



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA  
FILHO” - UNESP  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA**

**Marina Montosa Belluci**

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA DIETA SOBRE A  
DENSIDADE E O METABOLISMO ÓSSEO AO REDOR DE  
IMPLANTES COM OSSEOINTEGRAÇÃO ESTABELECIDADA.  
ESTUDO EM RATOS.**

**Araraquara**

**2008**

**MARINA MONTOSA BELLUCI**

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA DIETA SOBRE A  
DENSIDADE E O METABOLISMO ÓSSEO AO REDOR DE IMPLANTES  
COM OSSEOINTEGRAÇÃO ESTABELECIDO. ESTUDO EM RATOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico.

Co-Orientador: Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior.

**Araraquara**

**2008**

**MARINA MONTOSA BELLUCI**

**EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE MAGNÉSIO NA DIETA SOBRE A  
DENSIDADE E O METABOLISMO ÓSSEO AO REDOR DE IMPLANTES  
COM OSSEOINTEGRAÇÃO ESTABELECIDO. ESTUDO EM RATOS.**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico

2º Examinador: Profa. Dra. Maria Lucia Rubo de Rezende

3º Examinador: Prof. Dr. Luis Antônio Borelli Barros

Araraquara, 31 de março de 2007.

## **DADOS CURRICULARES**

**Marina Montosa Belluci**

NASCIMENTO	30.08.83 – Catanduva/SP
FILIAÇÃO	Amaury Belluci Filho Míriam Helena Montosa Belluci
2002 – 2006	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2006 – 2008	Curso de Pós-Graduação em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2007	Curso de Especialização em Periodontia, na Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas – APCD/Araraquara - SP

## **Dedicatória**

### **A Deus**

Sempre presente, seja nos momentos de dificuldade e tristeza, bem como nos de alegria e conquistas como este, iluminando o meu caminho para que eu chegasse até aqui.

### **Aos meus pais**

Apesar da distância e de meus momentos de ausência, vocês sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando em todas as minhas escolhas e tudo isso sempre com muita união, força e carinho. Vocês me ensinaram a ser forte e a lutar pelas oportunidades da vida. Sem vocês do meu lado nada disso seria possível. Serei eternamente grata. Amo vocês.

### **Aos meus Avós**

Eles são a base da família, são sábios, nos ensinam a dar valor a cada momento da vida.

### **Aos amigos e familiares**

Àqueles que, seja perto ou distante, verdadeiramente torceram por mim durante todo esse tempo, me incentivando a continuar, dando conselhos e apoio. Compartilho com vocês esse grande momento.

### **A Profa. Dra. Silvana Regina Perez Orrico**

Por sua competência e profissionalismo, sua dedicação e paciência. Obrigada por tudo.

## **Agradecimentos**

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho:

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, e Vice-Diretor, Prof. Dr. José Cláudio Martins Segalla.

Ao Prof. Elcio Marcantonio Junior, pela atenção e disponibilidade dedicada.

A todos os docentes do Curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: Profs. Adriana Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio, Carlos Rossa Junior, Elcio Marcantonio Junior, Joni Augusto Cirelli, José Eduardo Cezar Sampaio e Silvana Regina Perez Orrico pela formação e orientação.

À minha turma do curso de Pós-Graduação: Aline, Andrés, Nana, Roberta, Rodrigo, Romeu, Rubens, Sabrina, Wagner e Yeon. Compartilhamos momentos especiais de aprendizado e descontração durante todo o curso.

Aos demais companheiros do curso de Pós-Graduação que estiveram sempre presentes, nos dando apoio, trocando experiências, compreendendo as nossas aflições nos momentos mais difíceis.

A todos os funcionários da Faculdade, em especial:

- da Disciplina de Periodontia, entre estes: Claudinha, Regina Lúcia, D. Maria do Rosário, Zezé, Thelma, Sueli e Toninho, pela compreensão e prestatividade.

- da Biblioteca, entre estes: Adriano, Ceres, Eliane, Maria Helena e Silvia pela colaboração.

- da Seção de Pós-Graduação, Alexandre, Flávia, Mara e Rosângela, pela paciência e cooperação.

À nossa equipe de trabalho: Silvana, Elaine, Andrés e Gabi e professores colaboradores: Aureluce Demont, Carlos Rossa e Elcio Marcantonio Junior, pela ajuda e cooperação na realização deste trabalho.

À CAPES, CNPq, FAPESP e FUNDUNESP pelo apoio financeiro, sem o qual não poderia realizar este trabalho

A Daniela, minha irmã, e ao Renato que mesmo estando longe sempre estivemos unidos e nos apoiando em tudo na vida.

A todos os meus companheiros de laboratório: Fabio, Morgana, Rafaela, Tete e João, pelas várias horas de convivência, onde tive muito trabalho e pude contar com vocês sempre, obrigada pela paciência na hora de ensinar.

As minhas amigas Andréa, Fabiane e Renata que sempre me acompanharam em todos os momentos. Sem amigos não somos ninguém.

**MUITO OBRIGADA!**

## Sumário

<b>Resumo.....</b>	<b>8</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>10</b>
<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2 Revisão de Literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>3 Proposição.....</b>	<b>23</b>
<b>4 Material e Método.....</b>	<b>24</b>
<b>5 Resultado.....</b>	<b>38</b>
<b>6 Discussão.....</b>	<b>55</b>
<b>7 Conclusão.....</b>	<b>63</b>
<b>8 Referências .....</b>	<b>64</b>
<b>9 Anexos.....</b>	<b>71</b>



Belluci MM. Efeito da deficiência de magnésio na dieta sobre a densidade e o metabolismo ósseo ao redor de implantes com osseointegração estabelecida. Estudo em ratos. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2008.

## Resumo

**Introdução:** O magnésio ( $Mg^{+2}$ ) é essencial para a vida, sendo importante em reações enzimáticas de vários tipos celulares, além de ter um papel importante no tecido ósseo e na homeostase mineral, podendo afetar diretamente a função das células ósseas e a formação da hidroxiapatita. O entendimento de fatores associados à modificação do metabolismo ósseo é de extremo interesse na reabilitação oral com implantes osseointegrados. O contato íntimo entre o metal do implante e o tecido ósseo é fundamental para o sucesso desta forma de tratamento. Diversas alterações sistêmicas, dentre elas a deficiência de Mg, podem representar um risco à osseointegração, podendo afetar a remodelação e diminuir o contato osso-implante.

**Objetivo:** Avaliar, em animais com diferentes idades, o efeito da deficiência de magnésio na dieta sobre o metabolismo ósseo ao redor de implantes de Ticp (titânio comercialmente puro) com osseointegração estabelecida

**Material e Método:** Foram utilizados 90 ratos machos, divididos em 2 grupos de acordo com a idade, sendo constituídos por animais jovens (60 dias) e adultos (150 dias). Após adaptação ao ambiente do biotério, todos os animais foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda (dia 0). Decorrido um período de 60 dias, necessário à osseointegração dos implantes, os animais de cada grupo foram então subdivididos em 3 subgrupos conforme a dieta que iriam receber (dieta padrão, dieta com redução de 75% do magnésio necessário diariamente e dieta com redução de 90% do magnésio necessário diariamente), a qual foi administrada por mais 90 dias para

instalação da deficiência mineral. No período de 24 horas antes do sacrifício foram coletadas amostras de urina. Após o sacrifício, foram coletadas amostras de soro para determinação da concentração de magnésio (Mg) e cálcio (Ca). O efeito da deficiência sobre a densidade óssea esquelética foi avaliado por meio de densitometria óssea (DXA) da coluna lombar e fêmur, enquanto a densidade óssea ao redor dos implantes foi avaliada por meio de densidade óssea radiográfica. Para avaliação do efeito da deficiência de Mg sobre o metabolismo ósseo foi realizado PCR semi-quantitativo para os genes RANKL e OPG do periosteado adjacente ao implante.

**Resultado:** A diminuição da concentração sérica e urinária de magnésio ( $p < 0.05$ ) foi constatada para os grupos de animais jovens e adultos. A análise densitométrica das vértebras lombares e do fêmur demonstrou a perda sistêmica de massa óssea tanto em animais jovens como adultos, sendo mais significativa para os subgrupos com maior deficiência e nas avaliações globais. Foi demonstrada uma redução estatisticamente significativa da densidade óssea radiográfica ao redor dos implantes, para todas as regiões ( $p < 0.01$ ) dos subgrupos com deficiência de Mg, em ambos os grupos. A análise por PCR, para os animais jovens, demonstrou uma tendência de aumento da expressão de RANKL e um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) da expressão de OPG entre os subgrupos CTL e Mg2. Nos animais adultos, houve uma tendência de diminuição da expressão de OPG e aumento da expressão de RANKL.

**Conclusão:** A deficiência de magnésio resultou em perda de massa óssea sistêmica e perda de densidade óssea ao redor dos implantes com osseointegração estabelecida independente da idade, entretanto são necessários mais estudos sobre o mecanismo de sinalização da indução de perda óssea.

**Palavras Chaves:** Deficiência de magnésio; osseointegração; densidade óssea.

Belluci MM. Effect of magnesium deficiency in diet on bone density and bone metabolism around osseointegrated implants. Study in rats. [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia UNESP; 2008.

### *Abstract*

**Introduction:** Magnesium ( $Mg^{+2}$ ) is essential for life, it is important for many enzymatic reactions of several kinds of cells. Magnesium is very important for bone and mineral homeostasis; it can directly affect bone cell functions and crystal formation (hydroxyapatite). The factors associated to the modification of bone metabolism are extremely important in oral rehabilitation of osseointegrated implants. The intimate bone to implant contact is fundamental for the success of this kind of treatment. Several systemic alterations, like magnesium deficiency, can represent a risk factor to implants osseointegration, it could affect bone remodeling and reduce the bone-implants contact.

**Objective:** This study evaluated, in animals with different ages, the effect of magnesium deficiency in diet on bone metabolism around integrated implants.

**Methods:** Ninety male Holtzman rats were divided in 2 groups by the age, young animals were 60 days years old and adult animals were 150 days years old. After acclimation to the vivarium, all the animals were submitted to a titanium implant at right and left tibias (day 0). After a healing period of 60 days the animals were ramdonly divided into 3 subgroups: rats were fed either normal control magnesium diet (CTL), a reduction of 75% of magnesium diet (Mg1) and a reduction of 90% of magnesium diet (Mg2). After 90 days on the experimental diet the animals were sacrificed. In order to confirm the systemic deficiency of magnesium the serum and urine were colleted for determination of magnesium and calcium concentration. In order to confirm the systemic osteopenia, a dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) was performed in lombar vertebra and

femur. For evaluation of bone density around integrated implants, radiographs were taken. And for evaluation of magnesium deficiency in osseous metabolism, mRNA levels of RANKL and OPG were quantified.

**Results:** The decrease of magnesium concentration in serum and urine confirmed magnesium deficiency in both groups ( $p < 0.05$ ). Densitometric measurements of the femur and lumbar vertebrae confirmed systemic bone mass loss in both groups. The measurements for radiographic bone density around integrated implants showed a decreased in bone density in all regions of all experimental groups ( $p > 0.01$ ). The mRNA levels for RANKL were slighted but not significantly increased in both groups. The mRNA levels for OPG were significantly increased in young animals ( $p > 0.05$ ) and not significantly decreased in adult animals.

**Conclusion:** According to this study, magnesium deficiency on diet resulted in loss of systemic bone mass and bone density around integrated implant. However more studies are necessary for the signalization of bone loss mechanism.

**Keywords:** Magnesium deficiency; osseointegration; bone density.

## *1 Introdução*

Os implantes osseointegrados foram desenvolvidos por Branemark há mais de 40 anos e se tornaram um marco na reabilitação oral. Desde então muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de tornar essa prática cada vez mais previsível e assim permitir o sucesso funcional e estético desse tipo de tratamento.

Para se obter esse sucesso é de fundamental importância o contato íntimo entre o metal do implante e o tecido ósseo, ou seja, a osseointegração do implante<sup>2,3</sup>. Entretanto, o processo de osseointegração é complexo e para que ocorra depende principalmente de fatores fisiológicos e fatores relacionados ao implante, entre outros<sup>21</sup>.

O entendimento de fatores associados à modificação do metabolismo ósseo é de extremo interesse para esse tipo de prática odontológica. Muitas situações como osteoporose, doenças infecciosas e/ou inflamatórias que afetam o tecido ósseo e prejudicam seu metabolismo, podem influenciar na osseointegração dos implantes<sup>40</sup>.

Com o desenvolvimento das pesquisas é possível afirmar que a nutrição tem um papel fundamental para o indivíduo pela possibilidade do desencadeamento de doenças associadas à modificação do metabolismo ósseo, entre outras patologias.

Dentro desse aspecto destaca-se o magnésio, um dos minerais mais abundantes no organismo e que é fundamental para várias funções enzimáticas e celulares, o que o torna um importante fator modificador da resposta inflamatória e imunológica<sup>30</sup>. Além disso, o magnésio tem um papel importante na homeostase mineral e óssea, principalmente no crescimento mas também na remodelação óssea em idades mais avançadas<sup>47</sup>. A deficiência desse tipo de mineral é muito comum em países industrializados<sup>32</sup>, principalmente entre a população jovem e adulta<sup>49</sup>. Tal deficiência, mesmo baixa, pode causar diversas

alterações metabólicas e está relacionada a muitas patologias, inclusive a osteoporose<sup>53</sup>.

As alterações sistêmicas e ósseas provocadas pela deficiência de magnésio podem ser um risco à osseointegração, à medida que podem afetar a remodelação e diminuir o contato osso-implante, comprometendo assim o sucesso dos procedimentos com implantes osseointegrados. Entretanto, poucos estudos têm demonstrado o efeito de condições sistêmicas que levam à perda de massa óssea, dentre elas a deficiência nutricional, sobre implantes com osseointegração já estabelecida.

Levando-se em consideração a importância desse mineral para o metabolismo ósseo e a escassez de estudos avaliando sua influência sobre implantes já osseointegrados, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da deficiência de magnésio sobre o tecido ósseo ao redor de implantes osseointegrados, uma vez que essa deficiência existe na população humana e causa diversas alterações na estrutura óssea.

## 2 Revisão de Literatura

Para um melhor entendimento, esta revisão de literatura será dividida em dois tópicos relacionados ao tema proposto: importância do magnésio e fatores relacionados à osseointegração de implantes.

### 2.1 MAGNÉSIO

O magnésio (Mg<sup>+2</sup>) é o oitavo elemento mais abundante na terra, o quarto elemento mais abundante em vertebrados e o cátion divalente mais abundante nas células<sup>30</sup>. Quando comparado ao sódio (Na), cálcio (Ca) e potássio (K), o magnésio (Mg) é um elemento de menor tamanho, menor força eletropositiva e em menor quantidade no soro, porém ele apresenta funções cruciais como a manutenção da homeostase hormonal, enzimática e eletrolítica, sendo assim, fundamental para o organismo<sup>24</sup>.

A quantidade total de magnésio presente em um indivíduo adulto normal é de aproximadamente 25g dos quais cerca de 53% é encontrado no osso, 27% no músculo, 19% no tecido mole, 0,5% nos eritrócitos e 0.3% no soro<sup>59</sup>, sendo que esse total varia entre as diferentes espécies animais e diminui com a idade<sup>30</sup>. Dos 53% de magnésio presente no osso, um terço representa a reserva que mantém a concentração extracelular desse elemento em níveis normais<sup>14</sup>.

As funções do magnésio estão relacionadas ao transporte intracelular e extracelular e ao controle de vários outros sistemas do organismo<sup>20</sup>, sendo que esse elemento tem a importante função de regular os níveis de cálcio intracelular. Na deficiência de magnésio há um aumento na concentração intracelular de cálcio que é responsável pelo aumento na vasoconstrição da musculatura e, conseqüentemente, maior contração da musculatura lisa. Por regular o tônus muscular da

musculatura lisa, essa deficiência também pode causar vasoespasmos coronários, hiperexcitabilidade neuromuscular, constrição dos brônquios e hipertensão<sup>57</sup>.

O magnésio participa ainda como co-fator em mais de 300 enzimas e atua na geração de energia aeróbica, anaeróbica e na glicólise. Além de ser um ativador enzimático e ser requerido para os processos de fosforilação<sup>60</sup>, também regula a atividade celular e a ação de hormônios, como o Paratormônio (PTH), mediante a interação com o cálcio e a expressão de alguns neurotransmissores<sup>29, 46</sup>.

Apesar de ser um mineral facilmente encontrado em vários tipos de alimentos sua absorção requer condições ideais do organismo e essa absorção é facilmente inibida por muitos fatores. Para sua absorção é necessária altas concentrações de PTH e vitamina D. Mesmo após ser absorvido pelo organismo muitas substâncias contribuem para maior eliminação renal do Mg como a ingestão excessiva de álcool, diuréticos, café, chá, sal, ácido fosfórico e açúcar, elementos muito comuns na dieta atual<sup>24</sup>.

A quantidade de magnésio que deve ser ingerida diariamente (Recommended Daily Allowance – RDA) é de 420 mg/dia para homens adultos enquanto para mulheres adultas é de 320mg/dia. Entretanto, o consumo regular de magnésio de uma grande parte da população de adolescentes e adultos é muito abaixo do recomendado<sup>48, 49, 50</sup>.

Com tantas funções no organismo, a deficiência desse mineral pode estar relacionada a patologias do sistema cardiovascular (aterosclerose e hipertensão) e à síndrome metabólica, que consiste da presença de obesidade, dislipidemia e resistência à insulina<sup>32</sup>.

Esse mineral tem um papel importante também sobre o tecido ósseo e na homeostase mineral, podendo afetar diretamente a função das células ósseas e a formação da hidroxiapatita<sup>12, 19</sup>. Alguns estudos epidemiológicos mostram uma correlação positiva entre pessoas



com dieta deficiente de magnésio e aumento na perda de massa óssea e/ou diminuição da densidade óssea, o que sugere que a deficiência de magnésio pode ser um fator de risco para a osteoporose<sup>44, 59, 61</sup>.

Além disso, em pacientes com osteoporose pós-menopausa têm sido demonstrada a diminuição nos níveis de magnésio sérico e do conteúdo mineral ósseo<sup>43</sup>.

Em pacientes idosos, é comum observar-se a diminuição dos níveis de magnésio por fatores relacionados à perda de apetite, dieta inadequada, diminuição da absorção por via intestinal associada à idade ou aumento da excreção do magnésio por via renal<sup>60</sup>.

No estudo realizado por Stendig-Lindberg et al.<sup>53</sup> foi demonstrado experimentalmente que uma dieta deficiente de magnésio por período prolongado (um ano) é capaz de induzir osteoporose em ratos.

Em estudo realizado em animais com deficiência severa de magnésio (0,04% dos Nutrientes Recomendados - NR), os resultados obtidos foram: maior fragilidade esquelética; aumento da reabsorção óssea; aumento da liberação de substância P, Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF $\alpha$ ) e Interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ); diminuição da formação óssea e osteoporose<sup>47</sup>. Em virtude desse tipo de deficiência severa ser raramente ocorrer em humanos, foram realizados estudos em animais com menores deficiências de magnésio (10% do NR, 25% do NR e 50% do NR)<sup>48, 49, 50</sup>. Os resultados demonstraram que mesmo com menor restrição do nutriente, foi observada perda óssea caracterizada por diminuição do volume do osso trabecular seguido por aumento na liberação de substância P e TNF $\alpha$ . Esse aumento na liberação de substância P, seguido de aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL1-  $\beta$ ) pode ser um dos fatores que contribuem para o aumento da atividade osteoclástica e reabsorção óssea relacionados à deficiência desse elemento. Além disso, foi observada uma diminuição na secreção de PTH, o que contribuiu para a diminuição da formação óssea<sup>48, 49, 50</sup>. A

alteração na secreção de PTH ocorre de maneira qualitativamente igual em humanos e animais com deficiência de magnésio<sup>46</sup>, sendo que a principal diferença está no fato de que em humanos a deficiência desse elemento resulta em hipocalcemia enquanto em roedores a deficiência é acompanhada de hipercalcemia<sup>49</sup>.

Em estudo realizado por Carpenter et al.<sup>7</sup>, foi observado que em ratos em crescimento, após oito dias de privação de magnésio, houve uma redução nos níveis de osteocalcina, um importante marcador específico de formação óssea, indicando que a deficiência desse elemento pode resultar em alterações na qualidade e quantidade de tecido ósseo na fase de crescimento.

Já em animais adultos há poucos estudos relatados na literatura sobre a influência da deficiência de magnésio no metabolismo ósseo. No estudo de Coudray et al.<sup>11</sup> foi observado que animais mais velhos apresentaram menor absorção intestinal e retenção do magnésio. Entretanto, não foi observada alteração na concentração desse elemento no soro, enquanto que no osso foi observada uma diminuição nos níveis do mineral.

A deficiência experimental de magnésio demonstrou também um efeito sobre o processo inflamatório e a resposta imunológica.

Uma importante modificação durante a inflamação é o aumento na produção de citocinas pro-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6)<sup>31, 37</sup>. O aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 ocorre com menos de 4 dias de deficiência de magnésio, portanto a resposta inflamatória é um acontecimento precoce na deficiência desse mineral, sugerindo que a redução dos níveis plasmáticos de magnésio extracelular pode ser responsável pela ativação das células imunológicas<sup>31</sup>.

Quanto a outras alterações na resposta imunoinflamatória, o estudo de Bussiére et al.<sup>6</sup> demonstrou que na deficiência de magnésio há um aumento no número de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) circulantes e na ativação dessas células, havendo portanto um aumento

na atividade fagocítica e uma maior produção de espécies reativas de oxigênio responsáveis pela maior destruição tecidual. Nesse mesmo estudo foi observado ainda que a maior concentração extracelular de magnésio inibe a formação desses radicais livres.

Outra modificação relacionada às alterações na concentração de magnésio é em relação ao sistema RANK, RANKL e OPG<sup>45</sup>. O ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), seu receptor celular RANK e seu antagonista osteoprotegerina (OPG) são identificados como sendo o sistema chave de regulação molecular para a remodelação óssea. O RANKL quando se liga ao seu receptor RANK estimula a diferenciação e ativação de osteoclastos. Esse efeito estimulatório é inibido por seu antagonista (OPG), o qual inibe a reabsorção óssea prevenindo a ligação do RANKL com o receptor RANK, ou seja, inibe a ativação e diferenciação dos osteoclastos. O sistema RANK também contribui para a reabsorção óssea induzindo a expressão de uma proteinase (catepsina K), que é produzida por osteoclastos ativados e está envolvida com a solubilização da matriz óssea<sup>56</sup>. As anormalidades nesse sistema têm sido relacionadas a várias patologias como osteoporose pós-menopausa, artrite reumatóide, doença periodontal, tumores ósseos benignos e malignos, metástases ósseas, doença de Paget e hipercalcemia maligna<sup>22</sup>.

A deficiência de magnésio pode regular a expressão de RANKL e seu antagonista OPG, como demonstrado no estudo de Rude et al.<sup>45</sup>, onde foi constatado um aumento de RANKL, essencial para osteoclastogênese, e uma diminuição da presença de OPG, levando à maior reabsorção óssea. A deficiência de OPG resulta em osteoporose, pela maior reabsorção óssea, assim como a deficiência de RANKL resulta em osteopetrose<sup>62</sup>.

O entendimento de alterações metabólicas sistêmicas é de fundamental importância para que se obtenha sucesso em muitos tratamentos odontológicos. No tratamento com implantes

osseointegrados, as alterações sistêmicas e ósseas causadas pela deficiência de magnésio, relatadas anteriormente, podem ser um importante fator de interferência no resultado e podem ser responsáveis por falhas uma vez que uma grande parte da população apresenta essa deficiência.

## **2.2 OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES**

A osseointegração foi definida primeiramente por Branemark et al.<sup>4</sup> como o contato direto entre implante e osso, e mais tarde, definida como o contato direto entre implante e osso sob carga funcional<sup>2</sup>.

Após o estabelecimento dessa nova possibilidade de reabilitação oral, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de tornar esse tipo de tratamento mais previsível.

Uma porcentagem muito alta de sucesso pode ser conseguida seguindo o protocolo de osseointegração de Branemark<sup>28</sup>, porém apesar de ocorrer em menor porcentagem, ainda existem falhas na osseointegração de implantes.

Diversos fatores contribuem para as falhas dos implantes orais, sendo o trauma cirúrgico e as condições anatômicas os mais importantes para a perda primária de implantes; já a qualidade óssea, o volume ósseo e a sobrecarga dos implantes são os principais determinantes para perda tardia<sup>36</sup>.

Muitos estudos não levam em consideração as alterações biológicas que podem acarretar em perda do implante. Berglungh et al.<sup>3</sup> em revisão sistemática de estudos prospectivos com um mínimo de 5 anos de instalação de implantes, observou que a perda do implante é freqüentemente descrita (96-100% dos estudos), enquanto que as complicações biológicas foram consideradas em 40 a 60% e complicações técnicas em 60 a 80% dos estudos.

A falha da osseointegração de um implante anteriormente estável e ancorado pode ser conceituada como a falha na mineralização da matriz óssea em contato direto com a superfície do implante, já que mecanicamente a interface implante/osso depende de uma estrutura mineralizada e intacta<sup>25</sup>.

O metabolismo ósseo normal é o resultado de um processo de formação e reabsorção óssea, chamado de remodelação óssea ou

*turnover* ósseo, que envolve principalmente dois tipos de células, osteoblastos (relacionada à formação óssea) e osteoclastos (relacionada à reabsorção óssea). Essas células são reguladas por uma complexa rede sinalizadora, mediada pelos receptores das membranas celulares e várias citocinas<sup>21</sup>. No estado patológico, onde há uma perda óssea excessiva, tem-se um excesso de fatores que estimulam a reabsorção óssea quando comparados a fatores que inibem a reabsorção óssea. Dentre as citocinas que estimulam a reabsorção óssea nos tecidos periimplantares tem-se IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, entre outras. Além das citocinas, também são de grande importância as interações RANK/RANKL e OPG<sup>21</sup>.

Alterações ósseas causadas por influência de doenças sistêmicas, podem se traduzir em baixa densidade óssea ou transtornos no metabolismo ósseo, principalmente na sua remodelação, o que pode ser prejudicial no tratamento com implantes.

Diversos autores<sup>13, 38, 59</sup> têm estudado o papel das doenças sistêmicas, como a osteoporose, e seus tratamentos na cicatrização de implantes dentais, demonstrando que a osteoporose pode resultar em menor quantidade de tecido ósseo em contato com a superfície dos implantes.

Entretanto, poucos estudos demonstram o efeito das doenças que causam perda de massa óssea sobre implantes com osseointegração já estabelecida. Em estudos realizados em ratas ovariectomizadas foi observada a redução da massa óssea ao redor de implantes osseointegrados instalados na tíbia, assim como a diminuição da força de torque de remoção desses implantes, mostrando que, mesmo em implantes com osseointegração já estabelecida, as alterações sistêmicas podem exercer um efeito negativo sobre a osseointegração<sup>16, 17, 51</sup>.

O envelhecimento também parece influenciar nesse processo, sendo que estudos demonstraram que a capacidade de

formação óssea é menor em ratos mais velhos do que em ratos mais novos<sup>41</sup>, e que na ocorrência de fratura há uma grande diferença na capacidade de regeneração óssea entre ratos jovens, adultos e idosos<sup>35</sup>. Com isso, pode-se supor que a idade pode influenciar também no processo de reparação do tecido ósseo após a colocação de implantes, como demonstrado no estudo de Shirota et al.<sup>52</sup>.

Assim, a verificação de fatores de risco locais, como dimensão óssea alveolar vertical e horizontal, e sistêmicos, como doenças metabólicas, são de grande importância para o planejamento, modificação de protocolos e, finalmente, o sucesso do tratamento<sup>39</sup>.

Em função do relatado anteriormente quanto ao efeito da deficiência do magnésio sobre o tecido ósseo e do exposto acima, entende-se que é oportuno avaliar o efeito da deficiência de Mg sobre o tecido ósseo ao redor de implantes com osseointegração estabelecida.

### 3 Proposição

Avaliar, em animais com diferentes idades, o efeito da deficiência de magnésio na dieta sobre o metabolismo ósseo e a densidade óssea ao redor de implantes de Tícp (titânio comercialmente puro) com osseointegração estabelecida.



## 4 Material e Método

### **4.1 ANIMAIS**

#### **4.1.1 GRUPOS**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), processo nº 20/2006 (Anexo 1).

Neste estudo foram utilizados 90 ratos (*Rattus Norvegicus, albinus, Holtzman*) machos, divididos em dois grupos: Grupo Jovem: ratos com aproximadamente 60 dias de idade (peso médio=180g) (n=45), e Grupo Adulto: ratos com aproximadamente 150 dias de idade (peso médio=380g) (n=45), provenientes do Biotério do Campus de Araraquara – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, confeccionadas em aço-inox, em ambiente com temperatura, umidade e luz controlados.

#### **4.1.2 SUBGRUPOS**

Os animais de cada grupo, foram subdivididos em 3 subgrupos, conforme a dieta que receberam :

- Subgrupo Controle (CTLE): os animais com acesso à ração com quantidade diária ideal de Mg (AIN-93), por um período de 90 dias. (n=15)<sup>42</sup>
- Subgrupo Mg 1: os animais com acesso à ração com quantidade reduzida de Mg em 75%, por um período de 90 dias. (n=15)<sup>48</sup>
- Subgrupo Mg 2: os animais com acesso à ração com quantidade reduzida de Mg em 90%, por um período de 90 dias. (n=15)<sup>50</sup>

Para hidratação, os animais receberão água destilada *ad libitum*.

## 4.2 DIETA

A confecção da dieta foi baseada no AIN-93 (American Institute of Nutrition) para manutenção de roedores<sup>42</sup>, como mostrado nas Tabelas 1 e 2:

Tabela 1- Formulação da dieta para manutenção de roedores (AIN – 93M) sendo a caseína usada como fonte de proteína

<b>Ingredientes</b>	<b>AIN – 93M (g/kg dieta)</b>
Amido de milho	465.69
Caseína (> 85% proteína)	140.00
Malto dextrina	155.00
Sacarose	100.00
Óleo de soja	40.00
Fibra	50.00
Mistura Mineral	35.00
Mistura Vitamínica	10.00
L-Cistina	1.80
Bitartarato de colina (41.1% colina)	2.50

Tabela 2- Mistura mineral com as concentrações minerais recomendadas para a manutenção de roedores (controle)<sup>42</sup>, dieta com redução de 75% de magnésio (Mg1) e dieta com redução de 90% de magnésio (Mg2).  
(AIN – 93M – MX)

<b>Ingredientes</b>	<b>Controle</b> (g ou mg/kg)	<b>Mg 1</b> (g ou mg/kg)	<b>Mg 2</b> (g ou mg/kg)
Carbonato de cálcio anidro (40.04% Ca)	375.00	375.00	375.00
Fosfato de potássio monobásico (22.76% P, 28.73% K)	250.00	250.00	250.00
Citrato de Potássio, tripotássico monohidratado (36.16% K)	28.00	28.00	28.00
Cloreto de sódio (39.34% Na, 60.66% Cl)	74.00	74.00	74.00
Sulfato de potássio (44.78% K, 18.39% S)	46.60	46.60	46.60
Oxido de magnésio (60.32% Mg)	24.00	6.0	2.4
Citrato férrico (16.5% Fe)	6.06	6.06	6.06
Carbonato de zinco (52.14% Zn)	1.65	1.65	1.65
Metassilicato de sódio 9H <sub>2</sub> O (9.88% Si)	1.45	1.45	1.45
Carbonato de manganês (47.79% Mn)	0.63	0.63	0.63
Carbonato cúprico (57.47% Cu)	0.30	0.30	0.30
Sulfato de cromo potássio 12 H <sub>2</sub> O (10.42% Cr)	0.275	0.275	0.275
Ácido bórico (17.5% B), mg	81.5	81.5	81.5
Fluoreto de sódio (45.24% F), mg	63.5	63.5	63.5
Carbonato de níquel (45% Ni), mg	31.8	31.8	31.8
Cloreto de lítio (16.38% Li), mg	17.4	17.4	17.4
Selenato de sódio anidro (41.79% Se), mg	10.25	10.25	10.25
Iodato de potássio (59.3% I), mg	10.0	10.0	10.0
Paramolibdato de Amônio 4 H <sub>2</sub> O (54.34% Mo), mg	7.95	7.95	7.95
Vanadato de amônio (43.55% V), mg	6.6	6.6	6.6
Sacarose	209.806	209.806	209.806

As dietas foram formuladas por empresa\* especializada e foram quimicamente analisadas com os métodos usuais para determinação da composição centesimal. Para acompanhamento do crescimento e desenvolvimento do animal, foram controlados diariamente a ingestão alimentar e, para avaliação da adaptação dos animais à dieta e às condições nutricionais, foi aferido semanalmente, o peso corporal.

#### 4.3 DESENHO DO ESTUDO

Após um período de cinco dias, para a adequação dos animais ao ambiente do biotério, todos foram submetidos à cirurgia de instalação dos implantes nas tíbias direita e esquerda. Durante o período de 60 dias, necessários à osseointegração dos implantes<sup>8</sup>, os animais receberam a dieta com concentração adequada de magnésio. Decorrido o período de osseointegração dos implantes, os animais dos grupos Mg1 e Mg2 tiveram acesso à dieta com redução do Mg, como mostrado anteriormente, por mais 90 dias, com o objetivo de instalar a referida deficiência<sup>48, 50</sup>. Após esse período, todos os animais foram sacrificados (Figura 1).

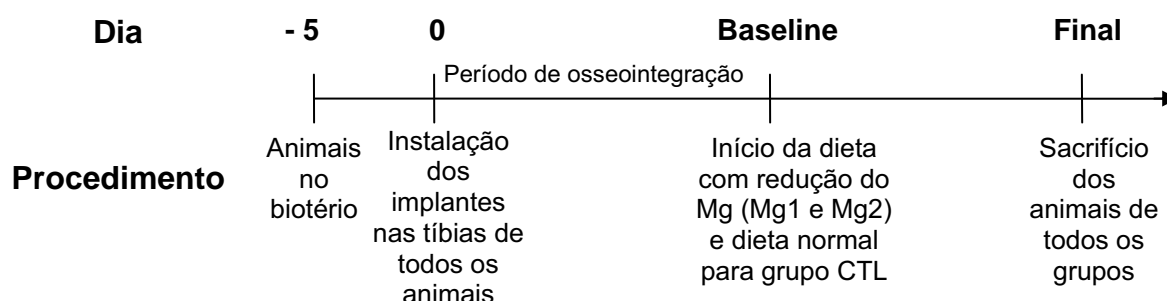


FIGURA 1 – Desenho Experimental

\* Pragsoluções biociência, Jaú, BR

#### 4.4 CIRURGIA PARA INSTALAÇÃO DOS IMPLANTES

Os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de ketamina\* numa concentração de 0,08ml/100g de massa corpórea e cloridrato de xilazina 2% \*\* na concentração de 0,04ml/100g. Posteriormente, foram submetidos à tricotomia da região interna das pernas direita e esquerda e realizada a antisepsia com gaze estéril embebida em solução de iodopovidona (Figura 2).

Uma incisão de aproximadamente 10 mm foi realizada, em planos, na região a ser operada, mais precisamente sobre a metáfise tibial (Figura 3). Após uma dissecação delicada (Figura 4), o tecido ósseo foi submetido à osteotomia, realizada por meio de uma seqüência progressiva de fresas (fresa lança; fresa espiral de 2.0 mm) para acomodar um implante de titânio\*\*\* de superfície porosa com 4 mm de comprimento por 2.2 mm de espessura (Figura 5). Todas as perfurações foram realizadas com motor elétrico\*\*\*\*, ajustado a 1200 rpm, sob abundante irrigação com solução salina estéril. O implante foi instalado com a ajuda de uma chave digital\*\*\*\*\* (Figura 6). Todo ferimento foi suturado em planos, internamente com fio reabsorvível\*\*\*\*\* e externamente com fio de seda\*\*\*\*\* (Figura 7).

Os animais receberam, em dose única, penicilina associada à estreptomicina\*\*\*\*\* na dosagem 0,1 ml/kg de peso e 5mg/kg de dexametasona intramuscular\*\*\*\*\*.

---

\* Ketamina Agener – Agener União

\*\* Rompum - Bayer

\*\*\* Conexão Sistemas de Prótese

\*\*\*\* BLM 600 - Driller

\*\*\*\*\* Chave Hexagonal – Conexão Sistemas de Prótese

\*\*\*\*\* Vicryl 5-0 – Johnson & Johnson

\*\*\*\*\* Seda 4-0 - Johnson & Johnson

\*\*\*\*\* Pentabiótico - Wyeth-Whitehall Ltda

\*\*\*\*\* Dexar – Agener União



FIGURA 2 – Tricotomia da área a ser operada

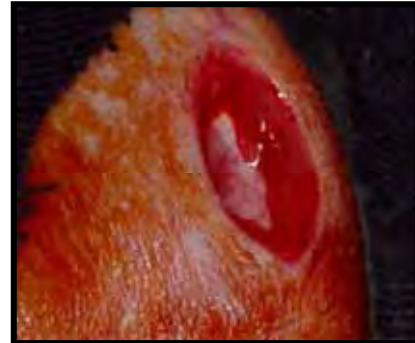


FIGURA 3 – Incisão da pele e tecidos subjacentes



FIGURA 4 – Exposição do leito receptor do implante



FIGURA 5 – Fresagem do leito receptor (fresa lança)



FIGURA 6 – Inserção do implante



FIGURA 7 – Sutura em planos

#### 4.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os animais foram sacrificados, após o período previamente determinado, com aprofundamento de anestesia. No sacrifício foram removidos a coluna lombar, o fêmur esquerdo, e as tíbias, direita e esquerda, do animal. Além disso, foi removido o periósteo presente no leito do implante.

#### 4.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

No período de 24 horas antes do sacrifício, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas para a coleta da urina de 24 horas, a qual foi utilizada para mensuração das concentrações de Mg e Ca. A amostra coletada foi congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem.

No momento do sacrifício, uma amostra de sangue foi coletada por punção da artéria caudal. A amostra de sangue obtida foi deixada para coagular por 30 minutos, sendo então centrifugada por 10 minutos. O soro separado do coágulo foi congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futura análise da concentração de Mg e Ca.

A mensuração da concentração sérica de Mg e Ca foi realizada por meio de kit comercial, pelo método colorimétrico\*. Nesse tipo de teste, o Mg, em meio alcalino, reage com o *magon sulfonado* (cor azul) formando um complexo de cor rósea, sendo que sua intensidade é proporcional à concentração de Mg presente na amostra. Sua absorbância foi mensurada pelo espectrofotômetro, no comprimento de onda de 500nm.

Para a quantificação do Ca, a reação ocorre com o arsenazo III em meio discretamente ácido produzindo um complexo de cor azul, o qual foi mensurado em espectrofotômetro a 650nm.

---

\* Labtest Diagnóstica

As concentrações urinárias de Mg e Ca foram medidas através de análises colorimétricas, semelhantes ao realizado no soro e descrito anteriormente.

#### 4.7 ANÁLISE DA DENSIDADE ÓSSEA

Foi realizada análise da densidade mineral óssea (BMD) da coluna lombar e do fêmur esquerdo para a constatação da perda de massa óssea esquelética. Para isso foi utilizado um densitômetro\*, sendo a análise da densitometria óssea realizada por Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA), empregando-se o software “*Small Animal*”, fornecido pelo fabricante do aparelho, no modo “*High Resolution*”.

Para calibração do aparelho, foi realizado um teste, o qual consiste em mensurar a densidade de um bloco padrão composto por três camadas sintéticas, de constituição semelhante ao osso, com área e conteúdo mineral conhecidos.

A delimitação das regiões analisadas foi realizada por dispositivos existentes no programa do aparelho, selecionando sempre o mesmo espaço a fim de padronizar as medidas de todas as sub-regiões.

Foram efetuadas medidas de BMD global e de três sub-regiões, assim determinadas (Figura 8 e 9):

Coluna Vertebral: L2) vértebra lombar 2

L3) vértebra lombar 3

L4) vértebra lombar 4

Fêmur: R1) Epífise proximal

R2) Epífise distal

R3) Diáfise

A precisão da DXA na determinação da BMD foi avaliada pela mensuração do coeficiente de variação, expresso como uma

---

\* QDR 2000 Hologic



porcentagem da média<sup>18</sup>. Para isso, foram realizadas cinco medidas consecutivas de cada região anatômica de uma mesma amostra.

Todas as medidas foram realizadas no Laboratório de Metabolismo Ósseo da Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Medicina de São Paulo-USP.

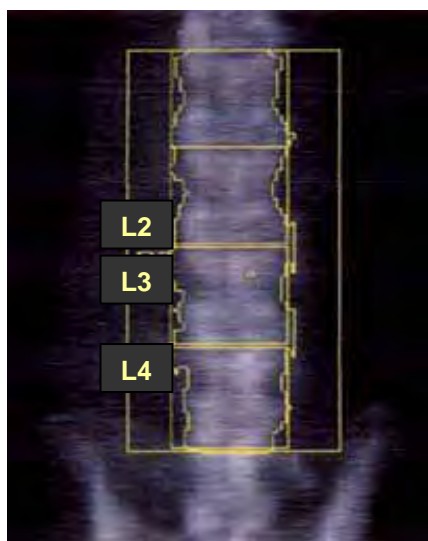


FIGURA 8- Avaliação Global e das sub-regiões da coluna lombar.

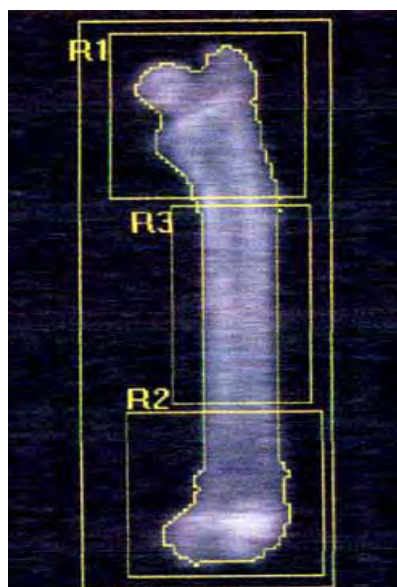


FIGURA 9- Avaliação Global e das sub-regiões do fêmur.

#### 4.8 ANÁLISE RADIOGRÁFICA

As imagens radiográficas dos implantes na tíbia foram obtidas por meio de um sistema de imagem digital direta - CDR (Computed Dental Radiography for Microsoft Windows) <sup>\*</sup>, o qual utiliza um sensor eletrônico em substituição ao filme radiográfico. Os implantes foram posicionados em um dispositivo com seu longo eixo perpendicular ao feixe central de raios-X e paralelo ao sensor, numa distância foco-objeto de 40 cm. O sensor foi exposto aos raios-X numa potência de 70KVp e 10mA, com tempo de exposição de 15 pulsos/segundo.

A resolução de imagem foi de 635 ppi (pixels per inch), o tamanho da imagem de 900x641 dpi e o tamanho dos pixels de 40 microns. As imagens foram armazenadas em formato TIFF (Tagged Image File Format) sem compressão de imagem (8 bits com resolução de 600 dpi).

As imagens foram exportadas do programa Schick® e importadas para um *software* analisador de imagens <sup>\*\*</sup>, em um computador com um processador de 1700 MHz <sup>\*\*\*</sup>, 512k, 256 DDR MB e sistema operacional Windows XP <sup>\*\*\*\*</sup> em uma tela plana S-VGA de 15 polegadas (1024 x 768 pixel resolution). A densidade óssea radiográfica foi avaliada utilizando-se a análise dos níveis de cinza da radiografia (histograma) em uma área de 5x5 pixels nas regiões de interesse: corticais, superior e inferior, e região medular, em ambos os lados do implante (Figura 10).

---

\* Shick Technologies, Inc

\*\* Adobe® Photoshop® 6.0

\*\*\* Athlon XP, AMD, USA

\*\*\*\* Microsoft, USA

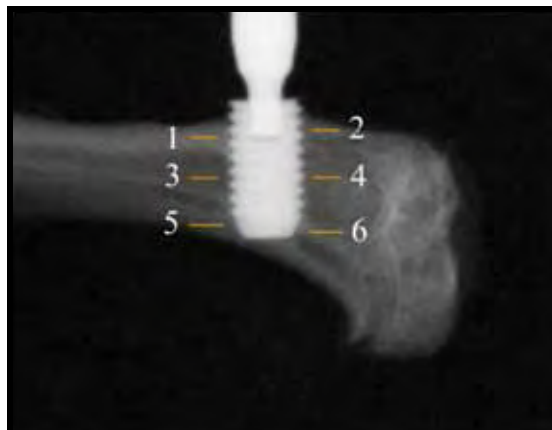


FIGURA 10- Regiões de interesse para análise da densidade óssea radiográfica (1 e 2 - cortical superior; 3 e 4 - medular; 5 e 6 - cortical inferior).

#### 4.9 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL, TRANSCRIÇÃO REVERSA E PCR SEMI-QUANTITATIVO

O perióstio obtido da região em que estava instalado o implante foi conservado em Trizol e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para posterior análise da expressão de mRNA das citocinas Ligante do Receptor-Ativador do Fator Nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) e Osteoprotegerina (OPG).

Para o isolamento e purificação de RNA foi seguido o protocolo do fornecedor\*. No tecido macerado, para melhor isolamento de RNA, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de Trizol (separação de fases). Os tubos foram agitados vigorosamente por 30 segundos e incubados à temperatura ambiente por 2 minutos, sendo, em seguida, centrifugados a 13.000 RPM a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. A fase incolor superior foi cuidadosamente transferida para um novo tubo ao qual foi, então, acrescentado 0,5 mL de isopropanol (precipitação do RNA). Após agitação suave por inversão dos tubos, estes foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugados por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e

\* Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

13.000 RPM. Após remoção por aspiração do sobrenadante, foi acrescentado 0,5 mL de etanol a 75% (lavagem do RNA), os tubos foram submetidos à breve agitação (5 segundos) em vórtex e novamente centrifugados por 5 minutos a 4°C e 9.500 RPM. O etanol foi removido cuidadosamente por aspiração e o RNA eluído em 10 a 40 µL (segundo o tamanho do pellet de RNA obtido) de tampão Tris-EDTA (TE, pH 7.5).

Estas amostras de RNA foram diluídas em tampão TE (1:100 a 1:1000), segundo o tamanho do pellet, para um volume final de 100 µL. A quantidade e pureza do RNA serão determinadas em espectrofotômetro de luz UV por meio da avaliação das absorvâncias a 260 nm e da relação entre as absorvâncias a 260/280 nm, respectivamente.

A síntese de cDNA foi realizada subseqüentemente utilizando 1µg de RNA total e 200 unidades da enzima de transcriptase reversa na presença de Oligo-dT (12-18) primers, dNTPs e MgCl<sub>2</sub>, segundo as instruções do fabricante\*.

Os pares de primers específicos para os genes-alvo OPG e RANKL\* são apresentados na Tabela 3. Como controle endógeno do RT-PCR foi utilizado a expressão de um gene constitutivo, como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cuja expressão não se altera com a deficiência de magnésio. É importante notar que embora as sequências de pares de primers específicas para os genes-alvo de ratos tenham sido publicadas na literatura, as condições da reação de PCR (incluindo concentração de primers, temperatura de anelamento e número de ciclos) foram otimizadas em experimentos-piloto.

---

\* Invitrogen Corp., Carlsbad, USA

**Tabela 3** – Seqüência dos primers e condições da reação de PCR (Ratos)

Gene	Primers (5' – 3') Sense (S) e antisense (AS)	Acession#	Ta (°C)	Amplicon	Ciclos
GAPDH	CACCATGGAGAAGGCCGGGG – S	X02231	52	437 bp	30
	GACGGACACATTGGGGGTAG – AS				
RANKL	TCGGGTTCCATAAAGTCAG – S	F019048	58	493 bp	36
	GGAACGCTAATTCCTCACCA – AS				
OPG	CACTGCACAGTCAGGAGGAA – S	U94330	55	318 bp	36
	TGCTTTCGATGACGTCTCAC – AS				

A reação de PCR foi realizada num volume total de 25 µL, utilizando 2 µL do produto da reação de transcriptase reversa na presença de 100 pmol/µL de primers de cada gene (50 pmol/µL de cada primer, *sense* e *antisense*). Os produtos da reação de PCR foram resolvidos por meio de eletroforese em gel de agarose a 1.5% e corados com brometo de etídeo (0.5 µg/mL). Para documentação e análise, foram obtidas imagens digitalizadas destes géis, as quais foram submetidas à análise densitométrica. A expressão dos genes-alvo foi normalizada para a expressão do *housekeeping gene* (GAPDH) e expressas como *fold change* em relação ao controle negativo.

#### 4.10 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada estatística descritiva dos dados pela aplicação do teste de D'Agostino para avaliação da normalidade e, então, aplicados os testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Kruskal-Wallis), para a comparação das médias obtidas entre os grupos experimentais. O nível de significância estabelecido foi 5%. A hipótese de nulidade foi rejeitada se  $p \geq 0,05$ .

Os dados relativos ao peso corporal, concentração sérica e urinária de magnésio e cálcio e a expressão gênica de RANKL e OPG foram analisados pelo teste não paramétrico (Kruskal Wallis).

Os dados relativos à densidade mineral óssea (DEXA) das vértebras lombares e fêmur e os dados relativos a densidade radiográfica ao redor do implante com osseointegração estabelecida foram analisados pelo teste paramétrico (ANOVA).

## ***5 Resultado***

### **5.1 Peso**

A análise do peso dos animais demonstra que houve um ganho ponderal para todos os grupos ao longo de todo o período experimental (Figura 11).

A análise do peso no período inicial demonstrou diferença significativa entre os grupos controle e Mg1 ( $p < 0.05$ ) para os animais do grupo jovem. Porém, no início da fase de deficiência de Mg (baseline), não foi constatada diferença significativa entre os grupos. Entre o baseline e o final do experimento foi verificado um ganho de peso estatisticamente significativo somente nos grupos Mg1 e Mg2 ( $p < 0.05$ ) (Figura 11).

A análise do peso dos ratos adultos no início do experimento demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos Mg1 e Mg2 ( $p < 0.05$ ), enquanto que a comparação entre o grupo controle e demais grupos não apresentou diferença estatisticamente significativa. Entretanto, no baseline não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 11).

O ganho ponderal dos subgrupos de animais adultos, no período compreendido entre baseline e final do experimento, foi considerado como não significativo (Figura 11).

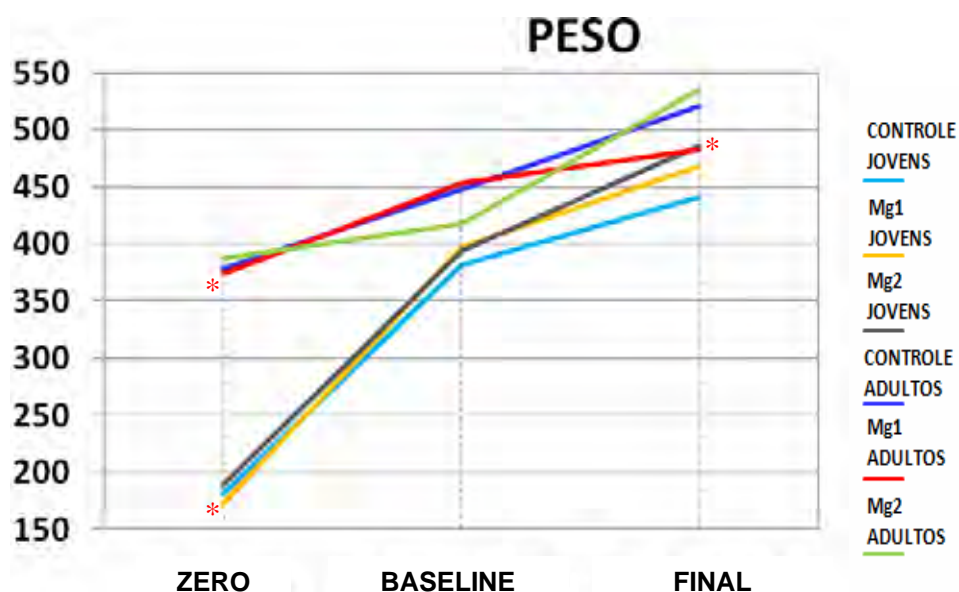


FIGURA 11- Comparação entre os grupos quanto à alteração do peso durante o período experimental.

\* $p < 0.05$

## **5.2 Concentração sérica de Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg):**

A análise dos dados (Kruskal Wallis) relativos ao grupo de ratos jovens demonstrou que houve uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) nos subgrupo controle e subgrupos Mg1 e Mg2 quanto à concentração de magnésio no soro. Os subgrupos não apresentaram diferença entre si quanto à concentração de cálcio (Figura 12).



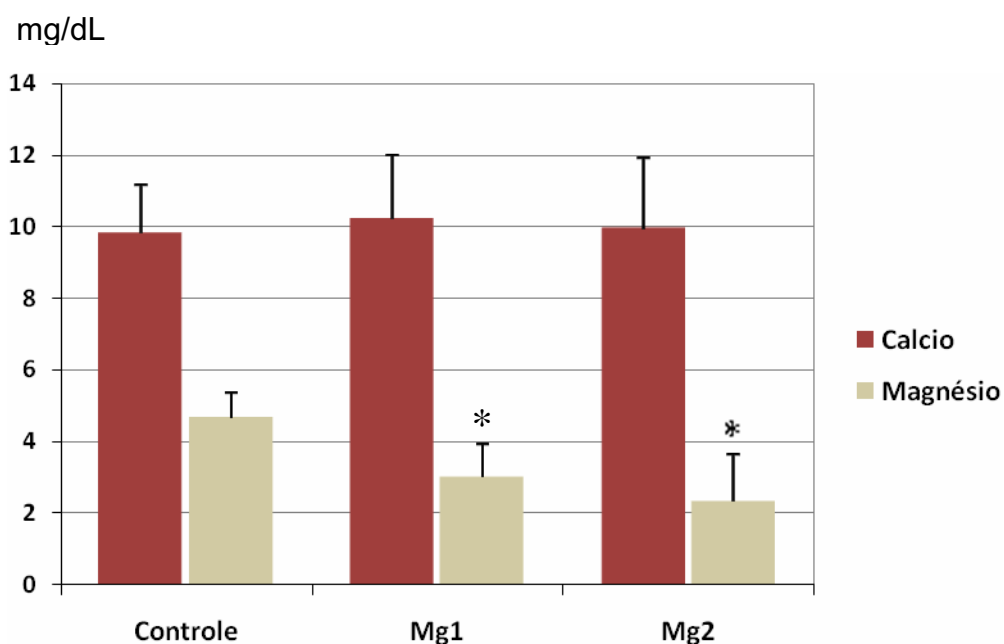


FIGURA 12- Comparação entre grupos quanto à concentração sérica de cálcio e magnésio para grupo de animais jovens.

\*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

A análise dos dados (Kruskal Wallis) relativos ao grupo de ratos adultos demonstrou que houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0.05$ ) nos subgrupos Mg2 e controle quanto à concentração plasmática de cálcio. Quanto à concentração de magnésio, houve uma diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos controle Mg1 e Mg2 (Figura 13).

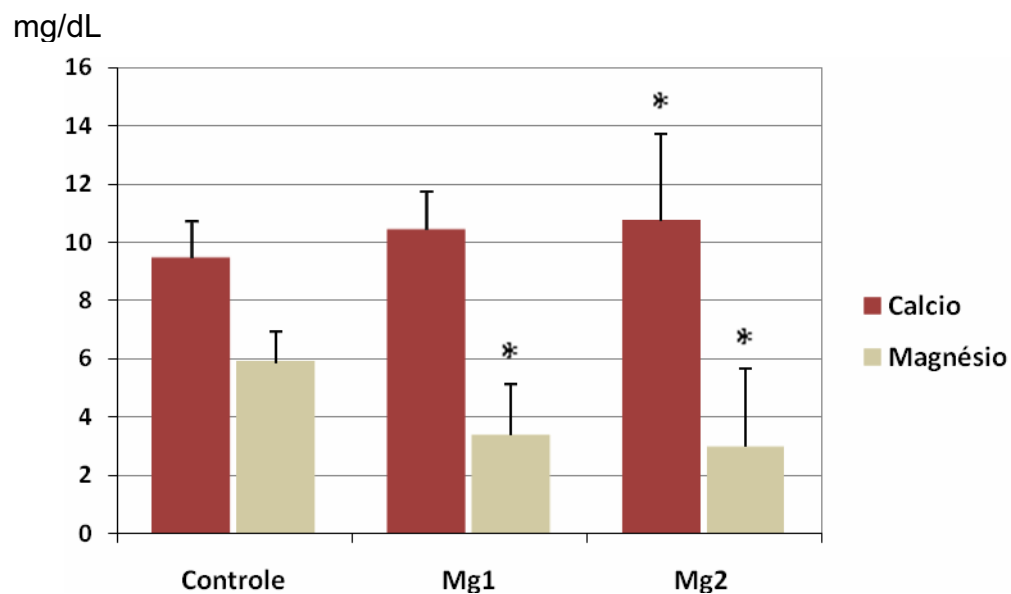


FIGURA 13- Comparação entre grupos quanto à concentração sérica de cálcio e magnésio para grupo de animais adultos.

\*  $p < 0.05$  em relação ao grupo controle.

Ao analisar a influência da idade sobre a concentração plasmática de magnésio foi observada um aumento estatisticamente significativo somente nos subgrupos controle (jovem e adulto). A concentração plasmática de cálcio não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando observada a influência da idade (Tabela 4).

**Tabela 4-** Comparação entre grupos quanto à influência da idade sobre a concentração sérica de cálcio e magnésio

Íon	Subgrupos	Jovem	Adulto
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	CTL	9.81 ± 1.31	9.45 ± 1.20
	Mg 1	10.19 ± 1.94	10.39 ± 2.97
	Mg 2	9.36 ± 1.77	10.71 ± 1.30
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	CTL*	4.65 ± 0.67	5.85 ± 1.03
	Mg 1	2.99 ± 1.26	3.36 ± 2.66
	Mg 2	2.33 ± 0.91	2.97 ± 1.71

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre subgrupos controle

### **5.3 Concentração Urinária de Cálcio e Magnésio:**

Quanto à concentração urinária de magnésio do grupo jovem, a análise (Kruskal Wallis) demonstrou que houve uma diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos Mg1 e Mg2 em comparação ao subgrupo controle. Em relação à concentração de cálcio, houve um aumento estatisticamente significativo nos subgrupos Mg1 e Mg2, porém não houve diferença estatisticamente significativa no subgrupo controle e demais subgrupos (Figura 14).

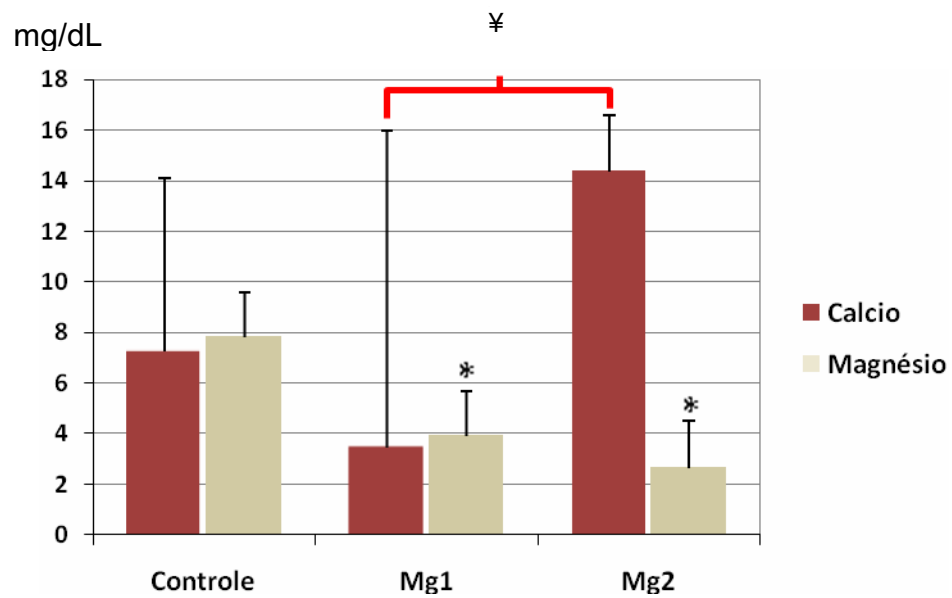


FIGURA 14- Concentração urinária de cálcio e magnésio para grupo de animais jovens.

\*  $p < 0.05$  em relação ao subgrupo controle  
 ¥  $p < 0.05$

Quanto aos animais adultos, a análise dos dados obtidos (Kruskal Wallis) demonstrou que houve uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ ) nos subgrupos Mg2 e controle quanto à concentração urinária de magnésio. Os demais subgrupos não apresentaram diferença significativa para a concentração de magnésio e cálcio (Figura 15).

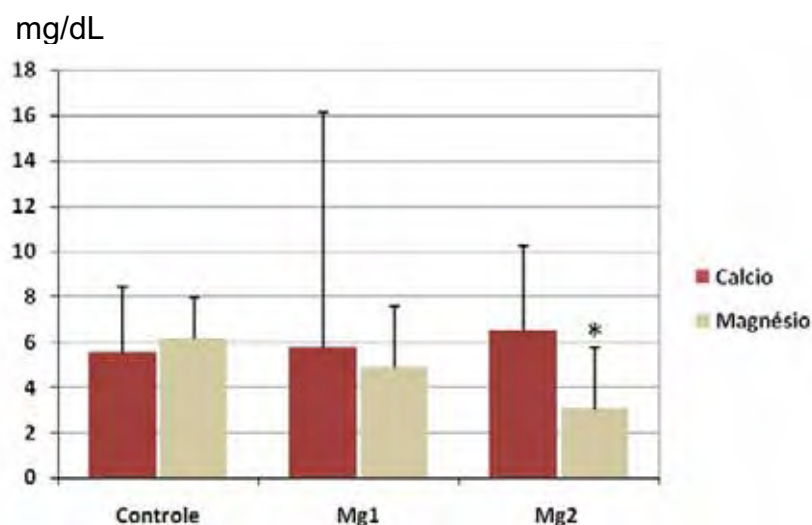


FIGURA 15- Concentração urinária de cálcio e magnésio para grupo de animais adultos.

\*  $p < 0.05$  em relação ao subgrupo controle.

Quanto à influência da idade sobre a concentração urinária de cálcio e magnésio, foi observado um aumento estatisticamente significativo nos subgrupos controles quanto à concentração urinária de magnésio. A idade não foi um fator de influência para a concentração urinária de cálcio (Tabela 5).

**Tabela 5-** Comparação entre grupos quanto à influência da idade sobre a concentração urinária de cálcio e magnésio

Íon	Subgrupos	Jovem	Adulto
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	CTL	7.26 ± 6.83	5.54 ± 2.87
	Mg 1	3.46 ± 2.23	5.71 ± 3.76
	Mg 2	14.37 ± 12.53	3.15 ± 2.46
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	CTL*	7.79 ± 1.80	6.13 ± 1.79
	Mg 1	3.91 ± 1.89	4.85 ± 2.71
	Mg 2	2.61 ± 1.78	3.04 ± 2.73

\* diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre subgrupos controle

## **5.4 Análise Densitométrica**

### **5.4.1 Análise Densitométrica das Vértexas Lombares:**

Para o grupo de animais jovens foi demonstrada diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos controle e Mg2 para a região L2 e global ( $p < 0.01$ ). No entanto, nos subgrupos Mg1 e Mg2, foi verificada diminuição estatisticamente significativa em L3 e L4 ( $p < 0.01$ ) e em L2 e Global ( $p < 0.05$ ) (Figura 16).

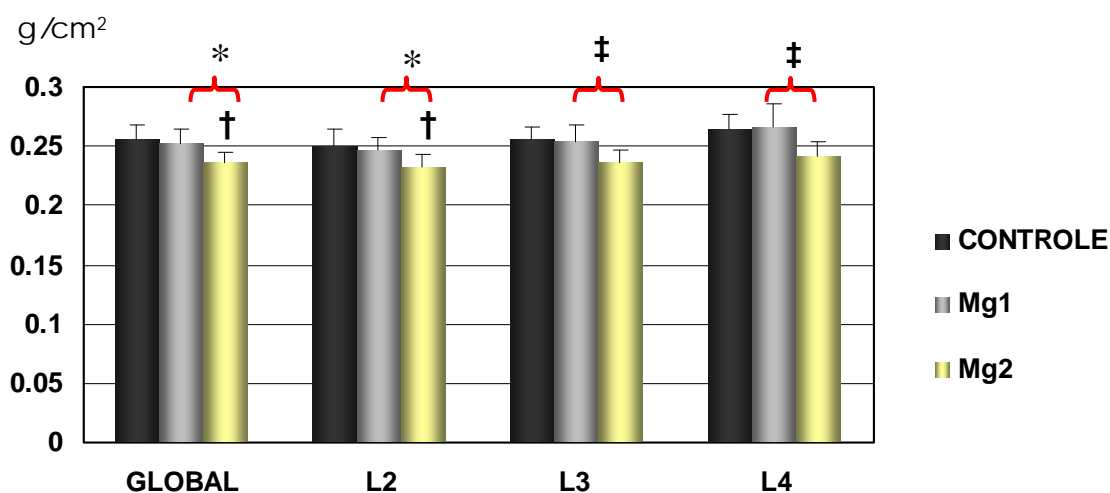


FIGURA 16- Densitometria óssea das vértebras lombares para grupo de animais jovens.

\* ( $p < 0.05$ )

‡ ( $p < 0.01$ )

† ( $p < 0.01$ ) diferença estatisticamente significativa em relação ao subgrupo Controle.

A análise dos dados de densitometria óssea das vértebras lombares para o grupo de animais adultos demonstrou diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos controle e Mg2 ( $p < 0.05$ ) para

todas as regiões. Foi constatada diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos Mg1 e Mg2 ( $p < 0.05$ ) na região L3 (Figura 17).

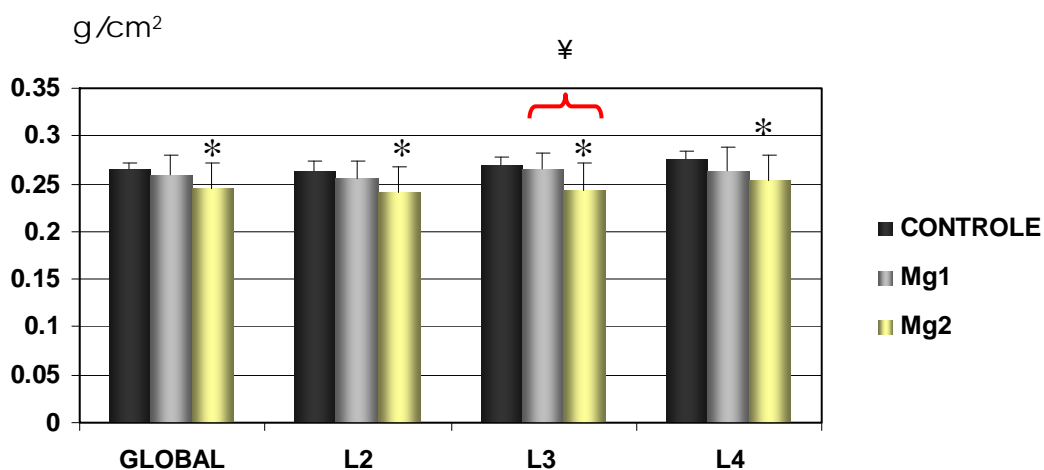


FIGURA 17- Densitometria óssea das vértebras lombares para grupo de animais adultos

\* ( $p < 0.05$ ) diferença estatisticamente significativa em relação ao subgrupo Controle

¥ ( $p < 0.05$ )

#### 7.4.2 Análise Densitométrica do Fêmur:

A análise dos dados de densitometria óssea do fêmur dos animais jovens, demonstrou uma diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos controle e Mg2 ( $p < 0.01$ ) e entre os subgrupos Mg1 e Mg2 ( $p < 0.05$ ) para as regiões R2 e Global. Entretanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa nos subgrupos controle e Mg1 para todas as regiões avaliadas (Figura 18).

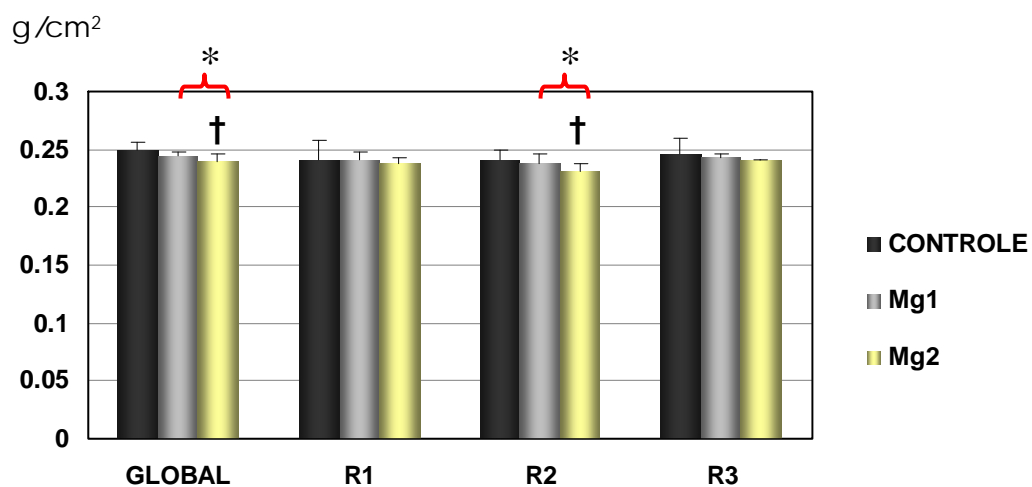


FIGURA 18- Densitometria óssea femoral para grupo de animais jovens.

\* ( $p < 0.05$ )

† ( $p < 0.01$ ) diferença estatisticamente significativa em relação ao subgrupo Controle

Para o grupo de animais adultos, a análise dos dados de densitometria do fêmur, demonstrou diminuição estatisticamente significativa nos subgrupos controle e Mg2 ( $p < 0.01$ ) e nos subgrupos Mg1 e Mg2 ( $p < 0.05$ ) apenas na região Global. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para as outras regiões (Figura 19).



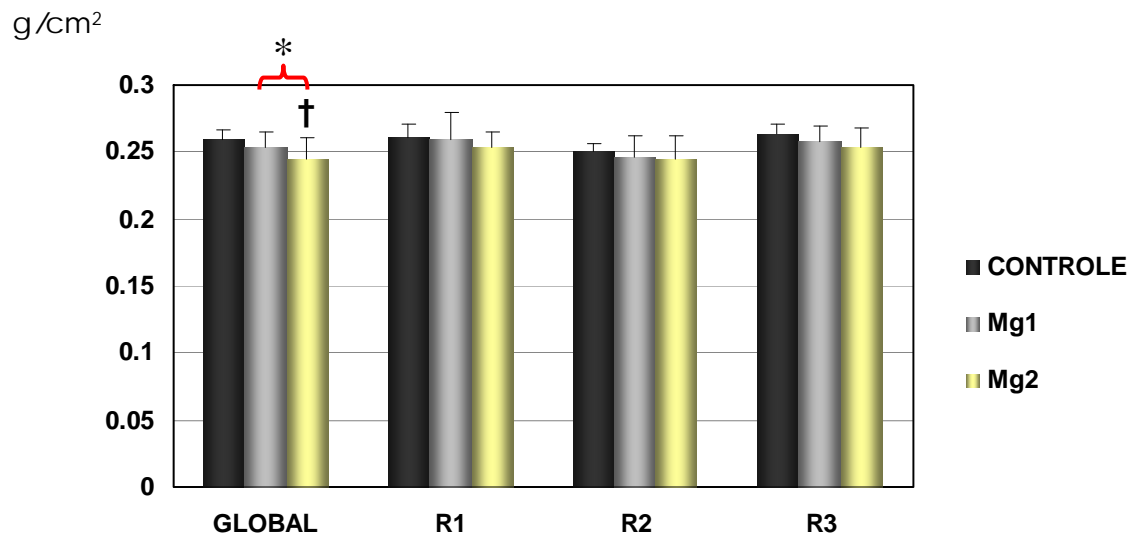


FIGURA 19- Densitometria óssea femoral para grupo de animais adultos.

\* ( $p < 0.05$ )

† ( $p < 0.01$ ) diferença estatisticamente significativa em relação ao subgrupo controle.

### **5.5 Análise de Densidade Óssea Radiográfica da Tíbia:**

A análise dos dados de densidade óssea radiográfica da tíbia para o grupo de animais jovens, demonstrou diminuição estatisticamente significativa no subgrupo controle e subgrupos Mg1 e Mg2 para as regiões cortical superior, medular e cortical inferior ( $p < 0.01$ ) (Figura 20).

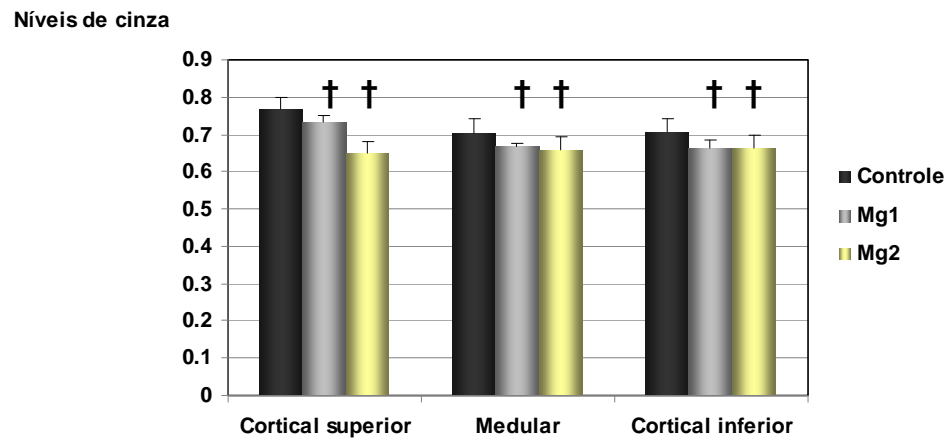


FIGURA 20- Densidade óssea radiográfica da tíbia, nas diferentes regiões, para grupos de animais jovens

†  $p < 0.01$  dos subgrupos Mg1 e Mg2 em relação ao controle

Para o grupo de animais adultos, a análise dos dados da densidade óssea radiográfica da tíbia, demonstrou diminuição estatisticamente significativa no subgrupo controle e subgrupos Mg1 e Mg2 nas regiões cortical superior ( $p < 0.01$ ) e cortical inferior ( $p < 0.05$ ). Na região medular houve diminuição estatisticamente significativa somente no subgrupo controle e o subgrupo Mg2 ( $p < 0.01$ ) (Figura 21).

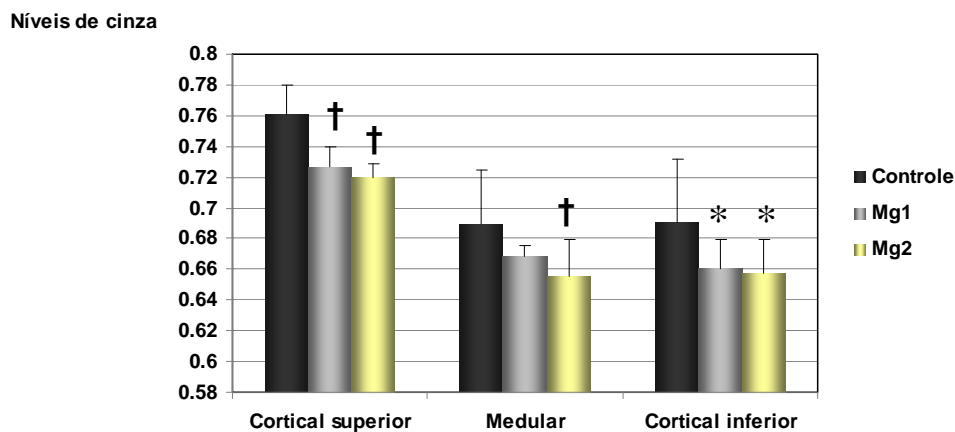


FIGURA 21- Densidade óssea radiográfica da tíbia, nas diferentes regiões, para grupos de animais adultos

\*  $p < 0.05$  em relação ao subgrupo controle

†  $p < 0.01$  em relação ao subgrupo controle

### **5.6 RT – PCR:**

A expressão de mRNA das citocinas Ligante do Receptor-Ativador do Fator Nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) de todos os grupos foi avaliada pela reação de RT – PCR.

Os resultados do grupo de animais jovens demonstrou uma tendência de aumento na expressão de mRNA para a citocina OPG à medida que aumenta a deficiência do magnésio, com aumento estatisticamente significativo entre os subgrupos controle e Mg2 (Figuras 22 e 23).

A expressão de mRNA da citocina RANKL não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos apesar de observada uma tendência de aumento de sua expressão (Figuras 22 e 23).

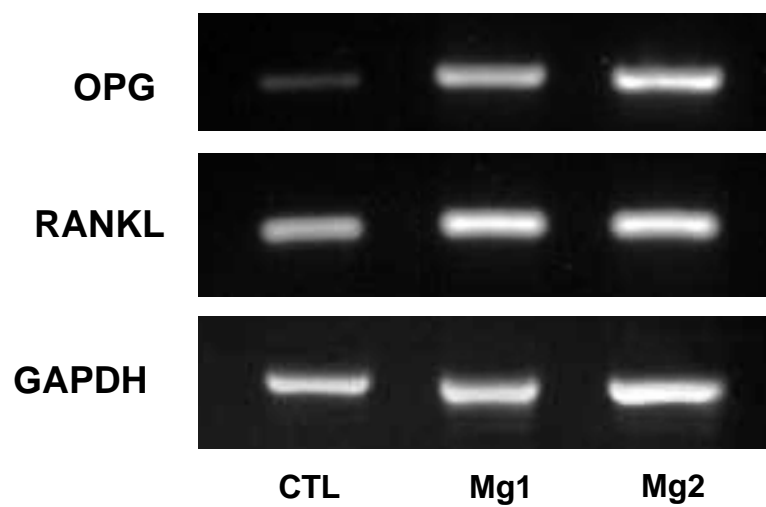


FIGURA 22- Imagens representativas da expressão gênica (RT-PCR) de OPG e RANKL, normalizadas para a expressão do gene constitutivo GAPDH, para o grupo de animais jovens.

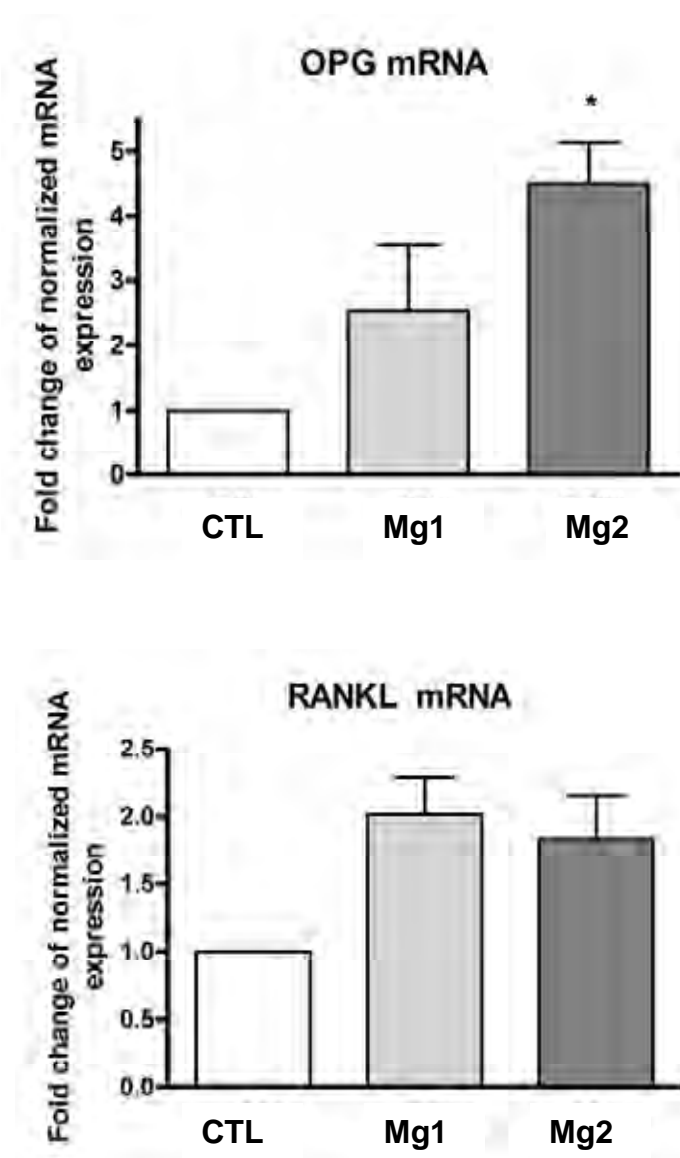


FIGURA 23- Representação gráfica da expressão gênica (RT-PCR) de OPG e RANKL, normalizadas para a expressão do gene constitutivo GAPDH, para o grupo de animais jovens.

A análise dos dados para o grupo de animais adultos demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos para a expressão de OPG, apesar de se observar uma tendência para diminuição da expressão conforme o aumento da deficiência (Figuras 24 e 25).

Quanto à expressão de RANKL houve uma tendência de aumento para os subgrupos Mg1 e Mg2 quando comparados ao subgrupo controle, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figs. 24 e 25). Entre os subgrupos Mg1 e Mg2 houve uma tendência de diminuição da expressão de RANKL à medida que aumenta a deficiência (Figuras 24 e 25).

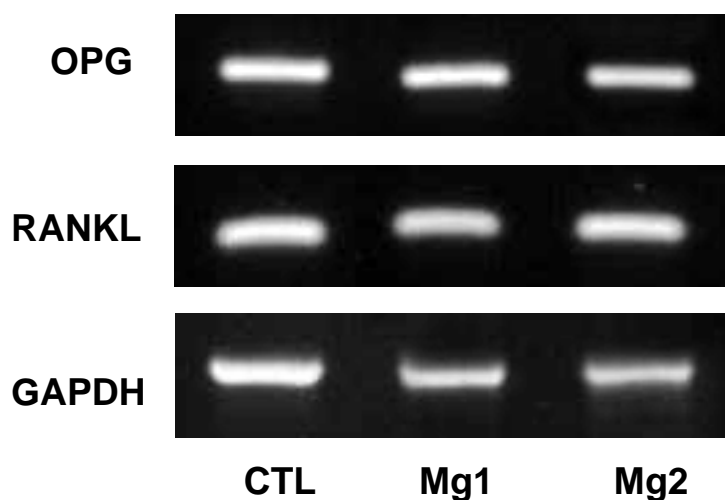


FIGURA 24- Imagens representativas da expressão gênica (RT-PCR) para OPG e RANKL, normalizadas para a expressão do gene constitutivo GAPDH, referente ao grupo de ratos adultos.

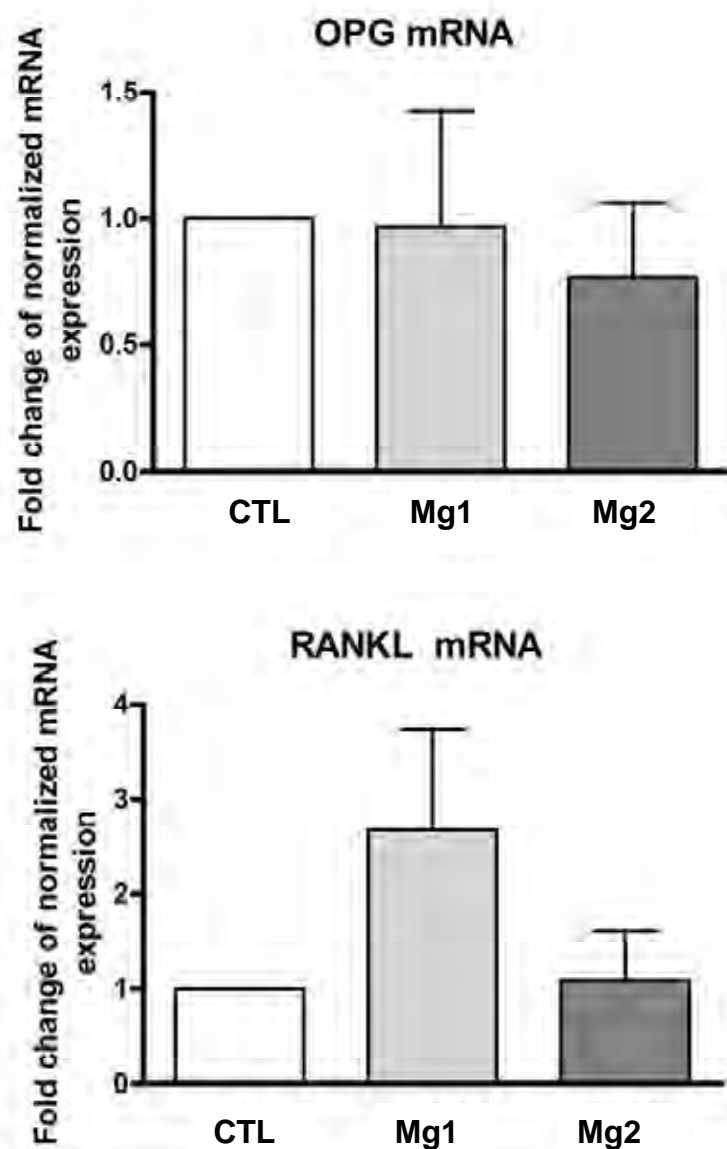


FIGURA 25- Gráficos representativos da expressão gênica (RT-PCR) para OPG e RANKL, normalizadas para a expressão do gene constitutivo GAPDH, referente ao grupo de animais adultos.

## 6 Discussão

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação positiva entre a deficiência de magnésio e a perda de massa óssea, podendo se constituir em um fator de risco para osteoporose<sup>40, 44, 59, 61</sup>.

No tratamento com implantes osseointegrados, as alterações sistêmicas são consideradas um importante fator de influência para o sucesso. Nesse aspecto, as alterações ósseas causadas pela deficiência de magnésio podem ser um fator de interferência no resultado desse tipo de tratamento. Entretanto, pouco se sabe sobre a influência de fatores sistêmicos sobre implantes osseointegrados.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar se a deficiência de magnésio na dieta poderia interferir no metabolismo ósseo ao redor de implantes com osseointegração já estabelecida.

Os resultados demonstraram que a deficiência de magnésio não influenciou no aumento de peso dos animais de ambos os grupos (Figura 11). Para os animais jovens, não houve perda de peso relevante quando comparados animais com deficiência e controle (Figura 11), discordando de Rude et al.<sup>50</sup> que relatam que uma elevada deficiência de magnésio ( $\geq 90\%$ ) pode levar à perda de peso relacionada à falta de apetite, considerada uma reação adversa. Entretanto, deve-se chamar a atenção que os estudos<sup>47, 50</sup> relatam essa perda de peso após um período prolongado (6 meses) e em animais muito mais jovens que os utilizados no presente estudo.

Para animais adultos também não houve diferença de peso durante todo o período de instalação da deficiência (Figura 11).

A concentração total de magnésio no soro<sup>63</sup> define o status do magnésio no organismo do rato. No presente estudo, a diminuição



progressiva da concentração de magnésio no soro demonstra que a deficiência foi instalada (hipomagnesia) em todos os animais com redução do mineral na dieta, após um período de três meses (Figuras 12 e 13).

A absorção do magnésio ocorre no intestino, por meio de um sistema passivo de absorção. Sendo assim, a quantidade de magnésio no trato digestivo é o principal fator controlador da quantidade de magnésio a ser absorvida<sup>10, 11</sup>. Portanto, a deficiência pode ser considerada dieta-dependente, ou seja, quanto maior a deficiência do mineral na dieta, menor é a concentração do íon no organismo<sup>10, 11, 63</sup>.

Entretanto, a concentração total de magnésio presente no soro não demonstra a real deficiência do mineral em todo o organismo. O soro contém somente 0.3% do total de magnésio presente no organismo, sendo que a maior concentração deste é encontrada nas células e tecido ósseo<sup>57</sup>. Assim, a mensuração do nível sérico do mineral pode demonstrar uma deficiência menor do que a real, presente em outros tecidos do organismo.

No presente estudo, a avaliação da concentração urinária demonstrou que quanto maior a deficiência de magnésio menor é a excreção do mesmo (Figuras 14 e 15), o que mostra a tendência do organismo em conservar o mineral e confirma a instalação da deficiência. A concentração de magnésio na urina está associada à concentração intracelular de magnésio, sendo que sua redução demonstra a diminuição da concentração de magnésio intracelular nos animais deficientes, proporcionalmente à quantidade ingerida na dieta<sup>53</sup>.

O cálcio é um mineral antagonista ao magnésio, e isso leva, nos ratos, a uma tendência de aumento de sua concentração sérica à medida que há deficiência de magnésio<sup>5, 34</sup>, o que está de acordo com o presente estudo (Figuras 12 e 13).

O cálcio e magnésio compartilham o mesmo sistema de transporte universal de magnésio (absorção intestinal passiva). Assim, na ausência de magnésio, a fração de absorção de cálcio pode ser

aumentada<sup>11, 49</sup>. A presença ou ausência de magnésio também tem influência na formação e secreção de hormônios que regulam a absorção e excreção do cálcio, como o PTH<sup>49</sup>.

No presente estudo, foi demonstrada uma tendência para maior excreção de cálcio à medida que aumentou a deficiência de magnésio, embora com significância estatística apenas para o grupo jovem (Figuras 14 e 15).

O cálcio é importante em muitos aspectos da resposta inflamatória, sendo essencial para a produção dos leucotrienos e formação de eucosanóides, além de ser um dos mensageiros na sinalização do *stress* oxidativo<sup>5</sup>. Meisel et. al<sup>34</sup> acreditam que a diminuição da razão entre magnésio e cálcio extracelular seja um dos principais fatores para o desencadeamento da reação inflamatória, relatada na deficiência de magnésio.

O tecido ósseo está fisiologicamente em constante adaptação<sup>55</sup>. A remodelação ou *turn over* ósseo consiste em um equilíbrio dinâmico entre as atividades de formação (osteoblastos) e reabsorção óssea (osteoclasto)<sup>55</sup>. É um processo complexo que envolve não somente as interações entre células e matriz óssea, mas também uma variedade de fatores reguladores sistêmicos e locais que coordenam a proliferação e atividade celular<sup>33</sup>. Dentre os fatores reguladores sistêmicos encontram-se a idade, as alterações hormonais e deficiências nutricionais.

Muitos estudos relatam que a deficiência de magnésio tem grande influência sobre o tecido ósseo, ocasionando a perda de massa óssea<sup>12, 26, 47, 48, 49, 50</sup>. Essa diminuição da massa óssea é observada em dietas com diferentes concentrações de magnésio, desde as restrições mais severas (0.04% do NR) até as pouco deficientes (50% do NR), sendo que quanto maior a deficiência do mineral maior é a perda de massa óssea<sup>47, 48, 49, 50</sup>.

A osteoporose é caracterizada pela diminuição da densidade óssea (BMD), pela maior suscetibilidade a fraturas (fragilidade óssea) e

alteração na arquitetura óssea<sup>9</sup>. No estudo de Stendig-Lindberg et al.<sup>53</sup> foi demonstrado experimentalmente que uma dieta deficiente de magnésio por período prolongado (um ano) é capaz de induzir osteoporose em ratos.

A redução de massa óssea relacionada à deficiência de magnésio pode ocorrer por meio de vários mecanismos, como regulação hormonal (PTH), estímulo de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ )<sup>47, 48, 49, 50</sup> e pela alteração na formação dos cristais de hidroxiapatita durante a mineralização do tecido ósseo<sup>12, 44, 49</sup>. O tamanho dos cristais mineralizados influencia nas propriedades mecânicas do tecido ósseo pela formação de cristais extremamente longos, o que torna o osso mais friável, portanto menos resistente à força<sup>44</sup>.

No presente estudo, a análise densitométrica das vértebras lombares e fêmures demonstrou que houve uma tendência à perda sistêmica de massa óssea com a deficiência de 75% e uma perda estatisticamente significativa com a deficiência de 90% (Figuras 16, 17, 18 e 19). Esses resultados concordam com estudos que utilizaram a mesma redução de magnésio (de 75% e 90%)<sup>48, 50</sup>. A perda da densidade mineral óssea (BMD) ocorreu em um período curto de tempo (3 meses) e foi observada tanto em ratos jovens como em ratos adultos (Figuras 16, 17, 18 e 19). Nesse parâmetro de avaliação a idade não teve influência sobre a perda de massa óssea sendo que esta foi dieta-dependente, ou seja, quanto menor a ingestão do magnésio maior a perda de massa óssea.

Além disso, a deficiência nutricional, no caso do magnésio, pode ter grande impacto sobre o processo de maturação do tecido ósseo. Tal maturação ao redor de implantes acontece por meio de mecanismos de modelação, remodelação e mineralização óssea, sendo esses mecanismos responsáveis pela adaptação à carga mecânica e consolidação do implante ao osso<sup>33</sup>.

No presente estudo, o tecido ósseo ao redor de implantes com osseointegração estabelecida foi avaliado por meio da densidade

óssea radiográfica (Figuras 20 e 21). A análise por meio de imagens radiográficas é um importante avanço tecnológico de acesso às alterações ósseas e tem sido bastante utilizada na avaliação do tecido ósseo periimplantar e no diagnóstico de periimplantites<sup>51</sup>. De acordo com Taba-Junior et al.<sup>54</sup>, os resultados da análise de densidade óssea radiográfica realizada por *softwares* de imagem são similares aos achados histológicos.

Os resultados aqui apresentados demonstraram que a dieta deficiente de magnésio teve efeito negativo sobre o osso ao redor de implantes com osseointegração estabelecida, tanto em animais jovens como em animais adultos, com diminuição estatisticamente significativa da densidade óssea radiográfica para os grupos com deficiência do mineral (Figuras 20 e 21). Em animais jovens, não houve diferença entre os subgrupos Mg1 e Mg2 quanto à perda de densidade, para todas as regiões avaliadas (Figura 20). Em animais adultos, a perda de densidade na região medular ocorreu de forma significativa somente para o subgrupo Mg2 (Figura 21).

Um importante resultado deste estudo foi que a perda de densidade óssea ocorreu não somente no osso medular, como demonstrado em estudos com ratas ovariectomizadas<sup>16, 51</sup>, mas também nas corticais.

Portanto, assim como a osteoporose é considerada um fator de risco para a osseointegração e a estabilidade mecânica de implantes<sup>33</sup>, as alterações ósseas causadas pela deficiência de magnésio também podem se constituir em fator de risco no tratamento com implantes osseointegrados.

A deficiência de magnésio de alguma maneira atua na homeostase do tecido ósseo. Entretanto, como observado anteriormente, a influência dessa deficiência sobre a regulação de citocinas inflamatórias, regulação hormonal e principalmente das vias de

sinalização, ainda é um assunto muito discutido na literatura<sup>12, 26, 47, 48, 49, 50</sup>.

Os sistemas imune e esquelético apresentam uma variedade de moléculas reguladoras em comum, demonstrando uma influência na fisiologia e patologia um do outro. Com o descobrimento do sistema de sinalização RANK, RANKL e OPG como um ponto chave para o controle do metabolismo ósseo e essencial na regulação da osteoclastogênese, muitos estudos relacionaram patologias ósseas a esse sistema de sinalização<sup>55</sup>.

A expressão do receptor para RANK (RANKL) está presente principalmente em células osteoblásticas e células mesenquimais primitivas. Tal expressão pode ser influenciada por fatores de reabsorção óssea como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e PTH<sup>23</sup>, entre outros<sup>27</sup>. RANKL isoladamente não tem capacidade de induzir a diferenciação de osteoclastos, sendo necessária a presença da citocina M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) para sua ação<sup>62</sup>. As células precursoras de osteoclastos, as quais apresentam RANK em sua superfície, ligam-se ao RANKL expressado pelo osteoblasto e, por interação célula-célula, diferenciam-se em osteoclastos na presença de M-CSF<sup>62</sup>. Dessa forma, ocorre a diferenciação, maturação e ativação de osteoclastos, desencadeando o processo da osteoclastogênese<sup>27</sup>.

Um regulador negativo dessa interação é a osteoprotegerina (OPG). OPG compete com RANK pela ligação ao RANKL agindo como inibidor da maturação e ativação de osteoclastos. A expressão de OPG pode ser regulada por fatores de reabsorção óssea como PGE<sub>2</sub>, fator de crescimento de transformação-beta (TGF $\beta$ ) e íons Ca<sup>+2</sup>, entre outros<sup>27</sup>.

No presente estudo, a análise do RNA mensageiro de amostras do periósteo adjacente ao leito do implante, por meio de RT-PCR, sugere que a deficiência de magnésio não teve grande influência sobre o sistema de sinalização RANKL e OPG nos animais jovens (Figuras 22 e 23). Os resultados demonstraram uma tendência de

aumento da expressão de RANKL, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo, sendo apenas indicativo de estímulo à reabsorção óssea. Quanto à expressão de OPG, houve um aumento estatisticamente significativo para a deficiência de 90% nesses animais (Figuras 22 e 23).

Na análise referente aos animais adultos, houve uma tendência de diminuição da expressão de OPG, porém não estatisticamente significativa. A expressão de RANKL demonstrou uma tendência de aumento na expressão para os grupos Mg1 e Mg2 quando comparados ao grupo controle, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo (Figuras 24 e 25). Esses resultados aproximam-se dos de Rude et al.<sup>49</sup>, embora com animais mais jovens.

Apesar disso, como relatado anteriormente, houve uma importante perda de massa óssea sistêmica e uma redução da densidade óssea radiográfica ao redor dos implantes. Sendo assim, outros mecanismos podem estar envolvidos na estimulação de osteoclastos ou na redução do número e/ou atividade dos osteoblastos devido à deficiência de magnésio.

Isso pode ser visto em estudos<sup>1, 45</sup> que relatam que o magnésio é extremamente importante nas reações celulares, inclusive de células ósseas, como osteoblastos, sendo que estas são incapazes de se proliferar na ausência de magnésio extracelular, uma vez que esse quadro causa a diminuição da síntese de proteínas (DNA e RNA).

Experimentos *in vitro* demonstraram que o magnésio influencia no crescimento e desenvolvimento dos osteoblastos por ser um agente mitogênico para essa célula<sup>44</sup>. Muitos estudos demonstram que em ratos com deficiência de magnésio há uma diminuição no número de osteoblastos e um aumento no número de osteoclastos<sup>47, 50</sup>. Além de ser observado o aumento do número de células clásticas, a deficiência de magnésio pode levar à elevação dos níveis de citocinas inflamatórias,

como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6<sup>47, 48, 49, 50</sup>, as quais irão induzir a diferenciação, ativação e sobrevivência dessas células<sup>15</sup>.

Assim, embora o sistema RANKL/OPG seja um sistema chave para a osteoclastogênese, no tecido sobre a influência da deficiência de magnésio as citocinas pro-inflamatórias e as alterações no número e atividade das células ósseas podem desempenhar um papel relevante no mecanismo de remodelação.

Entretanto, esses aspectos não foram avaliados no presente estudo. Dessa forma, entende-se que são necessários outros estudos para avaliar diferentes mecanismos pelos quais a deficiência de magnésio pode interferir no tecido ósseo e nas suas vias de sinalização intracelular.

## 7 Conclusão

- A deficiência de magnésio resultou em perda de massa óssea sistêmica e ao redor dos implantes com osseointegração estabelecida.
- A deficiência de magnésio influenciou de forma não-significativa a expressão dos genes RANKL e OPG.
- A idade não teve influência significativa na perda de massa óssea associada à deficiência de magnésio.
- São necessários mais estudos sobre o mecanismo de sinalização de indução de perda óssea pela deficiência de magnésio.



## *8 Referências\**

1. Abed E, Moreau R. Importance of melastatin-like transient receptor potential<sup>7</sup> and cations (magnesium, calcium) in human osteoblast-like cell proliferation. *Cell Prolif.* 2007; 40: 849-65.
2. Albrektsson T, Sennerby L. State of the art in oral implants. *J Clin Periodontol.* 1991; 18: 474-481.
3. Berglundh T, Persson L, Klinge B. A systematic review of the incidence of biological and technical complications in implant dentistry reported in prospective longitudinal studies of at least 5 years. *J Clin Periodontol.* 2002; 29 (suppl 3): 197-212.
4. Brånemark PI, Zarb GA, Albrektsson T (ed). *Tissue-integrated prosthesis: osseointegration in clinical dentistry.* Chicago: Quintessence; 1985.
5. Bussière FI, Gueux E, Rock E, Manzur A, Rayssiguier Y. Protective effect of calcium deficiency on the inflammatory response in magnesium-deficient rats. *Eur J Nutr* 2002; 41 (5): 197-202.
6. Bussière FI, Gueux E, Rock E, Girardeau JP, Tridon A, Mazur A, et al. Increased phagocytosis and production of reactive oxygen species by neutrophils during magnesium deficiency in rats and inhibition by high magnesium concentration. *Br J Nut.* 2002; 87: 107-13.
7. Carpenter TO, Mackowiak SJ, Troiano N, Gundberg, CM. Osteocalcin and its messages: relationship to bone histology in magnesium-deprived rats. *Am J Physiol.* 1992; 263 (1pt1): E107-14.

---

\* De acordo com a norma Vancouver. Disponível no site:  
[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

8. Clokie CM, Warshawasky H. Development of a rat tibia model for morphological studies of the interface between bone and titanium implant. *Compendium*. 1995; 16: 56;58;60.
9. Consensus development conference on osteoporosis. *Am J Med*. 1993; 95A (5A): 1S – 16S.
10. Coudray C, Fillet-Coudray C, Grizard D, Tressol JC, Gueux E, Rayssiguier Y. Fractional intestinal absorption of magnesium is directly proportional to dietary magnesium intake in rats. *J Nutr* 2002; 132: 2043-7.
11. Coudray C, Fillet-Coudray C, Rambeau M, Tressol JC, Gueux E, Mazur A, et al. The effect of aging on intestinal absorption and status of calcium, magnesium, zinc, and copper in rats: a stable isotope study. *J Trace Elem Med Biol*. 2006; 20: 73-81.
12. Creedon A, Flynn A, Cashman K. The effect of moderately and severely restricted dietary magnesium intakes on bone composition and bone metabolism in the rat. *Br J Nutr*. 1999; 82: 63-71.
13. Duarte PM, Cesar-Neto JB, Sallum AW, Sallum EA, Nociti Junior FH. Effect of estrogen and calcitonin therapies on bone density in a lateral area adjacent to implants placed in the tibiae of ovariectomized rats. *J Periodontol*. 2003; 74: 1618-24.
14. Elin RJ. Assessment of magnesium status. *Clin Chem*. 1987; 33: 1965-70.
15. Findlay DM, Haynes DR. Mechanisms of bone loss in rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. 2005; 15: 232-40.
16. Giro G, Gonçalves D, Sakakura CE, Pereira RMR, Marcantonio Jr E, Orrico SRP. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105: 162-7.

17. Giro G, Sakakura CE, Gonçalves D, Pereira RMR, MarcantonioJR E, Orrico SRP. Effect of 17 $\beta$ -estradiol and alendronate on the removal torque of osseointegrated titanium implants in ovariectomized rats. *J Periodontol.* 2007; 78: 1316-21.
18. Grier SJ, Turner AS, Alvis MR. The use of Dual-Energy X ray absorptiometry in animals. *Invest Radiol* 1996; 31: 50-62.
19. Gruber HE, Rude RK, Wei L, Frausto A, Mills BG, Norton HJ. Magnesium deficiency: effect on bone mineral density in the mouse appendicular skeleton. *BMC Musculoskelet. Disord.* 2003; 4: 7-11.
20. Gunther T. Mechanisms and regulation of Mg<sup>2+</sup> efflux and Mg<sup>2+</sup> influx. *Miner Electrolyte Metab.* 1993; 19: 259-65.
21. Haynes DR, Crotti TN, Zreiqat H. Regulation of osteoclast activity in peri-implant tissues. *Biomaterials* 2004; 25: 4877-85.
22. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med.* 2001; 79: 243-53.
23. Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004; 19: 235-44.
24. Johnson S. The multifaced and widespread pathology of magnesium deficiency. *Medical Hypotesis* 2001; 56: 163-70.
25. Joos U, Wiesmann HP, Szuwart T, Meyer U. Mineralization at the interface of implants. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35: 783-90.
26. Kenney MA, McCoy H, Williams L. Effects of magnesium deficiency on strength, mass, and composition of rat femur. *Calcif Tissue Int.* 1994; 54: 44-9.
27. Kong YY, Penninger JM. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. *Exp Gerontol.* 2000; 35: 947-56.
28. Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-years follow up study of mandibular fixed prosthesis supported by

- osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 1996; 7: 329-36.
29. Maguire ME. Hormone-sensitive magnesium transport and magnesium regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci.* 1984; 5: 73-7.
30. Maguire ME, Cowan JA. Magnesium chemistry and biochemistry. *Biomaterials.* 2002; 15: 203-10.
31. Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Daveau M, Gueux E, Linard C, Rock E, et al. Inflammatory response following acute magnesium deficiency in the rat. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1501:91-8.
32. Manzur A, Maier JAM, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y. Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys.* 2007; 458: 48-56.
33. Marco F, Milena F, Gianluca G, Vittoria O. Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron.* 2005; 36: 630-44.
34. Meisel P, Schwahn C, Luedemann J, John U, Kroemer HK, Kocher T. Magnesium deficiency is associated with periodontal disease. *J Dent Res.* 2005; 84: 937-41.
35. Meyer MH, Meyer Jr RA. Altered expression of mitochondrial genes in response to fracture in old rats. *Acta Orthopaedica* 2006; 77: 944-51.
36. Molly L. Bone density and primary stability in implant therapy. *Clin Oral Imp Res.* 2006; 17 (Suppl 2): 124-35.
37. Nakagawa M, Oono H, Nishio A. Enhanced production of IL-1 $\beta$  and IL-6 following endotoxin challenge in rats with dietary magnesium deficiency. *J Vet Med Sci.* 2001; 63: 467-9.
38. Narai S, Nagahata S. Effects of alendronate on the removal torque of implants in rats with induced osteoporosis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003; 18: 218-23.

39. Neukam FW, Flemmig TF. Local and systemic conditions potentially compromising osseointegration. Consensus report of working group 3. *Clin oral Imp Res*. 2006; 17 (Suppl 2): 160-2.
40. New SA, Robins SP, Campbell MK, Martin JC, Garton MJ, Bolton-Smith C, Grubb DA et al. Dietary influences on bone mass and bone metabolism: further evidence of a positive link between fruit and vegetable consumption and bone health? *Am J Clin Nutr*. 1997; 71: 142-51.
41. Nishimoto SK, Chang CH, Gendler E, Stryker WF, Nimni ME. The effect of aging on bone formation in rats: biochemical and histochemical evidence for decreased bone formation capacity. *Calcif Tissue Int*. 1985; 37: 617-24.
42. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as improvements in the AIN-76 diet. *J Nutr*. 1997; 127: 838S-41S.
43. Reginter JY, Strause L, Deroisy R, Lecart MP, Saltman P, Franchimont P. Preliminary report of decreased serum magnesium in postmenopausal osteoporosis. *Magnesium*. 1989; 8 (2): 106-9.
44. Rude RK, Gruber HE. Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *J Nutr Biochem*. 2004; 15: 710-6.
45. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A. Immunolocalization of RANKL is increased and OPG decreased during dietary Magnesium deficiency in the rat. *Nutr Metab*. 2005; 2: 24.
46. Rude RK, Oldham SB, Sharp Jr CF, Singer FR. Parathyroid hormone secretion in magnesium deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 47: 800-6.
47. Rude RK, Gruber HE, Wei LY, Frausto A, Mills BG. Magnesium deficiency: effect on bone and mineral metabolism in the mouse. *Calcif Tissue Int*. 2003; 72: 32-41.
48. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn J. Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement

- disrupts bone and mineral metabolism in the rat. *Bone*. 2005; 37: 211-9.
49. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn, J. Reduction of dietary magnesium by only 50% in the rat disrupts bone and mineral metabolism. *Osteoporos Int*. 2006; 17: 1022-32.
50. Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Mills BG. Bone loss induced by dietary magnesium reduction to 10% of the nutrient requirement in rats is associated with increased release of substance P and Tumor Necrosis Factor- $\alpha^1$ . *J Nutr*. 2004; 134: 79-85.
51. Sakakura CE, Giro G, Gonçalves D, Pereira RMR, Orrico SRP, Marcantonio Jr E. Radiographic assessment of bone density around integrated titanium implants after ovariectomy in rats. *Clin Oral Impl Res*. 2006; 17: 134-8.
52. Shirota T, Donath K, Matsui Y, Ohno K, Michi K. Reactions of bone tissue in old rats to three different implant materials. *J Oral Impl*. 1994; 20: 307-14.
53. Stendig-Lindberg MD, Koeller W, Bauer A, Rob MD. Prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23: 704S-11S.
54. Taba-Junior M, Novaes AB Jr, Souza SL, Grisi MF, Palioto DB, Pardini LC. Radiographic evaluation of dental implants with different surface treatments: an experimental study in dogs. *Implant Dent*. 2003; 12: 252-8.
55. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res*. 2005; 40: 287-93.
56. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000; 289 (5458): 1504-8.
57. Tong GM, Rude RK. Magnesium deficiency in critical illness. *J Intensive Care Med*. 2005; 20: 3-17.

58. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gomez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA, Tresguerres JAF. Local administration of growth hormone enhances perimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002; 13: 631-36.
59. Tucker KL, Hannan MT, Chen H, Cupples LA, Wilson PW, Kiel DP. Potassium, Magnesium, and fruit and vegetable intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69: 727-36.
60. Wacker WE, Parisi AF. Magnesium metabolism. *N Engl J Med.* 1968; 278: 658-63.
61. Wang MC, Moore EC, Crawford PB, Hudes M, Sabry ZY, Marcus R, et al. Influence of pre-adolescent diet on quantitative ultrasound measurements of the calcaneus in young adult women. *Osteoporos Int.* 1999; 9: 532-35.
62. Yamamoto Y, Udagawa N, Matsuura S, Nakamichi Y, Horiuchi H, Hosoya A, et al. Osteoblasts provide a suitable microenvironment for the action of receptor activator of nuclear factor- $\beta$  ligand. *Endocrinol.* 2006; 147: 3366-74.
63. Zimmermann U, Weiss HG, Classen B, Wendt A, Epple A, Zollner H, et al. The impact of diets with different magnesium contents on magnesium and calcium in serum and tissues of the rat. *Life Sci.* 2000; 67: 949-58.

## 9 ANEXOS



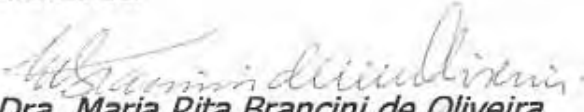
*Proc. CEEA nr. 20/2006*

Araraquara, 09 de agosto de 2006

Senhores Pesquisadores:

O Comitê de Ética em Experimentação Animal-CEEA desta Faculdade reunido em *09/08/2006*, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado "Influência da deficiência de magnésio na dieta sobre a densidade óssea e a osseointegração de implantes. Estudo em ratos" (Proc. CEEA nr. 20/2006) **AUTORIZA** a realização da pesquisa, ficando a aprovação vinculada à apresentação do **RELATÓRIO FINAL** em **DEZEMBRO/2009**.

Atenciosamente.

  
Prof. Dra. Maria Rita Brancini de Oliveira  
Coordenadora do CEEA

À

*Prof. Dra. ELAINE MARIA SGAVIOLI MASSUCATO*

DD. Pesquisador Responsável

*RICARDO ANDRÉS LANDAZURI DEL BARRIO*

DD. Pesquisador Colaborador-Orientado

Nesta

Autorizo a reprodução deste trabalho.  
(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 31 de março de 2007.

MARINA MONTOSA BELLUCI