

SUSANA UNGARO AMADEI

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA
NA PERDA ÓSSEA RESULTANTE DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL 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

SUSANA UNGARO AMADEI

**EFEITO DE DIFERENTES TEMPOS DE DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA
NA PERDA ÓSSEA RESULTANTE DA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL 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: Prof. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

São José dos Campos

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Amadei SU. Efeito de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite experimental em ratas. [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2007.

Banca examinadora

1) Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

2) Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

3) Prof. Dr. Nelson Luís de Macedo

Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP

4) Profa. Dra. Daniela Martins de Souza

Faculdade de Pindamonhangaba

5) Prof. Dr. Alexandre Prado Sherma

Instituto de Biociências

Universidade de Taubaté

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **José Carlos Amadei** e **Vani Ungaro Amadei**, meus eternos incentivadores, muito obrigada pelo amor incondicional e pela participação na realização de mais um sonho. Obrigada por sempre estarem ao meu lado. Tenho muita admiração e orgulho de tê-los como pais.

As minhas queridas irmãs **Bia** e **Lolo**, minhas melhores amigas, muito obrigada pelo imenso carinho e amizade. Sinto muita saudade de vocês ao meu lado. Amo vocês queridas!

Ao meu querido noivo **Jason**, agradeço muito pela compreensão e apoio em todos os momentos da minha vida, sempre me ajudando e incentivando. Sua paciência e seu companheirismo têm sido fundamentais na minha vida. Obrigada por ter estado sempre comigo, sendo tolerante e compreensivo nas horas de minha ausência.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha querida orientadora e grande amiga **Rosilene Fernandes da Rocha**, agradeço imensamente a orientação precisa, dedicação constante e a confiança em mim depositada. Seu carinho, competência, experiência e empenho foram fundamentais para concretização deste trabalho. Muito obrigada pela agradável convivência e valiosa e inestimável amizade. Saiba que foi a grande responsável pela minha formação e meu crescimento, não só profissional como também pessoal. Espero ter correspondido todo seu carinho, experiência e competência. Meus eternos agradecimentos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

As amigas para todas as horas **Adriana, Andresa, Carol, Elaine, Gisele, Luana, Renata e Vanessa**, agradeço muito pelos momentos felizes que passamos juntas. Muito obrigada meninas!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do Diretor da F.O.S.J.C **Prof^o Adj. Paulo Vilela Santos Júnior** pela oportunidade concedida.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o curso de Doutorado.

A **Prof^a Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, pela ajuda na leitura e interpretação dos cortes histológicos e pelas valiosas sugestões. Sua paciência e competência são exemplos para mim. Muito obrigada pelo carinho e atenção incondicionais.

A **Prof^a Adj. Yasmin Rodarte Carvalho** pelo carinho e amizade que sempre me transmitiu. Te admiro muito!

Ao **Prof^o Adj. Luiz Blumer Rosa** por estar presente e ter participado todos estes anos do meu curso de Pós-Graduação.

Ao **Prof^o. Dr. Nelson Macedo** pelos ensinamentos transmitidos e pela agradável convivência.

Aos tios **Tarcísio** e **Dora** pela maneira carinhosa que sempre me trataram.

A querida amiga **Marianne Spalding** pela valiosa amizade de todos estes anos. Muito obrigada pela oportunidade concedida!

A todos os colegas da Pós-Graduação pela convivência e pela troca de experiências em todos estes anos que passamos juntos.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Érika, Daniele, Luciano, Thales e Verônica** por terem possibilitado a execução de todas as etapas deste trabalho.

À **Daniela Martins de Souza** pelas sugestões e colaboração na análise estatística e **Juliana Madureira** pelo agradável convívio e pela divisão da orientadora.

À **Ângela de Brito Bellini**, Diretora dos Serviços de Biblioteca e Documentação, pelo auxílio na revisão das normas de apresentação deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacobs** e **Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela imensa colaboração durante a fase experimental deste trabalho e ao **Valter Cruz** e **Silvia Scarpel** pela disponibilidade e ajuda.

A todos os funcionários do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, obrigada pela convivência.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Remodelação óssea.....	13
2.2 Osteoporose.....	17
2.3 Estrógeno e seu mecanismo de ação no tecido ósseo.....	20
2.4 Modelo experimental de perda óssea em ratas.....	23
2.5 Doença periodontal.....	25
2.6 Osteoporose e perda óssea alveolar.....	29
3 PROPOSIÇÃO.....	37
4. MATERIAL E MÉTODO.....	38
4.1 Seleção da amostra e delineamento dos grupos experimentais.....	38
4.2 Método.....	39
4.2.1 Procedimentos cirúrgicos de ovariectomia e falsa ovariectomia.....	39
4.2.2 Indução da periodontite.....	42
4.3. Sacrifício.....	44
4.4 Análise das alterações sistêmicas.....	44
4.4.1 Peso corporal dos animais.....	44
4.5. Análise das alterações periodontais.....	45
4.5.1 Análise radiográfica do suporte ósseo remanescente.....	45
4.5.2 Morfometria da perda óssea alveolar vestibular.....	46

4.5.3 Análise histológica e histométrica.....	48
4.5.4 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Peso corporal das ratas.....	50
5.2 Análise do suporte ósseo periodontal (SOP).....	51
5.3 Morfometria da perda óssea alveolar vestibular.....	53
5.4 Histometria da perda óssea alveolar em região de furca.....	55
5.5 Análise histológica descritiva.....	57
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÃO.....	76
8 REFERÊNCIAS.....	77
Anexo.....	86
<i>ABSTRACT</i>	89

AMADEI SU. Efeito de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite experimental em ratas. [Tese]. São José dos Campos. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite induzida em ratas. Foram utilizadas 80 ratas, divididas em dois grupos: ovariectomizado-OVZ (n=40) e cirurgia simulada SHAM (n=40) e subdivididas de acordo com o tempo de deficiência estrogênica (30, 60, 90 e 120 dias). Os animais foram submetidos à indução de periodontite com fio de algodão na cervical do primeiro molar inferior esquerdo e segundo molar superior direito. Tal ligadura foi mantida nos últimos 30 dias de experimento. Após o sacrifício, as mandíbulas e maxilas foram removidas para análises radiográfica, morfométrica e histométrica. Nos grupos com e sem ligadura, foram considerados variáveis o tempo e a deficiência estrogênica, aplicando-se ANOVA e teste Tukey (5%). A comparação intragrupo demonstrou que a ligadura induziu periodontite em todas as análises. Na análise radiográfica, com ou sem ligadura observou-se influência da deficiência hormonal na redução do suporte ósseo periodontal em todos os períodos, sendo os valores nos grupos OVZ inferiores aos SHAM. O fator tempo foi significativo ao analisarem-se os grupos com ligadura, sendo o período de 90 dias o que apresentou menor valor. Comparando-se os grupos sem ligadura nas análises morfométricas e histométricas, os efeitos da deficiência estrogênica e do tempo não foram significativos. Entretanto, entre os grupos com ligadura, aqueles de 90 dias apresentaram significativa perda óssea. Concluiu-se que a deficiência estrogênica, aos noventa dias, agravou a perda óssea resultante da periodontite em ratas.

PALAVRAS-CHAVES: Ovariectomia, osteoporose, doenças periodontais, perda óssea alveolar, deficiência estrogênica.

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.



AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 20 de junho de 2007.

Assinatura:

E-mail: susana@fosjc.unesp.br

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que haverá um aumento na expectativa de vida, associado com mudanças no estilo de vida, guiando para epidemias globais de doenças crônico-degenerativas, destacando-se como fator limitante de sua qualidade. Dentre estas, a osteoporose, com sua elevada frequência, é relatada como doença silenciosa e crônica que afeta milhões de pessoas no mundo reduzindo acentuadamente a qualidade de vida e é considerada um importante problema de saúde pública em função do seu impacto epidemiológico e econômico.

A população idosa no Brasil, considerando-se a faixa etária de indivíduos com mais de 65 anos, compõe o segmento que mais cresce em termos proporcionais. Com o enfoque referente ao crescimento populacional do idoso, começaram a surgir estudos avaliando a possível relação da osteoporose com a perda óssea bucal e dentária. Com o aumento da longevidade as pessoas anseiam viver de maneira mais saudável e com qualidade de vida, inclusive mantendo boa saúde bucal. Saúde bucal precária pode constituir um fator indesejável, capaz de causar um decréscimo no bem estar geral. Sendo assim, os idosos almejam menor probabilidade de perda dentária, procurando manter seus dentes por mais tempo na boca, em relação aqueles que viveram décadas atrás.

Osteoporose e doença periodontal são doenças muito prevalentes e comuns em mulheres após cinquenta anos de idade.

Ambas são importantes problemas de saúde pública a serem tratados: têm múltiplas causas, envolvem perda óssea e dentária, causam efeitos deletérios em milhões de mulheres, apresentam alto custo de tratamento e incidência aumentada com o passar da idade. A osteoporose é uma doença caracterizada pela baixa massa óssea acarretando fragilidade com conseqüente aumento do risco de fraturas. Já a periodontite é caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte dentário, resultando tanto na reabsorção do osso alveolar quanto na perda de inserção de tecido conjuntivo, sendo a maior causa de edentulismo em adultos.

Mulheres que estão na menopausa experimentam mudanças em sua estrutura óssea e estudos sugeriram que a deficiência estrogênica poderia colocar as mulheres em risco para a doença periodontal. Grande atenção é dispensada à osteoporose feminina por afetar aproximadamente um terço da população após a menopausa, e por se constituir na desordem osteometabólica mais prevalente nos países desenvolvidos.

Apesar da dedicação incessante dos pesquisadores no estudo da osteoporose, muito ainda necessita ser elucidado. A deficiência dos esteróides sexuais, principalmente a estrogênica, é considerada a principal causa de osteoporose, embora existam inúmeros outros fatores envolvidos. Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho que avaliasse a relação do tempo de deficiência estrogênica com a perda óssea decorrente de doença periodontal em ratas. Justifica-se assim a realização deste estudo, o que poderia fornecer informações relevantes e aplicáveis tanto em trabalhos experimentais quanto na realidade clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

O tecido ósseo é um tecido metabolicamente ativo, que constitui cerca de 15 a 20% do peso corporal, sendo continuamente remodelado durante a vida adulta por um equilíbrio dinâmico entre osteoblastos e osteoclastos^{17,47}. Desquilíbrio nesse processo ocorrem em algumas doenças comuns que afetam os seres humanos, tal como a osteoporose³⁰.

O esqueleto contém 99% do cálcio do organismo, funcionando como uma reserva desse íon, cuja concentração no sangue deve ser mantida constante para o funcionamento normal do organismo, havendo, portanto, um intercâmbio contínuo entre o cálcio do plasma sangüíneo e o dos ossos. O cálcio absorvido da alimentação, que faria aumentar a concentração sangüínea deste íon, é depositado rapidamente no tecido ósseo e, inversamente, o cálcio dos ossos é mobilizado quando diminui sua concentração no sangue. A concentração de cálcio no sangue deve ser mantida constante e a carência alimentar desse mineral causa descalcificação dos ossos, predispondo ao risco de fraturas³⁷.

Na fisiologia das doenças ósseas, tem papel fundamental o pico de massa óssea alcançado até o final da segunda década de vida. É este pico, associado à velocidade de perda óssea, que vai determinar a massa óssea encontrada em cada idade. Diversos fatores influenciam a

obtenção do pico ósseo, podendo levar a formação de um baixo pico e predispondo o indivíduo à osteoporose. Dentre estes fatores destacam-se os genéticos, raciais, dieta alimentar e atividade física¹⁵.

A remodelação óssea caracteriza-se por um processo cíclico e contínuo de atividade óssea, tendo como finalidade fundamental a manutenção de sua microestrutura óssea garantindo constante adaptação às exigências mecânicas e funcionais do esqueleto. Este evento inicia-se pela atividade de reabsorção dos osteoclastos e estende-se pela atividade formadora dos osteoblastos⁶.

As circunstâncias que iniciam a proliferação e a atividade dos osteoclastos, elemento inicial no processo de remodelação óssea, não são bem conhecidas e diferem nos vários tipos de ossos e nas diferentes regiões do esqueleto. A relação entre volume ósseo e superfície metabolicamente ativa é um dos fatores que define a atividade metabólica. Sendo assim, a perda absoluta de massa óssea é diretamente proporcional à relação superfície / volume. Por este motivo, para um mesmo grau de remodelação e mesma frequência de ativação das unidades de remodelação, a perda é cinco vezes maior no osso trabecular do que no cortical. Embora os ossos cortical e trabecular constituam variedades de ossos com funções diferentes, sendo o cortical fundamentalmente mecânico e o trabecular metabólico, os processos de remodelação têm a mesma seqüência em ambos⁶.

No processo de remodelação óssea, existem várias substâncias que atuam tanto na formação quanto na reabsorção, dentre estas as citocinas. Essas são substâncias produzidas por várias células e agem próximo ao local onde foram secretadas. Elas regulam muitas atividades celulares incluindo: proliferação de vários tipos de células, agindo tanto estimulando quanto inibindo a mitogênese; auxiliam a migração e a diferenciação celular, síntese protéica e a atividade

secretora. A ligação das citocinas a receptores específicos na célula, ativa pequenas moléculas reguladoras, denominadas de mensageiros secundários, que emitem sinais para o núcleo, no qual a expressão de genes específicos é induzida, resultando na divisão ou em outras atividades celulares⁷⁹.

No tecido ósseo, as citocinas podem modificar a remodelação óssea atuando tanto na formação quanto na reabsorção. A reabsorção é iniciada por fatores sistêmicos, entretanto, sua continuidade depende de fatores locais, e as citocinas exercem importante papel como mediadores na fase final desse processo³⁰. Nas doenças ósseas, as citocinas mais estudadas são: fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11) e o fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que agem estimulando a reabsorção. Já o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) e o fator derivado de plaquetas (PDGF) atuam como promotores da formação óssea⁶⁴.

Grandes progressos na compreensão dos mecanismos de formação e reposição do osso ocorreram nos últimos anos, como por exemplo, a descoberta da osteoprotegerina (OPG) e o seu papel na osteoclastogênese, ajudando a entender os mecanismos reguladores de formação e ativação de osteoclastos^{28,83}.

Os osteoblastos apresentam receptores em suas membranas, os quais, quando ativados, produzem um fator de diferenciação dos osteoclastos, conhecido como RANKL. O RANKL reconhece receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) existente na superfície de células precursoras dos osteoclastos, na presença de fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF), e estimula tanto a diferenciação em osteoclastos assim como incrementa a atividade de osteoclastos já maduros^{14,83,87}.

Os osteoclastos são células multinucleadas, formadas a partir da fusão de precursores mononucleares derivadas da linhagem celular dos macrófagos/monócitos. Várias moléculas estão envolvidas na diferenciação dos osteoclastos ou osteoclastogênese: a OPG, RANK e RANKL. A interação RANK-RANKL exerce papel crucial neste processo, estimulando a maturação dos osteoclastos. A OPG, uma proteína expressa por osteoblastos, células estromais da medula e outros tipos celulares, inibe a formação e atividade dos osteoclastos se ligando ao RANKL e impedindo sua ligação com o RANK¹¹.

Na remodelação óssea, a interação entre o RANKL e seu receptor nos osteoclastos é controlada pela OPG, também conhecida como fator inibidor de osteoclastogênese. Esta é uma proteína semelhante aos membros da família do fator de necrose tumoral (TNF) que inibe a ligação do RANK ao RANKL, impedindo assim, o recrutamento, proliferação e ativação dos osteoclastos, tendo efeito inibitório sobre as células precursoras dos osteoclastos. A OPG funciona como um receptor solúvel para RANK, competindo com RANKL. Portanto, o balanço do sistema OPG/RANKL controla a remodelação óssea. Alterações na concentração dessas substâncias induzidas, por exemplo, pela deficiência estrogênica podem levar ao aumento do número e da atividade dos osteoclastos, determinando assim a perda óssea⁸³.

No osso quiescente, citocinas como o IGF e o fator de crescimento transformador β (TGF- β) encontram-se mergulhados na matriz óssea. O ciclo de remodelação óssea inicia-se com o recrutamento de precursores de osteoclastos por essas citocinas que estão quiescentes e são liberadas gradualmente. Durante a reabsorção óssea, células precursoras de osteoclastos, recrutadas por hormônios e citocinas, são ativadas pela ação de osteoblastos para formar osteoclastos multicelulares móveis, que aderem a uma área do osso e a seguir, deslocam-se ao longo da superfície óssea, escavando-a por meio da

secreção de íons hidrogênio (H^+) e enzimas osteolíticas, reabsorvendo-a e liberando as citocinas retidas⁶². Durante a formação óssea, as citocinas liberadas recrutam osteoblastos, que depositam osteóide e as citocinas IGF e TGF- β . A seguir, o osteóide sofre mineralização e as células de revestimento recobrem a área⁶².

Os hormônios sexuais femininos atuam na remodelação óssea por mecanismos não totalmente elucidados. A presença de receptores estrogênicos nos osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras da medula óssea sugere efeito direto desse hormônio sobre o osso. O estrógeno parece inibir indiretamente a reabsorção óssea, ao regular a síntese e a liberação de citocinas, prostaglandinas e de fatores de crescimento. A IL-6 é uma citocina produzida pelos osteoblastos e pelas células da medula óssea, importante no processo catabólico do osso e que tem sua expressão inibida pelo estrógeno, sendo um dos fatores responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea quando da deficiência desse hormônio⁶⁵.

2.2 Osteoporose

A faixa etária da população brasileira vem se alterando desde o início da década de 60, quando a queda das taxas de fecundidade começou a alterar sua estrutura etária, estreitando progressivamente a base da pirâmide populacional. Deste modo, a proporção de idosos em 2050 deverá alcançar 15% da população. Num contexto de importantes desigualdades regionais e sociais, idosos não encontram amparo adequado no sistema público de saúde e previdência, acumulando seqüelas de várias doenças, desenvolvendo incapacidade e perdendo autonomia e qualidade de vida. Diante desse quadro, a

incidência de múltiplas doenças associadas com a idade avançada e de suas conseqüências tende a aumentar¹³.

A osteoporose enquadra-se nesse grupo de doenças. Dentre as osteometabólicas, é a mais freqüente e o seu estudo tem sido especialmente motivado em decorrência das importantes repercussões em relação à morbidade e mortalidade de indivíduos portadores dessa condição, sendo nas últimas décadas amplamente reconhecida como importante problema de saúde pública. Trata-se de uma doença crônico-degenerativa, incapacitante, complexa e multifatorial caracterizada por uma fragilidade generalizada do esqueleto, pela redução da quantidade de osso associada às alterações na microarquitetura óssea, podendo progredir silenciosamente por anos e acarretar baixa qualidade de vida^{15,25, 49,54}.

De acordo com o Censo Demográfico Brasileiro de 2000 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2000) o Brasil apresenta aproximadamente 163 milhões de indivíduos, dos quais 81 milhões constituído por mulheres. Cerca de 12,5 milhões de mulheres encontram-se acima dos cinqüenta anos, com uma expectativa média de vida de 68 anos³². Estima-se que no Brasil, em 2025, a população na faixa etária a partir dos sessenta anos de idade, será de 34 milhões de pessoas, o que equivalerá a 13,8% da população total⁴⁴. No Brasil, a osteoporose atinge 25% a 30% das mulheres brancas durante a pós-menopausa e 40% a 60% dos indivíduos com mais de sessenta anos de idade. Por isso, na tentativa de evitar ou diminuir esse problema tanto para o paciente como para a sociedade, a osteoporose merece enfoque nos programas da saúde atuais⁵⁰.

Com o objetivo de dimensionar a utilização de recursos e custo anual por paciente com osteoporose pós-menopausa no Brasil, Kowalski et al.⁴¹ em pesquisa realizada no do ambulatório de doenças

osteometabólicas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) verificaram que a média de idade dos pacientes foi de 65 anos, com custos para o Sistema Público de R\$908,18/paciente/ano. Os autores concluíram que, em função do envelhecimento da população e aumento da incidência de osteoporose, políticas de alocação racional de recursos baseados em análises econômicas devem ser implementadas.

O diagnóstico de osteoporose atualmente adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é avaliado por meio da absorciometria de dupla emissão de raios X (DEXA). Com este método determina-se o valor da densidade mineral óssea (DMO) na coluna lombar e no colo do fêmur, que são representativos do osso trabecular e cortical respectivamente. O valor da DMO do indivíduo é comparado com o valor médio da DMO de um conjunto de indivíduos jovens do mesmo sexo, com valores no pico de massa óssea. Dessa relação, obtém-se o *T score*, ou seja, o número de desvios-padrão abaixo dos valores do grupo controle jovem. Considera-se que a mulher sofre de osteopenia se o valor do *T* está compreendido entre -1 e -2,5 e de osteoporose se é inferior a -2,5, sendo a massa óssea considerada normal para valores de *T-score* superiores a -1⁵⁴.

A osteopenia ou redução da massa óssea refere-se a um esqueleto com menos tecido ósseo comparado com o normal e, nesta condição, atividade física normal não causa fraturas espontâneas ou dores ósseas, que só ocorrem após quedas ou impactos maiores²². Já a osteoporose, refere-se à doença que combina à osteopenia evidências clínicas do excesso de fragilidade óssea, acarretando fraturas espontâneas ou dores ósseas durante atividades físicas normais^{21e22}.

As fraturas osteoporóticas afetam grande segmento da população e dentre os locais mais freqüentemente acometidos destacam-se a coluna vertebral, a extremidade distal do rádio e a extremidade

proximal do fêmur. Entretanto, a mais severa é a do terço proximal do fêmur, responsável pela maior parte da mortalidade e morbidade, sendo a principal causa de incapacidade na idade avançada¹⁵.

Para evitar os efeitos da osteoporose é preciso avaliar, especialmente antes que qualquer fratura e deformidade ocorram, a densidade óssea em pacientes de alto risco. Dentre os fatores de risco destacam-se: idade avançada (acima dos 65 anos), história familiar de fraturas, terapêutica sistêmica com glicocorticóide (mais de três meses de duração), hiperparatireoidismo primário, osteopenia aparente em raios-X, hipogonadismo e menopausa precoce (antes dos 45 anos de idade)¹².

Fatores de risco menos importantes incluem: artrite reumatóide, terapêutica crônica com anticonvulsivantes e heparina, baixa ingestão de cálcio, fumo, ingestão excessiva de álcool, cafeína e peso abaixo de 57 quilos¹².

2.3 Estrógeno e seu mecanismo de ação no tecido ósseo

Os estrógenos são hormônios da classe dos esteróides sintetizados pelo ovário (principal fonte) e pela placenta e, em pequena quantidade, pelos testículos e córtex da adrenal. A exemplo de outros esteróides, a substância precursora para a síntese dos estrógenos é o colesterol. Eles produzem numerosas ações fisiológicas, incluindo efeitos no crescimento e diferenciação de muitos tecidos, ações neuroendócrinas envolvidas no controle da ovulação, no preparo cíclico para a fertilização e implantação do óvulo e ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídios. Seu uso terapêutico é disseminado, sendo comumente utilizado na reposição hormonal após a menopausa e na anticoncepção^{62,66}.

Os precursores imediatos dos estrógenos consistem em substâncias androgênicas – a androstenediona ou a testosterona. Existem três estrógenos principais nos seres humanos – estradiol (E_2), estrona (E_1) e estriol (E_3), sendo o E_2 o mais potente e o principal estrógeno secretado pelos ovários. A exemplo de outros esteróides, o estrógeno liga-se a receptores intracelulares. As mulheres apresentam dois tipos de receptores para estrógeno (ER) denominados ER alfa (α) e beta (β), com distribuição diferente nos tecidos. A complexidade desta distribuição torna-se importante à medida que os moduladores sintéticos de receptores de estrógeno (SERMs) podem competir tanto com ER α , quanto para com o ER β , exercendo atividade agonista ou antagonista^{62,66}.

Compreende-se como climatério a fase da vida da mulher na qual as gônadas cessam sua função e menopausa o último sangramento cíclico. O período precedente, em que a menstruação se apresenta irregular, é identificado como pré-menopausa e o período subsequente à menopausa, em que dominam as manifestações regressivas, como pós-menopausa. O climatério, comumente, é um processo lento e gradual, caracterizado pela diminuição na secreção de estrógeno pelos ovários, na qual diversos sintomas neste período são manifestados. Entretanto, se o estrógeno for removido de forma mais abrupta, como acontece nas ovariectomias, essas manifestações são mais evidenciadas⁶⁶.

O reconhecimento da osteoporose pós-menopausa como importante problema de saúde pública deu origem a diversos estudos sobre a relação da deficiência estrogênica com o metabolismo ósseo³. A osteoporose pós-menopausa é caracterizada pela perda óssea progressiva com início após a menopausa natural ou cirúrgica, levando à ocorrência de fraturas 15-20 anos após a interrupção da função ovariana. Apesar de um baixo pico de massa óssea e da perda óssea fisiológica

com o avançar da idade serem fatores contribuintes, um aumento na reabsorção hormônio-dependente com acelerada perda óssea nos primeiros 5-10 anos após a menopausa parece ser o fator patogênico determinante para osteoporose pós-menopausa.

Os osteoblastos apresentam receptores para o hormônio estrógeno e com a interação ocorre liberação de mediadores químicos que inibem a atividade osteoclástica. Conforme já mencionado, o sistema constituído pelo RANK/RANKL e OPG desempenha papel fundamental na fisiopatologia da osteoporose¹¹.

O estrógeno se liga aos osteoblastos, induzindo-os a aumentar a produção de osteoprotegerina e suprimir a sua produção de RANKL, impedindo a formação de osteoclastos e mantendo o controle sobre a perda óssea. O declínio de estrógeno na menopausa contribui para a perda óssea, principalmente pela remoção destes fatores importantes na formação e atividade do osteoclasto. Além disso, parece prolongar a vida dos osteoblastos enquanto, simultaneamente, promove a apoptose dos osteoclastos¹¹.

O estrógeno regula, nos osteoblastos, a expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Ele aumenta a diferenciação dos osteoblastos e exerce efeito estimulatório sobre a síntese e mineralização da matriz óssea. Além disso, estimula a apoptose dos osteoclastos e mantém os osteócitos viáveis, havendo na sua deficiência aumento da taxa de apoptose dessas células. A síntese de interleucinas IL-1 β , IL-6, TNF α , PGE-2 e do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), importantes agentes reabsortivos, é inibida pelo estrógeno. Já a síntese de antagonistas dos receptores para IL-1, de proteínas ligantes do IGF e de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) é estimulada pelo estrógeno e

representam importantes mediadores da ação anabólica desse hormônio sobre o tecido ósseo⁶⁴.

2.4 Modelo experimental de perda óssea em ratas

A perda óssea que segue a depleção da função ovariana está associada com aumento nas taxas de reabsorção e de formação óssea, sendo que a primeira excede a segunda, ocorrendo aumento no número de osteoclastos, principalmente no osso trabecular⁴⁶.

Um dos principais mecanismos de indução de osteoporose em animais consiste na excisão cirúrgica bilateral dos ovários (ovariectomia). A ovariectomia em ratas está bem estabelecida na literatura como o protocolo para indução de osteoporose mais prevalente e pertinente, onde a diminuição do nível estrogênico resulta num quadro de osteopenia similar ao desenvolvido na pós-menopausa humana^{22,38}. A utilização de modelos animais no estudo da osteoporose tem sido freqüentemente utilizada nas últimas décadas em inúmeros trabalhos experimentais com o objetivo de avaliar a perda óssea^{2,18,36,74,85}.

No estudo de novos agentes terapêuticos, a experimentação animal é a primeira opção, especialmente quando se desconhecem os riscos a curto e longo prazos. Quando o modelo animal reproduz satisfatoriamente os aspectos da doença, passa a ser a melhor opção para investigação da mesma⁷².

Os roedores são os modelos animais mais utilizados na pesquisa da osteoporose, sendo o rato certamente o mais utilizado⁷². Há numerosas similaridades na estrutura e aspecto histológico dos roedores em relação aos humanos. Um modelo animal de perda óssea precisa ter as características da redução da massa óssea e seqüelas semelhantes a

dos humanos³⁸. Segundo Frost & Jee²², os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea durante o crescimento normal e na vida adulta, assim como na osteoporose, são os mesmos em ratos e humanos. De maneira similar às mulheres após a menopausa, ratas ovariectomizadas apresentam uma alteração na formação e na reabsorção óssea, com velocidade de remodelação aumentada resultando em perda óssea.

O osso do rato, assim como de humanos, não cresce continuamente durante toda sua vida. No rato ocorre um rápido crescimento até seis meses de idade. Observa rápido aumento do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de um a três meses de idade e depois deste período, a razão de crescimento se torna mais gradual. O crescimento torna-se insignificante dos seis aos 12 meses, cessando aos 18³⁸.

O modelo de rata idosa (12 meses) não possui mais crescimento ósseo devido ao estabelecimento da maturidade óssea. Este modelo possui características da perda óssea semelhante a que ocorre na pós-menopausa humana. No entanto, ratas idosas apresentam elevados custos, sua disponibilidade é limitada, longo período decorre antes que se manifestem os efeitos da ovariectomia sobre seus ossos. As características da perda óssea são, geralmente, semelhantes nos modelos de ratas jovens. Em contraste, ratas mais jovens (aproximadamente 3 meses de idade) não são muito caras, são facilmente disponíveis e os efeitos da ovariectomia sobre seus esqueletos se manifestam em um mês ou menos. Nas ratas ovariectomizadas, bem como na maioria dos modelos experimentais de osteoporose, não se observa aparecimento de fraturas, instalando-se, portanto, apenas um quadro de osteopenia^{22,38}.

A cirurgia de ovariectomia em ratas é o modelo mais empregado para simular a osteopenia pós-menopausa, embora outros modelos de osteopenia experimental também sejam utilizados, como indução por uso prolongado de glicocorticóide, deficiência de vitaminas e cálcio, imobilização das patas do animal e envelhecimento³⁸.

A ovariectomia induz em ratas perda óssea, similar a que ocorre em mulheres após a menopausa, sendo, portanto apropriada para avaliar os problemas relativos à perda óssea pós-menopausa. Este modelo apresenta características como: rápido aumento do ritmo de remodelação óssea em que a reabsorção excede a neoformação; fase inicial rápida seguida de uma fase mais lenta; maior perda de osso trabecular comparado com o cortical; diminuição da absorção intestinal de cálcio e ganho de peso³⁸.

Se a ovariectomia nos animais for realizada na idade ideal, os efeitos nos ossos se manifestarão após os primeiros trinta dias. A idade ideal para a realização da ovariectomia é aos três meses de idade, pois neste período as ratas já estão em fase de reprodução, e assim são capazes de responder apropriadamente à deficiência de hormônios sexuais, adquirida como seqüela da ovariectomia³⁸.

2.5 Doença periodontal

O periodonto corresponde aos tecidos que protegem e suportam os dentes, sendo constituído pelo cemento radicular, ligamento periodontal, osso alveolar e gengiva, formando uma unidade biológica e funcional susceptível às alterações fisiológicas ou patológicas^{45,77}.

Os processos inflamatórios e imunológicos que ocorrem nos tecidos periodontais têm como objetivo proteção contra o ataque

microbiano, formando uma barreira para impedir a disseminação ou invasão de microrganismos nos tecidos. Estes processos representam os mecanismos predominantes da gengivite e da periodontite, são visíveis, microscópica e/ou clinicamente, representando a reação do hospedeiro à microbiota do biofilme e seus produtos e em alguns casos podem se tornar prejudiciais, pois são capazes de danificar ou destruir células e estruturas do tecido conjuntivo, além do osso alveolar. Tais reações não são desencadeadas em resposta a uma simples espécie bacteriana, mas a uma infecção bacteriana mista. Ocorre destruição de estruturas de suporte dos dentes, como resultado da ação ineficaz e frustrada do sistema de defesa do hospedeiro em resposta ao acúmulo de biofilme bacteriano⁴⁵. Como resultado da doença periodontal, teremos a perda do osso alveolar, dano às fibras do ligamento periodontal e migração apical do epitélio juncional a partir da junção esmalte-cimento⁴⁵.

A maioria das formas da doença periodontal tem início como inflamação visível na gengiva. Em alguns indivíduos suscetíveis, caso não seja tratada, a inflamação pode propagar-se envolvendo áreas mais profundas do periodonto. Não se compreende, atualmente, porque algumas lesões permanecem localizadas na porção marginal dos tecidos gengivais, enquanto outras progredem envolvendo perda do tecido conjuntivo de inserção e osso alveolar de suporte, sendo os mesmos argumentos verdadeiros para algumas áreas do indivíduo suscetível. Obviamente, algum desequilíbrio da relação hospedeiro-microrganismo está ocorrendo nas lesões destrutivas, o qual pode ser único para aquela área e, em geral, nos indivíduos com suscetibilidade à doença periodontal. Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e gravidade no próprio indivíduo e entre indivíduos diferentes, e as razões para isso são diversas, como o meio ambiente, o hospedeiro e a microbiota bucal⁴⁵.

O biofilme bacteriano desempenha papel fundamental no processo da doença periodontal. O acúmulo do mesmo produz uma variedade de irritantes, como ácidos, endotoxinas e antígenos, os quais com o tempo destroem os dentes e danificam os tecidos de suporte⁴⁵. Embora seu agente etiológico seja o biofilme bacteriano específico, estudos clínicos e laboratoriais têm demonstrado que alguns fatores sistêmicos podem exercer um importante papel na progressão da periodontite²⁶.

Na doença periodontal, um número limitado de espécies bacterianas é pré-requisito para iniciar e levar a progressão da doença. Porém, quem indica a prevalência e o avanço da periodontite é a resposta imunológica individual à agressão microbiana⁶⁰. Dessa maneira, no contexto multifatorial da doença, existe uma complexa interação, incluindo bactérias específicas, mecanismos de defesa e interferência dos fatores comportamentais, ambientais e hereditários^{1,57,60}.

A patogenia da doença é representada por um processo envolvendo vários eventos. O aumento do número de neutrófilos no sulco gengival ocorre quando a condição de saúde é rompida. Caso essas células de defesa não sejam suficientes para controlar a agressão bacteriana, leva à formação da bolsa periodontal, o que favorece a progressão para periodontite. Com o aumento da resposta inflamatória, o infiltrado consiste principalmente de monócitos, macrófagos e linfócitos⁶⁰.

Os macrófagos, sensibilizados por lipopolissacarídeos, produzem IL1 β , TNF- α , metaloproteinase da matriz extracelular (MMP) e PGE2. A IL-1 β e o TNF- α agem diretamente, modulando a proporção da perda óssea ou indiretamente, estimulando fibroblastos a produzir MMP e PGE2. Já a MMP modula a destruição da matriz extracelular da gengiva e do ligamento periodontal e a PGE2 a resposta à destruição óssea

alveolar. A progressão desses eventos é dependente da resposta do hospedeiro frente à agressão microbiana⁶⁰.

Em periodontia, modelos animais têm sido utilizados para compreensão dos mecanismos patogênicos da doença e para avaliar várias modalidades de tratamento⁸⁴. O emprego de modelos animais tem viabilizado a análise de alguns aspectos do periodonto que dificilmente seriam estudados em humanos. O rato é o animal mais comumente utilizado para esse fim pelo fato de apresentar algumas vantagens em relação a outros animais como baixo custo, facilidade de manipulação, capacidade de manutenção em condição livre de microrganismos e possibilidade de desenvolvimento de imunodeficiências⁵⁹.

Estudos longitudinais em humanos apresentam algumas dificuldades como: determinação do nível de atividade, risco e susceptibilidade à progressão da doença e controle de determinadas variáveis de confusão⁸⁴. Sendo assim, modelos animais são empregados para o estudo. Além disso, a similaridade anatômica do periodonto é fundamentalmente importante. Em ratos, os molares apresentam tecido periodontal com estrutura e organização muito semelhantes ao dos humanos. No periodonto do rato são identificados os epitélios gengivais oral, sulcular e juncional, as fibras colágenas do ligamento periodontal, o cemento celular e acelular e osso alveolar. A maior diferença está no epitélio sulcular dos ratos que é queratinizado. No entanto, essa característica não representa razão que coloque o modelo em descrédito⁵⁹.

As estruturas periodontais dos ratos podem ser modificadas de forma patológica, pela indução de doença periodontal, ou pelos processos fisiológicos que continuamente remodelam o osso alveolar com o passar do tempo. Essas alterações podem ser mensuradas pelos métodos radiográfico, histológico e morfométrico.

Essas avaliações são capazes de quantificar as alterações teciduais ocorridas nos animais até o momento de seu sacrifício³⁹.

Souza et al.⁷⁰ avaliaram a característica anatômica do osso alveolar de 30 ratos por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. Após o sacrifício, as mandíbulas e maxilas foram analisadas em lupa estereoscópica para determinação do nível ósseo alveolar nas faces livres e posteriormente, foram radiografadas para mensuração do suporte ósseo periodontal (SOP) junto as proximais distal e mesial. O percentual de SOP não diferiu estatisticamente nem entre as raízes mesial e distal nem entre os arcos. Entretanto, o nível ósseo alveolar apresentou-se menor na raiz distal da mandíbula e na maxila, e maior nas raízes linguais que nas vestibulares. Quando comparada às raízes linguais maxilares com as mandibulares, os valores mandibulares foram estatisticamente superiores. Os autores concluíram que os métodos radiográfico e morfométrico são reproduzíveis e complementares e que a anatomia óssea alveolar dos molares se caracteriza por apresentar níveis ósseos distintos associados à SOP proporcionalmente equivalentes.

Numerosos estudos têm sido realizados para avaliação da doença periodontal induzida em ratos com a utilização de fio de algodão ao redor dos segundos molares superiores^{5,63,71,80} e primeiros molares inferiores^{18,58}.

2.6 Osteoporose e perda óssea alveolar

A doença periodontal é um dos principais problemas da Odontologia, devendo receber atenção na prática clínica diária. Desse modo, o conhecimento obtido em estudos sobre a patogênese das doenças que acometem o sistema estomatognático, torna-se importante contribuição à promoção e a manutenção da saúde bucal e geral. No

campo da Odontologia, a influência do tempo de deficiência estrogênica nos ossos maxilares tem atraído atenção e os estudos sobre esse problema têm aumentado.

Alterações no periodonto têm sido também relacionadas com a osteoporose. Diversos trabalhos encontrados na literatura relatam uma associação positiva entre a doença periodontal e a osteoporose, com diminuição da densidade óssea. Entretanto, essa associação muitas vezes não é encontrada. O verdadeiro papel da osteoporose na etiopatogenia da doença periodontal ainda não está completamente esclarecido. Ambas as doenças são multifatoriais e apresentam inúmeros fatores de risco em comum, como fumo, deficiências nutricionais, idade e disfunção do sistema imune. Assim, a dificuldade de isolamento dos fatores de confusão tem sido uma das principais limitações dos estudos em humanos que correlacionam osteoporose e doença periodontal⁸².

Alguns estudos com animais foram encontrados avaliando o efeito da osteoporose sobre os maxilares^{19,73,74,76}. Os achados mais freqüentes incluem menor densidade óssea mandibular¹⁹; severa reabsorção do rebordo residual⁸¹; maior número de dentes perdidos e alterações na região condilar⁷⁴.

Hildebolt²⁹, em um trabalho de revisão, relata a possível associação entre a osteoporose e a perda óssea oral. O autor afirma que depois dos 50 anos de idade, ocorre um aumento acentuado da porosidade da mandíbula, sendo este aumento maior no osso alveolar do que no corpo mandibular, concomitantemente com um decréscimo na massa óssea sistêmica. Esta perda óssea é mais acentuada nas mulheres, estimada em 1,5% ao ano e menor nos homens (0,9%).

Acredita-se que a deficiência estrogênica cause alterações no osso alveolar que poderiam resultar no agravamento de uma doença

periodontal pré-existente. A doença periodontal, assim como a osteoporose, são doenças crônicas multifatoriais. Sendo assim, não seria surpreendente que ambas as alterações patológicas dividissem fatores de risco em comum como ambientais, genéticos, dietéticos e sistêmicos^{35,42}.

Johnson et al.³⁵ estudaram a relação entre a deficiência estrogênica, inflamação periodontal e perda óssea alveolar utilizando ovelhas ovariectomizadas. Os animais foram sacrificados após três e 12 meses da cirurgia de ovariectomia. Foram realizados testes bioquímicos dos níveis séricos e gengivais de IL1 β , 6 e 8 e avaliação dos exames radiográficos, clínicos e microscópicos. Os autores observaram, após 90 dias da ovariectomia, maiores níveis de IL-6 e maior porcentagem de sítios exibindo profundidade de sulco de 4 a 6 mm ou superior a 6mm nos animais ovariectomizados comparados com o controle, sendo essa diferença gradualmente maior nos grupos sacrificados após um ano, indicando que a doença periodontal foi exarcebada pela deficiência estrogênica.

Kribbs⁴² comparou o osso mandibular de 112 mulheres sendo 85 osteoporóticas e 27 sadias, com idade variando entre cinqüenta e 85 anos, e comparou os achados dentais avaliando quais variáveis melhor distinguem os 2 grupos. A avaliação dentária de cada paciente consistia de um exame intraoral e radiografias periapical, oclusal e panorâmica bem como da massa óssea mandibular, espessura da cortical óssea, número de dentes presentes e condição periodontal. O exame periodontal verificou profundidade de sondagem, recessão gengival e índice de sangramento. Quanto à massa óssea mandibular, o número de dentes e a espessura da cortical, foram encontrados diferenças estatisticamente significantes entre a população osteoporótica e a normal. No entanto, em relação à condição periodontal não foram observadas alterações estatisticamente significativas. O autor concluiu que a

osteoporose ainda que tenha efeito na massa óssea mandibular, parece não ter influência na etiopatogenia da doença periodontal.

Payne et al.⁶¹ com o objetivo de determinar a associação entre a deficiência estrogênica na pós-menopausa e a DMO alveolar, realizaram um estudo longitudinal durante um período de um ano. 24 mulheres foram divididas em dois grupos, sendo um constituído por mulheres que faziam reposição estrogênica (grupo estrogênio suficiente) e o outro que apresentava deficiência estrogênica (grupo estrógeno deficiente). Por meio de exames radiográficos, observou-se diminuição da densidade óssea alveolar relacionada com os baixos níveis estrogênicos. Em contrapartida, as mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal estrogênica apresentaram maior ganho de densidade óssea. Esses dados sugerem que o estrógeno parece influenciar a DMO alveolar.

Elovic et al.¹⁹ realizaram um estudo para determinar se a deficiência estrogênica e a idade avançada afetavam o osso mandibular. Para tanto, utilizaram 41 ratas ovariectomizadas e 41 SHAM, com cento e oitenta dias de idade, divididas em seis grupos de acordo o período de sacrifício (14, 114, 220 dias). Os autores mediram a DMO, por meio da DEXA e as propriedades mecânicas, por meio de teste de força e concluíram que a falta de estrogênio por longo período leva a uma diminuição da DMO e a alterações das propriedades estruturais mandibulares. Esses achados indicam que a ovariectomia contribui para a perda óssea oral e que a idade pode acentuar essa perda.

Tanaka et al.⁷⁴, utilizando microscópio de varredura à laser, avaliaram histomorfometricamente as alterações no cêndilo de ratas OVZ e SHAM com 120 dias de idade nos períodos experimentais de 7, 14, 30 e 60. Foram administradas tetraciclina e calceína anteriormente ao sacrifício. Analisando as regiões subcondral e central dos cêndilos, os

autores observaram que os animais do grupo SHAM (controle), o volume ósseo das duas regiões aumentou com o tempo. Na região subcondral do grupo OVZ, o volume ósseo diminuiu significativamente aos sete dias, porém se recuperou e alcançou mesmo valor que no grupo SHAM aos 14 dias. Na região central do grupo OVZ, o volume ósseo não se alterou em relação ao SHAM, porém, aos 60 dias, revelou-se menor. Dessa maneira, a ovariectomia induziu a uma perda óssea transitória na região subcondral ao passo que o ganho ósseo na região central foi inibido, sugerindo que a carga mecânica modulou a perda óssea em ratas OVZ, o que é observado em outras partes do esqueleto. Diante disso, os autores concluíram que o côndilo mandibular de ratas OVZ alterou dinamicamente sua estrutura sob os efeitos da deficiência estrogênica e da carga oclusal.

Para esclarecer a relação entre deficiência estrogênica e perda dentária, Tanaka et al.⁷³ analisaram morfometricamente alterações na estrutura trabecular no osso alveolar mandibular de ratas OVZ. Para tanto os animais foram divididos em dois grupos: OVZ e SHAM, sendo os animais sacrificados depois de sessenta dias de cirurgia. Os autores avaliaram histomorfometricamente o tecido ósseo da região do septo interradicular do primeiro molar inferior. O volume de osso trabecular bem como o número de trabéculas do grupo OVZ foi significativamente menor que no grupo SHAM. Diante dos resultados, concluíram que a deficiência estrogênica causou uma significativa diminuição na massa óssea no septo interradicular do primeiro molar.

Tanaka et al.⁷⁶ observaram as alterações na estrutura trabecular em mandíbula de ratas OVZ após longo período de deficiência estrogênica. Ratas com seis meses de idade foram ovariectomizadas ou falso ovariectomizadas e sacrificadas após 1 ano. A região do septo interradicular foi avaliada histomorfometricamente utilizando microtomografia computadorizada e microscopia de varredura. Os autores verificaram que ocorreu perda óssea alveolar mandibular nas ratas

ovariectomizadas bem como fragmentação das trabéculas e diminuição do volume, número e espessura das trabéculas em relação ao grupo SHAM. Os autores concluíram, diante das alterações osteoporóticas na região do septo interradicular do primeiro molar, que este fenômeno pode acelerar a perda óssea, especialmente as mulheres menopáusicas. Entretanto, para elucidar os efeitos da deficiência estrogênica na doença periodontal são necessários estudos adicionais usando animais ovariectomizados com doença periodontal.

Moriya et al.⁵¹ verificaram a relação entre osteoporose experimental, induzida por meio de ovariectomia, e a perda óssea alveolar em ratas submetidas com dieta normal ou deficiente em cálcio. Quatro semanas após a ovariectomia, os animais foram sacrificados e a maxila, a mandíbula, o fêmur e a tíbia foram analisados. Exames radiográficos demonstraram que a DMO nos ossos avaliados foi significativamente maior no grupo controle com dieta normal seguido pelo ovariectomizado com dieta normal. Em relação à perda óssea ocorrida entre a junção esmalte-cimento e crista óssea, não houve diferença estatística entre os grupos. Os resultados indicaram que a osteoporose experimental, utilizando-se ovariectomia e dieta osteoporótica, conduz a uma redução da DMO, tanto no esqueleto quanto no osso alveolar de ratas, porém, não induz à perda óssea em altura nos alvéolos. Concluíram, portanto, que a osteoporose isoladamente não correspondeu a um fator fundamentalmente importante na destruição óssea periodontal.

Teófilo et al.⁷⁸ compararam em ratas o efeito de ovariectomia associada ou não à dieta deficiente em cálcio (Ca) para promover osteoporose em maxila e metáfise proximal de tíbia de ratas, nos períodos de cinco e 11 semanas pós-cirurgia. Metade das ratas ovariectomizadas recebeu dieta deficiente em Ca (OVZ*) e as demais (OVZ), assim como as que sofreram falsa cirurgia, receberam dieta normal. Foram coletados o osso maxilar e a metáfise proximal da tíbia

para medidas do peso seco e da cinza óssea utilizada para dosagem de Ca (método colorimétrico). Cinco semanas após a cirurgia, não se observaram alterações no grupo OVZ com dieta normal, enquanto no grupo OVZ com dieta pobre em cálcio houve redução da massa óssea da metáfise proximal (17%) e da maxila (35%). Após 11 semanas, o grupo OVZ com dieta normal apresentou 14% de redução da massa óssea da metáfise proximal, mas não da maxila, enquanto no grupo OVZ com deficiência em cálcio observou-se diminuição de 30% em ambos os segmentos ósseos. A concentração de Ca na cinza não se alterou em nenhuma condição experimental. Os resultados mostraram que apenas a deficiência estrogênica não foi suficiente para provocar osteoporose maxilar em ratas num período de até 11 semanas, embora nesse período já se observa seu efeito deletério na metáfise proximal da tíbia. Quando se associa a ovariectomia à dieta deficiente em Ca, observa-se diminuição da massa óssea após cinco semanas, duas vezes maior na maxila do que na metáfise proximal da tíbia. Os autores concluíram que o modelo animal ovariectomizado com baixas dosagens de cálcio é um protocolo efetivo para obtenção de osteoporose maxilar.

Com o objetivo de padronizar a metodologia com relação à idade do animal e tempo experimental de atuação da deficiência estrogênica induzida em ratas, Marques⁴⁸ avaliou 160 ratas ovariectomizadas com trinta, sessenta, noventa e 120 dias de idade, nos tempos experimentais de cinco, dez, vinte, trinta e quarenta dias pós cirurgia. O autor observou que ratas com idades de sessenta e noventa dias, avaliadas após quarenta dias de cirurgia, apresentaram características mais evidentes de osteoporose na região de maxilar posterior, concluindo que a osteoporose nos maxilares, obtida por meio da ovariectomia, interfere na morfologia óssea alveolar.

Duarte et al.¹⁸ avaliaram tanto o impacto da deficiência estrogênica quanto às terapias estrogênicas e de calcitonina na perda

óssea resultante da periodontite experimental em ratas. Cinquenta e oito ratas foram divididas em 4 grupos experimentais, sendo SHAM; OVZ; OVZ recebendo calcitonina e OVZ estrógeno. Após 21 dias da ovariectomia, as ligaduras foram colocadas ao redor do primeiro molar inferior de apenas um lado, sendo o contralateral (sem ligadura) servido como controle. Após sessenta dias, os animais foram sacrificados, e os autores observaram que a administração de estrógeno conferiu proteção sob os efeitos diretos da deficiência estrogênica no osso alveolar, entretanto, nem o estrógeno nem a calcitonina puderam prevenir esse efeito quando associado com a periodontite.

Orrico et al.⁵⁸ avaliaram radiograficamente, por meio da DEXA e de radiografia digital direta – CDR (*Computed Dental Radiography for Microsoft Windows*), a influência da perda óssea sobre a doença periodontal em ratas ovariectomizadas. Para tanto, utilizou 48 ratas, divididas em quatro grupos, sendo, Grupo 1 (SHAM, sem indução de doença periodontal), Grupo 2 (SHAM, com indução de doença periodontal), Grupo 3 (OVZ, sem indução de doença periodontal) e grupo 4 (OVZ, com indução de doença periodontal). Nos animais pertencentes aos grupos 2 e 4, após um período de cento e vinte dias, foram colocadas ligaduras ao redor dos primeiros molares inferiores do lado direito. Os autores avaliaram radiograficamente a presença ou ausência da perda óssea vertical, medindo da crista óssea à junção cimento-esmalte na mesial do primeiro molar inferior, de ambos os lados e concluíram que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto à doença periodontal induzida.

Baseando-se na literatura encontrada, o presente trabalho tem como objetivo relacionar diferentes tempos de ausência de hormônios ovarianos com a perda óssea decorrente da periodontite experimental em ratas.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite induzida experimentalmente em ratas, por meio dos métodos radiográficos, morfométricos e histométricos.

4 MATERIAL E MÉTODO

A etapa experimental deste estudo foi realizada de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, protocolo nº 019/2006 (Anexo A).

4.1 Seleção da amostra e delineamento dos grupos experimentais

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 80 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com aproximadamente noventa dias de idade e massa corpórea de 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

Os oitenta animais constituintes da amostra foram inicialmente divididos em dois grupos experimentais conforme a cirurgia realizada. Nos animais do Grupo OVZ (n=40) realizou-se a cirurgia de ovariectomia e nas ratas pertencentes ao Grupo SHAM (n=40), a cirurgia simulada ou falsa ovariectomia.

Para cada um desses grupos, foi realizada a subdivisão dos animais em quatro subgrupos conforme o tempo de deficiência estrogênica (Quadro 1).

Quadro 1 – Divisão dos grupos e subgrupos experimentais conforme o tempo de indução da periodontite e cirurgia de ovariectomia.

OVZ	Indução da periodontite no mesmo dia da cirurgia de ovariectomia	G1
	Indução da periodontite 30 dias após a cirurgia de ovariectomia	G2
	Indução da periodontite 60 dias após a cirurgia de ovariectomia	G3
	Indução da periodontite 90 dias após a cirurgia de ovariectomia	G4
SHAM	Indução da periodontite no mesmo dia da cirurgia sham	G5
	Indução da periodontite 30 dias após a cirurgia sham	G6
	Indução da periodontite P 60 dias após a cirurgia sham	G7
	Indução da periodontite 90 dias após a cirurgia sham	G8

4.2 Método

4.2.1 Procedimentos cirúrgicos de ovariectomia e falsa ovariectomia

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cirúrgica cuidadosamente limpa do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP. Para a indução da anestesia geral, empregou-se uma solução de 13mg/kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Anasedan - Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativas, analgésicas e relaxante muscular e 33mg/kg de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil LTDA), anestésico geral, via intramuscular.

Todas as ratas pertencentes ao grupo ovariectomizado (OVZ), aos três meses de idade, sofreram, após anestesia, depilação da

região abdominal lateral e anti-sepsia com álcool iodado, incisão longitudinal com extensão aproximada de 1 cm na pele e musculatura da região lateral do corpo, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. Esta foi confeccionada com lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo de bisturi Bard Parker.

O ovário foi identificado e exposto e confeccionou amarras logo abaixo para realização da hemostasia, por meio da ligação da parte superior da trompa com o fio de seda 4-0 (Ethicon/Johnson & Johnson), sendo estes procedimentos realizados bilateralmente. O ovário foi removido juntamente com a gordura circundante e pequena porção do útero. Ao final dos procedimentos, as camadas musculares foram suturadas com fio de sutura absorvível Catgut 4-0 (Cirumédica - Cotia, SP, Brasil) e a pele com fio de seda 4-0 (Ethicon/Johnson & Johnson – São José dos Campos) (Figura 1).

Para simulação do estresse cirúrgico, em todos os animais do grupo SHAM (cirurgia simulada) foram realizados os procedimentos cirúrgicos descritos acima, com exceção da hemostasia e remoção dos ovários. Portanto, após a exposição do ovário, foi realizada a recolocação dos órgãos na cavidade abdominal e a sutura dos tecidos (Figura 1).

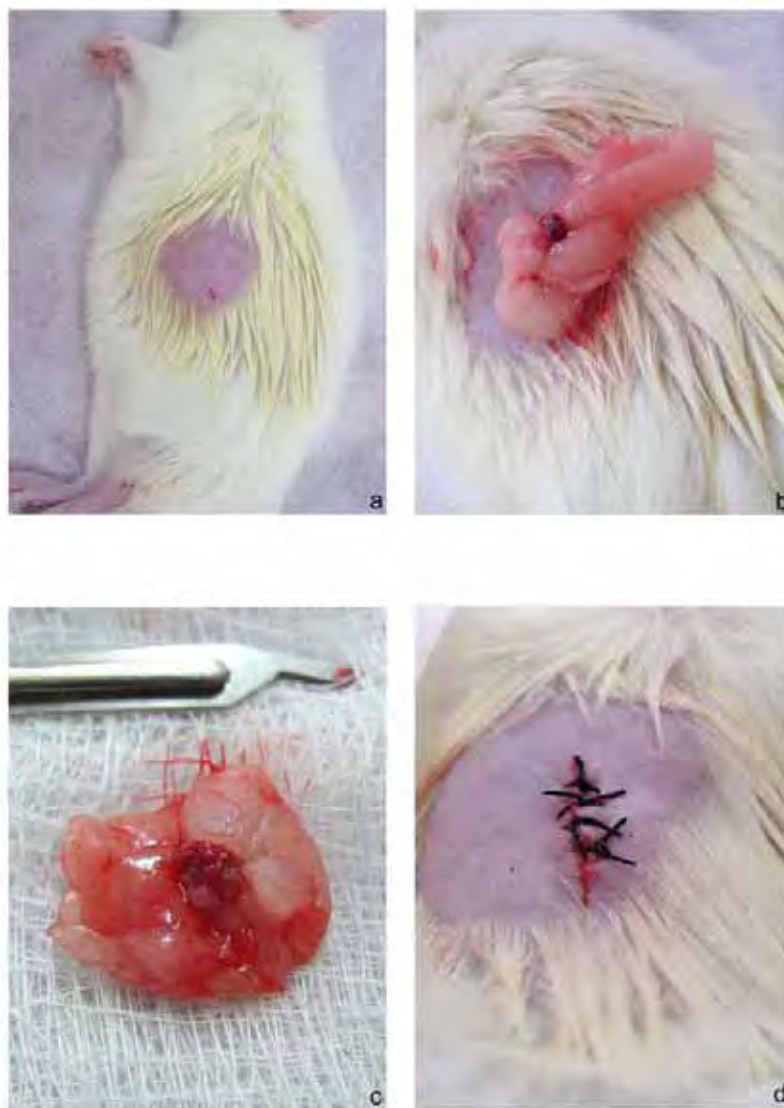


FIGURA 1 - Ovariectomia: a) local do procedimento cirúrgico; b) exposição do ovário e tecido circundante; c) ovário após a remoção; d) sutura.

4.2.2 Indução da periodontite

De acordo com o momento definido em cada grupo experimental, a indução da periodontite foi realizada por meio da colocação de ligadura de algodão, procedimento no qual duas voltas do fio de algodão foram envolvidos na região cervical do dente, unilateralmente. O primeiro molar inferior esquerdo e segundo molar superior direito dos animais receberam a ligadura, sendo que o dente contralateral serviu para controle (ausência de indução de periodontite). A ligadura permaneceu por um período de trinta dias finais em todos os animais, independentemente do grupo, momento esse no qual os animais foram sacrificados, conforme esquema do delineamento experimental (Figura 2).

A metodologia de indução de periodontite por ligadura de algodão na maxila e mandíbula já foi empregada com sucesso no Departamento^{4,63,68,71} da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

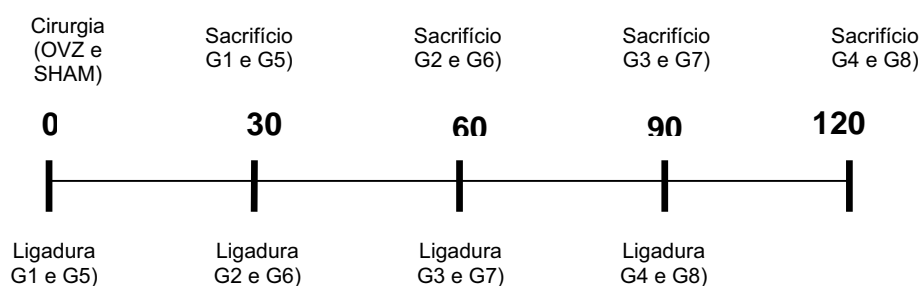


FIGURA 2 – Delineamento Experimental

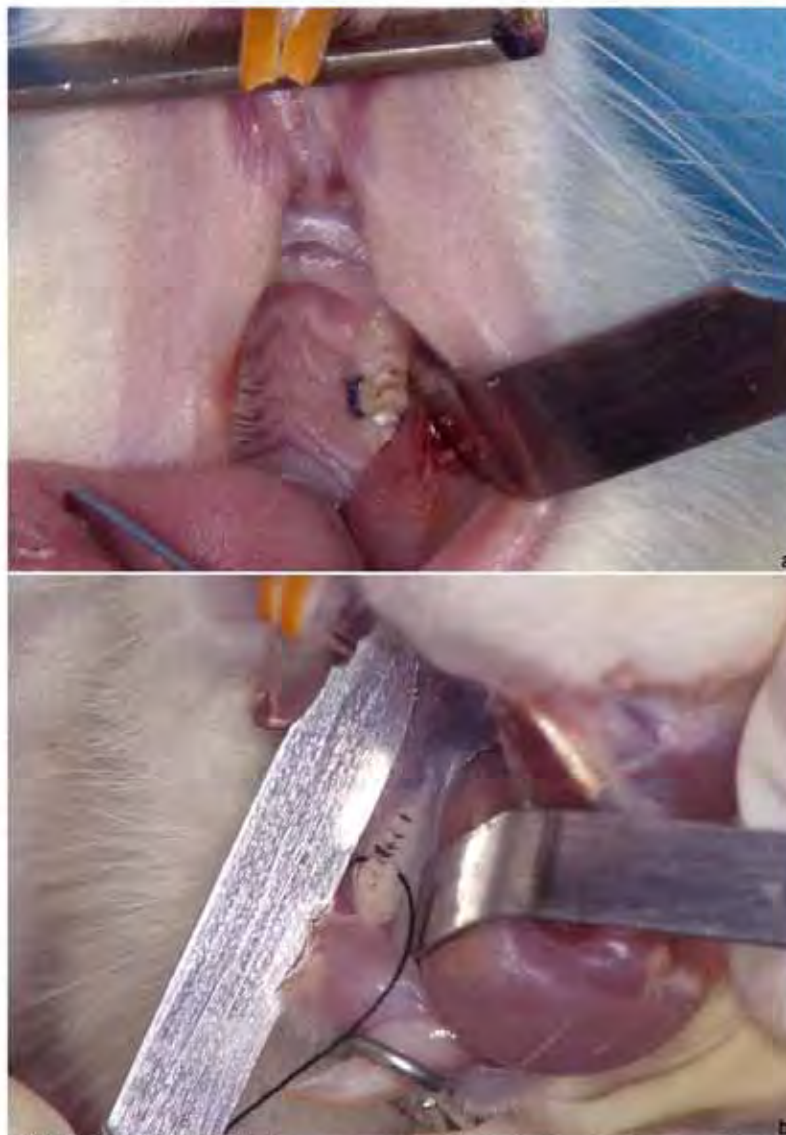


FIGURA 3 - Indução da doença periodontal: a) fio de algodão circundando o segundo molar superior; b) inserção do fio ao redor do primeiro molar inferior.

4.3 Sacrifício

Todos os animais foram sacrificados após 30 dias da colocação das ligaduras, com dose excessiva de anestésico e decapitados em guilhotina, sendo suas maxilas e mandíbulas removidas, o tecido mole excedente eliminado e o material fixado em formol a 10%.

A maxila foi utilizada para avaliação morfométrica da perda óssea alveolar e a mandíbula para análise radiográfica do suporte alveolar, sendo posteriormente descalcificada para análise microscópica.

4.4 Análise das alterações sistêmicas

4.4.1 Peso corporal dos animais

Todos os animais foram pesados no início do experimento e no dia do sacrifício para verificação de possíveis alterações no peso entre os grupos experimentais.

Para tanto, cada rata foi colocada em gaiola individual e pesada em balança digital (Micronal B600 - São Paulo, SP, Brasil). O percentual da variação de peso das ratas foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}}$$

4.5 Análise das alterações periodontais

4.5.1 Análise radiográfica do suporte ósseo remanescente

As hemi-mandíbulas foram radiografadas pelo sistema de imagem radiográfica intra-oral digital RVG[®] (RadioVisioGraphy – Trofhy Radiology Inc. – Marietta / USA), o qual emprega dispositivos de carga acoplada (sensor-CCD) para captura direta das imagens. As tomadas radiográficas foram realizadas utilizando aparelho de raios-X digital Gendex 765DC[®] (Gendex, Dentsply, Internacional, USA) com 65 kv, 7mA e tempo de exposição de 0,08seg. O sensor CCD foi fixado em uma mesa e o cilindro posicionado com distância focal de 30 cm. As hemi-mandíbulas, com a face lingual voltada para o cilindro de raios-X, foram fixadas na porção central do sensor com auxílio de cera utilidade. As peças foram posicionadas objetivando-se o paralelismo entre as cúspides linguais e vestibulares, as quais deveriam estar sobrepostas na imagem radiográfica. O sensor apresentou relação de paralelismo com as faces livres dos dentes e de perpendicularismo com as faces oclusais.

O sistema de análise de imagem *Image Tool* (v.3.0; UTHSCSA) foi empregado para as medições lineares, sendo realizadas análises cegas três vezes por um examinador treinado. Nas radiografias digitais, foram considerados três pontos no primeiro molar selecionado: ápice da raiz distal (A), ponta da cúspide distal (C) e o fundo do defeito na distal do dente (B). O ápice radicular foi definido como o ponto mais apical do dente e o fundo do defeito representado como a posição mais apical do tecido ósseo proximal, sendo mensuradas as distâncias lineares entre os pontos AC e AB (Figura 4). Portanto, o suporte ósseo periodontal (SOP) foi calculado pela fórmula baseada em Klausen et al⁴⁰: $SOP = AB/AC \times 100$. A média das três medidas foi usada para expressar o valor de SOP em cada animal, sendo que os maiores valores indicaram menor destruição óssea periodontal (Figura 4).

4.5.2 Morfometria da perda óssea alveolar vestibular

As hemi-maxilas direitas e esquerdas foram masseradas e dissecadas por meio de imersão em solução de hipoclorito de sódio (1%), durante 5 horas e, posteriormente foi realizada a remoção mecânica para retirar os remanescentes de tecido mole.

Posteriormente, todas as peças foram coradas com azul de metileno (1 g/100 ml) por 1 minuto para demarcar a junção esmalte-cimento (JEC). Os espécimes foram observados em lupa estereoscópica, sendo posicionados de forma que não ocorresse sobreposição das cúspides vestibular e lingual, não havendo a possibilidade de visualização da superfície oclusal.

A imagem captada da lupa foi digitalizada por câmera fotográfica (aumento de 25X) e as medidas de perda óssea alveolar realizadas por região vestibular da hemi-maxila. Para tanto, foram identificados pontos de referência, representados pela junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea (CO), localizados na metade de cada raiz, além da extremidade mesial e distal do dente.

Em seguida, os pontos foram unidos gerando retas de medidas no sentido do longo eixo dos dentes. Cada reta foi medida três vezes, sendo obtido um valor médio. A perda óssea alveolar foi determinada pela média dos valores considerando a região diretamente envolvida com a ligadura (média das retas de 3 a 6), por meio do programa *Image Tool* (v.3.0; UTHSCSA) (Figura 4).

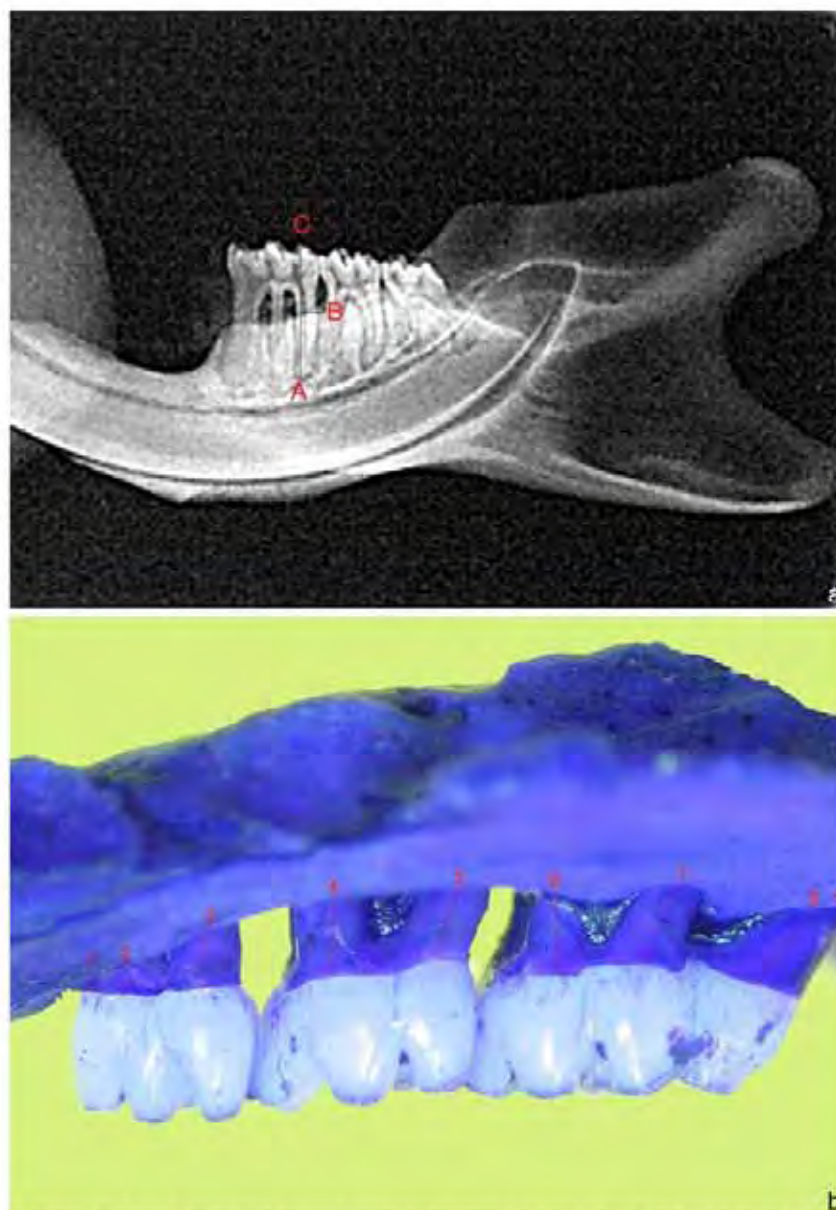


FIGURA 4 - Metodologia: a) análise radiográfica do suporte ósseo periodontal; b) análise macroscópica da perda óssea alveolar.

4.5.3 Análise histológica e histométrica

Depois de radiografadas, as mandíbulas sofreram um processo de descalcificação em solução aquosa de ácido etilenodinitrilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA – Titriplex P.A – Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 10%.

Após descalcificação, as peças foram aparadas e preparadas para inclusão em parafina com a face lingual paralela ao plano de corte. Foram realizados cortes seriados de 5 µm no sentido mesio-distal, os quais foram obtidos a partir do momento que a raiz mediana do primeiro molar inferior for totalmente removida, permitindo visualização da furca formada entre as raízes mesial e distal. A partir de então, foram selecionados cinco cortes (intervalo de 20 µm) por animal, corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise histológica e histométrica.

As imagens foram obtidas, por meio de câmera acoplada ao microscópio, sendo os cortes selecionados com aumento de 100X. As imagens obtidas compreenderam a região formada a partir do teto da furca em direção apical. Em cinco secções por espécimes, foram medidos, por meio do programa *Image Tool* (v.3.0; UTHSCSA), a área de perda óssea ou de ligamento periodontal junto ao teto da furca. Essas áreas foram delimitadas pelo contorno ósseo e superfície de cimento radicular na presença e ausência de ligadura. Foram esperadas áreas de perda óssea em dentes com a indução de periodontite e áreas de ligamento periodontal preservado em dentes sem a indução da mesma. A partir das medidas dos cinco cortes, obtivemos o valor médio por animal, o qual foi utilizado para fornecer a média do grupo.

4.5.4 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média e desvio padrão analisados estatisticamente ao nível de significância de 5%. O teste *t-Student* pareado foi empregado para comparação intragrupo entre presença e ausência de ligadura para verificar se a colocação de ligadura foi capaz de induzir periodontite. Os subgrupos com e sem ligadura foram submetidos à análise de variância (ANOVA e teste de Tukey) considerando os fatores hormônio e tempo de deficiência estrogênica (30, 60, 90 e 120 dias) para verificar se houve diferença entre os mesmos.

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal das ratas

Os valores obtidos dos pesos corpóreos dos animais foram transformados em porcentagem de ganho e indicaram diferenças significantes entre as médias de peso inicial e final com aumento de peso em todos os grupos experimentais (Tabela 1). Quanto ao percentual de variação de peso o grupo G4 (OVZ 120 dias) foi o que ganhou mais peso, seguido do G3 (OVZ 90 dias) e o grupo que menos ganhou peso foi o G5 (Sham 30 dias). Observou-se em todos os grupos experimentais que o fator tempo determinou gradual ganho de peso, tanto na presença quanto na ausência do hormônio estrógeno (Figura 5).

Tabela 1 - Valores de média e desvio padrão do peso corpóreo inicial e final em gramas (g) das ratas e o percentual de variação (%) nos grupos experimentais

Grupo	Peso inicial (g)	Peso final (g)	% variação (g)
G1	255,62 ± 7,76	308,12 ± 10,67	20,54 ± 2,89 ^A
G2	256,87 ± 12,52	346,87 ± 23,59	25,95 ± 1,74 ^{AB}
G3	273,15 ± 13,08	352,50 ± 14,39	29,05 ± 2,54 ^{BC}
G4	268,12 ± 16,68	353,75 ± 19,23	31,94 ± 2,36 ^C
G5	275,62 ± 21,62	288,75 ± 23,41	04,76 ± 1,55 ^D
G6	255,00 ± 10,35	285,62 ± 19,72	10,72 ± 3,04 ^E
G7	263,12 ± 26,31	318,75 ± 20,13	21,14 ± 13,10 ^A
G8	261,25 ± 26,29	326,25 ± 21,67	24,88 ± 12,35 ^A

* Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si.

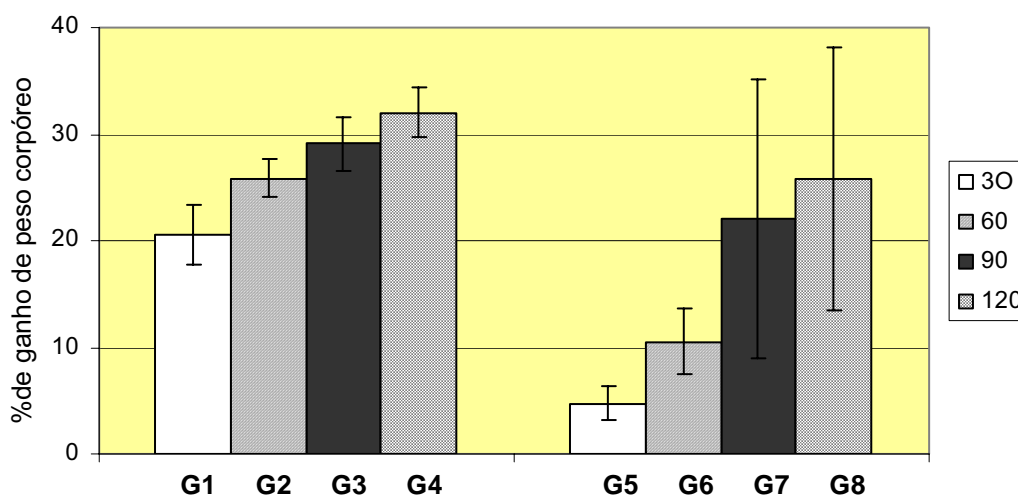


FIGURA 5 – Valores de médias e desvio padrão do percentual (%) de variação do peso das ratas segundo os fatores tempo e hormônio.

5.2 Análise do suporte ósseo periodontal (SOP)

Para análise do suporte ósseo periodontal (SOP) foram determinados três pontos nas radiografias digitais no primeiro molar inferior: ápice da raiz distal, ponta da cúspide distal e o fundo do defeito na distal do dente. Baseado na metodologia de Klausen et al.⁴⁰, os maiores valores de SOP indicaram menor destruição óssea periodontal.

A análise intragrupo revelou inferioridade estatística ($p < 0,05$) nos percentuais de SOP para as condições de presença de ligadura em relação à ausência de ligadura para todos os grupos experimentais. Observa-se na Tabela 2 a influência da deficiência estrogênica no percentual de SOP remanescente, tanto na presença quanto na ausência de ligadura.

Na ausência de ligadura foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) no percentual de suporte ósseo superior nos grupos SHAM 60, 90 e 120 dias em relação aos demais grupos (Tabela 2 e Figura 6).

Na presença de ligadura a análise estatística intergrupo, verificou remanescente de suporte ósseo inferior somente no grupo que recebeu ligadura após 90 dias da cirurgia de ovariectomia (G3) em relação aos demais (G1, G2 e G4). Além disso, os quatro grupos submetidos à cirurgia SHAM apresentaram remanescente de suporte ósseo superior aos grupos submetidos à cirurgia de ovariectomia (Tabela 2 e Figura 7).

Tabela 2- Valores de média e desvio padrão dos percentuais de suporte ósseo periodontal (SOP) remanescente nos grupos experimentais

Grupo	Com ligadura	Sem ligadura	Cirurgia
G1	50,61 ± 2,90 ^{a*}	62,13 ± 1,68 ^A	OVZ
G2	51,55 ± 2,04 ^a	62,57 ± 1,20 ^A	OVZ
G3	47,82 ± 2,96 ^b	61,56 ± 1,78 ^A	OVZ
G4	50,87 ± 1,54 ^a	61,43 ± 0,82 ^A	OVZ
G5	54,32 ± 3,14 ^c	62,39 ± 2,28 ^A	SHAM
G6	53,18 ± 1,43 ^c	63,82 ± 1,63 ^B	SHAM
G7	54,52 ± 1,80 ^c	64,34 ± 1,25 ^B	SHAM
G8	54,47 ± 1,73 ^c	64,10 ± 2,13 ^B	SHAM

* letras minúsculas podem ser consideradas para presença de ligadura e letras maiúsculas para ausência de ligadura (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$). Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si.

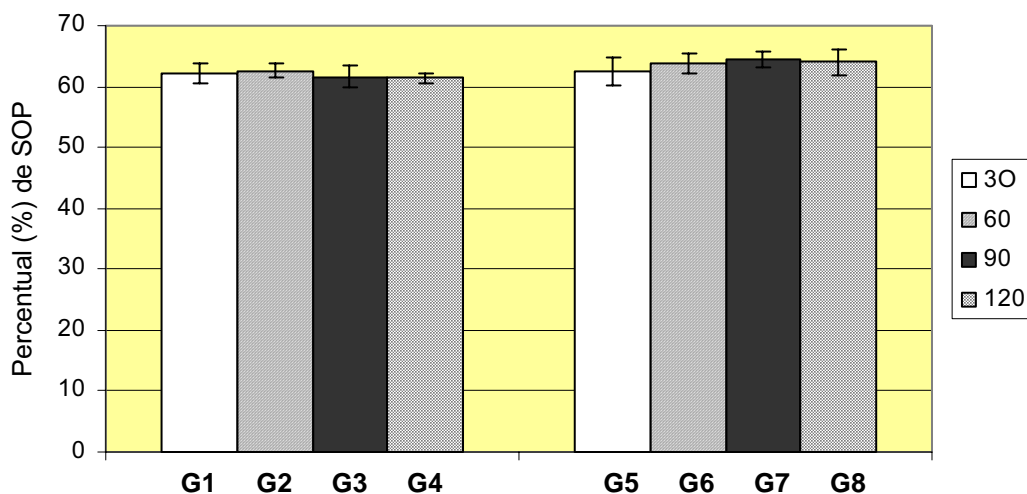


FIGURA 6- Valores de médias e desvio padrão do percentual de SOP (%) nos animais sem ligadura considerando os fatores tempo e hormônio.

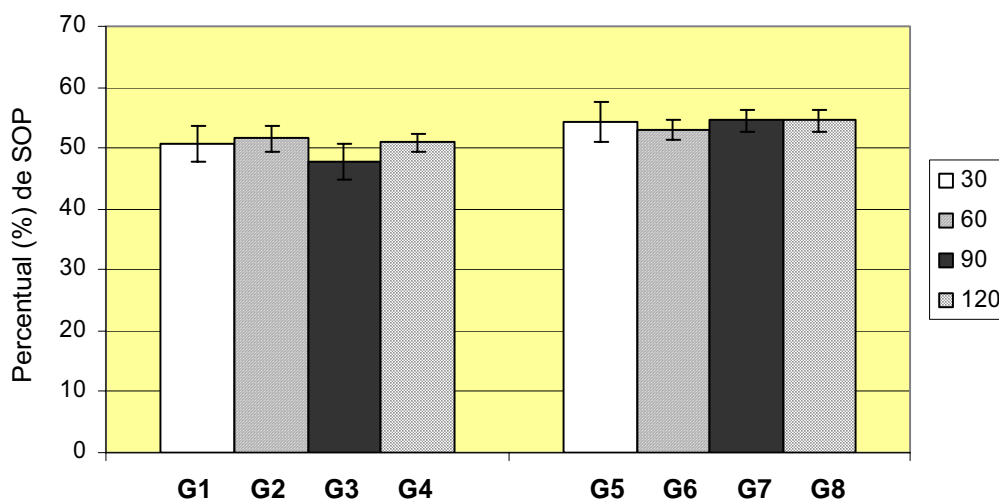


FIGURA 7- Valores de médias e desvio padrão do percentual de SOP (%) nos animais com ligadura considerando os fatores tempo e hormônio.

5.3 Morfometria da perda óssea alveolar vestibular

Para análise morfométrica da perda óssea alveolar vestibular, foram identificados pontos de referência, representados pela junção cimento-esmalte (JCE) e crista óssea (CO), localizados na metade de cada raiz, além da extremidade mesial e distal do dente envolvido. A perda óssea alveolar foi determinada pela média dos valores considerando a região diretamente envolvida com a ligadura.

A análise morfométrica intragrupo demonstrou que a presença de ligadura resultou em perda óssea significativamente maior ($p < 0,05$) que na condição de ausência de ligadura. Tal fato foi observado em todos os grupos experimentais ($p = 0,0000$).

Na ausência de ligadura, quando os grupos experimentais foram comparados, a análise não identificou diferença significativa na perda óssea alveolar entre todos os grupos ($p > 0,05$), o que pode ser observado na Tabela 3 e Figura 8.

Na presença de ligadura a análise intergrupo mostrou perda óssea alveolar significativamente maior nos animais com 90 dias de ausência hormonal (G3) em relação aos demais grupos experimentais (Figura 9 e Tabela 3).

Tabela 3- Valores de médias e desvio padrão da perda óssea alveolar (mm) obtida morfometricamente nos grupos experimentais

Grupo	Com ligadura	Sem ligadura	Cirurgia
G1	141,80 ± 5,22 ^{a*}	42,18 ± 3,76 ^A	OVZ
G2	141,50 ± 8,43 ^a	42,09 ± 3,53 ^A	OVZ
G3	146,89 ± 8,45 ^b	40,80 ± 4,02 ^A	OVZ
G4	140,40 ± 4,77 ^a	41,18 ± 4,05 ^A	OVZ
G5	140,82 ± 8,29 ^a	41,36 ± 5,63 ^A	SHAM
G6	139,27 ± 9,40 ^a	41,45 ± 4,76 ^A	SHAM
G7	140,25 ± 3,14 ^a	40,45 ± 3,17 ^A	SHAM
G8	139,70 ± 4,85 ^a	40,58 ± 2,58 ^A	SHAM

* letras minúsculas podem ser consideradas para presença de ligadura e letras maiúsculas para ausência de ligadura (ANOVA e Tukey, $p < 0,05$). Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si.

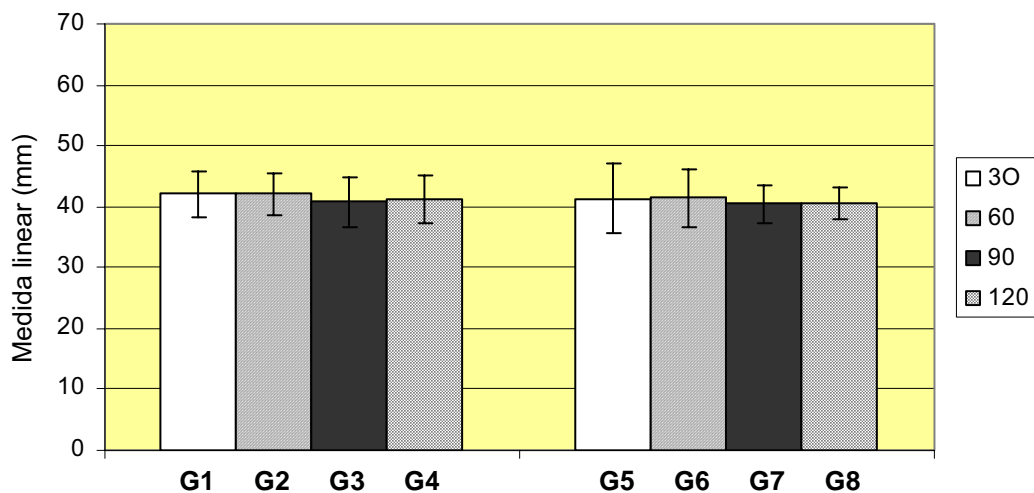


FIGURA 8- Valores de médias e desvio padrão da perda óssea alveolar obtida morfometricamente nos grupos sem ligadura considerando os fatores tempo e hormônio

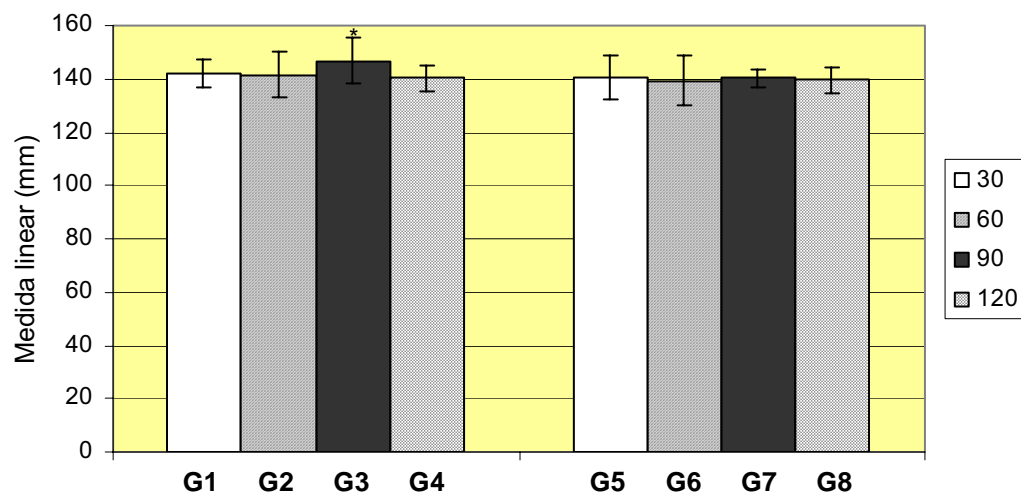


FIGURA 9- Valores de médias e desvio padrão da perda óssea alveolar obtida morfometricamente nos grupos com ligadura considerando os fatores tempo e hormônio

5.4 Histometria da perda óssea alveolar na região de furca

A análise histométrica intragrupo demonstrou que a presença da ligadura resultou em perda óssea significativamente maior ($p < 0,05$) que na condição de ausência de ligadura. Tal fato foi observado em todos os grupos experimentais ($p = 0,0000$).

Na ausência de ligadura, quando os grupos experimentais foram comparados, a análise não identificou diferença significativa na perda óssea alveolar entre todos os grupos ($p>0,05$), o que pode ser observado na Tabela 4 e Figura 10. Entretanto, na presença de ligadura, no grupo de 90 dias de deficiência estrogênica (G3) ocorreu maior destruição óssea, significativa em relação aos demais grupos experimentais (Figura 11 e Tabela 4).

Tabela 4 – Valores de média e desvio padrão da perda óssea alveolar na região de furca nos grupos experimentais

Grupo	Com ligadura	Sem ligadura	Cirurgia
G1	10,47 ± 0,33 ^{a*}	2,15 ± 0,20 ^A	OVZ
G2	10,38 ± 0,59 ^a	2,13 ± 0,17 ^A	OVZ
G3	12,05 ± 1,45 ^b	2,15 ± 0,22 ^A	OVZ
G4	10,38 ± 0,31 ^a	2,15 ± 0,18 ^A	OVZ
G5	10,47 ± 0,65 ^a	2,15 ± 0,13 ^A	SHAM
G6	10,56 ± 0,57 ^a	2,14 ± 0,25 ^A	SHAM
G7	10,39 ± 0,32 ^a	2,17 ± 0,14 ^A	SHAM
G8	10,45 ± 0,73 ^a	2,15 ± 0,20 ^A	SHAM

* letras minúsculas podem ser consideradas para presença de ligadura e letras maiúsculas para ausência de ligadura (ANOVA e Tukey, $p<0,05$). Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si.

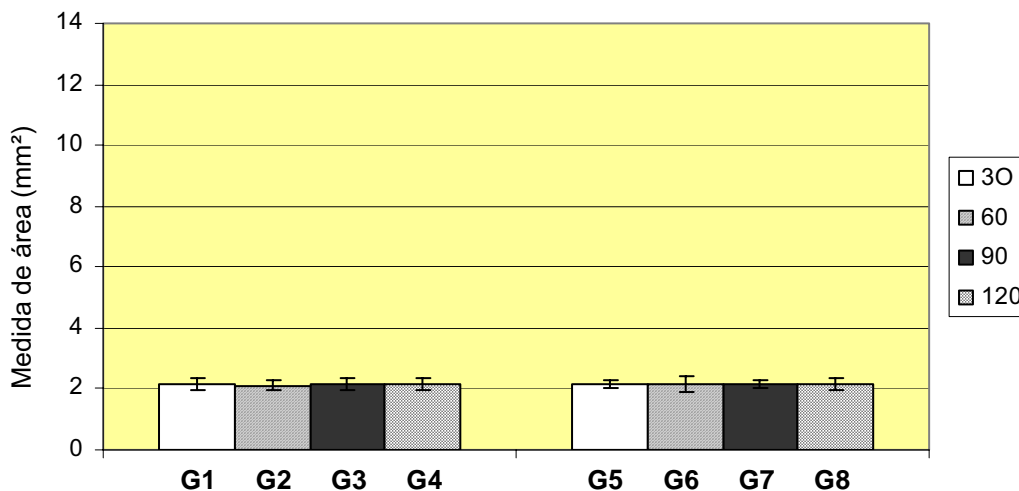


FIGURA 10- Valores de médias e desvio padrão da perda óssea alveolar na região da furca obtida histometricamente nos grupos sem ligadura considerando os fatores tempo e hormônio

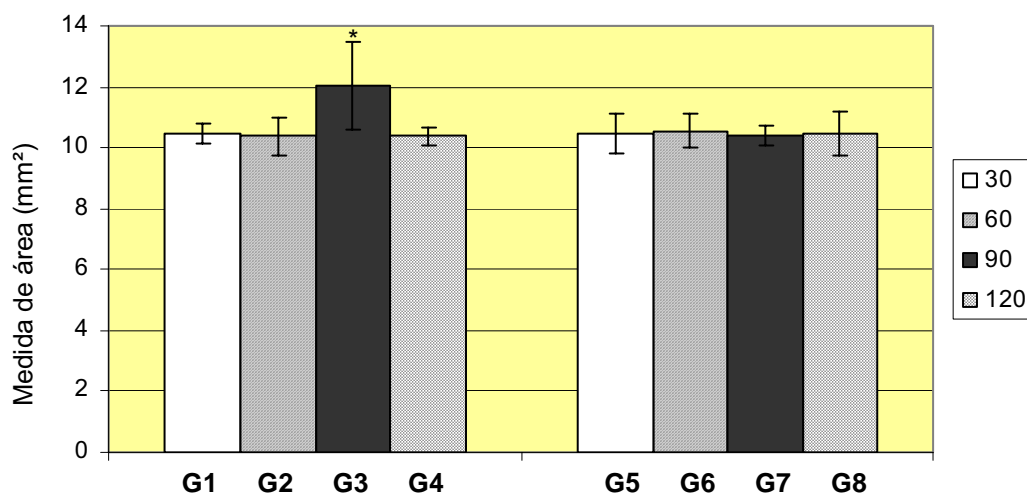


FIGURA 11- Valores de médias e desvio padrão da perda óssea alveolar obtida histometricamente nos grupos com ligadura considerando os fatores tempo e hormônio

5.5 Análise histológica descritiva

Foram observados aspectos microscópicos semelhantes nos animais SHAM e OVZ em todas as condições experimentais, com

diferenças marcantes somente nos animais do grupo G3 (90 dias) com ligadura em relação aos demais grupos.

Os cortes histológicos dos espécimes sem indução da periodontite revelaram, na região de furca, fibras de Sharpey bem inseridas no osso alveolar inter-radicular e no cimento; ligamento periodontal com canais vasculares e fibroblastos alongados. A crista óssea alveolar inter-radicular exibiu extremidade arredondada, levemente irregular, exatamente onde inseriam-se as fibras de Sharpey, com orientações bem definidas, com ausência de reabsorção óssea. O tecido ósseo exibiu aspecto regular e denso, com muitos osteócitos distribuídos homoganeamente; poucos espaços medulares revestidos por osteoblastos cubóides alinhados. A crista óssea alveolar interdental também exibiu as mesmas características da inter-radicular. O teto da furca apresentou-se com superfície lisa e sem irregularidades (Figura 12).

Já os animais que tiveram a indução da periodontite, apresentaram crista óssea inter-radicular com aspecto bastante irregular; espaço entre o teto da furca e o osso inter-radicular reabsorvido preenchido por ligamento periodontal modificado, constituído por tecido conjuntivo com fibras colágenas dispostas em diversas orientações e poucos fibroblastos. A orientação das fibras variou entre os animais, ora no sentido horizontal ou vertical ora oblíquo desorganizado. Além disso, observou-se variação no volume e na coloração dos fibroblastos que, por vezes, exibiam núcleos volumosos e hiperromatismo tanto dos núcleos quanto das próprias fibras (Figura 13).

O osso alveolar destes animais, tanto inter-radicular quanto interdental, exibiu perda do aspecto compacto, com intensa remodelação óssea, caracterizada por linhas de reversão, presença de crateras e lacunas de reabsorção, com células gigantes multinucleadas, levando à destruição da crista óssea. Notou-se também proliferação tanto dos espaços medulares quanto de células osteogênicas, conferindo ao

osso um aspecto “fragmentado”, com perda do padrão compacto denso. Algumas áreas ainda exibiam aspecto de mosaico, sugestivo de alta atividade de remodelação óssea; intenso infiltrado inflamatório, presença de colônias bacterianas no teto da furca e nas papilas interdentais, ninhos de epitélio proliferado, com perda de inserção e migração epitelial. Ninhos epiteliais em degeneração cística com colônias bacterianas no seu interior foram observados em alguns animais. O teto da furca estava preenchido por ligamento periodontal, com fibras do ligamento, dispostas em diversas orientações, exibindo discreto pleomorfismo nuclear, núcleos volumosos e hipercromados (Figura 13).

Nos animais do grupo G3 (90 dias) com ligadura, a reabsorção óssea apresentou-se mais extensa em direção apical e frequentemente invadindo a furca. Na face mesial do dente a migração do epitélio foi mais intensa. Nesses animais também foi observado lacunas de reabsorção na superfície do dente voltada para a furca, tanto no teto quanto nas porções laterais. Em alguns animais deste grupo houve separação da crista óssea inter-radicular em duas lâminas verticais separadas por uma faixa de tecido conjuntivo fibroso, rico em vasos sanguíneos e células osteogênicas (Figura 14).

A polpa do primeiro molar inferior apresentou congestão vascular e ausência de inflamação em todos os grupos, com e sem indução da periodontite.

Na análise histológica descritiva verificou-se características correspondentes com os resultados obtidos nas análises radiográficas, morfométricas e histométricas, havendo diferenças marcantes entre os grupos com e sem ligadura. Além disso, houve diferença entre esses e os animais do grupo G3 que tiveram inserção da ligadura.

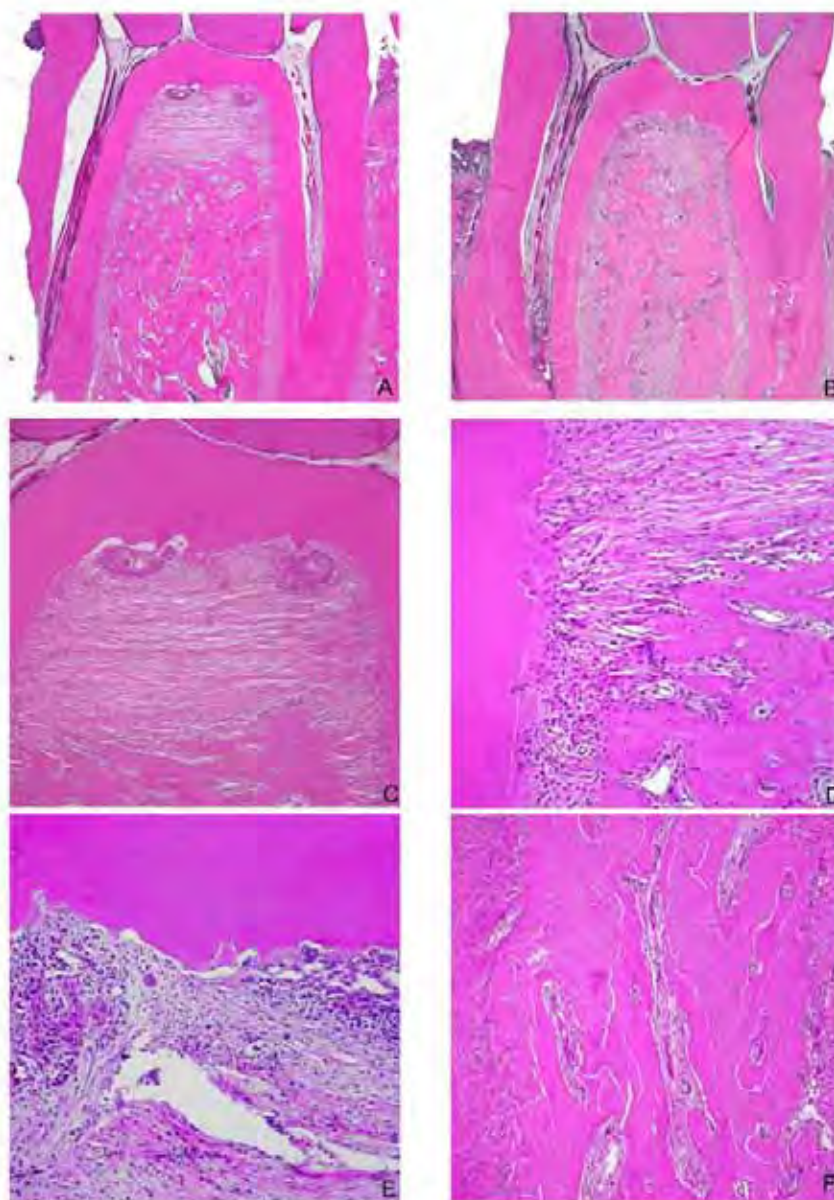


FIGURA 13 - grupos OVZ e SHAM com ligadura e doença periodontal. A e B) aspecto panorâmico. Aumento original de 25X. C) áreas de reabsorção com perda da extremidade da crista óssea, ligamento periodontal preenchendo o espaço e ninhos de epitélio na região da furca. Aumento original de 100X; D e E) Lacunas de reabsorção na raiz do dente, inserção irregular das fibras de Sharpey e ninhos de epitélio. Aumento original de 100X e 200X, respectivamente; F) osso não compacto, permeado por feixes de tecido conjuntivo vascularizado, com aspecto em mosaico. Aumento original de 200X.

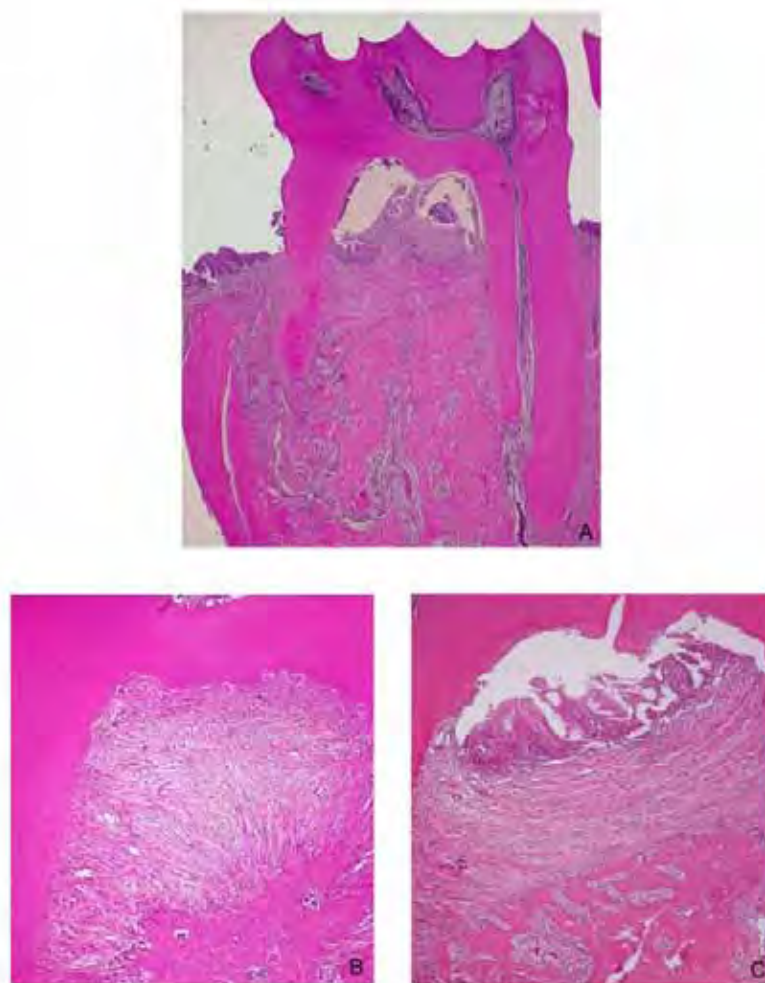


FIGURA 14 - grupo G3 (OVZ com ligadura 90 dias) : A) aspecto panorâmico com acentuada destruição do osso interdental e inter-radicular; migração do epitélio para região de furca. Aumento original de 25X; B) crista óssea irregular e fibras de Sharpey com orientação em leque e discreto pleomorfismo e hiper cromatismo. Aumento original de 100X; C) Ninhos epiteliais com degeneração cística. Aumento original de 100X.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como finalidade investigar o efeito de diferentes tempos de deficiência estrogênica, promovida pela ovariectomia, na perda óssea periodontal induzida experimentalmente por ligadura em ratas, por meio dos métodos radiográficos, morfométricos e histométricos.

Controvérsias existem nos trabalhos da literatura associando osteoporose e perda óssea oral em humanos. Segundo Beck⁸, a perda óssea alveolar é resultado da doença periodontal e suspeita-se que a osteoporose esteja relacionada com esta doença. Contudo, o autor relata que é difícil estabelecer tal relação, pois, alguns estudos têm apresentado metodologia inadequada, com número de amostras reduzido e sem o controle de importantes fatores comuns tanto para a doença periodontal, como para a osteoporose, tais como idade, hábito de fumar, diabetes e algumas medicações. Concordando com essas afirmações, Becker et al.⁹ afirmam ainda, que a contribuição da osteoporose na perda dentária é difícil de ser demonstrada pois os dentes podem ser perdidos por várias causas e não somente pela perda óssea de suporte. Dentre os motivos são citados tanto os de origem local, como problemas endodônticos e protéticos, traumas, fraturas, cáries, qualidade de tratamentos dentários realizados; bem como os originados por diferentes níveis socioculturais e econômicos.

Em contrapartida, segundo Grodstein²⁷, existe uma possibilidade de associação da osteoporose com a perda dentária, decorrente do comprometimento da integridade estrutural do osso por

distúrbios metabólicos dos níveis de cálcio ou por determinadas doenças, alterando assim a estrutura e a massa óssea. Este fenômeno pode ser notado em mulheres na pós-menopausa que apresentam uma diminuição do hormônio estrogênio. Kribbs⁴² acredita que a deficiência estrogênica poderia causar alterações no osso alveolar, podendo agravar uma doença periodontal pré-existente.

Sendo assim, muitas vezes os trabalhos mostram resultados conflitantes decorrentes da grande variabilidade de metodologias empregadas para avaliar a relação existente entre a doença periodontal e a osteoporose. Diferenças no tamanho da amostra, na população examinada e na idade da mesma, impedem a interpretação e comparação dos resultados originados destes trabalhos, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de estudos longitudinais para o esclarecimento da real natureza de ambas. Além disso, na maioria das pesquisas os estudos são transversais, limitando assim a disponibilidade de informações sobre qual das duas doenças estudadas poderia ter precedido o exame, pois, tanto a osteoporose como a doença periodontal, doenças crônicas multifatoriais, resultam em reabsorção óssea, sempre existindo a possibilidade de uma delas já estar presente previamente ao início da pesquisa^{23,84}.

Portanto, para sobrepujarmos tais limitações, obstáculos e dificuldades, empregamos na presente pesquisa o modelo animal. A escolha do rato como modelo deve-se pela conveniência de diminuirmos o período de pesquisa obtendo resultados confiáveis em um intervalo de tempo menor, uma vez que em seres humanos as transformações ósseas podem demorar anos, dificultando assim nossa avaliação. Além disso, há predominância de estudos envolvendo a deficiência estrogênica nesse animal e a facilidade de execução da ovariectomia, ao baixo custo, também pelo fato de não ser

necessário longos períodos de experimentação e à simulação do quadro ósseo semelhante ao observado na menopausa, com rápida perda óssea e aumento na taxa de remodelação^{38,52,86}. No entanto, os estudos em animais também apresentam, muitas vezes, conclusões discrepantes resultantes da grande variabilidade de metodologias empregadas para avaliar a relação existente entre a deficiência estrogênica e a doença periodontal.

Portanto, consultou-se a literatura no intuito de refinar a utilização de tal modelo animal. A idade das ratas utilizadas no presente estudo foi de três meses, pois, segundo Kalu³⁸, nesta faixa etária as mesmas são consideradas sexualmente maduras, apresentando alterações ósseas mais rápidas. De acordo com Sampson⁶⁷, esta faixa etária corresponderia ao adulto jovem quando relacionada ao humano. Além disso, nessa idade, existe a possibilidade de se desvincular a perda óssea conseqüente à deficiência hormonal da perda óssea relacionada ao envelhecimento.

Em relação ao presente modelo experimental, para o estudo da interferência do tempo de deficiência hormonal na indução da periodontite, diferentes tempos após a realização da ovariectomia foram determinados para a inserção da ligadura. Este trabalho teve início com a excisão bilateral dos ovários no dia em que os animais completaram três meses de idade, pois animais idosos teriam o fator fisiológico de senilidade interferindo nos resultados. Marques⁴⁸ objetivou padronizar em seu trabalho a metodologia com relação à idade do animal e tempo experimental de deficiência estrogênica induzida em ratas avaliando a morfologia óssea alveolar maxilar e o periodonto de sustentação, realizando para isto, vários períodos de ovariectomia. O autor mostrou que o tempo experimental de 40 dias foi o ideal para o estudo da remodelação óssea. Neste período foi possível avaliar características mais intensas da osteoporose em relação aos

outros períodos de observação. No entanto, o trabalho deste autor difere do nosso, pois o mesmo avaliou somente o osso alveolar da maxila, predominantemente trabecular, sem ter induzido periodontite, como realizado em nosso trabalho, o que pode justificar as alterações precoces encontradas nesse período.

O modelo de indução de periodontite em animais, utilizando-se ligaduras, constitui um método largamente empregado, eficaz, de fácil execução e de baixo custo^{5,56,69}. Este modelo atua como fator retentor de biofilme bacteriano para a indução da periodontite, fator imprescindível para o desenvolvimento da doença periodontal. Rovin et al.⁶⁵ confirmaram tal afirmação, quando utilizaram animais “*germfree*” e afastaram a hipótese de que o trauma mecânico pela presença da ligadura poderia ser o responsável pela perda de tecido periodontal de suporte. Os autores verificaram que enquanto o grupo “*germfree*” permaneceu sem alterações no periodonto, nos animais controle, a retenção de biofilme bacteriano sobre o fio de algodão promoveu um desequilíbrio na microbiota capaz de induzir doença periodontal.

Em nosso trabalho, a metodologia empregada para indução da periodontite, com a utilização de fio de algodão envolvendo tanto a região cervical do segundo molar superior quanto do primeiro molar inferior, mostrou-se efetiva. Foram encontradas na análise estatística dos dados radiográficos, morfométricos e histométricos diferenças significativas entre os animais com e sem ligadura em todas as condições experimentais. Estes dados foram concordantes com os resultados da análise histológica, na qual foi observada, nos animais com ligadura, evidente reabsorção óssea alveolar e espaço entre o teto da furca e o osso inter-radicular reabsorvido preenchido por ligamento periodontal.

A averiguação da permanência do fio de algodão ao redor da coroa dentária pode ser realizada, sob anestesia, durante o período experimental, entretanto, em nosso trabalho a presença da mesma só foi verificada no dia do sacrifício, como realizado por Souza⁶⁸, diferindo das pesquisas de Anbinder⁴ e Spalding⁷¹. No entanto, de todos animais operados, somente quatro apresentaram-se sem a ligadura no dia do sacrifício, sendo que estes foram excluídos e substituídos.

O periodonto dos ratos é alterado por processos fisiológicos que continuamente remodelam o osso alveolar com o passar do tempo. Entretanto, as estruturas periodontais dos ratos podem ser intensamente modificadas de forma patológica, pela indução de doença periodontal. A condição de normalidade e essas alterações podem ser mensuradas pelos métodos radiográficos, histométricos, e morfométricos entre outros. Esses métodos possibilitam quantificar as alterações teciduais ocorridas nos animais até o momento do sacrifício³⁹. Logo após a remoção dos maxilares dos animais, o tecido ósseo alveolar pode ser prontamente avaliado pelos métodos radiográficos e morfométricos; no entanto, para análise histométrica é necessário submeter os espécimes ao processo de descalcificação e posterior processamento de cortes seriados em local padronizado⁷⁰.

Em nosso trabalho optamos por avaliar a perda óssea periodontal por meio de três diferentes análises de comparação, a fim de avaliar metodologias complementares, sendo elas a radiográfica, morfométrica e histométrica para dar maior respaldo e confiabilidade aos nossos resultados. De acordo com a literatura consultada, nenhum dos métodos isoladamente é capaz de abranger todos os aspectos da doença periodontal em ratos³⁹. Todos os métodos são de fácil realização e devem

ser empregados conjuntamente em avaliações ósseas alveolares em ratos, pois avaliam aspectos distintos⁴⁰.

A subjetividade das análises de mobilidade dentária e do grau de envolvimento de furca^{4,71} foi o principal fator para sua exclusão de nossa metodologia. Soma-se ainda, a possibilidade de variações individuais entre os examinadores e a dificuldade em extrapolar os resultados para uma análise clínica diária.

O método radiográfico possibilita quantificar as perdas ósseas proximais, por medidas da distância entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar na raiz mesial do primeiro molar inferior^{31,34,53} e o suporte ósseo periodontal presente junto à raiz distal do mesmo elemento dentário^{10,40}.

É consenso geral que a osteoporose isoladamente não inicia a doença periodontal. De acordo com a literatura ela pode afetar o curso da doença, pela redução da densidade mineral óssea e quantidade do trabeculado ósseo oral. Há ainda, a hipótese de que a osteoporose pode ocasionar uma diminuição na densidade do osso alveolar, tornando-o mais susceptível à reabsorção. Contribuindo para confirmar a veracidade deste fato, notou-se que na análise radiográfica, na qual avaliamos a altura do osso remanescente na face distal da raiz do primeiro molar inferior, verificamos que as médias de altura da crista alveolar foram estatisticamente mais baixas nos grupos ovariectomizados tanto na presença quanto na ausência de ligadura, mostrando que a deficiência estrogênica interfere no suporte ósseo periodontal, pois o estrógeno é fundamental na preservação da massa óssea. Estes dados estão de acordo com Johnson et al.³⁵, que averiguaram,

utilizando ovelhas ovariectomizadas, que a doença periodontal foi exacerbada pela deficiência estrogênica.

Considerando que o exame radiográfico é limitado pelo fato de reproduzir estruturas anatômicas tridimensionais, em imagens bidimensionais, optamos por também avaliar, de forma complementar, o nível ósseo horizontal junto às faces livres dos molares empregando o método morfométrico em maxilares dissecados baseado no estudo de Souza et al.⁷⁰ que afirmam que ambos os métodos são reproduzíveis e complementares.

A avaliação morfométrica destina-se a medir as perdas ósseas horizontais localizadas nas faces livres dos molares a partir de imagens obtidas de maxilares macerados e corados. Devido a questões anatômicas essas mensurações são realizadas pelas faces vestibular e palatino na maxila e por lingual na mandíbula¹⁶. Os valores são fornecidos por medidas da distância linear da junção cimento-esmalte à crista óssea junto às raízes dentais nas faces estabelecidas, determinando assim, o nível ósseo alveolar^{10,40,43}. Nossos resultados mostraram que nos animais sem ligadura o fator hormonal não interferiu na perda óssea alveolar. Entretanto, na presença da ligadura, a deficiência estrogênica agravou a perda óssea somente no período de 90 dias de ausência de estrógeno.

É bem estabelecido que a perda de massa óssea decorrente da deficiência estrogênica em ratas ovariectomizadas ocorre gradualmente, apresenta um pico e estabiliza-se. Entretanto, os picos encontrados nos trabalhos nem sempre são coincidentes^{35,73,76,86}. Corroborando com os nossos resultados, embora em ovelhas, Johnson et al.³⁵, observaram alterações inflamatórias periodontais significantes após 90 dias da ovariectomia, nos animais ovariectomizados comparados com o controle.

Wronski et al.⁸⁶ verificaram osteopenia e aumento do índice de reabsorção óssea aos 14 dias após a cirurgia, que se tornou gradualmente mais pronunciada até se estabilizar por volta dos cem dias. Tanaka et al.⁷⁶ observaram perda óssea e fragmentação das trabéculas das mandíbulas das ratas após 1 ano da ovariectomia e acreditam que a elevada taxa de reabsorção imediata à ovariectomia declina com o tempo. Tanaka et al.³⁸ consideram que sete dias após a ovariectomia pode-se avaliar os efeitos agudos da deficiência estrogênica em ratas. Em nosso estudo, o período com maior atividade osteoclastogênica decorrente da ovariectomia foi após 90 dias. Tal resultado repetiu-se em todas as análises realizadas comprovando sua autenticidade.

A análise histométrica se destina a avaliar alterações ocorridas nos tecidos e observadas em cortes histológicos como, por exemplo, a perda de inserção conjuntiva junto à porção proximal²⁴ ou a perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior^{7,18,55}. Nossos resultados mostraram novamente que nos animais sem ligadura o fator hormônio não interferiu na perda óssea alveolar. Entretanto, na presença da ligadura, esta deficiência agravou a perda óssea somente no período de 90 dias de ausência de estrógeno.

Os resultados encontrados nas análises morfométricas e histométricas foram coerentes e relacionados, entretanto diferentes dos obtidos na análise radiográfica, no que tange a influência da deficiência estrogênica sobre os ossos maxilares. A deficiência estrogênica em todos os tempos avaliados só revelou-se significativa, comparando-se os grupos SHAM e OVZ, na avaliação do suporte ósseo periodontal. Isto provavelmente se deve à análise de parâmetros diferentes. A análise radiográfica avalia uma medida linear vertical na região distal radicular, enquanto que, a

histométrica quantifica área de perda óssea na região de furca e a morfométrica destina-se a medir as perdas ósseas horizontais localizadas nas faces livres. Embora a deficiência estrogênica seja um fator sistêmico, sua influência pode não ser evidente o suficiente para ser verificada em todas as análises.

A mandíbula suporta forças mecânicas produzidas pela carga oclusal e pela ação dos músculos mastigatórios, os quais contribuem para a manutenção da massa óssea, se opondo aos efeitos da deficiência hormonal na indução de osteoporose. Essas forças mecânicas, decorrentes dos esforços oclusais, e as cargas geradas pela mastigação, podem suprimir a reabsorção provocada pela ovariectomia, o que foi verificado por Elovic et al¹⁹. No entanto, em nosso trabalho o objetivo foi de avaliar somente a influência da deficiência hormonal na perda óssea, sem nos preocuparmos com a influência da proteção do esforço mastigatório sobre os ossos maxilares, tornando este fato tema a ser desenvolvidos em futuras pesquisas.

Outro fator importante no desenvolvimento da perda óssea pode ser o peso do indivíduo. Segundo Wronski et al.⁸⁶, o aumento de peso em ratas ovariectomizadas pode atenuar a perda óssea nos ossos longos. Em nosso trabalho, os valores obtidos dos pesos corpóreos dos animais foram transformados em porcentagem de ganho e indicaram aumento de peso em todos os grupos experimentais; sendo os animais do grupo ovariectomizado os que apresentaram maior ganho de peso, dados estes condizentes com os relatos da literatura^{2,33}.

É sabido que o aumento de apetite é devido à tentativa de manutenção da homeostase interna frente ao desequilíbrio hormonal. É

possível que a restrição de moderada atividade física, a qual é encontrada freqüentemente em mulheres osteoporóticas, possa explicar o achado de aumento na quantidade de gordura medular neste grupo comparado com o grupo normal. Além disso, observou-se no presente estudo, em todos os grupos experimentais, que o fator tempo determinou gradual ganho de peso, tanto na presença quanto na ausência do hormônio estrógeno.

O emprego de vários intervalos de tempo utilizados neste trabalho foi oportuno para revelar o período ideal no qual a deficiência estrogênica exerce maior influência no agravamento da perda óssea decorrente da periodontite induzida. Trabalhos anteriores^{4,71} não verificaram esta relação com a utilização de um período experimental menor. Baseados em nossos resultados, verificamos que não há a necessidade de tempos experimentais mais longos com os grupos G4 e G8 (120 dias), embora outros estudos sejam necessários a fim de se esclarecer a relação da deficiência estrogênica com a periodontite neste período.

Diante do exposto, acreditamos que os resultados obtidos em nosso trabalho foram coerentes e permitiram uma adequada análise da influência de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea decorrente da periodontite e evidenciaram a relação da doença periodontal com a ovariectomia, que aos noventa dias agravou a perda óssea alveolar, respondendo o questionamento levantado em nossa proposição.

7 CONCLUSÃO

Baseado nas condições experimentais, concluiu-se, por meio do modelo utilizado, que a deficiência estrogênica aos noventa dias agravou a perda óssea resultante da periodontite experimental em ratas.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002; 29:177-206.
- 2 Amadei SU. Estudo comparativo dos efeitos da isoflavona e da ipriflavona na reparação óssea em tíbias de ratas ovariectomizadas. [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 3 Amadei SU, Silveira, VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha, RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(1):7-15.
- 4 Anbinder AL. Influência da ausência de hormônios ovarianos e dos tratamentos com sinvastatina ou alendronato sódico na condição periodontal de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.

* Baseado em:

International Comitê of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscript submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 5 Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Bras Dent J.* 2006; 17(3):201-7.
- 6 Bandeira F, Macedo G, Caldas G, Griz L, Faria M. Osteoporose. Rio de Janeiro: Medsi; 2000.390 p.
- 7 Barros SP, Silva MA, Somerman MJ, Nociti FH Júnior. Parathyroid hormone protects against periodontitis associated bone loss. *J Dent Res.* 2003 Oct.; 82 (10):791-5
- 8 Beck JD. Periodontal implications: older adults. *Ann Periodontol.* 1996 Nov.; 1(1):322-57.
- 9 Becker ARI. Osteoporosis risk factors in female dental patients. A preliminary report. *J Indiana Dent Assoc.* 1997; 76(2):15-9.
- 10 Björnsson MJ, Velschow S, Stolz K, Havemose-Poulsen A, Schou S, Holmstrup P. The influence of diet consistence, drinking water and bedding on periodontal disease in Sprague-Dawley rats. *J Periodontal Res.* 2003 Dec.; 38(6):543-50.
- 11 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003 May; 423:337-42.
- 12 Brown JP, Josse RG. 2002 clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Can Med Assoc J.* 2002 Nov.; 167(S10):1-34.

- 13 Chaimowicz F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. Rev Saúde Pública. 1997; 31(2):184-200.
- 14 Compston JE. Sex steroids and bone. Physiol Rev. 2001 Jan.; 81(1): 419-47.
- 15 Consensus Development Conference. Prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med 1991 Jan.; 90:107-10.
- 16 Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. J Periodontal Res. 1978 July; 13(4):316-25
- 17 Douglas CR. Fisiologia do osso. In: __. Tratado de fisiologia: aplicada às ciências da saúde. 4^a. ed. São Paulo: Robe, 1999. Cap.87, p.1221-36.
- 18 Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Júnior. Effect of estrogen deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. J Periodontol Res. 2004 Apr.; 39(2):107-10.
- 19 Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. Calcif Tissue Int. 1995 Apr.; 56(4):305-10.
- 20 French L, Shimp L. Prevention and treatment of osteoporosis in postmenopausal women. J Fam Pract. 2002 Sept./Oct.; 51(10):872-5.

- 21 Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone*. 1997 May; 20(5):385-91.
- 22 Frost HM, Jee WSS. One the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner*. 1992.; 18 (3): 227-36.
- 23 Garcia R I. Relationship between periodontal disease and systemic health. *Periodontol*. 2000. 2001. 25:..21-36.
- 24 Gasperic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. Influence of subcutaneous administration recombinant TNF-a on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*, 2003 Apr.;38(2):198-203.
- 25 Genant HK, Cooper C, Poor G, Reid I, Ehrlich G, Kanis J et al. Interium report and recommendations of the world health organization task-force for osteoporosis. *Osteoporos Int*. 1999; 10:259-64.
- 26 Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. J Periodontol. 1996 Oct.; 67(S10):1041-9.
- 27 Grodstein F, Colditz GA, Stampfer MJ. Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *JADA*. 1996 Mar.; 127:370-377.
- 28 Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423:349-55.
- 29 Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofac Radiol*. 1997. 26:3-15.

- 30 Hill PA, Orth M. Bone remodeling. Br J Orthod. 1998 May; 25(2):101-7.
- 31 Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio Júnior E. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res. 2004 June; 39 (3):188-94.
- 32 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro. Censo demográfico 2000: resultado do universo. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. [citado em 6 nov. 2005].Disponível em:www.ibge.gov.br/censo
- 33 Jaime APG, Anbinder AL, Prado FA, Balducci I, Rocha RF. Influência da administração local de alendronato sódico no reparo ósseo em calvária de ratas ovariectomizadas. Cienc Odontol Bras. 2005 Abr./Jun.;8(2):70-9.
- 34 Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. J Periodontal Res. 1975 Dec.; 10(6):332-45.
- 35 Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, Dai X, Newton BI, Tracy RR et al. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. J Periodontol. 1997 Sept.; 68(9):864-71.
- 36 Junqueira JC, Mancini MNG, Caravilho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of sinvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats on blood cholesterol level. J Oral Sci. 2002; 44(3/4):117-24.

- 37 Junqueira LC, Carneiro J. Tecido Ósseo. In: __. Histologia básica. 10^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2004. Cap.8, p.136-53.
- 38 Kalu DN. The ovariectomy rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991; 15:175-92.
- 39 Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental disease in rats: a review article. *J Periodontol.* 1991 Jan.; 62(1):59-73.
- 40 Klausen B, Evans RT, Sfantescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level. *Scand J Dent Res.* 1989 Dec.; 97(6):494-9.
- 41 Kowalski SC, Sjenzfeld VL, Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Rev Assoc Med Bras.* 2001; 47(4):352-7.
- 42 Kribbs PJ. Comparasion of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent.* 1990 Feb.; 63(2):218-22.
- 43 Kuhr A, Popa-Wagner A, Schoii H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res.* 2004 Apr.;39(2):101-6.
- 44 Lederman R, Carneiro RA. Osteoporose: saúde pública no Brasil. *ARS CVRANDI Clin Med.* 1996 Jun.; 29:17-24.
- 45 Lindhe J, Karring T, Lang N. Patogênese da periodontite. In: Lindhe J, Karring T, Lang N. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 5^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

- 46 Manolagas SC. Role of cytokines in bone resorption. *Bone*. 1995 Aug.; 17(S2):63-7.
- 47 Manolagas SC, Jilka RL. Mechanisms of diseases: bone marrow, cytokines, and bone remodeling: emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb.;332(5):305-11.
- 48 Marques KP. Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas [dissertação]. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; Bauru:1998.
- 49 Modesto J Filho., Azevedo LAP, Azevedo LCP. Tratamento da osteoporose. *J Bras Med*. 1996 Nov./Dez.; 71(5/6):77-9.
- 50 Moreira C. Osteoporose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP, Fonseca JGM, Silva OA. *Terapêutica Clínica*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. Cap.67, p.588-604.
- 51 Morya Y, Ito K, Muray S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Science*. 1998.; 40(4):171-5.
- 52 Mosekilde L. Assessing bone quality--animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone*. 1995 Oct.;17(S 4):343-52.
- 53 Nassar CA, Nassar PO, Abirached RSG, Holzhausen M, Marcantonio Júnior E, Spolidorio LC. Effect of ciclosporin A on alveolar bone homeostasis in a rat periodontitis model. *J Periodontal Res*. 2004 June; 39(3):143-8.

- 54 National Institute of Health. Consensus Development Program. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. NIH Consensus Statement. 2000 Mar.;17(1):1-45.
- 55 Nociti FH Júnior, Nogueira Filho GR, Tramontana VA, Machado MAN, Barros SP, Sallum EA, et al. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vitro study. J Periodontal Res. 2001 Dec.; 36(6):361-6.
- 56 Nogueira-Filho GD, Rosa BT, Cesar-Neto JB, Tunes RS, Tunes UD. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. J Periodontol. 2007 Apr.;78(4):730-5.
- 57 Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontol 2000. 2003; 32:11-23.
- 58 Orrico SR, Goncalves D, Galeazzi ST, Giro G, Takayama L, Pereira RM. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. J Periodontol. 2005; 76(9):1404-10.
- 59 Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals: a comparative review. New York: Korger; 1982. p.71-106.
- 60 Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000. 1997 June; 14:216-48.

- 61 Payne JB, Zachs NR, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil K. The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. *J Periodontol*. 1997 Jan.; 68(1):24-31.
- 62 Rang HP, Dale MM, Rilter JM, Moore PR. *Farmacologia*. trad.5^a .ed Rio de Janeiro: Americana; 2004. p.904.
- 63 Ricardo LH. Estudo comparativo da utilização local de tetraciclina, minociclina e ácido cítrico como coadjuvantes a instrumentação periodontal: análise histológica em ratos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2002.
- 64 Rosenberg AE. Osso, articulações e tumores de tecidos moles. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto, N. *Patologia: bases patológicas das doenças*.7^a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. Cap.26, p.1231-385.
- 65 Rovin S, Costich ER, Gordon HA The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodont Res*.1966;1:193–203.
- 66 Ruggiero R.J, Likis FE. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Women Health*. 2002 May/June; 47(3):130-8.
- 67 Sampson HW. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 Apr.; 21(2):352-9.

- 68 Souza DM. Efeito do consumo crônico de álcool na perda óssea resultante da periodontite induzida experimentalmente em ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2006.
- 69 Souza DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Rocha R F. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in periodontitis in rats. J. Appl. Oral Sci. 2006 nov./dec.;14(6):443-7.
- 70 Souza DM, Rosa LP, Ricardo LH, Moraes LC, Rocha RF. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. Ciênc Odontol Bras. 2005 out.dez.; 8(4):77-84.
- 71 Spalding M. Efeitos da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da periodontite induzida em ratas. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 72 Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000, 406p.
- 73 Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. J Periodont Res. 2002 May; 37(2):161-5.
- 74 Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. J Prosthet Dent. 1998 June; 79(6):685-90.

- 75 Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction. 2001; 262:203–212
- 76 Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. Oral Maxillofac Radiol. 2003 Apr.; 95(4):495-502.
- 77 Ten Cate R. Desenvolvimento do periodonto. In:_. Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função. 5^a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. Cap.12, p.222-37.
- 78 Teófilo JM, Azevedo ACB, Penenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TLL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. Pesqui Odontol Bras. 2003 Oct./Dec.; 17(4):302-6.
- 79 Trowbridge HO, Emling RC. Regeneração e cicatrização. In: Inflamação: uma revisão do processo, 4. ed. São Paulo: Quintessence; São Paulo, 1996. Cap. 7, p.146-7.
- 80 Vasconcellos LM, Ricardo LH, Balducci I, Vasconcellos LG, Carvalho YR. Histological analysis of effects of 24% EDTA gel for nonsurgical treatment of periodontal tissues. J Oral Sci. 2006 Dec.;48(4):207-14.
- 81 von Wowern N, Kollerup G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. J Prosthet Dent. 1992 May;67(5):656-60.

- 82 Wactawski-Wende J, Grossi SG, Trevisan M, Genco RJ, Tezal M, Dunford RG et al. The role of osteopenia in oral bone loss and periodontal disease. J Periodontol. 1996 Oct.;67(S 10):1076-84.
- 83 Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. Trends Mol Med. 2006 Jan.; 12(1):17-25.
- 84 Weinberg MA, Bral M. Laboratory animals in periodontology. J Clin Periodontol. 1999 June;26(6):335-40.
- 85 Werkman C, Senra GS, Rocha RF, Brandão AAH. Comparative therapeutic use of risedronate of *Calcareo phosphorica*- allopathy X homeopathy in bone repair in castrated rats. Bras Oral Res. 2006; 20(3):196-201.
- 86 Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. Calcif Tissue Int. 1988 Sept.;43(3):179-83.
- 87 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci. 1998 Mar.; 95(7):3597-602.

AMADEI SU. Different times of estrogen deficiency effects on bone loss induced by experimental periodontitis in female rats.[thesis]. Sao José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos. UNESP – São Paulo State University; 2007.

ABSTRACT

This study evaluated the different times of estrogen deficiency effects on loss bone induced by experimental periodontitis in female rats. Eighty female rats were used and were divided into two groups: ovariectomized-OVZ (n=40) and simulated surgery SHAM (n=40) and subdivided according to the times of estrogen deficiency (30, 60, 90 and 120 days). The animals were submitted to induced periodontitis using cotton thread in the cervical of the first inferior molar and second superior molar in opposite sides. Such ligature was kept in the last 30 days of experiment. After the sacrifice, the mandibles and maxillas were removed for radiographic, morphometric and histometric analysis. In both groups, with and without ligatures, the time and the estrogen deficiency were considered variables and ANOVA and Tukey test were applied (5%). The comparison within groups demonstrated that the ligature induced periodontitis in all analysis. In the radiographic analysis, with or without ligature, the influence of the hormonal deficiency in the decrease of the periodontal osseous support in all periods was observed, being the values in the OVZ group lower than SHAM ones. The factor time was significant at the analysis of the ligature groups, and the groups studied within 90 days presented the lowest value. Comparing the groups without ligature in the morphometric and histometric analysis, the estrogen deficiency and time effects were not verified. However, among the ligature groups, those treated within 90 days showed significant bone loss. We can conclude that reaching 90 days of estrogen deficiency it was possible an adequate study of the periodontal disease in osteopenic rats; therefore, it is the ideal period to evaluate this relation.

Key-words: ovariectomy, osteoporosis, periodontal diseases, alveolar loss bone, estrogen deficiency