



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

DANIELLA VICENSOTTO BERNARDO

**EFEITOS DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSÁTIL (CEMP)
NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATAS
OVARIECTOMIZADAS: análises histomorfométrica,
imunoistoquímica e microtomografia computadorizada
(MicroCT)**

2019

DANIELLA VICENSOTTO BERNARDO

EFEITOS DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO PULSÁTIL (CEMP) NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS: análises histomorfométrica, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada (MicroCT)

Tese apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL.

Área: Patologia. Linha de pesquisa: Inflamação e reparação tecidual.

Orientadora: Profa. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2019]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Bernardo, Daniella Vicensotto

Efeitos do campo eletromagnético pulsátil (CEMP) na doença periodontal induzida em ratas ovariectomizadas: análises histomorfométrica, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada MicroCT / Daniella Vicensotto Bernardo. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
55 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardim.

1. Doenças periodontais. 2. Osteoporose. 3. Campos eletromagnéticos. 4. Remodelação óssea. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof Dr Fabio da Silva Matuda

Universidade do Vale do Paraíba (Univap)

Faculdade de Ciência e Saúde

Campus de São José dos Campos

Prof^a Dr^a Andréa Carvalho de Marco

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a Dr^a Mariéllen Longo Vilas Boas

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a Dr^a Cibelle Barbosa Lopes

Prefeitura Municipal de São José dos Campos

São José dos Campos, 18 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

Ao Criador de tudo que é...

Aos meus pais, **Jeannette Vicensotto Bernardo** e **Nelson Bernardo** (*in memorian*), pelo carinho e dedicação. Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.

Ao meu irmão e melhor amigo, **Daniilo Vicensotto Bernardo**, pelo carinho e apoio incondicional, sem o qual não seria possível superar mais esta etapa da minha vida.

À minha orientadora, **Profª Ucha**, por me orientar desde a iniciação científica até o doutorado, pela amizade, confiança e apoio.

Às minhas amigas, **Camila Lopes** e **Camilla Magnoni Moretto Nunes**, pelo carinho, paciência e cumplicidade. Tê-las ao meu lado tornou minha caminhada mais suave e me deu forças para seguir em frente.

A todos que de alguma forma me ajudaram e torceram para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos (ICT – UNESP), pelos onze anos de acolhimento, desde a graduação até o doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profª. Assoc. Maria Aparecida Neves Jardim (Profª. Ucha), por ser minha orientadora, pela dedicação, pela amizade e por todo aprendizado.

Ao pesquisador do INPE Mario Celso Padovan de Almeida, pela construção do gerador de Campo Eletromagnético, sem ele a pesquisa não seria possível.

À Profa. Dra. Andréa Carvalho de Marco, pelo convívio fraterno, pela amizade e dedicação.

À Profa. Assoc. Mônica Fernandes Gomes, pelo convívio e por ceder gentilmente o laboratório CEBAPE, para que realizasse os meus trabalhos.

À Profa. Dra. Mariéllen Longo pela amizade e por tudo que me ensinou, sua ajuda foi muito importante.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Doutorado no período de 01/08/2016 a 28/02/2019.

Ao técnico Walter Cruz, pela grande amizade e todos os seus ensinamentos.

Às minhas amigas Camila Lopes Ferreira, Camilla Magnoni Moreto e Letícia Torquato pelo apoio, companheirismo, paciência, ensinamentos e carinho.

À todos os amigos que fiz na pós graduação.

"A ciência não é só compatível com a espiritualidade, é uma profunda fonte de espiritualidade". Carl Segan

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 PROPOSIÇÃO	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Distribuição da amostra.....	16
3.2 Procedimento cirúrgico - ovariectomia	17
3.3 Indução da DP.....	19
3.4 Exposição ao CEMP	20
3.5 Eutanásia.....	21
3.6 MicroCT	22
3.7 Processamento histológico.....	24
3.8 Análise histomorfométrica	24
3.9 Análise imunoistoquímica	25
3.9.1 Reação imunoistoquímica para detecção de OPG, RANKL e TRAP	25
3.10 Análise estatística	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Constatações clínicas	28
4.2 Resultados da análise MicroCT.....	30
4.3 Avaliação histológica na região de furca	33
4.4 Resultados da análise histomorfométrica.....	34
4.5 Resultados da análise imunoistoquímica	36
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma da amostra	17
Figura 2 - Ovariectomia	18
Figura 3 - Ligadura	19
Figura 4 - Equipamento gerador de campo elétrico pulsátil	20
Figura 5 - Representação da sequência operacional dos animais no experimento..	21
Figura 6 - Hemimandíbulas	22
Figura 7 - Planos de orientação das peças anatômicas na análise MicroCT	23
Figura 8 - Imagem da região de interesse analisada no MicroCT	23
Figura 9 – Figura ilustrativa dos úteros das ratas após a eutanásia.....	28
Figura 10 - Gráfico 1: Peso dos animais	29
Figura 11 - Gráfico 2 : Volume de tecido mineralizado (BV).....	31
Figura 12 - Gráfico 3: Volume tecidual total (TV).....	31
Figura 13 - Gráfico 4: Volume ósseo (BV/TV)	32
Figura 14 - Gráfico 5: Número de trabéculas (Tb. N)	32
Figura 15 - Gráfico 6: Espaço entre as trabéculas (Tb Sp)	33
Figura 16 - Fotomicrografias dos cortes histológicos na região de furca.....	34
Figura 17 – Gráfico 7: Perda óssea na região de furca	35
Figura 18 - Imunomarcção RANKL.....	36
Figura 19 - Imunomarcção OPG.....	37
Figura 20 - Fotomicrografias das imunomarcções do biomarcador TRAP	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média e desvio padrão referente ao peso dos animais	29
Tabela 2 - Média e desvio padrão dos dados obtidos na análise microCT	30
Tabela 3 - Média e desvio padrão obtidos na análise da perda óssea na região de furca	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ARRIVE</i>	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
BV	Volume de tecido mineralizado
BV/TV	Fração de volume ósseo
CEM	Campo eletromagnético
CEMP	Campo eletromagnético pulsátil
DE	Deficiência estrogênica
DMO	Densidade mineral óssea
DP	Doença periodontal
MicroCT	Microtomografia Computadorizada
OPG	Osteoprotegerina
Ovz	Grupo de ratas ovariectomizadas
Ovz-CEMP	Subgrupo que recebeu indução da DP e terapia com CEMP
Ovz-O	Subgrupo que recebeu indução da DP e não recebeu terapia com CEMP
RANKL	Receptor Ativador do Fator Nuclear – Kappa B ligante
ROI	Região de interesse
Sham	Grupo de ratas de ovariectomia simulada
Sham-CEMP	Subgrupo que recebeu indução da DP e terapia com CEMP
Sham-S	Subgrupo que recebeu indução da DP e não recebeu terapia com CEMP
Tb. N	Número de trabéculas
Tb. Sp	Espaço entre as trabéculas
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartaro

Bernardo DV. Efeitos do campo eletromagnético pulsátil (CEMP) na doença periodontal induzida em ratas ovariectomizadas: análises histomorfométrica, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada MicroCT [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

A doença periodontal (DP) resulta de uma infecção polimicrobiana complexa, levando à destruição dos tecidos periodontais, como consequência da perturbação da homeostase entre a microbiota subgengival e os mecanismos de defesas do hospedeiro em indivíduos suscetíveis. A deficiência estrogênica (DE) é a causa mais comum de osteoporose. A osteoporose é definida como uma doença crônica, multifatorial, provenientes de uma desordem esquelética que promove fragilidade óssea pela redução de sua massa. Vários estudos experimentais têm demonstrado que a estimulação com Campo Eletromagnético Pulsátil (CEMP) pode promover a osteogênese e potencialmente aumentar a mineralização óssea e também, reduzir a inflamação aguda e crônica em tecidos moles e duros. Frente a isso, este estudo teve como objetivo, avaliar por meio da histomorfometria, imunoistoquímica e microtomografia computadorizada (MicroCT), a influência do CEMP na DP induzida em ratas ovariectomizadas e Sham. Para a pesquisa, foram utilizadas 60 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com 3 meses de idade, pesando em torno de 300 gramas e em todos os animais a DP foi induzida. As ratas foram randomizadas em dois grupos experimentais, contendo 30 animais cada, classificados em ovariectomia simulada (Sham) e Ovariectomizada (Ovz), respectivamente. Os grupos foram divididos em dois subgrupos com 15 animais cada: Sham-S (n=15): não receberam terapia com CEMP e este foi nosso grupo controle. Sham-CEMP (n=15): receberam terapia com CEMP. Ovz-O (n=15): não receberam terapia com CEMP. Ovz-CEMP (n=15): receberam terapia com CEMP. As análises histomorfométrica, e MicroCT foram realizadas e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ambos com nível de significância convencional de 95% e não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa. Na análise semiquantitativa para os biomarcadores RANKL e OPG, o subgrupo Ovz-O apresentou maior expressão do biomarcador RANKL e menor expressão do biomarcador OPG em relação aos outros subgrupos. Na análise quantitativa da expressão do biomarcador TRAP não foi encontrado nenhuma diferença estatisticamente significativa. Apesar de não encontramos evidências significativas da terapia com CEMP na DP em ratas ovariectomizadas, o presente estudo nos sugere que o CEMP pode apresentar um efeito benéfico na remodelação óssea.

Palavras-chave: Doenças periodontais. Osteoporose. Campos eletromagnéticos. Remodelação óssea.

Bernardo DV. *Effects of the pulsed electromagnetic field (PEMF) on induced periodontal disease in ovariectomized rats: histomorphometric, immunohistochemical and computerized microtomography (microCT) analyzes [doctorate thesis].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

*Periodontal disease (PD) results from a complex polymicrobial infection, leading to the destruction of periodontal tissues as a consequence of the disturbance of homeostasis between the subgingival microbiota and the host defense mechanisms in susceptible individuals. Estrogen deficiency is the most common cause of osteoporosis. Osteoporosis is defined as a chronic, multifactorial disease from a skeletal disorder that promotes bone fragility by reducing its mass. Several experimental studies have shown that Pulsed Electromagnetic Field (PEMF) stimulation can promote osteogenesis and potentially increase bone mineralization and also reduce acute and chronic inflammation in soft and hard tissues. The aim of this study was to evaluate, through histomorphometry, immunohistochemistry and computerized microtomography (MicroCT), the influence of PEMF on PD induced in ovariectomized and Sham rats. For the research, 60 adult rats (*Rattus norvegicus*, albinus variant, Wistar) at 3 months of age, weighing around 300 grams were used and in all animals PD was induced. The rats were randomized into two experimental groups, containing 30 animals each, classified as simulated ovariectomy (Sham) and Ovariectomized (Ovz), respectively. The groups were divided into two subgroups with 15 animals each: Sham-S (n = 15): did not receive PEMF therapy and this was our control group. Sham-PEMF (n = 15): received PEMF therapy. Ovz-O (n = 15): did not receive PEMF therapy. Ovz-PEMF (n = 15): received PEMF therapy. The histomorphometric and MicroCT analyzes were performed and the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test, both with a 95% significance level and did not present any statistically significant difference. In the semiquantitative analysis for RANKL and OPG biomarkers, the Ovz-O subgroup showed higher expression of the RANKL biomarker and lower expression of the OPG biomarker in relation to the other subgroups. In the quantitative analysis of TRAP biomarker expression no statistically significant difference was found. Although we did not find significant evidence of PEMF therapy in PD in ovariectomized rats, the present study suggests that PEMF may have a beneficial effect on bone remodeling.*

Keywords: *Periodontal diseases. Osteoporosis. Eletromagnetic fields. Bone remodeling.*

1 INTRODUÇÃO

As doenças periodontais geralmente são de natureza crônica inflamatória que se resulta de uma infecção polimicrobiana complexa, levando à destruição dos tecidos periodontais, como consequência da perturbação da homeostase entre a microbiota subgingival e os mecanismos de defesas do hospedeiro em indivíduos suscetíveis (Sanz et al., 2011; Mouchrek Júnior et al., 2017). Dentre os tipos de doença periodontal (DP), a DP crônica é a forma mais comum (Haffajee et al., 1994). Tem sido estabelecido que o biofilme bacteriano é o agente etiológico da DP (Baek et al., 2012) que consiste em mais de 700 espécies bacterianas diferentes e seus produtos (Kroes et al., 1999; Paster et al., 2001). A DP é causada principalmente por bactérias gram-negativas e também é conhecida por ser um fator de risco para muitas doenças sistêmicas (Moutsopoulos et al., 2012; Otomo-Corgel et al., 2012). Os fatores sistêmicos são o estado nutricional, distúrbio hematológico e anormalidade hormonal (Petersen, Ogawa, 2012; Reynolds, 2014).

A deficiência estrogênica (DE) é a causa mais comum de osteoporose, porém a ação do hormônio estrógeno sobre o tecido ósseo ainda não foi claramente definida, embora se saiba que ele influencia na diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas em osteoclastos e participa da regulação de citocinas e de fatores locais envolvidos nos mecanismos de remodelação óssea (Tenório et al., 2005; Eftekhari et al., 2018).

A osteoporose é definida como uma doença crônica, multifatorial, determinada por interações entre fatores ambientais e genéticos, provenientes de uma desordem esquelética que promove fragilidade óssea pela redução de sua massa. Tal desordem acarreta no comprometimento da resistência óssea e alteração da microarquitetura do osso que, em conjunto, vão contribuir para uma maior propensão de fraturas ósseas ao mínimo trauma (Giampietro et al., 2010; Gao et al., 2011). O aumento da variabilidade da densidade mineral óssea (DMO) induzida pela DE pode comprometer a estabilidade mecânica do osso alveolar de suporte dos dentes (Ames et al., 2010). A DE afeta sistematicamente a remodelação óssea através da sinalização RANKL (Receptor Ativador do Fator Nuclear – Kappa B ligante) / OPG (osteoprotegerina) durante os eventos que modulam a diferenciação

celular dos osteoclastos e o desenvolvimento de linfócitos (Luvizuto et al., 2010a, 2010b). Após a menopausa, a perda óssea está relacionada com a preferência da atividade de RANKL em relação à OPG/RANKL é o principal fator estimulante para a diferenciação, desenvolvimento, maturação, ativação e sobrevivência dos osteoclastos (Tera et al., 2014a, 2014b; Tella, Gallagher, 2014; Thummuri et al., 2018).

Os agentes farmacológicos comumente utilizados para o tratamento da osteoporose incluem agentes anabólicos capazes de aumentar a formação óssea, como o hormônio da paratireóide e o uso de agentes anti-reabsortivos, como bisfosfonatos, calcitonina, inibidores de RANKL, raloxifeno e terapia de reposição de estrogênio (Das, Crockett, 2013). Apesar destas várias opções, não existe uma única opção capaz de restaurar totalmente a perda óssea e o uso de terapia com bifosfonatos (uma das principais opções de tratamento para prevenção de perda de massa óssea em pacientes com osteoporose) está associada a vários efeitos colaterais incluindo doenças gastrointestinais, osteonecrose da mandíbula, fraturas femorais atípicas (Rizzoli et al., 2011) e interrupção do ciclo de remodelação óssea (Dai et al., 2016).

Os efeitos dos campos electromagnéticos (CEM) em sistemas biológicos têm sido pesquisados por séculos (Nursal et al., 2006). Nos anos 70, Bassett et al. (1974) pela primeira vez encontraram evidências de que o tratamento com campo eletromagnético pulsátil (CEMP) era capaz de acelerar a consolidação de fraturas ósseas em pacientes. Nas últimas quatro décadas, estudos mostram que a terapia utilizando CEMP como um método não invasivo e alternativo é capaz de produzir efeitos terapêuticos satisfatórios em uma ampla gama de doenças ósseas, tais como, fraturas recentes e desunidas (Bassett et al., 1982; Assiotis et al., 2012), osteoartrite (Thamsborg et al., 2005; Ryang et al., 2013; Yang et al., 2018) e osteoporose (Jing et al., 2013; Androjna et al., 2014).

Vários estudos experimentais têm demonstrado que a estimulação com CEMP pode promover a osteogênese e potencialmente aumentar a mineralização óssea. (Rubin et al., 1989; Diniz et al., 2002; Chang et al., 2003; Zhang et al., 2007; Shen, Zhao, 2010; Jing et al., 2010, 2011).

O CEMP tem demonstrado ser uma terapia emergente para o tratamento tanto da inflamação aguda quanto crônica (Selvam et al., 2007; Hedén et al., 2008;

Akan et al., 2010; Rawe et al., 2012). Rohde et al. (2010, 2015) demonstraram que a terapia com CEMP reduziram significativamente os níveis de interleucina-1 β e exudado inflamatório em pacientes submetidas à cirurgia de reconstrução de mama.

Investigações clínicas revelaram que CEMP poderia ajudar a aumentar a DMO e reduzir o risco de fraturas em pacientes com osteoporose (Tabrah et al.,1990; Eyres et al.,1996; Garland et al.,1999). Apesar de terem sido encontrados resultados positivos, as vias de sinalização exatas e seus mecanismos regulatórios associados da terapia CEMP em osteopenia/osteoporose ainda não estão claros (Jing et al., 2013).

A aplicação da terapia com CEM na área médica encontra-se em crescentes pesquisas. Dados substanciais indicam que campos eletromagnéticos podem levar à melhora significativa na cura de tecidos moles e duros. Frente a isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do CEMP na DP induzida em ratas com ou sem DE.

2 PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar por meio da análise histomorfométrica, imunistoquímica e microtomografia computadorizada (MicroCT) a influência do campo eletromagnético pulsátil na doença periodontal induzida em ratas ovariectomizadas e normais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para manipulação experimental foram realizados de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo “*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*” (ARRIVE).

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com animais do Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT –UNESP), registrado com o nº 013/2016 e as ratas foram obtidas do biotério central da UNESP - Campus de Botucatu.

Foram utilizadas 60 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com 3 meses de idade, pesando em torno de 300 gramas. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas à temperatura ambiente (22°C), alimentadas com ração da marca Guabi Nutrilabor® e água *ad libitum*.

3.1 Distribuição da amostra

O estudo foi desenvolvido para detectar uma mínima diferença significativa da perda óssea na região de furca de 0,7 mm entre os subgrupos, usando $\alpha = 0,05$. O tamanho da amostra foi calculado utilizando um *power* de 80% e um desvio padrão de 0,5 mm, conforme descrito anteriormente por Nogueira-Filho et al, (2007).

As 60 ratas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos contendo 30 animais cada, compreendidos em Sham (ovariectomia simulada) e ovariectomizadas (Ovz), respectivamente.

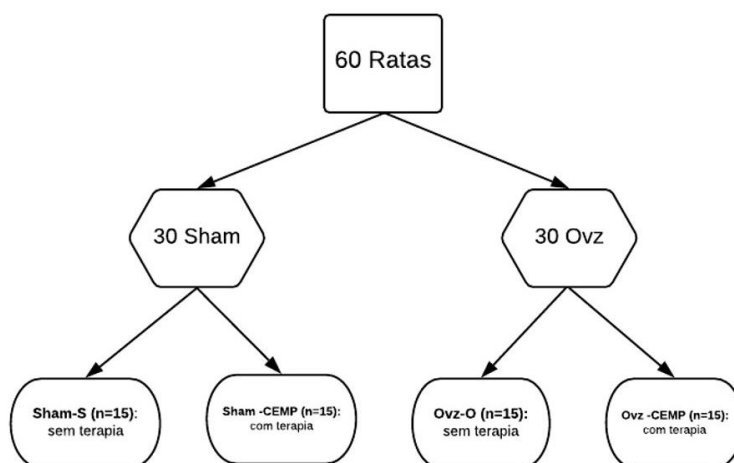
Os grupos Sham e Ovz foram randomizados em dois subgrupos com 15 animais cada, totalizando quatro subgrupos no experimento, que são:

- a) **Sham - S (n=15)**: os animais receberam na mandíbula direita a indução à DP e não receberam a terapia com CEMP. Este foi o nosso grupo controle;
- b) **Sham – CEMP (n=15)**: os animais receberam na mandíbula direita a indução à DP + terapia com CEMP;

- c) **Ovz – O (n=15)**: os animais receberam na mandíbula direita a indução à DP e não receberam a terapia com CEMP;
- d) **Ovz – CEMP (n=15)**: os animais receberam na mandíbula direita a indução à DP + terapia com CEMP.

A (Figura 1) ilustra o fluxograma com a distribuição da amostra.

Figura 1 – Fluxograma da amostra



Legenda: Fluxograma da distribuição da amostra.
Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2 Procedimento Cirúrgico – ovariectomia

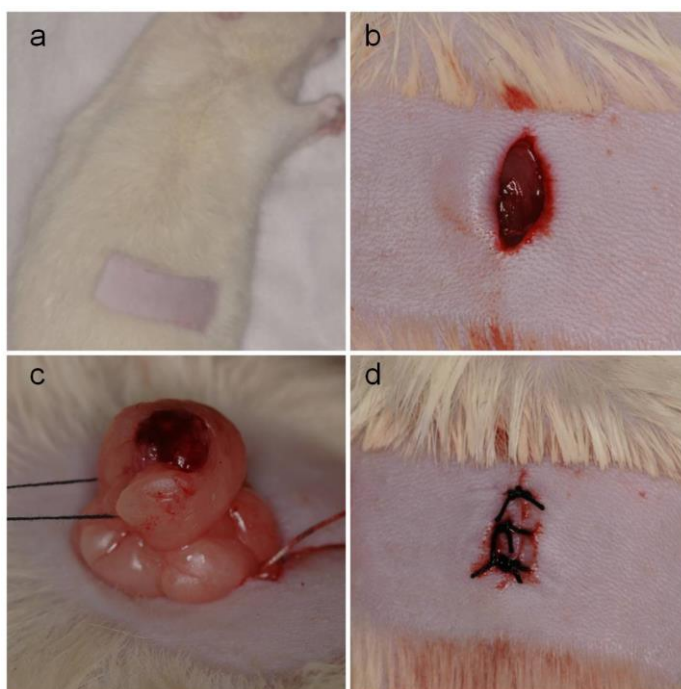
Para a realização das cirurgias de ovariectomia bilateral e indução da DP, os animais foram anestesiados com a associação de cloridrato de Xilazina (Rompum – Bayer® do Brasil) e ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil) por via intramuscular. Após a administração da anestesia, os pesos das ratas foram mensurados e anotados.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral para se obter visualização e fácil acesso ao flanco lateral. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região com lâminas de barbear (Gillete® Brasil) e, após a anti-sepsia da região com

digluconato de clorexidina a 0,2 %, foi feita uma incisão longitudinal de 1 cm na pele, logo abaixo da costela, com a lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo de bisturi BardParker®. O tecido subcutâneo foi divulsionado e o muscular incisionado para acessar a cavidade abdominal. Com o auxílio de uma pinça, o ovário foi tracionado para fora da cavidade abdominal e, após a amarra da vasculatura local com fio de sutura, realizou-se a excisão. Em seguida, a região foi suturada tanto da camada muscular com fio de sutura 5,0 absorvível de poligalactina 910 (ETHICON – Johnson & Johnson®) quanto da pele com fio de seda 4.0 (ETHICON – Johnson & Johnson®). O procedimento descrito foi realizado primeiramente no decúbito lateral direito e depois no esquerdo (Figura 2).

Nos animais do grupo Sham foi realizada a ovariectomia simulada, que consiste na exposição, tracionamento e devolução dos ovários na cavidade abdominal sem a realização da excisão cirúrgica, assim, todos os animais estiveram submetidos às mesmas condições de estresse.

Figura 2 - Cirurgia de ovariectomia



Legenda: Ovariectomia - a) posição em decúbito lateral, tricotomia e assepsia da região abdominal; b) incisão linear; c) exposição e amarra da vasculatura local para excisão do ovário; d) sutura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

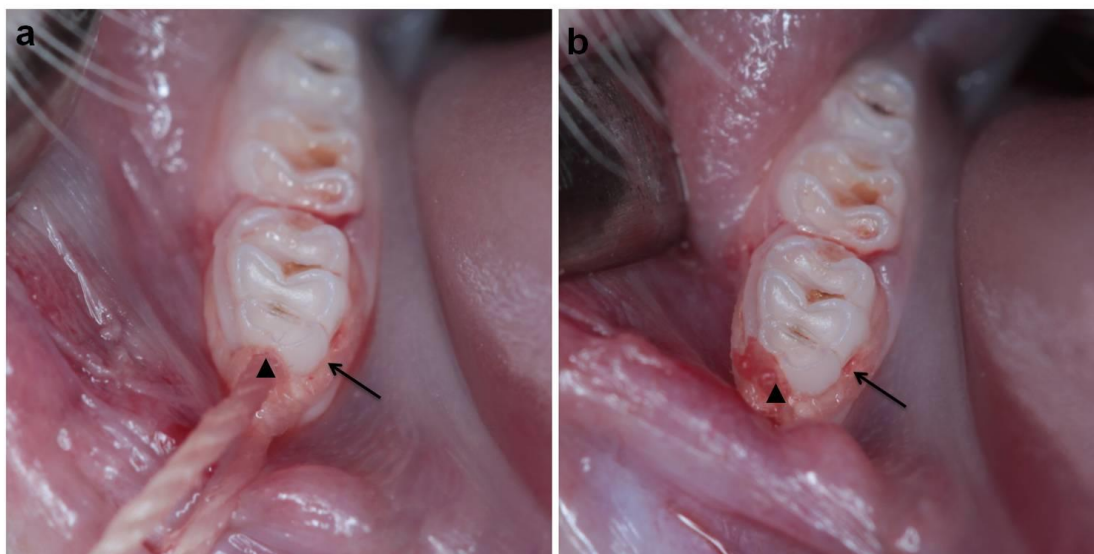
3.3 Indução da DP

Os animais receberam a indução da DP por um único cirurgião experiente e treinado que estava cego em relação aos subgrupos.

Os animais foram anestesiados e a ligadura para a indução da doença periodontal foi uma linha 100% algodão, nº10 (Corrente® – Ind. Brasileira) que foi posicionada na região cervical do primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado em penetrar o fio no sulco gengival, portanto, em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (Figura 3).

A ligadura foi mantida durante todo o período experimental.

Figura 3 – colocação da ligadura



Legenda: Ligadura a e b - ▲ nó da ligadura na região mesial, (→) ligadura em íntimo contato com o sulco gengival.

Fonte: Elaborada pelo autor.

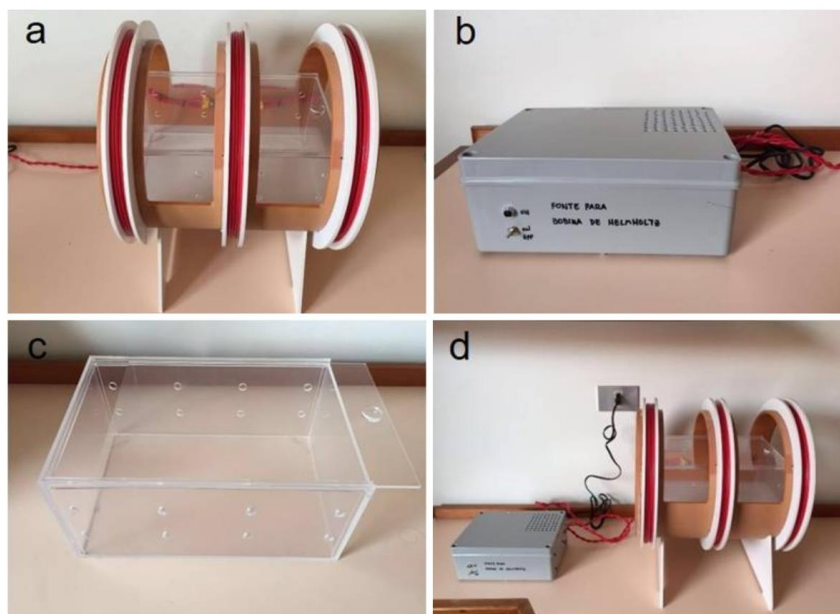
A exposição ao CEMP iniciou-se sete dias após a instalação da ligadura. Holzhausen et al. (2002) demonstraram que há perda óssea alveolar significativa em doença periodontal induzida por ligadura em ratos a partir deste período.

3.4 Exposição ao CEMP

O dispositivo de exposição do CEMP é composto por um gerador de sinal pulsátil e as bobinas de Helmholtz. As ratas foram submetidas à exposição do CEMP com os seguintes parâmetros fixos: 25 ciclos de -1mTesla a + 1mTesla em 200 microssegundos que se repete a taxa de 15 Hz (Figura 4). O tempo de exposição ao CEMP foi de 3 horas por dia, por 21 dias até a eutanásia (Midura et al., 2005; Androjna et al., 2014).

A gaiola contendo os 5 animais de cada subgrupo foi posicionada bem no centro do campo gerado pelas bobinas de Helmholtz. As ratas dos subgrupos sem a exposição do CEMP também foram colocadas no conjunto de bobina e CEMP, porém estavam inativadas, pois o intuito foi á apenas simular a estimulação (Tucker et al., 2016).

Figura 4 - Equipamento gerador de campo eletromagnético pulsátil



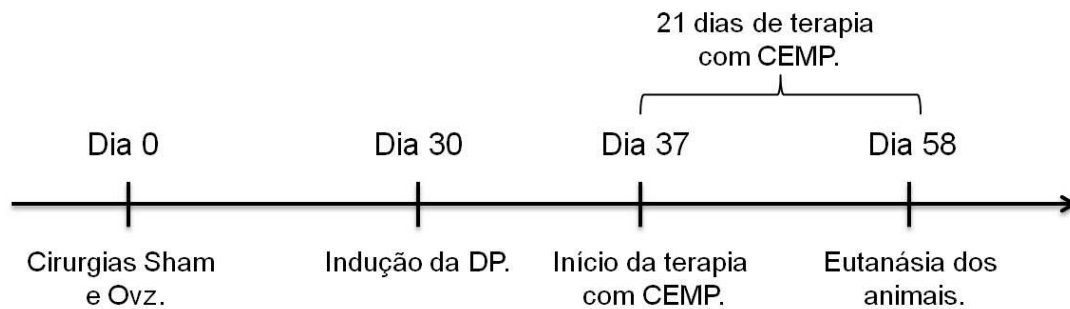
Legenda: Equipamento gerador de campo elétrico pulsátil - a) bobinas de Helmholtz; b) fonte de energia; c) caixa acrílica para acondicionamento dos animais; d) conjunto formado pelas bobinas, fonte e caixa acrílica.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 Eutanásia

Após o período experimental as ratas foram anestesiadas com sobredose de anestésico, pesadas e eutanasiadas. O fluxograma abaixo apresentará resumidamente toda a sequência operacional dos animais no experimento (Figura 5).

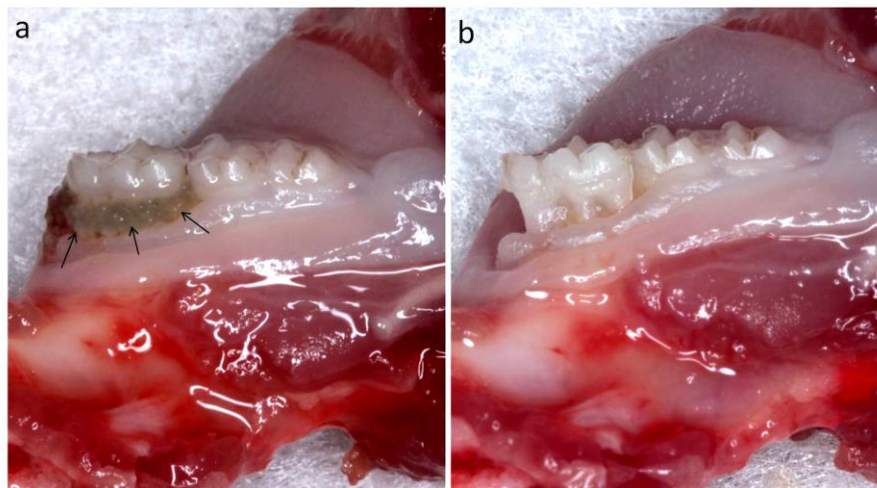
Figura 5 - Representação da sequência operacional dos animais no experimento



Legenda: Representação da sequência operacional dos animais do início ao fim do experimento.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Para confirmar o sucesso da ovariectomia, a análise macroscópica dos cornos uterinos foi realizada em todos os animais (Carvalho et al., 2006; Romualdo et al., 2018). As hemimandíbulas direitas foram separadas, removeram-se as ligaduras (Figura 6) e foram fixadas em solução de paraformaldeído tamponado 4% durante 48 horas. Passado este período, as peças foram lavadas em água corrente e 10 espécimes de cada subgrupo foram desmineralizados em Ácido etileno-amino-tetracético (EDTA) à 10%. Os outros 5 espécimes de cada subgrupo foram armazenados em álcool 70% para a realização do MicroCT. Após o procedimento da captura das imagens estes 5 espécimes também foram desmineralizados para a realização das análises histomorfométrica.

Figura 6 – Hemimandíbula direita após a eutanásia antes e depois da remoção da ligadura



Legenda: Hemimandíbulas - a) Hemimandíbula com a ligadura, (→) ligadura; b) Hemimandíbula após a remoção da ligadura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.6 MicroCT

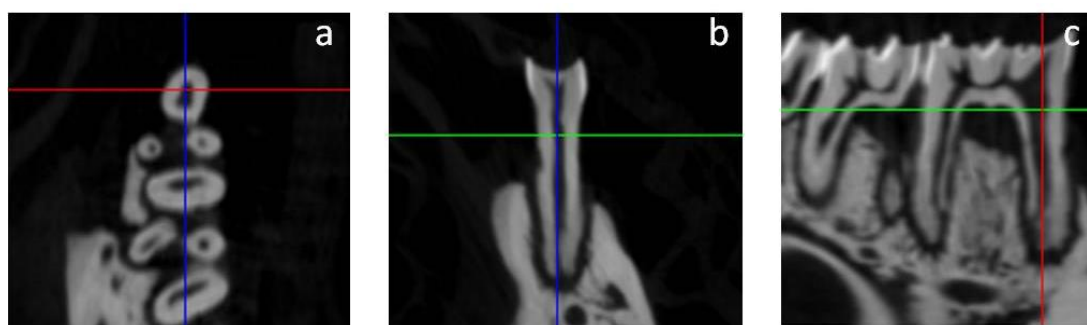
As imagens MicroCT dos 5 espécimes conservados em álcool 70% foram feitas no microtomógrafo Skyscan 1176, Aatselaar, Bélgica, 2003 (Processo 2009/54080-0 FAPESP - Programa Equipamentos Multiusuários) no laboratório de Microtomografia in vivo da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

As hemimandíbulas de cada animal foram posicionadas no equipamento para obtenção das imagens tomográficas.

Após obtenção das imagens, estas foram reconstruídas utilizando o software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0. Por meio do software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens reconstruídas foram orientadas e padronizadas nos planos coronal, transaxial e sagital (Figura 7). Com os três planos alinhados, o eixo coronal (Figura 7a) foi escolhido para se realizar a medição volumétrica. Esta escolha foi baseada para facilitar e se obter uma padronização em todas as amostras. Utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foi determinada a região de interesse (ROI),

na região de furca, entre as raízes do primeiro molar inferior. Cinquenta cortes com $18\mu\text{m}$ de espessura foram utilizados para propiciar a interpolação dos ROIs, ou seja, fazê-los unidos em uma só estrutura, para permitir o cálculo 3D dos índices volumétricos. A figura escolhida para a interpolação dos ROIs foi uma figura geométrica na forma de um retângulo (Figura 8), no qual todos os lados tangenciaram as raízes do primeiro molar inferior. A metodologia da escolha de uma figura geométrica para análise da região de interesse está documentada na literatura (Xu et al., 2013).

Figura 7 – Planos de orientação da peça anatômica



Legenda: a) Eixo coronal; b) Eixo transaxial; c) Eixo sagital.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 8 – Região de interesse (ROI)



Legenda: Imagem da escolha da forma geométrica: O retângulo vermelho é o guia para direcionar o local da região de interesse (ROI). Ele ficou posicionado de tal modo que os seus lados pudessem tocar a face de cada uma das raízes, em todos os “cortes” que compõem o ROI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os parâmetros analisados através do MicroCT foram: o volume de tecido mineralizado (BV); o volume total de tecido, medidos pelos contornos na área de interesse (TV); fração de volume ósseo, ou seja, a proporção do volume de osso ao volume total (BV/TV); O número de trabéculas (Tb. N) e o espaço entre trabéculas (Tb.Sp).

3.7 Processamento histológico

Após a desmineralização, cada espécime foi incluído no sentido da superfície de corte em bloco de parafina. Os cortes foram obtidos no sentido mesio-distal. Para a análise histomorfométrica os blocos de parafina foram submetidos a cortes seriados de 5 µm e a coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE – Merck & Co, Inc.) e para a análise imunoistoquímica foram feitos cortes seriados com 4 µm de espessura e estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma Chemical CO., St.Louis, USA).

3.8 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi feita através da captura de imagens dos cortes histológicos, a partir de um microscópio de luz *Axiophot* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital *AxioCam MRc* (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional *AxioVision Release 4.7.2*. A ferramenta utilizada para mensuração histomorfométrica foi o programa computacional NIH Image J 1.35, de domínio público. Foi mensurada a área entre a crista óssea e cimento na região de furca do primeiro molar inferior direito. A análise histomorfométrica seguiu o protocolo de medição da área de perda óssea na região de furca do laboratório de Patologia do ICT-Unesp, em São José dos Campos.

Antes de realizar as medições oficiais, o examinador foi avaliado para verificar a validade e a confiabilidade dos resultados. A determinação de

concordância intraexaminador descrita por Eklund et al. (1993) foi realizada e o coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado em medições testes. O examinador mensurou vinte lâminas, duas vezes em dias sucessivos e o valor coeficiente de correlação de Pearson foi 0,943, o que demonstrou forte correlação entre as mensurações, pois o valor foi bem próximo a 1. A partir dessa padronização, todas as medições histomorfométricas foram feitas.

As imagens possuíam códigos que não permitiam a identificação dos subgrupos ao qual pertenciam, possibilitando uma análise cega dos dados. Os dados foram tabulados e submetidos à análise estatística.

3.9 Imunoistoquímica

No processamento imunoistoquímico foram utilizados os marcadores: osteoprotegerina (OPG), Receptor Ativador do Fator Nuclear – Kappa B ligante (RANKL) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Estes marcadores ósseos fornecem informações importantes sobre metabolismo ósseo, pois apresentam participação na proliferação, apoptose e reabsorção óssea (Rogers, Eastell, 2005; Halleen et al., 2006).

3.9.1 Reação imunoistoquímica para detecção de OPG, RANKL e TRAP

As amostras receberam processamento imunoistoquímico seguindo o protocolo descrito: Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão citrato, pH 6,0 (EP-12- 20557 Easy Path), em câmara pressurizada (Decloakingchamber®, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) com dois ciclos de temperatura, a 93°C, por 4 minutos e 70°C, por 25 segundos.

No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em PBS-triton 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente.

As lâminas contendo amostras de cada grupo foram divididas em três lotes, e cada lote foi incubado com um dos seguintes anticorpos primários: *anti-RANKL* - (1:100, Goat anti-RANKL, SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), *anti-OPG* (1:200, Goat anti-OPG, SC-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e *anti-TRAP* (1:100, Goat anti-TRAP, SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA).

Os anticorpos primários foram colocados em solução diluente do anticorpo (Spring ADS-125) e as lâminas foram colocadas em uma câmara úmida durante 16–18 horas a 4°C de temperatura. Após as 18 horas, os cortes histológicos foram incubados com anticorpo secundário histofine (Easy Link one EP-12-20501) por 30 minutos em temperatura ambiente (22 a 25 °C).

Foi realizada a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e a contracoloração com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

Um examinador cego ao estudo selecionou as lâminas para a análise imunoistoquímica. Outro examinador calibrado e cego ao experimento conduziu a análise dos dados. As análises quantitativa e semi-quantitativa foram efetuadas três vezes pelo mesmo examinador em dias diferentes para reduzir a variação dos dados (Garcia et al., 2013, 2014).

Foram analisados 2 cortes de 5 espécimes de cada subgrupo. As imunomarcações foram visualizadas em microscópio óptico com sistema de captura e de análise de imagem *AxioVision*.

Para os biomarcadores RANKL e OPG foi feita a análise semiquantitativa da imunomarcação em toda área de furca, com um aumento de 400x (Garcia et al., 2013) e foi adotada uma modificação dos critérios estabelecidos por (Buduneli et al., 2007), onde o escore estabelecido são:

- a) escore 0 – ausência de imunomarcção (ausência total de células imunorreativas -IR);
- b) escore 1- baixo padrão de imunomarcção (1/4 das células-IR);
- c) escore 2- moderado padrão de imunomarcção (1/2 das células-IR);
- d) escore 3- alto padrão de imunomarcção (3/4 das células-IR).

Os escores de RANKL e OPG foram individualmente analisados em cada grupo experimental.

Na imunomarcção para o biomarcador TRAP foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no compartimento citosólico das células positivas. A imunomarcção para TRAP foi realizada pela contagem de células TRAP-positivas localizada na região de furca dos primeiros molares inferiores (Theodoro et al., 2015) com um aumento de 400x.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos através da mensuração do peso dos animais e do MicroCT foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 18) e GraphPad Prism 5.0, (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Para a análise histomorfométrica e imunoistoquímica foi utilizado o programa computacional R (R Core Team, 2017).

A estatística descritiva foi realizada através cálculo de médias e desvio padrão, enquanto que a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (*one way ANOVA*) seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

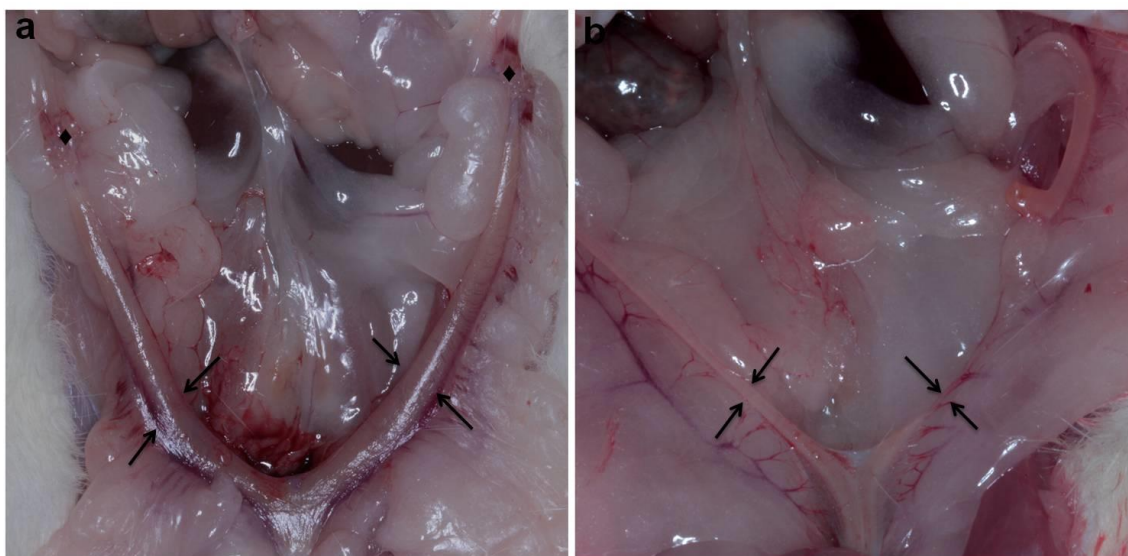
Para o cálculo da imunomarcção TRAP foi utilizado o teste exato de Fisher, com nível de detecção de significância $\alpha = 0,05$. É um teste de significância estatística aplicado a tabelas de contingência de dados categóricos (Fisher, 1962; Agresti, 2002).

4 RESULTADO

4.1 Constatações clínicas

A análise macroscópica dos cornos uterinos após a eutanásia (Figura 9) confirmou o sucesso da ovariectomia, pois no grupo Sham se apresentaram róseos e volumosos, enquanto no grupo Ovz estavam atróficos e anêmicos.

Figura 9 – Cornos uterinos após a eutanásia



Legenda: Figura ilustrativa dos úteros das ratas após a eutanásia - a) Útero encontrado na presença de estrógeno: vascularizado, róseo e volumoso (→) e ovários (◆); b) Útero encontrado na deficiência de estrógeno: atrófico e anêmico (→).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Comparando-se os pesos das ratas desde o início até o final do experimento observa-se que os animais ganharam peso nesse período. No entanto, desde o momento das cirurgias até o dia da eutanásia todos os animais apresentaram a média de peso sem diferença estatística significativa.

Os dados da estatística descritiva (média±desvio padrão) obtidos do peso corpóreo dos animais estão representados na tabela 1, mostrada a seguir.

Tabela 1 - Média e desvio padrão referente ao peso dos animais

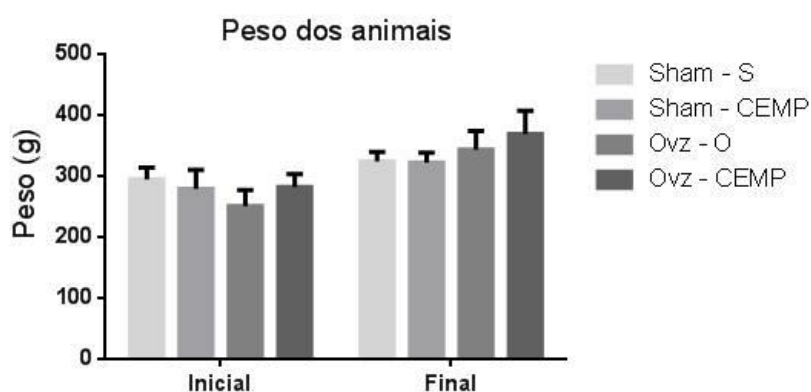
Períodos	Subgrupos			
	Sham-S	Sham -CEMP	Ovz-O	Ovz - CEMP
Inicial	279±31,04	294,26±19,72	281,4±21,06	257,73±24,02
Final	321,8±16,59	324,13±15,6	343±30,86	369,13±38,3

Legenda: Médias e desvio padrão referente ao peso dos animais realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 1 (Figura 10) referente aos valores médios e desvio padrão do peso dos animais, não apresenta diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo e intersubgrupo.

Figura 10 – Peso dos animais



Legenda: Médias e desvio padrão referente aos pesos dos animais realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2 Resultados da análise MicroCT

Os dados da estatística descritiva (média \pm desvio padrão) obtidos das análises MicroCT (BV, TV, BV/TV, Tb. N e Tb. Sp) estão apresentados na tabela 2, mostrada a seguir:

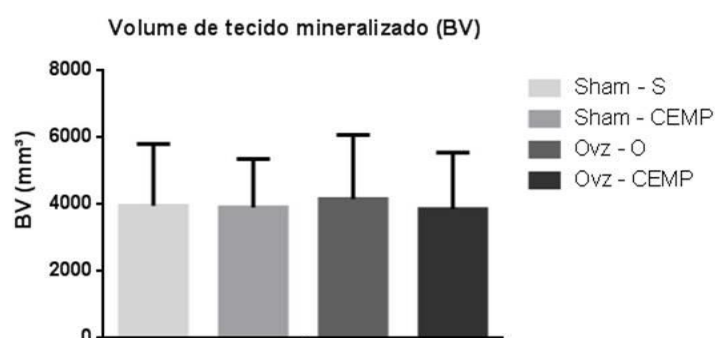
Tabela 2 – Médias e desvio padrão dos dados obtidos na análise microCT

Parâmetros	Subgrupos			
	Sham-S	Sham-CEMP	Ovz-O	Ovz –CEMP
BV (mm³)	3,94 \pm 1,84	3,89 \pm 1,45	3,98 \pm 1,91	3,85 \pm 1,68
TV (mm³)	9143 \pm 1623,68	10935 \pm 898	10079 \pm 922,03	9334 \pm 1094,96
BV/TV (%)	41 \pm 14,64	39 \pm 19,95	42 \pm 20,3	49 \pm 14,29
Tb. N (mm⁻¹)	0,0089 \pm 0,0017	0,0086 \pm 0,0007	0,009 \pm 0,0014	0,0093 \pm 0,001
Tb. Sp (mm)	0,35 \pm 0,47	0,35 \pm 0,34	0,34 \pm 0,44	0,35 \pm 0,37

Legenda: Médias e desvio padrão realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$). (BV); volume total de tecido, medidos pelos contornos na área de interesse (TV); fração de volume ósseo (BV/TV); número de trabéculas (Tb. N) e o espaço entre as trabéculas (Tb. Sp).
Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 2 (Figura 11) referente aos valores médios e desvio padrão do BV, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 11 – Gráfico do volume de tecido mineralizado (BV)

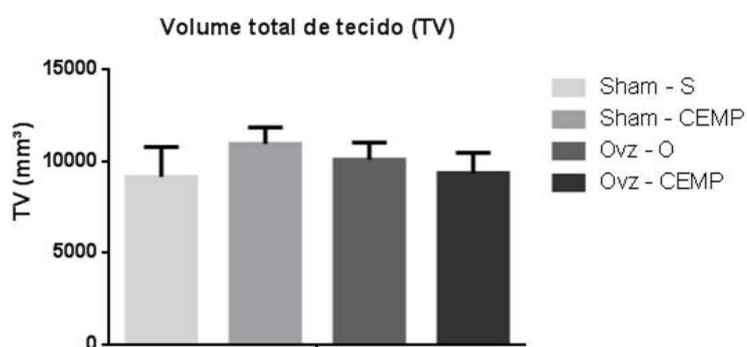


Legenda: Médias e desvio padrão referente ao volume de tecido mineralizado (BV) realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 3 (Figura 12) referente aos valores médios e desvio padrão do TV, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 12 – Gráfico do volume de tecido (TV)

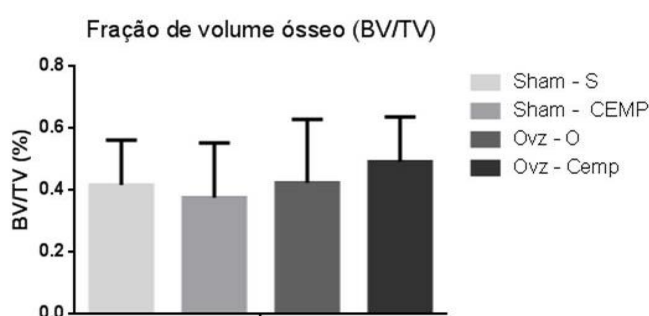


Legenda: Médias e desvio padrão referente ao volume tecidual total (TV) realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 4 (Figura 13) referente aos valores médios e desvio padrão do BV/TV, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 13 – Gráfico da fração de volume ósseo (BV/TV)

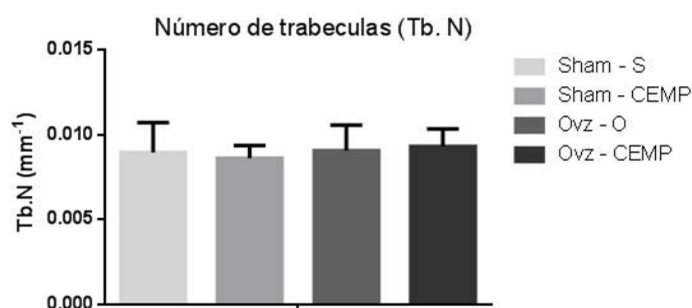


Legenda: Médias e desvio padrão referente à fração de volume ósseo (BV/TV) realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 5 (Figura 14) referente aos valores médios e desvio padrão do Tb. N, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 14 – Gráfico do número de trabéculas

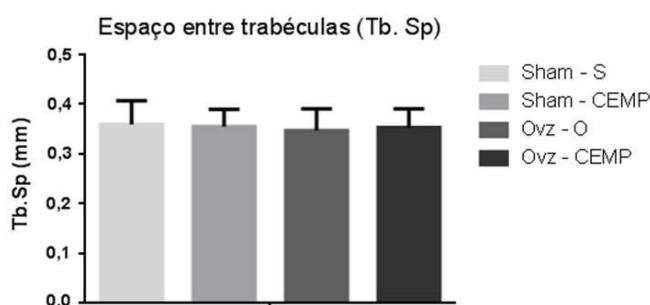


Legenda: Médias e desvio padrão referente ao número de trabéculas (Tb. N) realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 6 (Figura 15) referente aos valores médios e desvio padrão do Tb. Sp, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 15 – Gráfico do espaço entre trabéculas



Legenda: Médias e desvio padrão referente ao espaço entre trabéculas (Tb. Sp) realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

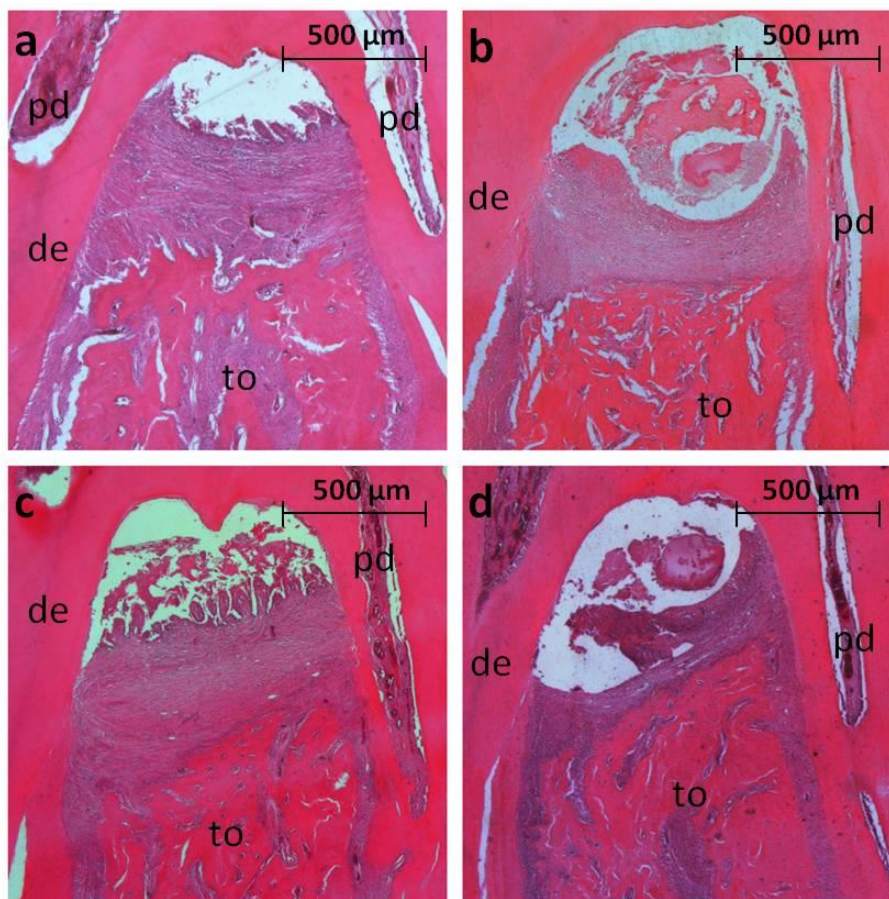
Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Avaliação histológica na região da furca

Na região da furca, todos os subgrupos apresentaram tecido conjuntivo desorganizado com infiltrado inflamatório, destruição do ligamento periodontal, áreas de reabsorções ósseas alveolares e cementárias.

A Figura 16 representa as fotomicrografias dos cortes histológicos do primeiro molar inferior direito na região de furca.

Figura 16 – Fotomicrografias dos cortes histológicos do primeiro molar inferior direito na região de furca



Legenda: Fotomicrografias dos cortes histológicos do primeiro molar inferior direito na região de furca - a) Subgrupo Sham-S; b) Subgrupo Sham-CEMP; c) Subgrupo Ovz-O e d) Subgrupo Ovz-CEMP. (de) dentina; (pd) polpa dentária e (to) tecido ósseo. Aumento original 25X. Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Resultados da análise histomorfométrica

Os dados da estatística descritiva (média \pm desvio padrão) obtidos da análise histomorfométrica da perda óssea na região de furca estão apresentados na tabela 3, mostrada a seguir:

Tabela 3 – Médias e desvio padrão dos dados obtidos na análise da perda óssea na região de furca

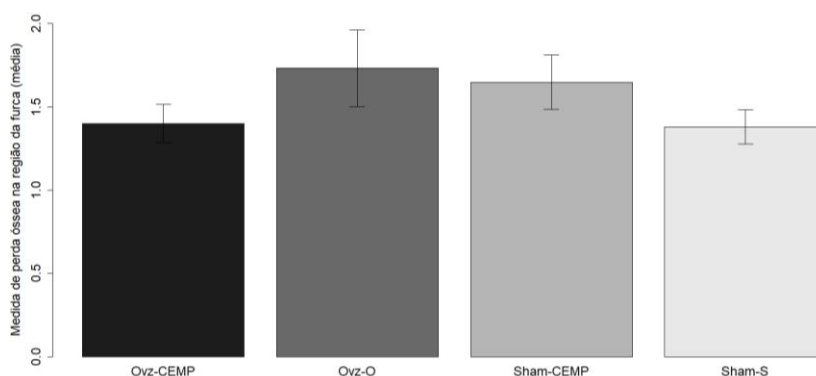
Parâmetro	Subgrupos			
	Sham-S	Sham -CEMP	Ovz-O	Ovz - CEMP
Perda óssea (mm²)	1,38±1,10	1,64±1,03	1,73±1,0	1,39±1,01

Legenda: Médias e desvio padrão referente a perda óssea na região de furca realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

O gráfico 7 (Figura 17) referente aos valores médios e desvio padrão da análise histomorfométrica da perda óssea na região de furca, não apresentou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

Figura 17 – Gráfico da análise histomorfométrica da perda óssea na região de furca



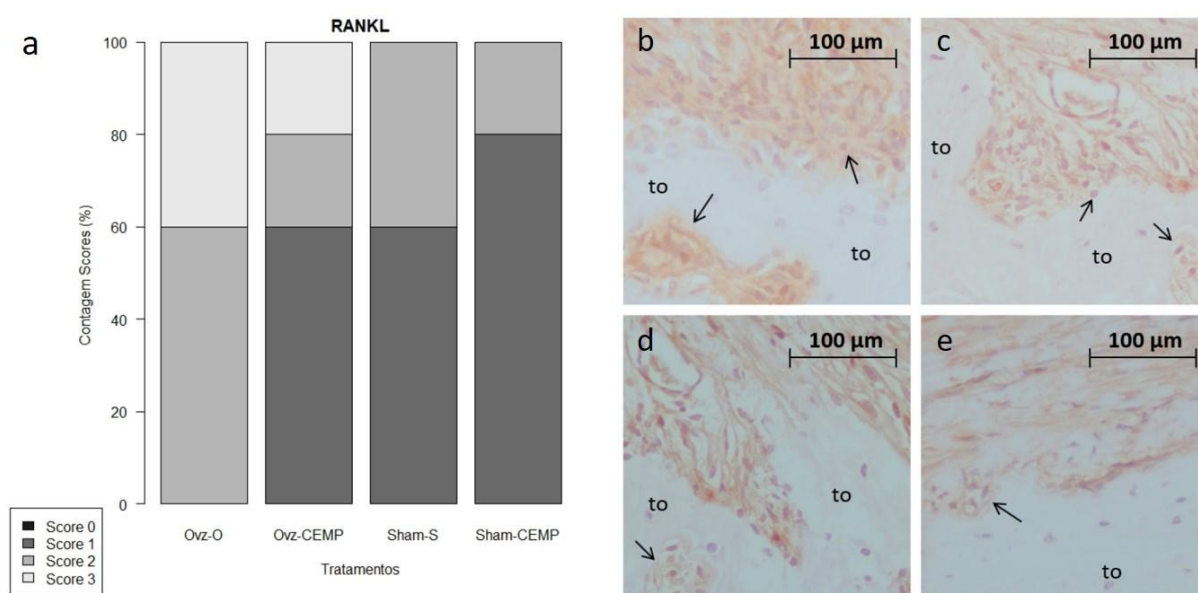
Legenda: Médias e desvio padrão referente a análise histomorfométrica da perda óssea na região de furca realizada através da análise de variância ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*, ambos ao nível de significância convencional de 95% ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5 Resultados da análise imunoistoquímica

A expressão do biomarcador RANKL na região de furca dos primeiros molares inferiores apresentou-se com maior frequência no subgrupo Ovz-O em relação aos outros subgrupos (Figura 18).

Figura 18 – Gráfico 8 e imagens da imunomarcacão para o biomarcador RANKL na região de furca nos primeiros molares inferiores direito

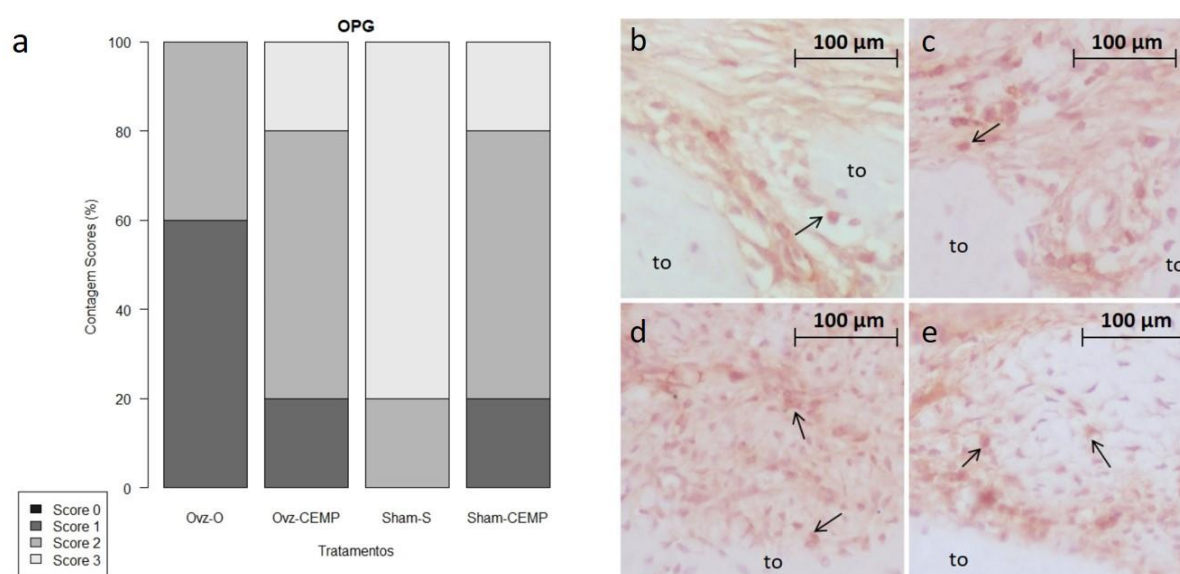


Legenda: Imunomarcacão para RANKL - a) Gráfico 8 mostrado a distribuicão dos Scores (em porcentagem) referente ao padrã de imunomarcacão para RANKL. Fotomicrografias das imunomarcacões do biomarcador RANKL na região de furca dos primeiros molares inferiores direito - b) Subgrupo Ovz-O - com alto padrã de imunomarcacão; c) Subgrupo Ovz-CEMP - com moderado padrã de imunomarcacão; d) Subgrupo Sham-S - com moderado padrã de imunomarcacão e e) Subgrupo Sham-CEMP - com baixo padrã de imunomarcacão. (→) osteoclasto e (to) tecido ósseo. Aumento original 400x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O biomarcador OPG na região de furca dos primeiros molares inferiores apresentou-se com menor expressão no subgrupo Ovz-O em relação aos outros subgrupos (Figura 19).

Figura 19 – Gráfico 9 e imagens da imunomarcação para o biomarcador OPG na região de furca nos primeiros molares inferiores direito

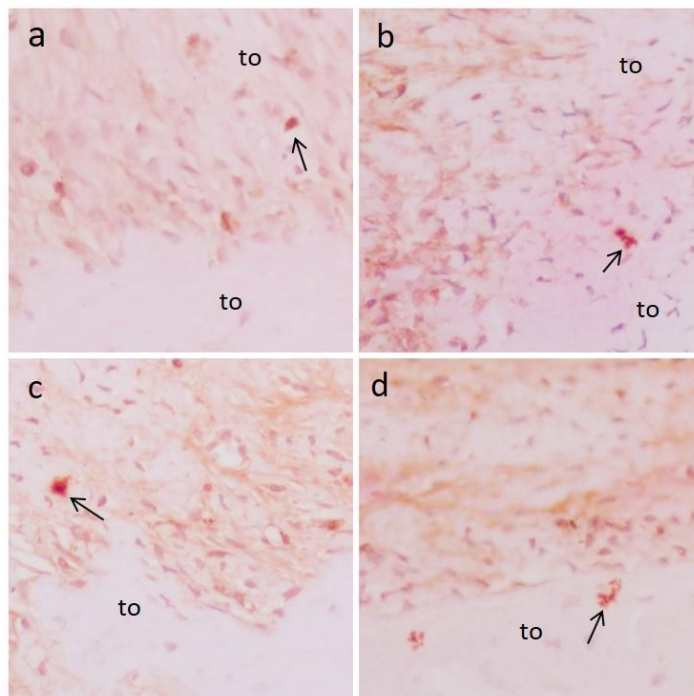


Legenda: Imunomarcação para OPG - a) Gráfico 9 mostrado a distribuição dos Scores (em porcentagem) referente ao padrão de imunomarcação para o biomarcador OPG. Fotomicrografias das imunomarcações do biomarcador RANKL na região de furca dos primeiros molares inferiores direito - b) Subgrupo Ovz-O - com baixo padrão de imunomarcação; c) Subgrupo Ovz-CEMP - com moderado padrão de imunomarcação; d) Subgrupo Sham-S - com alto padrão de imunomarcação e e) Subgrupo Sham-CEMP - com alto padrão de imunomarcação. (→) osteoblasto e (to) tecido ósseo. Aumento original 400x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para o cálculo da imunomarcação TRAP foi utilizado o teste de Fisher. O valor calculado do teste $F=1,020983$ se encontra dentro dos limites do intervalo de confiança para $\alpha = 0,05$ (0,2817002 e 3,7165223) indicando que não foi observada diferença com significância estatística entre os subgrupos. Na figura abaixo (Figura 20) estão apresentadas as fotomicrografias das imunomarcações do biomarcador TRAP nos 4 subgrupos.

Figura 20 – Imagens da imunomarcacão para o biomarcador TRAP na região de furca nos primeiros molares inferiores direito



Legenda: Fotomicrografias das imunomarcaces do biomarcador TRAP na região de furca dos primeiros molares inferiores direitos - a) Subgrupo Ovz-O; b) Subgrupo Ovz-CEMP; c) Subgrupo Sham-S e d) Subgrupo Sham-CEMP. (→) Células TRAP-positivas e (to) tecido seo. Aumento original 400x.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A DP crônica é a forma mais frequente das doenças periodontais (Raitapuro-Murray et al., 2017), e tem como característica a formação de bolsas nos tecidos periodontais e/ou recessão gengival. Sua manifestação é prevalente em adultos, mas pode ocorrer em qualquer idade. É a principal causa de perda dentária e também é considerada uma das duas maiores ameaças à saúde bucal (de Pablo et al., 2009; Benjamin, 2010).

O hormônio estrógeno desempenha um papel essencial para a manutenção da homeostase óssea (Florencio-Silva et al., 2017). O estrógeno tem participação direta na formação de osteoblastos que mantêm atividades de formação e manutenção óssea e a perda crônica do estrógeno em mulheres na menopausa está associada a um declínio destas atividades (Khosla et al., 2012). A DE, caracterizada em mulheres na pós menopausa, tem vários efeitos na saúde bucal (Scardina, Messina, 2012) e pode influenciar a remodelação óssea em locais com processo inflamatório, resultando em uma reabsorção exacerbada (Romualdo et al., 2018).

Os CEMP foram utilizados com sucesso como terapia adjuvante na aceleração do reparo de fraturas ósseas recentes e não consolidadas, cicatrização de feridas, redução da dor (Basset et al., 1977; Ross et al., 2013) e de inflamação aguda e crônica (Selvan et al., 2007; Akan et al., 2010). Guo et al. (2012) avaliaram em uma meta análise que a terapia com CEMP tem eficácia no tratamento de dor e edema pós-operatório.

Sobre a escolha do modelo animal, os resultados dos trabalhos de Wronsky et al. (1988a;1988b;1989) revelam muitas similaridades quantitativas existentes entre os efeitos da DE e do tratamento hormonal em ratas e humanos, sugerindo que o modelo animal de ovariectomia utilizando-se o rato deve ser útil para avaliações iniciais de tratamentos ou processos fisiológicos no tecido ósseo.

Kalu, em 1991, designou os modelos baseados em ratas de 3 meses como modelo de rata madura. O termo maduro foi utilizado para enfatizar que as ratas estão em fase reprodutiva, sexualmente maduras, sendo capazes de responder apropriadamente à deficiência do hormônio sexual e às sequelas decorrentes da ovariectomia. Pela facilidade de obtenção e pela similaridade das características da

perda óssea, ratas nesta idade são amplamente utilizadas para estudar a deficiência do hormônio ovariano.

O CEMP demonstrou ser eficaz em modelos animais de osteoporose (Jing et al., 2010, 2011, 2013, 2014; Androjna et al., 2014). Embora os efeitos positivos da terapia com CEMP no osso osteoporótico tenham sido documentados, pouco se sabe sobre os efeitos da aplicação do CEMP na osteoporose induzida em ratas ovariectomizadas (Zhou et al., 2017).

Vários estudos demonstraram que a estimulação do CEMP pode melhorar a mineralização, a microarquitetura óssea e promover a resposta dos osteoblastos (Zhang et al., 2007; Shen, Zhao, 2010; Jing et al., 2014; Lei et al., 2018). No entanto estudos relatam que o CEMP não teve efeito na remodelação óssea (Mollon et al., 2008; Handoll, Elliott, 2015). van der Jagt et al. (2012) avaliaram os efeitos do CEMP em ratas ovariectomizadas em quatro protocolos diferentes e o CEMP não induziu quaisquer alterações no osso esponjoso ou cortical em comparação aos grupos controles. No presente estudo não foi apresentado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos na avaliação da microarquitetura óssea através do MicroCT e nem na quantidade de perda óssea devido a DP induzida avaliada através da histomorfometria.

Embora a osteoporose também tenha sido considerada um fator de risco para a progressão da DP (Martínez-Maestre et al., 2010; Esfahanian et al., 2012; Guiglia et al., 2013), outros estudos mostram que esta relação é controversa (Kuo et al., 2008; Marjanovic et al., 2013; Darcey et al., 2013). Enquanto alguns autores observam um efeito negativo da DE em várias regiões da mandíbula (Tanaka et al., 2002; Duarte et al., 2004) outros autores não observaram alterações maxilares decorrentes da ovariectomia (Moriya et al., 1998; Esteves et al., 2015; Lee et al., 2018).

A manutenção da massa óssea é dependente da atividade de remodelação óssea contínua, que envolve os efeitos balanceados da formação óssea osteoblástica e reabsorção óssea osteoclástica (Henriksen et al., 2009; Martin et al., 2009). Estudos mostraram que o sistema RANK / RANKL / OPG desempenha um papel fundamental na osteoclastogênese e na função dos osteoclastos (Dougall et al., 1999; Simonet et al., 1997; Boyce, Xing, 2008).

A interação de RANKL com RANK em células precursoras de osteoclastos hematopoiéticas aumenta o recrutamento e ativação de osteoclastos (Zhou et al., 2013). No entanto, a OPG, um receptor solúvel, compete com RANKL pela RANK para inibir o recrutamento e a ativação dos osteoclastos, controlando assim a reabsorção óssea osteoclástica (Simonet et al., 1997; Boyce, Xing, 2008).

Chang et al. (2005) mostraram que o CEMP poderia regular as concentrações de osteoclastogênese, reabsorção óssea, RANKL, OPG e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) no sistema de cultura de medula óssea. Zhou et al. (2013) mostraram que o CEMP suprimiu a expressão RANKL e aumentou a expressão de OPG em ratas ovariectomizadas. Estes resultados corroboram com o nosso estudo, pois o subgrupo Ovz-O obteve maior expressão de RANKL e menor expressão de OPG, comparado aos outros subgrupos. No entanto, Chen et al. (2012) sugeriram que o CEMP não teve efeito sobre a expressão de RANKL em ratas ovariectomizadas.

Embora tenha sido documentado que a estimulação de CEMP tem a capacidade de promover a osteoblastogênese, ainda não temos uma compreensão adequada dos efeitos regulatórios e mecanismos relacionados do CEMP nas atividades e funções osteoclásticas (Wang et al., 2017).

Dai et al. (2016) avaliaram alterações iniciais no volume ósseo alveolar em ratas com DP induzida e ovariectomizadas nos períodos 0, 3, 7 e 11 dias e constatou que somente no período de 3 dias houve maior expressão de células TRAP-positivas na região de furca de ratas ovariectomizadas em relação as ratas Sham. No presente estudo as ratas permaneceram durante 28 dias com a ligadura e não apresentou resultado estatisticamente significativo em nenhum subgrupo referente à expressão do biomarcador TRAP. Barnaba et al. (2012) não encontraram nenhum resultado significativo da expressão do biomarcador TRAP em osteoclastos na presença de CEMP.

O mecanismo exato sobre como os osteoclastos respondem estimulação externa ao CEMP ainda não é conhecido. Ainda carecemos de conhecimentos básicos essenciais sobre os parâmetros de exposição ideais do CEMP na inibição de atividades e funções osteoclásticas. Essas questões representam limitações significativas para a aplicação científica do CEMP em clínicas (Wang et al., 2017).

Fatores que dificultam melhores constatações sobre os efeitos da terapia com CEMP são as diferentes especificações dos componentes geradores de CEMP, o tempo de exposição, os diferentes tratamentos e as diferentes análises. Além das diferenças nas características dos tratamentos usados em cada estudo com CEMP, as idades dos animais também variam (van der Jagt et al., 2012). Neste estudo, a construção do gerador de CEMP e o tempo de exposição foram baseados nos estudos de Midura et al. (2005), Jing et al. (2013) e Androjna et al. (2014).

Até o momento não há nenhum estudo avaliando os efeitos do CEMP na doença periodontal induzida em ratas Sham e ovariectomizadas e sugerimos que novos estudos devem ser realizados.

6 CONCLUSÃO

Neste estudo não encontramos evidências significativas da terapia com CEMP na doença periodontal induzida em ratas Sham e e ovariectomizadas. No entanto sugerimos que novos estudos com diferentes protocolos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS*

Agresti A. Categorical data analysis. New York: Wiley; 2002.

Akan Z, Aksu B, Tulunay A, Bilsel S, Inhan-Garip A. Extremely low-frequency electromagnetic fields affect the immune response of monocyte-derived macrophages to pathogens. *Bioelectromagnetics*. 2010 Dec;31(8):603-12. doi: 10.1002/bem.20607. Epub 2010 Aug 31. PubMed PMID: 20809504.

Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim DG. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol*. 2010 Aug;55(8):599-605. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.05.011. Epub 2010 Jun 11. PubMed PMID: 20541742; PubMed Central PMCID: PMC2902606.

Androjna C, Fort B, Zborowski M, Midura RJ. Pulsed electromagnetic field treatment enhances healing callus biomechanical properties in an animal model of osteoporotic fracture. *Bioelectromagnetics*. 2014 Sep;35(6):396-405. doi: 10.1002/bem.21855. Epub 2014 Apr 24. PubMed PMID: 24764277.

Assiotis A, Sachinis NP, Chalidis BE. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delayed unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. *J Orthop Surg Res*. 2012 Jun 8;7:24. doi: 10.1186/1749-799X-7-24. Review. PubMed PMID: 22681718; PubMed Central PMCID: PMC3441225.

Baek O, Zhu W, Kim HC, Lee SW. Effects of nicotine on the growth and protein expression of *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol*. 2012 Feb;50(1):143-8. doi: 10.1007/s12275-012-1212-8. Epub 2012 Feb 27. PubMed PMID: 22367949.

Barnaba SA, Ruzzini L, Di Martino A, Lanotte A, Sgambato A, Denaro V. Clinical significance of different effects of static and pulsed electromagnetic fields on human osteoclast cultures. *Rheumatol Int*. 2012 Apr;32(4):1025-31. doi: 10.1007/s00296-010-1724-7. Epub 2011 Jan 19. PubMed PMID: 21246371.

Bassett CA, Pawluk RJ, Pilla AA. Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science*. 1974 May 3;184(4136):575-7. PubMed PMID: 4821958.

Bassett CA, Pilla AA, Pawluk R. A non-surgical salvage of surgically-resistant pseudoarthroses and non-unions by pulsing electromagnetic fields. *Clin Orthop Relat Res*. 1977;124:117-131.

Bassett CA, Mitchell SN, Gaston SR. Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. *JAMA*. 1982 Feb 5;247(5):623-8. PubMed PMID: 7054564.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Benjamin RM. Oral health: the silent epidemic. *Public Health Rep.* 2010 Mar-Apr;125(2):158-9. PubMed PMID: 20297740; PubMed Central PMCID: PMC2821841.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):139-46. doi:10.1016/j.abb.2008.03.018. Epub 2008 Mar 25. Review. PubMed PMID: 18395508; PubMed Central PMCID: PMC2413418.

Buduneli E, Vardar-Sengül S, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, Sorsa T. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, and laminin-5 gamma2 chain immune localization in gingival tissue of endotoxin-induced periodontitis in rats: effects of low-dose doxycycline and alendronate. *J Periodontol.* 2007 Jan;78(1):127-34.

Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti FH Jr, da Rocha Nogueira Filho G, Casati MZ, et al. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J Periodontol.* 2006 Apr;77(4):599-605. PubMed PMID: 16584340.

Chang K, Chang WH. Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: a prostaglandin E2-associated process. *Bioelectromagnetics.* 2003 Apr;24(3):189-98. PubMed PMID: 12669302.

Chang K, Chang WH, Huang S, Huang S, Shih C. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects osteoclast formation by modulation of osteoprotegerin, RANK ligand and macrophage colony-stimulating factor. *J Orthop Res.* 2005 Nov;23(6):1308-14. PubMed PMID: 15913941.

Chen J, Huang LQ, Xia QJ, He CQ. Effects of pulsed electromagnetic fields on the mRNA expression of CAll and RANK in ovariectomized rats. *Rheumatol Int.* 2012 Jun;32(6):1527-32. doi: 10.1007/s00296-010-1740-7. Epub 2011 Feb 15. PubMed PMID: 21327437.

Dai J, Ma Y, Shi M, Cao Z, Zhang Y, Miron RJ. Initial changes in alveolar bone volume for sham-operated and ovariectomized rats in ligature-induced experimental periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2016 Apr;20(3):581-8. doi: 10.1007/s00784-015-1531-3. Epub 2015 Jul 17. PubMed PMID: 26179986.

Darcey J, Devlin H, Lai D, Walsh T, Southern H, Marjanovic E, et al. An observational study to assess the association between osteoporosis and periodontal disease. *Br Dent J.* 2013 Dec;215(12):617-21. doi: 10.1038/sj.bdj.2013.1191. PubMed PMID: 24357765.

Das S, Crockett JC. Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment. *Drug Des Devel Ther.* 2013 May 31;7:435-48. doi:10.2147/DDDT.S31504. Print 2013. Review. PubMed PMID: 23807838; PubMed Central PMCID: PMC3686324.

de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Apr;5(4):218-24. doi:10.1038/nrrheum.2009.28. Review. PubMed PMID: 19337286.

Diniz P, Shomura K, Soejima K, Ito G. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics*. 2002 Jul;23(5):398-405. PubMed PMID: 12111759.

Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*. 1999 Sep 15;13(18):2412-24. PubMed PMID: 10500098; PubMed Central PMCID: PMC317030.

Duarte PM, Gonçalves PF, Sallum AW, Sallum EA, Casati MZ, Humberto Nociti F Jr. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):107-10. PubMed PMID: 15009518.

Eftekhari H, Hosseini SR, Baboli HP, Golchin MM, Heidari L, Abedian Z, et al. Association of interleukin-6 (rs1800796) but not transforming growth factor beta 1 (rs1800469) with serum calcium levels in osteoporotic patients. *Gene*. 2018 May 31. pii: S0378-1119(18)30629-2. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.118. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29860063.

Eklund SA, Moller IJ, Leclercq MH. Calibration of examiners for oral health epidemiological surveys. World Health Organization. Geneva: WHO; 1993.

Esfahanian V, Shamami MS, Shamami MS. Relationship between osteoporosis and periodontal disease: review of the literature. *J Dent (Tehran)*. 2012 Fall;9(4):256-64. Epub 2012 Dec 31. PubMed PMID: 23323188; PubMed Central PMCID: PMC3536461.

Esteves CM, Moraes RM, Gomes FC, Marcondes MS, Lima GM, Anbinder AL. Ovariectomy-associated changes in interradicular septum and in tibia metaphysic in different observation periods in rats. *Pathol Res Pract*. 2015 Feb;211(2):125-9. doi: 10.1016/j.prp.2014.11.015. Epub 2014 Dec 3. PubMed PMID: 25532670.

Eyres KS, Saleh M, Kanis JA. Effect of pulsed electromagnetic fields on bone formation and bone loss during limb lengthening. *Bone*. 1996 Jun;18(6):505-9. PubMed PMID: 8805989.

Fisher RA. Confidence limits for a cross-product ratio. *Aust J Stat*. 1962;4;41.

Florencio-Silva R, Sasso GRS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. *Biomed Pharmacother*. 2018 Feb;98:406-415. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.089. Epub 2017 Dec 27. PubMed PMID: 29276969.

Gao SG, Li KH, Xu M, Jiang W, Shen H, Luo W, et al. Bone turnover in passive smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC Musculoskelet Disord*. 2011 Jun 11;12:131. doi: 10.1186/1471-474-12-131. PubMed PMID: 21663694; PubMed Central PMCID: PMC3125254.

Garcia VG, Gualberto Júnior EC, Fernandes LA, Bosco AF, Hitomi Nagata MJ, Casatti CA, et al. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *J Periodontol*. 2013 Apr;84(4):556-65. doi: 10.1902/jop.2012.120163. Epub 2012 Jun 9. PubMed PMID: 22680299.

Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2014 Oct;49(5):584-94. doi: 10.1111/jre.12138. Epub 2013 Nov 9. PubMed PMID: 24206053.

Garland DE, Adkins RH, Matsuno NN, Stewart CA. The effect of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis at the knee in individuals with spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 1999 Winter;22(4):239-45. PubMed PMID: 10751127.

Giampietro PF, McCarty C, Mukesh B, McKiernan F, Wilson D, Shuldiner A, et al. The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: a pilot study utilizing the Marshfield Clinic Personalized Medicine Cohort. *Osteoporos Int*. 2010 Mar;21(3):467-77. doi: 10.1007/s00198-009-0981-3. Epub 2009 Jun 9. Review. PubMed PMID: 19506792.

Guiglia R, Di Fede O, Lo Russo L, Sprini D, Rini GB, Campisi G. Osteoporosis, jawbones and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Jan 1;18(1):e93-9. Review. PubMed PMID: 23229255; PubMed Central PMCID: PMC3548653.

Guo L, Kubat NJ, Nelson TR, Isenberg RA. Meta-analysis of clinical efficacy of pulsed radio frequency energy treatment. *Ann Surg*. 2012 Mar;255(3):457-67. doi: 10.1097/SLA.0b013e3182447b5d. PubMed PMID: 22301609.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994 Jun;5:78-111. Review. PubMed PMID: 9673164.

Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab*. 2006;52(9-10):499-509. Review. PubMed PMID: 17078477.

Handoll HH, Elliott J. Rehabilitation for distal radial fractures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Sep 25;(9):CD003324. doi: 10.1002/14651858.CD003324.pub3. Review. PubMed PMID: 26403335.

Hedén P, Pilla AA. Effects of pulsed electromagnetic fields on postoperative pain: a double-blind randomized pilot study in breast augmentation patients. *Aesthetic Plast Surg*. 2008 Jul;32(4):660-6. doi: 10.1007/s00266-008-9169-z. Epub 2008 May 28. PubMed PMID: 18506512.

Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*. 2009 Jun;44(6):1026-33. doi: 10.1016/j.bone.2009.03.671. Epub 2009 Apr 5. Review. PubMed PMID: 19345750.

Holzhausen M, Rossa Júnior C, Marcantonio Júnior E, Nassar PO, Spolidório DM, Spolidório LC. Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2002 Sep;73(9):1030-6. PubMed PMID: 12296588.

Jing D, Shen G, Huang J, Xie K, Cai J, Xu Q, et al. Circadian rhythm affects the preventive role of pulsed electromagnetic fields on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Bone*. 2010 Feb;46(2):487-95. doi: 10.1016/j.bone.2009.09.021. Epub 2009 Sep 25. PubMed PMID: 19782781.

Jing D, Cai J, Shen G, Huang J, Li F, Li J, et al. The preventive effects of pulsed electromagnetic fields on diabetic bone loss in streptozotocin-treated rats. *Osteoporos Int*. 2011 Jun;22(6):1885-95. doi: 10.1007/s00198-010-1447-3. Epub 2010 Oct 26. PubMed PMID: 20976595.

Jing D, Li F, Jiang M, Cai J, Wu Y, Xie K, et al. Pulsed electromagnetic fields improve bone microstructure and strength in ovariectomized rats through a Wnt/Lrp5/ β -catenin signaling-associated mechanism. *PLoS One*. 2013 Nov;8(11):e79377. doi: 10.1371/journal.pone.0079377.e Collection 2013. PubMed PMID: 24244491; PubMed Central PMCID: PMC3828367.

Jing D, Cai J, Wu Y, Shen G, Li F, Xu Q, et al. Pulsed electromagnetic fields partially preserve bone mass, microarchitecture, and strength by promoting bone formation in hindlimb-suspended rats. *J Bone Miner Res*. 2014 Oct;29(10):2250-61. doi: 10.1002/jbmr.2260. PubMed PMID: 24753111.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec;15(3):175-91. Review. PubMed PMID: 1773131.

Khosla S, Oursler MJ, Monroe DG. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Nov;23(11):576-81. doi: 10.1016/j.tem.2012.03.008. Epub 2012 May 16. Review. PubMed PMID: 22595550; PubMed Central PMCID: PMC3424385.

Kroes I, Lepp PW, Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Dec 7;96(25):14547-52. PubMed PMID:10588742; PubMed Central PMCID: PMC24473.

Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008 Apr;122(4):417-33. Epub 2007 Oct 29. Review. PubMed PMID: 18028967.

Lee DJ, Wu L, Shimono M, Piao Z, Green DW, Lee JM, et al. Differential Mechanism of Periodontitis Progression in Postmenopause. *Front Physiol*. 2018 Aug 14;9:1098. doi: 10.3389/fphys.2018.01098. eCollection 2018. PubMed PMID: 30246792; PubMed Central PMCID: PMC6113945.

Lei T, Liang Z, Li F, Tang C, Xie K, Wang P, et al. Pulsed electromagnetic fields (PEMF) attenuate changes in vertebral bone mass, architecture and strength in ovariectomized mice. *Bone*. 2018 Mar;108:10-9. doi: 10.1016/j.bone.2017.12.008. Epub 2017 Dec 8. PubMed PMID: 29229438.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR Jr, et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol*. 2010a Jan;55(1):52-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2009.11.001. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19948337.

Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR Jr, Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010b Apr;46(4):1021-9. doi: 10.1016/j.bone.2009.12.016. Epub 2009 Dec 28. PubMed PMID:20036346.

Marjanovic EJ, Southern HN, Coates P, Adams JE, Walsh T, Horner K, et al. Do patients with osteoporosis have an increased prevalence of periodontal disease? A cross-sectional study. *Osteoporos Int*. 2013 Jul;24(7):1973-9. doi: 10.1007/s00198-012-2246-9. Epub 2013 Jan 23. PubMed PMID: 23340948.

Martin T, Gooi JH, Sims NA. Molecular mechanisms in coupling of bone formation to resorption. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2009;19(1):73-88. Review. PubMed PMID: 19191758.

Martínez-Maestre MÁ, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric*. 2010 Dec;13(6):523-9. doi: 10.3109/13697137.2010.500749. Epub 2010 Aug 7. Review. PubMed PMID: 20690866.

Midura RJ, Ibiwoye MO, Powell KA, Sakai Y, Doehring T, Grabiner MD, et al. Pulsed electromagnetic field treatments enhance the healing of fibular osteotomies. *J Orthop Res*. 2005 Sep;23(5):1035-46. PubMed PMID: 15936919.

Mollon B, da Silva V, Busse JW, Einhorn TA, Bhandari M. Electrical stimulation for long-bone fracture-healing: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Nov;90(11):2322-30. doi: 10.2106/JBJS.H.00111. PubMed PMID: 18978400.

Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci.* 1998 Dec;40(4):171-5. PubMed PMID: 10036831.

Mouchrek Júnior JCE, Macedo CG, Abdalla HB, Saba AK, Teixeira LN, Mouchrek AQES, et al. Simvastatin modulates gingival cytokine and MMP production in a rat model of ligature-induced periodontitis. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2017 May 15;9:33-38. doi: 10.2147/CCIDE.S134125. eCollection 2017. PubMed PMID: 28553143; PubMed Central PMCID: PMC5439939.

Moutsopoulos NM, Kling HM, Angelov N, Jin W, Palmer RJ, Nares S, et al. *Porphyromonas gingivalis* promotes Th17 inducing pathways in chronic periodontitis. *J Autoimmun.* 2012 Dec;39(4):294-303. doi: 10.1016/j.jaut.2012.03.003. Epub 2012 May 3. PubMed PMID: 22560973; PubMed Central PMCID: PMC3416947.

NC3Rs [internet]. London: National Center for the Replacement, Refinement & Reduction of Animals in Research [cited 2016 03 12]. ARRIVE: Animal Research Reporting In Vivo Experiments. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/arrive-animal-research-reporting-vivo-experiments>

Nogueira-Filho Gda R, Rosa BT, César-Neto JB, Tunes RS, Tunes Uda R. Low- and high-yield cigarette smoke inhalation potentiates bone loss during ligature-induced periodontitis. *J Periodontol.* 2007 Apr;78(4):730-5. PubMed PMID:17397322.

Nursal TZ, Bal N, Anarat R, Colakoglu T, Noyan T, Moray G, et al. Effects of a static magnetic field on wound healing: results in experimental rat colon anastomoses. *Am J Surg.* 2006 Jul;192(1):76-81. PubMed PMID: 16769280.

Otomo-Corgel J, Pucher JJ, Rethman MP, Reynolds MA. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J Evid Based Dent Pract.* 2012 Sep;12(3Suppl):20-8. doi: 10.1016/S1532-3382(12)70006-4. Review. PubMed PMID: 23040337.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001 Jun;183(12):3770-83. PubMed PMID: 11371542; PubMed Central PMCID: PMC95255.

Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000.* 2012 Oct;60(1):15-39. doi: 10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x. Review. PubMed PMID: 22909104.

R Core Team (version 2017) [computer program]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. R: A language and environment for statistical computing. Available from: <https://www.R-project.org>

Raitapuro-Murray T, Molleson TI, Hughes FJ. The prevalence of periodontal disease in a Romano-British population c. 200-400 AD. *Br Dent J.* 2014 Oct;217(8):459-66. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.908. PubMed PMID: 25342357; PubMed Central PMCID: PMC4340975.

Rawe IM, Lowenstein A, Barcelo CR, Genecov DG. Control of postoperative pain with a wearable continuously operating pulsed radiofrequency energy device: a preliminary study. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Apr;36(2):458-63. doi: 10.1007/s00266-011-9828-3. Epub 2011 Oct 25. PubMed PMID: 22037572.

Reynolds A. Can hepatitis c be sexually transmitted? Yes. No. Maybe. It's complicated. All of the above. *Posit Aware*. 2014 Nov-Dec;26(7):27-31. PubMed PMID: 26292379.

Rizzoli R, Reginster JY, Boonen S, Bréart G, Diez-Perez A, Felsenberg D, et al. Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int*. 2011 Aug;89(2):91-104. doi: 10.1007/s00223-011-9499-8. Epub 2011 Jun 3. Review. PubMed PMID: 21637997; PubMed Central PMCID: PMC3135835.

Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kappaB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Nov;90(11):6323-31. Epub 2005 Aug 16. Review. PubMed PMID: 16105967.

Rohde C, Chiang A, Adipoju O, Casper D, Pilla AA. Effects of pulsed electromagnetic fields on interleukin-1 beta and postoperative pain: a double-blind, placebo-controlled, pilot study in breast reduction patients. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jun;125(6):1620-9. PubMed PMID: 20527063.

Rohde CH, Taylor EM, Alonso A, Ascherman JA, Hardy KL, Pilla AA. Pulsed Electromagnetic Fields Reduce Postoperative Interleukin-1 β , Pain, and Inflammation: A Double-Blind, Placebo-Controlled Study in TRAM Flap Breast Reconstruction Patients. *Plast Reconstr Surg*. 2015 May;135(5):808e-817e. doi: 10.1097/PRS.0000000000001152. PubMed PMID: 25919263.

Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, et al. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod*. 2018 May;44(5):780-5. doi: 10.1016/j.joen.2018.01.010. Epub 2018 Mar 15. PubMed PMID: 29550006

Ross CL, Harrison BS. The use of magnetic field for the reduction of inflammation: A review of the history and therapeutic results. *Altern Ther Health Med*. 2013;19:47–54.

Rubin CT, McLeod KJ, Lanyon LE. Prevention of osteoporosis by pulsed electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg Am*. 1989 Mar;71(3):411-7. PubMed PMID: 2925715.

Ryang We S, Koog YH, Jeong KI, Wi H. Effects of pulsed electromagnetic field on knee osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 May;52(5):815-24. doi: 10.1093/rheumatology/kes063. Epub 2012 Apr 13. Review. PubMed PMID: 22504115.

Sanz M, van Winkelhoff AJ; Working Group 1 of Seventh European Workshop on Periodontology. Periodontal infections: understanding the complexity—consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011 Mar;38 Suppl 11:3-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01681.x. PubMed PMID: 21323698.

Scardina GA, Messina P. Oral microcirculation in post-menopause: a possible correlation with periodontitis. *Gerodontology*. 2012 Jun;29(2):e1045-51. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00608.x. Epub 2011 Dec 28. PubMed PMID: 22212114.

Selvam R, Ganesan K, Narayana Raju KV, Gangadharan AC, Manohar BM, Puvanakrishnan R. Low frequency and low intensity pulsed electromagnetic field exerts its antiinflammatory effect through restoration of plasma membrane calcium ATPase activity. *Life Sci*. 2007 Jun 6;80(26):2403-10. Epub 2007 May 1. PubMed PMID: 17537462.

Shen WW, Zhao JH. Pulsed electromagnetic fields stimulation affects BMD and local factor production of rats with disuse osteoporosis. *Bioelectromagnetics*. 2010 Feb;31(2):113-9. doi: 10.1002/bem.20535. PubMed PMID: 19670410.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):309-19. PubMed PMID: 9108485.

Tabrah F, Hoffmeier M, Gilbert F Jr, Batkin S, Bassett CA. Bone density changes in osteoporosis-prone women exposed to pulsed electromagnetic fields (PEMFs). *J Bone Miner Res*. 1990 May;5(5):437-42. PubMed PMID: 2195843.

Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res*. 2002 Apr;37(2):161-5. PubMed PMID: 12009186.

Tella SH, Gallagher JC. Biological agents in management of osteoporosis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014 Nov;70(11):1291-301. doi: 10.1007/s00228-014-1735-5. Epub 2014 Sep 11. Review. PubMed PMID: 25204309.

Tenório Ada S, Alves SB, Bezerra Ade L, Souza GM, Catanho MT, Tashiro T, et al. [Effect of physical training on the bone tissue and the calcium serum concentration in ovariectomized mice]. *Acta Cir Bras*. 2005 Jul-Aug;20(4):280-3. Epub 2005 Jul 18. Portuguese. PubMed PMID: 16186946.

Tera Tde M, Prado RF, De Marco AC, Santamaria MP, Jardini MA. The RANK/RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res*. 2014a;28. pii: S1806-83242014000100261. Epub 2014 Sep 15. PubMed PMID: 25229791.

Tera Tde M, Nascimento RD, Prado RF, Santamaria MP, Jardini MA. Immunolocalization of markers for bone formation during guided bone regeneration in osteopenic rats. *J Appl Oral Sci*. 2014b Nov-Dec;22(6):541-53. doi: 10.1590/1678-775720140190. PubMed PMID: 25591022; PubMed Central PMCID: PMC4307769.

Thamsborg G, Florescu A, Oturai P, Fallentin E, Tritsarlis K, Dissing S. Treatment of knee osteoarthritis with pulsed electromagnetic fields: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Osteoarthritis Cartilage* 2005 Jul;13(7):575-81. PubMed PMID: 15979009.

Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, Novaes VC, Zanini NA, Ervolino E, et al. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci*. 2015 May;30(4):1209-18. doi: 10.1007/s10103-014-1575-7. Epub 2014 Apr 15. PubMed PMID: 24733282.

Thummuri D, Guntuku L, Challa VS, Ramavat RN, Naidu VGM. Abietic acid attenuates RANKL induced osteoclastogenesis and inflammation associated osteolysis by inhibiting the NF-KB and MAPK signaling. *J Cell Physiol*. 2018 Jun 22. doi: 10.1002/jcp.26575. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29932225.

Tucker JJ, Cirone JM, Morris TR, Nuss CA, Huegel J, Waldorff EI, et al. Pulsed electromagnetic field therapy improves tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model. *J Orthop Res*. 2016 Jun 10. doi: 10.1002/jor.23333. PMID: 27282093.

van der Jagt OP, van der Linden JC, Waarsing JH, Verhaar JA, Weinans H. Systemic treatment with pulsed electromagnetic fields do not affect bone microarchitecture in osteoporotic rats. *Int Orthop*. 2012 Jul;36(7):1501-6. doi: 10.1007/s00264-011-1471-8. Epub 2012 Jan 17. PubMed PMID: 22249842; PubMed Central PMCID: PMC3385882.

Wang P, Liu J, Yang Y, Zhai M, Shao X, Yan Z, et al. Differential intensity-dependent effects of pulsed electromagnetic fields on RANKL-induced osteoclast formation, apoptosis, and bone resorbing ability in RAW264.7 cells. *Bioelectromagnetics*. 2017 Dec;38(8):602-612. doi: 10.1002/bem.22070. Epub 2017 Jul 24. PubMed PMID: 28741320.

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988a Sep;43(3):179-83. PubMed PMID: 3141020.

Wronski TJ, Cintrón M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1988b Aug;123(2):681-6. PubMed PMID: 3396505.

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*. 1989 Dec;45(6):360-6. PubMed PMID: 2509027.

Xu Y, Zhao T, Xu W, Ding Y. Periodontal microstructure change and tooth movement pattern under different force magnitudes in ovariectomized rats: an in-vivo microcomputed tomography study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013 Jun;143(6):828-36. doi: 10.1016/j.ajodo.2013.01.020. PubMed PMID: 23726333.


Yang X, He H, Gao Q, He C. Pulsed electromagnetic field improves subchondral bone microstructure in knee osteoarthritis rats through a Wnt/ β -catenin signaling-associated mechanism. *Bioelectromagnetics*. 2018 Feb;39(2):89-97. doi: 10.1002/bem.22106. Epub 2017 Dec 18. PubMed PMID: 29251361.

Zhang X, Zhang J, Qu X, Wen J. Effects of different extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblasts. *Electromagn Biol Med*. 2007;26(3):167-77. PubMed PMID: 17886004.


Zhou J, Chen S, Guo H, Xia L, Liu H, Qin Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in ovariectomized rats. *Rheumatol Int*. 2013 May;33(5):1135-41. doi: 10.1007/s00296-012-2499-9. Epub 2012 Sep 5. PubMed PMID: 22948539.

Zhou J, Liao Y, Zeng Y, Xie H, Fu C, Li N. Effect of intervention initiation timing of pulsed electromagnetic field on ovariectomy-induced osteoporosis in rats. *Bioelectromagnetics*. 2017 Sep;38(6):456-465. doi: 10.1002/bem.22059. Epub 2017 May 16. PubMed PMID: 28510268.

ANEXO — Certificado CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
 Campus de São José dos Campos
 Instituto de Ciência e Tecnologia

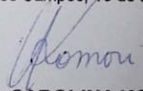


CERTIFICADO
CEUA – Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo intitulado "Efeitos da estimulação elétrica em ratas com doença periodontal induzida e ovariectomizadas: análise histomorfométrica e imunistoquímica, registrado com o nº 013 /2016-CEUA-ICT-UNESP, sob a responsabilidade de **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, tendo como colaboradora a Doutoranda Daniella Vicensoto Bernardoro, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as Normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICT – CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS-UNESP)**, em reunião de 09/12/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	09/12/2016 a 10/12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico (Rattus norvegicus albinus Wistar)
Nº de Animais	60
Peso/Idade	250-300 grs - 90dias
Sexo	fêmea
Origem	Biotério Central – Campus de Botucatu-UNESP

São José dos Campos, 16 de dezembro de 2016



Profa.Dra. PAULA CAROLINA KOMORI DE CARVALHO
 Coordenadora

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Domingos
 CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9076
 Fax: (12) 3947-9010 / gaudesin@fosjc.unesp.br / komori@fosjc.unesp.br