBO¹⁹, 2004; FLORIAN et al.³², 2004; GOSS et al.⁴⁴, 2004; QI et al.¹¹², 2004).

O aumento de massa corpórea, observado após a OVX possivelmente está relacionado à hiperfagia decorrente da falta dos hormônios ovarianos (YONEDA et al.¹⁵⁶, 1998). Quando há um controle na dieta de animais ovariectomizados, o ganho de peso é semelhante ao

ganho de peso do animal *sham* operado (JAHANGIRI et al.⁵⁸, 1997; KURODA et al.⁸⁴, 2003; ERBEN et al.²⁹, 2004). Essa maior porcentagem de massa corpórea parece ocorrer para promover uma proteção parcial contra a osteopenia em ossos longos.

O ganho de massa corpórea após a ovariectomia está primariamente associado ao aumento no número de adipócitos. Tem sido postulado que isso pode ser uma forma compensatória da diminuição dos níveis séricos de estrógeno (JAHANGIRI et al.⁵⁸, 1997), já que uma das formas de estrógeno (estrone) é produzida via conversão da androstenedione nos tecidos adiposos (RUGGIERO & LIKIS¹²², 2002). Os hormônios sexuais modulam o ganho de peso e o consumo de alimentos (YONEDA et al.¹⁵⁶, 1998; ECKEL & GEARY²⁶, 2001; WALLEN et al.¹⁵⁰, 2002).

O mecanismo exato da ação do estrógeno na massa corpórea, bem como na distribuição do tecido adiposo no organismo, não está completamente elucidado (SHIMIZU et al.¹²⁷, 1997). O estrógeno parece modular a excitabilidade dos neurônios no núcleo ventromedial do hipotálamo, exercendo efeito hipofágico (SHIMIZU et al.¹²⁷, 1997; WALLEN et al.¹⁵⁰, 2002). Butera et al.¹⁰ (1996) demonstraram que o estrógeno age também no núcleo paraventricular do hipotálamo, aumentando os efeitos de um polipeptídeo do intestino relacionado à saciedade, sugerindo assim um mecanismo neural através do qual o estrógeno influencia o comportamento alimentar. Outro possível mecanismo de ação do estrógeno é a regulação da obesidade por ação direta sobre o tecido adiposo. O estrógeno parece regular a expressão do gene *ob* nos adipócitos (YONEDA et al.¹⁵⁶, 1998), dessa forma podendo causar uma diminuição nos níveis de leptina circulante. Esse hormônio, sintetizado principalmente a partir do tecido adiposo tem por função regular a ingestão de alimentos, estando relacionado à redução da massa gordurosa, bem como a normalização dos níveis de glucagon e insulina

(SHIMIZU et al.¹²⁷, 1997; YONEDA et al.¹⁵⁶, 1998; CHEN & HEIMAN¹⁵, 2001).

Após a menopausa foi observado que ocorre uma diminuição no nível de leptina (SHIMIZU et al.¹²⁷, 1997). Geary & Asarian³⁸ (2001) demonstraram a ação do estrógeno sobre o glucagon. Este hormônio, produzido no pâncreas está relacionado à saciedade, e o estrógeno foi capaz de potencializar a ação do glucagon, promovendo maior diminuição da fome em ratas OVX. Dessa forma os autores consideram também esse mecanismo de ação do estrógeno no controle da fome.

No presente estudo, a administração do estrógeno influenciou de maneira significativa o peso das ratas, concordando com a literatura consultada. Foi observado que as ratas que iniciaram a TRH imediatamente à ovariectomia apresentaram menor ganho de peso que as ratas do grupo ovariectomizado controle e as ratas que iniciaram a TRH/E 4 semanas após a OVX. A porcentagem de ganho de massa corpórea nas ratas *sham* operadas equiparou com a das ratas incluídas nos grupos experimentais, independente do período de início da TRH.

A atrofia uterina e o peso do útero têm sido utilizados como parâmetro para confirmar o sucesso da OVX (MOST et al.⁹⁷, 1997; HIDAKA et al.⁵², 2000; HUNZIKER et al.⁵⁶, 2000; NAMKUNG-MATTHAI et al.⁹⁹, 2001; KAWAMOTO et al.⁷⁰, 2002; KOYAMA⁷⁶, 2002; ARSHAD et al.⁴, 2004; DUARTE et al.²³, 2004; TIVESTEN et al.¹⁴⁵, 2004; BURT-PICHAT et al.⁹, 2005). Hughes et al.⁵⁵, em 1996, demonstraram que ratas que sofreram OVX tiveram o peso uterino aproximadamente cinco vezes menor que no grupo *sham*, e dez vezes menor que no grupo em que foi feita reposição hormonal com o 17 β estradiol, duas vezes por semana. Erben et al.²⁹ (2004) demonstraram que baixas doses de estrógeno (1,5 μ g/kg/dia) aplicadas subcutaneamente durante quatro meses, foram suficientes para tornar o peso uterino das ratas OVX semelhantes ao das

ratas *sham*. A TRH/E aumenta o peso uterino quando comparado ao *sham* (ARSHAD et al.⁴, 2004).

No presente trabalho, além da constatação da atrofia uterina, o sucesso da OVX foi confirmado pelo nível de estradiol sérico.

Observou-se que na ausência dos ovários (subgrupos controles) o nível de estradiol foi significativamente menor comparado aos animais que apresentavam os ovários (grupo *sham*). Este dado foi útil para comprovar a eficácia da OVX, uma vez que foi observada diminuição significativa do nível de estradiol plasmático na ratas OVXs. Da mesma forma, esta análise também foi importante para demonstrar que o período de início da TRH/E teve influência na manutenção do nível sérico de estradiol, ou seja, os subgrupos experimentais (OVX – TRH/E) que iniciaram a reposição hormonal até as duas primeiras semanas após a OVX, apresentaram um nível sérico de estradiol estatisticamente maior do que o dos subgrupos controles (OVX – placebo). Os subgrupos experimentais que iniciaram a TRH/E na terceira e quarta semana apresentaram nível de estradiol próximos ao dos subgrupos controles. No entanto, não foi observada diferença significativa entre o grupo *sham* e os subgrupos experimentais, independente do período de início da TRH/E. Estes achados talvez possam ser explicados pela variação normal de estradiol que ocorre normalmente em ratas, de acordo com a fase do ciclo estral (Koyama⁷⁶, 2002).

7 CONCLUSÕES

Diante do proposto e de acordo com o modelo experimental utilizado neste estudo, concluiu-se que:

- a) a depleção do estrógeno, decorrente da OVX, não foi fator agravante na evolução da periodontite induzida por ligadura nos segundos molares da maxila de ratas;
- b) a TRH/E independente do período de início não teve relação com a evolução da periodontite induzida.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ALBANDAR, J.M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontol** 2000, v.29, n.1, p.177-206, Apr. 2002.
- 2 ANBINDER A.L. **Influência da ausência de hormônios ovarianos e dos tratamentos com sinvastatina ou alendronato sódico na condição periodontal de ratas. 2004.** 139f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos,2004.
- 3 ARJMANDI, B.H. et al. Dietary soybean protein prevents bone loss ovariectomized rat model of osteoporosis. **J Nutr**, v.126, n.4, p.161-7, 1996.
- 4 ARSHAD, M. et al. *In vitro* anti-resorptive activity and prevention of ovariectomy: induced osteoporosis in female Sprague-Dawley rats by ormeloxifene, a selective estrogen receptor modulator. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.91, p.67-78, 2004.

* Baseado em:

Associação Brasileira de Normas Técnicas. Rio de Janeiro. **Informação e documentação**: referências, elaboração, NBR6023. Rio de Janeiro, 2002-23p.

- 5 BANDEIRA, F.; CARVALHO, E.F.; THEODÓSIO, C.E. Epidemiologia genética e patogênese da osteoporose. In BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro:Medsi, 2002. 390p. Cap.3, p.31-49.

- 6 BOLLEN, A. M. et al. Number of teeth and residual alveolar ridge height in subjects with a history of self-reported osteoporotic fractures. **Osteoporos Int**, v.15, p.970-4, 2004.

- 12 CAO, T. et al. Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbit mandibles. **J Periodont Res**, v.39, p.37-41, 2004.
- 13 CASSIDY, A. Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens. **Curr Opin Lipidol**, v.10, n.1, p.47-52, Feb. 1999.
- 14 CATE, R. T. **Oral histology**: development, structure and function. 5. ed. St. Louis: Mosby, 1998. p.253-288.
- 15 CHEN, Y.; HEIMAN, M.L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.20, n.2, p.315-22, Feb. 2001.
- 16 CHESNUT, C.H. The relationship between skeletal and oral bone mineral density: an overview. **Ann Periodontol**, v.6, n.1, p.193-6, Dec. 2001.
- 17 CHOW, J. J. H. et al. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. **J Clin Invest**, v.89, p.74-8, Jan. 1992.
- 18 CIVITELLI, R et al. Alveolar and postcranial bone density in postmenopausal women receiving hormone/estrogen replacement therapy: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. **Arch Int Med**, v.162, n.12, p.1409-15, June 2002.

- 19 COLOMBO, C.E.D. **Efeitos do estrógeno e da progesterona na regeneração da glândula parótida após atrofia por ligadura do ducto excretor: estudo histológico e imuno-histoquímico em ratas pós ovariectomia.** 2004. 155f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de odontologia de São José dos Campos, 2004.
- 20 COMPSTON, J.E. Sex steroids and bone. **Physiolog Rev**, v.81, n.1, p.419-47, Jan. 2001.
- 21 CRUMP, T.B. et al. Effects of locally-delivered human macrophage products and estrogen on murine inflammatory bone resorption. **J Periodont Res**, v.37, n.2, p.101-9, 2002.
- 22 DEYHIM, F. et al. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. **Nutrition Res**, v.23, n.1, p.123-30, 2003.
- 23 DUARTE, P.M. et al. Effect of estrogen deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v.39, n.2, p.107-10, Apr. 2004.
- 24 DUBNOV, G.; BRZEZINSKI, A.; BERRY, E.M. Weight control and the management of obesity after menopause: the role of physical activity. **Maturitas**, v.44, n.2, p.89-101, Feb. 2003.
- 25 EARNSHAW, S.A. et al. Tooth counts do not predict bone mineral density in early postmenopausal caucasian women. **Int J Epidemiol**, v.27, n.3, p.479-83, June 1998.

- 26 ECKEL, L. A.; GEARY, N. Estradiol treatment increases feeding-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.281, p.R738-46, Sept. 2001.
- 27 ELDERS, P.J.M. et al. The relation between periodontitis and systemic bone mass in women between 46 and 55 years of age. **J Clin Periodontol**, v.19, p.492-6, 1992.
- 28 ELOVIC, R.P.; HIPPEL, J.A.; HAYES, W.C. Maxillary molar extraction decreases stiffness of the mandible in ovariectomized rats. **J Dent Res**, v.73, n.11, p.1735-41, Nov.1994.
- 29 ERBEN, R.G.; BRUNNER, K.S.; BREIG, B. Long-term sensitivity of uterus and hypothalamus/pituitary axis to 17 β -estradiol is higher than that of bone in rats. **J Bone Miner Res**, v.19, n.11, p.1827-32, 2004.
- 30 ERIKSEN, E.F. et al. Bone remodeling and bone structure. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin:Springer-Verlag, 1993. Cap.2, p.67-109.
- 31 FERRARI, S.L. et al. Interactions of interleukin-6 promoter polymorphisms with dietary and lifestyle factors and their association with bone mass in men and women from the framingham osteoporosis study. **J Bone Miner Res**, v.19, n.4, p.552-9, 2004.

- 32 FLORIAN, M.; FREIMAN, A.; MAGDER, S. Treatment with 17 β -estradiol reduces superoxide production in aorta of ovariectomized rats. **Steroids**, v.69, p.779-87, 2004.
- 33 FOUNTAS, L. et al. Estrogen receptor alpha gene analysis in osteoporosis and familial osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.15, p.948-56, 2004.
- 34 FROLIK, C.A. et al. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. **J Bone**, v.18, n.6, p.621-7, June 1996.
- 35 FROST, H.M.; JEE, W.S.S. On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. **Bone Miner**, v.18, p.227-36, 1992.
- 36 GALLAGHER, C. et al. Management of postmenopausal osteoporosis: position statement of the North American Menopause Society. **J Am Menopause**, v.9, n.2, p. 84-101, Mar. 2002.
- 37 GAMBACCIANI, M.; CIAPONI, M. Postmenopausal osteoporosis management. **Curr Opin Obstetr Gynecol**, v.12, n.3, p.189-97, June 2000.
- 38 GEARY, N.; ASARIAN, L. Estradiol increases glucagon`s satiating potency in ovariectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.281, p.1290-4, Oct. 2001.

- 39 GENANT, H.K. et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization task-force for osteoporosis. **Osteoporos Int**, v.10, n.4, p.259-64, 1999.
- 40 GENG, W.; DEMOSS, D.L.; WRIGHT, G.L. Effect of calcium stress on the skeleton mass of intact and ovariectomized rats. **Life Sci**, v.66, n.24, p.2309-21, 2000.
- 41 GEURS, N.C.; LEWIS, C.E.; JEFFCOAT, M.K. Osteoporosis and periodontal disease progression. **Periodontol 2000**, v.32, p.105-11, 2003.
- 42 GLICKMAN, I.; QUINTARELLI, J. Further observations regarding the effects of ovariectomy upon the tissues of the periodontium. **J Periodontol**, v.31, n.1, p.31-7, Jan. 1960.
- 43 GOLUB, L.M. et al. A chemically modified nonantimicrobial tetracycline (CMT-8) inhibits gingival matrix metalloproteinases, periodontal breakdown, and extra oral bone loss in ovariectomized rats. **Ann New York Acad Sci**, v. 878, p.290-310, June 1999.
- 44 GOSS, P. E. et al. The selective estrogen receptor modulator SCH 57068 prevents bone loss, reduces serum cholesterol and blocks estrogen-induced uterine hypertrophy in ovariectomized rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.92, p.79-87, 2004.
- 45 GOTCHER, J.E.; JEE, W.S.S. The progress of the periodontal syndrome in the rice rat. II. The effects of a diphosphonate on the periodontium. **J Periodont Res**, v.16, n.3, p.441-55, May 1981.

- 46 GRAY, T.K. Estrogens and the skeleton: celular and molecular mechanisms. **J Steroid Biochem**, v.34, n.1-6, p.285-7, 1989.

- 55 HUGHES, D. E. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . **Nat Med**, v.2, n.10, p.1132-6, Oct.1996.
- 56 HUNZIKER, J.; WRONSKI, T.J.; MILLER, S.C. Mandibular bone formation rates in aged ovariectomized rats treated with anti-resorptive agents alone and in combination with intermittent parathyroid hormone. **J Dent Res**, v.79, n.6, p.1431-8, 2000.
- 57 INAGAK, I.K. et al. Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in japanese women. **J Dent Res**, v. 80, n.9, p.1818-22, 2001.
- 58 JAHANGIRI, L.; KIM, A.; NISHIMURA, I. Effect of ovariectomy on the residual ridge remodeling. **J Prosthet Dent**, v.77, n.4, p.435-43, Apr.1997.
- 59 JÄRVINEN, T.L.N.; KANNUS, P.; SIEVÄNEN, H. Estrogen and bone: a reproductive and locomotive perspective. **J Bone Miner Res**, v.18, n.11, p.1921-31, 2003.
- 60 JEFFCOAT, M. K. Osteoporosis: a possible modifying factor in oral bone loss. **Ann Periodontol**, v.3, n.1, p.312-26, July 1998.
- 61 JEFFCOAT, M.K.; CHESNUT, C.H. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. **J Am Dent Assoc**, v.124, p. 49-56, Nov. 1993.
- 62 JEFFCOAT, M.K. et al. Post-menopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. **Periodontol 2000**, v.23, p.94-102, 2000.

- 63 JIANG, Y. et al. Long term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen deprived/-replaced rats. **J Bone Miner Res**, v.12, n.5, p.820-31, May 1997.
- 64 JOHNSON, R.B. et al. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. **J Periodontol**, v.68, n.9, p.864-71, Sept. 1997.
- 65 JUNQUEIRA, J. C. et al. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. **J Oral Sci**, v.44, n.3/4, p.117-24, 2002.
- 66 KALU, D.N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Mineral**, v.15, n.3, p.175-91, 1991.
- 67 KALU, D. N. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinol**, v.124, n.1, p.7-16, 1989.
- 68 KANIS, J. A. Estrogens, the menopause, and osteoporosis. **Bone**, v.19, n.5, suppl., p.185s-90s, Nov. 1996.
- 69 KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Panamericana, 1999.
- 70 KAWAMOTO, S. et al. Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. **Arch Oral Biol**, v.47, n.1, p.67-73, 2002.

- 71 KINANE, D.F.; BERGLUNDH, T.; LINDHE, J. Interações entre parasita e hospedeiro na doença periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara koogan, 2005. Cap.5. p.148-75.
- 72 KLAUSEN, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v.62, n.1, p.59-73, Jan. 1991.
- 73 KLAUSEN, B.; EVANS, R.T.; SFINTESCU,C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. **Scand J Dent Res**, v.97, n.6, p.494-9, Dec. 1989.
- 74 KLEMETTI, E. et al. Mineral status of skeleton and advanced periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v.21, n.2, p.184-8, Mar. 1994.
- 75 KNUT, A. S. Discussion: animal models in reconstuctive therapy. **J Periodontol**, v.65, p.1169-72, 1994.
- 76 KOYAMA, C.A. 2002. 15f. Relatório PIBIC (Iniciação Científica) – Setor Endocrinologia experimental, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de São Paulo-EMP. São Paulo. 2002.
- 77 KRALL, E.A. et al. Postmenopausal estrogen replacement and tooth retention. **Am J Med**, v.102, p.536-42, June 1997.

- 78 KRALL, E.A. The oral effects of osteoporosis. **Nutr Clin Care**, v.4, n.1, p.22-7, Jan./Feb. 2001.
- 79 KREJCI, C.B.; BISSADA, N.F. Women's health issues and their relationship to periodontitis. **J Am Dent Assoc**, v.133, n.3, p.323-9, Mar. 2002.
- 80 KRIBBS, P.J. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. **J Prosthet Dent**, v.63, n.2, p.218-22, Feb.1990.
- 81 KRIBBS, P.J. et al. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. **J Prosthet Dent**, v.62, n.6, p.703-7, Dec. 1989.
- 82 KUHR, A. et al. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v.39, n.2, p.101-6, Apr. 2004.
- 83 KUIPER, G.G.J. M. et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . **Endocrinol**, v.138, n.3, p.863-70, 1997.
- 84 KURODA, S. et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. **Oral Dis**, v.9, n.1, p.24-8, Jan. 2003.

- 85 LANE, N. E. et al. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat *in vivo*. **J Bone Miner Res**, v.13, n.2, p.229-36, Feb. 1998.
- 86 LASCALA, N.T.; MOUSSALLI, N.H. **Compêndio terapêutico periodontal**. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. 539p.
- 87 LISTGARTEN, M.A. Similarity of epithelial relationships in the gingiva of rat and man. **J Periodontol**, v.46, n.11, p.677-80, Nov. 1975.
- 88 LOCKER, D.; SLADE, G.D.; MURRAY, H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. **Periodontol 2000**, v.16, p.16-33, Feb. 1998.
- 89 LOZA, J.C.; CARPIO, L.C.; DZIAK, R. Osteoporosis and its relationship to oral bone loss. **Curr Opin Periodontol**, v. 3, p.27-33, 1996.
- 90 MARQUES, K.P. **Avaliação das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas**.1998, 120f. Dissertação (Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Bauru, 1998.
- 91 MATTSON, J.S.; CERUTIS, D.R.; PARRISH, C.P. Osteoporosis: a review and its dental implication. **Compend Contin Educ Dent**, v.23, n.11, p.1001-14, Nov. 2002.

- 92 MODESTO FILHO, J.; AZEVEDO, L.A.P.; AZEVEDO, L.C.P. Tratamento da osteoporose. **J Bras Med**, v.71, n.5-6, p.77-9, nov./dez. 1996.
- 93 MOHAMMAD, A. R. et al. The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. **Int J Prosthodont**, v.9, n.5, p.479-83, Sep./Oct. 1996.
- 94 MOHAMMAD, A. R. et al. Spinal bone density and tooth loss in a cohort of postmenopausal women. **Int J Prosthodont**, v.10, n.4, p.381-5, July/Aug. 1997.
- 95 MOHAMMAD, A.R. et al. An investigation of the relationship between systemic bone density and clinical periodontal status in post menopausal asian american women. **Int Dent J**, v.53, n.3, p.121-5, 2003.
- 96 MORIYA, Y.; ITO, K.; MURAI, S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. **J Oral Sci**, v.40, n.4, p.171-5, 1998.
- 97 MOST, W. et al. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. **Bone**, v. 20, n.1, p.27-30, Jan. 1997.
- 98 MUNDY, G.R. Hormonal factors which regulate bone. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.235-38.

- 99 NAMKUNG-MATTHAI, H. et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, v.28, n.1, p.80-86, Jan. 2001.
- 100 NEVITT, M. C. Epidemiology of osteoporosis. **Rheum Dis Clin North Am**, v.20, n.3, p.535-59, Aug. 1994.
- 101 NIELSEN, T. F. et al. Pulsed estrogen therapy in prevention of postmenopausal osteoporosis A 2-year randomized, double blind, placebo-controlled study. **Osteoporos Int**, v.15, p.168-74, 2004.
- 102 NORDERYD, O. M. et al. Periodontal status of women taking postmenopausal estrogen supplementation. **J Periodontol**, v.64, n.10, p.957-62, Oct. 1993.
- 103 NYMAN, S.; LINDHE, J. Exame de pacientes com doença periodontal. In : LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4.ed. Rio de Janeiro:Guanabara koogan, 2005. Cap.18, p. 391-400.
- 104 OATES, T.W.; GRAVES, D.T.; COCHRAN, D.L. Clinical, radiographic and biochemical assessment of IL-1/TNF-[alpha] antagonist inhibition of bone loss in experimental periodontitis. **J Clin Periodontol**, v.29, n.2, p.137-43, Feb.2002.
- 105 OHTA, H. et al. Bone resorption versus estrogen loss following oophorectomy and menopause. **Maturitas**, v.43, n.1, p.27-33, Sept. 2002.
- 106 OMI, N.; EZAWA, I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. **Bone**, v.17, n.4, suppl., p.163s-168s, Oct. 1995.

- 107 PAGANINI–HILL, A. The benefits of estrogen replacement therapy on oral health: the leisure world cohort. **Obstet Gynecol Surv**, v.51, n.7, p. 425-7, July 1996.
- 108 PAYNE, J.B. et al. Gingival crevicular fluid IL-8: correlation with local IL- 1 β levels and patient estrogen status. **J Periodont Res**, v.28, n.6, p.451-3, Nov.1993.
- 109 PAYNE, J. B. et al. The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. **J Periodontol**, v.68, n.1, p.24-31, Jan. 1997.
- 110 PAYNE, J.B. et al. Longitudinal alveolar bone loss in postmenopausal osteoporotic/osteopenic women. **Osteoporos Int**, v.10, n.1, p.34-40, 1999.
- 111 PILGRAM, T.K. et al. Relationships between longitudinal changes in radiographic alveolar bone height and probing depth measurements: data from postmenopausal women. **J Periodontol**, v.70, n.8, p.829-33, Aug. 1999.
- 112 QI, M. C. et al. Oestrogen replacement therapy promotes bone healing around dental implants in osteoporotic rats. **J Oral Maxillofac Surg**, v.33, p.279-85, 2004.
- 113 RAISZ, L.G.; SHOUKRI, K.C. Pathogenesis of osteoporosis. In: MUNDY, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.298-330.

- 114 REDDY, M. Osteoporosis and periodontitis: discussion, conclusions, and recommendations. **Ann Periodontol**, v. 6, n.1, p.214-17, Dec. 2001.
- 115 REINHARDT, R.A. et al. Gingival fluid IL - 1 β and IL – 6 levels in menopause. **J Clin Periodontol**, v.21, p.22-5, 1994.
- 116 REINHARDT, R.A. et al. Gingival fluid IL-1 β in postmenopausal females on supportive periodontal therapy: a longitudinal 2 year study. **J Clin Periodontol**, v.25, n.12, p.1029-35, Dec.1998.
- 117 REINHARDT, R.A. et al. Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. **J Periodontol**, v.70, n.8, p.823-8, Aug. 1999.
- 118 REIS, L.M. **Influência do gel de EDTA a 24% no tratamento da doença peridontal induzida em ratos: análise histológica.** 2002, 121f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2002.
- 119 RICARDO, L.H. **Estudo comparativo da utilização local de tetraciclina, minociclina e ácido cítrico como coadjuvantes a instrumentação periodontal: análise histológica em ratos.** 2002, 160f. Tese (Doutorado em Odontologia, Área de Concentração em Biopatologia Bucal)- Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2002.

- 120 RONDEROS, M. et al. Associations of periodontal disease with femoral bone mineral density and estrogen replacement therapy: cross-sectional evaluation of US adults from NHANES III. **J Clin Periodontol**, v.27, n.10, p.778-86, Oct. 2000.
- 121 RORIES, C.; SPELSBERG, T.C. Ovarian steroid action on gene expression: mechanisms and models. **Annu Ver Physiol**, v.51, p.653-81, 1989.
- 122 RUGGIERO, R. J.; LIKIS, F.E. Estrogen: physiology, pharmacology and formulations for replacement therapy. **J Midwifery Women's Health**, v.47, n.3, May/June 2002.
- 123 RUIZ, M.M. Disponível em <http://www.miranet.com.br/medicina/ortopedia.htm>. Acesso em: 24 nov.2002.
- 124 SCARLETT-FERGUSON, H. Osteoporosis: the future looks solid. **Drug Market Development**, v. 13, n.7, p.209-13, July 2002. Disponível em <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>. Acesso em: 14 out. 2002.
- 125 SCHOUR, I.; MASSLER, M.; The teeth. In: GRIFFITH, J.Q.; FARRIS, E. J. **The rat in laboratory investigation**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. p.235-38.
- 126 SEKO, K. et al. Effects of ovariectomy and estrogen replacement on rat oral mucosa. **Maturitas**, v.50, p.44-51, 2005.
- 127 SHIMIZU, H. et al. Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. **J Endocrinol**, v.154, n.2, p.285-92, Aug. 1997.

- 128 SHOHAM, Z. SHACHTER, M. Estrogen biosynthesis-regulation, action, remote effects and value of monitoring in ovarian stimulation cycles. **Fertil Steril**, v.65, n.4, p.687-701, Apr. 1996. Disponível em <http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>. Acesso em: 4 fev. 2003.
- 129 SHOJI, K.; HORIUCHI, H.; SHINODA, H. Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v.30, p.277-84, 1995.
- 130 SILVA, L.K. Avaliação tecnológica em saúde: densitometria óssea e terapêuticas alternativas na osteoporose pós-menopausa. **Cad Saúde Pública**, v.19, n.4, p.987-1003, jul/ago. 2003.
- 131 SILVEIRA, V.A.S. **Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal com estrógeno e da associação de ambos na reparação de defeitos ósseos em ratas ovariectomizadas**. 2004, 140f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal)-Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2004.
- 132 SIMS, N.A. et al. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. **Bone**, v.19, n.5, p.455-61, Nov. 1996.
- 133 SOMJEN, D. et al. Estrogenic activity of glabridin and glabrene from licorice roots on human osteoblasts and prepubertal rat skeletal tissues. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.91, p.241-6, 2004.

- 134 SPALDING, M. et al. Effect of estrogen on the trabecular bone in rats. **J Dent Res**, v.84, Sp. Iss. A, 2005.
- 135 SRIVASTAVA, S. et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down regulating receptor activator of NF kB ligand (RANKL) induced JNK activation. **J Biol Chemistry**, v.276, n.12, p.8836-40, Mar.2001.
- 136 STEEVE, K. T. et al. IL -6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine Growth Factor Rev**, v.15, p.49-60, 2004.
- 137 TAGUCHI, A. et al. Relationship between bone mineral density and tooth loss in elderly japanese women. **Dentomaxillofac Radiol**, v.28, n.4, p.219-23, July 1999.
- 138 TANAKA, M. et al. Changes of cancellous bone mass in rat mandibular condyle following ovariectomy. **Bone**, v.25, n.3, p.339-47, Sept. 1999.
- 139 TANAKA, S. et al. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **Anatom Rec**, v.262, n.2, p.203-12, 2001.
- 140 TANAKA, M. et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. **J Periodont Res**, v.37, n.2, p.161-5, Apr. 2002.
- 141 TANAKA, M.. et al. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.95, n.4, p.495-502, Apr. 2003.

- 142 TEÓFILO, J.M. et al. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. **Pesq Odontol Bras**, v.17, n.4, p.302-6, Oct./Dec.2003.
- 143 TEZAL, M. et al. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. **J Periodontol**, v.71, n.9, p.1492-8, Sept. 2000.
- 144 TILAKARATNE, A.; SOORY, M. Androgen metabolism in response to oestradiol 17β and progesterone in human gingival fibroblasts (HCF) in culture. **J Clin Periodontol**, v.26, n.11, p.723-31, Nov. 1999.
- 145 TIVESTEN, A. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v.19, n.11, p.1833-9, 2004.
- 146 TURNER, R.T.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. **Endocr Rev**, v.15, n.3, p.275-300, 1994.
- 147 VEGETO, E. et al. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17β -estradiol in macrophage cells. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.91, p.59-66, 2004.
- 148 WACTAWSKI-WENDE, J. et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. **J Periodontol**, v.67, n.10, p.1076-84, 1996.

- 149 WACTAWSKI-WENDE, J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. **Ann Periodontol**, v.6, n.1, p.197-208, Dec. 2001.
- 150 WALLEN, W.J.; BELANGER, M.P.; WITTNICH, C. Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. **J Nutr**, v.132, n.8, p.2246-50, Aug. 2002.
- 151 WASSMANN, S. et al. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. **Circulation**, v.103, p.435-54, 2001.
- 152 WEINBERG, M.A.; BRAL, M. Laboratory animal models in periodontology. **J Clin Periodontol**, v.26, n.6, p.335-40, June 1999.
- 153 WIMALAWANSA, S. J. et al. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy: induced bone loss. **Bone**, v.18, n.4, p.301-4, 1996.
- 154 WRONSKI, T.J.; CINTRÓN, M.; DANN, L.M. Temporal relationship between bone loss increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif Tissue Int**, v.43, p.179-83, 1988.
- 155 YANG, J.; PHAM, S.M.; CRABBE, D.L. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. **Dentomaxillofac Radiol**, v.32, n.4, p.247-51, July 2003.
- 156 YONEDA, N. et al. The influence of ovariectomy on ob gene expression in rats. **Horm Metab Res**, v.30, n.5, p.263-5, May 1998.

- 157 ZEEMAN, G.G.; VETH, E.O.; DENNISON, D.K. Focus on primary care: periodontal disease: implications for women's health. **Obstet Gynecol Surv**, v.56, n.1, p.43-9, Jan. 2001.

SPALDING, M. **Effect of different periods of estrogen replacement therapy onset on the progression of experimental periodontitis in ovariectomized rats.** 2005.145f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of different periods of estrogen replacement therapy onset on the progression of experimental periodontitis in ovariectomized rats. Sixty five female Wistar rats were ovariectomized and divided into two groups, experimental and control that received 17 β estradiol or vehicle, respectively. Each group was subdivided into five subgroups that started the treatment immediately, one, two, three and four weeks after the ovariectomy. Another eight rats underwent sham surgery. A month after ovariectomy or sham surgeries, a cotton ligature was placed around the maxillary second molars. Thirty five days after ligature placement, the animals were killed. It was analyzed the macroscopic, radiographic, microscopic and histometric aspects of the periodontal area. The results indicated that estrogen-deficient state may not have a direct effect on the alveolar bone adjacent to the maxillary second molar roots. Under the conditions of this experiment, estrogen replacement therapy did not delay the progression of induced periodontitis.

KEYWORDS: *Estradiol; periodontal diseases; ovariectomy; osteoporosis, rats.*

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos, desde que referenciada a fonte.

São José dos Campos, 25 de julho de 2005