

RENATA FALCHETE DO PRADO

**EFEITOS DA OSTEOPENIA NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE
RATAS**

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

RENATA FALCHETE DO PRADO

**EFEITOS DA OSTEOPENIA NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE
RATAS**

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

Orientadora Profª Adj Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos 2008

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Bellini AB. Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2006.

P882e Prado, Renata Falchete do.
Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas / Renata Falchete do Prado. __ São José dos Campos : [s.n.]; 2008
100.f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2008.
Orientador: Prof. Dra Yasmin Rodarte Carvalho

1. Osteopenia. 2. Osteoporose. 3. Reparo ósseo. I. Carvalho, Yasmin Rodarte. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD12

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 12 de setembro de 2008 .

Assinatura :

E-mail: renatafalchete@hotmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Prado RF. Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas [Tese].
São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos
Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

São José dos Campos, 15 de julho de 2008.

Banca examinadora

- 1) Profa.Adj. Yasmin Rodarte Carvalho
Faculdade de Odontologia de São José dos campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
- 2) Profa.Adj. Rosilene Fernandes da Rocha
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP
- 3) Profa. Dra. Renata Callestini Felipini
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista – UNESP
- 4) Profa. Dra. Juliana Mazzonetto Teófilo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo – USP
- 5) Profa. Dra. Vanessa Ávila Sarmento Silveira
Faculdade de Pindamonhagaba - FAPI

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, meus pais ***Aparecida e Antônio Luis*** e minha irmã ***Juliana***, que mandaram constantemente um pensamento positivo que me iluminou, me dando forças, determinação e paz de espírito para seguir serena na difícil estrada para me tornar alguém...

Ao meu amado ***Caique***, carinhoso, divertido e prático companheiro, que dividiu comigo angústias, indecisões, momentos de fúria e de plenitude divina... Obrigada

Aos meus queridos e atenciosos sogros ***Eliana e José Carlos*** que vivenciaram cada fase deste doutorado, opinando e preenchendo, principalmente, os finais de semana com alegria.

À amiga ***Vanessa Ávila Sarmiento Silveira***, que trabalhou sempre ao meu lado. Juntas, demos o melhor de nós, para a realização desta e de outras pesquisas.

Às amigas, ***Andresa Costa Pereira, Carolina Júdice Ramos, Elaine Dias do Carmo, Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Giselle Segnini Senra, Samira Esteves Afonso Camargo e Susana Ungaro Amadei***, e ao ***Carlos Eduardo Dias Colombo*** pela convivência.

À querida Prof^a. Dr^a. ***Renata Callestini Felipini*** que sempre, e até hoje, vibra com minhas conquistas e vitórias, gostaria de agradecer e lembrar, que tudo isso começou graças à sua orientação...

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha orientadora Prof^a. Adj. **Yasmin Rodarte Carvalho** que me ofereceu a oportunidade de permanecer ao seu lado, transferindo incomparável bagagem acadêmica científica, bem como carinho e atenção. Obrigada!

Agradeço também aos **professores** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, à Prof^a. Adj. **Rosilene Fernandes da Rocha**, e à Prof^a. Dr^a. **Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, que escreveram comigo a história do meu doutorado e do início de minha carreira profissional.

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, representada pelo Diretor, Prof. **José Roberto Rodrigues**, pela oportunidade de realização deste Doutorado e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pelo auxílio financeiro (processo 476143/2006-3).

Ao colega Dr. **Jefferson Luís Oshiro Tanaka** representando a Disciplina de Radiologia por auxiliar nas tomadas radiográficas para esta e outras pesquisas.

Às alunas de iniciação científica **Fernanda de Oliveira e Silva, Erica Vedovatto, Mariana Garcia Bedin, Jucely Aparecida da**

Rosa, Lucileni Braga Sandes pela ajuda durante a fase experimental desse estudo.

Aos alunos de iniciação científica **Vinícius Diniz Chaves Carvalho, Giselly Parizoto Costa, Deise Silva Leite, Gabriela Esteves de Campos, Evelyn Luzia de Souza Santos**, pelo trabalho em conjunto que deu certo...

Aos **funcionários** do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, em especial, à **Ana Lourdes da Silva Machado, Maria Salete Faria, à Sílvia Scarpel** e ao **Valter Cruz** pela colaboração durante a realização dessa pesquisa.

Aos funcionários do Biotério, **Lourival Jacob e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos**, pela importante colaboração na fase experimental deste estudo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças** pelos avisos e organização burocrática do meu doutorado e à bibliotecária **Silvana Alvarez**, pela orientação na normalização deste estudo.

Aos **colegas** do Programa de Pós-Graduação, que estiveram comigo, tanto os mais antigos quanto os mais recentes, obrigada pela convivência.

Gostaria ainda, de lembrar aqueles que agradeci em meu mestrado, pois sua participação foi decisiva no desenrolar de minha vida... Obrigada a todos **vocês**...

SUMÁRIO

RESUMO	08
1 INTRODUÇÃO.....	09
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Deficiência estrogênica e a remodelação óssea.....	11
2.2 Deficiência estrogênica e a reparação óssea.....	20
2.3 Reparação óssea alveolar	22
2.4 Deficiência estrogênica e a reparação óssea alveolar	24
2.5 Mastócitos	28
3 PROPOSIÇÃO.....	30
4 MATERIAL E MÉTODO	31
4.1 Animais	31
4.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia ou cirurgia SHAM	31
4.3 Grupos experimentais	33
4.4 Exodontia.....	35
4.5 Sacrifício dos animais	35
4.6 Radiografias	37
4.6.Processamento tecidual.....	38
4.6.1 Processamento tecidual sem desmineralização	38
4.6.2 Processamento tecidual com desmineralização	41
4.7 Formas de análise	41
4.7.1 Análise do peso dos animais	41
4.7.2 Análise radiográfica	42
4.7.3 Análise da taxa de aposição mineral	42
4.7.4 Análise histológica	43
4.7.5 Análise histomorfométrica.....	43

4.7.6 Número de mastócitos	44
4.8.Estatística	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Peso dos animais.....	45
5.2 Análise radiográfica.....	48
5.3 Taxa de aposição mineral	52
5.4 Análise histológica	55
5.4.1 Período de 7 dias.....	55
5.4.2 Período de 21 dias.....	58
5.4.3 Período de 45 dias.....	59
5.5 Análise histomorfométrica.....	61
5.5.1 Volume trabecular.....	61
5.5.2 Volume osteóide	64
5.6 Número de mastócitos	67
6 DISCUSSÃO.....	70
7 CONCLUSÃO	81
8 REFERÊNCIAS	82
APÊNDICES	93
ANEXO A	99
ABSTRACT	100

Prado RF. Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas [Tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2008.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar os efeitos iniciais da deficiência estrogênica associada ou não a dieta deficiente em cálcio na reparação óssea alveolar. Foram utilizadas 72 ratas, aos três meses de idade, das quais 48 foram ovariectomizadas e 24 falso-operadas (SHAM). Das 48 ratas ovariectomizadas, 24 receberam ração comercial padrão (OVZ) e 24 receberam ração especial com baixo teor de cálcio (ESP). Foi extraído o primeiro molar inferior, bilateralmente, 15 dias após a ovariectomia e a cirurgia Sham. Os animais foram sacrificados aos sete, 21 e 45 dias após as exodontias. As mandíbulas foram radiografadas e processadas para análise radiográfica e microscópica. Como resultados após a comparação pelo teste ANOVA e de Tukey verificou-se que a densidade óptica, o volume trabecular e o número de mastócitos foram crescentes significativamente com o decorrer do tempo, enquanto a taxa de aposição mineral óssea diária e o volume osteóide foram decrescentes com o tempo. A comparação entre os grupos SHAM e OVZ não revelou diferenças estatísticas, entretanto a comparação entre os grupos OVZ e ESP mostrou diferenças no volume trabecular e número de mastócitos, sendo os demais parâmetros semelhantes. Diante do exposto concluiu-se que a deficiência hormonal não retarda o reparo ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas e um possível mecanismo de reabsorção óssea é ativado diante da hipocalcemia e deficiência estrogênica recrutando mastócitos. A taxa de aposição mineral diária não é influenciada pela deficiência hormonal, mas pareceu sofrer alguma influência quando se associou a dieta pobre em cálcio, mostrando uma tendência à diminuição.

PALAVRAS-CHAVE: osteopenia; osteoporose; reparo ósseo

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser definida como uma síndrome caracterizada pela redução, por unidade de volume, do osso normalmente mineralizado e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando à fragilidade óssea e conseqüente aumento do risco de fraturas³⁸. Apesar de poder ser secundária a várias condições, as formas de osteoporose mais comuns são as que se desenvolvem no envelhecimento e na pós-menopausa⁵⁰.

A osteoporose pós-menopausa afeta 1,5 milhões de mulheres por ano, tornando tal doença um grande problema de saúde²¹. Segundo Kowalski et al.³³, 11% da renda mensal da família é destinada ao tratamento da mulher com osteoporose pós-menopausa e no Sistema Público de Saúde do estado de São Paulo, o custo médio anual é de R\$908,18 por paciente com a doença. A relevância de estudos que busquem novas perspectivas e conhecimentos sobre tal doença é indiscutível.

A deficiência estrogênica decorrente da menopausa representa o fator etiológico mais importante no seu desenvolvimento⁶. A perda óssea trabecular após a menopausa ocorre predominantemente por redução do número de trabéculas, bem como pela diminuição de sua espessura⁴.

Investigações pré-clínicas de novas estratégias para melhorar o tratamento e o reparo na osteoporose como, por exemplo, implantes com novos designs e o uso de fatores de crescimento requerem um modelo animal efetivo³⁷. Este modelo deve ser comparável à

osteoporose humana com relação ao nível de osteoporose, a deterioração óssea, a redução da competência mecânica do osso, as alterações histomorfométricas, o metabolismo ósseo, o padrão hormonal e a anatomia³⁷.

A ovariectomia em ratas tem sido utilizada com este intuito, causando perda de massa óssea decorrente da deficiência hormonal².

Segundo alguns autores²⁴, os ossos maxilares de ratas dificilmente são afetados pela deficiência hormonal decorrente da ovariectomia, provavelmente em virtude de seus hábitos mastigatórios. Alternativamente, algumas estratégias poderiam ser adotadas na tentativa de melhorar a eficácia dos estudos utilizando este modelo animal associado, por exemplo, a diminuição da ingestão de cálcio.

Investigadores do mundo inteiro realizam estudos a respeito dos efeitos da deficiência hormonal sobre a remodelação e reparação ósseas. Estes achados poderão gerar cuidados pré-operatórios com administração de fatores geneticamente desenvolvidos, alternativamente às terapias conhecidas até hoje, acelerando o reparo normal e melhorando a reparação em casos de comprometimentos sistêmicos²⁰.

Justifica-se assim, a contínua busca de novos conhecimentos sobre o papel da deficiência estrogênica no processo de reparação óssea alveolar por diversas metodologias que possam auxiliar a conduta do cirurgião-dentista nos procedimentos cirúrgicos nestes pacientes com osteoporose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Deficiência estrogênica e a remodelação óssea

O tecido ósseo apresenta características dinâmicas, encontrando-se em constante processo de remodelação³⁶. A remodelação óssea tem papel fundamental na homeostasia dos níveis plasmáticos de cálcio¹⁶. Na osteoporose pós-menopausa, ocorre uma maior reabsorção em comparação à velocidade de aposição óssea. Conseqüentemente ocorre perda da massa óssea⁴⁹.

Os mecanismos que relacionam o estrógeno e a regulação da remodelação óssea ainda não são compreendidos⁴⁸, entretanto, estudos em culturas de células sugerem que o hormônio atua na secreção e na atividade dos fatores que regulam os precursores osteoblásticos e os osteoclásticos prevenindo a formação de osteoclastos⁶⁰. Os receptores estrogênicos dos osteoblastos e osteoclastos possuem funções regulatórias nestas células e conseqüentemente na remodelação óssea, entretanto tais funções não estão bem esclarecidas³⁶.

Os osteoblastos podem iniciar sua função fisiológica de sinalização para a reabsorção mediando a atividade osteoclástica, quando sua ativação ocorre por indutores como o hormônio da paratireóide (PTH), a interleucina 1 (IL1), o fator de necrose tumoral (TNF) ou a prostaglandina (PGE-2), que estimulam os osteoblastos a secretar fatores que induzem os osteoclastos a reabsorverem osso. A diminuição

do estrógeno aumenta a produção destes e de outras citocinas envolvidas na reabsorção óssea²¹.

Hughes et al.²³ 1996, investigaram *in vitro* e *in vivo* a função estrogênica na regulação da apoptose de osteoclastos. Segundo os autores, o estrógeno aumenta a produção de TGF- β pelos osteoclastos. O anticorpo anti-TGF- β diminui a apoptose dos osteoclastos. Sendo assim, os estrógenos podem regular a função reabsortiva limitando a vida dos osteoclastos.

O estrógeno apresenta efeito apreciável na expressão de citocinas e fatores de crescimento por osteoblastos e osteoclastos, desempenhando um importante papel na regulação desses e consequentemente na ação parácrina e autócrina dos mesmos. Dentre os principais fatores de crescimento relacionados com o estrógeno estão os IGF-I e II, TGF- β e o PDGF⁶⁸.

Alguns fatores de crescimento que podem atuar na sinalização, proliferação, migração e síntese de matriz pelos osteoblastos são: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento insulínico (IGF) I e II, fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento transformante (TGF), especialmente TGF- β e proteínas morfogenéticas (BMPs)⁶⁷.

Os IGF I e II podem estimular a mitogênese e a síntese de colágeno do osteoblasto, enquanto o TGF- β exibe efeito duplo, estimulando ou deprimindo a função osteogênica. Outros dois fatores de crescimento, o FGF e o PDGF apresentam funções similares, porém menos destacadas¹¹.

O IGF também promove síntese de matriz cartilaginosa. Os condrócitos tanto o secretam quanto respondem ao IGF de modo autócrino. Sua função na remodelação e reparo ósseos não está completamente esclarecida²⁰. Contudo, Okazaki et al.⁴³ 2003, acreditam que os mediadores químicos inflamatórios como prostaglandinas secretadas logo após um trauma podem induzir a expressão de IGF-I.

Nos períodos iniciais do reparo, o ácido ribonucléico (RNA) mensageiro do IGF-I foi expresso pelas células mesenquimais, por condrócitos imaturos, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos no calo ósseo. Após duas semanas de reparo, os osteoblastos continuavam a expressar IGF-I. Tal fator parece estar envolvido na proliferação e diferenciação de osteoblastos e condrócitos, atuando como um fator mitogênico autócrino e parácrino durante o reparo ósseo.

Apesar de ser encontrado em menores quantidades quando comparado como IGF-II, o IGF-I promove maior síntese de colágeno, sendo mais ativo sobre o tecido ósseo⁵².

Com relação às funções do TGF- β , segundo Finkelman et al.¹⁴ a deficiência neste fator nos ossos de ratas ovariectomizadas, sugere sua importância na manutenção do volume ósseo, uma vez que pode induzir proliferação e diferenciação das células ósseas⁵².

Outra via de atuação dos estrógenos sobre o processo de remodelação óssea constitui a sinalização osteoprotegerina (OPG), o receptor ativador de NF- κ B (RANK) e a citocina RANK ligante (RANKL), identificados como os principais fatores envolvidos na osteoclastogênese. O RANK localiza-se na superfície de osteoclastos maduros e de seus precursores, enquanto a RANKL é uma proteína pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). Seu principal papel é a inibição da apoptose dos osteoclastos e a estimulação da diferenciação e ativação destas células. A OPG pode atuar inibindo RANKL por meio da ligação com RANK e também diretamente, por meio de outros receptores presentes nos osteoclastos. Seus efeitos são antagônicos aos efeitos da RANKL. Diversas citocinas e compostos como os estrógenos, influenciam a osteoclastogênese por meio da regulação da produção de RANKL/OPG pelas células estromais e pelos osteoblastos⁶¹.

Steeve et al.⁶¹ afirmaram que tanto os estrógenos quanto o TGF- β aumentam a produção de OPG, diminuindo, conseqüentemente,

a diferenciação e ativação dos osteoclastos, bem como induzindo a apoptose destas células.

Um modelo experimental que simula a deficiência estrogênica pós-menopausa em mulheres é a ovariectomia de ratas, a qual resulta na diminuição dos níveis de estrógeno⁵⁸. Como resultado, a ovariectomia causa perda óssea em ossos como maxila⁶⁴, mandíbula⁶³, fêmur²⁴, entre outros. Contudo, considerando-se que os sinais apresentados pelas mulheres acometidas pela doença não são idênticos aos que ocorrem nas ratas neste modelo, considera-se apropriada, a utilização do termo osteopenia que reflete a diminuição da massa óssea nestes animais em decorrência da deficiência estrogênica²⁸.

Encontram-se dificuldades na comparação de estudos com este modelo animal no que tange o momento em que se realizou a excisão dos ovários, sendo três as principais idades para as ratas no experimento: ratas jovens, maduras e idosas. Considera-se o modelo de rata madura aquele com animais de três meses de idade, sendo uma de suas vantagens o menor custo do experimento quanto comparado aquele de ratas idosas. As ratas de três meses de idade têm maturidade reprodutiva, respondem apropriadamente à deficiência hormonal em consequência da ovariectomia e não estão em fase de crescimento acelerado como as ratas jovens²⁸. Ainda utiliza-se na literatura a excisão dos testículos de machos⁴⁰, contudo não se priorizou este tipo de estudo.

Segundo Quinn⁴⁷ não há uma relação simples entre a idade humana e da rata. Na conversão da idade da rata para a humana deve-se considerar o parâmetro a ser analisado. Por exemplo, o autor explica que ao levar em consideração a expectativa de vida das espécies, um dia da rata corresponderia a 27 dias da mulher. Se for considerada a maturidade sexual, um dia da rata corresponderia a 80 dias da mulher. Mesmo assim, o modelo animal em ratos representa uma importante ferramenta de estudo, permitindo comparações quando estes fatores são levados em consideração.

Ishihara et al.²⁴ avaliaram os efeitos da ovariectomia no osso da maxila de ratas. A cirurgia de ovariectomia ocorreu quando as ratas completaram três meses. Decorridos cinco meses da ovariectomia, as ratas foram sacrificadas e as maxilas processadas para análise em microscópio de varredura de elétrons retroespalhados (BSE). Não encontraram diferenças entre os aspectos das trabéculas ósseas dos animais do grupo que sofreu a cirurgia-simulada (SHAM) quando comparado ao grupo ovariectomizado (OVZ). Entretanto, encontraram maior perda óssea ao avaliar o fêmur dos animais OVZ. Os autores consideraram que a perda de massa óssea ocorre predominantemente em locais de ossificação endocondral (distal do fêmur) em comparação àqueles de ossificação intramembranosa (maxila).

O tempo aguardado após a ovariectomia até o sacrifício dos animais constitui importante variante neste modelo experimental. Wronski, et al.⁷⁰, avaliaram o efeito do tempo de ovariectomia sobre os parâmetros histomorfométricos ósseos na face proximal de tíbias de ratas. Nos animais OVZ ocorre, após 14 dias da cirurgia, uma fase de perda óssea inicial, que se torna gradualmente mais pronunciada e que coincide com o aumento máximo da remodelação óssea. Esta fase se estabiliza por volta dos 100 dias quando a reabsorção assume nível semelhante ao do grupo controle. Os dados de taxa de aposição mineral (marcadores fluorescentes) revelam também uma forte evidência de aceleração da formação óssea nas ratas ovariectomizadas. Infelizmente a taxa de reabsorção não pode se medida diretamente por morfometria. Sendo assim pode-se inferir que a perda de massa óssea indica um grande incremento na reabsorção óssea que excede o incremento ocorrido na formação óssea.

Estudando diferentes tempos de ovariectomia e orquiectomia (ratos machos), Most et al.⁴⁰ perceberam que em cultura de células a deficiência estrogênica causa aumento transitório na osteoclastogênese. Sete dias após a cirurgia, o potencial

osteoclastogênico das células de medula hematopoiética foi acentuado e se estabilizou após 30 dias de deficiência hormonal. Seriam estas células, as responsáveis por uma fase precoce de rápida perda óssea. Lane et al.³⁵ perceberam o estabelecimento de perda da conectividade óssea nos períodos iniciais pós-ovariectomia.

Estes autores³⁵ utilizaram tomografia computadorizada e histomorfometria para avaliar tíbias de ratas ovariectomizadas. Verificaram decréscimo de até 27% na conectividade óssea entre cinco e oito dias após a ovariectomia. Este fenômeno parece estabilizar-se até 30 dias e novamente tem um pico no nível de deterioração que se estende até 50 dias após a ovariectomia. Contudo, os níveis do marcador de reabsorção óssea (DPD – deoxipiridinolina) avaliado na urina dos animais tiveram um acréscimo no décimo terceiro dia após a ovariectomia, que foi gradativamente maior até o último período avaliado de 50 dias. Os autores concluíram que apesar do nível do DPD promover um eficaz monitoramento da reabsorção óssea em ratos em longo prazo, seus níveis de excreção alteram-se lentamente, sendo menos precisos para determinar alterações precoces envolvidas na deterioração da estrutura óssea pós-ovariectomia.

Tanaka et al.⁶² em 2002, optaram por aguardar um período mais longo após ovariectomia. Os autores realizaram a cirurgia em ratas de quatro meses de idade e aguardaram dois meses para o sacrifício. Foi avaliada a região do septo inter-radicular do primeiro molar mandibular em microscópio confocal. Os parâmetros histomorfométricos de formação e reabsorção ósseas mostraram-se alterados nos animais OVZ. Já os parâmetros de conectividade foram semelhantes aos do grupo SHAM, e os autores consideraram que talvez fosse necessário mais tempo de deficiência estrogênica para sua alteração na região avaliada.

Posteriormente em 2003⁶³, o período aguardado estendeu-se por um ano. Os parâmetros de formação e reabsorção óssea não se apresentavam tão alterados e os autores perceberam que a perda

de massa óssea deveu-se, principalmente, ao alto índice de reabsorção imediatamente após a ovariectomia que declinou como o decorrer do tempo⁶³.

Segundo Teófilo et al.⁶⁵, a literatura é controversa quanto à eficiência da ovariectomia em induzir perda óssea nos ossos maxilares, sendo necessária a administração de dieta deficiente em cálcio⁶⁵. Ou, alternativamente, associar ao modelo experimental de ovariectomia a redução do esforço mastigatório por meio, por exemplo, das extrações dos molares antagonistas, para se obter perda óssea significativa⁷³. Kiliaridis et al.³¹ verificaram maior perda óssea mandibular em ratos em crescimento mediante a administração de dieta triturada e umedecida (dieta macia).

O mecanismo pelo qual o esforço mecânico afeta a massa óssea não está completamente estabelecido. Uma teoria baseia-se na presença de receptores especiais nos osteócitos distribuídos por todo tecido ósseo que são capazes de captar os estímulos mecânicos aos quais o esqueleto está submetido e constantemente sinalizam para as células de revestimento da superfície óssea, mantendo-as em repouso ou induzindo sua migração para a reabsorção de determinada superfície por osteoclastos⁶⁸.

A consistência da alimentação foi alvo do estudo de Yamamoto⁷² no qual foram determinados o posicionamento dentário e parâmetros histomorfométricos em ratos em fase de crescimento, que foram submetidos à dieta líquida em comparação ao grupo controle que recebeu dieta sólida padrão. O autor deu ênfase no estudo do crescimento maxilar, encontrando diferenças significativas nos níveis e nos locais de aposição óssea conforme o tipo de dieta.

Kawamoto e Nagaoka²⁹ perceberam que a deficiência estrogênica acentuou os índices de reabsorção óssea no alvéolo dental de dente submetido à oclusão traumática. Entretanto, os parâmetros de formação óssea permaneceram semelhantes nos grupos SHAM e OVZ.

Aguardaram sete dias após a ovariectomia para a indução do trauma por meio de colagem de estrutura de metal na face oclusal do primeiro molar superior e os animais foram mortos um, três, cinco, sete e dez dias após este procedimento. Segundo os autores, o recrutamento de osteoclastos e precursores apresenta-se acentuado aos sete dias após a ovariectomia, como resultado, um grande número de osteoclastos são ativados em resposta ao trauma no ligamento periodontal.

Moriya et al.³⁹ realizaram um estudo para verificar a relação entre osteoporose experimental e a perda óssea alveolar induzida por meio da ovariectomia em ratas com dieta padrão ou pobre em cálcio. Na densidade mineral, tanto na maxila quanto na mandíbula, foi constatado que não houve uma diferença significativa entre os grupos SHAM e OVZ que receberam dieta padrão, mas os que receberam dieta deficiente em cálcio apresentavam menor massa óssea. Assim, concluíram que a ovariectomia isoladamente não corresponde a um fator de perda óssea nestes ossos.

Hara et al.¹⁸ estudaram tíbias, mandíbulas e maxilas por meio de análise histomorfométrica. A face proximal da tíbia, o côndilo mandibular e o palato duro foram avaliados e os autores verificaram que os efeitos da deficiência em cálcio são mais acentuados quando comparados com os da deficiência estrogênica. A dinâmica óssea foi alterada por ambos na tíbia e mandíbula e somente pela deficiência em cálcio no palato.

Jiang et al.²⁵ averiguaram a relação entre a osteoporose e a perda óssea mandibular por meio de tomografia computadorizada periférica quantitativa. As ratas receberam ração com teor de cálcio controlado, sendo o grupo controle alimentado com 1.0% de cálcio e os grupos SHAM e OVZ com 0.01% de cálcio. Três e seis meses após a ovariectomia realizaram-se os sacrifícios. Os animais SHAM demonstraram discreta diminuição da massa óssea quando comparados com os animais controle e os animais OVZ mostraram-se com menor

densidade óssea que os SHAM. Tais alterações foram principalmente notadas no período de três meses após a ovariectomia. Os valores foram semelhantes no período de seis meses de deficiência estrogênica. A acentuada diminuição da densidade mineral foi atribuída à indução da reabsorção óssea pela deficiência do cálcio. A idade dos animais pareceu não interferir na densidade óssea mandibular de ratas. Em geral, o osso em atividade física possui alto índice de remodelação. O estresse mecânico, assim como o exercício físico, promovem remodelação, resultando em aumento da massa óssea. Neste estudo, a perda óssea foi mais evidente na região do primeiro molar, local coincidente com área de maior esforço durante a mastigação.

Outra forma de estudar a importância do cálcio em ratas ovariectomizadas foi utilizada por Shirai et al.⁵⁵ que avaliaram a implicação da dieta rica em cálcio na dinâmica óssea da maxila, mandíbula e tíbia na osteoporose experimental. Os autores observaram que o grupo de ratas ovariectomizadas que recebeu elevada quantidade de cálcio na dieta apresentou os parâmetros de formação óssea e de reabsorção semelhantes aos do grupo das ratas SHAM, sendo que, o cálcio da dieta foi capaz de reverter os efeitos da deficiência estrogênica.

Zaffe et al.⁷³ acreditam que para induzir a osteopenia oral severa, é necessário produzir uma notável alteração no estresse mecânico. Sendo assim, para acentuar a perda óssea alveolar seria necessário associar a remoção dos ovários à diminuição de carga mecânica, por exemplo, por meio de extrações de molares.

Kawane et al.³⁰ realizaram estudo com metodologia semelhante, extraíndo todos os molares maxilares bilateralmente duas semanas após a cirurgia de ovariectomia. As extrações alteraram a densidade mineral óssea somente no grupo OVZ, sendo que não ocorreu diminuição da massa óssea mandibular nos animais do grupo SHAM. Os autores administraram hormônio da paratireóide (PTH) do tipo sintético ou recombinante nos animais. Não houve diferença entre os dois tipos de

medicamentos, sendo que ambos reverteram o quadro de perda óssea na região de molares mandibulares. Esta atuação apresentou-se dose dependente e menos potente no ramo da mandíbula, predominantemente composto por osso cortical, tipo ósseo menos afetado pelo PTH.

No trabalho de Ejiri et al.¹², foi realizada a exodontia dos molares inferiores, e ocorreu perda óssea maxilar. Os autores verificaram a diminuição do volume ósseo tanto nos animais OVZ quanto nos animais SHAM na maxila, quando foi realizada a exodontia dos molares inferiores antagonistas. Inclusive, a perda foi maior nos animais OVZ quando comparados aos SHAM.

2.2 Deficiência estrogênica e a reparação óssea

Estudos realizados sobre as diferenças entre a reparação óssea em indivíduos normais e com osteoporose sugerem uma redução na capacidade de reparação desse tecido^{1,27,34,37,42,56}.

O reparo ósseo foi influenciado pela deficiência hormonal em ovelhas ovariectomizadas no estudo de Lill et al.³⁷. Os autores avaliaram a evolução do reparo ósseo de um defeito realizado na tíbia dos animais. As ovelhas foram ovariectomizadas, e receberam por sete meses uma dieta deficiente em cálcio e fósforo e doses diárias de metilprednisona. Após a confecção do defeito, a avaliação da espessura do calo ósseo, com aparelho especial, foi semanal sem sacrifício dos animais. Os animais foram mortos na primeira, quarta e oitava semana de experimento e foram determinadas a densidade, área e aspectos de torção da região do calo. Os resultados destes testes mostraram que o reparo do grupo ovariectomizado apresentou-se prejudicado com menor quantidade óssea e propriedades biomecânicas inferiores às aquelas encontradas nas ovelhas controle. Avaliaram também a densidade

mineral do osso cortical e trabecular fora do reparo e os animais controle apresentaram maior densidade mineral óssea quando comparada com a do grupo ovariectomizado.

Junqueira et al.²⁷ ao investigar o reparo ósseo utilizaram vários grupos experimentais, alguns deles, como intuito de testar o efeito da sinvastatina sistêmica (medicamento utilizado no tratamento da hipercolesterolemia) no reparo e nos níveis de colesterol em ratas. Após a ovariectomia, foram aguardados três meses para a realização de um defeito bicortical no ângulo da mandíbula em todos os animais. A análise histomorfométrica mostrou que as ratas OVZ possuíam menor volume trabecular ósseo, quando comparadas ao grupo controle, denotando a influência da deficiência estrogênica no reparo ósseo. A sinvastatina teve efeito sobre o volume trabecular no reparo das ratas ovariectomizadas, sem, contudo alterar as características do grupo controle. Neste experimento, o medicamento manteve os níveis de normalidade do colesterol.

Kubo et al.³⁴ propuseram-se a estudar a influência da deficiência estrogênica no reparo ósseo. Para tanto utilizaram ratas de 8 meses de idade que foram submetidas à cirurgia de ovariectomia e alimentadas com dieta especial com 0,1% cálcio. As ratas SHAM receberam ração comercial padrão. Três meses após, realizaram a fratura em fêmur. Um mês e meio e três meses após a fratura, as ratas foram mortas. Nos animais OVZ, a densidade mineral óssea na área da fratura diferenciou-se dos animais SHAM no período de três meses de reparo, porém o mesmo não ocorreu no período mais precoce. A força de torque necessária para fratura foi menor no grupo OVZ quando comparado como grupo SHAM também no período de três meses. Na análise microscópica, os espécimes OVZ deste período mostraram marcada presença de osteoclastos e lacunas de reabsorção. Segundo os autores estes achados são clinicamente importantes quando do tratamento de fraturas de mulheres com osteoporose pós-menopausa.

Amadei¹, Namkung-Matthai et al.⁴², Silveira⁵⁶, Walsh et al.⁶⁹, entre outros autores também investigaram os efeitos da deficiência estrogênica sobre o reparo ósseo de defeitos e fraturas em tíbia e fêmur de ratas ovariectomizadas encontrando um reparo deficiente nos animais ovariectomizados.

2.3 Reparação óssea alveolar

Johansen²⁶ extraíram os primeiros molares inferiores de ratos para o estudo do reparo ósseo alveolar. O processo de reparo alveolar foi minuciosamente descrito, dia após dia até o décimo e no período de 17 e 20 dias, sendo que os principais fenômenos foram a formação do coágulo ao primeiro dia e sua gradativa organização e substituição aos três dias pelo tecido de granulação. Neste período já se observa reabsorção e neoformação óssea na parede alveolar. O completo preenchimento do alvéolo por osso neoformado foi visto ao sexto dia. A queratinização praticamente normal do epitélio de recobrimento ocorreu no décimo primeiro dia de reparo. Após 20 dias da extração observava-se discreta diminuição da espessura da mandíbula quando comparada com o lado controle.

Neste estudo²⁶, ocorreu a fratura de uma ou mais raízes, mas nenhum procedimento foi realizado para remover os fragmentos remanescentes para evitar maiores traumas cirúrgicos que poderiam alterar o reparo dos demais alvéolos. Alguns animais sofreram perda de peso até cinco dias após a cirurgia. Segundo o autor as fraturas de raízes ou das tábuas ósseas obviamente interferiram no processo de reparo alveolar, contudo, estas complicações forneceram informações interessantes sobre as reações às raízes residuais e seu periodonto. A presença de raízes fraturadas atrasou o recobrimento epitelial do alvéolo.

Por vezes o epitélio envolvia seqüestros ósseos da crista alveolar. Aos três e seis dias de reparo havia pronunciada presença de tecido conjuntivo e células endoteliais. Havia marcada presença de restos epiteliais de Malassez, o que não ocorria no lado oposto (controle). Segundo o autor, os períodos de observação foram curtos para determinar o destino final destes restos radiculares²⁶.

Em ratas normais, Devlin et al.⁸ estudaram a formação óssea trabecular durante a reparação óssea alveolar após exodontia do molar. Os autores verificaram que as fibras colágenas tipo III detectáveis aos seis e sete dias de reparo, originadas da parede do alvéolo formam um arcabouço, sobre o qual são depositadas as trabéculas ósseas neoformadas.

O colágeno tipo IV é associado com a matriz de células endoteliais. Provavelmente, a ligação seletiva do colágeno IV com fatores de diferenciação e crescimento celular exerça regulação nas células mesenquimais, convertendo-as a osteoblastos²⁰.

2.4 Deficiência estrogênica e a reparação óssea alveolar

Alguns autores propuseram-se a avaliar o reparo ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas, comparando-o com animais SHAM-operados. Em sua maioria, estes estudos preocuparam-se especialmente com a formação e reabsorção ósseas ocorridas ao redor do alvéolo, e poucos com a neoformação óssea no interior do alvéolo^{22,46,53,54,57,64,66,59,74}.

Silveira⁵⁷ realizou ovariectomia em ratas de três meses de idade, aguardou duas semanas e extraiu os primeiros molares mandibulares bilateralmente. Avaliou os efeitos iniciais da deficiência estrogênica, bem como da terapia de reposição hormonal e da terapia alternativa com isoflavonas da soja. O autor realizou análise morfométrica da taxa de aposição mineral e de densidade de volume, bem como análise imunoistoquímica e microscopia por elétrons retroespalhados do osso neoformado no interior do alvéolo. Os resultados mostraram que, apesar da perda da conectividade observada nos espécimes OVZ e das médias de densidade de volume terem sido menores, foram estatisticamente semelhantes às do grupo SHAM. Os estrógenos e as isoflavonas não alteraram estes parâmetros ósseos. O grupo que recebeu estrógenos apresentou maior volume de tecido osteóide e maior taxa de aposição mineral. Concluiu-se que o efeito inicial da ovariectomia não provocou alterações evidentes na formação óssea no reparo alveolar.

Hsieh et al.²² utilizaram para seu experimento a seguinte divisão dos grupos: grupo I composto por seis ratas ovariectomizadas com exodontia simultânea; grupo II composto por cinco ratas com exodontia e cirurgia SHAM; grupo III composto por cinco ratas SHAM sem exodontia; todos sacrificados dez dias após a exodontia; e grupo IV composto por oito ratas OVZ com exodontia (metade sacrificada cinco dias e a outra metade 14 dias após a extração dentária). Determinaram a superfície de mineralização e a taxa de aposição mineral ao redor dos alvéolos (fluorescência). A partir destes fatores calcularam a taxa de formação mineral, multiplicando-as. A média de largura do osso alveolar também foi calculada. A superfície de mineralização do grupo III foi maior que as demais, sem diferenças entre o grupo I e II. A largura do osso alveolar foi maior no grupo ovariectomizado com exodontia quando comparada com o SHAM sem exodontia. Os grupos SHAM e OVZ com exodontia foram semelhantes.

A superfície de mineralização foi maior no período de 14 dias²². Nos animais mortos aos cinco e dez dias, o período de injeção da tetraciclina coincidiu com a fase de atividade osteoclástica, resultando em uma reduzida superfície de mineralização. Os autores perceberam que a taxa de aposição mineral foi mais alta aos cinco dias após ovariectomia em relação a dez e catorze dias depois da ovariectomia. As ratas SHAM com extração demonstraram aumento da remodelação por osteoclastos com relação às ratas sem exodontia, contudo, a ovariectomia acentuou tal evento, sendo que este fator sistêmico foi capaz de afetar a remodelação do osso alveolar. Por analogia, os autores consideram que a reabsorção da crista óssea residual pode ser maior em mulheres que sofrem extração após a menopausa²².

Tanaka et al.⁶⁴ avaliaram a influência dos efeitos iniciais da deficiência estrogênica em ratas ovariectomizadas sobre a reparação óssea alveolar. Extraíram o primeiro molar maxilar sete dias após a ovariectomia e o sacrifício ocorreu sete, 30 e 60 dias após as extrações. Por microscopia eletrônica de varredura, os autores estudaram a deposição óssea e as áreas de reabsorção ao redor do alvéolo. Aos sete dias, os grupos SHAM e OVZ foram semelhantes, contudo, aos 30 e 60 dias, as áreas reabsortivas tornaram-se mais pronunciadas nos animais OVZ. Os índices de formação óssea foram discretamente superiores nos animais OVZ, contudo, os índices morfométricos de reabsorção óssea foram significativamente superiores neste grupo. Por microscopia de elétrons retroespalhados, avaliaram o osso neoformado no interior do alvéolo dentário. Na área total da raiz mesial avaliada, a formação de tecido ósseo não foi diferente entre os animais SHAM e OVZ. A composição mineral (% de cálcio e fósforo) avaliada não revelou diferenças entre os animais SHAM e OVZ. Sendo assim, os autores acreditam que a estrutura óssea pós-extração perde espessura e força mecânica, especialmente na região palatina em virtude da intensa

atividade reabsortiva induzida pela deficiência estrogênica, configurando-a como um fator de risco à reparação alveolar prejudicada.

Shimizu et al.⁵³ estudaram o reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas. O modelo utilizado foi a cirurgia de excisão dos ovários em animais de seis meses de idade. Sessenta dias após, o primeiro molar maxilar foi extraído e o sacrifício ocorreu quatro, sete, 30 e 60 dias depois da extração. Segundo os autores, a metodologia empregada (microscopia eletrônica de varredura associada à microscopia óptica) permite a identificação de áreas formativas e reabsortivas do tecido ósseo alveolar. A superfície óssea ao redor do alvéolo foi avaliada, sendo que a neoformação óssea do interior do alvéolo não foi estudada neste experimento. Os resultados mostraram que os animais OVZ produziram maior quantidade óssea que os do grupo SHAM, no período inicial, que foi decrescendo com o tempo e a reabsorção óssea foi superestimada, provavelmente pelos osteoblastos envolvidos na neoformação óssea no local. Também observaram que a formação e reabsorção ósseas ocorrem separadamente em locais específicos na superfície óssea alveolar e no interior do alvéolo e estes processos parecem coexistir simultaneamente em alguns locais desta superfície.

Por meio do mesmo modelo animal⁵⁴, este mesmo grupo de autores avaliou o osso neoformado do interior do alvéolo e da superfície vestibular do alvéolo. A morfometria realizada sobre a área de tecido ósseo neoformado na superfície ao redor do alvéolo demonstrou que os animais SHAM apresentaram maior quantidade óssea, significativamente aos sete e 60 dias, e sem significância estatística aos 30 dias de reparo. No interior do alvéolo, aos sete dias OVZ e SHAM apresentaram-se semelhantes, contudo, 30 e 60 dias após a extração, o alvéolo dos animais ovariectomizados apresentava menor quantidade óssea estatisticamente significativa. O reparo alveolar, mesmo após 60 dias não se mostrava completo no grupo OVZ. Sendo assim a deficiência estrogênica diminuiu a formação óssea prejudicando o reparo⁵⁴.

O reparo ósseo alveolar foi alvo do estudo de Teófilo et al.⁶⁶, que se propuseram a avaliar não só os efeitos da deficiência estrogênica em associação à dieta deficiente em cálcio, como também, estudar a influência de um enxerto de vidro bioativo sobre a reparação alveolar. Para tanto foram extraídos incisivos de ratas ovariectomizadas previamente (duas semanas antes) e os animais sacrificados uma, duas, três e nove semanas após as exodontias. A análise morfométrica de densidade de volume ósseo revelou menor quantidade óssea nos animais OVZ com maior porcentagem de tecido conjuntivo e de coágulo remanescentes. Havia também grande quantidade de osteoclastos profusamente distribuídos na superfície das trabéculas ósseas neoformadas, sugerindo um aumento da atividade reabsortiva em decorrência das deficiências em cálcio e estrogênica. O enxerto testado promoveu melhora nas condições de reparo dos animais ovariectomizados.

Zecchin et al.⁷⁴, realizaram a extração do primeiro e segundo molares mandibulares bilateralmente decorridas três semanas da ovariectomia. Os animais foram sacrificados 3, 5 e 7 dias após a cirurgia. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da ausência de estrógenos sobre a expressão e a atividade dos colágenos tipo I e III e das metaloproteinases 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9) no tecido de granulação alveolar, por zimografia e reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A atividade gelatinolítica das MMPs foi reduzida significativamente nos animais OVZ quando comparados com os do grupo SHAM. Houve redução dos níveis de RNA mensageiro de MMP-9, colágeno I e III nos espécimes do grupo ovariectomizado. A expressão dos colágenos I e III parece estar associada ao estrógeno via receptor- β e as enzimas são importantes para a digestão da matriz provisória do tecido de granulação. Estes resultados indicam que a deficiência hormonal pode prejudicar o reparo alveolar.

Pereira et al.⁴⁶ realizaram a ovariectomia em ratas de um mês de idade, aguardaram vinte e um dias e extraíram os molares inferiores bilateralmente para avaliar a influência da ovariectomia no reparo ósseo alveolar. Segundo os resultados da densitometria óssea, os alvéolos dos animais ovariectomizados possuíam menor densidade óssea. As análises microscópica e histométrica demonstraram que no período inicial de reparo do grupo ovariectomizado havia maior quantidade de fibroblastos e fibras colágenas e menor quantidade de trabéculas ósseas que no grupo controle. Nos períodos mais tardios, os espaços medulares eram maiores e mais freqüentes no grupo com deficiência estrogênica. Sendo assim, os autores concluíram que a ausência de estrógeno diminuiu a neoformação de osso e prejudicou o reparo ósseo alveolar.

2.4 Mastócitos

Os mastócitos derivam de células precursoras na medula óssea e são encontrados em tecidos conjuntivos próximos dos vasos sanguíneos. Seus grânulos contêm mediadores inflamatórios como histamina, heparina, fatores quimiotáticos de eosinófilos e neutrófilos e certas proteases. Os distúrbios proliferativos dos mastócitos contemplam um espectro de lesões cujos sintomas relacionam-se à liberação de mediadores inflamatórios e incluem rubor, prurido e urticária. Dentre eles pode-se citar a hiperplasia dos mastócitos ou mastocitose reativa, que pode ser observada na medula óssea de mulheres com osteoporose pós-menopáusia⁵¹.

Os mastócitos parecem contribuir na reabsorção óssea¹⁰. Esta afirmação tem como fundamentação a observação de algumas condições patológicas com elevado índice de reabsorção óssea

associadas a um aumento no número destas células na proximidade de superfícies ósseas em reabsorção.

Banovac et al.³ estudaram a reparação de fraturas em fêmures e observaram que os mastócitos e suas enzimas desempenham papel na formação da matriz extracelular do calo ósseo. Segundo os autores no período inicial do reparo, tais células podem estar envolvidas na formação do tecido conjuntivo frouxo, especialmente na angiogênese. Nos estágios avançados, podem atuar, em conjunto com outras células, na reabsorção do calo fibroso para deposição óssea, e ainda ajudar na reabsorção óssea para remodelação do calo ósseo.

Os mastócitos foram alvos do estudo de Brumsen et al.⁵ que levantaram a hipótese da participação destas células na patogênese da osteoporose idiopática em homens. A presença de mastócitos foi observada na medula óssea de pacientes com osteoporose e marcadores urinários comprovaram a alta atividade metabólica destas células nestes pacientes, sugerindo alguma relação entre os mastócitos e a baixa densidade mineral óssea. Contudo, segundo os autores, mais estudos são necessários para elucidar o papel dos mastócitos na perda óssea da osteoporose idiopática em homens.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar, em ratas, os efeitos iniciais da ovariectomia associada ou não à dieta pobre em cálcio no processo de reparação óssea alveolar e na taxa de aposição mineral no osso alveolar.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Neste trabalho foram utilizadas 72 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 3 meses de idade, peso aproximado de 300 g, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, e alimentadas com ração comercial padrão (Guabi Nutrilabor®) com teor de cálcio de até 1,2% e fósforo de no mínimo 0,8% ou com ração com baixo teor de cálcio (0,1%) e fósforo (0,5%) e água destilada *ad libitum*. A quantidade de ração ingerida foi pré-determinada, na quantidade de 20 g por dia para assegurar o mesmo volume de alimento para todos os grupos. Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, sob o protocolo 027/2005/PA-CEP (Anexo A). Apoio: CNPq (processo 476143/2006-3)

4.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia ou cirurgia SHAM

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados utilizando-se instrumentais devidamente esterilizados e descartáveis.

Para anestesia geral foi utilizada solução de 14,2 mg/kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Anasedan-Bayer do Brasil®), substância com propriedades sedativas e analgésicas,

além de relaxante muscular, e 38,5 mg/kg de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil Ltda.®), anestésico geral, via intramuscular.

Os animais foram aleatoriamente divididos em:

- a) ovariectomizados - constituído por 48 animais, os quais foram submetidos a ovariectomia;
- b) SHAM - constituído por 24 animais, os quais foram falsamente operados.

Ao iniciar o experimento todas as ratas foram pesadas. A pesagem dos animais foi repetida no dia do sacrifício. Os animais do grupo ovariectomizado foram anestesiados, fez-se a depilação da região lateral do corpo, ao nível dos rins e abaixo da costela mais inferior e anti-sepsia com álcool iodado. Realizou-se incisão longitudinal, com extensão de 1 cm em média, na pele, com lâmina de bisturi nº15. Em seguida, foi feita a divulsão do tecido subcutâneo e posterior incisão da musculatura. O ovário foi exposto e confeccionou-se uma ligadura logo abaixo do mesmo para a contenção da hemorragia e posterior remoção deste, juntamente com parte do útero e tecidos moles circundantes, sendo este procedimento feito bilateralmente (Figura 1).

Nos animais do grupo controle, foi realizada a falsa ovariectomia ou cirurgia *sham*, na qual foram feitos os mesmos procedimentos, incluindo a exposição dos ovários, com exceção da ligadura e remoção dos mesmos.

Ao fim dos procedimentos a camada muscular foi suturada com fio reabsorvível Categute nº4 (Cirumédica-Brasil), em seguida, realizou-se a sutura da pele com fio de seda 4.0 (Ethicon-Johnson & Johnson), e por fim nova anti-sepsia com álcool iodado na região operada.

4.3 Grupos experimentais

De acordo com o tratamento recebido os animais ovariectomizados foram ainda subdivididos em grupos:

- a) Grupo Ração Especial (ESP) – constituído por 24 ratas, as quais receberam ração deficiente em cálcio;
- b) Grupo Ovariectomizado (OVZ) - constituído por 24 ratas, as quais receberam ração comercial padrão.

Os 24 animais do grupo SHAM também receberam ração comercial padrão.

A administração das rações específicas para cada grupo iniciou-se no dia da ovariectomia. Os animais do grupo ração especial receberam a ração denominada Dieta AIN-93M cálcio (0,1%) e fósforo (0,5%) fabricada por RHOSTER Indústria e Comércio LTDA –Vargem Grande Paulista –SP (Figura 2).



FIGURA 1 - Excisão do ovário e tecido mole circunjacente, após ligadura para contenção da hemorragia.



FIGURA 2 - Dieta: a) ração padrão fornecida às ratas do grupo SHAM; b) ração deficiente em cálcio fornecida aos animais ovariectomizados.

4.4 Exodontia

Em todos os animais foi realizada a exodontia dos primeiros molares inferiores, bilateralmente, 15 dias após a ovariectomia ou cirurgia SHAM sob anestesia geral. Para tanto, fez-se a sindesmotomia, luxação e o dente foi removido (Figura 3). Todos os animais receberam 1 mg/kg de antiinflamatório (diclofenaco sódico 75 mg, Voltaren injetável- Geigy) e 0,1 ml da solução do antibiótico (Pentabiótico – Fort Dodge Ltda.).

Administrou-se tetraciclina (Terramicina, Pfizer), na dose de 20 mg/kg, intramuscular, 24 h após a exodontia. A tetraciclina foi utilizada como marcador para análise histomorfométrica dinâmica, com a finalidade de se verificar a taxa de aposição mineral diária⁴⁵.

Os animais receberam duas opções de ração após as exodontias, em grãos (padrão) ou moída, por dois dias, para minimizar o desconforto pós-operatório.

4.5 Sacrifício dos animais

Todos os animais foram anestesiados e pesados antes do sacrifício. De cada grupo, oito ratas foram sacrificadas após sete dias das exodontias, oito sacrificadas após 21 dias, enquanto as oito restantes foram sacrificadas decorridos 45 dias após as extrações dentárias. Avaliou-se a atrofia dos úteros nos animais ovariectomizados confirmando o sucesso da cirurgia (Figura 4).

Administrou-se tetraciclina (Terramicina, Pfizer), 48 h antes do sacrifício, com seringas de insulina descartáveis. Assim, as injeções de tetraciclina formaram duas linhas fluorescentes cuja distância permitiu a análise da taxa de aposição mineral diária.

Para o sacrifício, os animais foram anestesiados e sacrificados na guilhotina. As mandíbulas foram removidas, dissecadas e fixadas em solução de formol a 10% durante o tempo mínimo de 48 h.



FIGURA 3 - Exodontia: Luxação do primeiro molar inferior direito para sua posterior remoção.

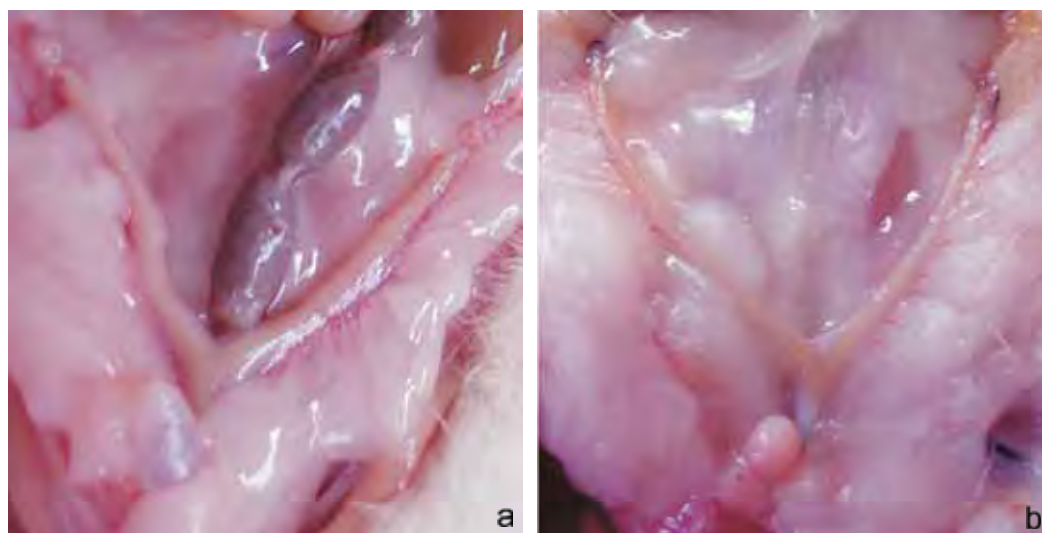


FIGURA 4 - Comprovação do efeito da ovariectomia. a) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo SHAM; b) aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo OVZ.

A distribuição dos grupos experimentais e os períodos aguardados podem ser melhor visualizados no delineamento do estudo a seguir.

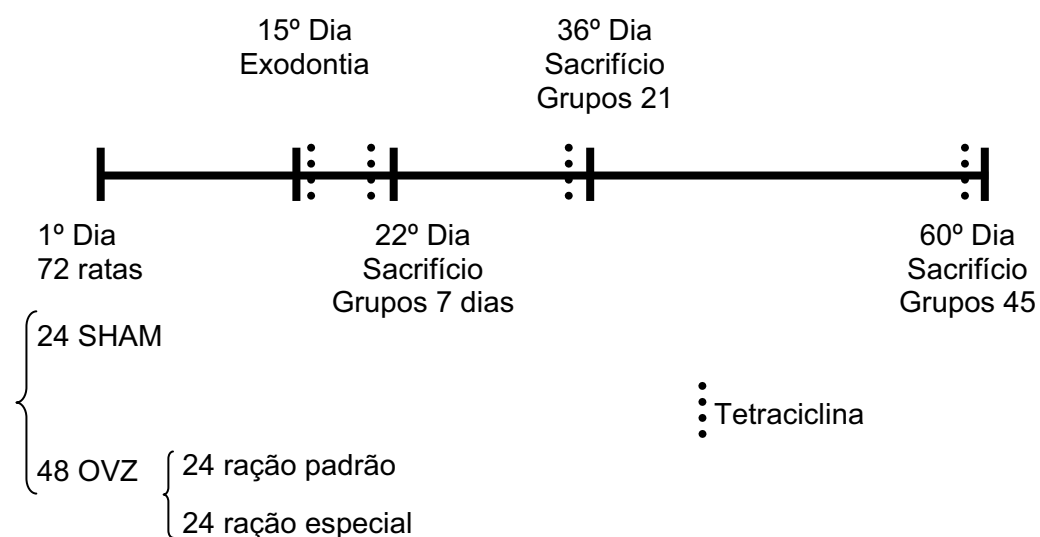


FIGURA 5: Delineamento da pesquisa com a linha do tempo

4.6 Radiografias

As hemi-mandíbulas esquerdas, após a fixação, foram utilizadas para a análise radiográfica digital para verificação da densidade óptica ($n=6$). Cada hemi-mandíbula foi posicionada sobre o sensor, com face lingual voltada para o aparelho de RX. As radiografias foram feitas com distância foco-objeto de 40 cm e tempo de exposição de 0,02 s.

4.6 Processamento tecidual

4.6.1 Processamento tecidual sem desmineralização - Inclusão em Resina

As hemi-mandíbulas esquerdas de cada período (n=7) foram submetidas às seguintes etapas de processamento:

- a) Imersão em concentrações crescentes de Etanol, durante 1 h cada, até álcool absoluto;
- b) Imersão em álcool absoluto por 4 dias;
- c) Imersão em Xilol por 3 dias;
- d) Imersão em Solução A (85% de metilmetacrilato e 15% de dibutilftalato) por 3 dias;
- e) Imersão em Solução 1, (85% de metilmetacrilato e 15% de dibutilftalato adicionada de 1 g de peróxido de benzoíla) por 4 dias, em geladeira.

A inclusão do fragmento foi realizada em uma pré-base, composta por Solução A adicionada de 3 g de peróxido de benzoíla, já polimerizada, em estufa à 37°C, contida em um frasco de vidro de 30 ml com tampa. O espécime foi posicionado sobre a pré-base, seguido de preenchimento do frasco com a Solução A adicionada de 3 g de peróxido de benzoíla, ficando, dessa maneira, o espécime suspenso do fundo do frasco. O frasco foi levado à estufa à 37°C por 48 h para a polimerização.

O frasco de vidro foi quebrado e o bloco encaminhado para corte no longo eixo da mandíbula, transversal às raízes (Figura 6), com o aparelho de corte Labcut 1010 (Exttec), utilizando-se disco diamantado de 3 polegadas de diâmetro (Figura 7a). Em seguida, os cortes da região apical do reparo foram colados em lâminas de plaxiglass incolor (Figura 7b) por meio de dispositivo de prensagem (Figura 7c). Como referência, o nível apical correspondeu àqueles cortes que ainda

não apresentavam a definição das duas raízes menores médio-vestibular e médio-lingual (Figura 6).

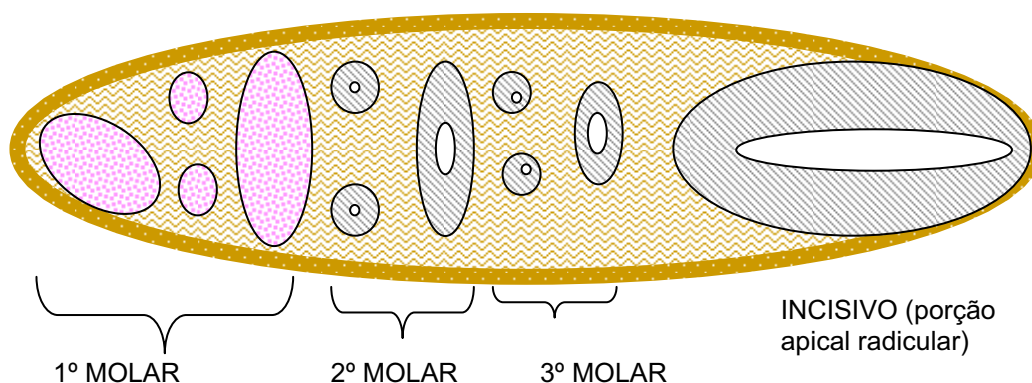


FIGURA 6: Esquema do sentido do corte perpendicular ao longo eixo das raízes, correspondente à região média radicular com a definição dos 4 alvéolos do primeiro molar inferior

Um dispositivo de apreensão foi utilizado para o desgaste das lâminas, feito em lixadeira politriz Labpol 8-12 (Extex) (Figura 7d), utilizando-se seqüência crescente de lixas d'água (600 e 1200), buscando-se a mínima espessura com o máximo de detalhes (Figura 7e).

A escolha do terço apical do alvéolo para histomorfometria foi feita por se tratar de uma região não afetada por possíveis fraturas ocorridas na tábua óssea do terço cervical do alvéolo.

As lâminas, ao fim do processamento foram submetidas à análise histomorfométrica, da taxa de aposição mineral e do número de mastócitos.

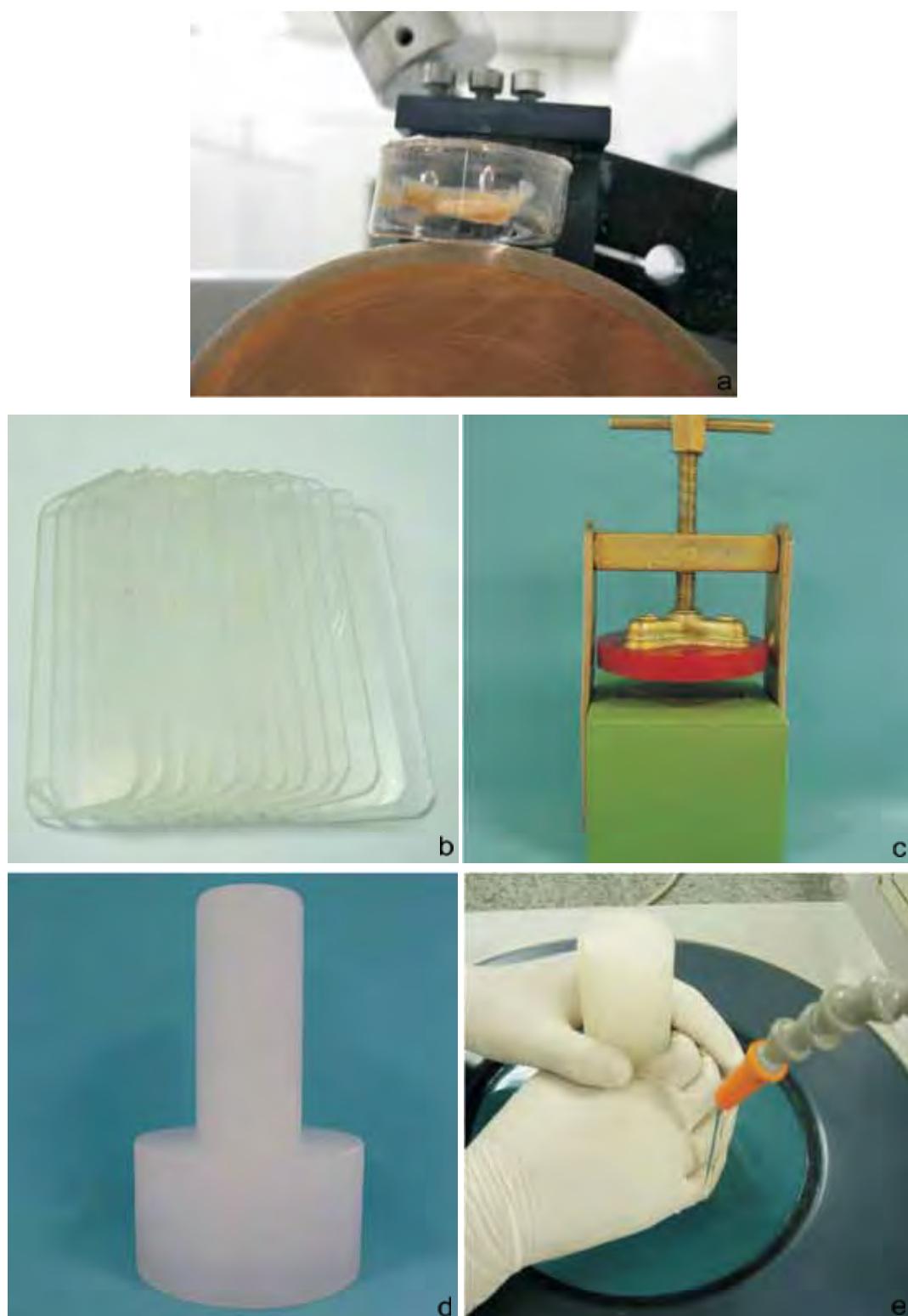


FIGURA 7 - Procedimentos laboratoriais: a) bloco posicionado para corte; b) lâminas de plaxiglass; c) dispositivo de prensagem; d) dispositivo para desgaste; e) polimento final.

4.6.2 Processamento tecidual com desmineralização - Inclusão em Parafina

Após a fixação, as 8 hemi-mandíbulas direitas de cada subgrupo foram encaminhadas para desmineralização em solução de 100 g de etilenodinitrilotetracético (EDTA), 10 g de hidróxido de sódio P.A. e água destilada até completar 1000 ml.

Após desmineralizadas, as peças foram lavadas abundantemente em água corrente removendo assim toda a solução desmineralizadora. Em seguida, foram submetidas à técnica histológica de rotina e incluídas em parafina. O corte foi feito no longo eixo da mandíbula, transversal às raízes (Figura 6) e as lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE).

Este processamento possibilitou a análise histológica qualitativa.

4.7 Formas de análise

4.7.1 Análise do peso dos animais

Os valores do peso dos animais no início (PI) e no fim do experimento (PF) foram utilizados para a obtenção da porcentagem do ganho de peso (GP), pela seguinte fórmula: $GP = (PF - PI) / PI \times 100$. Em seguida os valores de ganho de peso foram comparados com aplicação do teste de análise de variância (ANOVA, 2 fatores).

4.7.2 Análise radiográfica da densidade óptica

As radiografias foram analisadas com utilização do programa computacional, desenvolvido pelo NIH (*National Institutes of Health*), *Image-J* (versão *Windows* - domínio público), para medir a densidade óptica em tons de cinza no alvéolo mesial do primeiro molar inferior esquerdo. A escala em tons de cinza do programa *Image J* varia de 0 (negro total) a 256 (branco total).

4.7.3 Análise da taxa de aposição mineral diária

Nos cortes sem desmineralização não corados foi obtida a distância entre as duas marcações de tetraciclina na região ao redor do alvéolo do primeiro molar. Essa foi dividida pelo intervalo de tempo entre os 2 períodos de administração do marcador ósseo, para obtenção da taxa de aposição mineral, expressa em micrometros por dia.

Foram selecionados 10 campos na região apical próxima aos alvéolos mesial ou distal de cada animal (n=7). As imagens de cada campo foram selecionadas em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10X e objetiva de 40X. Em seguida, as imagens foram obtidas por câmera digital Sony (modelo Cybershot), acoplada ao microscópio. As imagens digitais foram submetidas à análise histomorfométrica, com utilização do programa computacional *Image-J*.

Foram realizadas 3 medidas lineares de cada campo e uma média obtida. O valor da taxa de aposição mineral por rata correspondeu à média dos valores obtidos nos 10 campos analisados.

4.7.4 Análise histológica

Os cortes desmineralizados foram submetidos à análise histológica em microscópio de luz para avaliação qualitativa do tecido ósseo neoformado (n=8).

4.7.5 Análise histomorfométrica

Os cortes incluídos em resina foram corados com azul de toluidina e posteriormente avaliados em microscópio de luz (n=7).

Foram fotografados 5 campos na região apical do alvéolo mesial ou distal de cada animal e a quantificação do volume trabecular e do volume osteóide foi feita por meio de planimetria por contagem de pontos. As imagens foram obtidas em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com ocular de 10x e objetiva de 20X, digitalizadas utilizando-se câmera digital Sony (modelo Cybershot), acoplada ao microscópio. Para a análise histomorfométrica foi utilizado o programa *Image-J*. Para tanto, utilizou-se um retículo composto por 70 pontos resultantes das interseções entre linhas verticais (7) e horizontais (10), posicionado sobre a imagem histológica para a contagem. Tal programa possibilitou a confecção do retículo e seu posicionamento sobre a imagem histológica. Observaram-se os seguintes parâmetros³⁴.

- a) volume trabecular: volume ocupado pelo osso trabecular, mineralizado ou não, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula e trabéculas ósseas;
- b) volume osteóide: volume ocupado pelo osso não mineralizado, expresso como porcentagem do volume

ocupado pelo osso trabecular mineralizado e não mineralizado.

4.7.6 Número de mastócitos

Foi analisado ainda o número de mastócitos encontrados em cada campo descrito anteriormente para histomorfometria. O número de mastócitos por animal correspondeu à média dos valores obtidos nos 5 campos analisados.

4.8 Estatística

A análise de variância pelo teste ANOVA dois fatores, bem como o teste de comparação múltipla de Tukey foram sempre realizados em duas abordagens de comparação. A primeira teve como variáveis o tempo de sacrifício (7, 21 e 45 dias) e o fator ovariectomia (presença ou ausência de hormônios ovarianos), comparando-se os grupos SHAM com os grupos OVZ.

A segunda teve como variáveis o tempo de sacrifício (7, 21 e 45 dias) e o tipo de ração administrada (padrão ou deficiente em cálcio) comparando-se os grupos OVZ com os grupos ESP.

Todos os dados da reparação óssea foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva e inferencial segundo as duas abordagens. Antes da análise, todas as imagens foram codificadas não permitindo a identificação do grupo experimental ao qual pertenciam, possibilitando uma obtenção cega dos dados.

5 RESULTADOS

5.1 Peso dos animais

Os valores absolutos do ganho de peso estão apresentados no Apêndice A e os valores em porcentagem, referentes à estatística descritiva estão apresentados na Tabela 1 mostrada a seguir.

Tabela 1 - Estatística descritiva dos valores de ganho do peso em porcentagem (Peso Final – Peso Inicial)/Peso Inicial x 100)

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	5,59	7,17	20,09
	DP	14,87	5,80	12,14
OVZ	Média	14,26	16,56	25,58
	DP	5,35	10,53	10,61
ESP	Média	11,56	23,38	38,61
	DP	5,12	6,18	10,74

*DP = Desvio Padrão

Ao analisar a Tabela 1 e a Figura 8 verificou-se que as médias de ganho do peso aumentaram com o decorrer do tempo.

Comparando-se os dados dos grupos OVZ e SHAM por meio da análise de variância (ANOVA), observaram-se como efeitos significantes a ovariectomia ($p=0,013$) e o tempo de sacrifício ($p=0,002$).

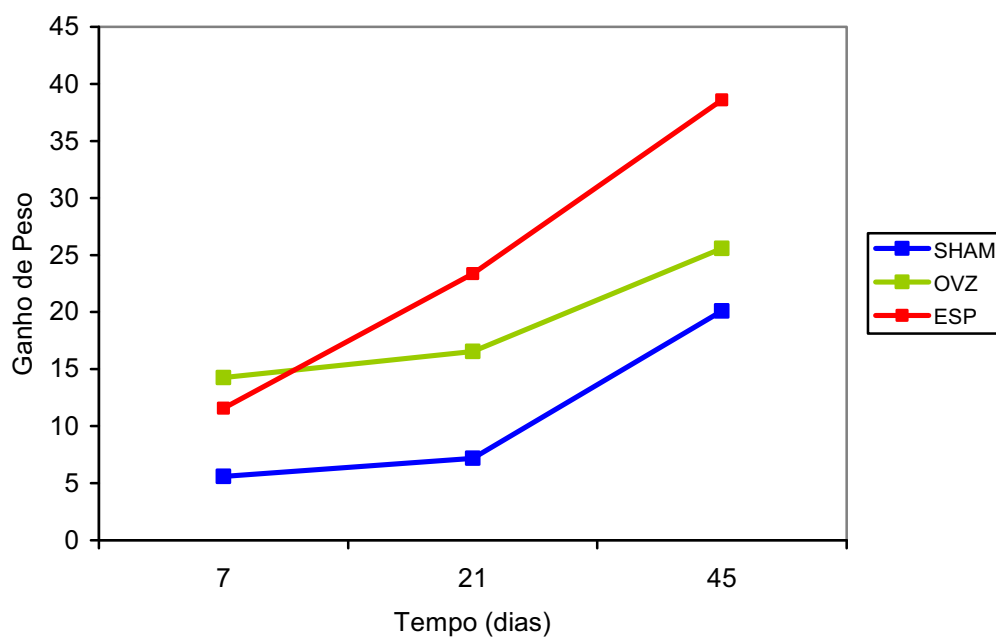


FIGURA 8 – Gráfico das médias de ganho do peso corporal dos grupos experimentais, no tempo de sacrifício de sete, 21 e 45 dias.

A comparação múltipla pelo teste de Tukey entre os grupos SHAM e OVZ demonstrou a formação de dois grupos homogêneos que foram estatisticamente diferentes, sendo o grupo OVZ, aquele com maior ganho de peso. A tabela 2 mostra que a média do grupo SHAM45 foi a que mais se aproximou daquelas dos grupos OVZ. Estes efeitos podem ser melhor compreendidos mediante o gráfico das médias mostrado anteriormente (Figura 8).

Tabela 2 – Teste de Tukey para os dados referentes ao ganho de peso entre os grupos SHAM e OVZ

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
SHAM	7	5,59	A
SHAM	21	7,17	A
SHAM	45	20,09	AB
OVZ	7	14,26	AB
OVZ	21	16,56	AB
OVZ	45	25,58	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

A comparação entre os grupos OVZ e ESP pelo teste ANOVA revelou que as ratas que receberam dieta deficiente em cálcio apresentaram ganho de peso diferente das OVZ ($p=0,025$). Com relação ao fator tempo de sacrifício, este também foi significativo ($p=0,000$) bem como a interação do tempo decorrido e da dieta administrada ($p=0,040$)

A comparação múltipla pelo teste de Tukey entre os grupos OVZ e ESP demonstrou a formação de três grupos homogêneos que foram estatisticamente diferentes, sendo o grupo ESP, aquele com maior ganho de peso. A Tabela 3 mostra que apesar do ganho de peso do grupo ESP7 ter sido o menor, não diferiu dos OVZ7, OVZ21 e ESP21. Pode-se também afirmar que o grupo ESP45 teve o maior ganho de peso.

Tabela 3 – Teste de Tukey para os dados referentes ao ganho de peso entre os grupos OVZ e ESP

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	14,26	AB
OVZ	21	16,56	AB
OVZ	45	25,58	B
ESP	7	11,56	A
ESP	21	23,38	AB
ESP	45	38,61	C

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.2 Análise Radiográfica

Os dados originais da densidade óptica, analisada em radiografias da mandíbula na região do alvéolo mesial do primeiro molar esquerdo, são apresentados no Apêndice B. A Tabela 4 abaixo, contendo a estatística descritiva destes dados, mostra que todos os grupos exibiram médias de densidade crescentes com o decorrer do tempo.

A análise de variância realizada entre os grupos OVZ e SHAM demonstrou como efeito significativo o tempo de reparo ($p=0,000$). O mesmo ocorreu na comparação dos grupos ovariectomizados ($p=0,000$). A figura 9 ilustra este efeito.

Tabela 4 - Estatística descritiva dos valores de densidade óptica média em tons de cinza da área analisada no alvéolo (escala *Image J*: 0-negro total; 256-branco total)

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	76,05	85,60	94,04
	DP	13,05	5,82	7,78
OVZ	Média	72,65	88,93	95,45
	DP	10,87	14,11	11,66
ESP	Média	71,99	80,03	94,65
	DP	11,01	11,11	11,96

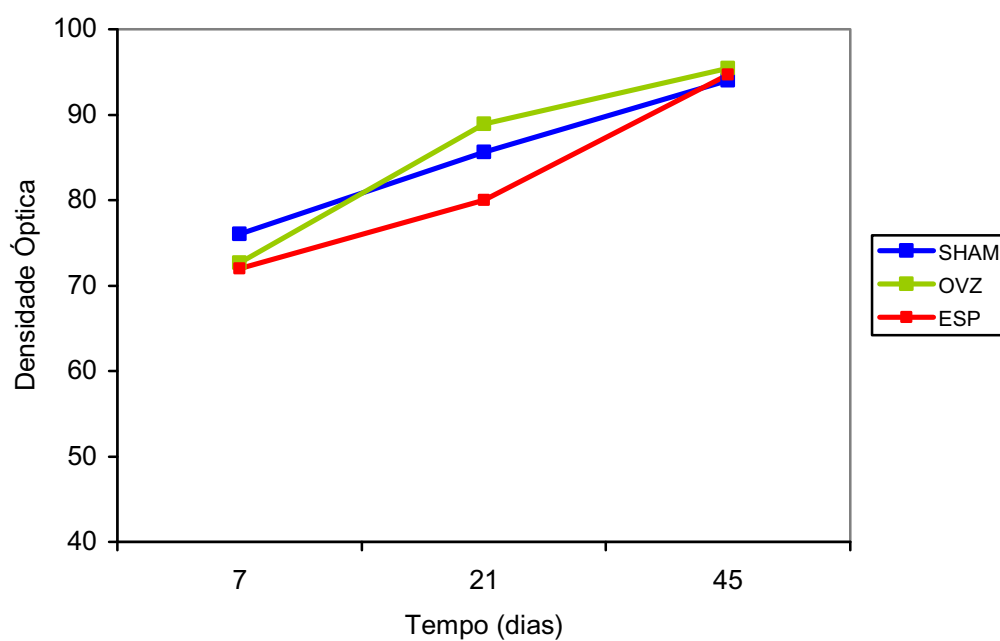


FIGURA 9 – Gráfico das médias de densidade óptica média em tons de cinza da área analisada no alvéolo mesial dos grupos experimentais, no tempo de sacrifício de sete, 21 e 45 dias.

O teste de comparação múltipla de Tukey aplicado nos dados dos grupos SHAM e OVZ permitiu a afirmação de que aos 21 e 45 dias de reparo, independentemente do grupo experimental, a densidade óptica é maior do que no período de sete dias (tabela 5). As radiografias da Figura 10 ilustram o efeito do tempo decorrido da cirurgia de exodontia sobre o reparo ósseo alveolar.

Tabela 5 – Teste de Tukey para densidade óptica nos três períodos de observação entre os grupos SHAM e OVZ

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	74,35	A
21	87,26	B
45	94,74	B

Quando o mesmo teste utilizou os dados dos grupos OVZ e ESP, o mesmo resultado foi obtido, sendo as densidades radiográficas semelhantes entre grupos que receberam rações diferentes e com aumento de densidade no decorrer do tempo (Tabela 6).

Tabela 6 – Teste de Tukey para densidade óptica nos três períodos de observação entre os grupos OVZ e ESP

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	72,32	A
21	84,47	B
45	95,05	B

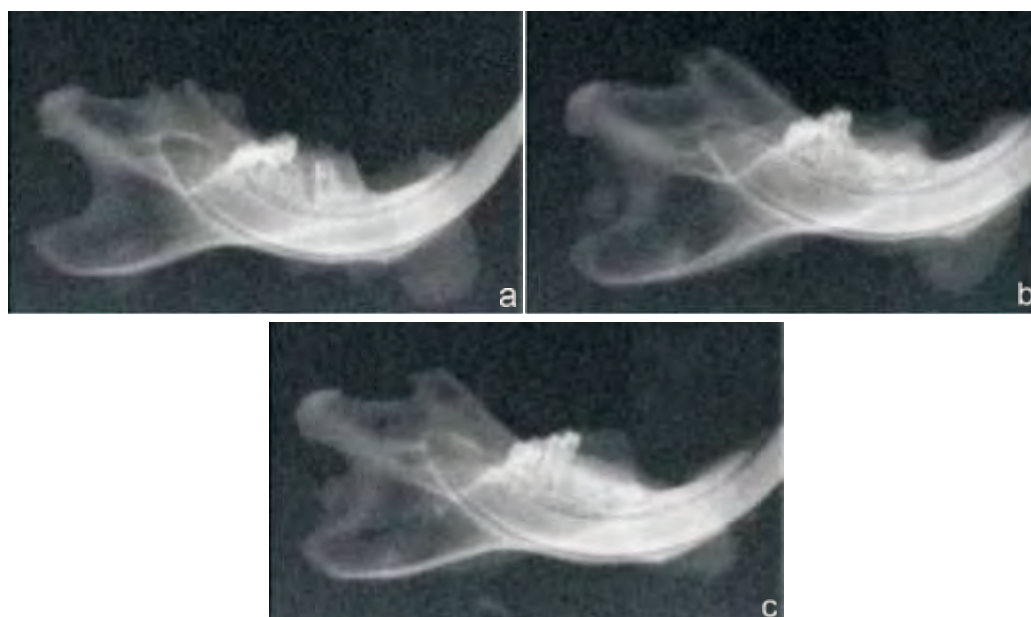


FIGURA 10 - Grupo SHAM: a) aspectos radiográficos do reparo após 07 dias; b) aspectos radiográficos aos 21 dias de reparo; c) aspectos radiográficos após 45 dias da exodontia.

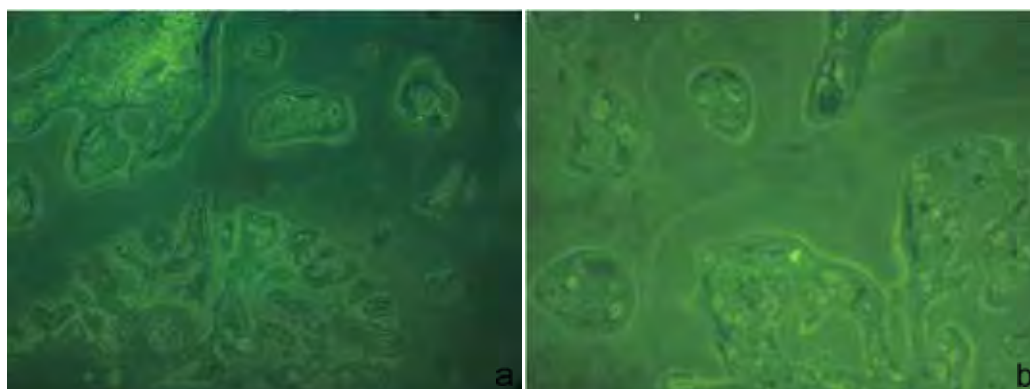


FIGURA 11 - Análise da taxa de aposição mineral do grupo ESP: a) grupo ESP aos 7 dias; b) grupo ESP aos 45 dias.

5.3 Taxa de aposição mineral

Ao redor do alvéolo, observou-se a presença de duas linhas fluorescentes em algumas trabéculas. Mediu-se a distância entre as duas marcações de tetraciclina nos três períodos de observação (Figura 11). Os dados originais estão apresentados no Apêndice C. A estatística descritiva desses dados encontra-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Estatística descritiva referente à taxa de aposição mineral diária (em $\mu\text{m}/\text{dia}$) dos grupos experimentais

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	3,40	1,39	0,67
	DP	0,51	0,24	0,12
OVZ	Média	3,38	1,14	0,58
	DP	1,14	0,24	0,10
ESP	Média	3,16	0,72	0,55
	DP	0,54	0,14	0,07

Observando os dados da Tabela 7 nota-se que os valores de todos os grupos experimentais no período de sete dias foram superiores aos demais períodos de observação.

Os dados dos grupos SHAM e OVZ, quando submetidos ao teste ANOVA mostraram, como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0,000$).

Após a comparação dos grupos ovariectomizados, por análise de variância, obtiveram-se os seguintes valores de p para o efeito tipo de ração ($p=0,065$) e tempo de sacrifício ($p=0,000$). A Figura 12 ilustra tal efeito.

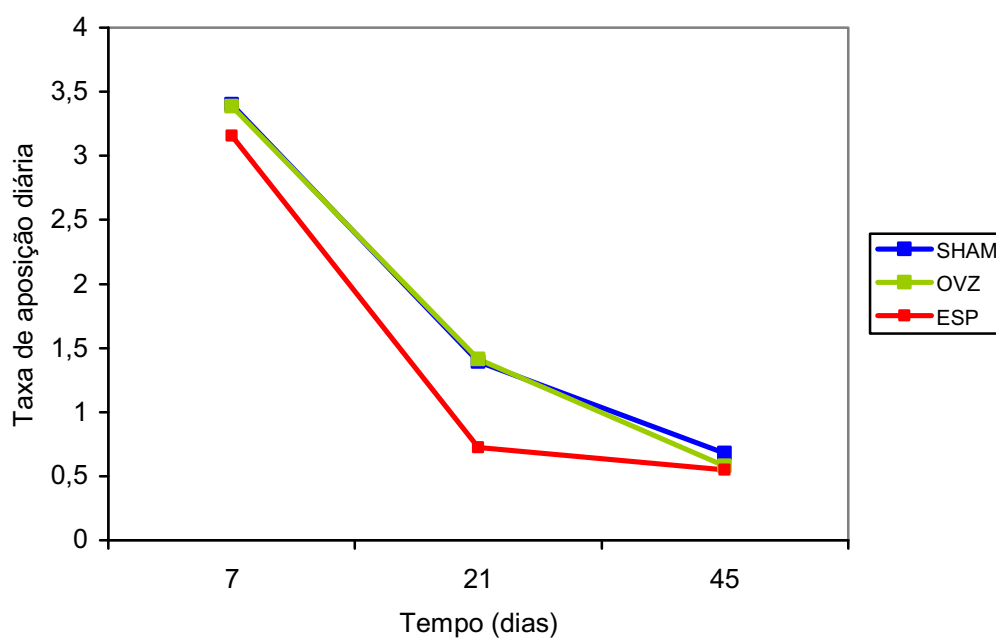


FIGURA 12 – Gráfico das médias da taxa de aposição mineral ($\mu\text{m}/\text{dia}$) nos tempos de sacrifício de sete, 21 e 45 dias.

Observou-se por meio da Figura 12 que as médias de todos os grupos experimentais apresentaram comportamento semelhante e decresceram com o decorrer do tempo

O teste de comparação múltipla de Tukey efetuado em seguida indicou semelhança entre os grupos SHAM e OVZ no mesmo período de observação (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral diária ($\mu\text{m}/\text{dia}$) nas seis condições experimentais

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
SHAM	7	3,40	A
SHAM	21	1,39	B
SHAM	45	0,67	B
OVZ	7	3,38	A
OVZ	21	1,41	B
OVZ	45	0,57	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de comparação múltipla de Tukey, efetuado em seguida para os grupos ovariectomizados, indicou que o grupo OVZ aos 07 dias apresentou maior taxa de aposição mineral diária, contudo semelhante ao ESP7. A menor taxa foi encontrada no grupo que recebeu ração especial, 45 dias após a extração, entretanto esta diferença não foi significativa na comparação deste mesmo período no grupo OVZ (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste de Tukey para os dados referentes à taxa de aposição mineral ($\mu\text{m}/\text{dia}$) dos grupos ovariectomizados

Tratamento	Tempo	Média	Grupos homogêneos
OVZ	7	3,38	A
OVZ	21	1,41	B
OVZ	45	0,58	BC
ESP	7	3,15	A
ESPI	21	0,72	BC
ESP	45	0,55	C

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.4 Análise Histológica

O padrão histológico encontrado foi, de maneira geral, semelhante nos grupos experimentais OVZ e SHAM, apresentando diferenças marcantes quanto ao período de observação e algumas diferenças no grupo ESP (Figura 13 e 14). As características foram descritas de acordo com os tempos de sete, 21 e 45 dias. As diferenças observadas foram destacadas conforme o grupo.

5.4.1 Período de sete dias

Os alvéolos mesial e distal do primeiro molar foram estudados por suas maiores dimensões (Figura 13a). Ambos, na região apical, apresentaram-se com quantidade variada de osso neoformado composto por trabéculas finas e delicadas que se irradiavam da parede alveolar em direção ao centro (Figura 13b). A região central do alvéolo usualmente exibia área de tecido de granulação, de maturação variada,

sem tecido ósseo (Figuras 13a-d). Muitas vezes observaram-se tecido osteóide na superfície de delgadas traves oriundas do osso alveolar (Figura 14a), e, por vezes, na superfície de trabéculas maduras geralmente recoberto por osteoblastos colunares (Figuras 14b). Os osteócitos apresentaram-se volumosos dentro de osteoplastos amplos e irregulares.

O tecido de granulação possuía alto índice de celularidade apresentando fibroblastos volumosos e poucas áreas hemorrágicas. Focos de células inflamatórias crônicas foram vistos. A maioria dos vasos sanguíneos encontrava-se com congestão.

Na porção média do alvéolo, muitas vezes o tecido ósseo apresentava-se em maior quantidade, preenchendo a área central a qual na porção apical permanecia com tecido de granulação. No terço médio, notavam-se, além dos alvéolos mesial e distal já bastante definidos e facilmente distinguidos, os alvéolos correspondentes às raízes médio-vestibular e médio-lingual do primeiro molar.

Percebiam-se áreas de reabsorção caracterizadas por linhas reversas basofílicas e trabéculas ósseas apresentando superfícies irregulares, com lacunas contendo ou não células gigantes multinucleadas sugestivas de osteoclastos.

No terço cervical, evidenciava-se grande quantidade de infiltrado inflamatório composto por células polimorfonucleares e mononucleares. Também foi encontrada neoformação óssea periosteal na superfície externa da cortical óssea lingual e vestibular.

Verificou-se, ainda, extensa reabsorção óssea ao redor do alvéolo, predominando sobre a neoformação óssea no interior do mesmo. Muitas vezes ocorreu o recobrimento parcial do processo alveolar por epitélio pavimentoso estratificado. Na região, freqüentemente observou-se fratura da cortical óssea, seqüela da exodontia. Como consequência, nessas áreas, notou-se atraso do processo de reparação.

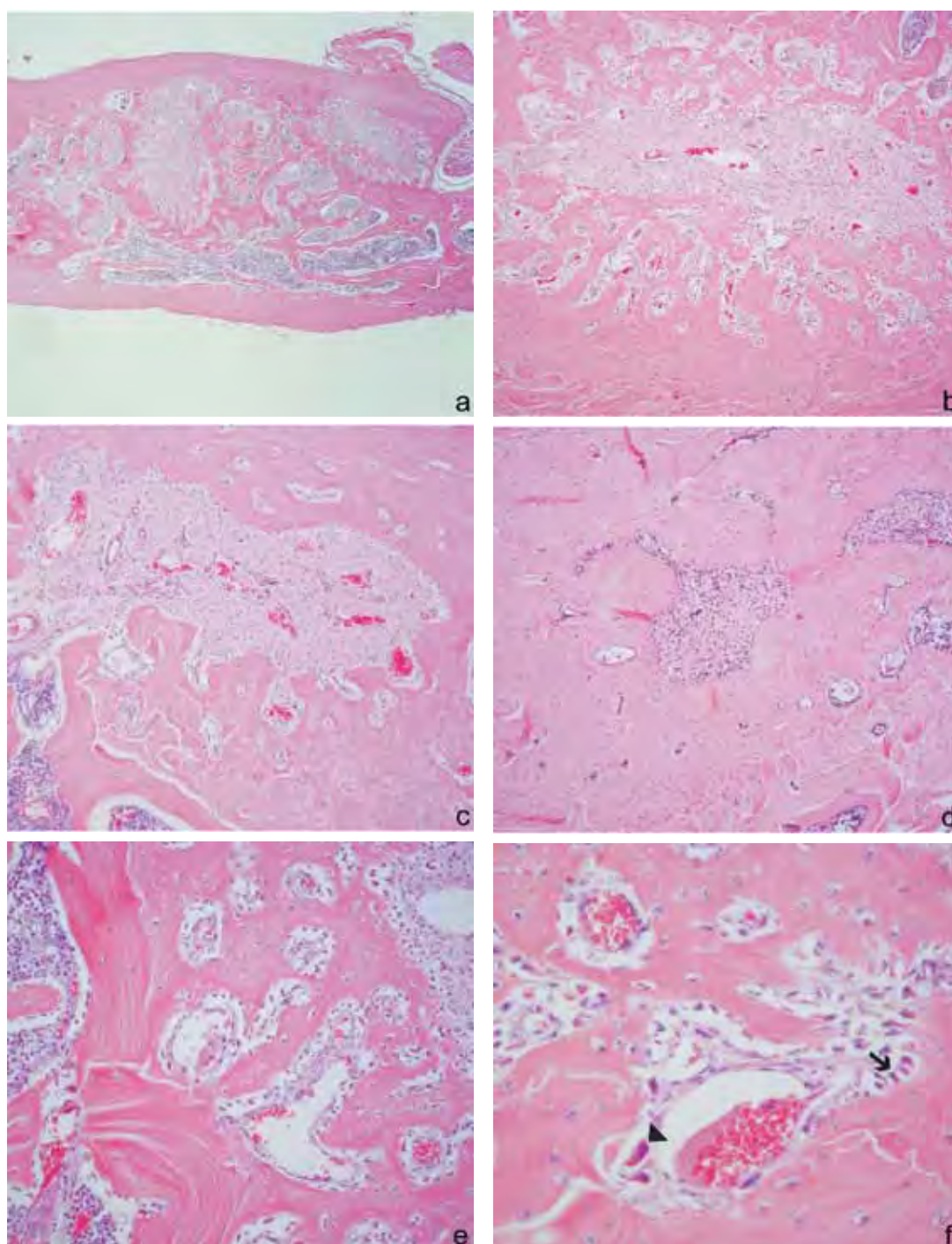


FIGURA 13 - a) vista panorâmica da região do primeiro molar inferior aos 7 dias, 25x; b) trabéculas ósseas delicadas aos 7 dias, 100x; c) reparo ósseo aos 21 dias, 100x; d) reparo ósseo aos 45 dias, 100x; e) espaços medulares preenchidos por medula hematopoiética e tecido conjuntivo fibroso no reparo, 200x; f) trabéculas ósseas ora contornadas por osteoblastos colunares (→), ora por osteoclastos (▶), 400x (a-d, grupo Sham; e-f, grupo ESP. HE).

O grupo SHAM apresentou as características descritas anteriormente, no entanto, mostrou cortical alveolar mais evidente, compacta, delimitando o alvéolo mesial diferenciando-se dos grupos OVZ e ESP.

5.4.2 Período de 21 dias

Neste período, na região apical, as trabéculas já eram mais densas, delimitando pequenos espaços preenchidos por tecido ricamente vascularizado, os osteócitos menos volumosos e os osteoclastos apareceram com maior frequência no interior do alvéolo (Figura 14c). Osteoblastos achatados ou colunares, arranjados em fileira contornando trabéculas foram observados. Tecido ósseo não mineralizado, de aspecto osteóide, ao redor das trabéculas ósseas neoformadas foi encontrado. Nos cortes corados por azul de toluidina, evidenciou-se a presença de mastócitos dispersos pelo tecido (Figura 14c).

A área central permaneceu preenchida por tecido conjuntivo fibroso, porém em menor quantidade quando comparada ao período anterior (Figura 13c).

O terço médio foi preenchido por tecido ósseo com diminutos espaços medulares e linhas reversas basofílicas. No terço cervical, nos casos sem fraturas de tábua óssea, a reepitelização estava completa, com perda de altura da crista óssea.

O grupo ESP mostrou característica distinta no terço apical, com trabéculas delgadas, delimitando amplos espaços preenchidos por medula hematopoiética, contendo muitos mastócitos, células linfóides e megacariócitos (Figura 14d).

A reabsorção óssea foi evidenciada por lacunas com ou sem osteoclastos e muitas linhas reversas basofílicas (Figura 14e). A presença de fraturas retardou o processo de reparo resultando na

persistência de infiltrado inflamatório misto, bem como na contaminação por restos alimentares e por infecções microbianas.

5.4.3 Período de 45 dias

Nesse período, na região apical, o osso apresentava-se compacto (Figura 13d), com osteócitos diminutos e superfície óssea recoberta por osteoblastos, normalmente achatados. A quantidade de tecido osteóide decaiu consideravelmente em comparação aos períodos anteriores. Os alvéolos eram mal delimitados, pois a distinção das corticais alveolares tornou-se difícil devido à intensa remodelação ocorrida no local em todos os grupos.

Nos grupos OVZ e SHAM foram vistos espaços medulares preenchidos por medula hematopoiética. Contudo, após comparação com o grupo ESP, constatou-se diferença marcante, sendo que este último apresentou maior quantidade e amplitude destes espaços (Figura 13e).

Os grupos OVZ e ESP apresentaram menor largura da mandíbula na região estudada, evidenciando maior reabsorção óssea no local, além de espaços medulares maiores, alterando a microarquitetura óssea quando comparados ao grupo SHAM. A remodelação óssea foi evidenciada pela presença de osteoclastos em determinadas áreas enquanto em outras se observavam osteoblastos colunares (Figura 13f).

Os mastócitos estavam presentes em todos os grupos, em especial, no grupo ESP.

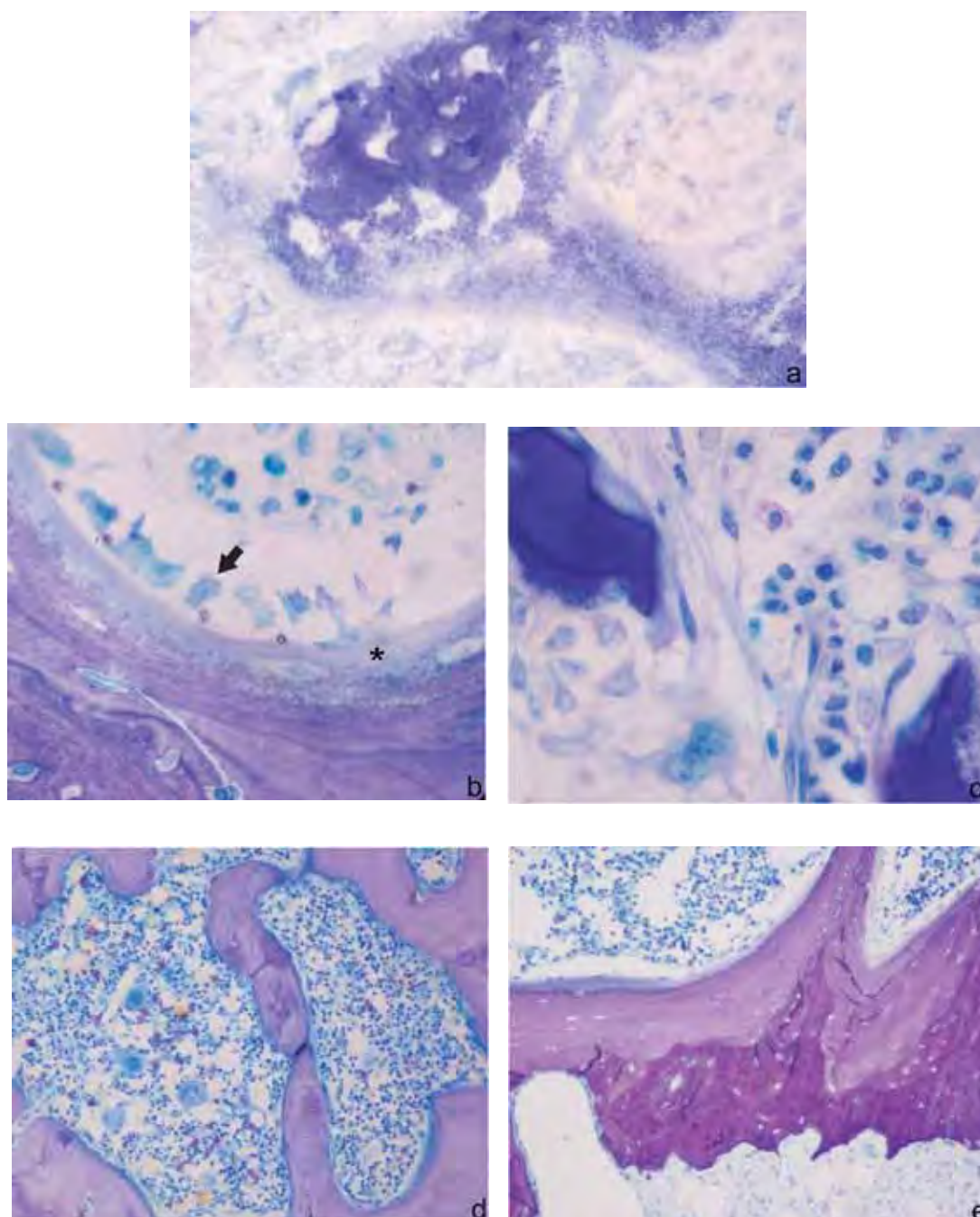


FIGURA 14 - a) tecido ósseo em mineralização, 630x; b) osteóide (*) contornado por osteoblastos colunares (➡) arranjados em fileira, 630x; c) mastócitos em meio ao tecido conjuntivo fibroso do reparo, 400x; d) espaços medulares contendo medula hematopoiética e mastócitos, 200x; e) lacunas de reabsorção por vezes contendo osteoclastos, 200x; (a-c, grupo SHAM7; d, grupo ESP45; e, grupo ESP21. Azul de Toluidina).

5.5 Análise histomorfométrica

5.5.1 Volume trabecular

Os dados originais estão apresentados no Apêndice D. A estatística descritiva desses dados encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Estatística descritiva referente às médias e desvios padrões obtidos a partir dos dados do volume trabecular expressos em porcentagem

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	23,08	39,85	52,32
	DP	6,72	8,56	8,33
OVZ	Média	28,98	41,44	51,55
	DP	4,23	4,56	6,78
ESP	Média	14,41	38,01	36,92
	DP	4,20	5,00	7,48

Observando os dados da Tabela 10, nota-se que o volume trabecular aumentou com o decorrer do tempo.

Os dados dos grupos OVZ e SHAM, quando submetidos ao teste ANOVA, mostraram como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0,000$).

Ao analisarem-se os dados dos grupos ovariectomizados, o teste ANOVA revelou como efeitos significativos o tempo de sacrifício ($p=0,000$), o tipo de ração ($p=0,000$), bem como a interação entre ambos ($p=0,015$). A Figura 15, a seguir, ilustra tais efeitos.

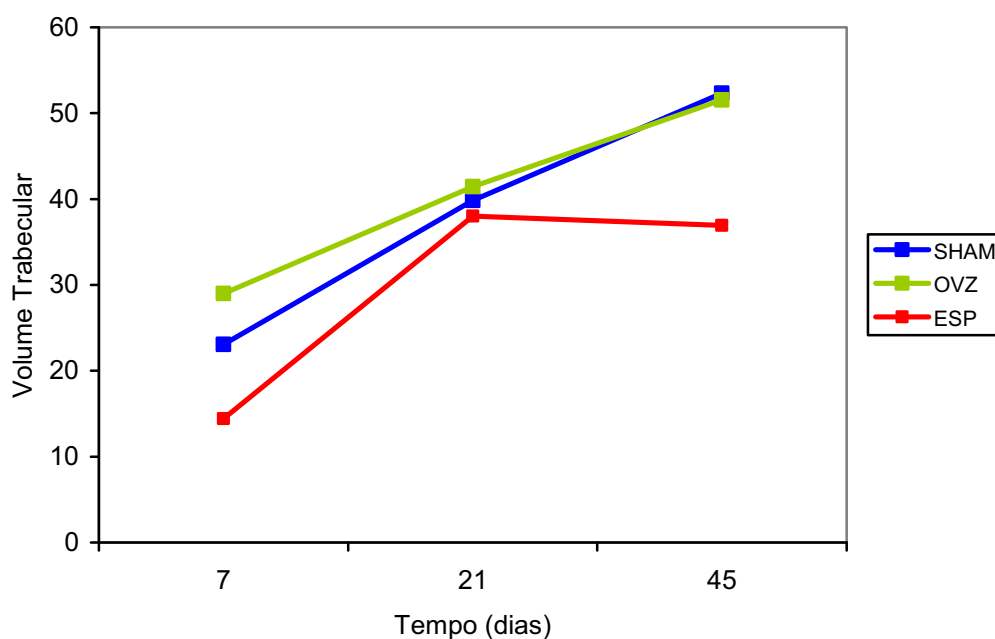


FIGURA 15 - Gráfico das médias de volume trabecular dos grupos experimentais aos sete, 21 e 45 dias.

Pode-se observar o efeito do tempo sobre a porcentagem do volume trabecular. A maioria dos grupos experimentais apresentou comportamento semelhante com aumento de osso nos períodos mais longos. Aplicando-se o teste de Tukey para as médias dos grupos OVZ e SHAM, verificou-se, quanto ao efeito tempo de sacrifício, que com o seu decorrer houve aumento do volume trabecular (Tabela 11 e Figura 15).

Tabela 11 – Teste de Tukey para volume trabecular nos três períodos de observação entre os grupos SHAM e OVZ

Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos
7	26,029	A
21	40,646	B
45	51,934	C

Quanto ao efeito da ovariectomia, após o teste de comparação múltipla de Tukey, pode-se afirmar que o grupo OVZ apresentou volume trabecular semelhante ao grupo SHAM (Tabela 12), independentemente período de observação (Tabela 13).

Tabela 12 - Formação de grupos de mesmo desempenho, após o teste de comparação múltipla de Tukey (5%) entre os grupos SHAM e OVZ

Grupos	Média	Grupos homogêneos
SHAM	38,417	A
OVZ	40,656	A

Tabela 13 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume trabecular entre os grupos SHAM e OVZ nos três períodos de observação

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
SHAM	7	23,081	A
SHAM	21	39,851	B
SHAM	45	52,319	D
OVZ	7	28,976	A
OVZ	21	41,441	BC
OVZ	45	51,550	CD

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de comparação múltipla de Tukey para os grupos ovariectomizados mostrou que o grupo OVZ apresentou média superior em relação à do grupo ESP, diferindo estatisticamente deste, exceto no período de 21 dias pós-exodontia, quanto tiveram médias semelhantes (Tabela 14).

Tabela 14 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume trabecular para os grupos ovariectomizados e tratados

Grupo	Tempo	Média	Grupos homogêneos*
OVZ	7	28,976	B
OVZ	21	41,441	C
OVZ	45	51,550	D
ESP	7	14,411	A
ESP	21	38,014	C
ESP	45	36,919	BC

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.5.2 Volume osteóide

Os dados de cada animal estão apresentados no Apêndice E. A estatística descritiva desses dados encontra-se na tabela a seguir (Tabela 15).

Tabela 15 - Estatística descritiva referente ao volume osteóide expresso em porcentagem

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	9,98	2,97	0,88
	DP	3,45	0,90	0,57
OVZ	Média	8,70	3,55	2,04
	DP	4,29	2,59	2,13
ESP	Média	8,86	2,74	1,47
	DP	2,95	1,94	0,54

Nota-se que o volume osteóide decai no decorrer do tempo. Os dados dos grupos OVZ e SHAM, quando submetidos ao teste ANOVA, mostraram como efeito significativo, o tempo de sacrifício ($p=0,000$).

O teste ANOVA, comparando os grupos ovariectomizados, também revelou como efeito significativo o tempo de sacrifício ($p=0,000$). Tais efeitos estão representados na Figura 16 a seguir.

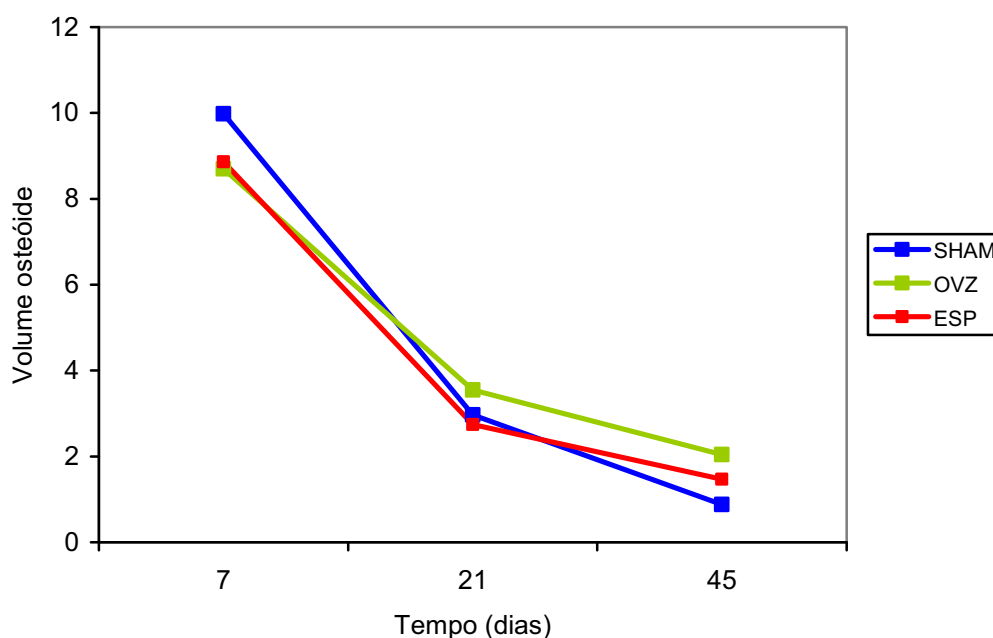


FIGURA 16 - Gráfico das médias de volume osteóide dos grupos experimentais nos períodos de observação sete, 21 e 45 dias.

Observando a Figura 16 pode-se notar que os grupos SHAM, OVZ e ESP apresentaram comportamento semelhante nos três períodos de observação. O teste de comparação múltipla de Tukey mostrou que os grupos SHAM e OVZ apresentaram diferença significativa considerando-se o fator tempo ($p=0,000$) sendo o período de sete dias, aquele com maior volume osteóide para ambos os grupos (Tabela 16).

Tabela 16 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume osteóide dos grupos SHAM e OVZ

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
SHAM	7	9,97	A
SHAM	21	2,97	B
SHAM	45	0,88	B
OVZ	7	8,69	A
OVZ	21	3,55	B
OVZ	45	2,04	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

As médias de volume osteóide dos grupos ovariectomizados ao serem submetidas ao teste de comparação múltipla de Tukey indicaram a mesma diferença entre os períodos de sete dias quando comparados aos de 21 e 45 que foram semelhantes. (Tabela 17).

Tabela 17 – Teste de Tukey para os dados referentes ao volume osteóide para os grupos ovariectomizados

Grupo	Tempo	Média	Grupos homogêneos*
OVZ	7	8,69	A
OVZ	21	3,55	B
OVZ	45	2,04	B
ESP	7	8,86	A
ESP	21	2,74	B
ESP	45	1,47	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

5.6 Número de mastócitos

Os dados de cada animal estão apresentados no Apêndice F. A estatística descritiva desses dados encontra-se na tabela a seguir (Tabela 18).

Tabela 18 - Estatística descritiva referente à média de mastócitos de cada grupo experimental

		Tempo (dias)		
		7	21	45
SHAM	Média	0,09	3,43	2,12
	DP	0,12	3,34	2,32
OVZ	Média	0,02	1,58	2,16
	DP	0,06	1,82	0,90
ESP	Média	0,00	1,50	9,44
	DP	0,00	0,88	8,40

Observando as médias dos grupos experimentais nota-se que os grupos apresentaram aumento do número de mastócitos com o decorrer do tempo. Uma exceção foi o grupo SHAM que ao 45 dias diminuiu comparado ao período de 21 dias.

O teste ANOVA para os grupos OVZ e SHAM, revelou somente o tempo de sacrifício como efeito significativo ($p=0,003$).

Comparando-se os grupos ovariectomizados entre si, o teste ANOVA revelou como efeito significativo não só o tempo de sacrifício ($p=0,000$), como também o tipo de ração ($p=0,036$), bem como a interação entre eles ($p=0,012$). Os efeitos estão representados na Figura 17 a seguir.

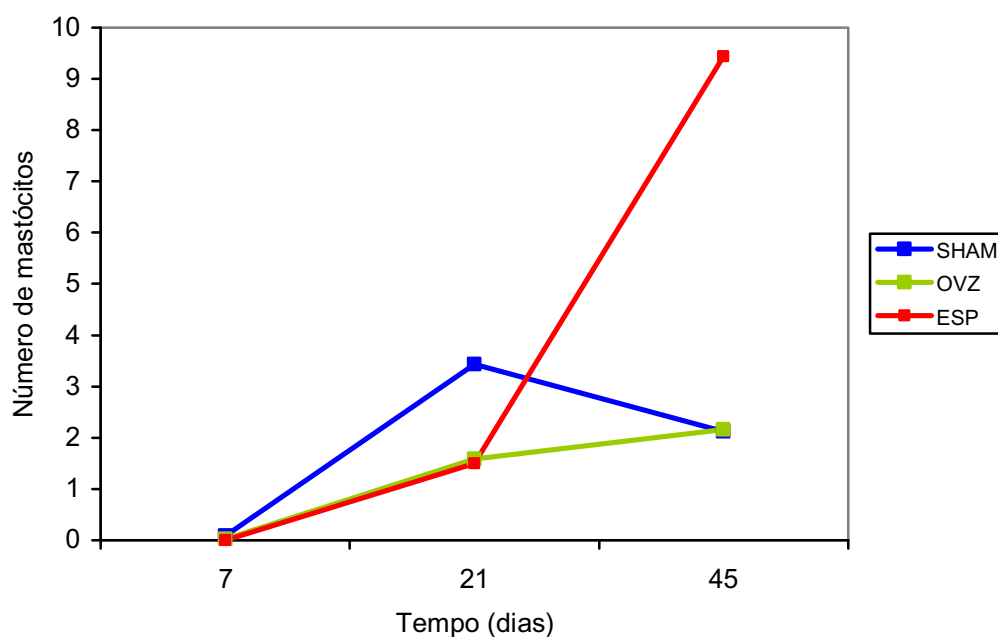


FIGURA 17 - Gráfico das médias do número de mastócitos dos grupos experimentais aos sete, 21 e aos 45 dias.

Observando a Figura 17 pode-se notar que aos 45 dias, o grupo ESP apresentou comportamento diferente dos demais devido ao aumento do número de mastócitos, enquanto os demais tiveram as médias bem menores.

O teste de comparação múltipla de Tukey entre os grupos OVZ e SHAM, demonstrou que o número de mastócitos nestes grupos no período de sete dias foi menor que nos demais períodos (Tabela 19).

Tabela 19 – Teste de Tukey para os dados referentes ao número de mastócitos para os grupos OVZ e SHAM

Tempo	Média	Grupos homogêneos*
7	0,05	A
21	2,50	B
45	2,14	B

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de Tukey para comparação dos grupos OVZ e ESP comprovou que, aos 45 dias pós-exodontia, o grupo ESP apresentou média diferente estatisticamente na comparação com os demais (Tabela 20).

Tabela 20 – Teste de Tukey para os dados referentes ao número de mastócitos dos grupos ESP e OVZ

Grupos	Tempo (dias)	Média	Grupos Homogêneos*
OVZ	7	0,02	B
OVZ	21	1,58	B
OVZ	45	2,16	B
ESP	7	0,00	B
ESP	21	1,50	B
ESP	45	9,44	A

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

6 DISCUSSÃO

Novos conhecimentos que possam orientar as condutas terapêuticas dos profissionais da saúde para o atendimento de mulheres com osteoporose pós-menopáusica, podem contribuir na melhoria da qualidade de vida destas pacientes. A partir deste raciocínio, tais conhecimentos podem ser aplicados pelos cirurgiões dentistas diante da necessidade de extrações dentárias, bem como outros procedimentos cirúrgicos em pessoas com tal doença.

A metodologia utilizada para simular os efeitos da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, que corresponde à indução experimental de osteopenia em ratas pelo procedimento de ovariectomia, constitui técnica bem consolidada na universidade na qual foi desenvolvida esta pesquisa. É considerada uma boa metodologia para o estudo das alterações osteopênicas^{1,28,56,57,70} e dos possíveis mecanismos de reparo ósseo alterados diante delas, bem como dos possíveis tratamentos para estas alterações^{1,27,56,57}.

Com o objetivo do estudo do reparo ósseo alveolar, a extração de primeiros molares inferiores de ratos foi selecionada diante da revisão da literatura^{22,46,53,54,57,64,74} na qual se notou que pesquisadores preconizaram este dente. Tal escolha foi devida a características morfológicas semelhantes aos molares humanos, mesmo diante das dificuldades de acesso, fragilidade e tamanho do molar.

O tempo aguardado para realização da cirurgia de exodontia, depois do procedimento de ovariectomia foi determinado após revisão de diversos estudos a respeito da remodelação óssea, determinando o menor período de deficiência estrogênica capaz de

desencadear osteopenia^{35,40,62,63,70}. Outros estudos a respeito de reparação de ossos longos em animais osteopênicos^{1,34,37,42,56}, e do reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas^{22,46,53,54,57,64,66,74} foram considerados na determinação deste prazo. Após a avaliação de todos esses estudos, o período de quinze dias foi escolhido, considerando-se que já havia alteração da remodelação óssea.

Os animais tiveram um período de recuperação pós-operatória adequado, podendo evitar perdas indesejáveis de animais durante a segunda anestesia e o tempo total de experimento não foi muito longo ou oneroso, comparando-se com experimentos de até um ano de duração⁶³.

A dificuldade de obtenção de alterações osteopênicas nos ossos gnáticos de roedores é muito discutida. Muitos estudos não encontraram diferenças entre os ossos maxilares e mandibulares de animais do grupo controle SHAM-operado e do grupo ovariectomizado^{39,59,65}. Provavelmente tal fato se deve aos hábitos mastigatórios peculiares desses roedores, sendo necessária a associação com outra metodologia que cause osteopenia, como, por exemplo, a administração de dieta deficiente em cálcio^{18,25,39,65}. Alguns autores já preconizam esta associação utilizando em seus trabalhos apenas o grupo ovariectomizado alimentado com dieta deficiente em cálcio para comparar com o grupo controle^{34,37}.

No presente estudo, os grupos experimentais delineados foram grupo SHAM, com três períodos de sacrifício, grupo ovariectomizado também com três períodos de sacrifício, ambos alimentados com dieta comercial padrão e grupo ovariectomizado, que a partir do dia da ovariectomia foi alimentado com ração deficiente em cálcio. A quantidade de ração de todos os grupos foi controlada, para evitar ganho de peso exagerado pelos animais ovariectomizados, fenômeno relatado na literatura⁷¹.

Tenta-se evitar o ganho de peso como seqüela da ovariectomia nos animais porque este poderia ser um mecanismo de proteção^{19,71}, que utilizaria o tecido adiposo como fonte de hormônios estrogênicos, podendo diminuir a perda óssea desejada no modelo de estudo. Constatou-se que o osso, as glândulas mamárias, a placenta e o tecido adiposo expressam a aromatase, enzima envolvida na síntese dos estrógenos⁷.

Preconizou-se a pesagem dos animais no dia da ovariectomia e no dia do sacrifício. Após os cálculos, o ganho de peso dos grupos foi comparado.

Ao comparar o peso dos animais ovariectomizados com os SHAM-operados, Pereira et al. perceberam que nos grupos com deficiência hormonal o peso dos animais era maior que dos animais controle. Este resultado também foi encontrado no presente experimento. As ratas do grupo OVZ tiveram maiores médias de peso, ao final do experimento em comparação com as do grupo SHAM. Entretanto, a formação de grupos homogêneos no teste Tukey mostrou que entre os mesmos períodos de observação, a deficiência hormonal não alterou o ganho de peso entre os grupos SHAM e OVZ.

O controle da quantidade de ração administrada pode ser observado em alguns trabalhos com, por exemplo, o *pair feeding*, administrando-se na semana seguinte, a determinado grupo de animais, a média consumida pelo grupo controle, na semana anterior^{9,19,71}. Outra maneira de controle foi encontrada no trabalho de Kawamoto e Nagaoka²⁹ e seguida no presente estudo, pesando-se a mesma dose diária de alimentação, para cada animal na quantidade de 20 gramas.

A hiperfagia citada por Harrison et al.¹⁹ como induzida pela ovariectomia não foi confirmada pelo trabalho de Omi e Ezawa⁴⁴. A quantidade de ração ingerida foi idêntica nas ratas SHAM e OVZ, mas o ganho de peso, maior nas OVZ. Deve-se pesquisar de que maneira a deficiência estrogênica aumenta o armazenamento dos nutrientes

ingeridos, sem aumentar a quantidade de ingestão. Segundo Deyhin et al.⁹, o ganho de peso pode ser relacionado ao decréscimo do metabolismo nos animais com deficiência hormonal.

A média de peso do grupo de ratos que receberam ração deficiente em cálcio (0,03%) do estudo de Furuta et al.¹⁵ foi menor que do grupo com ração padrão. Este efeito foi explicado pelos autores considerando-se o fato da hipocalcemia induzida, ter inibido o crescimento destes animais. Já os animais ovariectomizados do estudo de Kubo et al.³⁴ que também receberam ração deficiente em cálcio tiveram médias de peso corporal idênticas às ratas submetidas à cirurgia simulada (SHAM), alimentadas com ração padrão. No presente estudo, o ganho de peso do grupo ESP foi significativamente maior que do grupo OVZ. Comparando-se tais resultados com os de Furuta et al.¹⁵ as variações encontradas podem ser devidas ao fator ovariectomia, que não foi realizada em seu estudo.

O ganho de peso nas ratas ovariectomizadas que receberam ração especial, deste trabalho, foi bem maior que nas ratas SHAM-operadas, comparando-se com os resultados do estudo de Kubo et al.³⁴. Mas suas ratas já podem ser consideradas maduras (oito meses de idade), encontrando-se fora do período de crescimento. Este aspecto não foi observado no presente estudo, nem no estudo de Omi e Ezawa⁴⁴. Suas ratas de um mês e meio de idade ovariectomizadas e alimentadas com ração deficiente em cálcio tiveram maior ganho de peso corporal que aquelas SHAM-operadas, também alimentadas com ração pobre em cálcio. Entretanto, o mecanismo de ganho de peso pós-ovariectomia incrementado pela associação com uma dieta pobre em cálcio ainda não foi esclarecido.

A análise radiográfica do presente estudo não foi sensível suficiente para detectar as diferenças entre os grupos SHAM, OVZ e ESP, posteriormente percebidas na análise histomorfométrica. Sugere-se que a análise radiográfica não seja adequada para detectar pequenas

alterações na densidade do tecido ósseo neoformado. Mas as grandes modificações com relação ao aumento progressivo do tecido ósseo com o decorrer do tempo foram plenamente evidenciadas pelos resultados estatísticos, percebendo-se o aumento da densidade óptica com o decorrer do tempo de reparo. Em mulheres, no estudo de Konstantino et al.³² as radiografias panorâmicas utilizadas nas avaliações odontológicas mostraram perda óssea relacionada à deficiência hormonal e segundo os autores, devem ser utilizadas como instrumento de diagnóstico precoce da osteoporose. As médias da densidade óptica do presente trabalho até sugerem uma menor quantidade óssea no grupo ESP, na seqüência confirmada pela análise histomorfométrica.

O volume trabecular de osso neoformado no interior dos alvéolos, segundo o presente estudo não foi afetado pela deficiência hormonal estrogênica. A análise do volume trabecular foi realizada por dois tipos de processamento do tecido ósseo: com e sem desmineralização, incluindo-se os espécimes em parafina e em resina respectivamente. Consequentemente, o número de espécimes analisados foi o dobro do descrito no capítulo de material e métodos. Como os resultados foram idênticos optou-se por descrever somente aqueles encontrados nos cortes desmineralizados, mas tal informação pode fortalecer a credibilidade dos resultados.

O mesmo ocorreu na comparação dos resultados quanto à diminuição do volume trabecular no grupo ovariectomizado que recebeu ração deficiente em cálcio. Ambas as metodologias aplicadas (inclusão em resina e inclusão em parafina) revelaram a formação de grupos homogêneos idênticos com aplicação do Teste de Tukey. Verificou-se que o volume trabecular dos grupos ESP foram significativamente menores que dos OVZ, excetuando-se no período de 21 dias, sem significância estatística.

Dos trabalhos encontrados na literatura relacionando a deficiência hormonal e alterações no reparo ósseo, Silveira⁵⁷, Shimizu et

al.⁵⁴, Pereira et al.⁴⁶ e Tanaka et al.⁶⁴ avaliaram o volume trabecular ósseo neoformado do interior do alvéolo. Os resultados encontrados por Silveira⁵⁷ foram os mesmos observados no presente estudo. O autor percebeu que o volume trabecular no interior do alvéolo não diferia nos animais com deficiência hormonal quando comparado com o volume trabecular dos animais controle, analisando a área apical do alvéolo. Sua análise diferiu com relação à metodologia, quando avaliou aproximadamente dez campos microscópicos fotografados em 400 X. Lembrando que o presente trabalho analisou 5 campos fotografados em 200 X. Tanaka et al.⁶⁴ também não encontraram diferenças entre o tecido ósseo neoformado no interior do alvéolo comparando-se os grupos SHAM e OVZ.

Shimizu et al.⁵⁴ 1998 perceberam menor quantidade óssea nos animais ovariectomizados nos períodos mais tardios de reparo alveolar. A contradição percebida pode ser devida ao tempo aguardado posteriormente à ovariectomia para realização da exodontia. Shimizu et al.⁵⁴ aguardaram sessenta dias de deficiência hormonal para extraírem os molares enquanto Silveira⁵⁷ aguardou 15 dias e Tanaka et al.⁶⁴ realizaram exodontia decorridos apenas sete dias da ovariectomia. O estudo de Pereira et al.⁴⁶ mostrou que, depois de aguardados 21 dias da cirurgia de ovariectomia para a extração dos molares mandibulares, no alvéolo dos animais OVZ ocorre menor quantidade óssea que no dos animais do grupo controle.

Contrariando os resultados do presente trabalho, Zecchin et al.⁷³ consideraram que a deficiência estrogênica poderia predispor a um reparo prejudicado. Em seu estudo, as enzimas de digestão da matriz colágena do tecido de granulação para deposição da matriz óssea foram apontadas como importantes na determinação da formação óssea. A deficiência hormonal não só alterou a atividade enzimática e expressão das metaloproteinases 2 e 9, mas também diminuiu a formação de colágeno I e III.

A comparação do volume trabecular dos grupos ovariectomizados deste estudo revelou que a hipocalcemia decorrente da ingestão de dieta pobre em cálcio diminuiu o volume de tecido ósseo neoformado na reparação óssea. Tal fato constitui uma importante informação para as pesquisas futuras que visam estudar as possíveis terapias para a busca do melhor reparo ósseo em pacientes com osteoporose. Acreditando-se que a osteoporose em humanos pode prejudicar o reparo, uma metodologia ideal em estudos em animais, para testes de medicamentos é a associação da dieta pobre em cálcio à ovariectomia. Teófilo et al.⁶⁵ em 2003 já preconizaram a associação desta metodologia para o estudo da remodelação de ossos gnáticos. Em seu estudo sobre reparação óssea, Teófilo et al.⁶⁶ de 2004, já utilizaram esta associação e compararam ratas SHAM alimentadas com ração padrão com ratas ovariectomizadas recebendo ração especial. Desta comparação perceberam menor quantidade óssea nos animais ovariectomizados.

Com relação ao reparo ósseo, principalmente ao osso neoformado, o estudo de Kubo et al.³⁴ apresentou resultados ligeiramente diferentes dos encontrados no presente estudo, uma vez que perceberam que a deficiência estrogênica associada à baixa ingestão de cálcio altera as características do reparo ósseo somente mais tardiamente, na fase de remodelação óssea e não nos períodos iniciais como visto nas diferenças dos grupos OVZ7 e ESP7. Contudo, há que se considerar que neste estudo foram analisadas mandíbulas, enquanto que no de Kubo et al.³⁴ foram ossos longos de ratas.

O volume osteóide mensurado no presente trabalho não foi afetado nem pela deficiência estrogênica nem pela deficiência em cálcio. Hara et al.¹⁸ avaliaram, entre outros parâmetros, a superfície osteóide de ratas ovariectomizadas, comparadas com ratas OVZ alimentadas com dieta deficiente em cálcio, encontrando um aumento nesta taxa. O mesmo ocorreu com os grupos SHAM, um com ração

padrão e outro com dieta pobre em cálcio. A dieta afetou a superfície osteóide. Este resultado não foi discutido pelos autores, mas pode ser devido ao fato de que quanto menor a quantidade de cálcio menos matriz é mineralizada, causando um aumento da superfície osteóide.

Com relação à contagem dos mastócitos, a ovariectomia não alterou o número de mastócitos dos grupos OVZ quando comparados aos grupos SHAM. Entretanto, o fator tempo de sacrifício foi significativo, visto que decorridos 45 dias da exodontia, os espécimes apresentam maior presença destas células. Embora ainda em estudo, a função dos mastócitos na reabsorção óssea vem sendo confirmada.

A administração de antagonistas dos receptores H1 e H2 da histamina para ratos submetidos a experimento de indução de reabsorção óssea, temporal e localmente determinada, diminuiu os parâmetros de superfície em reabsorção. Reduziu também o número de osteoclastos ativos e mastócitos e provocou alterações vasculares¹⁰. Os antagonistas utilizados no experimento, que foi feito em cultura de células e *in vivo*, foram a mepiramina (H1) e a cimetidina (H2).

Os eventos acima, guardadas devidas proporções, foram também observados no estudo sobre reparo ósseo de Banovac et al.³. Os mastócitos pareceram estar envolvidos na reabsorção do calo ósseo nos estágios mais avançados da reparação. Contudo, estes autores acreditam que as próprias enzimas dos mastócitos podem ajudar na degradação do osso, como por exemplo, a enzima quimase que digeriu, quase por completo, a matriz protéica não colágena extraída do osso dos animais.

Estas informações podem ser importantes para esclarecer a função dos mastócitos observados, no presente trabalho em todos os grupos, nos períodos de 21 e 45 dias. A histamina, mediador inflamatório ativo nos fenômenos vasculares e exsudativos da inflamação, e outras enzimas dos mastócitos, têm papel fundamental na reabsorção óssea, embora os mecanismos ainda não tenham sido completamente elucidados. Tanto é verdade, que o grupo que mais apresentou

mastócitos foi o que apresentou menor volume trabecular deste experimento, o ESP 45, sendo de significância estatística sua diferença com o grupo OVZ45. A ação dos mastócitos não parece se limitar à ativação de osteoclastos diretamente, uma vez que não foram evidenciados efeitos da histamina em osteoclastos em cultura de células isoladas¹⁷.

A presença do estrógeno no grupo SHAM e sua ausência no grupo OVZ, portanto, não afetaram o número de mastócitos, bem como não afetaram o volume trabecular. Já o fator sistêmico de diminuição de cálcio sérico decorrente da dieta deficiente deste mineral, provavelmente favoreceu o recrutamento de muitos mastócitos. Estes, liberando histamina, ajudaram na sinalização para os osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea e diminuindo o volume trabecular no grupo ESP, na fase de remodelação do reparo ósseo.

Diante de todos os fatos expostos, o reparo ósseo alveolar nas condições experimentais não foi influenciado pela deficiência hormonal, mas pelo fator tempo de sacrifício, apresentando densidade óptica, quantidade óssea (volume trabecular) e número de mastócitos crescentes e volume osteóide decrescente com o decorrer do tempo. Sendo assim, pode-se supor que o reparo ósseo alveolar, diante das condições experimentais, não é prejudicado pela deficiência estrogênica. Este resultado não foi encontrado por outros pesquisadores que perceberam alterações no reparo ósseo pós-exodontia de ratos com deficiência estrogênica^{46,54,64,74}.

As diferenças encontradas na comparação dos grupos ovariectomizados com dietas diferentes permitem a afirmação de que o reparo ósseo alveolar é alterado pela deficiência em cálcio. Tal informação, somada a outros relatos da literatura, pode ser promissora para o delineamento de pesquisas futuras que busquem terapias que possam ser aplicadas pelos cirurgiões dentistas diante da necessidade de extrações dentárias em paciente com osteoporose.

Na comparação dos dados de taxa de aposição mineral deste estudo, deve-se considerar que o osso avaliado foi aquele ao redor do alvéolo, que se encontrava em intensa remodelação óssea pós-trauma cirúrgico exodôntico, e não o osso propriamente neoformado do interior do alvéolo. Kawamoto e Nagaoka²⁹ verificaram em seu estudo que o estresse mecânico anormal na região do osso alveolar causou maior reabsorção nos grupos com deficiência estrogênica, quando comparado ao grupo controle. No presente estudo, os valores de aposição mineral diária foram semelhantes, tanto na comparação dos grupos SHAM e OVZ quanto dos grupos OVZ e ESP. O fator tempo decorrido da exodontia foi preponderante na diminuição de tal taxa. Contudo, observando-se o gráfico das médias dos grupos da ração especial, nota-se uma tendência destas apresentarem-se menores que os grupos ovariectomizados. Inclusive, p foi igual a 0,065 para o fator dieta. Talvez com um aumento no n do trabalho, tal diferença pudesse ser significativa estatisticamente. Hsieh et al.²² mensuraram a taxa de aposição mineral ao redor dos alvéolos de molares extraídos simultaneamente com a cirurgia de ovariectomia e perceberam o mesmo resultado do presente trabalho, que no período mais precoce, a taxa era maior.

Murray et al.⁴¹ perceberam que as taxas de aposição mineral em fêmures de camundongos, estavam diminuídas em animais que ingeriram dieta deficiente em cálcio (0,02%) quando comparadas com as dos que ingeriram dieta padrão. Eklou-Kalonji et al.¹³, que também alimentaram os animais de seu estudo – porcos – com dieta deficiente em cálcio (0,38 ou 0,11%), ao avaliarem os padrões ósseos observaram índices de formação e mineralização diminuídos, bem como fatores sanguíneos relacionados à atividade osteoclástica elevados, devido ao hiperparatireoidismo, com produção de PTH, seguido do aumento do calcitriol. A atividade osteoblástica estava elevada, contudo a taxa de aposição mineral foi diminuída, permitindo o aumento da taxa de volume osteóide, ou seja, a matriz não mineralizada, aguardando a deposição de

hidroxiapatita. Diante disso, a diminuição da formação óssea ocorre pela falta de mineralização, sem, contudo, alterar a formação de matriz pelos osteoblastos, uma vez que estão sendo estimulados à produção de osso pelo PTH e calcitriol¹³. Tal efeito não foi encontrado nesta pesquisa, uma vez que o volume osteóide não foi diferente entre os animais com dieta padrão e dieta deficiente em cálcio.

Diante de todos estes dados, a metodologia para estudo dos efeitos da osteoporose em ossos gnáticos deve utilizar a associação dos procedimentos cirúrgicos de excisão bilateral dos ovários e a administração de dieta pobre em cálcio, com o objetivo de obter uma condição de osteopenia similar à que ocorre em mulheres diante do quadro sistêmico de deficiência estrogênica, na menopausa.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir quanto à reparação alveolar que:

- a) a ovariectomia não retardou o reparo ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas;
- b) a deficiência hormonal associada à dieta deficiente em cálcio resulta em uma menor formação óssea no alvéolo em processo de reparo ósseo;
- c) um possível mecanismo de reabsorção óssea é ativado diante da hipocalcemia e deficiência estrogênica recrutando mastócitos;
- d) os mastócitos podem estar associados à reabsorção óssea.

Concluiu-se ainda, que taxa de deposição mineral diária não é influenciada pela deficiência hormonal, mas pareceu sofrer alguma influência quando se associou a dieta pobre em cálcio, mostrando uma tendência à diminuição.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 Amadei SU. Efeito comparativo de dois fitoterápicos na reparação óssea em tíbias de ratos com osteoporose [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 2 Arjmandi BH, Khalil DA, Hollis BW. Soy protein: its effects on intestinal calcium transport, serum vitamin D, and insulin-like growth factor-I in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 2002 June; 70(6): 483-7.
- 3 Banovac K, Renfree K, Makowski AL, Latta LL, Altman RD. Fracture healing and mast cells. *J Orthop Trauma.* 1995; 9(6): 482-90.
- 4 Borelli A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica.* São Paulo: Atheneu; 1998. p. 297-308.
- 5 Brumsen C, Papapoulos SE, Lentjes EG, Kluin PM, Hamdy NA. A potential role for the mast cell in the pathogenesis of idiopathic osteoporosis in men. *Bone.* 2002 Nov.; 31(5): 556-61.

*Baseado em:

Internacional Comité of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referentes [homepage na Internet]. Bethesda: US Nacional Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em:

http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 6 Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 2001 Jan.; 81(1): 419-47.
- 7 Conley A, Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 2001 May; 121(5):685-95.
- 8 Devlin H, Hoyland J, Newall JF, Ayad S. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. *Bone Miner Res.* 1997 Dec.; 12(12): 2061-7.
- 9 Deyhim F.; Stoecker BJ; Brusewitz GH; Arjmandi BH. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutrit Res.* 2003 Jan.; 23(1): 123-30.
- 10 Dobigny C, Saffar JL. H1 and H2 histamine receptors modulate osteoclastic resorption by different pathways: evidence obtained by using receptor antagonists in a rat synchronized resorption model. *J Cell Physiol.* 1997 Oct.; 173(1): 10-8.
- 11 Douglas CR, Douglas NA. Fisiologia do osso. In: DOUGLAS, C. R. *Tratado de fisiologia aplicada à saúde.* São Paulo: Robe editorial; 2002. p. 1447-62.
- 12 Ejiri S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Kohno S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Archives of Oral Biology.* 2006 Nov.; 51(11): 941-50.
- 13 Eklou-Kalonji E, Zerath E, Colin C, Lacroix C, Holy X, Denis I, et al. Calcium-regulating hormones, bone mineral content, breaking load and trabecular remodeling are altered in growing pigs fed calcium-deficient diets. *J Nutr.* 1999 Jan.; 129(1):188-93.

- 14 Finkelman RD, Bell NH, Strong DD, Demers LM, Baylink DJ. Ovariectomy selectively reduces the concentration of transforming growth factor β in rat bone: Implications for estrogen deficiency-associated bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Dec.; 89(24): 12190-3.
- 15 Furuta T, Shimizu Y, Takahashi I, Mitani H. Formation and mineralization of murine molar roots with hypocalcaemia induced by a low-calcium diet and the changes after returning to a normal diet. *Arch Oral Biol*. 1999 Aug.; 44(8):629-39.
- 16 Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Dec.; 1092:385-96.
- 17 Hall TJ, Schaubelin M. Promethazine inhibits osteoclastic bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1994 July; 55(1):68-70.
- 18 Hara T, Sato T, Oka M, Mori S, Shirai H. Effects of ovariectomy and/or dietary calcium deficiency on bone dynamics in the rat hard palate, mandible and proximal tibia. *Arch Oral Biol*. 2001 May; 46(5): 443-51.
- 19 Harrison E, Adjei A, Ameho C, Yamamoto S, Kono S. The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1998 Apr.; 44(2): 257-68.
- 20 Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with especial emphasis on fracture healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1996 Dec.; 82(6): 594-606.

- 21 Horowitz MC. Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*. 1993 Apr.; 260(5108): 626-7.
- 22 Hsieh YD, Devlin H, Mc Cord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol*. 1995 June; 40(6): 529-31.
- 23 Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med*. 1996 Oct.; 2(10): 1132-6.
- 24 Ishihara A, Sasaki T, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Ramamurthy NS, et al. Effects of ovariectomy on bone morphology in maxillae of mature rats. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1999; 48(4): 465-9.
- 25 Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab*. 2003; 21(6): 388-95.
- 26 Johansen JR. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand*. 1970 Aug.; 28(4): 441-61.
- 27 Junqueira JC, Mancini MN, Carvalho YR, Anbinder AL, Balducci I, Rocha RF. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. *J Oral Sci*. 2002 Dec.; 44(4): 117-24.
- 28 Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 1991 Dec.; 15(3): 175-91.

- 29 Kawamoto S, Nagaoka E. The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *J Oral Rehabil.* 2000 July; 27(7): 587-94.
- 30 Kawane T, Takahashi S, Saitoh H, Okamoto H, Kubodera N, Horiuchi N. Anabolic effects of recombinant human parathyroid hormone (1 - 84) and synthetic human parathyroid hormone (1 - 34) on the mandibles of osteopenic ovariectomized rats with maxillary molar extraction. *Horm Metab Res.* 2002 June; 34(6): 293-302.
- 31 Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A. Effect of low masticatory function on condylar growth: a morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1999 Aug.;116(2): 121-5.
- 32 Konstatino VZ, Skouteris CA, Velegrakis GA, Fragouli I, Neratzoulakis JM, Damilakis J, et al. Mandibular radiomorphometric measurements as indicators of possible osteoporosis in postmenopausal women. *Maturitas.* 2007 Nov.; 58(3):226-35.
- 33 Kowalski SC, Sjenzfeld VL, Ferraz MB. Utilização de recursos e custos em osteoporose. *Rev Ass Med Brasil.* 2001 Oct.; 47(4): 352-7.
- 34 Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999 Mar.; 68(6): 197-202.

- 35 Lane NE, Thompson JM, Haupt D, Kimmel DB, Modin G, Kinney JH. Acute changes in trabecular bone connectivity and osteoclast activity in the ovariectomized rat in vivo. *J Bone Miner Res.* 1998 Feb.; 13(2): 229-36.
- 36 Lerner UH. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 July; 85(7): 584-95.
- 37 Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res.* 2003 Sept.; 21(5): 836-42.
- 38 Moreira C. Osteoporose. In: Rocha MOC, Pedroso ERP, Fonseca JGM, Silva AO. *Terapêutica Clínica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.p. 588-604.
- 39 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.
- 40 Most W, van der Wee-Pals L, Ederveen A, Papapoulos S, Lowik C. Ovariectomy and orchidectomy induce a transient increase in the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in the mouse. *Bone.* 1997 Jan.; 20(1): 27-30.
- 41 Murray EJ, Murray SS, Grisanti M, Duarte ME, Urist MR. Effect of low dietary calcium on bone metabolism in the SENCAR mouse. *J Orthop Res.* 1997 July; 15(4):585-92.

- 42 Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao Lin J, Maastricht S, Swain M et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001 Jan.; 28(1): 80-6.
- 43 Okazaki K, Jingushi S, Ikenoue T, Urabe K, Sakai H, Iwamoto Y. Expression of parathyroid hormone-related peptide and insulin-like growth factor I during rat fracture healing. *J Orthop Res*. 2003 May; 21(3): 511-20.
- 44 Omi N, Ezawa I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. *Bone*. 1995 Oct.; 17(4): 163-8.
- 45 Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 1987 Dec.; 2(6): 595-610.
- 46 Pereira MC, Zecchin KG, Campagnoli EB, Jorge J. Ovariectomy delays alveolar wound healing after molar extractions in rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Nov.; 65(11):2248-53.
- 47 Quinn R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005 June; 21(6): 775–7.
- 48 Raisz LG. Physiology and Pathophysiology of Bone Remodeling. *Clinical Chemistry*. 1999 Aug.; 45(8):1353–8.
- 49 Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006; 8: 455- 98.

- 50 Rosenber AE. Bone, joints and soft tissue tumors. In: Kumar,V, Abbas AK, Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of disease. Philadelphia: Elsevier Saundes; 2005. p.1273-325.
- 51 Schwarting R, Kocher WD, McKenzie S, Alomari M. Hematopatologia. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D. Rubin Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006.p.1039-46.
- 52 Seino Y. Cytokines and growth factors which regulate bone cell function. Acta Astronaut. 1994 July; 33: 131-6.
- 53 Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. Anat Rec. 2000 May; 259(1): 76-85.
- 54 Shimizu M, Sasaki T, Ishihara A, Furuya R, Kawawa T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. J Electron Microsc (Tokyo). 1998; 47(5): 517-26.
- 55 Shirai H, Sato T, Oka M, Hara T, Mori S. Effect of calcium supplementation on bone dynamics of the maxilla, mandible and proximal tibia in experimental osteoporosis. J Oral Rehabil. 2002 Mar.; 29(3): 287-94.

- 56 Silveira VAS. Efeito das isoflavonas, da terapia de reposição hormonal estrogênica e da associação de ambos na reparação óssea de ratas ovariectomizadas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2004.
- 57 Silveira VAS. Efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com o estrógeno e as isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparação óssea alveolar e no útero de ratas [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.
- 58 Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. *Bone*. 1996 Nov.; 19(5): 455-61.
- 59 Spalding M. Efeitos da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da doença periodontal induzida em ratas. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2005.
- 60 Srivastava S, Toraldo G, Weitzmann MN, Cenci S, Ross FP, Pacifici R. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J Biol Chem*. 2001 Mar.; 276(12): 8836-40.

- 61 Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004 Feb.; 15(1): 49-60.
- 62 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.
- 63 Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003 Apr.; 95(4): 495-502.
- 64 Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec.* 2001 Feb.; 262(2): 203-12.
- 65 Teófilo JM, Azevedo AC, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano-Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Pesqui Odontol Bras.* 2003 Oct.; 17(4): 302-6.
- 66 Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol.* 2004 Sept.; 49(9): 755-62.

- 67 Trowbridge HO, Emling RC. Reparo: regeneração e cicatrização. In: Inflamação: uma revisão do processo. São Paulo: Quintessence. 1996. p. 137-52.
- 68 Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev.* 1994 June; 15(3): 275-300.
- 69 Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clin Orthop Relat Res.* 1997 Sept.; 342:218-27.
- 70 Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988 Sept.; 43(3): 179-83.
- 71 Wronski TJ, Schenck PA, Cintrón M, Walsh CC. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1987 Mar.; 40(3):155-9.
- 72 Yamamoto S. The effects of food consistency on maxillary growth in rats. *Eur J Orthod.* 1996 Dec.; 18(6): 601-15
- 73 Zaffe D, Paganelli C, Cocchi D. Induction and pharmacological treatment of oral osteopenia in rats. *Minerva Stomatol.* 1999 Mar.; 48(3): 45-62.
- 74 Zecchin KG, Pereira MC, Coletta RD, Graner E, Jorge J. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcified Tissue Int.* 2005; 76:136-45.

APÊNDICE A – Dados originais de ganho de peso

Tabela 21 – Valores originais de ganho de peso, de cada rata, de cada grupo experimental, em porcentagem obtida pela fórmula (peso final-peso inicial)/peso inicial X100

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
65	5	50	15	0	90	20	70	70
15	15	30	40	55	115	60	45	110
75	20	50	35	80	45	35	60	115
0	30	25	35	60	20	20	75	95
-25	0	25	50	50	60	25	30	75
5	45	100	30	15	75	30	55	45
-10	25	45	25	60	85	35	60	90
-15	10	85	60	25	95	30	80	75

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

APÊNDICE B – Dados originais da densidade óptica

Tabela 22 – Valores originais da densidade óptica em tons de cinza (escala *Image J*: 0-negro total; 256-branco total), de cada rata, de cada grupo experimental, na região do alvéolo mesial

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
63,95	83,32	87,23	79,14	80,06	114,81	89,74	99,96	114,44
66,05	90,97	94,65	79,03	93,26	80,20	68,76	83,69	101,94
71,16	84,02	82,56	51,74	71,53	92,97	77,26	79,31	81,30
78,72	94,41	103,50	72,79	112,52	91,52	73,82	69,38	88,59
76,41	81,49	98,66	72,18	83,81	101,51	63,94	76,93	87,22
100,01	79,39	97,63	81,04	92,39	91,67	58,42	70,90	94,42

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

APÊNDICE C – Dados originais da taxa de aposição mineral

Tabela 23 – Médias originais da taxa de aposição mineral em $\mu\text{m}/\text{dia}$ no tecido ósseo ao redor do alvéolo de cada rata, de cada grupo experimental

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
3,54	1,23	0,53	5,19	1,61	0,66	4,00	0,76	0,43
2,44	1,26	0,66	2,39	1,10	0,47	3,69	0,56	0,52
3,26	1,06	0,83	4,12	1,59	0,49	2,48	0,99	0,60
4,16	1,76	0,60	2,34	1,16	0,71	2,72	0,77	0,65
3,42	1,38	0,68	4,02	1,25	0,47	3,03	0,73	0,58
3,36	1,64	0,85	3,51	1,75	0,61	3,31	0,65	0,52
3,61	1,43	0,59	2,11	1,43	0,64	2,88	0,63	0,54

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

APÊNDICE D – Dados originais do volume trabecular

Tabela 24 – Médias originais do volume trabecular, de cada rata, de cada grupo experimental, expressas em porcentagem na reparação óssea alveolar

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
25,36	38,03	38,00	30,71	39,39	56,93	12,86	37,39	32,67
23,01	36,24	58,74	32,03	38,80	60,29	14,86	35,71	25,00
31,24	46,67	56,53	28,00	46,43	40,96	15,30	44,76	39,76
20,00	27,14	56,73	20,71	44,29	52,14	21,43	41,43	45,00
26,96	52,14	44,81	28,57	45,71	44,29	14,76	28,81	41,19
10,00	33,74	60,89	28,77	41,90	52,67	7,14	39,43	30,94
25,00	45,00	50,53	34,04	33,57	53,57	14,53	38,57	43,87

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

APÊNDICE E – Dados originais do volume osteóide

Tabela 25 – Médias originais de volume osteóide expresso em porcentagem, de cada rata, de cada grupo experimental, na reparação óssea alveolar

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
8,29	2,57	0,57	14,51	8,86	1,43	8,33	4,29	1,43
5,00	3,43	0,86	12,61	1,43	0,57	13,43	5,51	2,67
10,00	3,93	1,43	2,86	4,00	0,71	6,57	2,14	1,26
14,29	2,86	1,43	11,43	2,00	2,86	12,24	4,29	1,23
13,93	4,00	0,00	6,86	4,29	2,00	5,47	1,43	1,14
11,19	1,43	1,43	4,76	1,71	0,29	7,14	1,19	1,14
7,14	2,57	0,47	7,86	2,57	6,43	8,86	0,36	1,43

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

APÊNDICE F – Dados originais referentes ao número de mastócitos

Tabela 26 – Médias originais do número de mastócitos, de cada rata, de cada grupo experimental

SHAM	SHAM	SHAM	OVZ	OVZ	OVZ	ESP	ESP	ESP
7	21	45	7	21	45	7	21	45
0,33	4,00	6,00	0,16	0,66	3,00	0	0,00	2,86
0,00	9,50	1,40	0,00	1,40	1,80	0	1,86	10,62
0,00	6,00	4,80	0,00	4,80	2,50	0	1,50	9,88
0,16	1,33	0,00	0,00	0,20	3,20	0	2,00	10,71
0,00	1,20	1,00	0,00	0,00	2,60	0	1,60	26,40
0,16	0,00	0,33	0,00	0,60	0,83	0	0,80	2,00
0,00	2,00	1,33	0,00	3,40	1,20	0	2,75	3,60

SHAM – cirurgia simulada, OVZ – ovariectomizadas, ESP – ração especial

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 027/2005-PA/CEP, sobre “Efeito da deficiência estrogênica na remodelação e na reparação óssea alveolar, na glândula salivar e no epitélio oral: Estudo histomorfométrico e imunoistoquímico em ratas ovariectomizadas”, sob a responsabilidade de **YASMIN RODARTE CARVALHO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 04 de outubro de 2005.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Prado, RF. *Effects of osteopenia on alveolar bone repair of rats* [doctorate thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2008.

ABSTRACT

This study had the objective of analyze the initials effects of estrogen deficiency associated or not with a low calcium dietary in the alveolar bone repair. 72 rats at three months were used; 48 ovariectomized and 24 Sham-operated (SHAM). The ovariectomized rats were divided into 2 groups, 24 rats receiving common diet (OVZ) and 24 receiving special diet (ESP). SHAM rats received common diet. Treatment began on the ovariectomy day. The lower first molar was removed on both sides 15 days after ovariectomy. The rats received the diets until sacrifice, which occurred at seven, 21 and 45 days after dental extraction. The mandibles were submitted to radiographic and microscopic analyses. As results, using ANOVA and Tukey tests, optic density, trabecular volume and mast cell number increased with time and osteoid volume and mineral apposition rate decrease with time. Comparison between the OVZ and SHAM groups for each period revealed no difference; however OVZ and ESP groups showed different trabecular volume and mast cell number, being the other parameters, similar. In conclusion, hormonal deficiency do not retards the alveolar bone repair in ovariectomized rats and a possible mechanism of bone resorption is activated instead of hypocalcemia and estrogen deficiency recruiting mast cell. The mineral apposition rate is not affect by ovariectomy but seems to present an influence by its association with low calcium dietary shows a tendency to decrease.

KEYWORDS: *osteopenia; osteoporosis; bone repair.*