



LILIBETH FERRAZ DE BRITO PENNA FORTE

**INFLUÊNCIA DA OVARIECTOMIA ASSOCIADA À DIETA
DEFICIENTE EM CÁLCIO NA PERIODONTITE
EXPERIMENTAL**



2011

LILIBETH FERRAZ DE BRITO PENNA FORTE

**INFLUÊNCIA DA OVARECTOMIA ASSOCIADA À DIETA DEFICIENTE
EM CÁLCIO NA PERIODONTITE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho
Co-orientadora: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

F776i Forte, Lilibeth Ferraz de Brito Penna.

Influência da ovariectomia associada à dieta deficiente em cálcio na
periodontite experimental / Lilibeth Ferraz de Brito Penna Forte . - São
José dos Campos : [s.n.], 2011.

121 .f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de
São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

Co-Orientador: Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

1. Osteoporose. 2. Ovariectomia. 3. Doenças periodontais. 4.
Imunoistoquímica. I. Carvalho, Yasmin Rodarte. II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD64

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, 20 de junho de 2011 .

Assinatura :

E-mail: lilibeth.ferraz@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Faculdade de Odontologia
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Faculdade de Fisioterapia
Escola Superior de Cruzeiro “Prefeito Hamilton Vieira Mendes” – ESC

Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 20 de julho de 2011

DEDICATÓRIA

À Deus, por ter me dado força e saúde para cumprir essa jornada.

Ao meu marido, Rogério, por seu apoio incondicional e por acreditar sempre em mim. Seu companheirismo, compreensão e participação intensa tornaram este trabalho mais suave.

À minha filha Manuela, a razão da minha vida.

Ao meu filho, Miguel, que mesmo ainda no útero já participa desta jornada.

À minha mãe, Lenilza, ao meu pai, Jeremias e minha irmã Lissandra, por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, minha orientadora. Agradeço pela confiança depositada em mim, pelo aprendizado e principalmente pela compreensão nesses anos de convivência. Muito obrigada!

À Profa. Dra. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, por ter aceitado ser minha co-orientadora. Sua ajuda foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Renata Falchete do Prado, por seu importante conhecimento para a realização deste trabalho. Sua paciência e disposição em ajudar fazem de você uma pessoa e profissional exemplar.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. José Roberto Rodrigues.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial à Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha por todo apoio nestes 3 anos.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação para o Desenvolvimento da UNESP (FUNDUNESP) e Fundação Joseense de Ensino e Pesquisa em Odontologia (FUJEPPO) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de jornada Michelle, Adriana Delgado, Adriana Marchini, Fernando, Luis Felipe e Fernanda. A companhia de vocês tornou esse período mais alegre.

À minha querida amiga e colega Dennia, que tanto me ajudou e incentivou.

À Profa. Dra. Vanessa Ávila Sarmiento Silveira por toda ajuda.

Aos alunos de iniciação científica, Noala, Livia, Juliana, Maila, Felipe e Marcel, pelo trabalho em conjunto.

À Ana Lourdes da Silva Machado, pelas horas de conversa e apoio nestes anos e à Maria Salete Faria por toda ajuda.

Ao Walter Cruz por toda ajuda ao longo destes anos e principalmente no processamento das amostras.

Ao Seu Antônio D.S. B. M. Vasconcellos, Marco Antônio Correa Alfredo e Seu Lourival Jacobs pela disposição em ajudar no biotério.

À toda minha família e amigos que me acompanharam e torceram por mim nestes 3 anos.

Pedras no caminho?

Guardo todas....

Um dia vou construir um castelo!

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 O tecido ósseo.....	15
2.2 A deficiência de estrógeno.....	16
2.3 Osteoporose.....	17
2.4 Doença periodontal.....	20
2.5 Doença periodontal X Osteoporose.....	22
2.6 Dieta deficiente em cálcio.....	26
2.7 Doença periodontal e osteoporose experimental em ratos.....	29
2.8 Sistema RANK-RANKL-OPG.....	33
2.9 Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (TRAP).....	35
3 PROPOSIÇÃO.....	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais.....	38
4. 2 Grupos experimentais.....	38
4.3 Procedimentos cirúrgicos.....	39
4.3.1 Anestesia.....	39
4.3.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia.....	39
4.3.3 Dieta.....	41
4.3.4 Indução da doença periodontal.....	42
4.3.5 Eutanásia.....	43
4.4 Processamento do material.....	44
4.4.1 Processamento histológico.....	44
4.4.2 Processamento enzimoistoquímico.....	45

4.4.3 Processamento imunoistoquímico.....	47
4.5 Análise dos resultados.....	51
4.5.1 Análise histológica.....	51
4.5.2 Análise histomorfométrica.....	51
4.5.3 Análise enzimoistoquímica.....	53
4.5.4 Análise imunoistoquímica.....	54
4.5.5 Análise estatística.....	54
5. RESULTADOS.....	56
5.1 Resultado histológico.....	56
5.2 Resultado histomorfométrico.....	63
5.2.1 Grupos OVZ X Sham.....	63
5.2.2 Grupos OVZ X OVZ'.....	66
5.3 Resultado da enzimoistoquímica.....	69
5.3.1 Grupos OVZ X Sham.....	69
5.3.2 Grupos OVZ X OVZ'.....	72
5.4 Resultado da imunoistoquímica.....	75
5.4.1 OPG.....	75
5.4.1.1 Grupos OVZ X Sham.....	75
5.4.1.2 Grupos OVZ X OVZ'.....	78
5.4.2 RANKL.....	80
5.4.2.1 Grupos OVZ X Sham.....	80
5.4.2.2 Grupos OVZ X OVZ'.....	82
5.4.3 RANK.....	84
5.4.3.1 Grupos OVZ X Sham.....	84
5.4.3.2 Grupos OVZ X OVZ'.....	88
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÕES.....	104
8 REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICES.....	116
ANEXO.....	121

Forte LFBP. Influência da ovariectomia associada à dieta deficiente em cálcio na periodontite experimental [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

A deficiência de estrógeno e de cálcio na dieta são condições que potencialmente causam alterações no osso alveolar e como consequência podem agravar a doença periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da deficiência estrogênica, associada ou não à dieta deficiente em cálcio, sobre a perda óssea, a atividade de osteoclastos e os marcadores teciduais de remodelação óssea, na doença periodontal induzida em ratas. Foram utilizadas 96 ratas, aos 90 dias de idade, das quais 64 foram submetidas à ovariectomia e 32 à falsa-ovariectomia (Sham). Das 64 ratas ovariectomizadas, 32 receberam dieta comercial padrão (OVZ) e as outras receberam dieta deficiente em cálcio (OVZ'). Em todas as ratas, 60 dias após a cirurgia, foi induzida doença periodontal por meio da colocação de ligadura ao redor do primeiro molar inferior esquerdo. Com 3, 7, 14 e 30 dias após a inserção das ligaduras, efetuou-se a eutanásia. As hemi-mandíbulas esquerdas foram desmineralizadas e processadas para a obtenção de cortes microscópicos. Os cortes corados por H.E. foram analisados qualitativamente e quantitativamente por histomorfometria, utilizando-se planimetria por contagem de pontos, com o auxílio do programa Image J. Foi realizada reação enzimoistoquímica para marcação da fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e reação imunoistoquímica para marcação do receptor ativador de NF-kappa B (RANK), de seu ligante (RANKL) e de osteoprotegerina (OPG). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste de Mann-Whitney. Os resultados mostraram que o grupo Sham apresentou maior quantidade de matriz óssea e menor quantidade de marcação de células TRAP+ comparado com o grupo OVZ. Entretanto, o grupo OVZ apresentou menor quantidade de matriz óssea e marcação similar de células TRAP+ comparado ao grupo OVZ'. Em relação aos marcadores de remodelação óssea, o grupo Sham apresentou maior índice de marcação para OPG e RANKL, porém, para RANK mostrou quantidade equivalente ao grupo OVZ. Enquanto

isso, o grupo OVZ' apresentou os maiores índices de marcação para RANK e níveis equivalentes para OPG e RANKL do que o grupo OVZ. Concluiu-se que na doença periodontal induzida por ligadura em ratas uma consequência da deficiência estrogênica foi a maior perda óssea, a qual não foi acentuada pela ingestão de dieta deficiente em cálcio. O pico de perda óssea ocorreu aos 14 dias, independente da presença ou ausência de deficiência estrogênica e ocorreu maior reabsorção óssea, decorrente da atividade de osteoclastos positivos para fosfatase ácida tartarato-resistente, na ausência de hormônios ovarianos. Ocorreu aumento de OPG e diminuição de RANKL na fase inicial da doença periodontal, nas ratas com deficiência hormonal. O consumo de dieta deficiente em cálcio resultou em expressão variada de OPG e não interferiu na expressão de RANKL. A expressão de RANK ocorreu apenas em alguns períodos, na presença ou ausência de hormônios ovarianos e com o consumo de dieta deficiente em cálcio sua marcação diminuiu ao longo do tempo.

Palavras-chave: Osteoporose. Ovariectomia. Doenças periodontais. Imunoistoquímica.

Forte LFBP. Influence of ovariectomy associated to dietary calcium deficiency on the experimental periodontitis [thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Estrogen and dietary calcium deficiencies are conditions that potentially lead to alveolar bone alterations and might consequently worsen periodontal disease. The aims of the present study were to evaluate estrogen deficiency associated or not to dietary calcium deficiency over bone loss and to evaluate the activity of osteoclasts and bone remodeling tissue markers on induced periodontal disease in rats. Ninety six rats aging 90 days were used in the present study, being 64 submitted to ovariectomy and 32 to sham-ovariectomy (Sham). Thirty-two rats from the ovariectomized group received standard diet (OVZ), while the rest received calcium deficient diet (OVZ'). Periodontal disease was induced 60 days after the surgery in all rats by placing a ligature surrounding the first mandibular left molar. Euthanasia was performed 3, 7, 14 and 30 days after ligature placement. Left hemi-mandibles were demineralized and processed for obtaining the microscopic slices. HE stained slices were qualitatively and quantitatively analyzed by histomorphometry using a point-counting planimetry, and the Image J software. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) was marked by enzyme histochemistry, while factor NF-Kappa B receptor activator (RANK), its ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were marked by immunohistochemistry. Obtained data were submitted to statistical analysis by Mann-Whitney test. The results revealed that Sham group presented greater bone matrix quantity and lower TRAP+ cell in comparison to OVZ group. However, OVZ group presented lower bone matrix quantity and similar TRAP+ cells as OVZ' group. Regarding bone remodeling markers, Sham group presented the greatest marking index for OPG and RANKL, being the RANK quantity similar to OVZ group. The OVZ' group presented higher marking indices for RANK and similar levels of OPG and RANKL in comparison to OVZ. It was concluded that greater bone loss, which is not accentuated by

calcium deficient diet, is a consequence of estrogen deficiency in ligature induced periodontal disease in rats. Bone loss peak occurs at 14 days regardless estrogen deficiency and greater bone resorption occurs due to the activity of osteoclasts positive for tartrate-resistant acid phosphatase, in absence of ovarian hormones. OPG increase and RANKL decrease are observed during the initial phases of periodontal disease within hormone deficient rats. Calcium deficient diet consumption leads to varied OPG expression, while does not interfere with RANKL expression. RANK expression occurs only during certain periods, in the presence or absence of ovarian hormones, while its detection decreases over time with calcium deficient diet consumption.

Key-words: Osteoporosis. Ovariectomy. Periodontal disease. Immunohistochemistry.

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido capaz de modificar sua estrutura devido à sua capacidade de remodelação. Esse processo é regulado por hormônios sistêmicos, estímulos mecânicos e outros fatores produzidos localmente (Compston, 2001).

O estrógeno tem importante papel no processo de remodelação óssea. Na menopausa, se verifica diminuição da produção de estrógenos, gerando reabsorção que excede a formação óssea. Isto leva conseqüentemente a uma perda óssea gradativa, podendo culminar com um quadro de osteoporose (Kalu, 1991).

A osteoporose é uma doença sistêmica progressiva de grande preocupação a toda sociedade. Proporciona perda da massa óssea, suscetibilizando o indivíduo a fraturas. Um dos maiores riscos para a osteoporose é a deficiência de estrógeno (Compston, 2001).

A densidade óssea e a infecção oral podem influenciar na perda óssea alveolar em mulheres pós-menopausa (Brennan-Calanan et al., 2008). Desta forma, parece existir uma relação entre periodontite e osteoporose (Genco, 1996; Lopes et al., 2008).

Além disso, é provável que a osteoporose associada a outros fatores promova uma maior perda óssea mandibular (Moriya et al., 1998; Jiang et al., 2003). Um desses fatores seria a dieta deficiente em cálcio que promoveria uma maior perda óssea devido ao aumento da atividade de reabsorção (Hara et al., 2001; Zhang et al., 2009; Bae; Kim, 2010).

A deficiência estrogênica decorrente da perda da função ovariana e a dieta deficiente em cálcio são fatores que potencialmente alteram a perda óssea alveolar. Entretanto, o papel da interação desses

fatores sobre a perda óssea decorrente da doença periodontal necessita ser esclarecido, a fim de que se possa compreender melhor a evolução da doença periodontal em condições de deficiência estrogênica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O tecido ósseo

O tecido ósseo é originário de um tecido embrionário chamado mesênquima e composto por três tipos celulares, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. Histologicamente há dois tipos de tecido ósseo, o imaturo ou primário e o maduro ou secundário. No osso primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, enquanto que no secundário, as fibras colágenas se organizam em lamelas dispostas paralelamente (Junqueira, Carneiro, 2008).

O osso é um tecido extremamente ativo. Possui um alto grau de rigidez e resistência à pressão, porém, é capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta às forças a que está submetido. Isto se deve à sua capacidade de remodelação (Compston, 2001).

A remodelação é definida como um processo fisiológico no qual há remoção do osso antigo, reabsorção, e substituição por osso recentemente formado, neoformação óssea. É um mecanismo responsável pela manutenção da integridade óssea anatômica e funcional e é regulado por hormônios sistêmicos, estímulos mecânicos e fatores produzidos localmente, como as citocinas e fatores de crescimento. Os hormônios sistêmicos correspondem a substâncias endócrinas, como a vitamina D, hormônios calciotróficos, hormônios tireoidianos, sexuais, de crescimento e os glicocorticóides (Compston, 2001). Distúrbios no processo de remodelação determinam alterações na arquitetura óssea, podendo causar diminuição da sua densidade e acarretar maior risco de fraturas (Moreira et al., 2009).

No esqueleto humano, o pico de massa óssea, é alcançado por volta dos trinta anos de idade. A partir desse período ocorre um balanço negativo entre formação e reabsorção, havendo gradativa perda óssea durante o processo de remodelação (Moreira et al., 2009). Burr et al. (1997) relataram que a cada ciclo de remodelação, há um decréscimo na massa óssea, levando à formação de micro defeitos no tecido ósseo, que se acumulam ao longo da vida. Esse acúmulo pode estar relacionado ao maior risco de fraturas em mulheres idosas (Pinheiro et al., 2010).

2.2 A deficiência de estrógeno

Hormônios sexuais atuam no metabolismo ósseo e têm um importante papel no crescimento e manutenção do tecido ósseo (Compston, 2001). Existem evidências de que a diminuição ou ausência de estrógeno leva a uma progressiva diminuição da massa óssea, conseqüentemente à osteoporose (Douglas, 2006).

O estrógeno, hormônio sexual feminino, é responsável por alterações que ocorrem na puberdade das meninas, além de estimular o crescimento do endométrio e causar deposição de gordura nas mamas. É um hormônio da classe dos esteróides (Compston, 2001), sintetizado pelos ovários e regulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH). Influencia no metabolismo ósseo sendo parcialmente responsável pela remodelação óssea (Douglas, 2006). Há três estrógenos em quantidade significativa, β -estradiol, estroma e estriol, sendo o 17β -estradiol seu mais importante produto secretório (Guyton, Hall, 2006).

Segundo Srivastava et al. (2001), o estrógeno regula a diferenciação e formação dos osteoclastos modulando a produção de citocinas osteoclastogênicas, afeta a sensibilidade das células

precursoras de osteoclastos ao RANKL (ligante do receptor ativador do fator NF-kappa B) uma citocina envolvida na sua diferenciação e inibe a reabsorção óssea por induzir a apoptose de osteoclastos maduros e de seus precursores (Fountas et al., 2004).

O climatério, fase da vida da mulher na qual os ovários cessam sua função, tem início com o fim da função reprodutiva e termina com a adaptação do organismo à atrofia das gônadas. Na menopausa, último sangramento cíclico, se verifica diminuição da produção de estrógenos, principalmente de estradiol (Douglas, 2006). Neste período observa-se aumento do ritmo de remodelação óssea, com consequente perda óssea gradativa, podendo resultar em osteoporose. Desta forma, muitos autores afirmam que a deficiência estrogênica é uma das causas da osteoporose (Burr et al., 1997; Douglas, 2006).

2.3 Osteoporose

A osteoporose é uma doença sistêmica progressiva que reduz, por unidade de volume, o osso normalmente mineralizado e degrada sua microestrutura, fatores estes que aumentam significativamente a fragilidade, acarretando maior susceptibilidade a fraturas. Trata-se de uma doença muito comum e de grande impacto para a sociedade. Sua incidência é responsável por altos índices de morbidade e mortalidade. Por apresentar como maior consequência as fraturas, o alto custo social e a preocupação que envolve esta osteopatia aumentam cada vez mais no mundo, fazendo com que a osteoporose constitua um considerável problema de saúde pública (Genant et al., 1999; Pinheiro; Elis, 2010). As hospitalizações devido às fraturas decorrentes da osteoporose e os medicamentos empregados no seu tratamento representam altos custos para a sociedade (Häussler et al., 2007).

Mais de dez milhões de americanos têm sido diagnosticados com osteoporose e aproximadamente 1,5 milhão de fraturas anuais são decorrentes desta doença (McCormick, 2007). No Brasil, os idosos já representam cerca de 16 milhões de indivíduos (Martini et al., 2009). Estima-se que 12,8% dos homens e 15,1% de mulheres com 40 anos ou mais tenham osteoporose (Pinheiro et al., 2009).

A prevalência da osteoporose para adultos acima dos 50 anos é considerada maior nas mulheres (em torno de 50%) que nos homens (em torno de 13%) (McCormick, 2007). Esta aumenta com a idade, sendo de 60% nas mulheres e 16% nos homens acima de 75 anos (Häussler et al., 2007). Desta forma, a prevalência de fraturas por fragilidade óssea é elevada, variando de 11% a 23,8% (Pinheiro, Elis, 2010).

Prática de exercícios físicos regulares, redução do álcool e fumo, ingestão diária adequada de cálcio (Peters, Martini, 2010) e reposição hormonal são medidas de prevenção capazes de melhorar e aumentar a massa óssea do indivíduo (McCormick, 2007; Pinheiro et al., 2010).

O exame de densitometria óssea é um método de diagnóstico que expressa quantitativamente o conteúdo estimado de cálcio por área de superfície óssea. Atualmente, marcadores bioquímicos de remodelação óssea, permitem a determinação, na urina ou no sangue, de substâncias relacionadas com a produção ou reabsorção óssea. Os biomarcadores são produtos de degradação óssea, de grande interesse em pesquisa, pois apesar de inespecíficos para osteoporose, traduzem o *turnover* ósseo (McCormick, 2007; Moreira et al., 2009).

A osteoporose pode ser dividida em dois grupos. A osteoporose primária subdivide-se em idiopática e involutiva e suas causas fundamentais não são bem conhecidas; enquanto que a secundária, possui causas determinadas. As osteoporoses involutivas

constituem um grupo heterogêneo, subdividido em Tipo I, antes conhecida como pós-menopausa, e Tipo II, antes conhecida como senil. A osteoporose Tipo I está presente nas mulheres e sua evolução se faz após a menopausa, sendo a deficiência de estrógeno a causa mais importante neste período. Há perda de osso trabecular em ritmo três vezes maior do que o normal e as fraturas de vértebras, de rádio e perda de dentes, são os elementos clínicos mais comuns. A osteoporose Tipo II atinge indivíduos de ambos os sexos, aos 75 anos de idade ou mais, e há predomínio da osteopenia cortical, atingindo principalmente fêmur, pelve, tíbia e úmero proximal (Brasileiro Filho, 2009).

Vários são os fatores de risco para osteoporose. Alguns são modificáveis, outros não. Fatores modificáveis, que afetam o desenvolvimento de osteoporose de alguma forma, incluem o hábito de fumar, consumo de álcool, baixa ingestão de cálcio ou vitamina D (Cipriani Thorne, 2004; Pinheiro et al., 2009), falta de atividade física (sedentarismo), medicações (tais como anticonvulsivantes e glicocorticóides por tempo prolongado) (Genant et al., 1999; Pinheiro et al., 2009), alterações endócrino-metabólicas (hereditárias ou não), reumatológicas, renais, digestivas e neoplásicas (Cipriani Thorne, 2004). A idade e o gênero são dois dos principais fatores não modificáveis. São relacionados idade acima de 65 anos, mulheres com baixa estatura e baixa massa corpórea (Genant et al., 1999; Pinheiro et al., 2010).

Pinheiro et al. (2010) realizaram um estudo transversal com 4.332 mulheres acima de 40 anos de idade e observaram a prevalência de osteoporose e de fraturas por fragilidade óssea em 33% e 11,5%, respectivamente. Os autores concluíram que a idade avançada, menopausa, fratura prévia por baixo impacto e tabagismo são os principais fatores de risco da baixa densidade óssea, que por sua vez, se associa às fraturas por fragilidade óssea.

Nas mulheres, a redução dos níveis de estrógeno acarreta maior liberação de citocinas que estimulam a atividade dos

osteoclastos. Essa atividade ultrapassa o ritmo dos osteoblastos, levando a elevada taxa de remodelação óssea, que culmina com a reabsorção, principalmente do osso trabecular (Kalu, 1991; Deyhim et al., 2003).

Payne et al. (1997) avaliaram a associação entre o nível de estrógeno e a densidade óssea alveolar em mulheres com sete anos pós-menopausa, através de um estudo longitudinal. Vinte e quatro mulheres foram acompanhadas por um período de um ano e divididas em dois grupos. O primeiro grupo consistia de 10 mulheres que faziam reposição de estrógeno e o segundo, de 14 mulheres com deficiência estrogênica. Observou-se, por meio de exames radiográficos, diminuição da densidade óssea alveolar relacionada com os baixos níveis de estrógeno da população estudada e maior densidade óssea nas mulheres submetidas à terapia de reposição hormonal estrogênica. Os autores sugeriram, desta forma, que o nível de estrógeno pode influenciar na densidade óssea alveolar.

Tanaka et al. (2002) estudaram 16 ratas das quais oito sofreram ovariectomia e as restantes, falsa ovariectomia. Constataram, dois meses após este procedimento, que as ratas falso-ovariectomizadas apresentavam maior número e volume de trabéculas ósseas comparadas àquelas que foram submetidas à ovariectomia. Dessa forma, os autores concluíram que a carência de estrógeno provoca mudanças osteoporóticas, aumentando a destruição do tecido ósseo da mandíbula, o que pode levar posteriormente à perda de dentes.

2.4 Doença periodontal

A doença periodontal é caracterizada por destruição de estruturas de suporte dos dentes, como resultado da ação ineficaz e frustrada do sistema de defesa do hospedeiro, em resposta ao acúmulo

de biofilme dental (Lindhe, 2005). É a causa mais comum de perda dentária em adultos (Zeeman et al., 2001). Este processo patogênico apresenta diferenças na extensão e gravidade, tanto no próprio indivíduo quanto entre indivíduos diferentes, e as razões para isso são diversas, como por exemplo, o meio ambiente, a microbiota bucal e o hospedeiro (Lindhe, 2005).

O biofilme dental desempenha um papel fundamental no processo patogênico. Em geral, o processo se inicia a partir do acúmulo de placa, que produz uma variedade de irritantes, como ácidos, endotoxinas e antígenos. A persistência do estímulo origina uma resposta inflamatória crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte, formando bolsa periodontal. Além disso, há contínua degradação do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares e intenso infiltrado mononuclear predominantemente linfoplasmocitário (Kawai et al., 2006), que com o tempo destroem os tecidos de suporte dos mesmos (Lindhe, 2005).

Vários estudos confirmam a hipótese de que há uma alteração celular na evolução da doença periodontal (Rodini et al., 2005; Kawai et al., 2006). Na transição de gengivite para periodontite há substituição do infiltrado constituído predominantemente por células T para infiltrado rico em células B/plasmócitos (Gemmell et al., 2002).

Rodini et al. (2005) observou a doença periodontal inflamatória induzida por ligadura em ratos, com ênfase na avaliação clínica e microscópica, bem como no estudo quantitativo dos mastócitos e da presença do RNA mensageiro codificador das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases (MMPs) -2 -9. O autor concluiu que a doença periodontal experimentalmente induzida em ratos por meio de ligadura, caracteriza-se por lesões inflamatórias com predomínio de células polimorfonucleares e áreas de reabsorção óssea alveolar desde as primeiras 24 horas após a indução, com pico de reabsorção óssea no 14º dia e diminuição apenas no 42º dia. Também

observou progressão de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário organizado focalmente, que caracteriza a doença humana. Provavelmente, a MMP-9 e o óxido nítrico têm participação na evolução e patogênese da doença periodontal experimentalmente induzida por ligadura, incluindo destruição tecidual e perda óssea alveolar. Entretanto, os mastócitos parecem ter limitada participação na referida doença, não constituindo, provavelmente fonte significativa da iNOS e da MMP-9.

Kawai et al. (2006) observaram elevada expressão de RANKL e IL-1 β (interleucina-1 β), estimulados por linfócitos T e sobretudo linfócitos B ativados presentes no fluido gengival e tecido gengival de pacientes com periodontite crônica. Desta forma, o sistema de citocinas que regula o processo de reabsorção óssea periodontal é dependente da diferenciação de osteoclastos, de sua ativação e sobrevivência e diretamente influenciado pela presença de mediadores como RANKL e citocinas pró-inflamatórias.

Condições sistêmicas do hospedeiro podem determinar um maior ou menor risco de desenvolvimento da periodontite. Essas condições sejam adquiridas, congênitas ou hereditárias, podem modular a resposta inflamatória, assim como propiciar uma maior susceptibilidade individual à doença periodontal (Rodini et al., 2005). A osteoporose vem sendo relacionada à doença periodontal como um dos fatores sistêmicos adquiridos (Gomes-Filho et al., 2007; Lopes et al., 2008).

2.5 Doença periodontal X Osteoporose

Evidenciou-se que existe uma relação entre periodontite e doenças sistêmicas (Paquette, 1999). Vários fatores de risco que podem interferir no aparecimento e progressão da periodontite têm sido estudados (Genco, 1996; Zeeman et al., 2001).

Fator de risco é a circunstância do ambiente ou característica do indivíduo, herdada ou adquirida, associada à maior probabilidade em apresentar um dano à saúde. Dentre os fatores de risco conhecidos destacam-se o hábito de fumar e o *diabetes mellitus* como preditores da doença periodontal (Genco, 1996; Paquette, 1999).

Indicadores de risco são fatores de risco potenciais, ainda não confirmados por estudos longitudinais, mas que provavelmente alterem o curso da doença (Paquette, 1999). Importantes indicadores de risco para a doença periodontal incluem osteoporose associada com deficiência estrogênica, gênero, idade (com maior prevalência acima dos 50 anos) e fatores hereditários (Genco, 1996).

Kribbs, 1990, Moriya et al., 1998, Anbinder et al., 2006, Gomes-Filho et al., 2007 e Lopes et al., 2008 tentaram esclarecer a relação entre osteoporose e doença periodontal. Diversos autores acreditam que a deficiência de estrógeno cause alterações no osso alveolar que poderiam resultar no agravamento de uma doença periodontal pré-existente (Johnson et al., 1997; Brennan-Calanan et al., 2008; Kuo et al., 2008). De acordo com Gomes-Filho et al. (2007) mulheres na pós-menopausa com osteoporose apresentaram risco 2,5 vezes maior de ter doença periodontal do que as mulheres sem osteoporose.

Brennan-Calanan et al. (2008) realizaram um estudo com 1.256 mulheres na pós-menopausa para avaliar a associação entre osteoporose e perda óssea alveolar. Os autores concluíram que a densidade óssea e infecção oral independentemente influenciam na perda óssea alveolar em mulheres na pós-menopausa.

A doença periodontal e a osteoporose são doenças crônicas multifatoriais que, provavelmente, dividem fatores de risco em comum (Brennan-Calanan et al., 2008). Tais fatores podem ser ambientais, genéticos, dietéticos e sistêmicos (Reddy et al., 2002), como prevalência aumentada da doença com o aumento da idade, impactos

negativos do fumo sobre o desenvolvimento e severidade da doença, e deterioração da reparação tecidual (Kuo et al., 2008).

Como a osteoporose, as doenças periodontais são doenças silenciosas que não causam sintomas óbvios até estágios avançados do processo patológico, podendo causar perda dentária (Kuo et al., 2008).

Kribbs (1990) comparou a massa óssea mandibular, espessura da cortical óssea, número de dentes presentes e condição periodontal, entre mulheres normais e com osteoporose. Das 112 mulheres selecionadas para o estudo, com idade entre 50 e 85 anos, 85 mulheres apresentaram osteoporose enquanto as restantes apresentaram massa óssea normal. Em relação à massa óssea mandibular, número de dentes e espessura da cortical óssea, foi encontrado diferença estatisticamente significativa entre a população com osteoporose e a população normal. No que se refere à condição periodontal, não foram observadas alterações estatisticamente significantes entre as populações estudadas quanto à profundidade de bolsa, recessão gengival e índice de sangramento. Desta forma, o autor concluiu que a osteoporose parece não ter influência na etiopatogenia da doença periodontal, mesmo que a massa óssea mandibular da população com osteoporose tenha sido menor.

Johnson et al. (1997) estudaram a relação entre a deficiência estrogênica, inflamação periodontal e perda óssea alveolar em ovelhas ovariectomizadas. As eutanásias ocorreram 90 dias e um ano após ovariectomia. Dentre as diversas análises realizadas, foram feitos testes bioquímicos, mecânicos, radiográficos, histomorfométrico e sondagem de sulco periodontal. A porcentagem de sítios exibindo profundidade de sulco de quatro a seis milímetros ou superior a seis milímetros foi maior em ovelhas ovariectomizadas do que no grupo controle, após três meses da ovariectomia e se tornou gradualmente maior durante o período de um ano. Os autores observaram perda de

inserção periodontal e de osso alveolar nas ovelhas 90 dias pós-ovariectomia, alterações estas que se tornaram mais severas após um ano. Tais alterações não foram relacionadas à alimentação ou irritação mecânica. Desta forma, os dados obtidos sugerem que a deficiência de estrógeno pode resultar em uma perda óssea alveolar significativa e progressiva.

Marques et al. (2005) avaliaram a influência da administração intermitente do paratormônio sobre a perda óssea alveolar em ratas ovariectomizadas, já que a deficiência estrogênica pode sugerir um fator de risco para a doença periodontal. Os autores utilizaram 30 ratas e as dividiram em três grupos: (1) ovariectomizadas associadas à administração de paratormônio; (2) ovariectomizadas associadas à veículo e (3) Sham operadas. Após uma semana inseriram ligadura ao redor do primeiro molar inferior de todas as ratas para induzir doença periodontal. Concluíram que o paratormônio produziu significativa inibição da periodontite nas ratas ovariectomizadas e que as ratas que não receberam o hormônio, apresentaram menor densidade óssea mandibular.

Anbinder et al. (2006) analisaram os efeitos do tratamento com alendronato sódico ou sinvastatina e a influência de hormônios ovarianos como fator de risco para a evolução da doença periodontal em ratas. Foram utilizadas oitenta ratas, das quais quarenta sofreram ovariectomia (OVZ) e as restantes submetidas a falsa ovariectomia (Sham). Selecionaram aleatoriamente para a indução da doença periodontal por meio de ligadura, trinta ratas do grupo OVZ e trinta do grupo Sham. Foram subdivididos grupos contendo dez animais cada, conforme a substância administrada (sinvastatina, água filtrada e alendronato sódico). As vinte ratas do grupo Sham e OVZ que não sofreram indução da doença periodontal (sem ligadura), tiveram o mesmo tratamento das ratas do grupo placebo (água filtrada). Foram analisados o envolvimento de furca e a perda óssea alveolar. Em nenhuma das

análises realizadas foi verificada diferença significativa entre os animais do grupo OVZ e Sham, nem mesmo aqueles que receberam os diferentes medicamentos. Sendo assim, concluiu-se que a ausência de hormônios ovarianos não estava relacionada com as alterações periodontais e que a utilização dos medicamentos, com as doses testadas e durante o tempo empregado, não alterou a perda óssea decorrente da periodontite induzida em ratas.

Lopes et al. (2008) tentaram verificar a associação entre osteoporose e doença periodontal em 39 mulheres na pós-menopausa. Foram divididos três grupos, por meio da avaliação da densidade mineral óssea (osso normal, osteopenia e osteoporose) e aplicada o índice de nível de inserção clínica (NIC) para todas as participantes no início da pesquisa e após um ano. O exame periodontal revelou que as mulheres na pós-menopausa com osteopenia apresentaram menor média do NIC no exame clínico periodontal inicial ($2,1 \pm 1,1$ mm). Entretanto, essa diferença foi estatisticamente significativa nos pacientes com osteopenia e osteoporose, quando comparados os valores do NIC, nos dois períodos de avaliação. Os autores concluíram que a osteoporose pós-menopausa pode ser considerada como possível fator de risco para a doença periodontal.

2.6 Dieta deficiente em cálcio

A dieta pode influenciar o desenvolvimento da doença periodontal e da osteoporose. Uma dieta rica em vitaminas e minerais, pode assegurar a manutenção do pico de massa óssea do indivíduo (Pinheiro et al., 2010).

Moriya et al. (1998) verificaram a relação entre osteoporose experimental e a perda óssea alveolar induzida por meio da

ovariectomia em ratas com dieta padrão (0.892% cálcio) ou deficiente em cálcio (0.005% cálcio). Vinte ratas ovariectomizadas ou falso-operadas com quatro semanas de idade foram divididas em quatro grupos: a) ratas ovariectomizadas e dieta padrão; b) ratas ovariectomizadas e dieta deficiente em cálcio; c) ratas falso-operadas e dieta padrão; d) ratas falso-operadas e dieta deficiente em cálcio. Após um mês de cirurgia, os autores observaram, por meio de exames radiográficos, que a densidade óssea mineral da tíbia e fêmur das ratas ovariectomizadas submetidas a uma dieta padrão foi maior do que das ratas ovariectomizadas ou mesmo falso-operadas com dieta deficiente em cálcio. No osso alveolar, tanto na maxila quanto na mandíbula, foi constatado que não houve uma diferença significativa entre os grupos. Assim, concluíram que a osteoporose isoladamente não corresponde a um fator de destruição óssea periodontal.

Hara et al. (2001) realizaram uma análise histomorfométrica para verificar o efeito da ovariectomia e/ou da dieta deficiente em cálcio na dinâmica óssea do palato duro, mandíbula e tíbia proximal de ratas. Para o estudo foram utilizados 25 animais divididos em cinco grupos: controle (não operado), Sham + dieta normal (1.15% cálcio), OVZ + dieta normal, Sham + dieta deficiente em cálcio (0.02% cálcio) e OVZ + dieta deficiente em cálcio. Verificaram, desta forma, que a ovariectomia afetou a tíbia e a mandíbula, porém, não produziu efeitos significativos no palato. No entanto, a dieta deficiente em cálcio induziu perda óssea e aumento da remodelação nos três locais analisados, independente da ovariectomia.

Shirai et al. (2002) avaliaram o efeito 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 (2.30% cálcio) apresentou formação óssea e reabsorção semelhantes às do grupo controle das ratas falso-ovariectomizadas (1.15% cálcio).

Teófilo et al. (2003) compararam os efeitos da ovariectomia associada ou não à dieta deficiente em cálcio na indução da osteoporose em maxila e metáfise proximal da tíbia de ratas, após cinco e 11 semanas de tratamento. Foram ovariectomizadas 40 ratas e as 20 restantes submetidas à cirurgia Sham (falsa-ovariectomia), bilateralmente. Metade das ratas ovariectomizadas recebeu dieta deficiente em cálcio (0.1% cálcio) e as demais, assim como as que sofreram falsa cirurgia, receberam dieta padrão (1.4% cálcio). Foi observado que a deficiência do estrógeno em cinco semanas foi ineficaz para promover alteração na massa óssea, tanto na maxila quanto na tíbia. Já na ovariectomia associada à dieta deficiente em cálcio houve uma perda óssea de 17% na tíbia e 30-40% na maxila. Nas ratas ovariectomizadas com dieta deficiente em cálcio, em 11 semanas, houve diminuição na massa óssea de 23% na tíbia e 31% na maxila. No período de até 11 semanas, apenas a deficiência de estrógeno não foi suficiente para provocar osteoporose maxilar em ratas, no entanto, já se verificou nesse período efeito deletério na massa da metáfise proximal com perda de 14%. Também foi observado que, em apenas cinco semanas, a ovariectomia associada à baixa ingestão de cálcio, provocou diminuição duas vezes maior da massa óssea na maxila do que na tíbia. Os autores concluíam que a deficiência estrogênica associada à dieta deficiente em cálcio induziu osteoporose mesmo durante um curto período de tempo experimental.

Zhang et al. (2009) estudaram os níveis de RNAm em tíbia de ratas ovariectomizadas e com dieta deficiente em cálcio. A dieta foi administrada por um período de 12 semanas. Níveis séricos de RANKL e OPG (osteoprotegerina) foram mensurados. Observaram que tanto a dieta quanto a ovariectomia estimularam OPG e RANKL e que a deficiência de estrógeno pode significar a redução da proporção OPG/RANKL. Os índices de OPG e RANKL foram maiores nas ratas ovariectomizadas que nas ratas Sham, tanto com (0.1% cálcio) quanto sem dieta deficiente em cálcio (1.2% cálcio), porém, a proporção

OPG/RANKL foi maior nas ratas Sham do que nas ratas OVZ, independente da dieta. Os autores concluíram que o sistema OPG/RANKL é o maior mecanismo molecular que media a ação da ovariectomia e da dieta deficiente em cálcio na indução da perda óssea.

Bae e Kim (2010) investigaram o efeito da suplementação de magnésio e cálcio nos níveis séricos de biomarcadores de reabsorção óssea, OPG/RANKL, em ratas ovariectomizadas com dieta deficiente em cálcio. As ratas foram divididas em cinco grupos, cada um contendo nove animais: 1) Sham com adequado cálcio (0.5% cálcio) e magnésio; 2) OVZ com baixo cálcio (0.1% cálcio) e adequado magnésio; 3) OVZ com baixo cálcio e suplementação de magnésio; 4) OVZ com adequado cálcio e magnésio e 5) OVZ com cálcio adequado e magnésio suplementar. As dietas foram administradas por 12 semanas. OPG e RANKL foram mensurados por meio de ELISA. Os níveis de RANKL e OPG dos grupos OVZ foram significativamente mais altos que do grupo Sham e as ratas OVZ alimentadas com dieta adequada em cálcio e com suplementação de magnésio tiveram aumento dos níveis de OPG comparadas às do grupo alimentado com dieta deficiente em cálcio. Os autores concluíram que a proporção OPG/RANKL e o nível sérico de OPG aumentaram no grupo com dieta adequada em cálcio e suplementação de magnésio, comparado ao grupo com dieta deficiente em cálcio.

2.7 Doença periodontal (DP) e osteoporose experimental em ratos

Alguns estudos utilizam modelos em animais para a compreensão da doença periodontal (Benzten et al., 2005; Prabhu, Mehta, 2006). A anatomia da junção dentogengival da região de molares do rato é muito semelhante àquela descrita no homem, tornando válido o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nestes animais

(Bentzen et al., 2005). Além disso, esse modelo animal é de baixo custo, fácil manuseio e disponibilidade de variação controlada de condições fisiológicas, microbiológicas e imunológicas (Kuhr et al., 2004; Spalding, 2005; Gaspersic et al., 2008).

Em ratos, a periodontite pode ser induzida por diferentes métodos como a administração de uma dieta rica em sacarose, a inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos ou a indução por fio de algodão posicionado na margem gengival, também chamada de indução por ligadura (Rodini et al., 2005).

Bentzen et al. (2005) compararam dois métodos para a indução de doença periodontal em ratos: periodontite induzida por ligadura e injeção gengival de lipopolissacarídeos (LPS). A perda óssea alveolar foi comparada por meio de análise morfométrica e radiográfica. Os autores verificaram que a indução de doença periodontal através de ligadura por um período de quatro semanas, levou a uma destruição óssea significativa. Foi observado também que é possível induzir doença periodontal em ratos no período de uma semana através da utilização da ligadura. Ainda este processo apresentaria algumas vantagens, como a diminuição do tempo e custo do estudo, além de possibilitar uma menor manipulação dos animais. Por fim, os autores concluíram que o método de indução da doença periodontal através da inserção gengival de LPS mostrou ser pouco confiável.

Na doença periodontal induzida por meio de colocação de ligadura ao redor da região cervical do molar, geralmente o primeiro molar inferior e/ou o segundo molar superior são eleitos como sítios favoráveis (Rodini et al., 2005; Spalding, 2005; Gaspersic et al., 2008). Esta técnica consiste na inserção de um dispositivo que tem como finalidade promover irritação mecânica e aumento do número de bactérias através do acúmulo de biofilme supra e subgengival gerando uma resposta inflamatória prejudicial ao periodonto (Gaspersic et al., 2002).

Galvão et al. (2003) realizaram um estudo para avaliar as características histológicas da doença periodontal induzida em ratos através da ligadura, associada ou não com dieta rica em sacarose. Concluíram que o uso da ligadura foi capaz de promover periodontite em ratos, independente da dieta, além de se mostrar uma ferramenta adequada para avaliar as características histológicas da doença periodontal induzida.

Com esse tipo de modelo experimental de doença periodontal, há uma resposta à agressão mecânica que provoca achatamento e deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal, bem como redução da integridade tecidual pela ulceração causada no epitélio do sulco. O acúmulo gradual de biofilme associado à ruptura da integridade tecidual propicia a migração de bactérias em direção aos tecidos mais profundos, gerando processo inflamatório periodontal, que geralmente é caracterizado por períodos de inflamação aguda, com migração de células inflamatórias, especialmente PMN, seguidos por perda de tecido conjuntivo e períodos de inflamação crônica, caracterizando a instalação da doença periodontal. Após a indução, quase que imediatamente há perda óssea, conforme observado em períodos de 1 a 14 dias (Rodini et al., 2005).

Kuhr et al. (2004) observaram o modelo de doença periodontal induzida em ratos por meio de ligadura por 60 dias. Segundo os autores este modelo é o mais indicado para experimentos em curto prazo (preferencialmente 15 dias), sendo a resposta inflamatória mais significativa do dia 1 ao dia 15, diminuindo gradativamente. Porém foi notável a perda óssea gradativa até os 60 dias do experimento. Segundo os autores, para estudos de periodontite induzida por ligadura em modelos de ratos, deve ser considerado que a perda óssea periodontal é diretamente dependente da idade do animal.

Diversos pesquisadores têm utilizado como modelo experimental para o estudo da osteoporose a ovariectomia em ratas, por

conseguir a indução da osteoporose por deficiência estrogênica, devido às características similares envolvidas (Shirai et al., 2002; Tanaka et al., 2002; Teófilo et al., 2003). Estas incluem o rápido aumento da remodelação óssea, em que a reabsorção excede a neoformação, uma fase inicial rápida seguida de uma fase mais lenta, maior perda do osso trabecular em comparação com o cortical, diminuição da absorção intestinal de cálcio, ganho de peso, e resposta esquelética semelhante a agentes terapêuticos (Kalu, 1991).

Segundo Kalu (1991), aos três meses de idade as ratas já estão no período de reprodução (fase ideal para a realização da ovariectomia) e assim são capazes de responder à deficiência de hormônios sexuais, adquirida como sequela da ovariectomia. Se a ovariectomia nos animais for realizada neste período, ocorrerão alterações ósseas com perda drástica evidente no osso trabecular, a partir da segunda semana pós-ovariectomia, atingindo o auge após um mês.

Tanaka et al. (2003) avaliaram as alterações na estrutura trabecular em mandíbula de ratas ovariectomizadas, causadas pela deficiência estrogênica durante um ano. Após análise histomorfométrica, observaram que o osso alveolar das mandíbulas das ratas sofreu perda da conectividade das trabéculas e perda óssea. Os autores concluíram que a reabsorção óssea foi elevada logo após a ovariectomia e depois diminuiu com o tempo. Desta forma, a perda óssea teria sido causada principalmente pelo aumento inicial da taxa de reabsorção, imediatamente à ovariectomia e pela reabsorção moderada ocorrida no decorrer do ano.

2.8 Sistema RANK-RANKL-OPG

Uma proteína da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) denominada Ligante do Receptor Ativador do Fator NF-Kappa B (RANKL) tem sido relacionada com o processo de reabsorção óssea (Wittrant et al., 2003). RANKL é uma proteína de 317 aminoácidos, expressada por osteoblastos e células do estroma da medula óssea (Feng, 2005). Muitos hormônios como o da paratireóide, calcitriol e prostaglandinas estimulam a expressão do RANKL pelos osteoblastos (Gallagher, 2008). A interação de RANKL com o Receptor Ativador do Fator de NF-Kappa B (RANK), presente nos osteoclastos e em seus precursores celulares, promove a inibição da apoptose dos osteoclastos, estimulação da diferenciação de precursores de osteoclastos e ativação dessas células maduras (Boyle et al., 2003; Feng, 2005).

O RANK é um receptor expresso na superfície de precursores de osteoclastos hematopoiéticos (Boyle et al., 2003), osteoclastos maduros, condrócitos e células epiteliais de glândulas mamárias (Bezerra et al., 2005).

A osteoprotegerina (OPG) é outra proteína da família de receptores de TNF e conhecida como fator inibidor de osteoclastogênese (OCIF). É sintetizada e liberada por células osteoblásticas ativadas e células do estroma da medula óssea. Funciona como um receptor de encaixe solúvel para RANKL e compete com o RANK para inativar RANKL (Gallagher, 2008). É um inibidor efetivo da maturação e ativação de osteoclastos *in vivo* e *in vitro* (Bezerra et al., 2005). Ela é inibida pela prostaglandina E2 (PGE2) e glicocorticóides e ativada pela vitamina D, íons Ca^{+2} e TGF β (McCormick, 2007).

Níveis elevados de OPG em ratos causam osteopetrose (Bucay et al., 1998), bem como camundongos deficientes em OPG

apresentam osteoporose severa e alta incidência de fraturas, revelando que a massa óssea correlaciona-se com os níveis de OPG nas células (Golmia, Scheinberg, 2004). De acordo com Gallagher (2008), o estrógeno aumenta a secreção de OPG e este pode ser um dos principais mecanismos pelo qual o estrógeno inibe a reabsorção óssea.

Segundo Kawamoto et al. (2002), a deficiência de estrógeno resulta no aumento do RANKL seguindo por uma aceleração da formação osteoclástica. Na osteoporose pós-menopausa existem relatos de produção diminuída de OPG resultante da diminuição de estrógeno, apesar dos níveis séricos estarem elevados numa tentativa de compensar o declínio de massa óssea (Golmia, Scheinberg, 2004).

O balanço da expressão RANK-RANKL-OPG tem sido estudado em casos de osteoporose (Golmia, Scheinberg, 2004), osteopetrose (Kobayashi et al., 2009), artrite reumatóide (Gallagher, 2008), doença periodontal (Boyle, 2003; Peruzzo et al., 2008), tumores odontogênicos (Silva et al., 2008), movimentação ortodôntica (Yamaguchi, 2009) e diabetes (Amorim et al., 2008).

Lui et al. (2005) estudaram os níveis séricos de RANKL e OPG em 504 mulheres na pré e pós-menopausa. Esses autores pesquisaram a relação entre os níveis séricos de OPG e RANKL com a idade, menopausa, marcadores bioquímicos e densidade óssea mineral em mulheres chinesas de 20 a 75 anos. Foi encontrada uma relação positiva entre idade e concentrações de OPG, porém, uma correlação negativa com o RANKL. Comparado com mulheres na pré-menopausa, as mulheres na pós-menopausa apresentaram altos níveis séricos de OPG e baixos níveis de RANKL. Além disso, não foi observada nenhuma diferença desses marcadores de remodelação entre mulheres saudáveis, com osteopenia e com osteoporose na pós-menopausa, nem relação entre esses marcadores e densidade mineral óssea. Os autores concluíram que embora as concentrações séricas de OPG e RANKL não tenham apresentado relação com a densidade óssea mineral, a idade e a

menopausa, mudança nos níveis séricos de RANKL e OPG pode ser um mecanismo de proteção contra a acelerada perda óssea em mulheres na menopausa.

Jorgensen et al. (2010) estudaram a relação entre densidade mineral óssea e níveis séricos de OPG e RANKL em 2.003 homens e 2.134 mulheres. Os autores observaram que a densidade mineral óssea foi negativamente associada com OPG, tanto em mulheres quanto nos homens, e que os níveis de RANKL não foram associados com a DMO. Apesar de não conseguirem observar relação entre RANKL e a idade, os autores observaram aumento de OPG com a idade em ambos os sexos, especialmente nas mulheres na pós-menopausa. Além disso, nas mulheres na pós-menopausa que não faziam reposição hormonal, a perda óssea aumentou proporcionalmente com a OPG.

Jabbar et al. (2011) investigaram a relação entre doença periodontal, citocinas e vitamina D plasmáticas e densidade óssea mineral em mulheres com e sem osteoporose. Os autores observaram doença periodontal ativa ou inativa e puderam concluir que a doença periodontal é mais comum em mulheres com osteoporose associada a baixos níveis de vitamina D e altos níveis de RANKL e OPG. Desta forma, os autores relatam a importância dos marcadores bioquímicos de *turnover* ósseo.

2.9 Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (TRAP)

Os osteoclastos são células multinucleares, formadas pela fusão de progenitores mononucleares da família dos monócitos/macrófagos, sendo que a sua atividade pode ser avaliada por marcadores bioquímicos específicos (Teitelbaum et al., 2000). Um marcador clássico é representado pela Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (TRAP). TRAP é uma enzima lisossômica, que quando

sintetizada pelos osteoclastos reflete a sua atividade, sendo estes denominados TRAP-Positivos (TRAP⁺) (Feng, 2005).

A TRAP também possui uma importante função no processo de reabsorção óssea, devido ao fato de que a principal proteína da matriz óssea, a osteonectina, constitui como um substrato para essa enzima, que promove, portanto, a degradação catabólica da matriz óssea (Oddie et al., 2000; Kobayashi et al., 2009). Ek-Rylander et al. (1994) acrescentam que a TRAP também exerce uma atividade reguladora da adesão dos osteoclastos à superfície óssea.

Zhang et al. (2007) estudaram o efeito da deficiência de estrógeno na síntese de RANKL, OPG e na marcação de células TRAP⁺ em lesões peripicais induzidas em ratas. Uma semana após a cirurgia de ovariectomia ou Sham, foi induzida lesão periapical no primeiro molar inferior e em seguida as eutanásias ocorreram com 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Foi observado que aos 14 dias, ambos os grupos alcançaram o pico de marcação de RANKL, OPG e TRAP e que o grupo ovariectomizado apresentou maiores índices em todas as marcações. Desta forma, os autores concluíram que a deficiência de estrógeno aumentou a destruição óssea periapical, devido ao aumento de RANKL e de células TRAP⁺ no grupo ovariectomizado.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a influência da deficiência estrogênica, associada ou não à dieta deficiente em cálcio, sobre a perda óssea, a atividade de osteoclastos e os marcadores teciduais de remodelação óssea, na doença periodontal induzida em ratas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Animais da FO-SJC sob o protocolo nº 01/2008-PA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Este estudo foi realizado de acordo com o colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), o qual rege os Princípios Éticos para a Experimentação Animal. Foram utilizadas 96 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, *variação albinus*, Wistar), com noventa dias de idade, peso aproximado de 300g, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas e receberam ração controlada (22g/d/rato) e água *ad libitum*.

4.2 Grupos experimentais

As ratas foram inicialmente divididas de modo randomizado em três grupos: grupo Sham (n=32), ratas do grupo controle; grupo OVZ (n=32), ratas ovariectomizadas que receberam dieta padrão e grupo OVZ' (n=32), ratas ovariectomizadas que receberam dieta especial deficiente em cálcio.

4.3 Procedimentos cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, com instrumentais devidamente esterilizados. O cirurgião e auxiliares estavam paramentados com aventais esterilizados em autoclave, além de materiais descartáveis como máscaras, gorros e luvas.

4.3.1 Anestesia

Foi utilizado para anestesia geral solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Anasedan - Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativa, analgésica e relaxante muscular e de Ketamina base (Dopalen - Agribands do Brasil LTDA), anestésico geral, nas respectivas proporções de 1ml/0,5ml na dose de 0,1ml/100g, via intramuscular, na parte interna da coxa dos animais.

4.3.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia

As ratas foram randomizadas em três grupos experimentais: grupos ovariectomizados (OVZ e OVZ') e grupo Sham (falsa ovariectomia), com 32 animais cada. A pesagem de todos os animais foi realizada ao iniciar o experimento e repetida no dia da eutanásia.

Os animais dos grupos OVZ e OVZ', após anestesia, submeteram-se a cirurgia de ovariectomia. Foi realizada tricotomia da região abdominal lateral e antissepsia com álcool iodado. A pele foi incisada longitudinalmente ao nível dos rins e abaixo da costela mais inferior, com lâmina de bisturi nº 15. Em seguida, feita a divulsão do tecido subcutâneo, a musculatura foi incisada. O ovário foi exposto e confeccionou-se uma ligadura logo abaixo do mesmo para a hemostasia com fio de algodão estéril. Posteriormente, o ovário juntamente com a gordura circundante e uma pequena porção do útero foram excisados. As camadas musculares foram suturadas com fio de sutura reabsorvível Categut nº 4 (Cirumédica-Brasil) e a pele, com fio de seda nº 3 (Ethicon-Johnson-Johnson). Todos os procedimentos foram realizados bilateralmente.

Nos animais do grupo Sham, foi feita a falsa ovariectomia ou cirurgia Sham, na qual todos os procedimentos descritos acima foram realizados, exceto a hemostasia e remoção dos ovários. Estes foram expostos e reposicionados para a simulação do estresse cirúrgico.

A eficácia da ovariectomia foi confirmada pela acentuada atrofia observada nos cornos uterinos no momento da eutanásia (Figura 1).

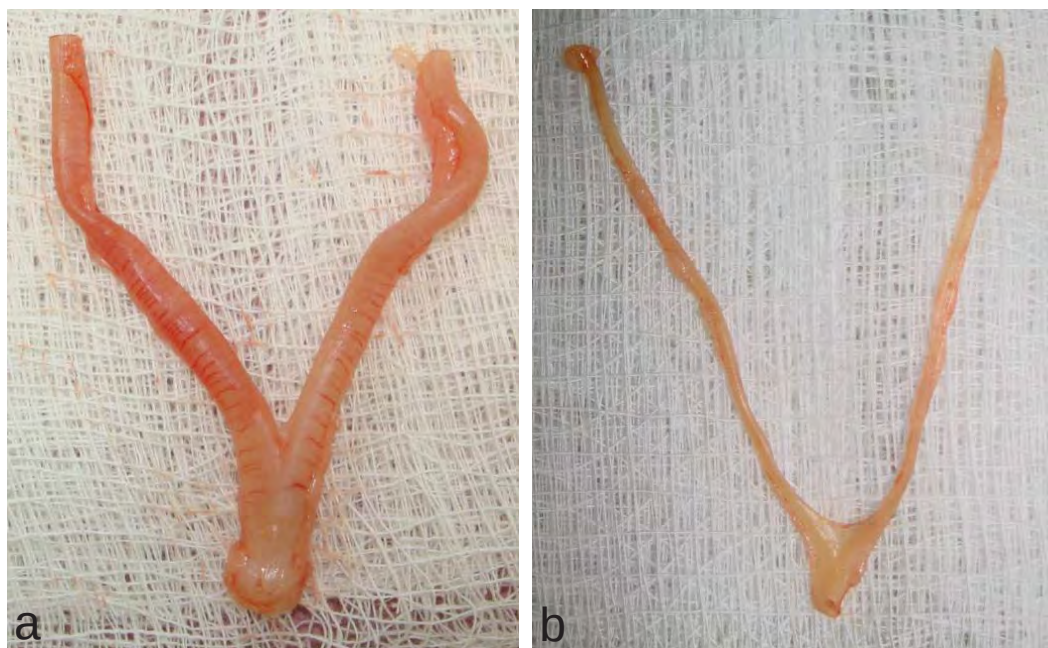


Figura 1 – Comprovação do efeito da ovariectomia: a) aspecto macroscópico dos cornos uterinos de uma rata do grupo Sham; b) aspecto macroscópico dos cornos uterinos de uma rata do grupo OVZ.

4.3.3 Dieta

Após a cirurgia de ovariectomia e falsa-ovariectomia, os grupos Sham e OVZ receberam ração padrão e o grupo de animais OVZ' recebeu ração especial com baixo teor de cálcio até o dia da eutanásia (Figura 2). A quantidade de ração ingerida por dia foi de 22g/d/rata, baseada no consumo médio diário dos animais, com o objetivo de impedir o aumento excessivo do peso das ratas. Foi fornecida ração padrão (Guabi Nutrilabor®) com teor de cálcio de até 1,2% e fósforo de no mínimo 0,8% e ração especial denominada Dieta AIN-93M cálcio (0,1%) e fósforo (0,5%) fabricada por RHOSTER Indústria e Comércio LTDA, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil.

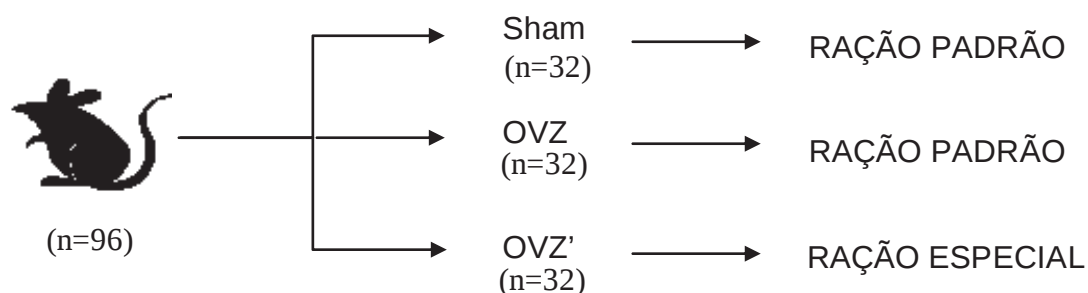


Figura 2 – Distribuição dos grupos experimentais.

4.3.4 Indução da doença periodontal

Após sessenta dias da ovariectomia, todas as ratas foram novamente anestesiadas e imobilizadas em mesa apropriada que as mantiveram com a boca aberta. Foi inserido um fio de linha de algodão da marca Corrente Laranja (Coats Corrente Ltda, São Paulo, Brasil), ao redor da coroa do primeiro molar inferior esquerdo. A ligadura foi atada no lado mesial, mantendo-se subgengival nas faces distal, lingual e vestibular e mantida por três, sete, 14 e 30 dias para o desenvolvimento da doença periodontal (Figura 3).



Figura 3 - Ligadura inserida ao redor do primeiro molar inferior esquerdo para indução da doença periodontal.

4.3.5 Eutanásia

Decorridos 3, 7, 14 e 30 dias da inserção da ligadura, os oito animais de cada subgrupo foram anestesiados e pesados. Em seguida, foi realizada a eutanásia por meio da técnica de perfusão cardíaca, através da injeção de formalina a 4% para possibilitar a fixação dos tecidos (Figura 4). A mandíbula foi removida, o tecido mole excedente eliminado e o material fixado em solução de formol a 10%.



Figura 4 – Eutanásia por meio da técnica de perfusão cardíaca com formalina 4%.

4.4 Processamento do material

4.4.1 Processamento histológico

Quarenta e oito horas após a fixação da mandíbula em formol a 10%, estas peças foram hemisseccionadas (Figura 5) e a metade esquerda foi imersa em solução de EDTA a 10% para desmineralização por um período de 90 dias, até serem consideradas próprias para a microscopia, pelo teste de penetração da agulha. As peças foram lavadas e desidratadas em etanol, diafanizadas e incluídas em parafina com a face lingual voltada para o plano de corte. Com o auxílio de um micrótomo foram realizados cortes até a visualização total da furca do primeiro molar com ajuda de um microscópio. Foram obtidos doze cortes frontais semi-

seriados com espessura de 5µm e seis cortes de 3µm da região de furca (Figura 6).

Após a montagem das lâminas, estas foram colocadas em estufa a 60°C por 24 horas para remoção do excesso de parafina. Parte dos cortes com 5 µm de espessura foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE) a fim de ser analisados por microscopia de luz e fotografados.

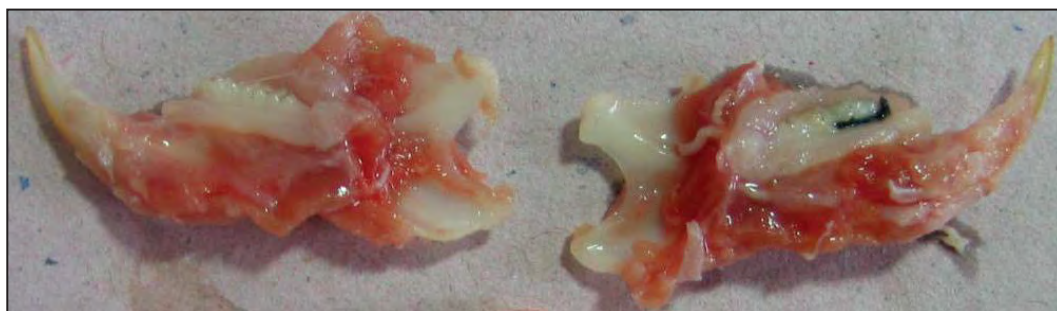


Figura 5 - Mandíbula hemisseccionada, com presença da ligadura em torno do primeiro molar inferior esquerdo.

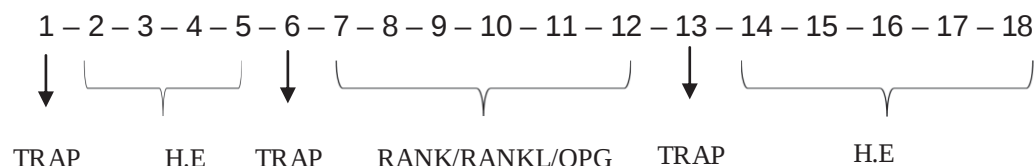


Figura 6 – Distribuição das lâminas segundo a coloração, reação enzimoistoquímica (TRAP) ou imunoistoquímica (RANK/RANKL/OPG).

4.4.2 Processamento enzimoistoquímico

Para a reação enzimoistoquímica foram utilizados cortes com 5µm de espessura. Para marcação da atividade da TRAP, foi utilizado o *Kit TRAP para detecção de fosfatase ácida* (387A, Sigma-Aldrich®, St.Louis, MO, USA), segundo especificação do fabricante.

- a) preparo da solução de fixação: 25 ml de solução de citrato, 65 ml de acetona e 8 ml de formaldeído 8%;
- b) imersão das lâminas na solução de fixação por 30 segundos e posterior lavagem em água deionizada;
- c) preparo de 2 soluções contendo em cada tubo de ensaio 0,5 ml de solução base de granada GBC e 0,5 ml de nitrito de sódio;
- d) preparo das soluções A e B em diferentes recipientes contendo em cada: 45 ml de água deionizada pré-aquecida a 37 °C, 1 ml da solução descrita no passo anterior, 0,5 ml de solução de fosfato AS-BI naftol, e 2 ml de solução de acetato;
- e) adição de 1 ml de solução de tartarato no recipiente B;
- f) imersão das lâminas nos recipientes aquecidos a 37 °C em banho-maria por 1 hora, sendo que das 2 lâminas obtidas de cada animal uma foi inserida no recipiente A e outra no recipiente B;
- g) duas passagens em água deionizada;
- h) contra-coloração com hematoxilina de Gill número 3 por 2 minutos;
- i) lavagem em água corrente por 5 minutos;
- j) secagem em temperatura ambiente;
- k) montagem em Permount[®] (Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA).

Nas lâminas obtidas após imersão na solução B (contendo tartarato), as células precursoras de osteoclastos (mononucleadas) e os osteoclastos (multinucleadas) corados em púrpura foram quantificados.

4.4.3 Processamento imunoistoquímico

Para a reação imunoistoquímica foram utilizados cortes com 3µm de espessura, em lâminas silanizadas.

Os cortes foram submetidos a reações imunoistoquímica segundo o protocolo do laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – FOSJC/UNESP:

- a) desparafinização em 2 banhos de xilol por 5 minutos cada, a temperatura ambiente;
- b) reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes, absoluto, 70% e 50% por duas vezes seguidas cada, por 3 minutos para cada imersão. Passagem em água destilada;
- c) recuperação antigênica. Quando utilizado o citrato, pH 6,0, as lâminas foram acondicionadas e imersas em recipiente contendo a solução, e levadas ao forno de microondas, onde foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de 5 minutos a potência 7, seguida de resfriamento a temperatura ambiente. Quando utilizado a pepsina, pH 1,8, as lâminas foram imersas na solução e levadas à estufa a 60°C por 10

minutos, e seguida, à estufa à 37°C por 50 minutos. Quando utilizado a proteinase K nas lâminas, a duração foi de 6 minutos a temperatura ambiente. Após a recuperação antigênica, realizou-se lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se 2 passagens em água destilada (Quadro 1);

- d) bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de álcool metílico 50% e peróxido de hidrogênio 20 volumes, na proporção 1:1, em dois ciclos de 5 minutos cada;
- e) lavagem em água corrente por 10 minutos e 2 passagens em água destilada;
- f) imersão por duas vezes em tampão Tris hidroximetil amino metano (pH 7,4), durante 5 minutos cada;
- g) incubação com soro albumina bovina (BSA) diluído em solução de TRIS (pH 7,4) por 1 hora, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;
- h) incubação com os anticorpos primários (Quadro 1);
- i) lavagem e imersão em solução de TRIS em 2 ciclos de 5 minutos cada;
- j) incubação do anticorpo secundário (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat - DAKO CO., Califórnia, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente;
- k) lavagem e imersão em solução de TRIS em 2 ciclos de 5 minutos cada;

- l) incubação do anticorpo terciário streptavidina-biotina-peroxidase (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat - DAKO CO., Califórnia, USA) por 30 minutos à temperatura ambiente. Quando utilizado o Sistema de visualização Histofine Simple Stain Max PO Multi (Nichirei Biosciences Inc. -Universal Immuno-peroxidase polymer anti mouse and rabbit), o tempo de incubação foi de 30 min;
- m) lavagem e imersão em solução de TRIS em 2 ciclos de 5 minutos cada;
- n) revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB) (DAKO CO., Califórnia, USA);
- o) duas lavagens em solução de TRIS;
- p) lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- q) contra-coloração com a hematoxilina de Mayer por 2 minutos;
- r) lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- s) os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis (50%, 70% e álcool absoluto) por 1 minutos cada, diafanizadas em xilol e montados com Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, New Jersey, USA) para microscopia .

Quadro 1 - Anticorpos, diluição, incubação (tempo, temperatura e kit) e recuperação antigênica

ANTICORPO PRIMÁRIO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	DILUIÇÃO	INCUBAÇÃO
OPG	Pepsina	1:1.000	1 hora temperatura ambiente Kit LSAB
RANKL	Proteinase K	1:100	30 minutos temperatura ambiente Histofine
RANK	Citrato	1:75	Overnight 4°C Kit LSAB

Os controles negativos foram feitos pela substituição do anticorpo primário pela soro-albumina bovina. Controles positivos foram realizados conforme instruções do fabricante do anticorpo primário.

Foi utilizado anticorpo policlonal de coelho para Osteoprotegerina (ab73400), anticorpo monoclonal de rato para RANKL (ab45039) e anticorpo monoclonal de rato para RANK (ab12008) (Abcam, Inc., Cambridge, MA, USA).

4.5 Análise dos resultados

Os resultados foram analisados com base nos aspectos histológicos, histomorfométricos, enzimoistoquímicos e imunoistoquímicos. Os valores obtidos (APÊNDICES A, B, C, D e E) foram submetidos a testes estatísticos.

4.5.1 Análise histológica

A análise histológica foi realizada em cortes corados por HE em microscópio de luz. Foi analisada a região da furca do primeiro molar inferior esquerdo, a fim de verificar os aspectos do tecido ósseo, do ligamento periodontal, a presença de infiltrado inflamatório, a migração de epitélio juncional e outros sinais de doença periodontal.

As imagens das lâminas histológicas foram fotografadas e capturadas por meio de câmera digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplada ao microscópio de luz (Axiophot 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision Release 4.7.2).

4.5.2 Análise histomorfométrica

Na análise histomorfométrica foi avaliada a porcentagem média de área ocupada por matriz óssea em aumento de 200X, em uma

região delimitada por um retículo com área de $0,27\text{mm}^2$. Este retículo de padrão quadrangular, com 70 pontos de intersecção, foi posicionado na região de furca (Figura 7) com auxílio do programa computacional NIH *Image J* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), versão 1.31 para *Windows* (domínio público). Foram quantificados os pontos de intersecção que recaíram sobre a matriz óssea (Figura 8) em oito cortes (um de cada lâmina) por animal, totalizando 560 pontos por animal. A comparação entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham e OVZ X OVZ'.

Os valores obtidos em cada grupo foram submetidos aos testes estatísticos e comparados entre si.



Figura 7 – Área da furca do primeiro molar inferior esquerdo demarcada para análise com auxílio do retículo. HE, aumento original 25X.

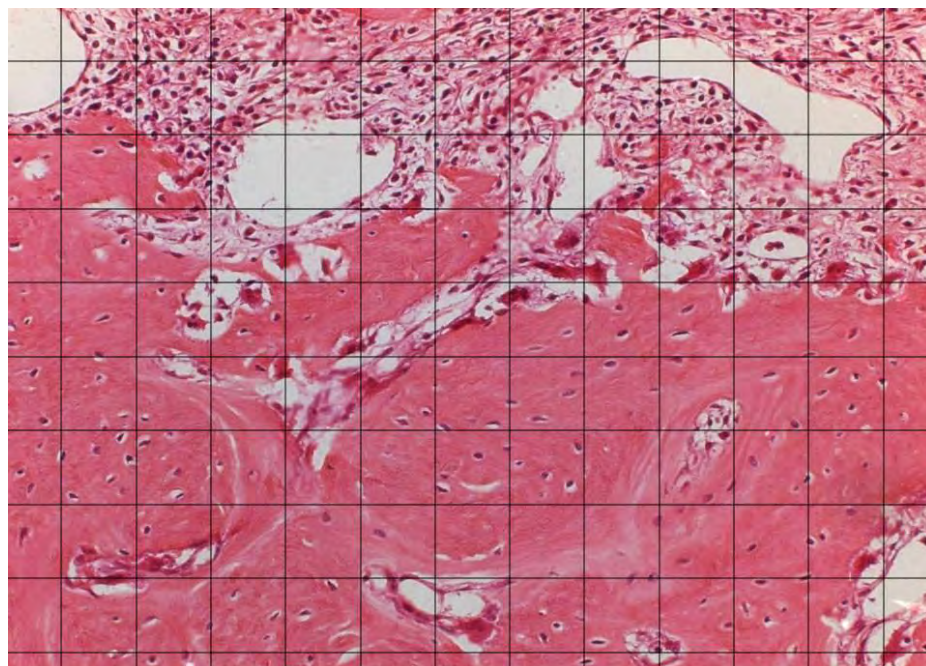


Figura 8 - Retículo com padrão quadrangular posicionado na região de furca do primeiro molar inferior com auxílio do programa *Image J*. HE, aumento original 200X.

4.5.3 Análise enzimoistoquímica

Para a análise enzimoistoquímica foi realizada a contagem de células TRAP+, considerando tanto os pré-osteoclastos (mononucleados) quanto os osteoclastos (multinucleados), em dois campos de 400X de um mesmo corte, na região da furca do primeiro molar inferior, de modo que não houvesse sobreposição de imagens. Os valores foram expressos somando-se o número de células TRAP+ dos dois campos. A comparação entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham e OVZ X OVZ'.

4.5.4 Análise imunoistoquímica

Para a análise imunoistoquímica foram avaliados três anticorpos: OPG, RANKL e RANK. Para cada tipo de anticorpo foi calculado o índice de marcação que corresponde ao produto da intensidade (0-neg; 1-leve; 2-moderado; 3-intenso) multiplicado pela porcentagem (0-não; 1-<25%; 2-25-50%; 3->50%) (Tobón-Arroyave et al., 2005) da imunomarcação dos osteoblastos e osteoclastos. A análise foi realizada em dois campos de 400X de um mesmo corte na região da furca do primeiro molar inferior, de modo que não houvesse sobreposição de imagens. A comparação de cada anticorpo entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham, OVZ X OVZ'.

4.5.5 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises histomorfométrica, enzimoistoquímica e imunoistoquímica foram analisados estatisticamente em duas partes. Na primeira parte foram comparados os grupos OVZ e Sham, tendo como variáveis hormônio e tempo de eutanásia. Na segunda parte foram comparados os grupos ovariectomizados entre si, analisando as variáveis dieta e tempo de eutanásia. Para comparar os grupos OVZ e Sham e os grupos OVZ e OVZ' foi utilizado o teste de Mann-Whitney em todas as variáveis e em todos os momentos (Quadro 2). Em todos os testes foi definido um nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$), com intervalo de confiança estatística de 95%.

Antes das análises, todas as lâminas foram codificadas, para não permitir a identificação do grupo, possibilitando a obtenção cega dos dados.

Quadro 2 - Grupos, variáveis e testes utilizados para a análise estatística

	GRUPOS	VARIÁVEIS	TESTE UTILIZADO
Primeira parte	OVZ X Sham	Hormônio Tempo de eutanásia	Mann-Whitney
Segunda parte	OVZ X OVZ'	Dieta Tempo de eutanásia	Mann-Whitney

5 RESULTADOS

5.1 Resultado histológico

O resultado histológico foi baseado na análise realizada na região da furca do primeiro molar inferior esquerdo, a fim de verificar os aspectos do tecido ósseo, a presença de infiltrado inflamatório e outros sinais de doença periodontal.

Os cortes microscópicos revelaram fragmento de mandíbula contendo os molares seccionados no sentido mesio-distal. De maneira geral, os grupos Sham, OVZ e OVZ', apresentaram aspectos semelhantes entre si, diferindo apenas quanto ao período de sacrifício. Assim, as características foram descritas de acordo com os tempos de 3, 7, 14 e 30 dias. Contudo, algumas diferenças observadas foram destacadas conforme o grupo.

No período de 3 dias o septo ósseo do primeiro molar exibiu contorno irregular, estando constituído por tecido ósseo trabecular. As trabéculas presentes nos grupos ovariectomizados aparentemente eram mais delgadas do que as observadas no grupo Sham (Figura 9a). Na periferia das trabéculas verificou-se intensa atividade de reabsorção óssea caracterizada pela presença de lacunas de Howship, preenchidas por numerosos osteoclastos ou por pré-osteoclastos mononucleares ainda não fusionados, principalmente no grupo OVZ' (Figura 9b). Na região do ligamento periodontal observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear, sendo este mais intenso no grupo OVZ' (Figura 10b) que no grupo Sham (Figura 10a).

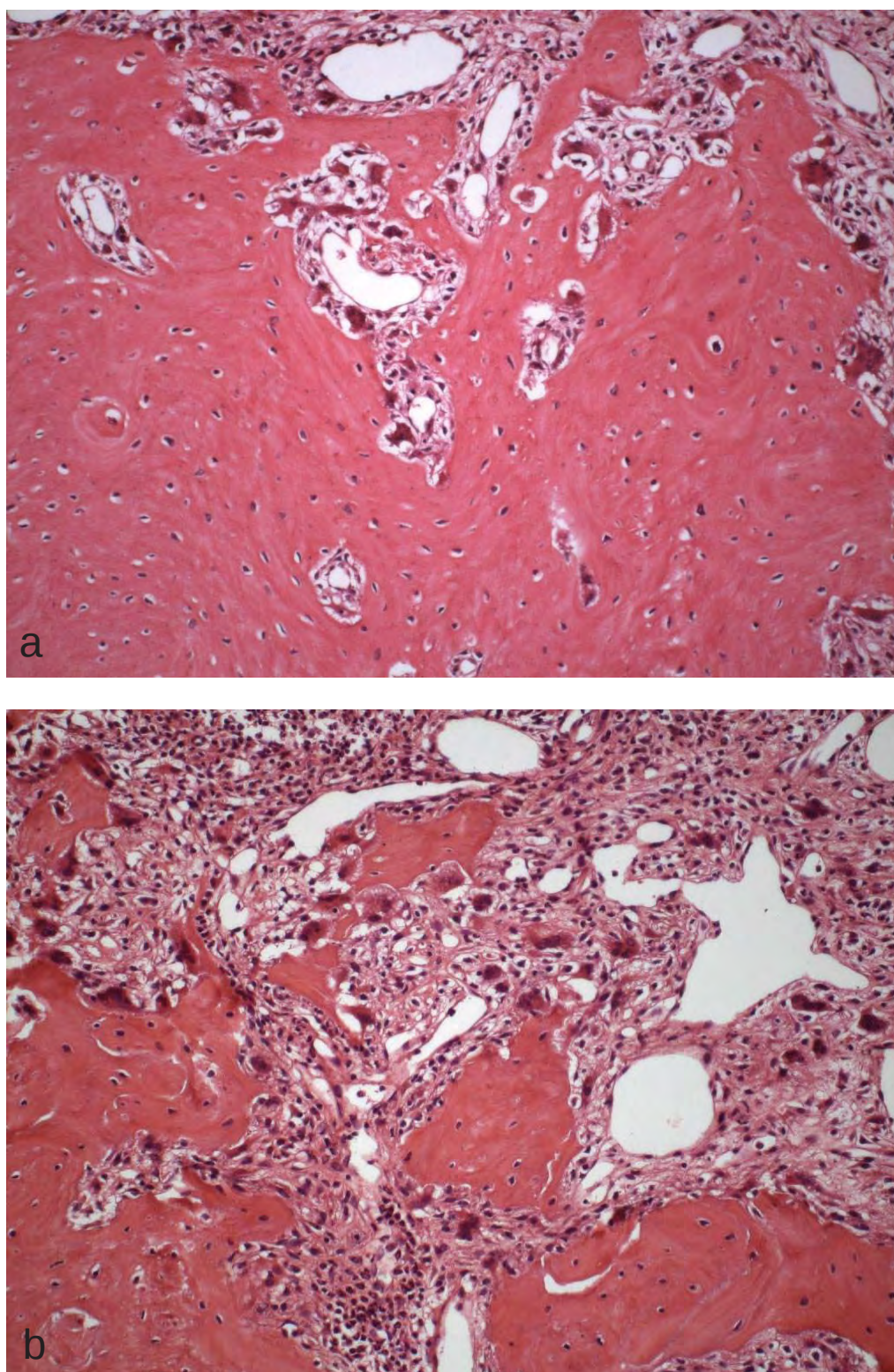


Figura 9 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo Sham: trabéculas ósseas espessas; b) Grupo OVZ': trabéculas ósseas delgadas. Em ambas: grande quantidade de osteoclastos circundando as trabéculas. HE, aumento original 200X.

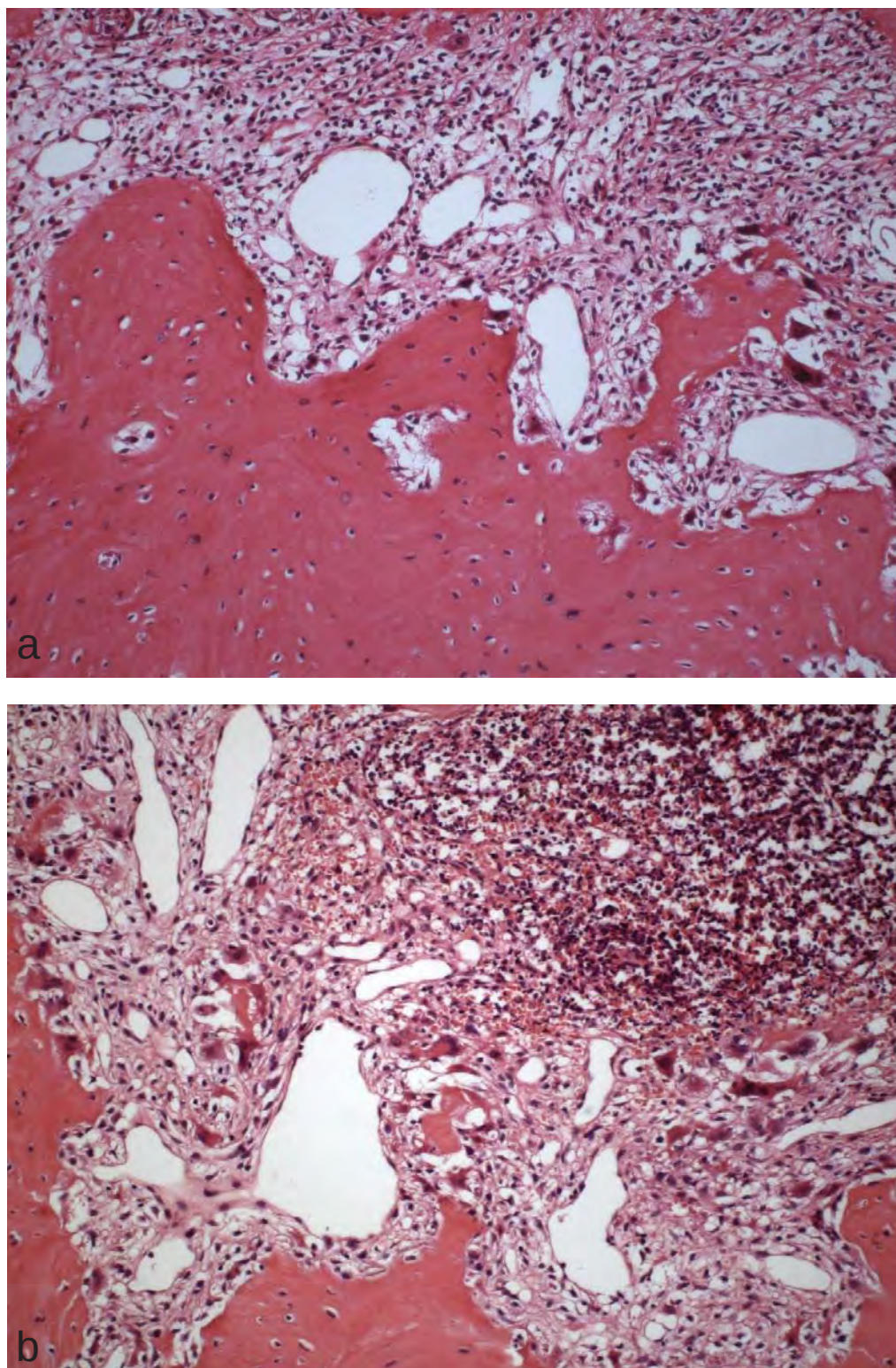


Figura 10 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo Sham: infiltrado inflamatório mononuclear discreto; b) Grupo OVZ: infiltrado inflamatório mononuclear intenso. HE, aumento original 200X.

Aos 07 dias o padrão de remodelação óssea das trabéculas foi mantido, uma vez que o septo ósseo também exibiu contorno irregular e as trabéculas ósseas aparentemente eram mais delgadas e com menor conectividade, principalmente nos grupos OVZ e OVZ'. Contudo, foi observado menor número de osteoclastos na periferia das trabéculas quando comparado ao período de 3 dias, independente do grupo (Figura 11). Observaram-se ainda osteoblastos achatados ou colunares, arranjados em fileiras contornando as trabéculas. Além disso, moderado infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear estava presente na região subjacente à furca.

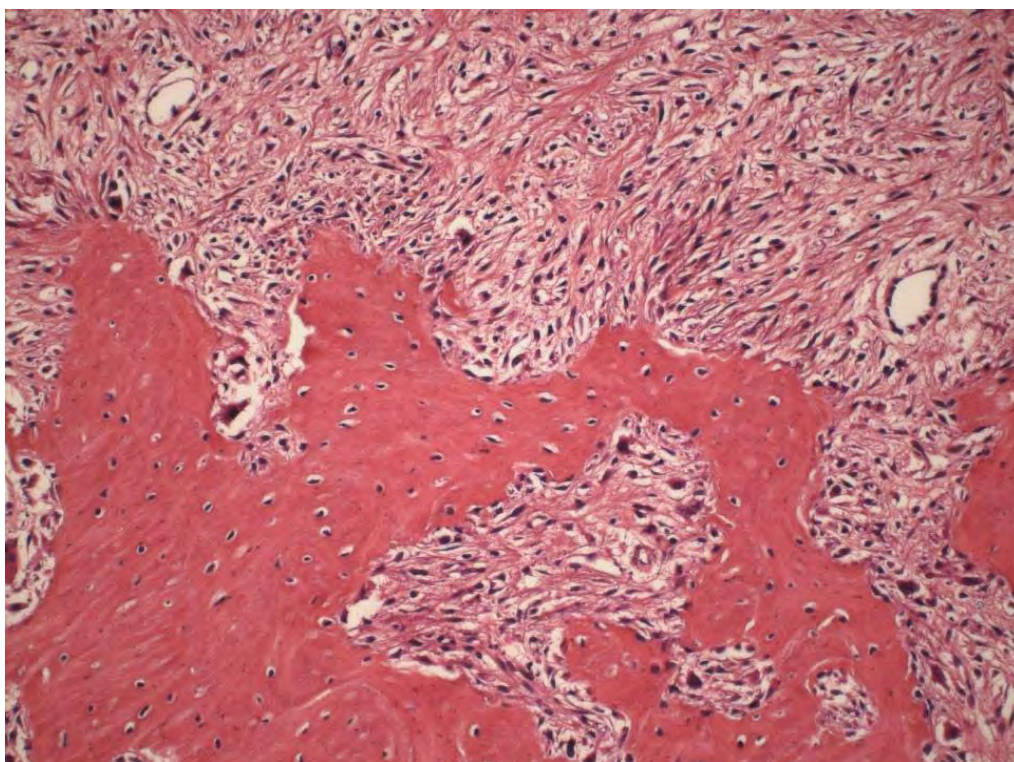


Figura 11 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 7 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ: pouca quantidade de osteoclastos circundando as trabéculas. HE, aumento original 200X.

No período de 14 dias o septo ósseo inter-radicular dos grupos mostrou-se menos compacto, sendo formado por trabéculas ósseas mais delgadas, porém exibindo numerosos e volumosos osteoblastos na periferia e menor quantidade de osteoclastos. Contudo, no grupo OVZ' as trabéculas apresentavam-se mais espessas quando comparadas aos outros grupos. Em diversos espécimes desse período observou-se migração de epitélio juncional para a região de furca, com moderado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear subjacente (Figura 12). O tecido de granulação foi mais evidente no grupo OVZ que no grupo Sham, apresentando alta celularidade, sendo constituído por fibroblastos volumosos e poucas áreas hemorrágicas. Focos de células inflamatórias crônicas também foram vistos.

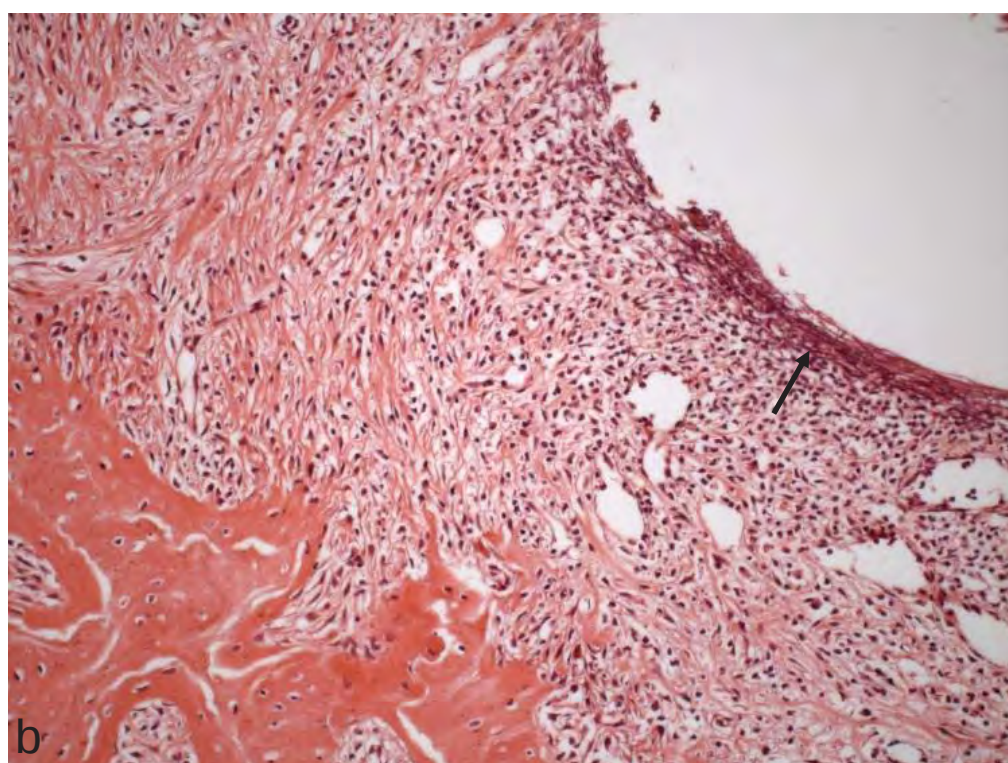


Figura 12 – a) Fotomicrografia do primeiro molar inferior, período de 14 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo Sham: migração do epitélio juncional (seta) para a região de furca; b) detalhe da região de furca com migração do epitélio juncional (seta). HE, aumento original a) 25X, b) 200X.

Aos 30 dias notou-se também o contorno irregular do septo ósseo, que se mostrou em geral mais compacto no grupo Sham do que no OVZ e OVZ'. Nestes três grupos, notou-se menor quantidade de osteoclastos do que nos períodos anteriores. Em diversos animais, em todos os grupos, notou-se migração de epitélio juncional para a região de furca, sendo observado discreto infiltrado inflamatório junto ao cimento da furca e abaixo do epitélio migrado. Também foram observadas ilhotas de epitélio odontogênico (Figura 13).

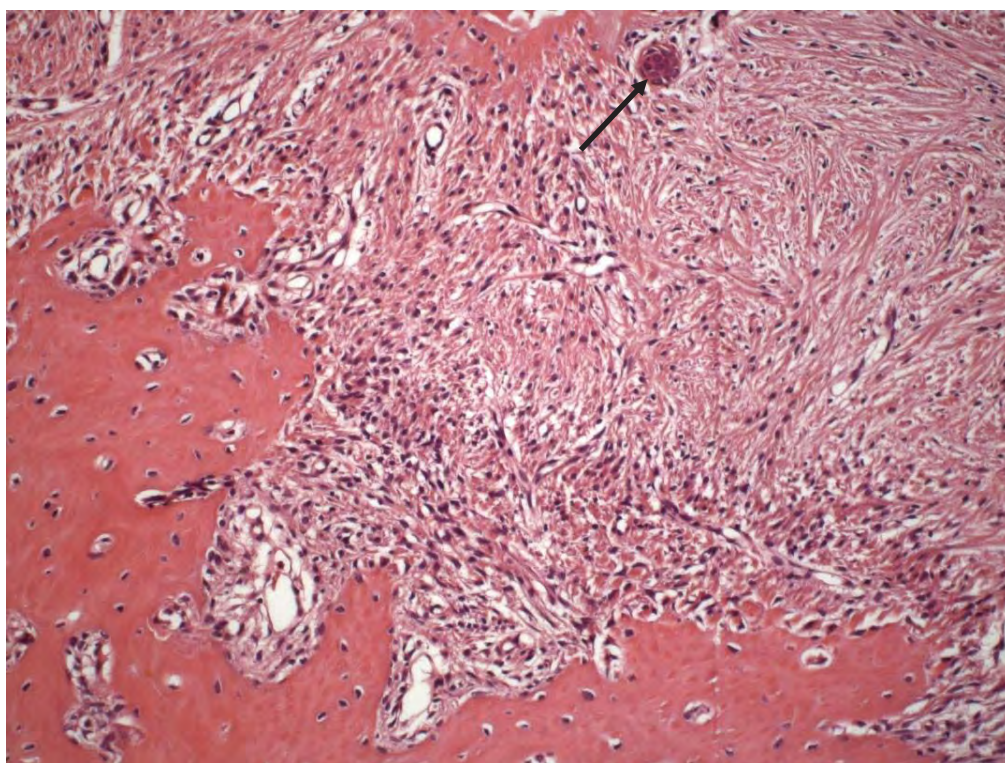


Figura 13 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 30 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ': contorno irregular do septo ósseo e ilhota de epitélio odontogênico (seta). HE, aumento original 200X.

5.2 Resultado histomorfométrico

O resultado histomorfométrico foi baseado na análise da porcentagem média de área ocupada por matriz óssea em uma região delimitada por um retângulo com área de $0,27\text{mm}^2$. A comparação entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham e OVZ X OVZ'.

5.2.1 Grupos OVZ X Sham

A média de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca obtida de cada grupo está representada na figura 14 e na tabela 1, segundo as variáveis, hormônio e tempo de eutanásia.

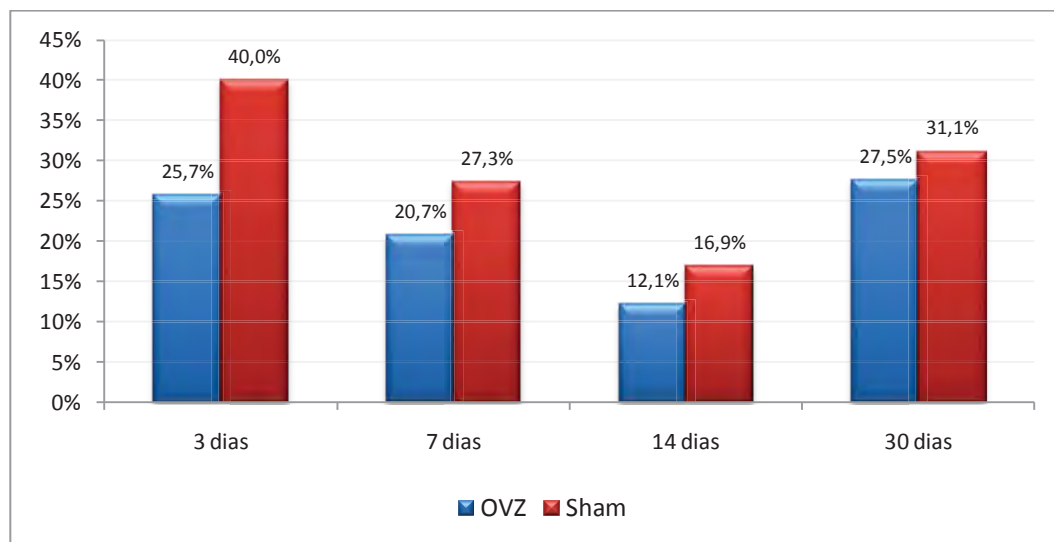


Figura 14 - Gráfico referente às médias de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e Sham.

Tabela 1 - Compara às médias de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca dos grupos OVZ e Sham por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	25,7%	8,5%	0,002*
	Sham	40,0%	5,7%	
7 dias	OVZ	20,7%	8,4%	0,227
	Sham	27,3%	14,7%	
14 dias	OVZ	12,1%	9,9%	0,401
	Sham	16,9%	9,4%	
30 dias	OVZ	27,5%	9,7%	0,753
	Sham	31,1%	13,5%	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou uma maior porcentagem de área de matriz óssea nos grupos Sham.

Analisando os grupos OVZ e Sham em todas as variáveis, o grupo Sham 3 dias foi o que apresentou maior porcentagem de matriz óssea na análise histomorfométrica. Foi observado que neste período, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVZ e Sham ($p=0,002$), tendo o grupo Sham maior porcentagem de matriz óssea (40,0%) em relação ao grupo OVZ (25,7%) (Figura 15).

Outro fato também observado foi que nos períodos inicial (3 dias) e tardio (30 dias) do desenvolvimento da doença periodontal, houve maior porcentagem de matriz óssea, comparados aos períodos de 7 e 14 dias de eutanásia, tanto para os grupos OVZ quanto para os grupos Sham.

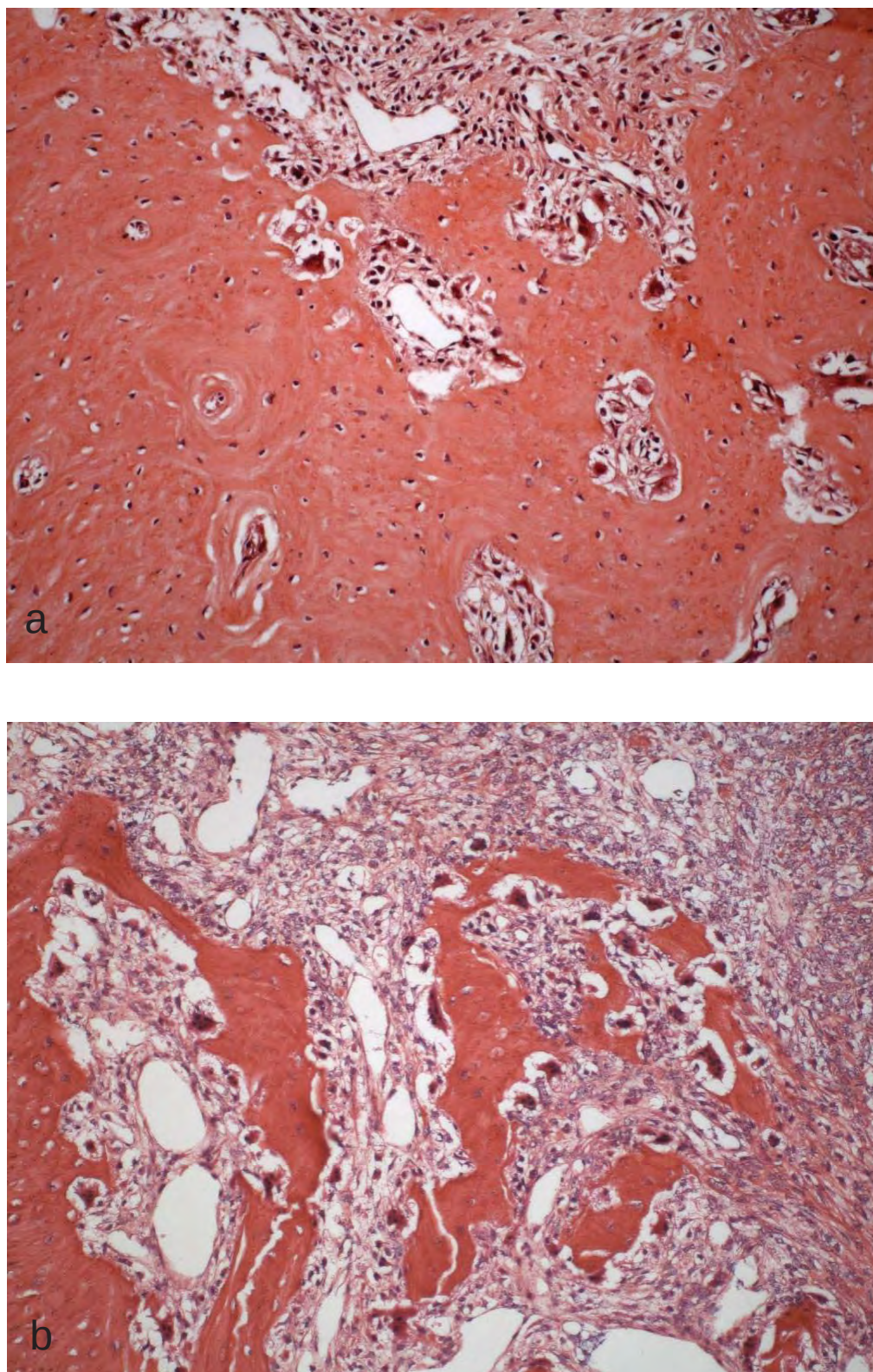


Figura 15 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo Sham; b) Grupo OVZ: menor quantidade de matriz óssea em b. HE, aumento original 200X.

5.2.2 Grupo OVZ X OVZ'

A média de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca obtida de cada grupo está representada na figura 16 e na tabela 2, segundo as variáveis, dieta e tempo de eutanásia.

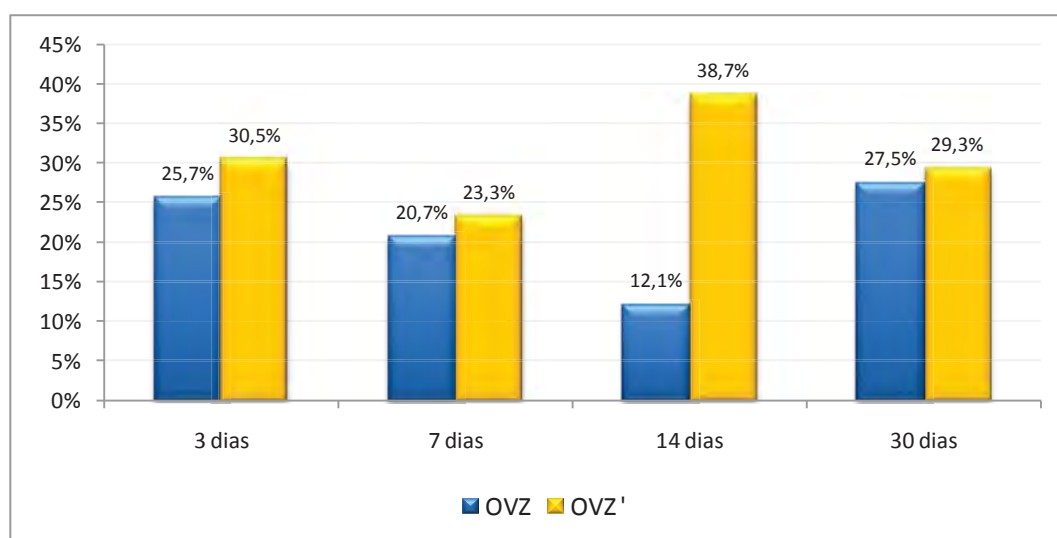


Figura 16 - Gráfico referente às medidas de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e OVZ'.

Tabela 2 - Comparação às médias de porcentagem de área de matriz óssea na região da furca dos grupos OVZ e OVZ' por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	25,7%	8,5%	0,401
	OVZ '	30,5%	11,9%	
7 dias	OVZ	20,7%	8,4%	0,345
	OVZ '	23,3%	11,7%	
14 dias	OVZ	12,1%	9,9%	0,005*
	OVZ '	38,7%	14,5%	
30 dias	OVZ	27,5%	9,7%	0,916
	OVZ '	29,3%	20,1%	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado do gráfico mostrou que os grupos OVZ' tiveram uma maior porcentagem de área de matriz óssea quando comparados aos grupos OVZ, apesar de apenas um período ter sido estatisticamente significativo.

Verifica-se que houve diferença estatisticamente significativa da porcentagem de matriz óssea entre as ratas dos grupos OVZ e OVZ' aos 14 dias ($p=0,005$) de eutanásia, caracterizando uma menor porcentagem no grupo OVZ (12,1%) comparada àquela apresentada pelo grupo OVZ' (38,7%) (Figura 17). Além disso, este último grupo também foi o que apresentou a maior porcentagem de matriz óssea (38,7%), analisando todos os grupos em todas as variáveis.

Foi observado que no início do desenvolvimento da doença periodontal, os grupos OVZ tiveram altas porcentagens de matriz óssea. Nos períodos intermediários houve uma curva decrescente desta porcentagem, seguida por um aumento no estágio avançado da doença.

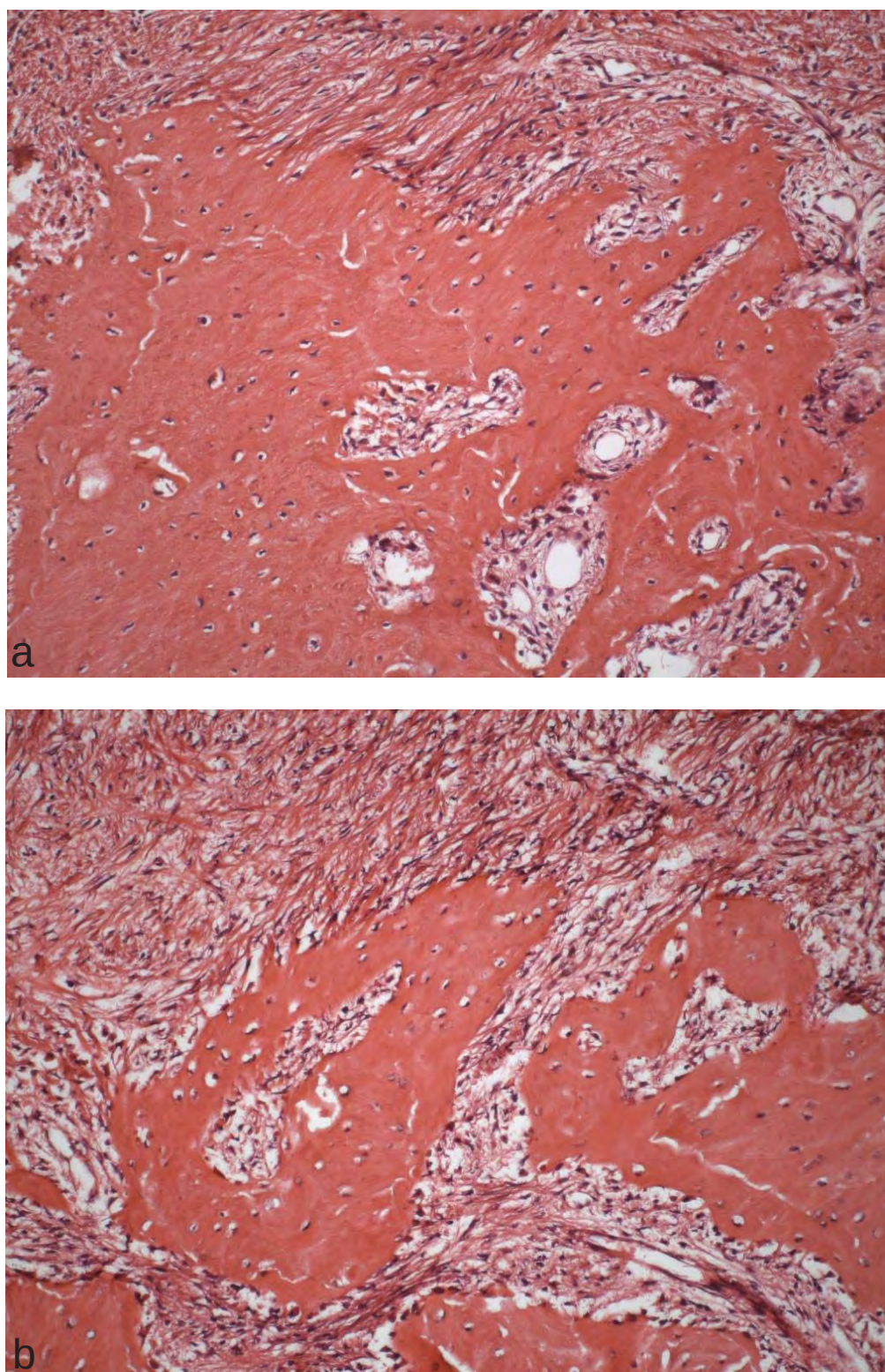


Figura 17 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 14 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo OVZ'; b) Grupo OVZ: menor quantidade de matriz óssea em b. HE, aumento original 200X.

5.3 Resultado da enzimoistoquímica

O resultado da enzimoistoquímica foi baseado na contagem de células TRAP+ em dois campos de 400X na região da furca. A comparação entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham e OVZ X OVZ'.

5.3.1 Grupos OVZ X Sham

A média do número de células TRAP+ na região da furca obtida de cada grupo está representada na figura 18 e na tabela 3, segundo as variáveis, hormônio e tempo de eutanásia.

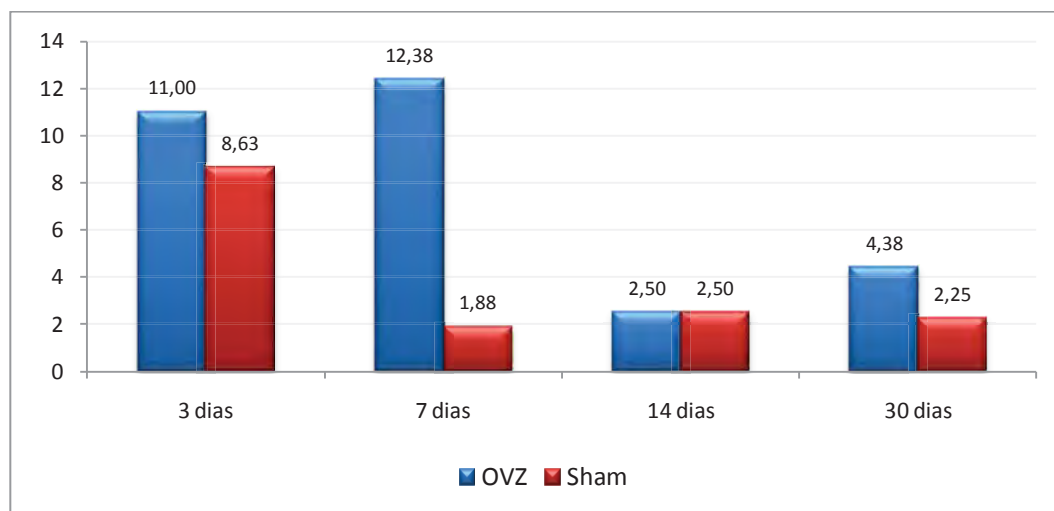


Figura 18 - Gráfico referente à média do número de células TRAP+ na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos Sham e OVZ.

Tabela 3 - Compara à média do número de células TRAP+ na região da furca dos grupos OVZ e Sham por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	11,00	8,23	0,562
	Sham	8,63	4,96	
7 dias	OVZ	12,38	10,85	0,010*
	Sham	1,88	1,25	
14 dias	OVZ	2,50	3,51	0,826
	Sham	2,50	3,25	
30 dias	OVZ	4,38	2,00	0,098
	Sham	2,25	2,66	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou uma maior quantidade de células TRAP+ nos grupos OVZ.

Analisando os grupos OVZ e Sham, o grupo OVZ 7 dias foi o que apresentou maior resultado na quantidade de células TRAP+ (12,38), sendo esta diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo Sham 7 dias (1,88) ($p=0,010$) (Figura 19).

Foi observado que nos grupos OVZ, a quantidade de células TRAP+ foi maior nos períodos iniciais da evolução da doença periodontal. Aos 14 dias de eutanásia, tanto o grupo OVZ quanto o Sham apresentaram o mesmo resultado (2,5). Já aos 30 dias, apesar de não ter sido significante estatisticamente, o grupo OVZ apresentou maior quantidade de matriz óssea comparado ao grupo Sham.

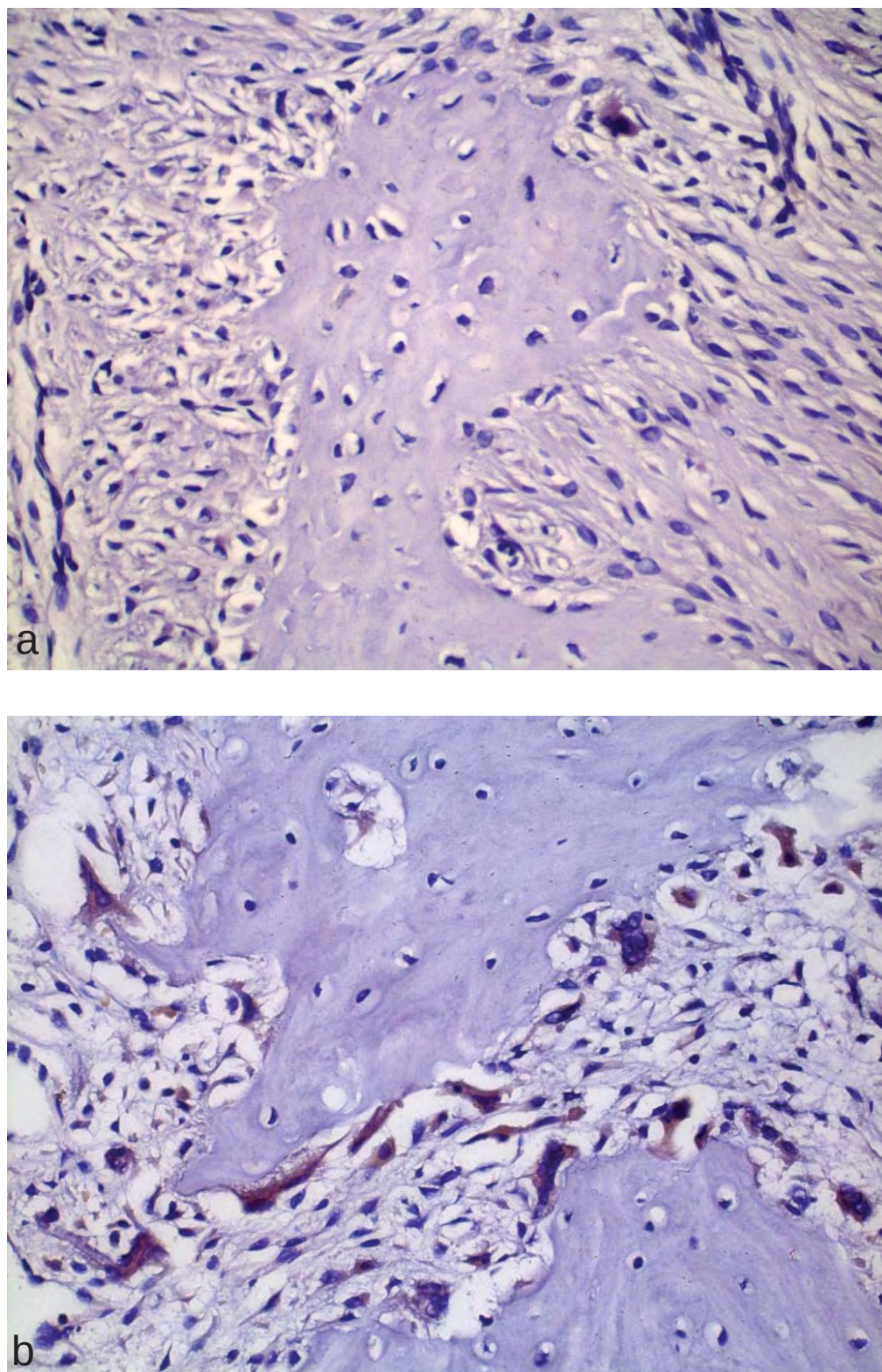


Figura 19 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 7 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo Sham; b) Grupo OVZ: maior número de células TRAP+ em b. Enzimoistoquímica, aumento original 400X.

5.3.2 Grupo OVZ X OVZ'

A média do número de células TRAP+ na região da furca obtida de cada grupo está representada na figura 20 e na tabela 4, segundo as variáveis, dieta e tempo de eutanásia.

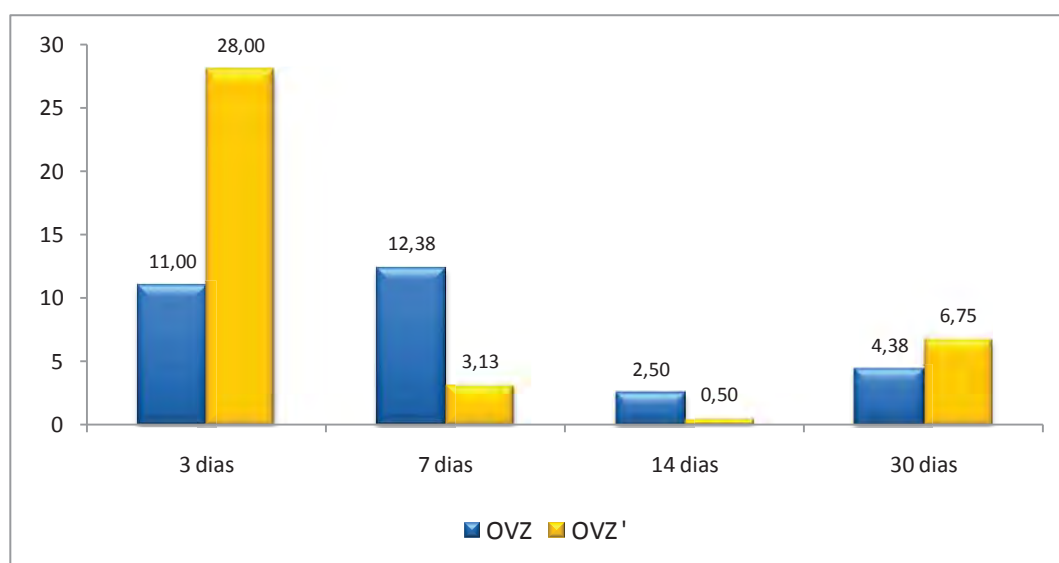


Figura 20 - Gráfico referente à média do número de células TRAP+ na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e OVZ'.

Tabela 4 - Compara a média do número de células TRAP+ na região da furca nos grupos OVZ e OVZ' por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	11,00	8,23	0,006*
	OVZ '	28,00	9,91	
7 dias	OVZ	12,38	10,85	0,040*
	OVZ '	3,13	2,75	
14 dias	OVZ	2,50	3,51	0,365
	OVZ '	0,50	0,53	
30 dias	OVZ	4,38	2,00	0,080
	OVZ '	6,75	3,20	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O gráfico mostrou que no período inicial e final da evolução da doença periodontal, os grupos OVZ' apresentaram maior quantidade de células TRAP+ que os grupos OVZ.

Resultados estatisticamente significantes ocorreram nos períodos 3 ($p=0,006$) e 7 ($p=0,040$) dias. Foi observado que no período de 3 dias os grupos OVZ' apresentaram maior resultado (28,0) quando comparados aos grupos OVZ (11) (Figura 21), enquanto que aos 7 dias, os grupos OVZ (12,38) superaram a quantidade de células TRAP+ dos grupos OVZ' (3,13).

Analisando os grupos OVZ e OVZ' em todas as variáveis, o grupo OVZ' 3 dias foi o que apresentou maior resultado na quantidade de células TRAP+ (28,0).

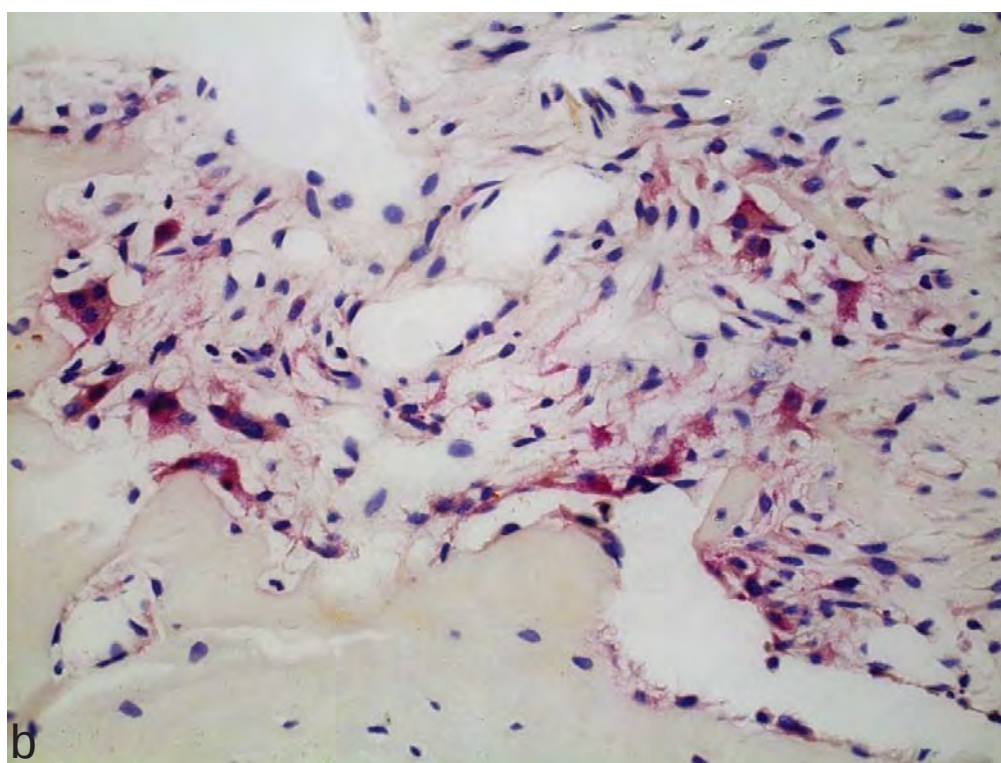
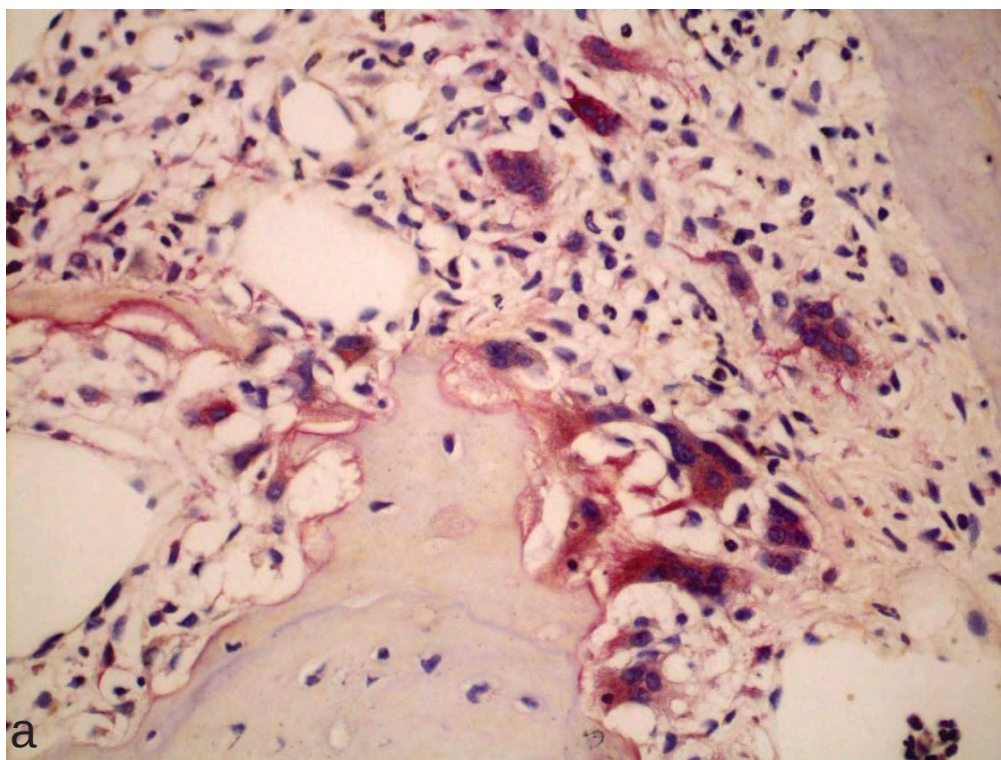


Figura 21 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal, marcação para TRAP: a) Grupo OVZ'; b) Grupo OVZ. Enzimoistoquímica, aumento original 400X.

5.4 Resultado da imunoistoquímica

O resultado da imunoistoquímica foi baseado na avaliação de três anticorpos: OPG, RANK e RANKL. Para cada tipo de anticorpo foi calculado o índice de marcação que corresponde ao produto da intensidade multiplicado pela porcentagem da imunomarcação dos osteoblastos (OPG e RANKL) ou osteoclastos (RANK). A comparação de cada anticorpo entre os grupos foi realizada em duas etapas: OVZ X Sham e OVZ X OVZ'.

5.4.1. OPG

5.4.1.1. Grupos OVZ X Sham

O índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 22 e na tabela 5, segundo as variáveis, hormônio e tempo de eutanásia.

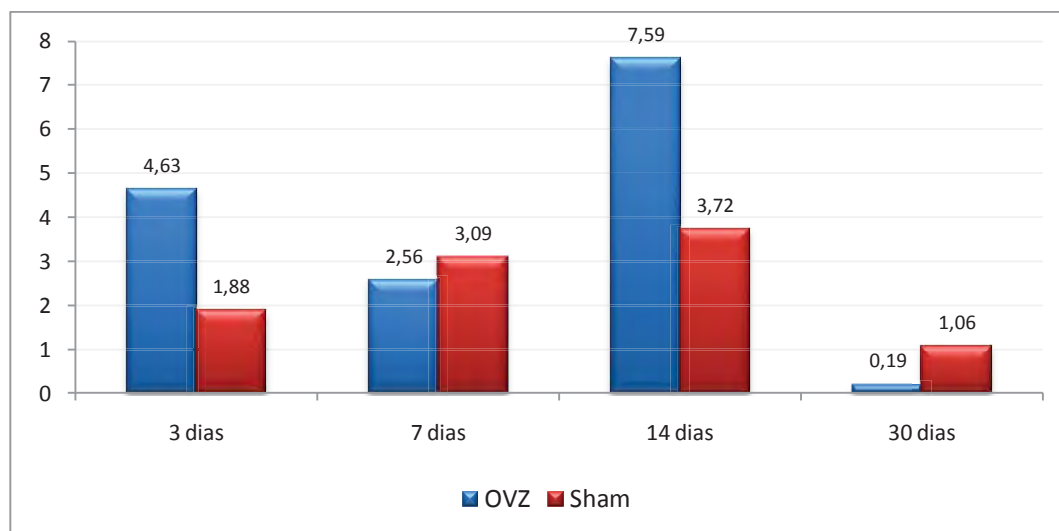


Figura 22 - Gráfico referente ao índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos Sham e OVZ.

Tabela 5 - Compara o índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca dos grupos OVZ e Sham por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	4,63	2,20	0,023*
	Sham	1,88	2,33	
7 dias	OVZ	2,56	2,85	0,338
	Sham	3,09	2,00	
14 dias	OVZ	7,59	1,44	0,095
	Sham	3,72	4,08	
30 dias	OVZ	0,19	0,35	0,115
	Sham	1,06	1,15	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O gráfico apresentou resultados que variaram de acordo com o período de eutanásia realizado.

A única diferença estatisticamente significativa foi observada no período de 3 dias ($p=0,023$), no qual o grupo OVZ (4,63) apresentou maior resultado que o grupo Sham (1,88) (Figura 23).

Foi observado que nos períodos de 3, e 14 dias, os grupos OVZ apresentaram maiores índices de marcação para OPG em osteoblastos que os grupos Sham. Já nos períodos de 7 e 30 dias os grupos Sham apresentaram maiores resultados.

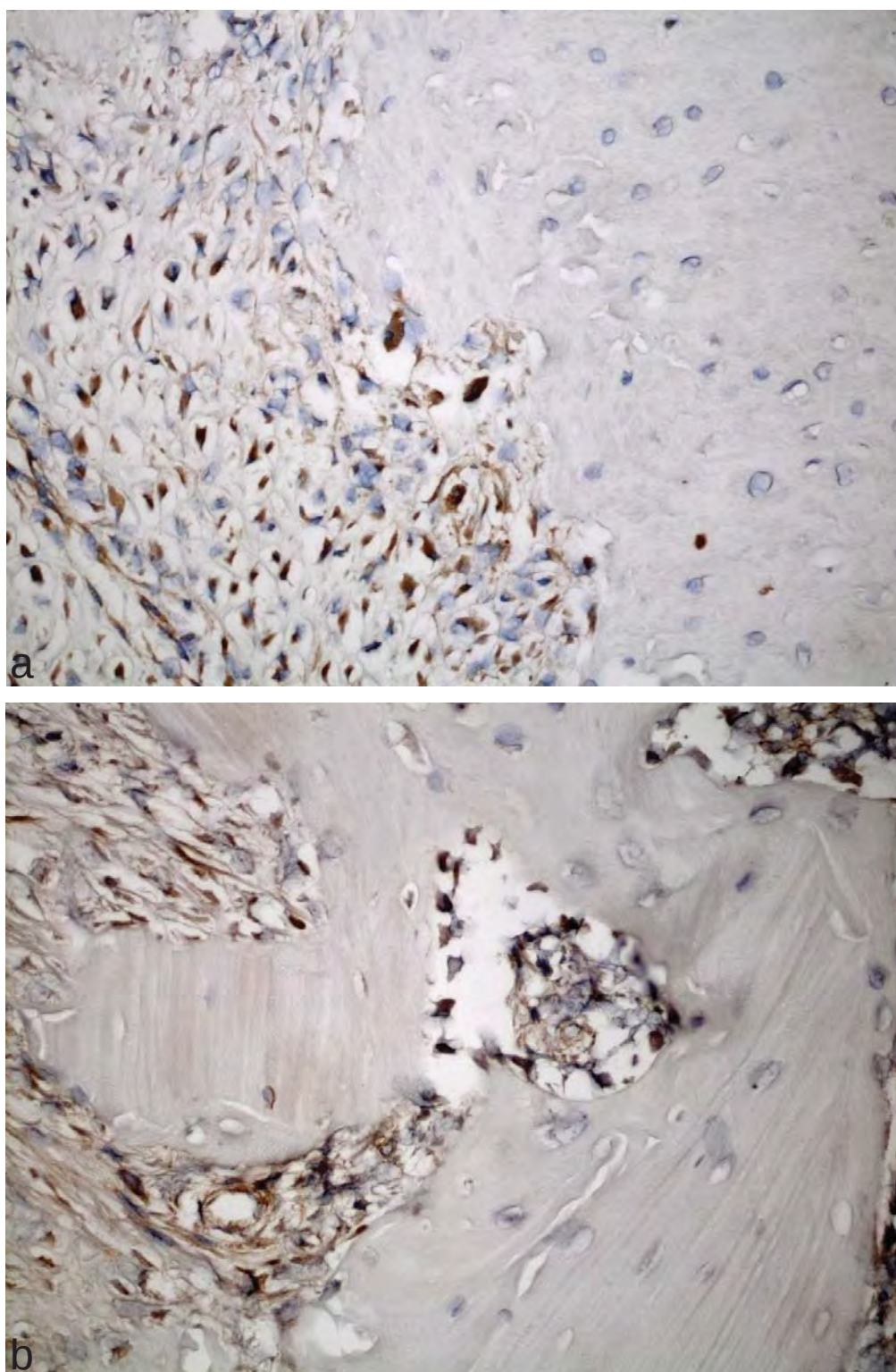


Figura 23 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal: a) Grupo Sham; b) Grupo OVZ: maior número de osteoblastos marcados para OPG em b. Imunoistoquímica, aumento original 400X.

5.4.1.2. Grupo OVZ X OVZ'

O índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 24 e na tabela 6, segundo as variáveis, dieta e tempo de eutanásia.

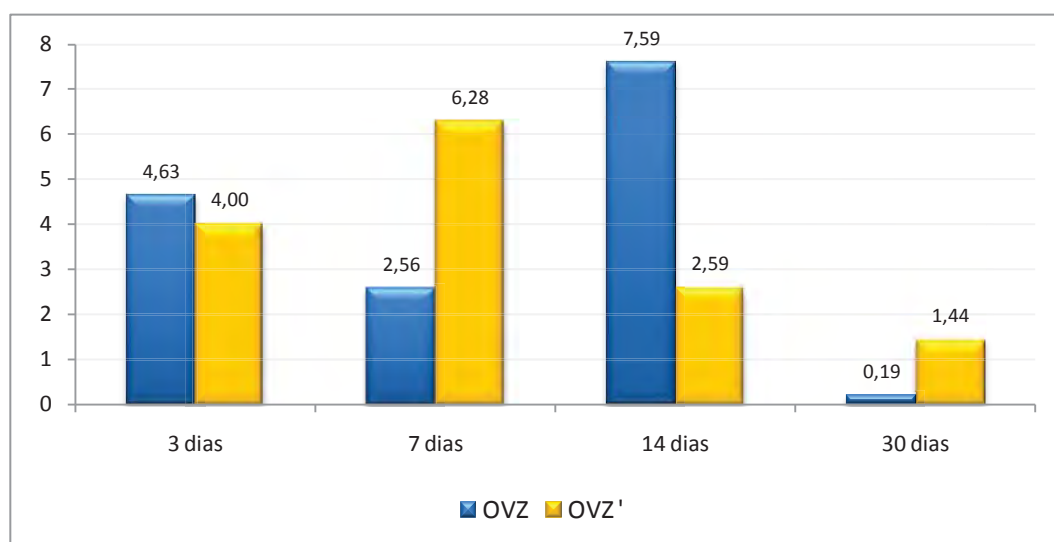


Figura 24 - Gráfico referente ao índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e OVZ'.

Tabela 6 - Compara o índice de marcação para OPG em osteoblastos na região da furca dos grupos OVZ e OVZ' por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	4,63	2,20	0,492
	OVZ '	4,00	2,84	
7 dias	OVZ	2,56	2,85	0,049*
	OVZ '	6,28	3,12	
14 dias	OVZ	7,59	1,44	0,042*
	OVZ '	2,59	3,99	
30 dias	OVZ	0,19	0,35	0,762
	OVZ '	1,44	3,15	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O gráfico apresentou resultados que variaram de acordo com o período de eutanásia realizado.

Resultados estatisticamente significantes foram observados nos períodos de 7 ($p=0,049$) e 14 dias (0,042). Aos 7 dias, o grupo com dieta deficiente em cálcio apresentou resultado maior (6,28) quando comparado ao grupo com dieta padrão (2,56) (Figura 25). Já aos 14 dias houve maior índice de marcação para OPG em osteoblastos no grupo OVZ (7,59) que no grupo OVZ' (2,59) (Figura 26).

Analisando os grupos OVZ e OVZ' em todas as variáveis, o grupo OVZ 14 dias foi o que apresentou maior índice de marcação para OPG em osteoblastos (7,59) na análise imunoistoquímica.

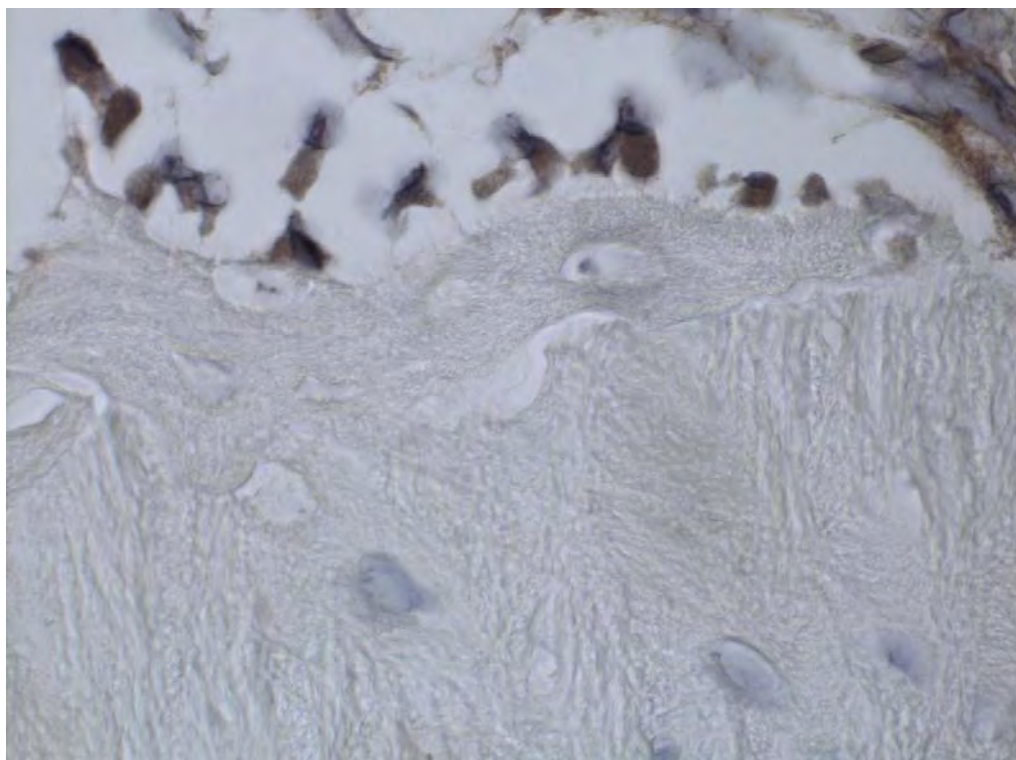


Figura 25 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 7 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ: osteoblastos marcados para OPG. Imunoistoquímica, aumento original 1000X.

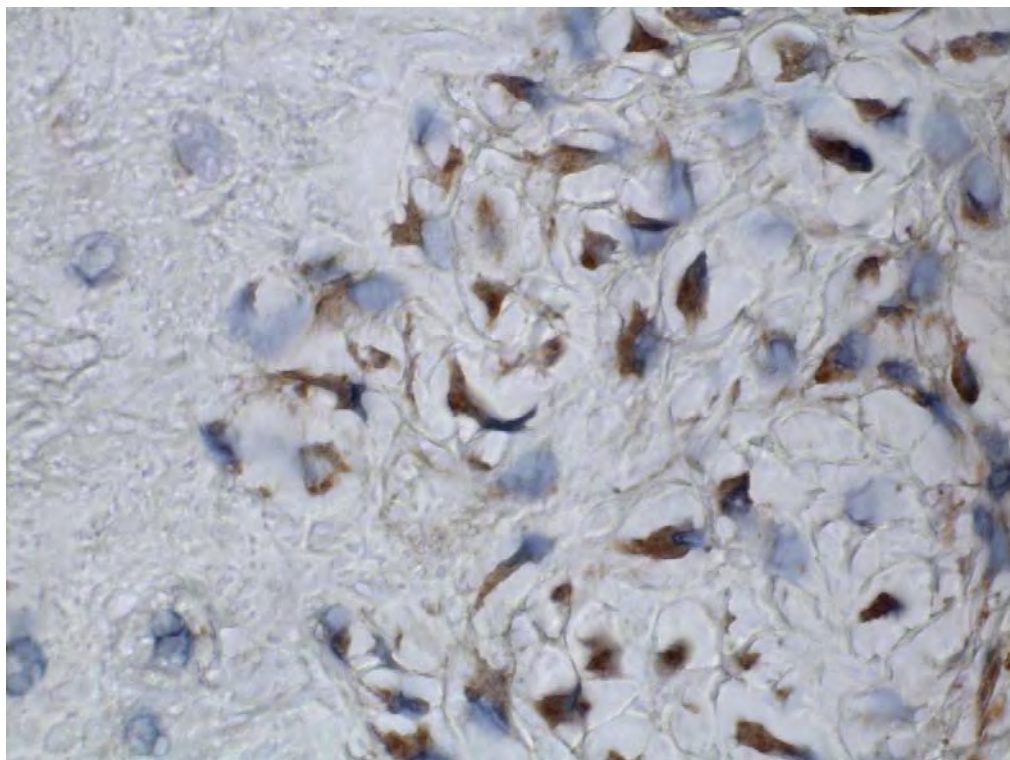


Figura 26 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 14 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ: osteoblastos marcados para OPG. Imunoistoquímica, aumento original 1000X.

5.4.2 RANKL

5.4.2.1 Grupos OVZ X Sham

O índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 27 e na tabela 7, segundo as variáveis, hormônio e tempo de eutanásia.

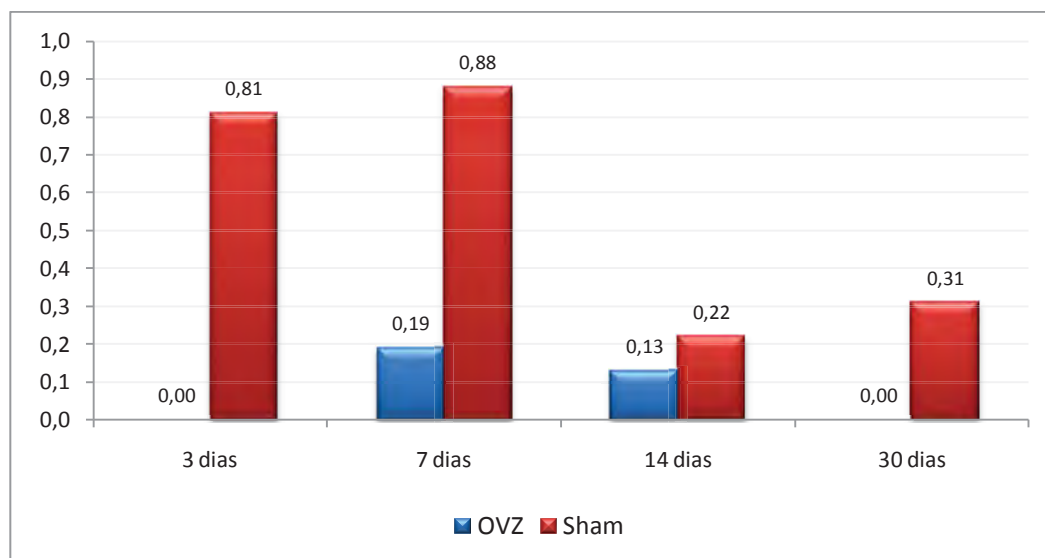


Figura 27 - Gráfico referente ao índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos Sham e OVZ.

Tabela 7 - Compara o índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca dos grupos OVZ e Sham por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	0,00	0,00	0,001*
	Sham	0,81	0,64	
7 dias	OVZ	0,19	0,35	0,123
	Sham	0,88	0,99	
14 dias	OVZ	0,13	0,35	0,178
	Sham	0,22	0,34	
30 dias	OVZ	0,00	0,00	0,064
	Sham	0,31	0,69	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou maiores índices de marcação para RANKL em osteoblastos nos grupos Sham quando comparados aos grupos OVZ.

Apesar dos grupos Sham apresentarem maiores resultados do que os grupos OVZ em todos os períodos, o único resultado estatisticamente significante foi aos 3 dias de eutanásia, em que apenas o grupo Sham (0,81) apresentou marcação (Figura 28).

Os grupos OVZ não apresentaram índices de marcação para RANKL em osteoblastos tanto no período inicial quanto no período tardio do desenvolvimento da doença periodontal.

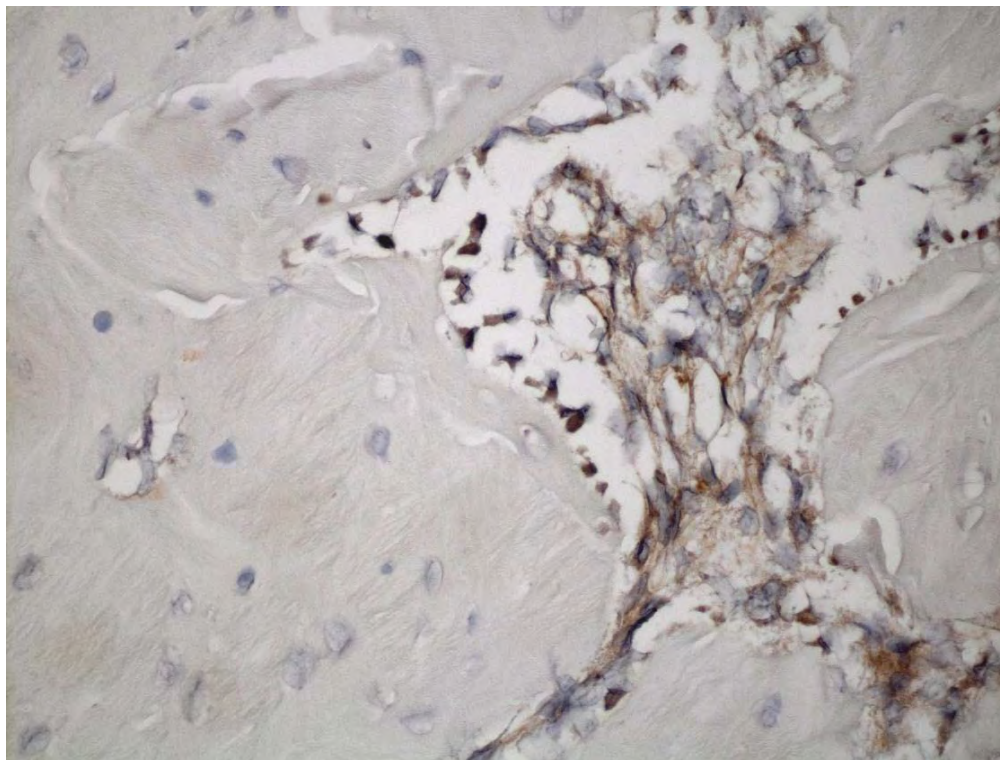


Figura 28 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo Sham: osteoblastos marcados para RANKL. Imunoistoquímica, aumento original 400X.

5.4.2.2 Grupo OVZ X OVZ'

O índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 29 e na tabela 8, segundo as variáveis, dieta e tempo de eutanásia.

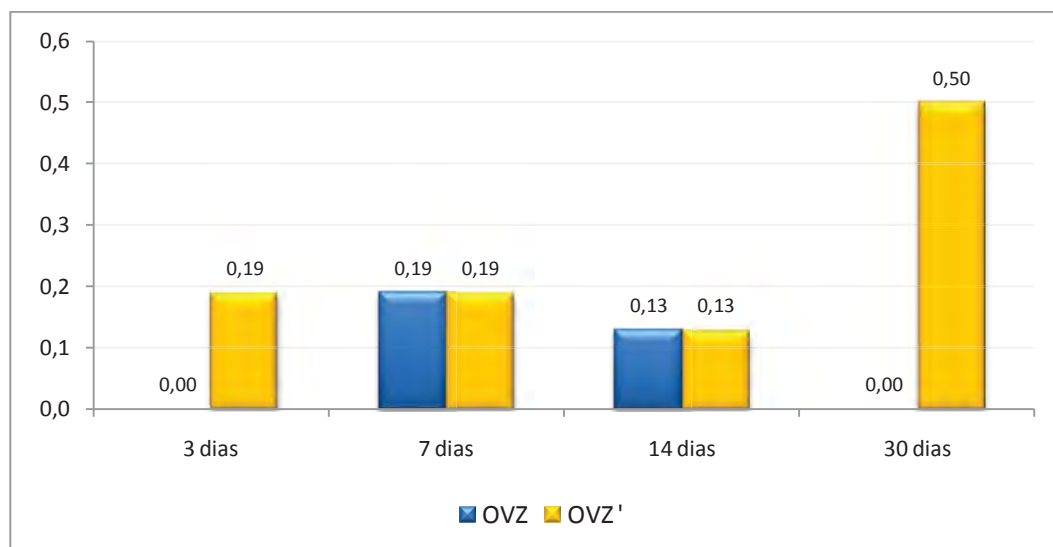


Figura 29 - Gráfico referente ao índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e OVZ'.

Tabela 8 - Compara o índice de marcação para RANKL em osteoblastos na região da furca dos grupos OVZ e OVZ' por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	0,00	0,00	0,317
	OVZ'	0,19	0,53	
7 dias	OVZ	0,19	0,35	0,369
	OVZ'	0,19	0,53	
14 dias	OVZ	0,13	0,35	1,000
	OVZ'	0,13	0,35	
30 dias	OVZ	0,00	0,00	0,317
	OVZ'	0,50	1,41	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou uma maior tendência de marcação para RANKL em osteoblastos nos grupos OVZ', quando comparados aos grupos OVZ, apesar desta análise não apresentar nenhum resultado estatisticamente significativo.

Os grupos OVZ' apresentaram resultados maiores que os grupos OVZ no período inicial e no período tardio do desenvolvimento da doença periodontal.

Os grupos OVZ' apresentaram resultados semelhantes (0,19), nos períodos de 3 e 7 dias. O mesmo ocorreu quando se comparou os grupos OVZ e OVZ' aos 7 (0,19) e 14 dias (0,13) de eutanásia, apresentaram resultados semelhantes.

5.4.3 RANK

5.4.3.1. Grupos OVZ X Sham

O índice de marcação para RANK em osteoclastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 30 e na tabela 9, segundo as variáveis, hormônio e tempo de eutanásia.

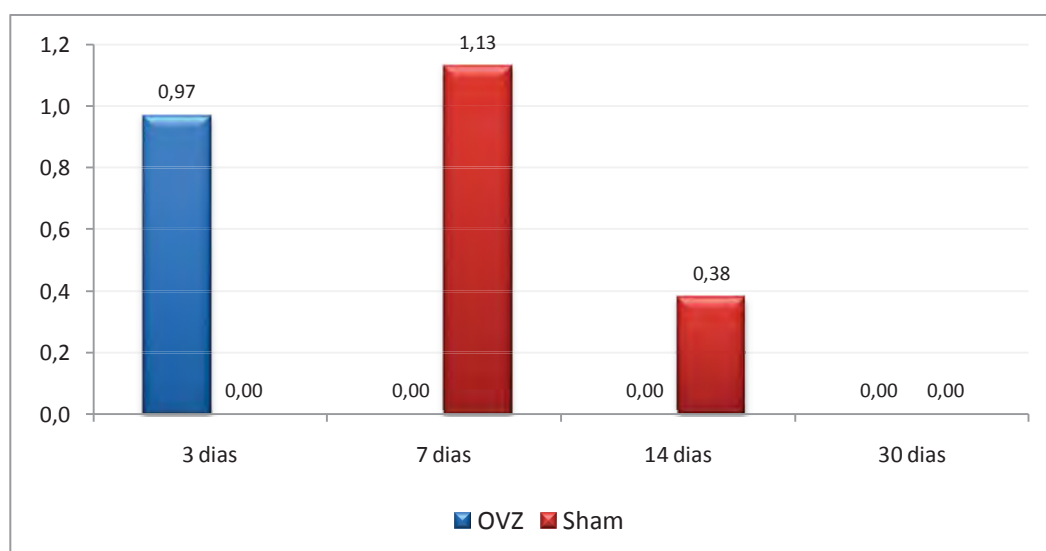


Figura 30 - Gráfico referente ao índice de marcação para RANK em osteoclastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos Sham e OVZ.

Tabela 9 – Compara o índice de marcação para RANK em osteoclastos na região da furca dos grupos OVZ e Sham por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	0,97	1,06	0,011*
	Sham	0,00	0,00	
7 dias	OVZ	0,00	0,00	0,010*
	Sham	1,13	1,13	
14 dias	OVZ	0,00	0,00	0,144
	Sham	0,38	0,74	
30 dias	OVZ	0,00	0,00	1,000
	Sham	0,00	0,00	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou que, o índice de marcação para RANK em osteoclastos foi maior nos grupos Sham que nos grupos OVZ, apesar de que, em alguns períodos não houve marcação destas células.

Resultados estatisticamente significantes foram observados nos dois períodos iniciais de eutanásia, 3 dias ($p=0,011$) e 7 dias ($p=0,010$).

Vale salientar que os grupos OVZ apresentaram índice de marcação para RANK em osteoclastos apenas no período de 3 dias (0,97) (Figura 31), nos demais períodos os grupos OVZ não apresentaram marcação.

Outro resultado também observado foi no grupo Sham, que não apresentou marcação no período inicial (3 dias) e no período tardio (30 dias) do desenvolvimento da doença periodontal. Já nos períodos intermediários da doença seus índices foram maiores que nos grupos OVZ.

Analisando os grupos OVZ e Sham em todas as variáveis, o grupo Sham 7 dias foi o que apresentou maior índice de marcação para RANK em osteoclastos (1,13) na análise imunoistoquímica (Figura 32).

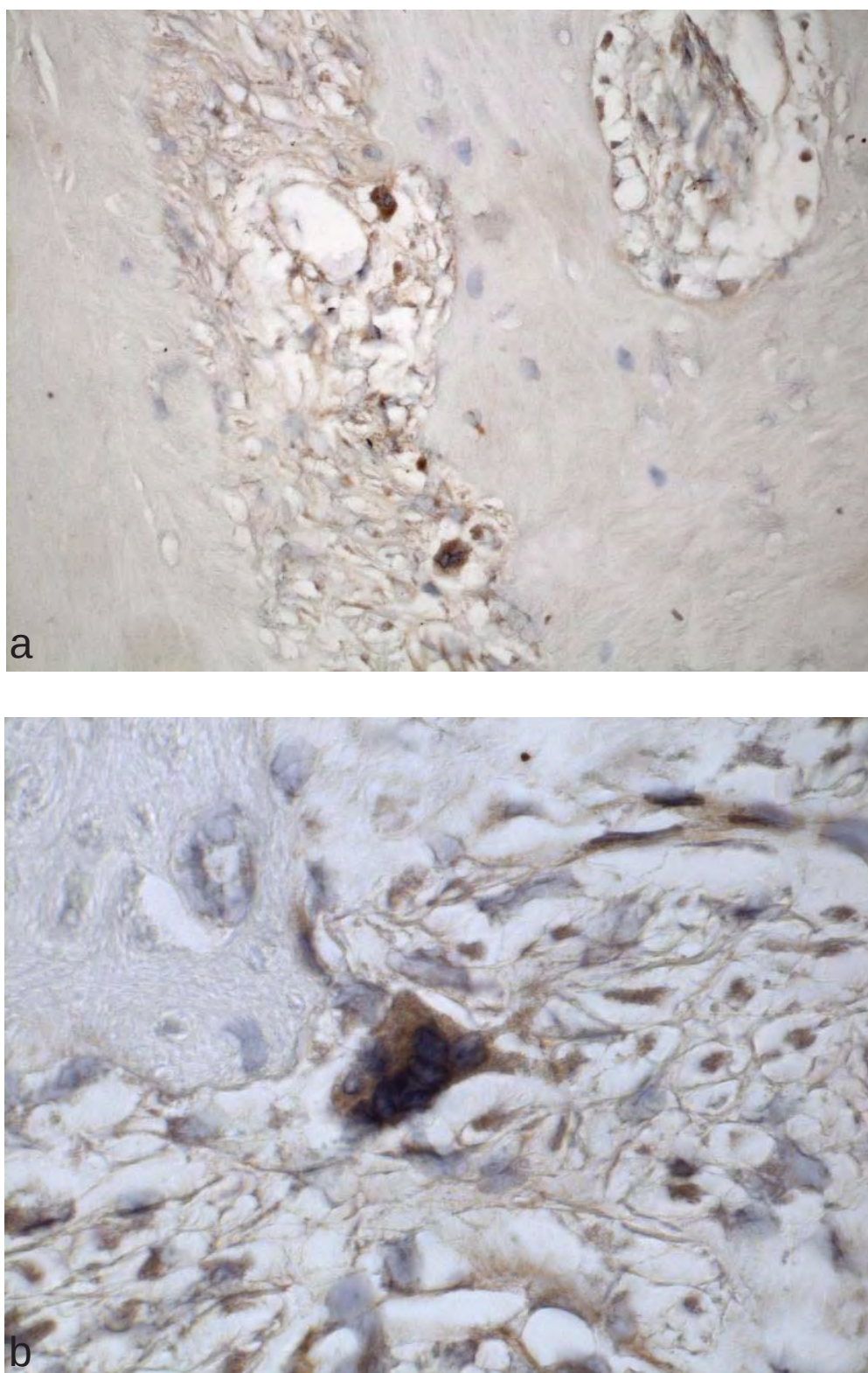


Figura 31 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 3 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ: osteoclastos marcados para RANK. Imunoistoquímica, aumento original: a) 400X; b)1000X.

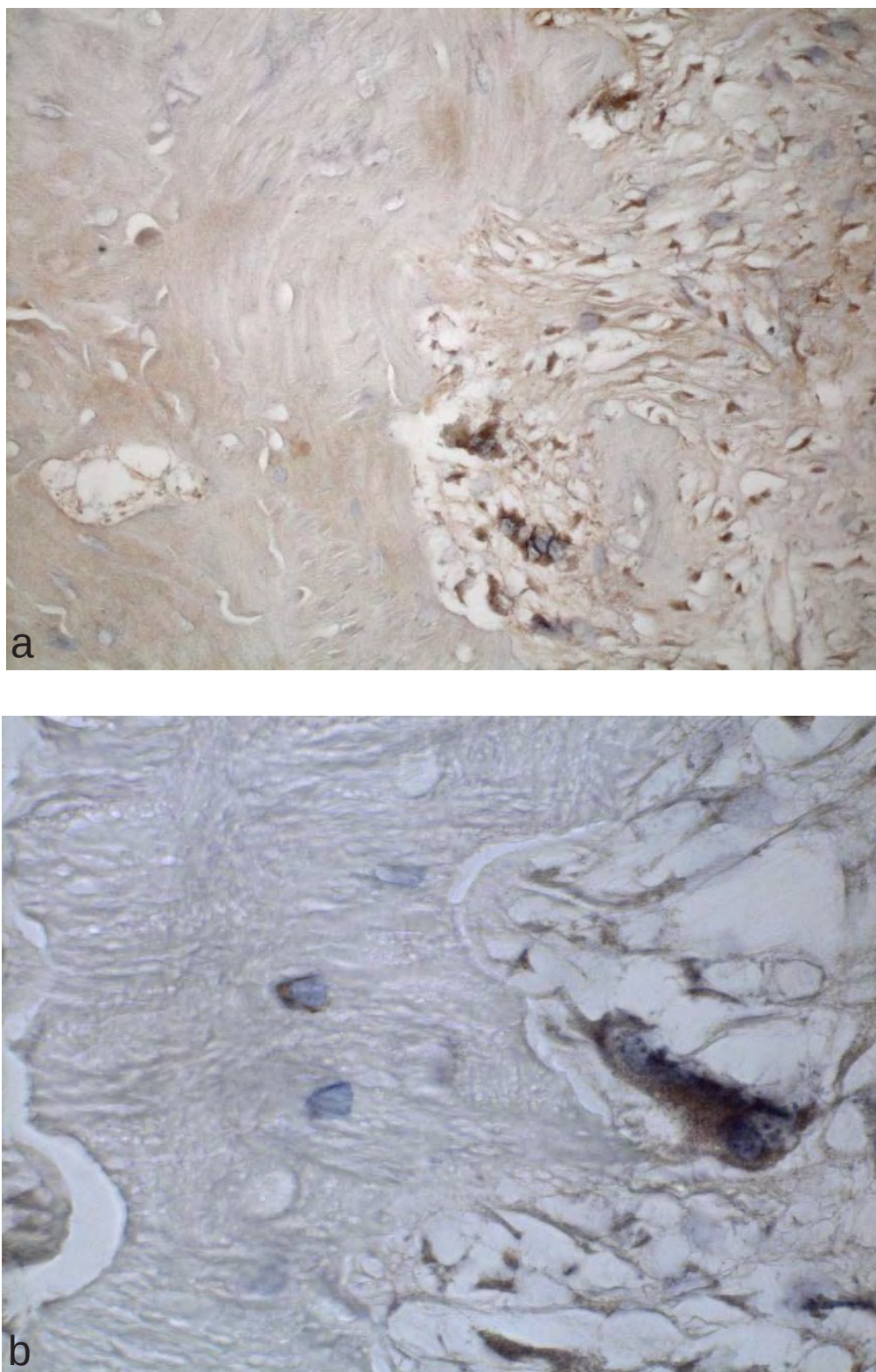


Figura 32 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 7 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo Sham: osteoclastos marcados para RANK. Imunoistoquímica, aumento original: a) 400X; b)1000X.

5.4.3.2 Grupo OVZ X OVZ'

O índice de marcação para RANK em pré-osteoclastos e osteoclastos na região da furca obtida de cada grupo está representado na figura 33 e na tabela 10, segundo as variáveis, dieta e tempo de eutanásia.

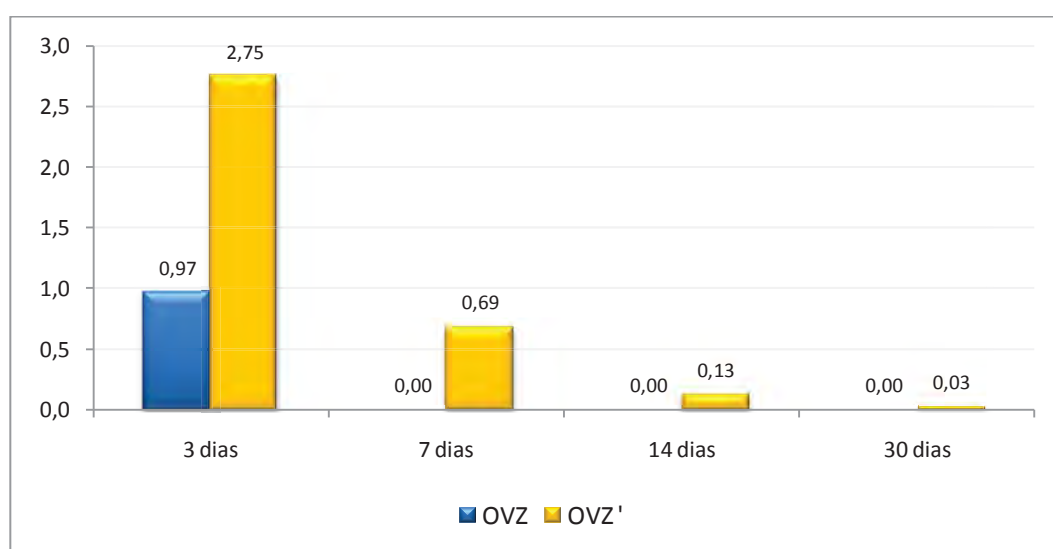


Figura 33 - Gráfico referente ao índice de marcação para RANK em osteoclastos na região da furca, nos diversos períodos de eutanásia, considerando-se os grupos OVZ e OVZ'.

Tabela 10 - Compara o índice de marcação para RANK em osteoclastos na região da furca dos grupos OVZ e OVZ' por meio do teste de Mann-Whitney em todas as variáveis

Tempo	Grupos	Média	Desvio Padrão	P-valor
3 dias	OVZ	0,97	1,06	0,159
	OVZ '	2,75	2,38	
7 dias	OVZ	0,00	0,00	0,027*
	OVZ '	0,69	0,88	
14 dias	OVZ	0,00	0,00	0,317
	OVZ '	0,13	0,35	
30 dias	OVZ	0,00	0,00	0,317
	OVZ '	0,03	0,09	

* = p-valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

O resultado mostrou maiores índices de marcação para RANK em osteoclastos nos grupos OVZ', quando comparadas aos índices dos grupos OVZ.

Resultado estatisticamente significativo foi observado aos 7 dias de eutanásia ($p=0,027$), em que apenas o grupo com dieta deficiente em cálcio (0,69) apresentou marcação (Figura 34).

Nos grupos OVZ' foi observado que houve uma diminuição da marcação para RANK em osteoclastos, em relação ao período de sacrifício. Já nos grupos OVZ, foi observado que houve marcação apenas no período inicial do desenvolvimento da doença periodontal, isto é, aos 3 dias de eutanásia.

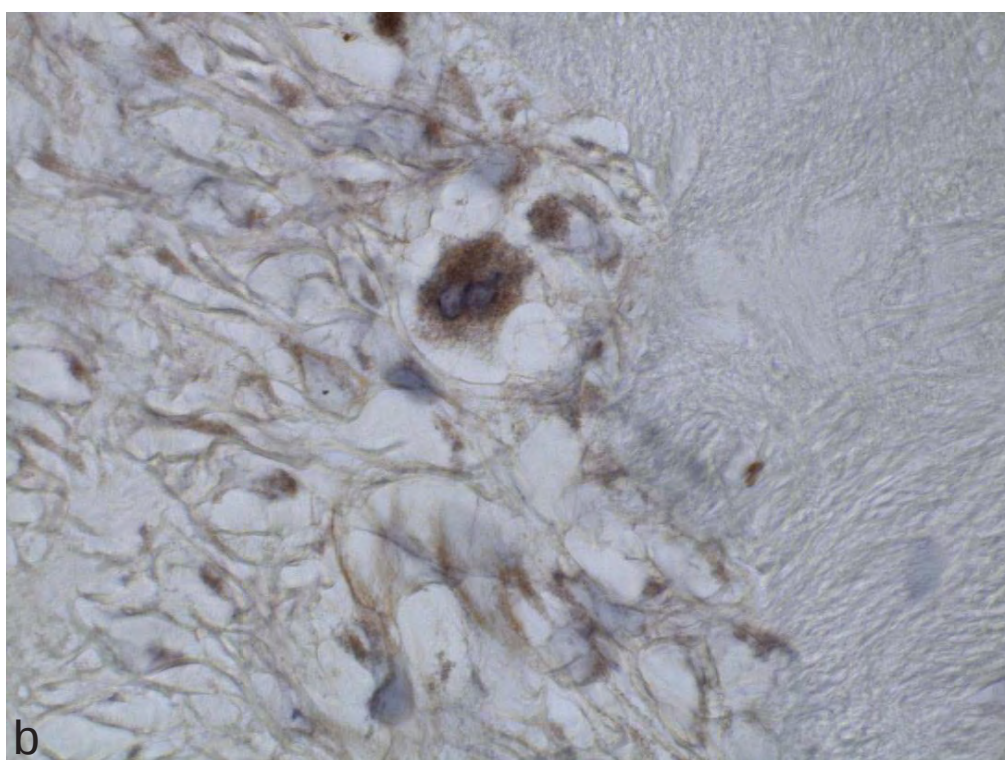
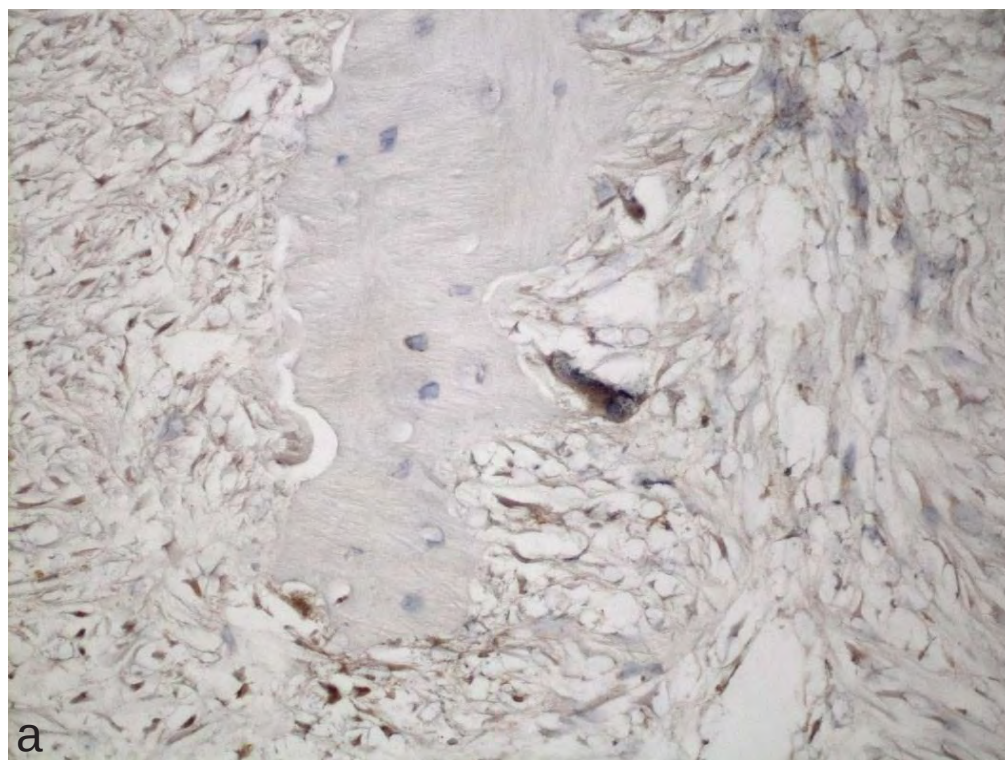


Figura 34 - Fotomicrografia da região de furca do primeiro molar inferior, período de 7 dias de indução experimental de doença periodontal, grupo OVZ': osteoclastos marcados para RANK. Imunoistoquímica, aumento original: a) 400X; b)1000X

6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo comparar a perda óssea na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo de animais com doença periodontal, com ou sem osteoporose induzida pela remoção dos ovários. A doença periodontal foi induzida pela inserção de ligadura em torno do primeiro molar inferior esquerdo, decorridos 60 dias da ovariectomia ou cirurgia sham. A perda óssea foi analisada 3, 7, 14 e 30 após a indução da doença. Os tempos foram estipulados com o intuito de analisar a diferença de perda óssea durante a evolução da doença periodontal. Buscou-se avaliar também, a evolução da doença periodontal induzida em ratas ovariectomizadas que receberam dieta deficiente em cálcio. Para todos os grupos, foram realizadas análises histológica, histomorfométrica, enzimoistoquímica e imunoistoquímica.

A doença periodontal é um processo patogênico devido ao acúmulo de placa bacteriana, que causa destruição progressiva do ligamento periodontal, destruição óssea e perda dentária (Carranza et al., 2007). Em modelos experimentais, sua indução pode ocorrer através de uma agressão mecânica por meio de ligadura, que causa achatamento e ulceração do tecido gengival (Kurh et al, 2004). Segundo Bentzen et al. (2005), a semelhança da anatomia dentogengival do rato e do ser humano torna válido o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nestes animais.

A gravidade da doença periodontal pode variar com a condição sistêmica do paciente (Paquette, 1999). A ocorrência mais acentuada de doença periodontal em mulheres na pós-menopausa pode ser explicada pelo fato de que em ambas as condições há fatores predisponentes comuns de perda óssea (Jabbar et al., 2011). A

osteoporose e a doença periodontal podem sofrer influência de fatores genéticos, hormonais, dieta e outros fatores de risco como estilo de vida (Reddy et al., 2002). Contudo, na osteoporose, a perda óssea é generalizada enquanto que na doença periodontal, ela está localizada no osso alveolar dos maxilares (Jabbar et al., 2011). Estudos demonstraram que a osteoporose pode agravar a doença periodontal devido à alteração no metabolismo ósseo (Johnson et al., 1997; Brennan-Calanan et al., 2008; Kuo et al., 2008; Jabbar et al. 2011). No presente trabalho, também foi observada maior perda óssea nos animais com deficiência estrogênica, portanto, parece que tal deficiência realmente constitui um fator agravante da perda óssea decorrente da doença periodontal.

A osteoporose é uma doença sistêmica caracterizada pelo aumento da fragilidade óssea o que conduz ao maior risco de fraturas (Compston, 2001; Pinheiro, Elis, 2010). A diminuição ou ausência de estrógeno, um hormônio que atua no metabolismo ósseo, promove uma progressiva diminuição da massa óssea, podendo resultar em osteoporose (Douglas, 2006). A ovariectomia em ratas é um modelo padrão para avaliar a atividade do tecido ósseo associada com a deficiência estrogênica (Tanaka et al, 2002; Teófilo et al., 2003). A deficiência estrogênica após a ovariectomia tem um papel importante nas alterações iniciais do *turnover* local do osso trabecular, induzindo uma diminuição da massa óssea e destruição da rede trabecular (Yamaura et al., 1996). Tanaka et al., 2002 e Tanaka et al., 2003 avaliaram o efeito da ovariectomia em ratas e verificaram que o volume ósseo e o número de trabéculas na região do septo inter-radicular do primeiro molar inferior foi maior nos animais falso-ovariectomizados, comparados aos ovariectomizados. Já Costa et al. (2011) não encontraram diferença estatisticamente significativa no volume trabecular ósseo na região de primeiro molar superior de ratas quando compararam os grupos OVZ e Sham. No presente estudo, em que se induziu doença periodontal, a maior porcentagem de área de matriz óssea também foi observada nas

ratas que não foram submetidas à ovariectomia. Adicionalmente, pelo exame histológico observou-se que as trabéculas do tecido ósseo do septo inter-radicular eram mais delgadas nos grupos ovariectomizados, evidenciando que houve maior perda óssea na região da doença periodontal, nas ratas com deficiência hormonal induzida pela ovariectomia, comparadas às ratas com produção hormonal normal.

Assim, as ratas que não foram submetidas à ovariectomia exibiram a maior porcentagem de área de matriz óssea, porém, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos OVZ e Sham apenas no período de 3 dias. Ao longo da evolução da doença foi notado aumento da perda óssea, sendo que o maior nível de perda óssea para ambos os grupos, foi observado no período de 14 dias. Tal resultado está de acordo com os estudos de Kuhr et al., 2004 e Rodini et al., 2005, em que os autores concluíram que o pico de reabsorção óssea no modelo experimental de indução de doença periodontal por meio de ligadura ocorre no 14º dia. Contudo, no presente estudo, verificou-se diminuição da perda óssea no período de 30 dias, contrapondo-se ao estudo de Rodini et al. (2005), em que tal situação foi observada apenas no 42º dia.

A deficiência do estrógeno induz ao aumento da atividade osteoclástica, a qual pode ser mediada pelo aumento na expressão de Fosfatase Ácida Tartarato-Resistente (TRAP), que é um marcador bioquímico considerado relativamente específico para osteoclastos, permitindo a identificação da atividade desta célula (Feng, 2005; Kobayashi et al., 2009). Em geral, o grupo Sham apresentou maior quantidade de matriz óssea, enquanto o grupo OVZ exibiu maior quantidade de células TRAP+, demonstrando uma correlação entre o número de células osteoclásticas com a quantidade de matriz óssea remanescente. Assim como nos achados de Zhang et al. (2007), neste estudo foi observado um aumento do número de células TRAP+ aos 7 dias para o grupo OVZ comparado ao grupo Sham, sendo este o único resultado estatisticamente significativo. Em ambos os estudos também se

pode observar uma contínua diminuição da quantidade de osteoclastos (TRAP+) tanto para o grupo OVZ quanto para o grupo Sham nos estágios tardios da evolução da doença periodontal. Esta diminuição na quantidade de células TRAP+ poderia estar relacionada ao aumento da quantidade de matriz óssea aos 30 dias.

Apesar de Hirai et al., 1993 e Taguchi et al., 1995 terem encontrado relação entre a redução de massa óssea e perda dentária em pacientes com osteoporose, Moriya et al., 1998 e Jiang et al., 2003, observaram que a osteoporose por si só não é capaz de promover perda óssea alveolar ou mudanças na espessura cortical mandibular. Assim, acredita-se que existe a necessidade da associação de outros fatores osteopênicos para induzir perda óssea mandibular significativa.

No presente estudo, adicionalmente à doença periodontal e à ovariectomia, para um terço dos animais foi administrada a dieta deficiente em cálcio, uma vez que segundo Teófilo et al. (2003), é necessário associar uma dieta com baixo teor de cálcio para induzir perda óssea significativa nos maxilares. Outros estudos também mostraram que a dieta deficiente em cálcio, associada ou não a ovariectomia, promove maior perda óssea, devido ao aumento da remodelação com maior atividade de reabsorção óssea (Hara et al., 2001; Zhang et al., 2009; Bae; Kim, 2010). Esta metodologia foi empregada neste estudo, a fim de verificar a influência da associação da dieta deficiente em cálcio com a ausência dos hormônios ovarianos na perda óssea decorrente da doença periodontal.

Na análise histomorfométrica, além de se comparar os grupos OVZ e Sham, também se comparou as ratas ovariectomizadas com dieta padrão (OVZ) e dieta deficiente em cálcio (OVZ'). Inesperadamente, maior quantidade de matriz óssea foi verificada nos grupos OVZ', independente do período avaliado, ou seja, a dieta deficiente em cálcio, com o propósito de aumentar a perda óssea associada com a ovariectomia, pode ter estimulado mecanismos

compensatórios na remodelação óssea, conduzindo ao efeito oposto ao esperado.

A diferença entre os resultados do presente estudo e dos autores anteriormente citados pode estar relacionada com o tempo de administração da dieta deficiente em cálcio. Os estudos acima administraram tal dieta por cerca de 12 semanas (Hara et al., 2001; Zhang et al., 2009; Bae e Kim, 2010), enquanto neste estudo o período de administração foi de 8 semanas. Outro fator que poderia ter influenciado a menor perda óssea no grupo OVZ' é a consistência da dieta deficiente em cálcio. Tal dieta apresenta uma dureza maior que a dieta padrão ministrada ao grupo OVZ, aspecto que exige maior mastigação e conseqüentemente estimula o tecido ósseo. Costa et al. (2011) observaram que a dieta deficiente em cálcio associada à ovariectomia não causou perda óssea maxilar significativa, mesmo com a redução do esforço mastigatório decorrente da ausência do dente antagonista. Patullo et al. (2009) também observaram que apenas a ovariectomia não influenciou na perda óssea mandibular. Contudo, tanto Costa et al (2011) quanto Patullo et al. (2009) concluíram que a consistência da dieta foi o principal fator para a perda óssea nos maxilares.

Apesar da maior quantidade de matriz óssea ter sido verificada nos grupos OVZ', apenas no período de 14 dias foi observada diferença significativa. O aumento de matriz óssea observado no período de 14 dias pode estar relacionado à menor quantidade de células TRAP+ neste mesmo período. Tais resultados sugerem que a dieta deficiente em cálcio promove uma alteração na evolução da doença periodontal, uma vez que o maior pico de perda óssea ocorreu no período de 7 dias, o que diferiu dos grupos Sham e OVZ, em que foi verificada maior perda óssea em 14 dias. Kuhr et al., 2004 e Rodini et al., 2005 também verificaram pico de perda óssea no período de 14 dias de evolução da doença periodontal.

Conforme observado nos estudos de Srivastava et al., 2001 e Fountas et al., 2004, o estrogênio exerce um efeito significativo na reabsorção óssea, uma vez que reduz a função osteoclástica pela inibição da produção de fator estimulante de colônias de macrófagos, RANKL, IL-1, IL-6 e TNF-alfa, além da estimulação da produção de OPG e TGF-beta. Adicionalmente, a deficiência de estrogênio promove um aumento da formação e função de osteoclastos. De acordo com Boyle et al. (2003) as células envolvidas no *turnover* ósseo são os osteoclastos e osteoblastos, sendo que o balanço entre ativação e apoptose destas células é a chave para manter a massa óssea. A supressão ou controle da reabsorção óssea é, portanto a maior estratégia terapêutica para prevenir ou diminuir a perda óssea. A sinalização crítica para este caminho é dado por três proteínas principais: OPG, RANK e RANKL.

O RANKL é uma proteína relacionada com o processo de reabsorção óssea. Sua interação com o RANK, um receptor expresso na superfície de osteoclastos, promove a diferenciação e ativação de osteoclastos. Já a OPG é uma proteína produzida e liberada por osteoblastos e funciona como um receptor solúvel para RANKL, competindo com o RANK para inativar RANKL (Gallagher, 2008) e inibindo desta forma o processo de reabsorção óssea (Bezerra et al., 2005).

Diversos estudos avaliam o papel do sistema OPG/RANKL na remodelação óssea, porém, a metodologia empregada por estes trabalhos é variada (Seck et al., 2001; Pulsatelli et al., 2004; Liu et al., 2005; Duarte et al., 2007; Zhang et al., 2007 e Jorgensen et al., 2010), uma vez que as pesquisas foram realizadas tanto em humanos quanto em animais. Alguns autores avaliaram as concentrações séricas de OPG e RANKL procurando correlacioná-las com a modulação da osteoclastogênese na remodelação óssea fisiológica com a idade (Pulsatelli et al., 2004) ou com a deficiência hormonal (Jorgensen et al., 2010). Entretanto, as evidências demonstraram que a regulação deste

sistema é complexa e que a modulação em níveis sistêmicos parece ser totalmente diferente da modulação local. Quando se avalia a concentração sérica destes marcadores, deve-se considerar que eles são produzidos por vários tecidos e, portanto a taxa pode não refletir o que ocorre localmente no microambiente ósseo (Pulsatelli et al., 2004; Jorgensen et al., 2010).

Segundo Gallagher et al. (2008), a OPG é um fator inibidor de osteoclastogênese, produzido por células do estroma da medula óssea e osteoblastos ativos, cuja produção é estimulada pelo estrógeno, prevenindo perda óssea em mulheres na menopausa. Em tese, os níveis de OPG deveriam estar correlacionados, proporcionalmente, com a densidade de massa óssea, porém, esta associação nem sempre é observada (Trouvin, Goëb, 2010). Liu et al. (2005) observaram níveis séricos aumentados de OPG em mulheres durante o envelhecimento e verificaram também que os níveis séricos de OPG e RANKL não estavam relacionados à densidade mineral óssea. Segundo os autores, os maiores níveis de OPG poderiam representar uma resposta compensatória com relação à acelerada reabsorção óssea nessas mulheres. Indridason et al. (2005) estudaram as diferenças dos níveis séricos de osteoprotegerina relacionadas a idade e não encontraram associação entre OPG e densidade de massa óssea em mulheres saudáveis.

Jorgensen et al. (2010) observaram que em mulheres na pós-menopausa sem tratamento de reposição hormonal, a perda mineral óssea aumenta proporcionalmente com a OPG. Segundo os autores essa associação poderia representar um mecanismo contra-regulatório nas mulheres com deficiência de estrógeno, refletindo uma tentativa de controlar a atividade osteoclástica durante a perda óssea.

Além disso, adicionalmente, Zhang et al. (2007) observaram que nas fases iniciais da deficiência do estrógeno, a osteoblastogênese, que é caracterizada pelo aumento da OPG, também

estaria aumentada, o que poderia ser visto como uma resposta protetora reacional à reabsorção óssea. Estes autores observaram que a expressão de OPG nas lesões periapicais induzidas em ratas ovariectomizadas era maior do que em ratas normais aos sete dias após a indução da lesão, que correspondiam a 14 dias após a ovariectomia. Nos períodos posteriores, os níveis de OPG das ratas ovariectomizadas foram menores que das ratas do grupo sham.

Estudando a relação entre doença periodontal, citocinas e vitamina D plasmática e densidade mineral óssea em mulheres com osteoporose, Jabbar et al. (2011) observaram um significativo aumento de OPG e RANKL no plasma dessas mulheres com doença periodontal, comparadas a mulheres sem doença.

Duarte et al. (2007) verificaram diminuição de OPG na doença periodontal associada à diabete, estudando os níveis de RNAm em biópsias gengivais. Os resultados indicaram que a destruição óssea parece envolver níveis reduzidos de mediadores anti-inflamatórios como IL-10 e de moléculas anti-reabsortivas, como OPG.

No presente estudo, foi observado maior índice de marcação de OPG no grupo OVZ do que no Sham, na fase inicial da doença periodontal, enquanto que nos demais períodos não houve diferença estatística significativa. Considerando-se as observações de Zhang et al. (2007) de que os níveis de OPG estavam mais elevados em ratas ovariectomizadas apenas nos períodos iniciais da ovariectomia e considerando-se que no presente estudo a doença periodontal foi induzida 60 dias após a ovariectomia, os resultados sugerem que o aumento de OPG está mais relacionado com a evolução da doença periodontal do que com a deficiência estrogênica. Talvez, o nível mais alto de OPG no período inicial da doença periodontal nas ratas ovariectomizadas, indique uma resposta reacional de proteção contra a perda óssea acentuada decorrente da doença periodontal induzida.

No presente estudo, não foi observada relação entre os níveis de OPG e porcentagem de matriz óssea na região de doença periodontal. Também não foi observada relação dos níveis de OPG com a presença ou ausência dos hormônios ovarianos, exceto no período de três dias, em que o grupo OVZ apresentou maior índice de marcação para OPG.

A imunomarcagem de OPG para os grupos OVZ e OVZ' também apresentou resultados diferentes ao longo do período de avaliação deste estudo. Aos 7 e 30 dias o grupo OVZ' exibiu maior índice de marcação, sendo observada diferença estatisticamente significativa apenas aos 7 dias. Entretanto, nos períodos de 3 e 14 dias, o grupo OVZ foi aquele que apresentou maior índice de marcação, sendo estatisticamente significativa aos 14 dias.

Poucos trabalhos correlacionaram à dieta deficiente em cálcio com imunomarcadores de remodelação óssea e estes trabalhos apresentaram resultados controversos (Zhang et al., 2009; Bae; Kim, 2010), dificultando a comparação com os nossos resultados. Zhang et al. (2009) demonstraram aumento significativo de OPG em ratas tratadas com dieta deficiente em cálcio em lesões periapicais e Bae e Kim (2010) observaram que ratas ovariectomizadas tratadas com dieta normal tiveram nível sérico de OPG semelhante ao de ratas alimentadas com dieta deficiente em cálcio, ambos com administração dessa dieta por um período de 12 semanas.

Os mecanismos de reabsorção óssea induzida pela dieta deficiente em cálcio e pela ovariectomia são diferentes (Zhang et al., 2009). A ovariectomia estimula o processo de osteoclastogênese em ratas, atuando na redução do sistema OPG/RANKL, mas ao mesmo tempo, inibe a expressão de genes específicos de osteoclastos tais como a cathepsina K e a metaloproteinase-9 na metáfase proximal de ossos longos. Por outro lado, a dieta deficiente em cálcio estimula a expressão de genes osteoblásticos específicos, incluindo colágeno tipo I α -1,

fator de transcrição cbfa e OPG, bem como estimula a produção de uma enzima envolvida na geração de íons hidrogênio em osteoclastos. Tal afirmação pode justificar as diferenças entre os resultados do presente estudo, em que a maior reabsorção óssea foi observada apenas nas ratas submetidas à ovariectomia e não foi agravada pela dieta deficiente.

O estrógeno bloqueia a formação de osteoclastos pela diminuição da resposta de seus precursores à citocina osteoclastogênica RANKL (Srivastava et al., 2001). Na deficiência estrogênica, a maior expressão de RANKL nas células da medula óssea é um fator determinante para o aumento da reabsorção óssea (Eghbali-Fatourehchi, 2003). A diminuição no estrógeno leva à diminuição de OPG e ao aumento da atividade do RANKL, o que causa maior reabsorção e perda óssea. O tratamento com estrógeno restaura o balanço de OPG sobre RANKL, explicando porque o estrógeno previne a perda óssea nas mulheres após a menopausa (Gallagher et al., 2008).

No entanto, Seck et al. (2001) não encontraram diferença na expressão de RNAm para OPG e RANKL na crista ilíaca de mulheres na pré e pós-menopausa, inclusive no grupo com terapia de reposição hormonal. Adicionalmente, Pulsatelli et al. (2004) também não encontraram diferença nos níveis séricos de RANKL em indivíduos idosos saudáveis de ambos os sexos, comparados com indivíduos jovens saudáveis, exceto por uma redução de RANKL nos indivíduos na faixa de 80 a 90 anos.

Similar à OPG, a relação entre RANKL e densidade mineral óssea não é um consenso, já que Liu et al., 2005, Mezquita-Raya, 2005 e Jorgensen et al., 2010 não mostraram esta associação em mulheres na pós-menopausa, enquanto que Uemura et al. (2008) observaram uma correlação negativa. Todos estes estudos avaliaram os níveis séricos de RANKL.

Duarte et al. (2007) encontraram aumento de RANKL no tecido gengival de mulheres sistemicamente saudáveis com doença

periodontal, comparado com pacientes sem doença. Em mulheres na pós-menopausa, o estudo de Jabbar et al. (2011) também mostrou aumento de RANKL em mulheres com doença periodontal, comparadas com mulheres sem doença, porém, para os autores, as análises do RANKL na doença periodontal ainda são inconsistentes.

No presente estudo, em que todas as ratas tinham doença periodontal induzida, a maior quantidade de RANKL foi observada no grupo Sham, em todos os períodos, quando comparado ao grupo OVZ. Os maiores índices de imunomarcacão para RANKL foram observados nos períodos iniciais, com diferença estatisticamente significativa apenas aos 3 dias. Neste período também foi observada maior quantidade de células TRAP+ no grupo Sham. Por outro lado, Zhang et al. (2007) observaram que os maiores índices de RANKL e células TRAP+ ocorreram aos 14 dias após a indução da lesão periapical em ratas, para ambos os grupos (OVZ e Sham).

Neste estudo, os animais que receberam dieta deficiente em cálcio (OVZ') apresentaram expressão de RANKL semelhante aos animais que receberam dieta padrão (OVZ). Este resultado está de acordo com os achados de Bae e Kim (2010) que também não verificaram diferença no nível sérico de RANKL entre ratas ovariectomizadas alimentadas com dieta contendo teor adequado ou deficiente de cálcio.

Embora fosse esperado um maior índice de marcação para RANKL no grupo OVZ, a indução da doença periodontal em todos os animais do presente estudo pode ter sido um fator importante para a presença de grande quantidade de RANKL no grupo Sham. Contudo, os níveis expressos por estes marcadores nas fases tardias da evolução da doença periodontal, isto é, 14 e 30 dias, foram consideravelmente mais baixos do que nos períodos iniciais, tanto no grupo OVZ quanto o grupo Sham. Estes valores podem ser explicados pelo fato da doença periodontal induzida em ratos apresentar maior perda óssea até duas semanas, conforme observado também por Rodini et al. (2005). Nossos

resultados mostraram, ainda, que após 14 dias houve ganho ósseo, refletindo os baixos índices de RANKL.

Jin et al. (2007) mostraram que a inibição de RANKL pela administração de OPG a ratos machos com doença periodontal induzida por ligadura diminuiu a reabsorção óssea alveolar, sugerindo que esta pode ser uma estratégia terapêutica para prevenir a perda óssea observada na doença periodontal.

A maioria dos trabalhos que aborda o sistema RANK-RANKL-OPG avalia a presença de RANKL e OPG por meio da pesquisa dos níveis de RNAm para estes marcadores, ou mesmo da presença de RANKL e OPG no fluido crevicular gengival, no soro ou ainda no tecido ósseo.

No presente trabalho avaliou-se também a expressão do receptor ativador do Fator NF-Kappa B (RANK) nas diferentes condições experimentais. No grupo OVZ sua expressão foi observada apenas aos 3 dias e no grupo Sham aos 7 e 14 dias, com valores decrescentes. Quando a variável dieta deficiente em cálcio foi avaliada, os resultados mostraram maior índice de marcação para RANK no grupo OVZ' do que no OVZ, aos 3 dias. A marcação observada no grupo OVZ' diminuiu nos períodos subsequentes. Amorim et al. (2008) estudaram a presença de RANK, RANKL e OPG em região de fratura de tíbia de ratos machos diabéticos comparados com ratos saudáveis. Observaram maior número de células marcadas para RANK aos 7 dias, porém, os valores foram menores no grupo diabético quando comparado com o grupo controle. Os autores sugeriram que a alteração do balanço de reabsorção e formação óssea no local de fratura em ratos diabéticos, levando a menor formação óssea neste grupo, pode ser o resultado de menor expressão de RANK, RANKL e OPG.

Os resultados controversos observados neste estudo, com relação ao sistema RANK-RANKL-OPG, podem estar relacionados com a interferência da doença periodontal sobre o processo de

remodelação óssea. Além disso, conforme demonstrado no estudo de Frank et al. (1993), não se pode excluir também que fatores relacionados ao processamento tecidual, como a desmineralização, possam ter interferido na detecção imunoistoquímica desses marcadores.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados, sob as condições experimentais deste trabalho, permitiu concluir que na doença periodontal induzida por ligadura em ratas:

- a) uma consequência da deficiência estrogênica é a maior perda óssea;
- b) a perda óssea não é acentuada pela ingestão de dieta deficiente em cálcio;
- c) o pico de perda óssea ocorre aos 14 dias, independente da presença ou ausência de deficiência estrogênica;
- d) ocorre maior reabsorção óssea decorrente da atividade de osteoclastos positivos para fosfatase ácida tartarato-resistente, na ausência de hormônios ovarianos;
- e) ocorre aumento de OPG na fase inicial da doença periodontal, nas ratas com deficiência hormonal e o consumo de dieta deficiente em cálcio por esses animais resulta em expressão variada desse marcador;
- f) não há relação entre a perda óssea nos animais com ou sem hormônios ovarianos e a quantidade de OPG no local;
- g) ocorre diminuição de RANKL no período inicial, nos animais com deficiência hormonal, e a

deficiência de cálcio na dieta não interfere na expressão desse marcador;

- h) há redução acentuada de RANKL no período final, o que coincide com ganho ósseo na região, independente da presença de hormônios ovarianos;
- i) a expressão de RANK ocorre apenas em alguns períodos, na presença ou ausência de hormônios ovarianos e com o consumo de dieta deficiente em cálcio sua marcação diminui ao longo do tempo.

8 REFERÊNCIAS*

Amorim FP, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, da Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol*. 2008 Aug;39(4):401-8.

Anbinder AL, Prado Mde A, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J*. 2006;17(3):201-7.

Bae YJ, Kim MH. Calcium and Magnesium Supplementation Improves Serum OPG/RANKL in Calcium-Deficient Ovariectomized Rats. *Calcif Tissue Int*. 2010 Oct;87(4):365-72.

Bentzen BH, Grauballe MCB, Björnsson MJ, Stoltze K, Hjørting Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scand J Lab Anim Sci* in press. 2005; 32(2):73-83.

Bezerra MC, Carvalho JF, Prokopowitsch AS, Pereira RM. RANK, RANKL and osteoprotegerin in arthritic bone loss. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Feb;38(2):161-70.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003 May;423(6937):337-42.

Brasileiro Filho G. Bogliolo Patologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM: c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brennan-Calanan RM, Genco RJ, Wilding GE, Hovey KM, Trevisan M, Wactawski-Wende J. Osteoporosis and oral infection: independent risk factors for oral bone loss. *J Dent Res*. 2008 Apr;87(4):323-7.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998 May 1;12(9):1260-8.

Burr DB, Forwood MR, Fyhrie DP, Martin RB, Schaffler MB, Turner CH. Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures. *J Bone Miner Res*. 1997 Jan;12(1):6-15.

Carranza FA, Newman MG, Takeii HH, Klokkevold PR. *Periodontia clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier Editora; 2007.

Cipriani Thorne E. Osteoporosis: consideraciones diagnósticas y terapéuticas. *Rev Med Hered*. 2004;15(2):101-107.

Compston JE. Sex steroids and bone. *Physiol Rev*. 2001 Jan;81(1):419-447.

Costa GP, Leite DS, do Prado RF, Silveira VA, Carvalho YR. Effect of low-calcium diet and grind diet on bone turnover of ovariectomized female rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jul 1;16(4):e497-502.

Deyhim F. The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats. *Nutrition Res*. 2003;23(1):123-30.

Douglas CR. *Tratado de fisiologia aplicada à saúde*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Duarte PM, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis*. 2007 Nov;13(6):594-9.

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, Boyle WJ, Lacey DL, Riggs BL. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest*. 2003 Apr;111(8):1221-30.

Ek-Rylander B, Flores M, Wendel M, Heinegård D, Andersson G. Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *J Biol Chem*. 1994 May;269(21):14853-6.

Feng X. Regulatory roles and molecular signaling of TNF family members in osteoclasts. *Gene*. 2005 Apr;350(1):1-13.

Fountas L, Anapliotou M, Kominakis A, Sekeris CE, Kassi E, Moutsatsou P. Estrogen receptor alpha gene analysis in osteoporosis and familial osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2004 Dec;15(12):948-56.

Frank JD, Balena R, Masarachia P, Seedor JG, Cartwright ME. The effects of three different demineralization agents on osteopontin localization in adult rat bone using immunohistochemistry. *Histochemistry*. 1993 Apr;99(4):295-301.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas*. 2008 May;60(1):65-9.

Galvão MP, Chapper A, Rösing CK, Ferreira MB, de Souza MA. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras*. 2003 Jan-Mar;17(1):56-62.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Skaleric U. Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. *Eur J Oral Sci*. 2002 Apr;110(2):125-9.

Gaspersic R, Kovacic U, Cör A, Skaleric U. Unilateral ligature-induced periodontitis influences the expression of neuropeptides in the ipsilateral and contralateral trigeminal ganglion in rats. *Arch Oral Biol*. 2008 Jul;53(7):659-65.

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):17-34.

Genant HK, Cooper C, Poor G, Reid I, Ehrlich G, Kanis J, et al. Interim report and recommendations of the World Health Organization Task-Force for Osteoporosis. *Osteoporos Int.* 1999;10(4):259-64.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996 Oct;67(10 Suppl):1041-9.

Golmia R, Scheinberg M. Atualização em osteoprotegerina. *Einstein.* 2004;2(3):220-1.

Gomes-Filho IS, Passos Jde S, Cruz SS, Vianna MI, Cerqueira Ede M, Oliveira DC, et al. The association between postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol.* 2007 Sep;78(9):1731-40.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

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.

Häussler B, Gothe H, Göl D, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D. Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. *Osteoporos Int.* 2007 Jan;18(1):77-84.

Hirai T, Ishijima T, Hashikawa Y, Yajima T. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent.* 1993 Jan;69(1):49-56.

Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 2005 Apr;16(4):417-23.

Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta HK, Francis RM, Tuck SP. Plasma vitamin D and cytokines in periodontal disease and postmenopausal osteoporosis. *J Periodontal Res.* 2011 Feb;46(1):97-104.

Jiang G, Matsumoto H, Fujii A. Mandible bone loss in osteoporosis rats. *J Bone Miner Metab.* 2003;21(6):388-95.

Jin Q, Cirelli JA, Park CH, Sugai JV, Taba M Jr, Kostenuik PJ et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *Periodontol.* 2007 Jul;78(7):1300-8.

Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC, Dai X, Newton BI, Tracy RR et al. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *J Periodontol.* 1997 Sep;68(9):864-71.

Jorgensen L, Vik A, Emaus N, Brox J, Hansen JB, Mathiesen E et al. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand: the Tromsø Study. *Osteoporos Int.* 2010 Jun;21(6):931-8.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

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

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihiro S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006 Sep;169(3):987-98.

Kawamoto S, Ejiri S, Nagaoka E, Ozawa H. Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Arch Oral Biol.* 2002 Jan;47(1):67-73.

Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2009;19(1):61-72.

Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent*. 1990 Feb;63(2):218-22.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):101-6.

Kuo L-C, Polson, AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*. 2008;122:417–4.

Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lopes FF, Loureiro FH, Pereira Ade F, Pereira AL, Alves CM. Association between osteoporosis and periodontal disease. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2008 Aug;30(8):379-83.

Liu JM, Zhao HY, Ning G, Zhao YJ, Chen Y, Zhang Zh et al. Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75. *Calcif Tissue Int*. 2005 Jan;76(1):1-6.

Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*. 2005 Apr;50(4):421-9.

Martini LA, Moura EC, Santos LC, Malta DC, Pinheiro Mde M. Prevalence of self-reported diagnosis of osteoporosis in Brazil, 2006. *Rev Saude Publica*. 2009 Nov;43 Suppl 2:107-16.

McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev*. 2007 Jun;12(2):113-45.

Mezquita-Raya P, de la Higuera M, García DF, Alonso G, Ruiz-Requena ME, de Dios Luna J et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2005 Nov;16(11):1368-74.

Moreira C, Pinheiro GRC, Marques Neto JF. *Reumatologia Essencial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

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.

Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, Walsh N, Guddat LW, de Jersey J, et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone.* 2000 Nov;27(5):575-84.

Paquette DW, Madianos P, Offenbacher S, Beck JD, Williams RC. The concept of "risk" and the emerging discipline of periodontal medicine. *Contemp Dent Pract.* 1999 Nov;1(1):1-8.

Patullo IM, Takayama L, Patullo RF, Jorgetti V, Pereira RM. Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling. *Oral Dis.* 2009 Nov;15(8):580-6.

Payne JB, Zachs NR, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil K. The association between estrogen status and alveolar bone density changes in postmenopausal women with a history of periodontitis. *J Periodontol.* 1997 Jan;68(1):24-31.

Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). *Osteoporos Int.* 2009 Mar;20(3):399-408.

Pinheiro Mde M, Elis SR. Epidemiology of osteoporotic fractures in Brazil: what we have and what we need. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2010 Mar;54(2):164-70.

Pinheiro MM, dos Reis Neto ET, Machado FS, Omura F, Yang JH, Szejnfeld J, et al. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Rev Saude Publica*. 2010 Jun;44(3):479-85.

Peters BS, Martini LA. Nutritional aspects of the prevention and treatment of osteoporosis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2010 Mar;54(2):179-85.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, et al. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol*. 2008 Apr;79(4):697-704.

Prabhu A, Mehta DS. A morphologic comparison of gingival changes influenced by cyclosporin and tacrolimus in rats: an experimental study. *J Periodontol*. 2006 Feb;77(2):265-70.

Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, Caraceni P, Facchini A, Ravaglia G et al. Soluble receptor activator of nuclear factor- kappaB Ligand (sRANKL)/osteoprotegerin balance in ageing and age-associated diseases. *Biogerontology*. 2004;5(2):119-27.

Reddy MS. Oral osteoporosis: is there an association between periodontitis and osteoporosis? *Compend Contin Educ Dent*. 2002 Oct;23(10 Suppl):21-8.

Rodini CO, Batista AC, Dionísio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Histol*. 2008 Jun;39(3):275-82.

Seck T, Diel I, Bismar H, Ziegler R, Pfeilschifter J. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *Eur J Endocrinol*. 2001 Aug;145(2):199-205.

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.

Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Mar;105(3):333-41.

Spalding M. Efeito da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da periodontite induzida em ratas. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista - UNESP; 2005.

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.

Taguchi A, Tanimoto K, Suei Y, Wada T. Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Jan;79(1):127-32.

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.

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.

Teitelbaum SL. Osteoclasts, integrins, and osteoporosis. *J Bone Miner Metab*. 2000;18(6):344-9.

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-Dec;17(4):302-6.

Tobón-Arroyave SI, Franco-González LM, Isaza-Guzmán DM, Floréz-Moreno GA, Bravo-Vásquez T, Castañeda-Peláez DA et al. Immunohistochemical expression of RANK, GRalpha and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral Oncol*. 2005 May;41(5):480-8.

Trouvin AP, Goëb V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. *Clin Interv Aging*. 2010 Nov 19;5:345-54.

Uemura H, Yasui T, Miyatani Y, Yamada M, Hiyoshi M, Arisawa K et al. Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in post-menopausal women. *J Endocrinol Invest*. 2008 Feb;31(2):163-8.

Wittrant Y, Theoleyre S, Couillaud S, Dunstan C, Heymann D, Rédini F. Regulation of osteoclast protease expression by RANKL. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct;310(3):774-8.

Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2009 May;12(2):113-9.

Yamaura M, Nakamura T, Tsurukami H, Hijioka A, Narusawa K, Ohnishi H et al. Local bone turnover in the metaphysis of the proximal tibia and the lumbar vertebra during the early periods after ovariectomy in rats. *Calcif Tissue Int*. 1996 Jan;58(1):52-9.

Zhang X, Peng B, Fan M, Bian Z, Chen Z. The effect of estrogen deficiency on receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin synthesis in periapical lesions induced in rats. *J Endod*. 2007 Sep;33(9):1053-6.

Zhang Y, Dong XL, Leung PC, Wong MS. Differential mRNA expression profiles in proximal tibia of aged rats in response to ovariectomy and low-Ca diet. *Bone*. 2009 Jan;44(1):46-52.

Zeeman GG, Veth EO, Dennison DK. Focus on primary care: periodontal disease: implications for women's health. *Obstet Gynecol Surv*. 2001 Jan;56(1):43-9.

APÊNDICE A – Quadro referente os dados da porcentagem de matriz óssea dos grupos Sham, OVZ e OVZ'

HISTOMORFOMETRIA												
	3 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'
R1	46,78	35,89	30,89	39,1	11,96	26,25	22,32	0,89	33,57	33,57	13,57	7,32
R2	33,92	31,78	43,03	13,92	26,6	31,78	11,96	23,39	11,07	35	15,89	50,35
R3	40,89	24,1	10	51,42	22,67	7,14	6,96	0,17	40,89	3,03	33,03	60,89
R4	45,71	10,89	33,03	26,6	34,1	30,71	32,14	13,39	60,71	34,1	35,35	5,17
R5	32,14	25,71	33,21	7,6	10,89	28,75	4,46	21,25	30	51,25	36,07	22,32
R6	44,18	31	21,60	35,17	24,63	29,46	18	0,78	43,57	25,18	28,41	39,28
R7	35	15,87	47,32	29,17	23,1	30,35	25,46	18,22	43,75	32	37,87	16,60
R8	41,7	30,2	25	15,1	11,36	2,14	13,69	18,54	46,42	34,7	19,6	32,85

APÊNDICE B – Quadro referente aos dados da média de células marcadas para TRAP dos grupos Sham, OVZ e OVZ'

TRAP+												
	3 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'
R1	6	14	32	4	5	6	0	0	1	0	7	2
R2	12	7	33	1	24	0	1	2	0	0	3	7
R3	2	13	9	2	1	7	0	0	0	4	3	10
R4	5	5	26	2	22	1	4	2	1	0	1	9
R5	11	13	34	2	8	0	9	0	1	1	6	2
R6	18	7	18	0	3	5	5	0	1	6	5	7
R7	7	1	33	1	7	4	1	8	0	6	4	10
R8	8	28	39	3	29	2	0	8	0	1	6	7

APÊNDICE C – Quadro referente aos dados da marcação imunoistoquímica para OPG em osteoblastos dos grupos Sham, OVZ e OVZ'

OPG												
	3 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'
R1	2	5	4,5	3	0	0	2,25	9	9	0	0	9
R2	1	1,5	2	3,75	1	9	0	7,5	9	2	0	0
R3	1,5	7,5	5	1,5	1	9	9	9	0	0	0	2,25
R4	7,5	5	6	2	5	6,25	0	9	0	0	0	0
R5	1	6,25	4	1	5	5	9	7,5	0	2	1	0
R6	0,5	6,25	1,5	7,5	0	4,5	2	7,5	1,5	3	0,25	0,25
R7	1	1,5	0	3	7,5	9	7,5	5	1	1	0	0
R8	0,5	4	9	3	1	7,5	0	6,25	0,25	0,5	0,25	0

APÊNDICE D – Quadro referente aos dados da marcação imunoistoquímica para RANKL em osteoblastos dos grupos Sham, OVZ e OVZ'

RANKL												
	3 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'
R1	1	0	1,5	1	0	1,5	1	0	1	2	0	0
R2	0,25	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0
R3	0,25	0	0	0	0,25	0	0	1	0	0	0	0
R4	1	0	0	1	0	0	0,25	0	0	0	0	0
R5	2	0	0	0	0,25	0	0,25	0	0	0	0	0
R6	1	0	0	1	0	0	0,25	0	0	0,25	0	0
R7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,25	0	0
R8	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4

APÊNDICE E – Quadro referente aos dados da marcação imunoistoquímica para RANK em osteoclastos dos grupos Sham, OVZ e OVZ'

RANK												
	3 dias			7 dias			14 dias			30 dias		
	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'	Sham	OVZ	OVZ'
R1	0	0	0	1	0	1,5	0	0	0	0	0	4
R2	0	2,5	0	6	0	1	1	0	0	0	0	1
R3	0	0	0	2	0,5	2	2	4	0,5	0	0	2
R4	0	0	0	1	0	2	0	0,25	0	0	0	0,25
R5	0	0	0	0	0	2	1,5	1	0	0	0	0,25
R6	0	0,25	0	2	0	0	0	1,5	1	0	0	0,25
R7	0	0	0	0	0,5	0	0	2	0	0	0	2
R8	0	2	0	0	0	0,25	1	2,25	0	0	0	0,25

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisas

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **01/2008-PA/CEP**, sobre **“Influência da ovariectomia em ratas associada à dieta deficiente em cálcio e à ausência de esforço mastigatório na evolução da doença periodontal induzida”** sob 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, 10 de março de 2008.



Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC