

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

DANILA DE OLIVEIRA

**Efeito da teriparatida sobre o processo de reparo alveolar
em ratos orquiectomizados. Análise imunoistoquímica e
microtomográfica.**

Araçatuba - SP

2017

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP

Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba

DANILA DE OLIVEIRA

Efeito da teriparatida sobre o processo de reparo alveolar em ratos orquiectomizados. Análise imunoistoquímica e microtomográfica.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba - SP

2017

Dedicat6ria

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Roberto Aparecido de Oliveira, por ser um exemplo de homem trabalhador, honesto, paciente e amoroso. Obrigada por ensinar e incentivar seus filhos a traçarem bons caminhos. Espero que Deus te dê muita saúde para desfrutar bons momentos e ver seus filhos dando bons frutos. O senhor é e sempre será o nosso maior exemplo de vida!

A minha mãe, Marly Venturelli Oliveira, por ser a minha melhor amiga, por seu coração imenso e por sempre cuidar de todos nós. A senhora é um exemplo de mulher batalhadora e que sempre fez de tudo para o bem-estar da nossa família. Que a senhora tenha muita saúde para aproveitar os filhos e netos! Agora é a hora de retribuirmos tudo o que a senhora e o papai fizeram por nós! Te amo e te admiro muito!

Ao meu irmão mais velho, Kleber Oliveira, por ser meu porto seguro e minha referência de vida. Obrigada pela compreensão, amor, apoio, amizade e cumplicidade. Obrigada por sempre se preocupar e cuidar de mim! A sua participação foi de fundamental importância para a consolidação dessa etapa. Espero, um dia, poder retribuir tudo o que você fez por mim!

Ao meu irmão, Thiago Oliveira, por seu amor e bondade. Eu sei que mesmo distante você sempre tentou estar presente e sempre se mostrou compreensível durante as minhas dificuldades. Você é um exemplo de determinação e força de vontade! Espero que ainda possamos partilhar muitos momentos juntos. Sinto muita saudade!

Aos meus sobrinhos, Guilherme, Lucas e Clara, por me proporcionarem momentos de felicidades e me mostrarem o quanto a vida é maravilhosa. Eu desejo a vocês todas as coisas boas da vida e saibam que, em qualquer situação, podem contar comigo. Vocês foram e são minha saudade constante. A titia ama vocês!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, família e amigos. Pelo verdadeiro amor e por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A minha orientadora, Prof. Dra. Roberta Okamoto, por sua disponibilidade e amizade durante os meus seis anos de graduação. Agradeço pelo suporte e incentivo, pelas inúmeras oportunidades, pela paciência, pela humildade, pela confiança e por tudo que me ensinou. Todas as minhas grandes conquistas na graduação foram graças à senhora e eu serei eternamente grata. É um orgulho muito grande ter feito parte de uma equipe tão bem estruturada como a da senhora. Que Deus continue abençoando todos os seus caminhos, pois a senhora é merecedora de cada conquista! Sentirei muita saudade das nossas conversas, da nossa equipe, do laboratório e do departamento...

A Prof. Dra. Mariza Akemi Matsumoto, pelos ensinamentos e auxílio nos afazeres do laboratório, pela amizade e por ser uma pessoa de fácil convívio e coração enorme. Te admiro muito e obrigada por tudo!

Aos professores das disciplinas de Anatomia e Histologia, Prof. Dr. José Américo, Prof. Dr. Paulo Botacin, Prof. Dr. Roelf Rizzolo, Prof. Dr. Edilson Ervolino, Prof. Dr. Cláudio Casatti e Prof. Dra. Alaíde Gonçalves, por serem grandes docentes, pela disposição em ensinar e pela boa convivência no departamento.

Aos professores da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-Facial, Prof. Dr. Idelmo Rangel, Prof. Dr. Osvaldo Magro, Prof. Dra. Alessandra Aranega, Prof. Dra. Ana Paula Bassi, Prof. Dra. Daniela Ponzoni e Prof. Dr. Leonardo Faverani, por serem grandes docentes e por abrirem as portas e nos fazer sentir em casa quando precisávamos estar no departamento ou no laboratório da disciplina.

A Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP na pessoa do Diretor Prof. Dr. Wilson Roberto Poi pela oportunidade de realização do curso de graduação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 2015/20203-9), indispensável para a realização deste trabalho.

Ao meu namorado, Pedro Henrique, por ser uma pessoa incrível e demonstrar seu amor e respeito todos os dias. Obrigada por sempre se preocupar e cuidar de mim, me ajudar nas dificuldades, me incentivar quando preciso e comemorar comigo cada conquista. Que o nosso amor e companheirismo aumente cada vez mais para juntos realizarmos nossos sonhos. Te amo muito, meu Lindo!

Ao meu amigo, Fernando Isquierdo, por me incentivar a seguir meus sonhos, me mostrar um outro lado da Odontologia e ser paciente quando me ensina. Você exerce a Odontologia com muito amor e dedicação sendo para mim um exemplo de pessoa, cirurgião-dentista e pesquisador. Espero aprender ainda muito mais com você e que nossa parceria e amizade se fortaleça a cada dia. Muito obrigada por tudo!

A minha amiga de infância, Andressa Ferro, a pessoa que eu compartilhei todas as minhas conquistas e derrotas. Muito obrigada pela amizade!

As minhas amigas de sala e duplas de clínicas, Camila Nathiele e Mariana Menezes, aprendemos e erramos juntas e agora vencemos mais uma etapa juntas!

As minhas amigas Elisa Furquim e Leticia Pitol por serem meu porto seguro em Araçatuba, por compartilharmos juntas dos bons e dos ruins momentos. Podem contar sempre comigo!

As minhas colegas e companheiras de estágio, Fernanda Yogui, Jaqueline Hassumi, Leticia Pitol, Elisa Furquim, Ana Cláudia Ervolino, Karen Lumi e Paula Frigério, pela boa convivência durante todos esses anos.

Aos pós graduandos da Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-Facial e do nosso grupo de pesquisa, André, Juliana, Pedro, Gustavo, Igor, Gabriel e Fábio, pelo bom convívio e realização dos trabalhos em equipe.

Aos colegas de sala de aula por compartilharmos seis anos de convívio e aprendizado. Desejo muito sucesso a todos vocês!

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela ajuda e por fazerem funcionar os diversos setores da nossa faculdade. Muito obrigada!

Epígrafe

“Nunca se afaste de seus sonhos, pois se eles se forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir.”

Charles Chaplin

Resumo

Oliveira D. **Efeito da teriparatida sobre o processo de reparo alveolar em ratos orquiectomizados. Análise imunoistoquímica e microtomográfica.** 2017. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

Objetivo: avaliar a influência da teriparatida no processo de reparo alveolar em ratos orquiectomizados através das análises microtomográfica e imunoistoquímica. **Materiais e Métodos:** 54 ratos machos e adultos foram divididos em três grupos experimentais: 18 ratos controle (SHAM); 18 ratos orquiectomizados (ORQ ST); 18 ratos orquiectomizados e tratados com teriparatida (ORQ TERI). Aos 30 dias após a orquiectomia deu início ao tratamento medicamentoso com teriparatida no grupo ORQ TERI, aos 60 dias foi realizada a exodontia do incisivo superior direito dos animais de todos os grupos e aos 14 e 42 dias após a exodontia foram realizadas as eutanásias através de sobredosagem anestésica. Para a análise imunoistoquímica analisou, qualitativamente através da atribuição de escores, a expressão das proteínas wnt, alp, oc e trap e para a análise microtomográfica (micro CT) analisou os parâmetros volume e porcentagem de volume ósseo (BV, BV/TV), número de trabéculas ósseas (Tb.N), separação e espessura do trabeculado ósseo (Tb.Sp, Tb.Th). Os dados quantitativos da micro CT passaram pela análise de homocedasticidade (teste de Shapiro-Wilk), para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram comparados pelo teste ANOVA 1 fator e pós-teste Bonferroni, adotou-se o nível de significância $p < 0,05$. **Resultados:** Na análise imunoistoquímica houve marcação moderada da wnt nos grupos SHAM e ORQ TERI aos 14 dias, tornando-se intensa aos 42 dias. A alp apresentou marcação moderada somente no ORQ TERI e leve nos demais grupos em ambos os períodos. A oc foi semelhante em todos os grupos e períodos com marcação leve. A trap apresentou marcação moderada nos grupos SHAM e ORQ ST e leve no grupo ORQ TERI aos 14 e 42 dias. Para o parâmetro BV o grupo ORQ TERI apresentou o maior valor ($157,91\text{mm}^3$) em relação aos demais grupos (ORQ ST: $p < 0,05$). Não houve diferença estatisticamente significativa na comparação dos resultados intragrupos para os parâmetros BV/TV, Tb.Sp e Tb.Th. Para Tb.N o ORQ ST apresentou o maior valor ($0,496\text{mm}$) em relação aos demais

grupos (ORQ TERI: $p < 0,05$). **Conclusão:** A teriparatida consegue reverter o prejuízo no metabolismo do tecido ósseo reparacional causado pela condição da orquiectomia.

Palavras-chave: Osteoporose. Orquiectomia. Teriparatida. Homens. Proteínas Wnt. Fosfatase Alcalina. Osteocalcina.

Abstract

Oliveira D. **Effect of the teriparatide in the alveolar bone repair process in orchietomy rats. Analysis immunohistochemical and tridimensional microtomography.** 2017. 56 p. End of course paper (Bachelor degree) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the influence of teriparatide on the alveolar bone repair in orchietomy rats through tridimensional microtomography and immunohistochemical analysis. **Materials and Methods:** 54 male and adults rats were divided into three experimental groups: 18 control rats (SHAM); 18 orchietomized rats (ORQ ST); and 18 orchietomized rats treated with teriparatide (ORQ TERI). At 30 days after the orchietomy the teriparatide drug treatment started in the ORQ TERI group, at 60 days, the right upper incisor of the animals of all groups was extracted and at 14 and 42 days after the extraction the rats were euthanized. For the immunohistochemical analysis, the expression of the wnt, alp, oc and trap proteins was analyzed. For the microtomography (micro CT) evaluation of volume and percentage of bone volume (BV, BV/TV), trabecular thickness (Tb.Th), number and separation of trabeculae (Tb.N, Tb.Sp). The quantitative data of the micro CT underwent the homoscedasticity analysis (Shapiro-Wilk test), to distinguish the parametric and nonparametric data. The parametric data were compared by ANOVA 1 factor test and Bonferroni post-test, with significance level $p < 0.05$. **Results:** In the immunohistochemistry analysis, there was a moderate expression of wnt in the SHAM and ORQ TERI groups at 14 days, becoming intense at 42 days. Alp presented moderate expression only in ORQ TERI and light in the other groups in both periods. OC was similar in all groups and periods with light expression. The trap presented moderate expression in SHAM and ORQ ST groups and light in ORQ TERI group at 14 and 42 days. For the BV parameter, the ORQ TERI presented the highest value (157.91mm^3) in relation to the other groups (ORQ ST: $p < 0.05$). There was no statistically significant difference in the comparison of intragroup results for BV/TV, Tb.Sp and Tb.Th. For Tb.N the ORQ ST presented the highest value (0.496mm) in relation to the other groups (ORQ TERI: $p < 0.05$). **Conclusion:** Teriparatide can reverse the loss in the metabolism of reparative bone tissue caused by the condition of orchietomy.

Key-Words: Osteoporosis. Orchiectomy. Teriparatide. Men. Wnt Proteins. Alkaline Phosphatase. Osteocalcin.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho ilustrativo dos grupos experimentais. 44
- Figura 2** - Orquiectomia bilateral. A: Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; B: Incisão; C e D: Exposição de ambos escrotos; E: Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; F: Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; G: Sutura; H: Ambos escrotos removidos (Orquiectomia). 44
- Figura 3** - Exodontia. A: Pré operatório. B: Antissepsia com PVPI. C, D e E: Luxação e exodontia do incisivo superior direito. F: Incisivo superior direito fora do alvéolo. 45
- Figura 4** - Delineamento experimental. 45
- Figura 5** - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína WNT aos 42 dias. (Original, 40x). 46
- Figura 6** - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína ALP aos 42 dias. (Original, 40x). 46
- Figura 7** - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína OC aos 42 dias. (Original, 40x). 46
- Figura 8** - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína TRAP aos 42 dias. (Original, 40x). 47
- Figura 9** - Volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. (* $p < 0,05$). 47
- Figura 10** - Porcentagem de volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$). 48
- Figura 11** - Número de trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. (* $p < 0,05$). 48
- Figura 12** - Separação entre as trabéculas. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$). 49
- Figura 13** - Espessura do trabeculado ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$). 49

Lista de Tabela

LI STA DE TABELA

Tabela 1 – Escores observados na marcação das proteínas WNT, ALP, OC e TRAP nos diferentes grupos experimentais.

50

*Lista de
Abreviaturas*

LISTA DE ABREVIATURAS

Al – Alumínio

Alp – Fosfatase alcalina

BV - Volume ósseo

BV/TV - Percentual de volume ósseo

Ca – Cálcio

Cu – Cobre

G – Grama

H - Hora

Kv - Quilovolt

Micro CT - Microtomografia Computadorizada

Min – minuto

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mm³ - Milímetros cúbicos

N – Newton

Oc - Osteocalcina

P – Fosfato

PTH – Paratormônio

Rpm - Rotações por minuto

Tb.N - Número de trabéculas

Tb.Sp - Separação entre as trabéculas

Tb.Th – Espessura das trabéculas

Vs - versus

μA - Microampére

μg/kg/dia - Micrograma por quilograma por dia

μm – Micrômetro

μm² - Micrômetro quadrado

% - Porcentagem

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVO	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 Animais.....	29
3.2 Orquiectomia bilateral.....	29
3.3 Tratamento medicamentoso.....	30
3.4 Exodontia.....	30
3.5 Processamento laboratorial.....	30
3.5.1 Análise imunoistoquímica.....	30
3.5.2 Análise microtomográfica.....	31
3.6 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1 Análise imunoistoquímica.....	34
4.2 Análise microtomográfica.....	34
5. DISCUSSÃO	36
6. CONCLUSÃO	41
FIGURAS E TABELAS	43
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	55

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é reconhecida como um problema de saúde significativo em mulheres, atingindo aproximadamente 2/3 desta população na fase pós-menopausa (1, 2). A maioria dos estudos encontrados na literatura são relacionados com o tratamento da osteoporose no sexo feminino (3-6). No entanto, essa patologia também é relatada no sexo masculino, com maior incidência nos indivíduos acima de 50 anos de idade e com estimativa de que um em cada oito homens acima dessa faixa etária sofre algum tipo de fratura devido a osteoporose durante a vida (2, 7, 8).

As causas da diminuição da massa óssea em homens são: senilidade, diminuição da absorção intestinal de cálcio, insuficiência de vitamina D e o hipogonadismo (9-11). Com relação ao último, sabe-se que a aromatização da testosterona em estradiol é importante na regulação da homeostase dos ossos em homens com evidências de que os níveis de estradiol livre ou biodisponíveis podem ser necessários para a manutenção fisiológica da remodelação óssea, limitando, assim, a perda óssea relacionada com a idade (9, 12-15).

Para o tratamento da osteoporose em seu estágio inicial é indicado o uso de medicamentos que promovem antirreabsorção óssea, como o denosumabe, raloxifeno, calcitonina ou os medicamentos da classe dos bifosfonatos (8). Em contrapartida, para o tratamento da osteoporose mais grave, é necessário o uso de agentes anabolizantes do tecido ósseo que aumentam a densidade mineral óssea. A teriparatida, um análogo do paratormônio (PTH), é relatada como uma opção eficaz para os casos de osteoporose mais grave no sexo masculino (16). Ela atua diretamente sobre a formação óssea através do aumento do número e ativação de osteoblastos e indiretamente através do aumento da reabsorção tubular e absorção intestinal de cálcio (16, 17). Sendo que o efeito anabolizante deste medicamento é maior quando administrado de forma intermitente e mais rápido nos primeiros 6 a 12 meses de administração com tendência a diminuir após esse período (18).

Estudos na literatura mostrando o comportamento da teriparatida administrada durante a avaliação do processo de reparo em modelos de fratura óssea, mostram, a partir de parâmetros morfométricos, um efeito favorável dessa medicação (19-22). Além disso, Kuroshima, Al-Salihi e Yamashita (2013) observaram, em um

estudo em roedores, que a administração de teriparatida após exodontia melhora a formação óssea no alvéolo. Esse processo de reparo alveolar representa um modelo interessante para avaliação da dinâmica do tecido ósseo, no qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento do alvéolo previamente ocupado pelo dente, finalizado por uma remodelação (23, 24). Sendo assim, a verificação do comportamento de medicações que promovam o aumento da densidade óssea, possibilitando o estabelecimento de um protocolo clínico para o tratamento da osteoporose no sexo masculino, é fundamental, tendo em vista o aumento da população com esta desordem do metabolismo ósseo nos consultórios odontológicos em busca de tratamento dentários.

Objetivo

2 OBJETIVO

Avaliar a influência da teriparatida no processo de reparo alveolar em ratos orquiectomizados através das análises microtomográfica e imunoistoquímica.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Inicialmente o projeto foi enviado para o Comitê de ética em pesquisa no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e obteve parecer favorável (Processo FOA nº 706/2015) (**Anexo A**).

Foram selecionados 54 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, adultos, com peso de aproximadamente 500g cada, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, e eles foram divididos em três grupos experimentais de acordo com a cirurgia de indução do estado osteopênico e tratamento medicamentoso: grupo SHAM (18 ratos submetidos à cirurgia fictícia); grupo ORQ ST (18 ratos submetidos à orquiectomia bilateral e sem tratamento medicamentoso); e, grupo ORQ TERI (18 ratos submetidos à orquiectomia bilateral e tratados com teriparatida). Estes animais foram mantidos em gaiolas e alimentados com ração balanceada (NUVILAB, Curitiba PR, Brasil) contendo 1.4% Ca e 0.8% P e água *ad libitum* durante todo o experimento (**Figura 1**).

3.2 Orquiectomia bilateral

Os 36 ratos dos grupos ORQ ST e ORQ TERI foram anestesiados por infiltração intramuscular de Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda) e Vetaset (Cloridrato de Quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada pelo fabricante e, a seguir, foram realizadas incisões em ambos os sacos escrotais, com a exposição dos testículos. Com a pinça hemostática o funículo espermático foi apresentado, com concomitante individualização e laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular, e então seccionados. Os testículos foram removidos e a ferida cirúrgica suturada com fio de seda 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil). Os 18 ratos do grupo SHAM passaram pelo mesmo procedimento, porém foi apenas realizada a exposição cirúrgica dos testículos sem sua remoção, com intuito de submeter os animais deste grupo ao mesmo estresse cirúrgico dos demais grupos (25) (**Figura 2A, B, C, D, E, F, G, H**). No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

3.3 Tratamento medicamentoso

Após trinta dias do procedimento cirúrgico de orquiectomia ou cirurgia fictícia, os ratos do grupo ORQ TERI foram submetidos a injeções subcutânea diárias de teriparatida (0,5 µg/kg/dia) e os ratos dos grupos SHAM e ORQ ST submetidos à aplicação subcutânea de solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) até o fim dos períodos experimentais de 14 e 42 dias após exodontia (26).

3.4 Exodontia

Um mês após o início da terapia medicamentosa com teriparatida todos os ratos foram anestesiados por infiltração intramuscular de Coopazine (Xilazina-Coopers, Brasil, Ltda) e Vetaset (Cloridrato de Quetamina injetável, Fort Dodge, Saúde Animal Ltda) na dosagem indicada pelo fabricante, foi realizada a antisepsia do campo operatório com polivinilpirrolidona iodada (Riodeine Indústria Química e Farmacêutica Rio Química, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil) e em seguida, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, utilizando instrumental especialmente adaptado para este fim (23). A mucosa gengival foi suturada com fio de poliglactina 910 (Vicryl 4.0 – Jhonson&Jhonson, New Brunswick, NJ, Estados Unidos). No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP) (**Figuras 3A, B, C, D, E, F**).

Decorridos 14 dias após a exodontia foi realizada a eutanásia, através de sobredosagem anestésica, de 6 animais de cada grupo experimental para a realização da análise imunoistoquímica, e os outros 36 animais restantes, após 42 dias para a realização das análises microtomográfica e imunoistoquímica (**Figura 4**).

3.5 Processo laboratorial

3.5.1 Análise imunoistoquímica

Após a eutanásia dos animais, as maxilas dos ratos foram removidas e fixadas em solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas e banhadas em água corrente por 24 horas.

Posteriormente foi realizada a descalcificação das maxilas em EDTA 10%, seguida pela desidratação com uma sequência de álcoois. Após foi feita a diafanização com xilol e inclusão das peças em parafina.

A partir das amostras incluídas em parafina, foram obtidos cortes com 5µm de espessura e montados em lâminas. A reação imunoistoquímica foi realizada através da técnica de imunoperoxidase indireta com amplificador. Portanto foi utilizado o peróxido de hidrogênio a 3% (Merck Laboratories), para a inibição da peroxidase endógena. A recuperação antigênica foi realizada a partir da imersão das lâminas em tampão fosfato citrato, ph=6, mantidas em vaporeira (calor úmido), por 20 minutos. Os bloqueios de reações inespecíficas foram realizados com albumina bovina (Sigma) e leite desnatado. Os anticorpos primários utilizados foram contra wnt, fosfatase alcalina, osteocalcina e trap, sendo estes anticorpos policlonais produzidos em cabras (Santa Cruz Biotechnology). A proteína wnt evidencia a diferenciação, ativação e recrutamento dos osteoblastos (28, 29); a fosfatase alcalina, o início do processo de mineralização pela precipitação do íon fosfato (30, 31); a osteocalcina é uma proteína tardia e é considerada o marcador da mineralização do tecido ósseo (32); e a trap apresenta marcação positiva para os osteoclastos, sendo assim, foi possível caracterizar o *turnover* ósseo.

Como anticorpo secundário, foi utilizado o anticorpo secundário biotilado anti-cabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology), o amplificador foi a Avidina e Biotina (Vector Laboratories) e a diaminobenzidina (Dako) como cromógeno. Ao término da revelação pela Diaminobenzidina, foi realizada a contra-coloração dos cortes histológicos por Hematoxilina de Harris. A análise das imunomarcações foi realizada no terço médio do alvéolo, por meio da atribuição de escores, onde o escore 1 representa marcação leve (+), 2 moderado (++) e 3 intenso (+++). Os escores foram atribuídos de acordo com a extensão da área de marcação positiva para cada um dos anticorpos analisados, respeitando-se as diferentes características nos padrões de imunomarcações sejam células ou matriz extracelular (33, 34).

3.5.2 Análise microtomográfica

Após a eutanásia dos animais (6 ratos de cada grupo experimental), as maxilas foram removidas, fixadas solução de formalina tamponada a 10% (Reagentes Analíticos, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) durante 48 horas, lavadas 24 horas em água corrente e armazenados em álcool 70%, para que

as peças fossem submetidas à análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada.

As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 9 μm de espessura (80Kv e 300 μA), com filtro de Cobre e Alumínio e passo de rotação de 0.3 mm, tamanho do pixel de 12.45 μm^2 e com tempo de aquisição de 1h e 26min. As imagens obtidas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstituídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0), com correção dos anéis de artefato de 8, Beam Hardening Correction de 24% e a faixa de conversão de imagem variou de 0,0 – 0,14. No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram direcionadas e foi selecionado um plano (plano sagital) para posterior avaliação. Em seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foram avaliados os parâmetros volume ósseo, porcentagem de volume ósseo, número de trabéculas ósseas, separação e espessura do trabeculado ósseo (27).

3.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Sigma Plot 12.3 (San Jose, CA, EUA). A análise da homocedasticidade foi realizado pelo teste de Shapiro-Wilk, para distinção dos dados paramétricos e não paramétricos. Para análise dos dados paramétricos do micro CT de volume ósseo (BV), porcentagem do volume ósseo (BV/TV), espessura do trabeculado ósseo (Tb.Th), separação e número de trabéculas (TB.Sp e Tb.N), foi utilizado o teste ANOVA 1 fator e pós-teste Bonferroni. Adotou-se o nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise imunoistoquímica

Na tabela 1 é possível observar os escores representativos observados em todos os grupos (SHAM, ORQ ST e ORQ TERI) e períodos experimentais para todas as proteínas estudadas (wnt, fosfatase alcalina, osteocalcina e trap). A tabela ilustra as análises realizadas nos dois períodos, no entanto, para a representação dos grupos experimentais e as diferentes proteínas, foram ilustrados apenas o período de 42 dias pós exodontia (período em que foram realizadas as análises morfométricas pela microtomografia computadorizada).

A wnt apresentou marcação moderada (++) nos grupos SHAM e ORQ TERI e leve (+) no grupo ORQ ST aos 14 dias após a exodontia. Ela se torna intensa (+++) nos grupos SHAM e ORQ TERI e moderada (++) no grupo ORQ ST aos 42 dias após a exodontia (**Figura 5**).

A alp apresentou marcação leve (+) nos grupos SHAM e ORQ ST e moderada (++) no grupo ORQ TERI em ambos os períodos analisados (**Figura 6**).

A oc apresentou marcação moderada (++) nos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI aos 14 dias após a exodontia. Essa marcação moderada se manteve nos grupos SHAM e ORQ ST aos 42 após a exodontia e se tornou intensa (+++) no grupo ORQ TERI (**Figura 7**).

A trap apresentou marcação moderada (++) nos grupos SHAM e ORQ ST e leve (+) no grupo ORQ TERI em ambos os períodos analisados (**Figura 8**).

4.2 Análise microtomográfica

A média dos valores referentes ao volume ósseo no grupo SHAM foi 124,12mm³, no grupo ORQ ST 65mm³, e no grupo ORQ TERI 157,91mm³. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos SHAM e ORQ ST, bem como ORQ ST e ORQ TERI ($p < 0,05$, Teste Bonferroni). (**Figura 9**).

Os valores médios referentes a porcentagem do volume ósseo no grupo SHAM foi 60,35%, no grupo ORQ ST 59,69% e 67,18% no grupo ORQ TERI, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre si ($p > 0,05$). (**Figura 10**).

A média dos valores referentes ao número de trabéculas ósseas nas amostras dos animais do grupo SHAM foi 0,417mm, no ORQ ST 0,496mm e no ORQ TERI 0,358mm. Observa-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ORQ ST e ORQ TERI ($p < 0,05$, Teste Bonferroni), mostrando menor número de trabéculas ósseas presentes no último grupo experimental (**Figura 11**).

O parâmetro separação entre as trabéculas ósseas mostrou os seguintes valores: no grupo SHAM 1,103mm, no grupo ORQ ST 0,764mm e 1,067mm no grupo ORQ TERI. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p > 0,05$) (**Figura 12**).

Com relação aos valores médios referentes a espessura do trabeculado ósseo obtidas para os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI foram observados respectivamente os seguintes valores: 1,46mm; 1,21mm e 1,87mm. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$). (**Figura 13**). No entanto, nota-se uma tendência a superioridade nos valores observados nas amostras do grupo ORQ TERI.

Discussão

5 DISCUSSÃO

A análise morfométrica dos parâmetros avaliados no presente estudo mostram tendência para a formação de um tecido ósseo reparacional de melhor qualidade e em maior quantidade nos animais do grupo SHAM, conforme o esperado, e no grupo ORQ TERI (19, 20, 35). Dados recentes submetidos a publicação, em que foi avaliada a morfometria do osso reparacional aos 28 dias após a exodontia do incisivo superior de ratos em condições homeostáticas, mostram um aumento significativo dos parâmetros volume ósseo, porcentagem de volume ósseo e espessura das trabéculas ósseas. Conseqüentemente, neste mesmo período observa-se uma redução na separação entre as trabéculas ósseas e porosidade do tecido ósseo. Nos resultados apresentados neste estudo, a análise foi feita aos 42 dias após a exodontia, uma vez que em função da interferência sistêmica, sabidamente haverá um atraso na cronologia do processo de reparo alveolar, justificando a análise em períodos tardios (32, 36, 37).

O tratamento do comprometimento sistêmico em questão com a teriparatida mostrou um tecido ósseo reparacional com características morfométricas semelhantes, e em alguns parâmetros até superiores, ao padrão de tecido observado no grupo SHAM. E fica evidente que há uma melhora das características do tecido ósseo reparacional, mesmo sem apresentar diferenças estatisticamente significativas em muitos dos parâmetros analisados, quando comparado com a interferência sistêmica sem tratamento (grupo ORQ ST).

No entanto, se trata de um estudo inicial, em que a deficiência de testosterona pela orquiectomia, poderia ser um modelo experimental para se avaliar a deficiência do metabolismo ósseo em condições da ausência deste esteroide gonadal. O atraso na cronologia do processo de reparo alveolar e a formação de tecido ósseo com maior grau de imaturidade mostram que este é um modelo promissor. Há necessidade em se caracterizar melhor este modelo experimental para torná-lo um modelo mais fundamentado para a avaliação da predisposição de condições de osteoporose, no caso, em função da andropausa, pois a literatura mostra este modelo experimental já utilizado para caracterizar a osteopenia no gênero masculino de ratos (38).

Ainda com relação aos grupos experimentais avaliados, o tratamento com teriparatida se mostrou promissor no sentido de reverter as características

prejudicadas do osso reparacional em função da interferência sistêmica, sendo que a administração de forma intermitente da teriparatida, que em função de atuar ativando osteoblastos, *bone lining cells* ou inibindo a apoptose osteoblástica, estimula o processo de formação do tecido ósseo, sendo considerada uma medicação anabolizante (17).

Em condições normais, o osso de boa qualidade normalmente apresenta maior espessura trabecular, menor número e maior espaço entre as trabéculas, em contrapartida, o osso de baixa qualidade normalmente apresenta menor espessura trabecular, maior número e menor espaço entre as trabéculas (27). Assim, os parâmetros morfométricos avaliados conjuntamente mostraram, aos 42 dias após a exodontia, um osso de boa qualidade nos animais do grupo SHAM e ORQ TERI e um osso com pior qualidade quando na condição de orquiectomia (ORQ ST).

Com relação às proteínas possivelmente envolvidas nas respostas do processo de reparo alveolar nas condições experimentais avaliadas, destacamos a participação da proteína wnt, a qual foi descrita recentemente e é a principal proteína que ativa a Via Wnt, relacionada a sinalização das etapas de osteoblastogênese e etapas iniciais da formação de tecido ósseo (28, 29). No presente estudo, houve marcação mais evidente da wnt após a administração da teriparatida, e foi possível observar que, aos 42 dias após a exodontia, ela está expressa de forma intensa nos grupos SHAM e ORQ TERI, comprovando que a atividade osteoblástica e os processos de formação óssea estão presentes de forma importante nos dois grupos mencionados, mostrando a cronologia normal do reparo alveolar. A imunomarcação marcada de forma intensa no grupo experimental tratado com a teriparatida (ORQ TERI), confirma a hipótese de que a teriparatida atua diretamente sobre a Via Wnt (17). No grupo interferência sistêmica sem tratamento (ORQ ST), a marcação leve sugere atraso no processo de reparo alveolar nesse grupo experimental, prejudicado pela menor atividade de formação óssea.

A enzima fosfatase alcalina, aos 42 dias, mostrou-se marcada de forma moderada no grupo ORQ TERI, qualitativamente mais expressa nas células deste grupo quando comparado aos cortes analisados dos grupos SHAM e ORQ ST. Este resultado sugere uma atividade importante da fosfatase alcalina, marcador da atuação de osteoblastos e precipitação do íon fosfato, no processo de formação óssea na presença da teriparatida, uma vez que não houve diferenças importantes nas imunomarcações dos osteoblastos do tecido em reparação para os animais SHAM ou

ORQ ST (39, 40). Estes resultados foram confirmados pela marcação da osteocalcina, que também caracterizou importante atividade osteoblástica e de mineralização, principalmente na presença da medicação. Outro aspecto importante é a marcação observada para a osteocalcina nos animais do grupo ORQ ST, no entanto, é importante ressaltar que neste grupo as marcações aparecem principalmente no tecido conjuntivo intertrabecular em função da menor quantidade de trabéculas ósseas neoformadas, mesmo aos 42 dias após a exodontia.

Com relação a atividade osteoclástica, a marcação positiva para trap mostrou-se reduzida nos animais do grupo ORQ TERI com marcação leve em ambos os períodos analisados, confirmando que neste grupo a atividade de formação óssea é mais relevante que a atividade de reabsorção. Maior quantidade de osteoclastos em atividade de reabsorção foi visualizada nos animais dos grupos controle e orquiectomizados sem tratamento.

Estabelecendo-se correlação entre os resultados morfométricos (microtomográficos) e imunoistoquímicos, é possível observar uma melhora de grande parte dos parâmetros avaliados no grupo ORQ TERI quando comparado ao grupo ORQ ST. Como destacado anteriormente, a partir dos parâmetros morfométricos e a análise quantitativa de parâmetros como volume e porcentagem do tecido ósseo, número, espessura e separação entre as trabéculas, foi possível caracterizar o osso reparacional de melhor qualidade nos animais do grupo SHAM e ORQ TERI. Estudos na literatura, mostrando o comportamento da teriparatida administrada durante a avaliação do processo de reparo em modelos de fratura óssea, mostram, a partir de parâmetros morfométricos, um efeito favorável dessa medicação (19-22). Portanto, o presente estudo mostra que o padrão comportamental do tecido ósseo alveolar se apresentou semelhante ao padrão de outros ossos avaliados em estudos da literatura.

Ainda, o presente estudo apresenta um aspecto diferencial dos estudos avaliados anteriormente, em função do quadro de osteopenia ter se desenvolvido no sexo masculino, uma vez que se constitui também em um dos objetivos do trabalho, avaliar um quadro que predisporia a osteoporose neste sexo, pois estudos realizados anteriormente associaram a teriparatida ao tratamento da osteoporose em ratas com osteoporose induzida (ovariectomizadas) (19, 20).

Alterações discretas prejudicando o metabolismo ósseo reparacional foram observados nos animais do grupo interferência sistêmica sem tratamento

medicamentoso (ORQ ST). Em contrapartida, no ORQ TERI a teriparatida reverte a maioria dos parâmetros que foram prejudicados quando da análise do osso reparacional avaliado nos animais com comprometimento sistêmico. Também é importante, para futuro estudos, avaliar o comportamento do tecido ósseo reparacional frente a maiores períodos após a orquiectomia, pois a longo prazo, é possível que as dificuldades em se garantir o metabolismo ósseo sejam maiores. Vale destacar que nas condições de deficiência de estrógeno, apenas após 120 dias da cirurgia de ovariectomia, considera-se a condição de osteoporose instalada nos animais experimentais.

O atraso na cronologia do processo de reparo alveolar no grupo de animais orquiectomizados mostram que este é um modelo promissor e que precisa ser melhor investigado quando se busca caracterizar a osteopenia por interferência dos esteroides gonadais, especialmente na questão do dimorfismo sexual. Mais estudos se fazem necessários para melhor caracterizar a biologia do tecido ósseo reparacional neste modelo experimental tratado ou não com teriparatida sobre o processo de reparo alveolar após exodontia.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

A teriparatida consegue reverter o prejuízo no metabolismo do tecido ósseo reparacional causado pela condição da orquiectomia.

Fíguas e Tabelas

FIGURAS

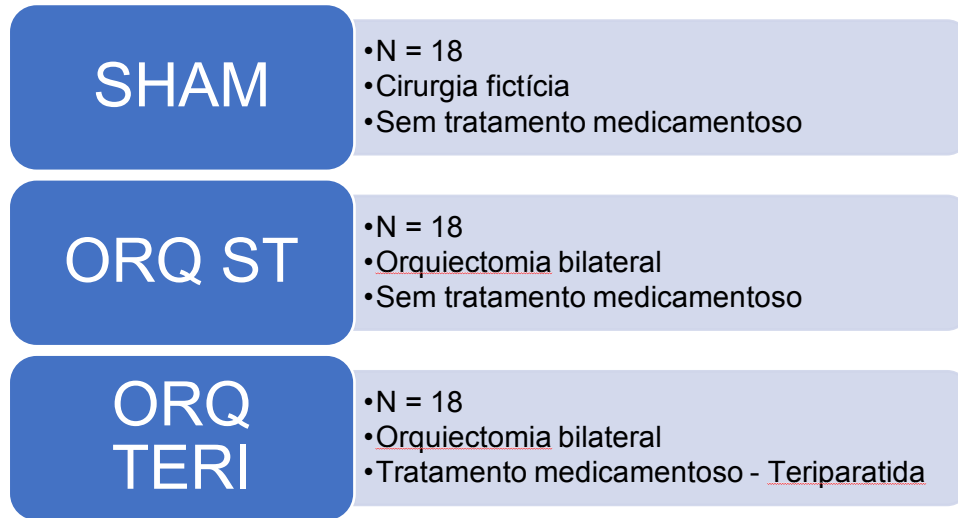


Figura 1 – Desenho ilustrativo dos grupos experimentais.

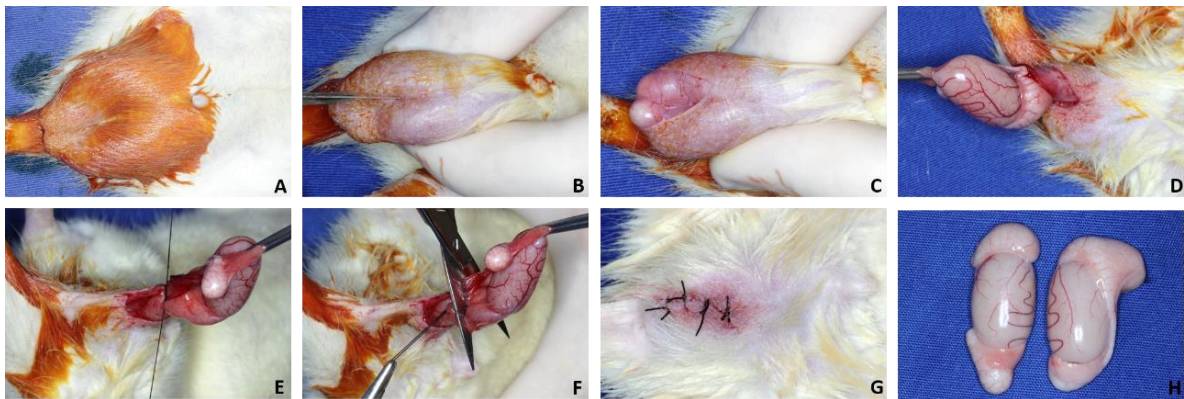


Figura 2 – Orquiectomia bilateral. **A:** Antissepsia com PVPI em ambos os sacos escrotais; **B:** Incisão; **C e D:** Exposição de ambos escrotos; **E:** Laqueamento do ducto deferente e do pedículo vascular; **F:** Remoção de ambos escrotos com auxílio de uma tesoura; **G:** Sutura; **H:** Ambos escrotos removidos (Orquiectomia).

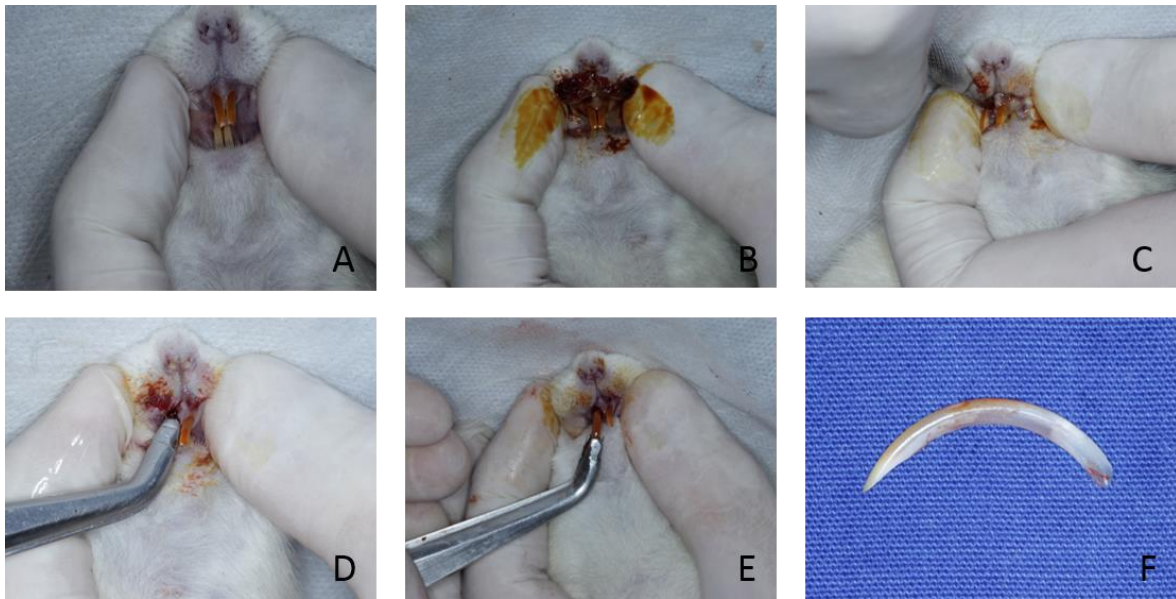


Figura 3 – Exodontia. **A:** Pré operatório. **B:** Antissepsia com PVPI. **C, D e E:** Luxação e exodontia do incisivo superior direito. **F:** Incisivo superior direito fora do alvéolo.

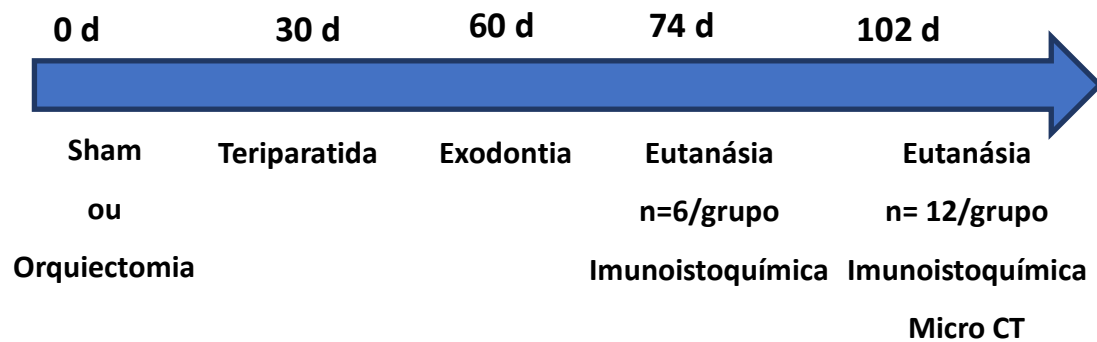


Figura 4 - Delineamento experimental.

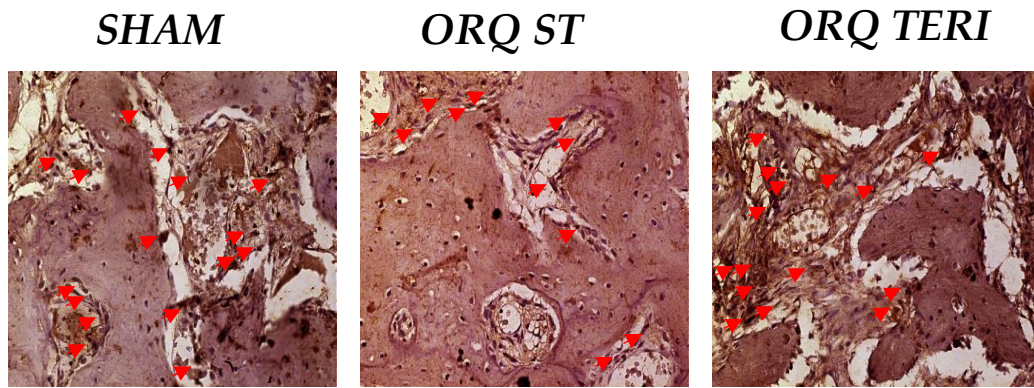


Figura 5 - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína WNT aos 42 dias. (Original, 40x).



Figura 6 - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína ALP aos 42 dias. (Original, 40x).



Figura 7 - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína OC aos 42 dias. (Original, 40x).



Figura 8 - Análise imunoistoquímica dos grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI através da marcação da proteína TRAP aos 42 dias. (Original, 40x).

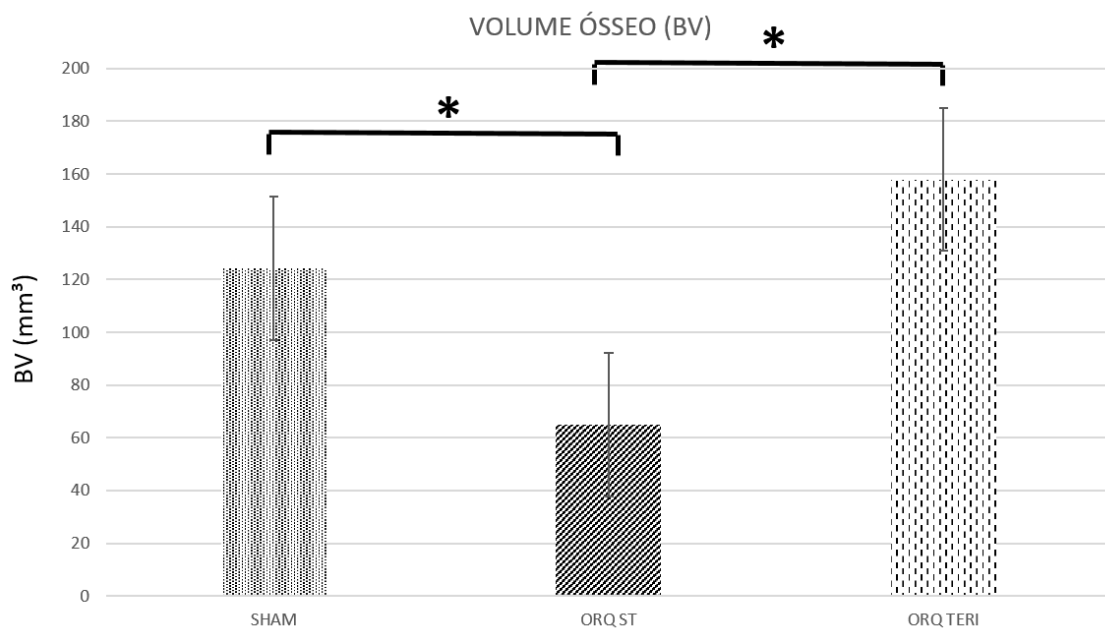


Figura 9 – Volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. (* $p < 0,05$).

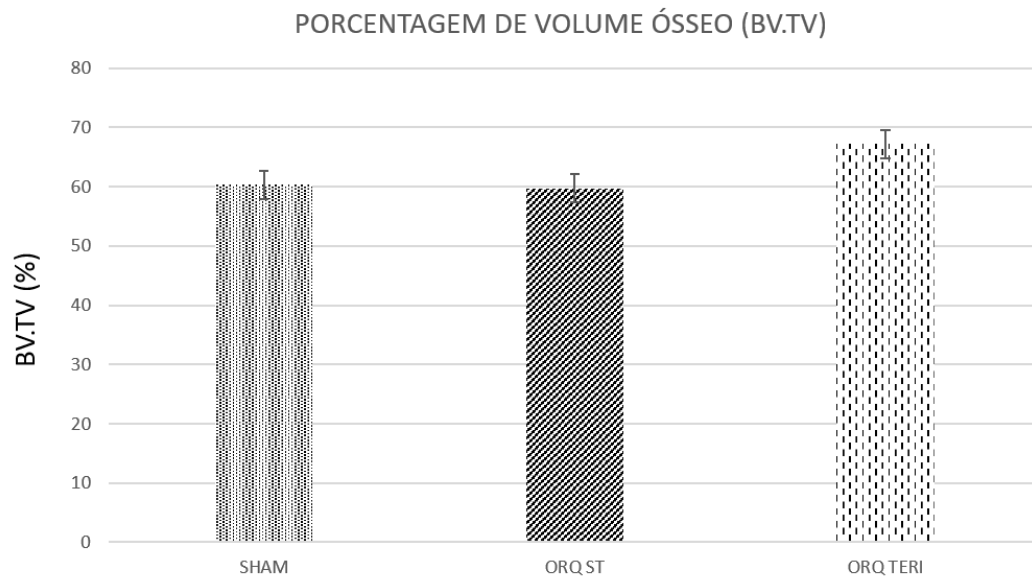


Figura 10 – Porcentagem de volume ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$).

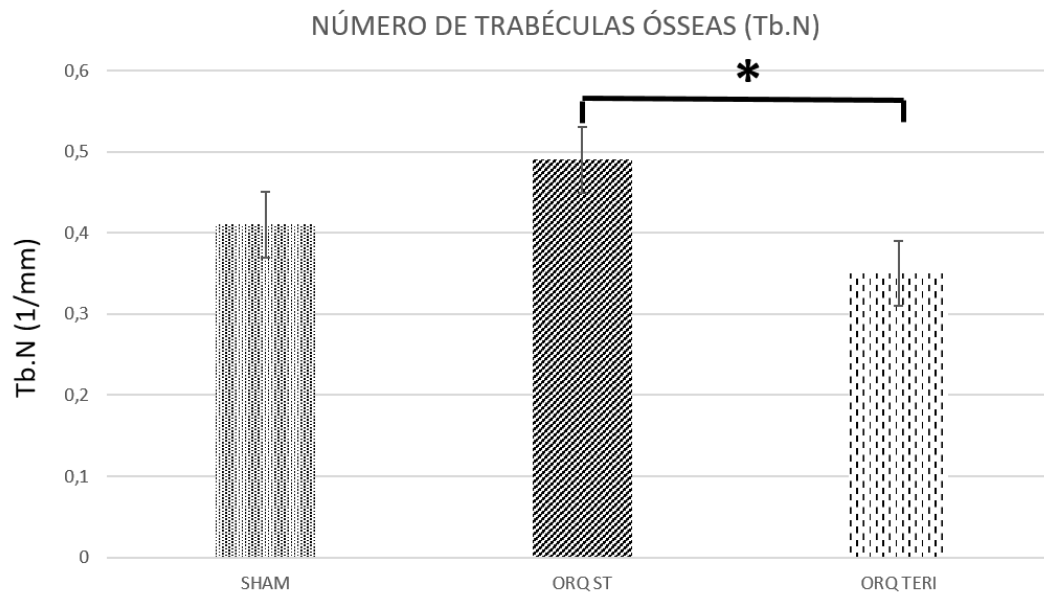


Figura 11 – Número de trabéculas ósseas. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. (* $p < 0,05$).

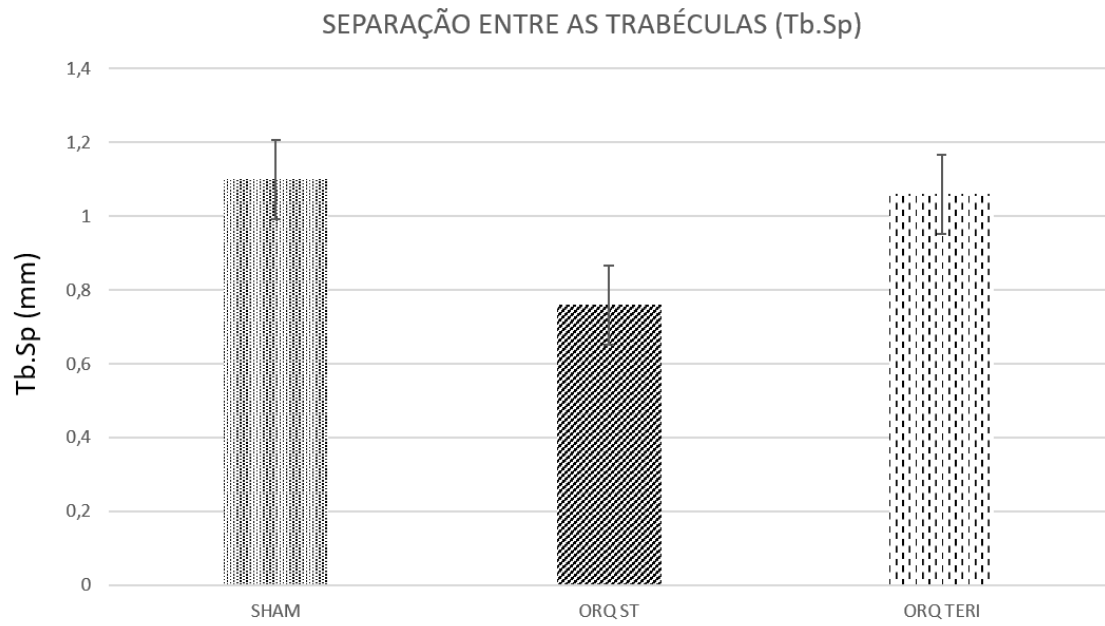


Figura 12 – Separação entre as trabéculas. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$).

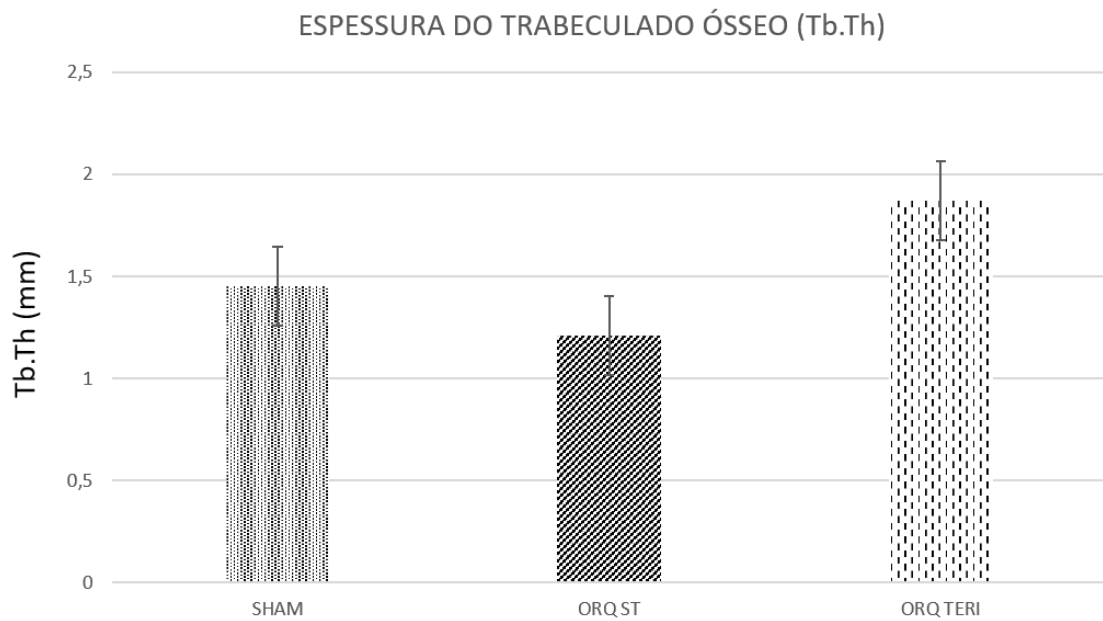


Figura 13 – Espessura do trabeculado ósseo. Comparação entre os grupos SHAM, ORQ ST e ORQ TERI. ($p > 0,05$).

TABELAS

Tabela 1 - Escores observados na marcação das proteínas WNT, ALP, OC e TRAP nos diferentes grupos experimentais.

	WNT	ALP	OC	TRAP
SHAM 14 dias	2	1	2	2
SHAM 42 dias	3	1	2	2
ORQ ST 14 dias	1	1	2	2
ORQ ST 42 dias	2	1	2	2
ORQ TERI 14 dias	2	2	2	1
ORQ TERI 42 dias	3	2	3	1

Referências

REFERÊNCIAS

1. Chacon GE, Stine EA, Larsen PE, Beck FM, McGlumphy EA. Effect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2006;64(7):1005-9.
2. Drake MT, Khosla S. Male osteoporosis. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2012;41(3):629-41.
3. Cauley JA, Robbins J, Chen Z, Cummings SR, Jackson RD, LaCroix AZ, et al. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Jama*. 2003;290(13):1729-38.
4. Liberman UA, Hochberg MC, Geusens P, Shah A, Lin J, Chattopadhyay A, et al. Hip and non-spine fracture risk reductions differ among antiresorptive agents: Evidence from randomised controlled trials. *International journal of clinical practice*. 2006;60(11):1394-400.
5. Miller PD, Derman RJ. What is the best balance of benefits and risks among anti-resorptive therapies for postmenopausal osteoporosis? *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2010;21(11):1793-802.
6. Maeda SS, Lazaretti-Castro M. An overview on the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2014;58(2):162-71.
7. Khosla S, Amin S, Orwoll E. Osteoporosis in men. *Endocrine reviews*. 2008;29(4):441-64.
8. Giusti A, Bianchi G. Treatment of primary osteoporosis in men. *Clinical interventions in aging*. 2015;10:105-15.
9. Kaufman JM, Lapauw B, Goemaere S. Current and future treatments of osteoporosis in men. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2014;28(6):871-84.
10. Kaufman JM, Goemaere S. Osteoporosis in men. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2008;22(5):787-812.
11. Mittan D, Lee S, Miller E, Perez RC, Basler JW, Bruder JM. Bone loss following hypogonadism in men with prostate cancer treated with GnRH analogs. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(8):3656-61.
12. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine reviews*. 2002;23(3):279-302.
13. Van Pottelbergh I, Goemaere S, Kaufman JM. Bioavailable estradiol and an aromatase gene polymorphism are determinants of bone mineral density changes in men over 70 years of age. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2003;88(7):3075-81.
14. Gennari L, Nuti R, Bilezikian JP. Aromatase activity and bone homeostasis in men. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(12):5898-907.
15. Vanderschueren D, Vandendput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrine reviews*. 2004;25(3):389-425.
16. Niimi R, Kono T, Nishihara A, Hasegawa M, Matsumine A, Kono T, et al. Analysis of daily teriparatide treatment for osteoporosis in men. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2015;26(4):1303-9.
17. Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone*. 2007;40(6):1434-46.
18. Hodsman AB, Bauer DC, Dempster DW, Dian L, Hanley DA, Harris ST, et al. Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocrine reviews*. 2005;26(5):688-703.

19. Komrakova M, Stuermer EK, Werner C, Wicke M, Kolios L, Sehmisch S, et al. Effect of human parathyroid hormone hPTH (1-34) applied at different regimes on fracture healing and muscle in ovariectomized and healthy rats. *Bone*. 2010;47(3):480-92.
20. Kuroshima S, Entezami P, McCauley LK, Yamashita J. Early effects of parathyroid hormone on bisphosphonate/steroid-associated compromised osseous wound healing. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2014;25(3):1141-50.
21. Habermann B, Kafchitsas K, Olender G, Augat P, Kurth A. Strontium ranelate enhances callus strength more than PTH 1-34 in an osteoporotic rat model of fracture healing. *Calcified tissue international*. 2010;86(1):82-9.
22. Naruse K, Uchino M, Hirakawa N, Toyama M, Miyajima G, Mukai M, et al. 4. The Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Mechanism and the Effect of Teriparatide on Fracture Healing. *Journal of orthopaedic trauma*. 2016;30(8):S3.
23. Okamoto T, de Russo MC. Wound healing following tooth extraction. *Histochemical study in rats*. *Revista da Faculdade de Odontologia de Aracatuba*. 1973;2(2):153-69.
24. de Carvalho ACP, Okamoto T. *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica*. Panamericana. 1987.
25. Al-Shahat AR, Shaikh MA, Elmansy RA, Shehzad K, Kaimkhani ZA. Prostatic assessment in rats after bilateral orchidectomy and calcitonin treatment. *Endocrine regulations*. 2011;45(1):29-36.
26. Ersan N, van Ruijven LJ, Bronckers AL, Olgac V, Ilguy D, Everts V. Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. *Dento maxillo facial radiology*. 2014;43(1):20130144.
27. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2010;25(7):1468-86.
28. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell*. 2005;8(5):739-50.
29. Chung YE, Lee SH, Lee SY, Kim SY, Kim HH, Mirza FS, et al. Long-term treatment with raloxifene, but not bisphosphonates, reduces circulating sclerostin levels in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012;23(4):1235-43.
30. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine reviews*. 1994;15(4):439-61.
31. Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5484):1501-4.
32. Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia IR, Jr., Okamoto R, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone*. 2010;46(4):1021-9.
33. Pedrosa WF, Jr., Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clinical oral implants research*. 2009;20(11):1254-64.
34. Manrique N, Pereira CC, Luvizuto ER, Sanchez Mdel P, Okamoto T, Okamoto R, et al. Hypertension modifies OPG, RANK, and RANKL expression during the dental socket bone healing process in spontaneously hypertensive rats. *Clinical oral investigations*. 2015;19(6):1319-27.

35. Ibrahim MR, Singh S, Merican AM, Raghavendran HR, Murali MR, Naveen SV, et al. The effect of strontium ranelate on the healing of a fractured ulna with bone gap in rabbit. *BMC veterinary research*. 2016;12(1):112.
36. Luvizuto ER, Dias SS, Okamoto T, Dornelles RC, Okamoto R. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. *Archives of oral biology*. 2011;56(10):984-90.
37. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR, Jr., et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Archives of oral biology*. 2010;55(1):52-9.
38. Seifi M, Ezzati B, Saedi S, Hedayati M. The Effect of Ovariectomy and Orchiectomy on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Wistar Rats. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*. 2015;16(4):302-9.
39. Shirakawa J, Harada H, Noda M, Ezura Y. PTH-Induced Osteoblast Proliferation Requires Upregulation of the Ubiquitin-Specific Peptidase 2 (Usp2) Expression. *Calcified tissue international*. 2016;98(3):306-15.
40. Phelps E, Bezouglaia O, Tetradis S, Nervina JM. Parathyroid hormone induces receptor activity modifying protein-3 (RAMP3) expression primarily via 3',5'-cyclic adenosine monophosphate signaling in osteoblasts. *Calcified tissue international*. 2005;77(2):96-103.

Anexos

APÊNDICES

ANEXO A – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Análise histométrica e imunoistoquímica do processo de reparo alveolar de ratos orquiectomizados submetidos à terapia com teriparatida**", Processo FOA nº 00706-2015, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 15 de Junho de 2017.

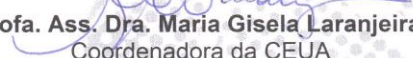
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 15 de Julho de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Alveolar repair process. Histometric and immunohistochemical analysis in orchidectomized rats treated with teriparatide**", Protocol FOA nº 00706-2015, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 15, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 15, 2017.


Prof. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br