

VANESSA FERREIRA DA SILVA

**Efeito da ovariectomia no reimplante dentário: análise
histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas**

ARAÇATUBA – SP

2012

VANESSA FERREIRA DA SILVA

**Efeito da ovariectomia no reimplante dentário: análise
histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas**

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

Orientador: Prof^a. Dra. Sônia Regina Panzarini.

Coorientador: Prof^o. Dr. Cláudio Aparecido Casatti.

ARAÇATUBA – SP

2012

Dedicatória

Aos meus pais, Luzia e Clementino, que são os maiores exemplos da minha vida e que com muito amor e compressão sempre estiveram ao meu lado, ajudando e apoiando em todas as minhas decisões, intervindo e aconselhando quando estas não eram tão sábias, que a conclusão desse trabalho torna-se realidade e uma conquista na minha vida.

Agradecimentos

À Deus, pois com Sua graça e a fé que Nele deposito tudo é possível.

À minha prima Jaqueline, que é uma das pessoas que mais tenho admiração e orgulho em poder dizer que convive 24 anos da minha vida e que sua presença no meu dia-a-dia fez toda diferença e me ajudou a construir o que sou hoje. Seu apoio, amor e amizade foram, são e sempre serão imprescindíveis para mim. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha família, em especial ao meu avô Valentin, minha avó Ilda (in memoriam), meu primo Cristian e a minha tia Zenaide que sempre me acompanharam e dividiram comigo os momentos da minha vida e hoje mais uma vez tenho orgulho em poder comemorar junto deles essa conquista.

Aos amigos que ganhei durante essa caminhada e que fizeram dela um momento mais do que especial e agradável onde convivemos com muito carinho, risadas, conversas, estudos e algumas festinhas também! Em especial aos meus amigos mais leais, Michele, Erika e Eduardo com os quais tive o prazer de dividir com mais intensidade tanto os momentos de muito aprendizado em clínicas quanto os da própria vida.

Ao meu amigo-irmão João Eduardo que esteve comigo nesses 6 anos de graduação e que compartilhou meus momentos de alegrias e o importante, se fez constante também nos momentos difíceis. A dupla mais engraçada que existe fazendo de qualquer clínica a mais divertida e produtiva! Agradeço a Deus por Ele ter me dado a honra de conhecer uma pessoa tão admirável e amiga como você Joni.

As todas as meninas que tive o prazer de conhecer em momentos e fases diferentes da vida e que por anos foram minha família nessa “nova cidade” e compartilharam além de uma casa comigo, meus melhores e piores dias, conversas até de madrugada, gargalhas, choros, louça suja, casa bagunçada, faxinas, festas de aniversário surpresa e mais que tudo isso: muito companheirismo!

A Prof.^a Dr. Sônia Panzarini que mais do que uma orientadora foi para mim uma amiga e até mãe. É admirável tanto como professora e cirurgiã dentista quanto como pessoa, sendo extremamente dedicada em tudo o que faz e com uma competência indescritível. Sem ela a realização desse trabalho não seria possível e sou imensamente grata por ter tido o prazer de conhecê-la e de tê-la como orientadora tanto nesse trabalho quanto na minha formação profissional.

Ao Prof.^e Dr. Cláudio Casatti que tive a alegria em conviver durante o desenvolvimento desse trabalho e que muito me ensinou contribuindo para o meu desenvolvimento científico e intelectual.

Ao Prof.^e Dr. Edilson Ervolino que como ninguém sabe ministrar uma aula espetacular e que sempre mostrou-se a disposição em todos os momentos que precisei desde o meu primeiro ano de graduação. Uma pessoa extremamente ética e um profissional exemplar.

À Prof.^a Dr. Eloá Luvizuto que foi uma grande incentivadora para o início da minha vida científica e para a realização desse trabalho, e que muito me ensinou também sobre o lado clínico da vida de um cirurgião dentista.

Às pós-graduandas Heloísa Fonseca Marão, Lithiene Ribeiro Castilho e Castilho Moriel Evangelista Melo que contribuíram muito para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À universidade Estadual Paulista (UNESP), pela oportunidade de realização do curso de Odontologia.

À todos os funcionários, técnico e pacientes que muito acrescentaram no desenvolvimento do meu crescimento profissional.

"Não há transição que não implique um ponto de partida, um processo e um ponto de chegada. Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje. De modo que o nosso futuro baseia-se no passado e se corporifica no presente. Temos de saber o que fomos e o que somos, para sabermos o que seremos."

Autor: Paulo Freire

Livro: Educação e mudança

SILVA, VF. **Efeito da ovariectomia no reimplante dentário: análise histomorfométrica e imunoistoquímica em ratas.** 2012. 45 f. Monografia - Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

Resumo

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica com a qual o cirurgião dentista pode se deparar na clínica e que pode ser causada durante a menopausa e após ovariectomia. Considerando a escassez da literatura no estudo do traumatismo dento-alveolar em indivíduos com essa condição sistêmica, o objetivo do trabalho é analisar o processo de reparo do reimplante dentário imediato após ovariectomia por meio da análise histomorfométrica e imunoistoquímica. Ratas foram submetidas ao estudo do ciclo estral durante 10 dias e após esse procedimento foram selecionados para o estudo quarenta animais que apresentaram ciclo regular. Os animais foram submetidos à cirurgia de exposição dos ovários - grupo I sham e remoção dos ovários - grupo II ovariectomia (OVX). Após dois meses foi realizado a exodontia e reimplante dentário imediato. Os animais sofreram eutanásia 7 e 15 dias após o reimplante. Nos dois grupos houve reinserção do ligamento periodontal no tecido ósseo e cimento e presença de reabsorção radicular externa de superfície aos 15 dias. A análise histomorfométrica e imunoistoquímica mostrou que não houve diferença no processo de reparo do reimplante imediato entre as ratas OVX e as Sham nos períodos estudados.

Palavras chave: Reimplante dentário. Ovariectomia. Imunoistoquímica.

SILVA, VF. **EFFECT OF OVARECTOMY ON DENTAL REPLANTATION: A HISTOMORPHOMETRICAL ANALYSIS IN RATS**. 2012. 45 f. Monografia - Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

Abstract

Estrogen deficiency is a systemic alteration that is frequently encountered by dental surgeons in the clinic, and is caused during menopause and after ovariectomy. Considering the shortage of literature in the study of dento-alveolar trauma in individuals with systemic condition, the aim of this study was to analyze the repair process in immediate dental replanting and its possible association with this systemic alteration by immunohistochemical and histomorphometrical analysis. Rats were subjected to estrous cycle evaluation for 10 days. Forty animals with regular cycle were selected for the experimental study. The study consisted of two experimental groups: group I: sham rats, and group II: ovariectomy (OVX) rats. Two month after OVX or sham surgery, the upper right incisors of all animals were extracted and immediately reimplanted. Animals were euthanized 7 and 15 days after reimplantation. Both groups presented reintegration of the periodontal ligament on the bone surface and cement layer and at 15 days after reimplantation were observed external root resorption. The study concluded that there was no difference in the healing process of the immediately reimplanted teeth between the studied groups on the analysed periods.

Key Words: Tooth replantation. Ovariectomy. Immunohistochemical.

Sumário

Sumário

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
OBJETIVOS	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	13
Ciclo Estral:	14
Procedimento cirúrgico:.....	14
Análise histomorfométrica:.....	16
Processamento imunoistoquímico.....	20
RESULTADO	21
Análise histomorfométrica.....	21
Análise estatística:	35
Análise imunoistoquímica	37
DISCUSSÃO:	44
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS.....	48

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estrógeno é um hormônio que tem um importante papel no controle do metabolismo ósseo regulando a expressão de proteínas como a Osteoprotegerina (OPG) (Wang et al., 2008, Jabbar et al., 2009) e RANKL (Jabbar et al., 2009) e citocinas pró-inflamatórias (Shul et al., 2008, Zhou et al., 2009). A sua deficiência causa a liberação de citocinas, como a IL-6 e TNF- α , que desempenham um papel destrutivo ao tecido ósseo, e têm sido relacionadas à patogênese da osteoporose (Zhou et al., 2009).

A deficiência de estrógeno é uma condição sistêmica com a qual o cirurgião dentista pode se deparar na clínica e pode ser causada após ovariectomia e durante menopausa (Budden et al. 1988, Vico et al., 1992). Uma das suas conseqüências é a osteoporose caracterizada pela diminuição de massa óssea sem alteração da composição química do tecido ósseo (Albright et al. 1941). É mais comum em indivíduos idosos e causada por um desequilíbrio entre os processos de formação/absorção, seja pela prevalência da absorção, pela redução da formação ou pela combinação das duas situações. Atinge ambos os sexos e é relativamente comum em mulheres após menopausa (Jeffcoat & Chestnut, 1993).

Com o aumento da expectativa de vida da população mundial, as pesquisas visam cada vez mais à geriatria (na odontologia: gerontologia) a fim de fornecer uma velhice mais saudável à população. Os indivíduos com deficiência de estrógeno além de susceptíveis às fraturas nos ossos longos e quadris também estão sujeitos aos traumatismos dento-alveolares dentre eles a avulsão.

Frente à avulsão dentária, o procedimento ideal é o reimplante imediato do dente em seu alvéolo, garantindo a vitalidade das estruturas aderidas à superfície radicular promovendo assim o reparo do ligamento periodontal por meio da reinserção de suas fibras (Andreasen, 1980).

O sucesso da manutenção do dente reimplantado está diretamente relacionado com a presença, tipo e velocidade do processo de reabsorção radicular (Andreasen, 1980, Pohl et al., 2005, Hammarström et al., 1989) bem como a fatores locais: tempo extra-alveolar, meio de armazenagem, a manipulação radicular inadequada e a

necrose pulpar (Andreasen, 1980, Andreasen, 1981, Panzarini et al., 2005, Saad-Neto et al., 1986, Sonoda et al., 2000, Lustosa-Pereira et al., 2006). Além dos fatores locais existem algumas patologias sistêmicas como a osteoporose que também poderiam interferir nesse processo, porém ainda não foram estudadas.

Para estudar os mecanismos envolvidos no reparo celular em reimplante dentário como a influência da deficiência de estrógeno além da análise histomorfológica a imunoistoquímica é uma ferramenta metodológica que pode auxiliar na compreensão e justificativa dos fatos evidenciados.

O periodonto de inserção é composto pelo ligamento periodontal, cemento e tecido ósseo. Seu crescimento, desenvolvimento e manutenção são processos altamente regulados (Nijweide et al., 1986). Proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, estão ativamente envolvidos nestes processos e exerce atividade direta sobre células com atividade osteoblástica e osteoclástica, atuando em sua diferenciação e ativação metabólica (Ducy et al., 2000).

Dentre essas proteínas destaca-se a OPG, também conhecida como fator inibitório de osteoclastogênese. A OPG é considerada um receptor solúvel secretado e é produzida por diferentes tecidos e tipos celulares, incluindo osteoblastos, células do estroma medular ósseo, fibroblastos e linfócitos T. Ela atua inibindo a maturação e a reabsorção óssea osteoclástica e, portanto, regulando a densidade óssea (Rogers, Eastell, 2005).

As proteínas PCNA e CASPASE-3 são responsáveis por evidenciar a proliferação celular (PCNA) e a CASPASE-3 presente na célula quando da clivagem sinaliza o início da apoptose (Sato et al., 2010). A proteína RUNX-2 é um fator de transcrição essencial para a diferenciação dos osteoblastos, além de desempenhar

papel importante na maturação dos condrócitos e invasão vascular na cartilagem. Sendo assim, esta proteína é uma molécula chave para o desenvolvimento ósseo (Maruyama et al., 2007).

A proteína TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) também tem um papel importante no processo de reabsorção, sendo um excelente marcador das células clásticas (Halleen et al., 2006).

Assim sendo, estes marcadores forneceram informações importantes sobre metabolismo do periodonto de inserção, pois apresentam participação na proliferação, apoptose e reabsorção óssea (Rogers, Eastell, 2005, Halleen et al., 2006, Maruyama et al., 2007, Min et al., 2007, Anraku et al., 2009, Sato et al., 2010).

Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na regulação da proliferação celular, apoptose, atividade osteoclástica no ligamento periodontal após o reimplante dentário (Sato et al., 2010) e particularmente na deficiência de estrógeno. Portanto, a análise das proteínas OPG, PCNA, CASPASE-3, RUNX-2 e TRAP poderão contribuir nesse sentido.

OBJETIVOS

A proposta do trabalho é analisar o processo de reparo no reimplante dentário imediato após ovariectomia por meio da análise histomorfométrica e imunoistoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP e aprovado (processo – 009289-2010).

Foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, com peso de 180g a 200g, mantidas em gaiolas no biotério do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com luz e temperatura controladas e alimentadas com ração balanceada (Ração ativada Produtor, Moinho Primor S/A), exceto 24 horas antes a intervenção cirúrgica e água ad libitum.

Ciclo Estral:

Foi realizado estudo diário do ciclo estral pela técnica descrita por Long e Evans (1922) e após a obtenção de 2 a 3 ciclos regulares, foram selecionados 40 ratas para o experimento.

O ciclo estral é dividido em quatro estágios que relacionam o tipo de célula predominante no esfregaço vaginal e o nível de hormônios sexuais presente no animal. Leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas remanescentes aparecem no metaestro. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. O número de células epiteliais nucleadas aumenta durante o proestro enquanto os leucócitos praticamente desaparecem. Ocorre, então, o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona na noite desta fase. Durante o estro aparecem basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais. O estágio diestro consiste predominantemente de leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno (Marcondes et al., 2002).

Procedimento cirúrgico:

Depois da obtenção dos ciclos estrais regulares de 40 ratas, elas foram anestesiadas com Cloridrato de Xilazina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil Ltda,

Osasco, SP, Brasil) na dosagem de 0,6 mg para cada 100g de peso corporal, para promover um relaxamento muscular e Cloridrato de Ketamina (Doálen AgriBands Ltda, Paulínea, SP, Brasil) na dosagem de 7mg para cada 100g de peso corporal para a obtenção do efeito anestésico. As ratas dos grupos I (Sham) foram submetidas à cirurgia para exposição dos ovários bilateralmente e Grupo II (OVX) foram submetidas à ovariectomia bilateral, visando induzir os efeitos da depleção de estrógeno.

Foi realizada a tricotomia bilateral ao ventre e a assepsia vigorosa da área com solução de digluconato de clorexidina a 0,12%. Após o isolamento da área cirúrgica, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº 10, incisões bilaterais de aproximadamente 1 cm foram realizadas, para se obter acesso aos ovários, sendo estes mantidos nos animais do grupo I (Sham), e removidos nos animais do grupo II (OVX). Logo após foi realizada suturas internas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon) e externas com fio de Seda 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon). Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Dois meses após o procedimento cirúrgico, todos os animais foram submetidos novamente a um exame do ciclo estral durante cinco dias consecutivos para verificar a efetividade do procedimento. Em seguida os animais foram anestesiados para a realização da exodontia e reimplante como descrito abaixo.

No Grupo I (Sham) e no Grupo II (OVX) – foi realizada a sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito que permaneceu por 5 minutos em meio ambiente sobre gaze estéril. A seguir, foi realizada a anti-sepsia da porção anterior da maxila com polivinilpirrolidona iodo (Riodeine – Ind. Farmac. Rioquímica Ltda) e o reimplante do dente.

Decorridos 7, 15 dias do reimplante dentário, os animais foram submetidos à eutanásia por perfusão e os espécimes obtidos foram fixados em solução de formaldeído a 4% por 24 horas e descalcificados em solução de EDTA a 10%, pH 7,0.

Após a descalcificação, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Nos blocos foram realizados cortes semi-seriados de cinco micrometros de espessura, no sentido longitudinal da raiz.

Análise histomorfométrica:

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas foram atribuídos escores de 1 a 4 aos diferentes eventos abaixo listados, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias (Panzarini et al., 2007).

Eventos considerados para a análise dos resultados:

1) Local da inserção epitelial

- 1- Junção cimento-esmalte;
- 2- Ligamento abaixo da junção cimento-esmalte;
- 3- Muito abaixo da junção cimento-esmalte (perto do terço médio);
- 4- Ausência do epitélio juncional.

2) Processo inflamatório agudo e crônico próximo do local da inserção epitelial.

2.1) Intensidade do processo inflamatório baseado no critério descrito por Wolfson and Seltzer (1975).

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2- Pequeno número de células inflamatórias. Até 10 células por campo com aumento de 400x;
- 3- Moderado número de células inflamatórias. De 11 a 50 células por campo com aumento de 400x;

4- Grande número de células inflamatórias. Acima de 50 células inflamatórias por campo com aumento de 400x.

2.2) Extensão do processo inflamatório

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;
- 2- Processo inflamatório restrito à lâmina própria da parte interna do epitélio;
- 3- Processo inflamatório estendendo-se apicalmente até a pequena porção do tecido conjuntivo subjacente à lâmina própria da porção interna do epitélio gengival;
- 4- Processo inflamatório atingindo proximidade da crista óssea alveolar.

3) Ligamento Periodontal

3.1) Organização do ligamento periodontal

- 1- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento;
- 2- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em dois terços da extensão do ligamento;
- 3- Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em um terço da extensão do ligamento;
- 4- Ausência de fibras periodontais com inserção em osso e cimento.

3.2) Intensidade e extensão do processo inflamatório agudo e crônico do ligamento periodontal.

3.2.1) Intensidade – Mesmo critério empregado próximo à área da inserção epitelial.

3.2.2) Extensão do processo inflamatório

- 1- Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias;

2- Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral;

3- Processo inflamatório atingindo mais que a metade do ligamento periodontal lateral da raiz do dente;

4- Processo inflamatório em todo ligamento periodontal.

4) Raiz do dente

4.1) Reabsorção radicular ativa e inativa

1- Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas;

2- Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);

3- Pequenas áreas de reabsorções ativas;

4- Extensas áreas de reabsorção ativa.

4.2) Extensão da reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) da extensão das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos por vestibular e por lingual permitirá a atribuição dos seguintes escores.

1- Ausência de reabsorção;

2- Profundidade média de 1 a 1000 micrômetros;

3- Profundidade média de 1001 a 5000 micrômetros;

4- Profundidade média maior que 5001 micrômetros.

4.3) Profundidade de reabsorção radicular. Em lâminas representativas serão feitas medidas (em micrometros) das maiores profundidades das áreas de reabsorção. A medida dos valores obtidos permitirá a atribuição dos seguintes escores.

- 1- Ausência de reabsorção;
- 2- Profundidade média de 1 a 100 micrômetros;
- 3- Profundidade média de 101 a 200 micrômetro;
- 4- Profundidade média maior que 201 micrômetro.

4.4) Reparo nas áreas de reabsorção radicular

- 1- Ausência de reabsorção ou deposição cemento neoformado em toda extensão das áreas reabsorvidas;
- 2- Deposição cemento neoformado em metade ou mais da extensão das áreas reabsorvidas;
- 3- Deposição cemento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas;
- 4- Ausência de deposição de cemento neoformado junto às áreas reabsorvidas.

5) Tecido ósseo

Áreas de reabsorção ativa e inativa

- 1- Ausência de área de reabsorção;
- 2- Presença de área de reabsorção inativa (ausência de células clásticas);
- 3- Presença de pequenas áreas de reabsorção ativa;
- 4- Presença de extensas áreas de reabsorção ativa.

6) Anquilose

- 1- Ausência de anquilose;
- 2- Pequenos pontos de anquilose;
- 3- Um terço da raiz está anquilosada;

4- Mais de um terço da raiz está anquilosada.

7) Polpa

- 1- Normal;
- 2- Presença de calcificações;
- 3- Totalmente calcificada;
- 4- Necrosada.

Processamento imunoistoquímico

Os cortes histológicos coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a banhos sucessivos de xilol e reidratados. Em seguida, submetidos às seguintes etapas de lavagens e incubações sob agitação a 20 rpm, descritas resumidamente: a) duas lavagens de 10 minutos em tampão fosfato de sódio (PB), pH 7.4, 0.1M, a temperatura ambiente; b) inibição da peroxidase endógena com 0,3% de H₂O₂ por 30 minutos em metanol; c) lavagens em PB à temperatura ambiente; d) recuperação antigênica com tampão citrato pH 6.0 em panela pressurizada, durante 15 minutos; e) lavagens em PB à temperatura ambiente; f) incubação por 24 horas a temperatura ambiente, com um dos seguintes anticorpos primários monoclonais ou policlonais anti-PCNA (1:500, VP980, Vector Laboratories, CA, USA), anti-CASPASE-3 (1:100, 9664, Cell Signaling Technology, USA) e anti-TRAP (1:150, sc7628, Santa Cruz Biotechnology, USA) diluídos em solução contendo 0,3% de triton X-100 Tween-20 (Sigma), soro normal de cabra/albumina de soro bovino - BSA (1:200, Sigma) e PB; e) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; g) incubação por 1 hora, em uma solução contendo anticorpo secundário biotilado universal obtido em suíno (LSAB kit, K0679, Dako laboratories, USA), 0.3% de triton X-100, soro normal de cabra e PB; h) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; i) incubação por 1 hora, com o complexo avidina-biotina peroxidase (LSAB kit, K0679, Dako Laboratories, USA) em PB e temperatura ambiente; j) duas lavagens de 10 minutos em PB a temperatura ambiente; l) revelação com uma solução de incubação contendo diaminobenzidina e intensificadores (LSAB kit, K0679, Dako laboratories); bloqueio da reação com lavagens em água destilada seguido de lavagens em KPBS.

Os cortes histológicos foram desidratados em soluções crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e montados com meio de montagem e lamínulas.

RESULTADO

Análise histomorfométrica

A análise microscópica foi realizada com auxílio de microscópio óptico, observando-se as características da mucosa gengival, do ligamento periodontal, osso alveolar, cimento, dentina e polpa, além da ocorrência de reabsorção radicular e anquilose aos 07 e 15 dias pós-operatório.

7 dias - Ratas Sham e Ratas ovariectomizadas (OVX)

O epitélio da mucosa gengival está reinserido e coberto com paraqueratina. O tecido conjuntivo sub-epitelial apresenta um pequeno infiltrado inflamatório, junto à superfície do dente e sobre a crista óssea alveolar. Em toda extensão do osso alveolar nota-se intensa atividade osteoblástica.

O ligamento periodontal alveolar está com suas fibras colágenas inseridas perpendicularmente ao osso e a ao cimento. A dentina e o cimento estão íntegros (Figs. 01 e 02).

O tecido pulpar na sua maior parte está amorfo, com células picnóticas e ausência das camadas de odontoblastos, porém em algumas áreas a pré-dentina está íntegra assim como a camada odontoblástica (Figs. 03 e 04).

No terço apical do dente a partir do fundo do alvéolo observa-se intensa proliferação vascular, tecido conjuntivo frouxo rico em fibroblastos substituindo o estroma da polpa (Figs.05 e 06).

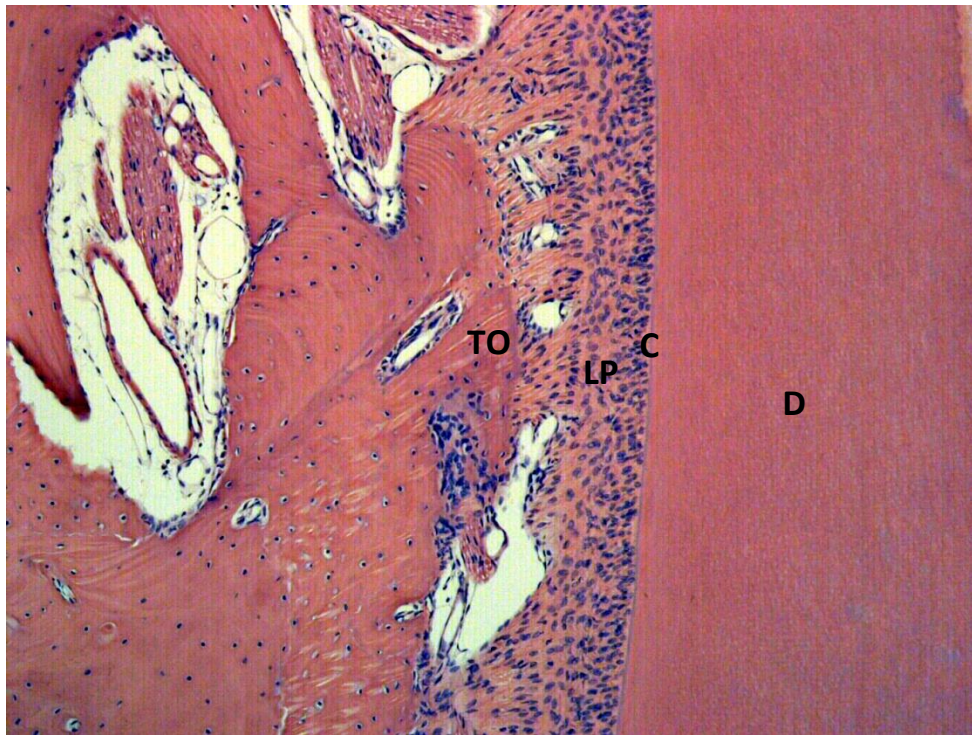


Fig. 01 – Sham 7 dias - O cemento (C) e a dentina (D) estão íntegros e o ligamento periodontal (LP) está reinserido. Tecido ósseo (TO). HE. Original 100X.

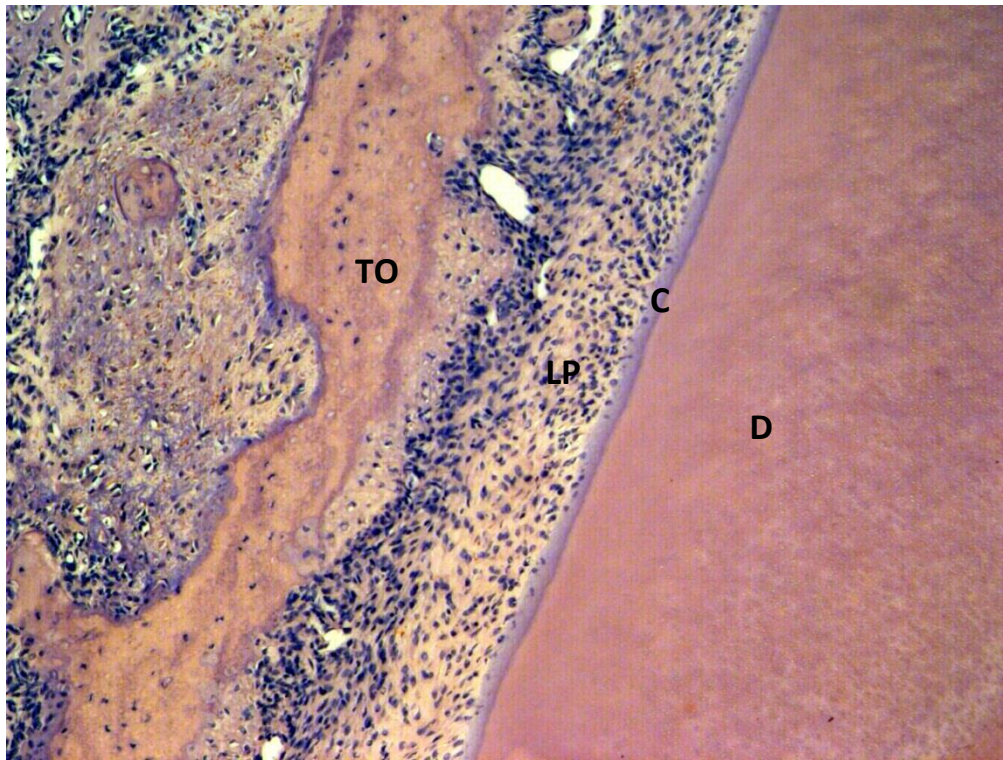


Fig 02 – OVX 7 dias - O ligamento periodontal (PL) apresenta-se com suas fibras inseridas no tecido ósseo (TO) e cimento (C). Dentina (D).HE Original 100X.

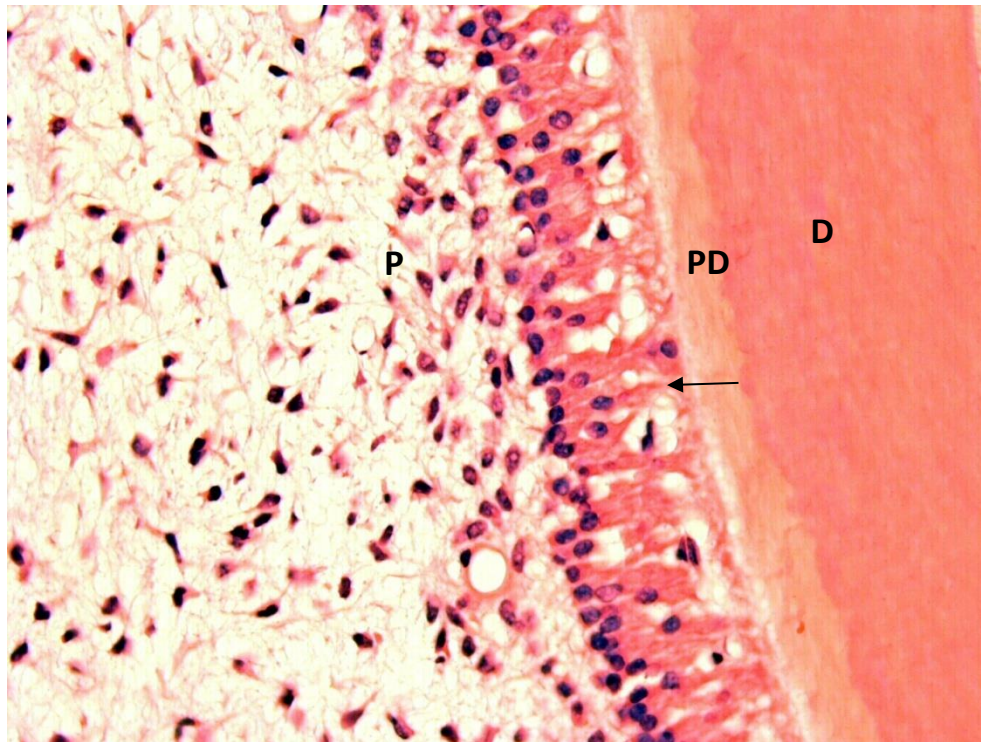


Fig. 03 – Sham 7 dias - A pré-dentina (PD) está íntegra assim como a camada odontoblástica (seta) em algumas áreas do tecido pulpar. Dentina (D), Polpa (P). HE Original 400X.



Fig.04 – OVX 7 dias - Tecido pulpar (P) no terço médio com células picnóticas, porém a camada de pré-dentina (seta) está preservada. Dentina (D). HE Original 25X.



Fig.05 – Sham 7 dias - Tecido conjuntivo frouxo com intensa proliferação vascular na região apical . Canal radicular(CR).HE Original 25X.

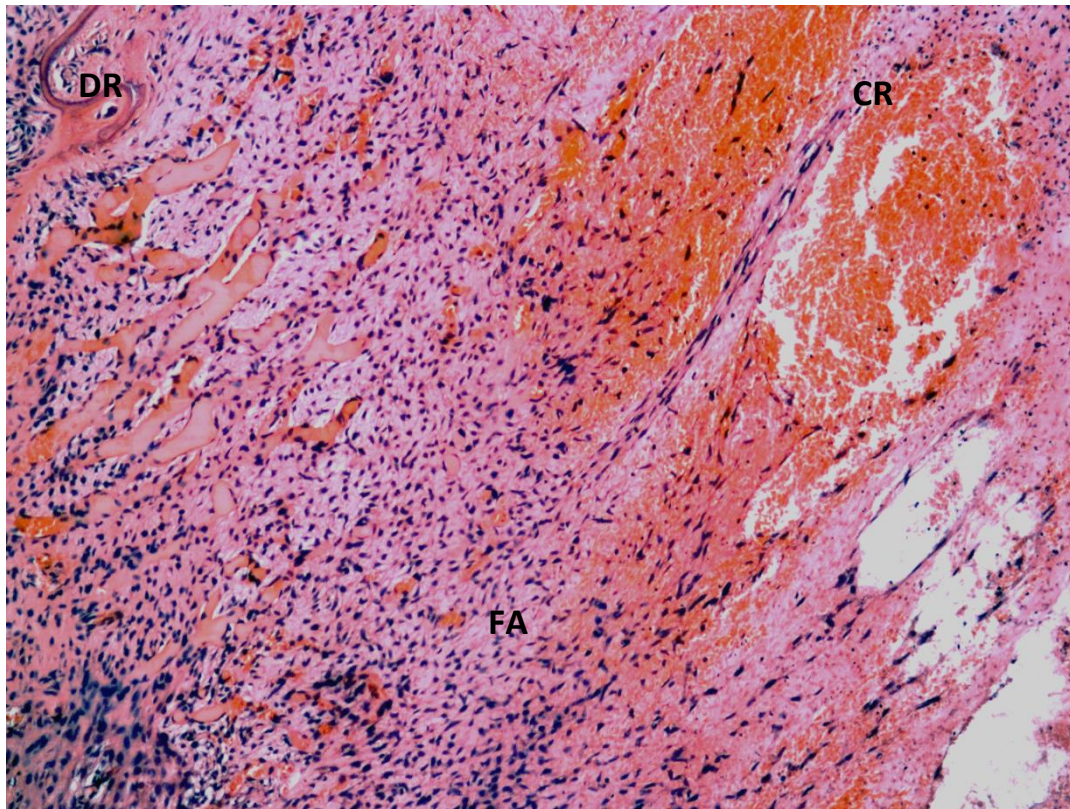


Fig.06 – OVX 7 dias - No terço apical a partir do fundo do alvéolo (FA) observa-se intensa proliferação vascular em direção ao canal radicular (CR). Dentina radicular (DR). HE Original 100X.

15 dias - Ratas Sham e Ratas ovariectomizadas (OVX)

A reinserção epitelial se encontra no limite amelocementário e o tecido conjuntivo adjacente apresenta um infiltrado inflamatório que variou de pequeno a moderado.

O ligamento periodontal apresenta-se reparado com reinserção das fibras no tecido ósseo e cimento (Figs. 07 e 08). O cimento e a dentina estão íntegros na maior parte de superfície radicular e em alguns pontos é possível evidenciar uma reabsorção na superfície com pouca profundidade (Figs. 09 e 10).

Na parede alveolar nota-se uma neoformação óssea que em alguns pontos diminui o espaço do ligamento periodontal.

Na região apical observa-se um infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos que invade o estroma pulpar em 02 espécimes onde ocorreu a necrose pulpar (Figs. 11 e 12).

Quando o estroma pulpar está preservado nota-se na região apical um tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos que invade o canal radicular e vai substituindo o tecido pulpar com presença de calcificações (Figs. 13 e 14).

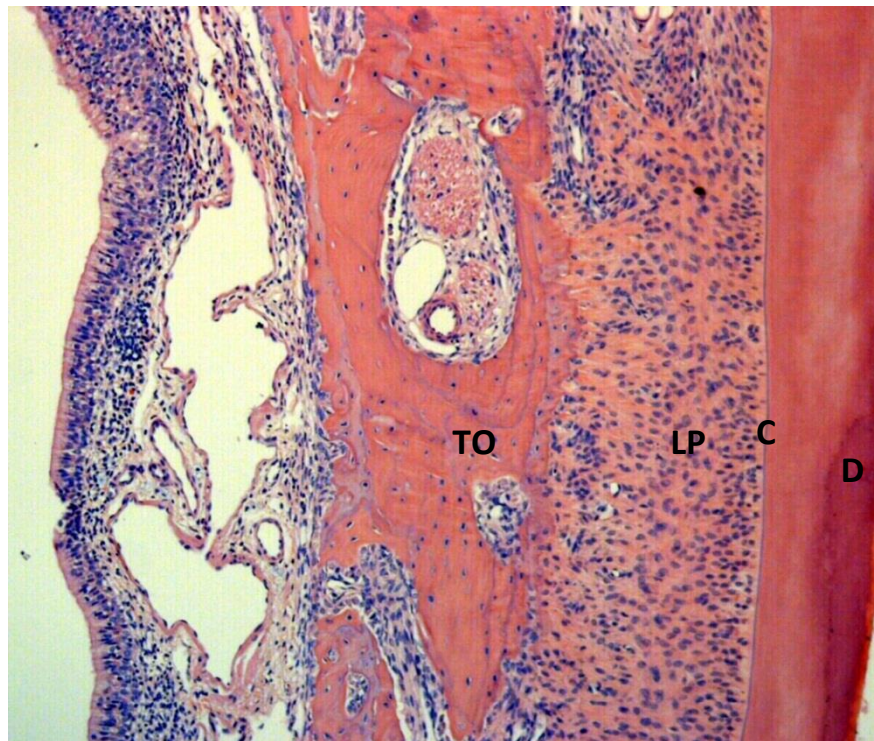


Fig.07 - Sham 15 dias - O ligamento periodontal (LP) apresenta-se reparado com reinserção das fibras no tecido ósseo (TO) e cimento (C). Dentina (D). HE Original 100X.

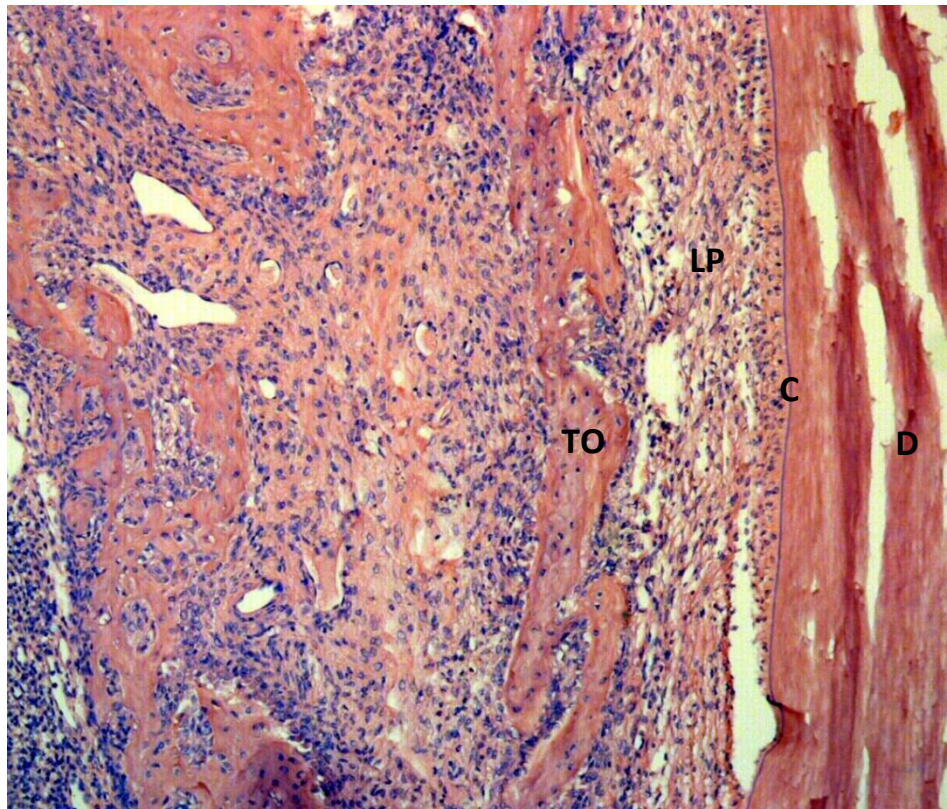


Fig.08- OVX 15 dias - O ligamento periodontal (LP) está reinserido no tecido ósseo (TO) e no cimento (C). Dentina (D). HE Original 100X.

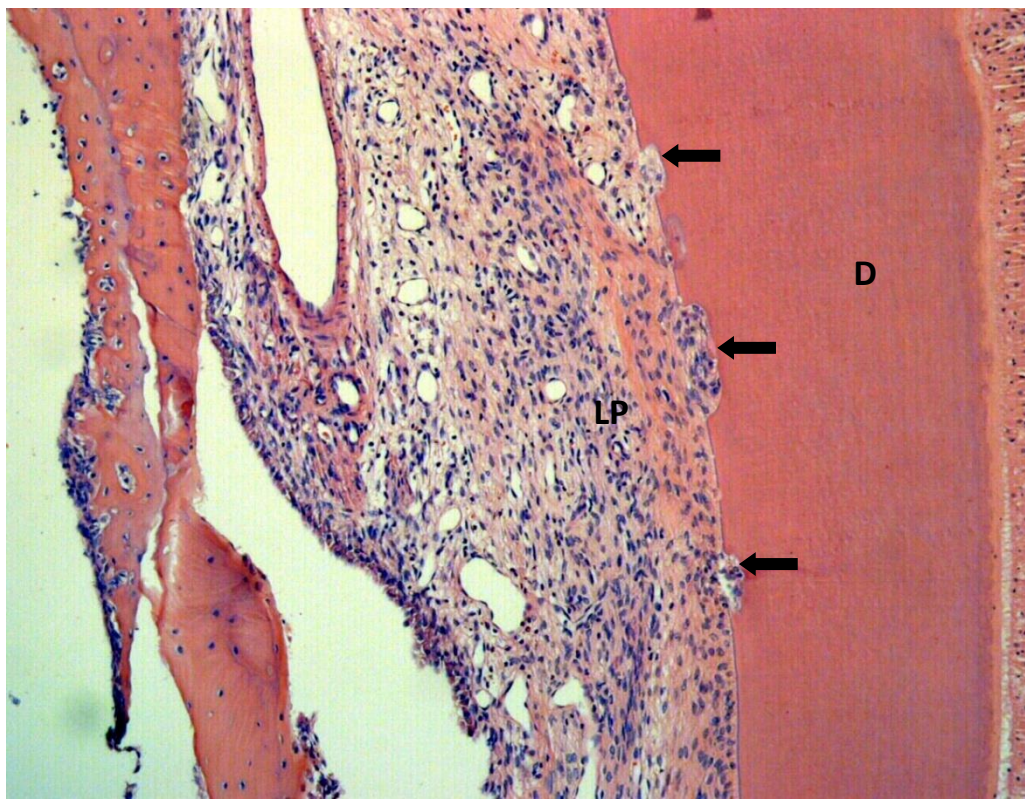


Fig.09 - Sham 15 dias - Áreas de reabsorção com pouca profundidade (setas) na superfície radicular. Dentina (D), Ligamento periodontal (LP). HE Original 100X.

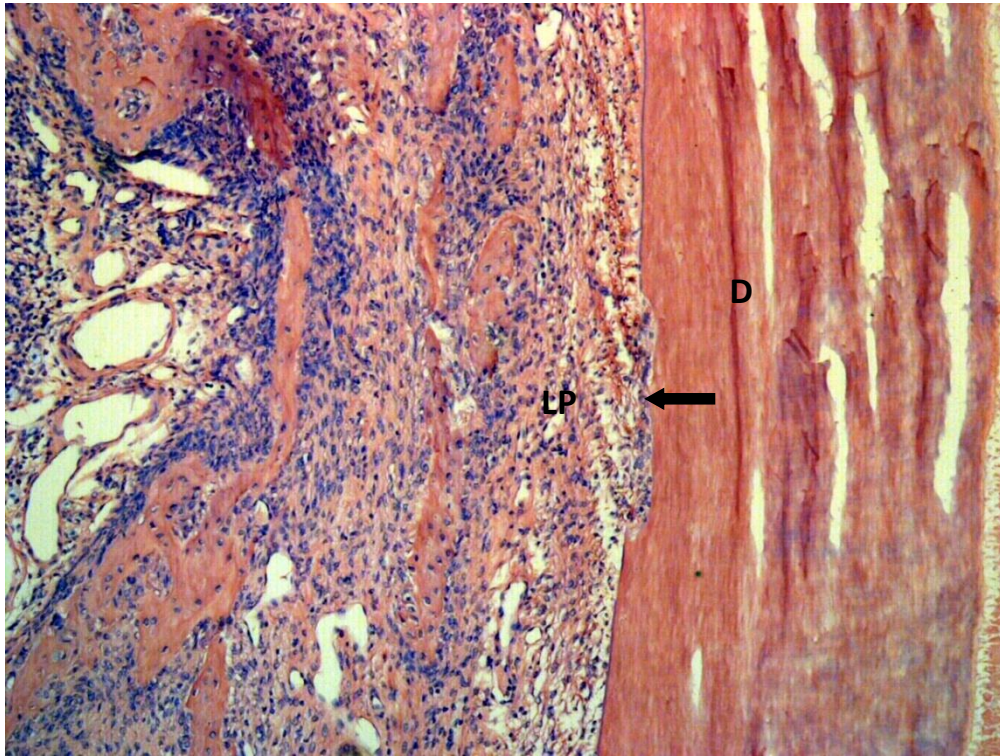


Fig.10 - OVX 15 dias – Presença de reabsorção na superfície radicular (setas).Ligamento Periodontal(LP), Dentina(D). HE Original 100X.



Fig.11- Sham 15 dias - Na região apical observa-se um infiltrado inflamatório que invade o estroma pulpar degenerado. Canal radicular (CR). HE Original 25X.

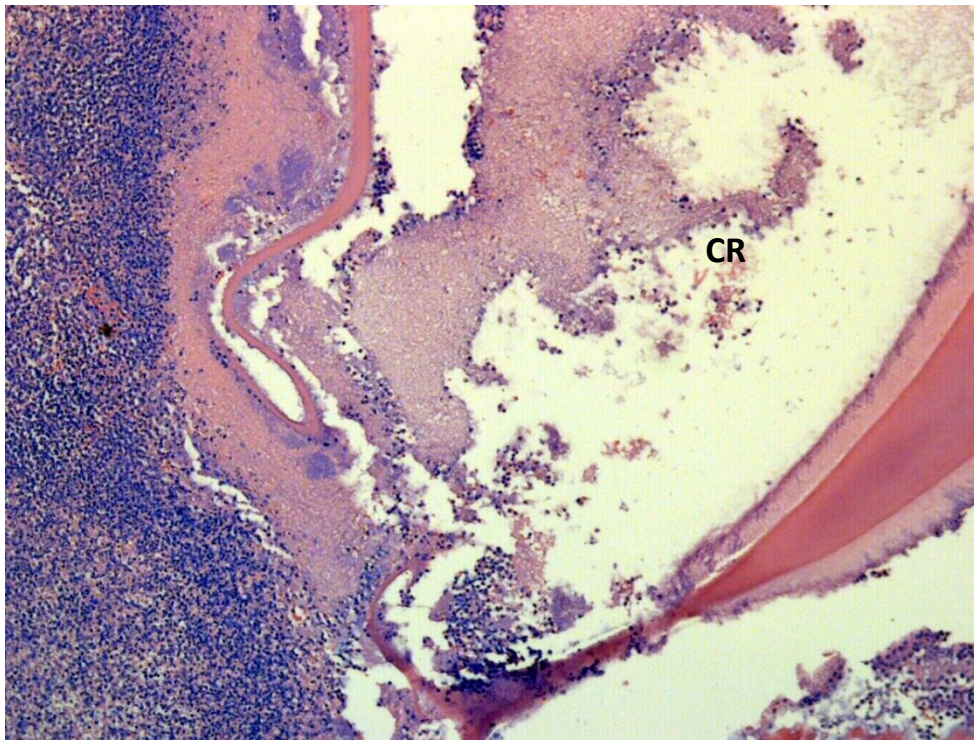


Fig.12 - OVX 15 dias – Intenso infiltrado inflamatório agudo invadindo o canal radicular (CR) cujo tecido pulpar apresenta-se degenerado. HE Original 25X.

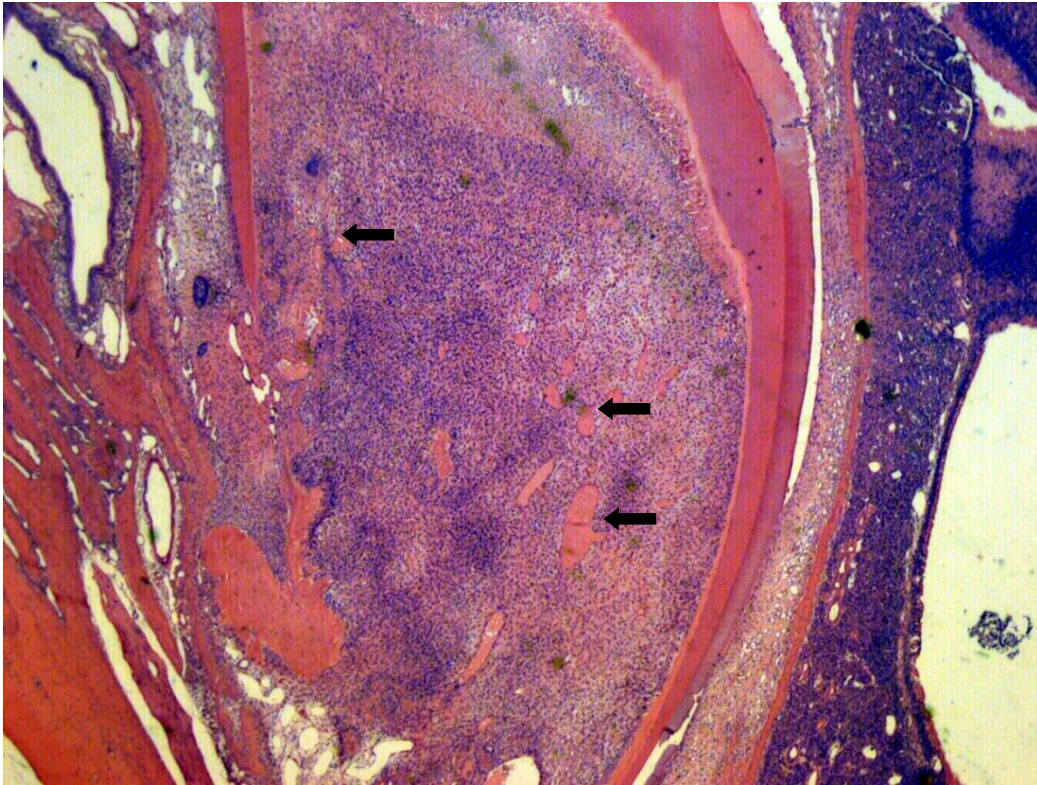


Fig.13 – Sham 15 dias – Presença de calcificações (setas) na porção apical do estroma pulpar. HE Original 25X.



Fig.14 - OVX 15 dias – Presença de calcificações no tecido pulpar na região apical (setas). HE Original 25X.

Análise estatística:

Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, utilizando o programa Graph Pad Prism® 3.0. Foram realizadas comparações entre os 4 grupos, considerando cada evento histomorfológico (Tabela 01)

Tabela 01 - Comparação entre os 4 grupos considerando cada evento histomorfológico.

EVENTOS HITOMORFOLÓGICOS	Grupos			
	07 dias		15 dias	
	Sham	OVX	Sham	OVX
INSERÇÃO EPITELIAL				
Local	a	a	a	a
Intensidade do infiltrado inflamatório agudo	a	a	a	a
Extensão do infiltrado inflamatório agudo	a	a	a	a
Intensidade do infiltrado inflamatório crônico	a	a	a	a
Extensão do infiltrado inflamatório crônico	a	a	a	a
LIGAMENTO PERIODONTAL				
Organização	a	a	a	a
Intensidade do infiltrado inflamatório agudo	a	a	a	a
Extensão do infiltrado inflamatório agudo	a	a	a	a
Intensidade do infiltrado inflamatório crônico	a	a	a	a
Extensão do infiltrado inflamatório crônico	a	a	a	a
REABSORÇÃO RADICULAR				
Ativa e inativa	a	a	b	b
Extensão	a	a	b	b
Profundidade	a	a,b	a,b	b
Reparação	a	a	b	b
TECIDO ÓSSEO	a	a	b	a,b
ANQUILOSE	a	a	a	a
POLPA	a	a	a,b	b

Nota: letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Análise imunoistoquímica

As imunomarcações foram nítidas e específicas para a PCNA e TRAP (Fig. 15-18). Por outro lado, a imunorreatividade a caspase-3 foi inconstante, com alguns cortes exibindo total ausência de imunorreatividade ou uma acentuada marcação de fundo (“background”).

As células imunorreativas a PCNA exibiram marcação nuclear e estavam posicionadas tanto nas superfícies do osso alveolar, assim como do cimento, além de distribuição no ligamento periodontal (Fig. 16). É interessante ressaltar que também analisamos a presença de células imunorreativas a PCNA na polpa dental.

As células imunorreativas a TRAP exibiram imunorreatividade citosólica com aspecto granular e foram predominantemente células gigantes multinucleadas (osteoclastos e odontoclastos) nas superfícies do osso alveolar e cimento e, em menor número células mononucleadas (Fig. 16-18). Uma significativa população de células imunorreativas a TRAP também foram visualizadas no ligamento periodontal (Fig. 16 e 17).

As células imunorreativas a caspase-3 exibiram imunorreatividade citosólica homogênea tanto na polpa dentária, assim como no ligamento periodontal e no cimento (Fig. 19).

A avaliação qualitativa pode sugerir que a imunorreatividade a PCNA é mais evidente nos animais com 7 dias de pós-operatório em comparação com 15 dias de pós-operatório, independente de pertencerem ao grupo Sham ou ovariectomizado.

Com relação à imunorreatividade a TRAP, a imunomarcação estava presente principalmente na superfície do osso alveolar nos animais com 7 dias de pós-operatório, em ambos grupos experimentais. Entretanto, este processo de reabsorção estava mais acentuado nos animais com 15 dias de pós-operatório, principalmente no terço cervical do periodonto, frequentemente associado a um processo inflamatório agudo.

Finalmente, com relação à caspase-3, não foram observadas diferenças entre os períodos pós-operatórios e procedimentos experimentais, em virtude da imunomarcação ter sido inconsistente.

Fotomicrografias em microscopia de luz de cortes histológicos do incisivo superior (região do ligamento periodontal – face lingual da raiz dentária) de animais dos grupos Sham e ovariectomizados, submetidos à identificação das proteínas PCNA (Fig. 15), TRAP (Figs. 16, 17, 18) e caspase-3 (Fig.19), através do método da imunoperoxidase indireta.

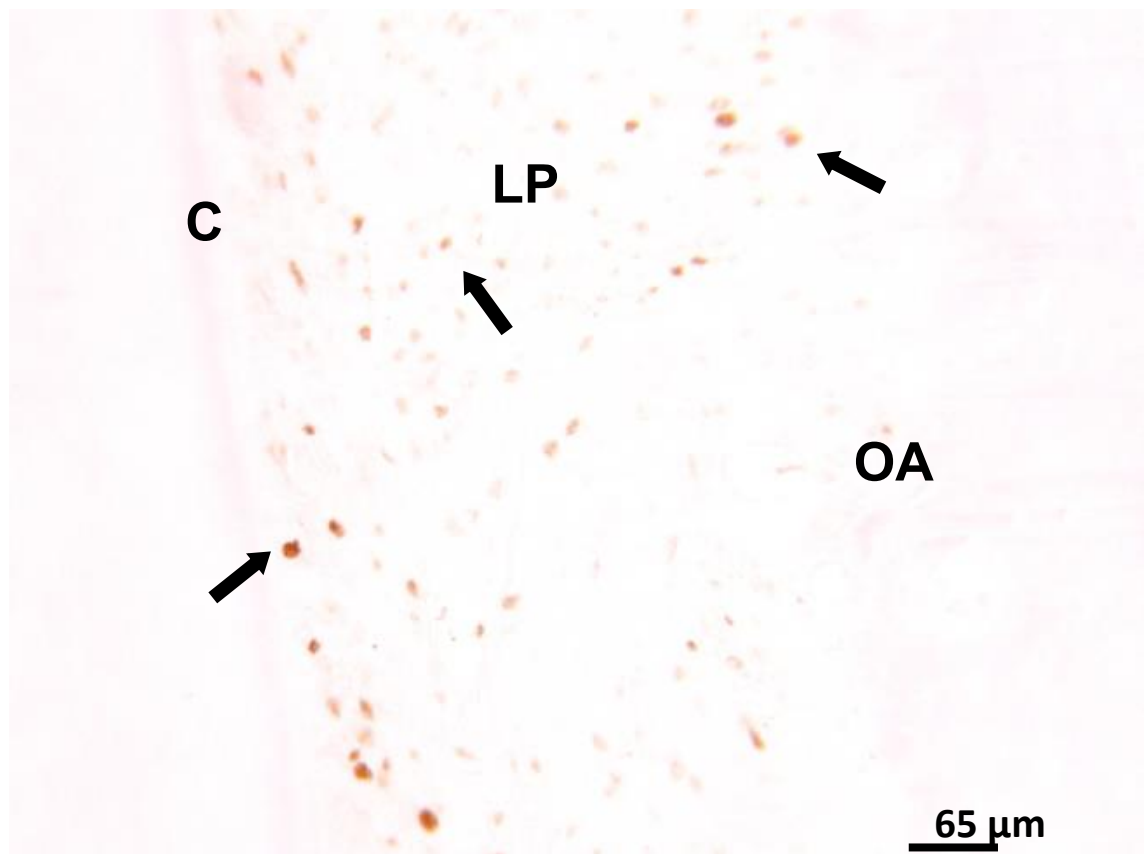


Fig.15. PCNA - Presença de imunomarcção nuclear em células associadas ao osso alveolar (seta), ligamento periodontal (seta) e cimento (seta).

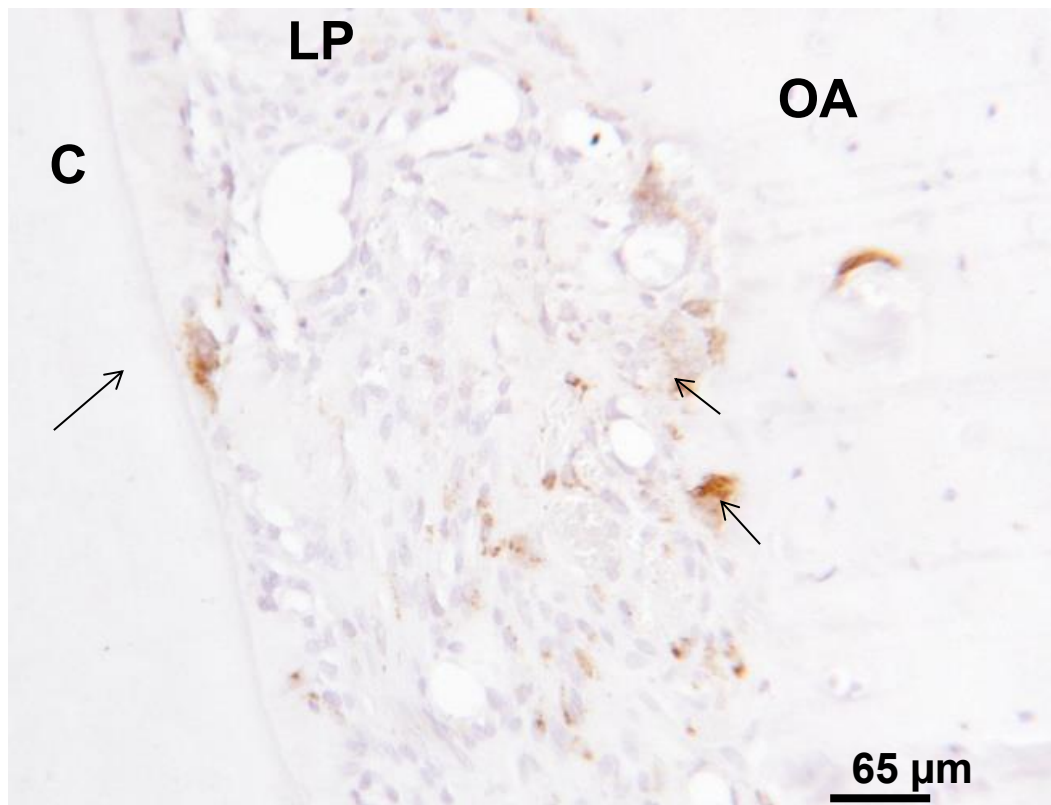


Fig. 16. TRAP - Imunomarcacão em células clásticas, no osso alveolar (seta) e cimento (seta).

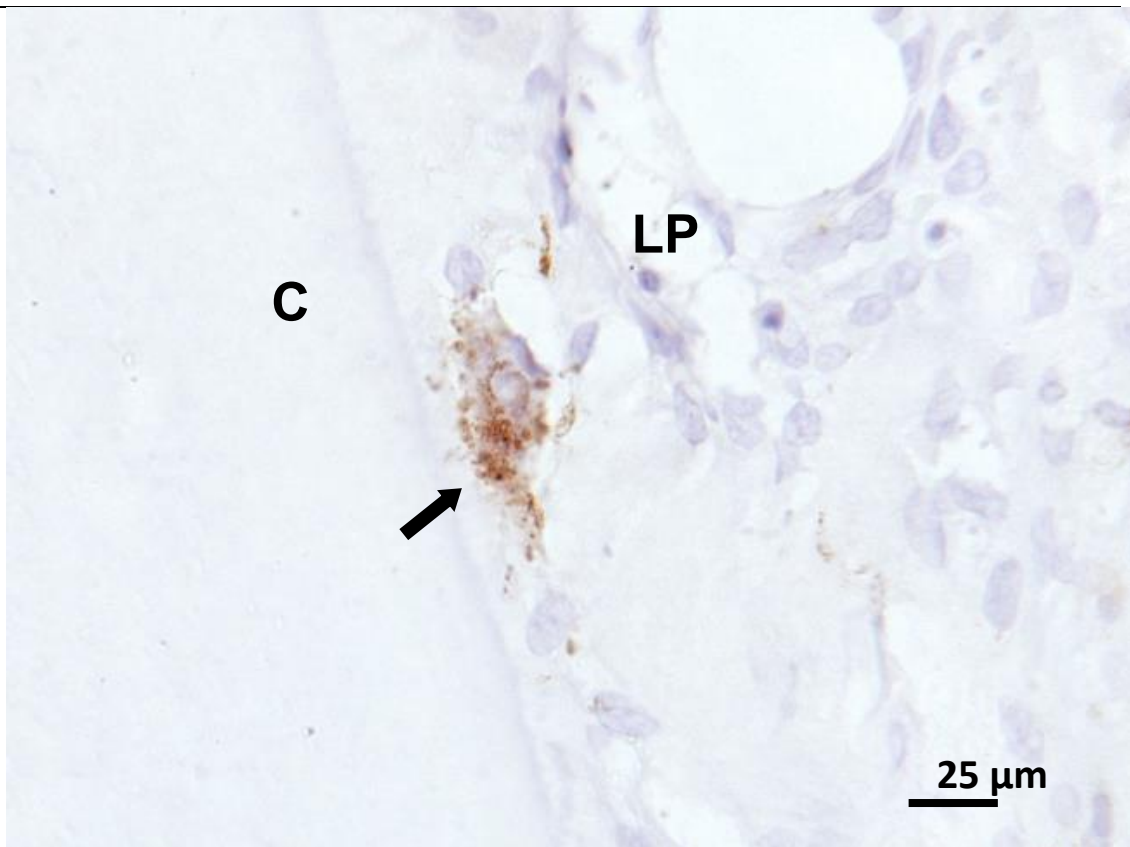


Fig.17. TRAP - Imunomarcacão no cementoclasto.

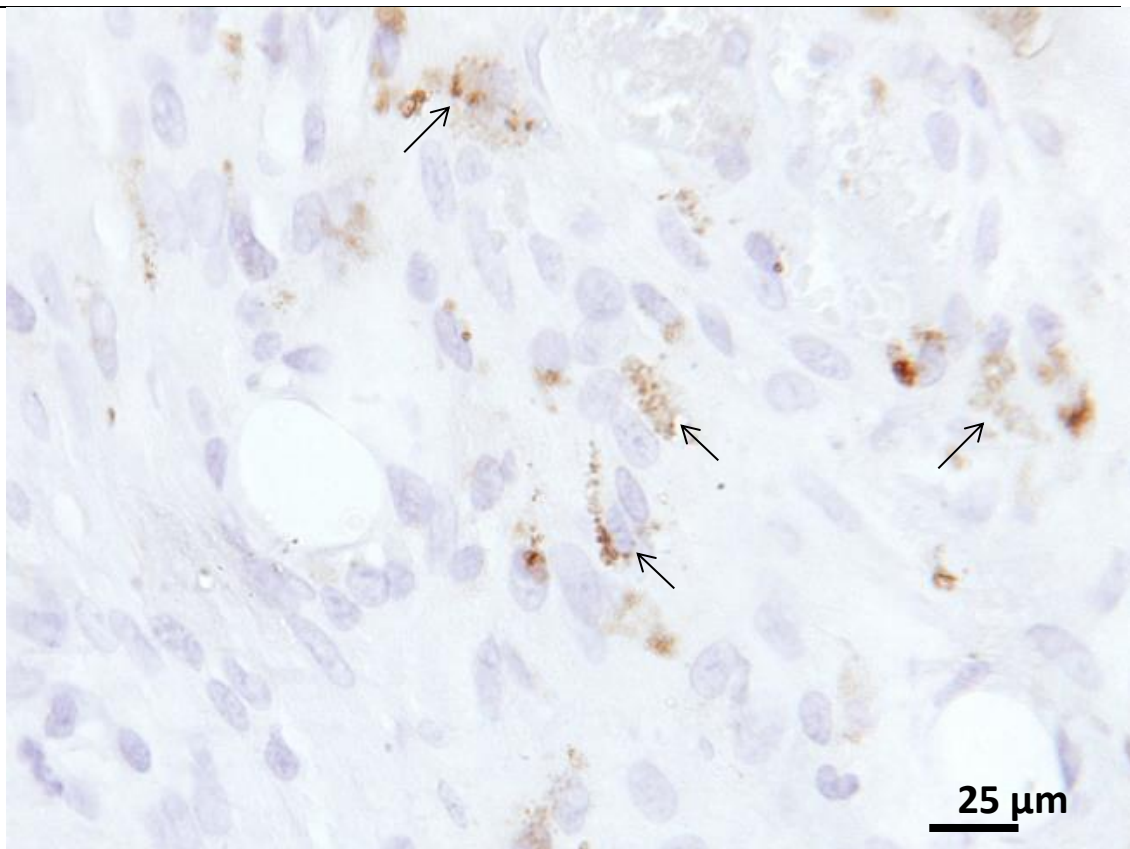


Fig.18. TRAP - Imunomarcacão em células clásticas isoladas no ligamento periodontal.

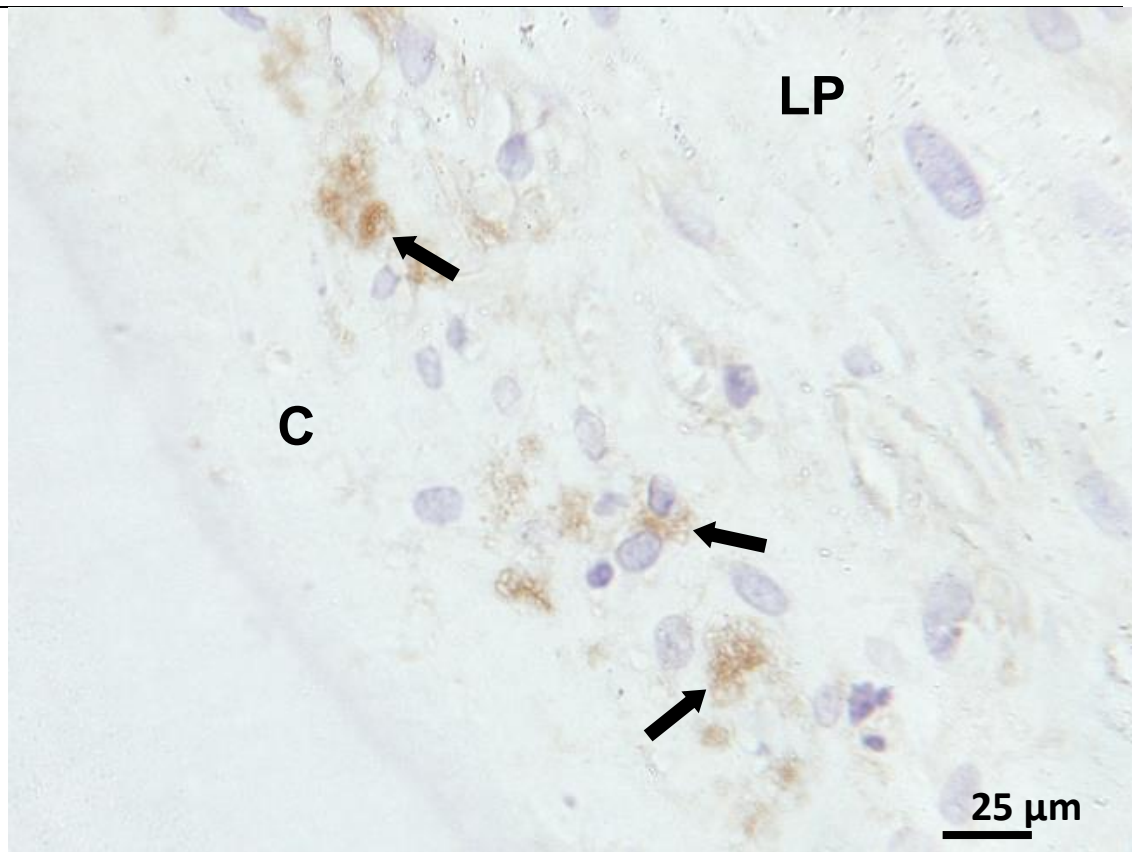


Fig. 19. CAPSPASE-3 - Imunomarcação em cementócitos no terço apical da raiz dentária.

DISCUSSÃO:

De acordo com o censo demográfico brasileiro de 2010 a população de mulheres no Brasil é de 97 milhões e dessas 9,4% estão na faixa etária de 50 a 74 anos (Censo, 2010). Considerando que a menopausa ocorre por volta dos 50 anos e que a expectativa de vida para elas é estimada em 68 anos, milhões de mulheres brasileiras viverão mais de um quarto de suas vidas nessa condição. E essa população não só viverá mais como também é mais ativa estando, portanto sujeita a sofrer traumatismo o que justifica a importância das pesquisas nessa área.

Quanto ao modelo experimental para o estudo dessa condição sistêmica este já está bem estabelecido e recomendado pela FDA e tem sido amplamente empregado para esse fim (Cesnjaj et al. 1991, Anbinder et al., 2006, Duarte et al., 2006, Giro et al., 2008, Ames et al., 2010) bem como para o estudo do reimplante dentário (Saad Neto et al., 1986, Sonoda et al., 2000, Lustosa-Pereira et al., 2006, Panzarin et al., 2005). O rato tem muita semelhança com o homem com relação à anatomia periodontal, desenvolvimento e composição da placa dental, histopatologia das lesões periodontais e imunobiologia de base (Klausen, 1991) além de ser de fácil obtenção e manuseio o que facilita o estudo.

Pesquisas em animais e em humanos mostram resultados contraditórios sobre a influência da deficiência do estrógeno na perda óssea alveolar (Dervis, 2005). Um dos motivos pode ser porque os efeitos da ovariectomia sobre o tecido ósseo não são imediatos geralmente leva mais de três meses para ser evidente (Kuroda et al., 2003) embora Yoon et al., (2012) tenham relatado aumento do turnover ósseo e significativa perda óssea trabecular em ratas ovariectomizadas após 8 semanas na região da coluna vertebral.

Os resultados desse estudo não mostraram diferença no processo de reparo do reimplante dentário das ratas ovariectomizadas em comparação com as ratas sham, e um dos motivos pode ter sido o tempo que os animais foram submetidos à deficiência de estrógeno, dois meses, e ainda a idade como são animais adultos jovens pode ter ocorrido algum mecanismo de compensação por não apresentarem, por exemplo, dificuldade na absorção de minerais como o cálcio já que recebiam uma dieta balanceada.

Outro ponto é que as forças oclusais decorrentes do comportamento roedor também podem ter uma influência atenuada no efeito esperado da ovariectomia sobre os ossos da mandíbula (Mavropoulos et al., 2007, Ejiri et al., 2008). A carga mecânica no processo alveolar durante a mastigação pode proteger o osso alveolar dos efeitos prejudiciais observados em outros locais do esqueleto, tais como a tíbia (Mavropoulos et al., 2007) e coluna vertebral (Yoon et al., 2012).

Diferenças morfológicas e embriológicas entre os locais do esqueleto também pode ter uma influência porque Mavropoulos et al. (2007) relataram maior perda óssea na tíbia quando comparada ao osso alveolar em ratas ovariectomizadas.

O peridonto de inserção composto pelo ligamento periodontal, cemento, e osso alveolar desempenha um papel importante na manutenção da estabilidade mecânica dos dentes. Forças mastigatória aplicadas aos dentes são transferidas diretamente ao osso alveolar através do ligamento periodontal estimulando a remodelação óssea. Essa remodelação óssea altera as propriedades desse tecido quando comparado a outras áreas da mandíbula que não recebem essa força (Ames et al., 2010).

A formação óssea inicia-se com a deposição de matriz orgânica e logo em seguida começa a mineralização primária (Roschger et al., 2008, Ruffoni et al., 2007). Cerca de 50% do potencial de mineralização é alcançado rapidamente com a mineralização primária (Boivin et al., 2009) enquanto que a secundária ocorre de forma mais lenta e gradual. A mineralização primária acontece em alguns dias a secundária leva anos (Ruffoni et al., 2007).

Há dois pontos de vista sobre o efeito da deficiência de estrógeno na neoformação óssea. O primeiro diz respeito aos efeitos negativos na osteoindução causados pela deficiência de estrogênio. Cesnjaj et al. (1991) relataram que a osteogênese diminuiu em ratas ovariectomizadas e que a condrogênese foi atrasada. Os autores teorizam que a deficiência estrogênica altera a produção de proteínas osteoindutiva, como osteogenina e proteínas ósseas morfogenética, e, desta forma atrapalha a formação da matriz óssea. O segundo ponto de vista é que a deficiência de estrogênio aumenta o turnover ósseo causando osteoporose (Yoon et al., 2012), tanto em osso neoformado como em osso velho Cesnjaj et al. (1991).

Estudo demonstraram aumento da fosfatase alcalina no grupo de ratas ovariectomizadas confirmando um aumento do turnover ósseo (Duarte et al., 2006, Yoon et al., 2012).

Fibroblastos do ligamento periodontal e fibroblastos gengivais desempenham papéis importantes na remodelação óssea. Fibroblastos do ligamento periodontal estimulam a remodelação óssea, enquanto os fibroblastos gengivais protegem da reabsorção óssea anormal (Kook et al., 2009). Wattanaroonwong et al.(2011) relataram que o estrógeno inibe a formação de osteoclastos induzidos pelos fibroblastos do ligamento periodontal.

Com relação ao processo de reparo do reimplante nos dois grupos o reparo foi favorável com reinserção do ligamento periodontal no osso e no cimento e poucas áreas de reabsorção de superfície aos 15 dias.

A reinserção do ligamento periodontal é devido à viabilidade das células do ligamento periodontal já que o reimplante foi imediato (Andreasen, 1981, Andreasen, 1980, Hammarstron et al., 1989, Pohl et al., 2005) fato evidenciado pela imunorreatividade a PCNA que indica proliferação celular, tanto no cimento quanto no osso alveolar, mais evidente aos 7 dias independente de pertencerem ao grupo Sham ou OVX.

Em reimplante dentário imediato de dentes com rizogênese incompleta é possível de ocorrer a revascularização pulpar (Andreasen, 2001) e neste estudo na maioria dos espécimes o tecido pulpar encontrava-se com vitalidade e foi possível observar células imunorreativas a PCNA na polpa.

A diferença estatística encontrada quanto à presença de reabsorção radicular entre o período de 7 e 15 dias é em decorrência do tempo de avaliação, pois as reabsorções radiculares se iniciam a partir desse período assim como a constatação da necrose pulpar (Andreasen, 2001).

Análise imunoistoquímica confirma esse achado com presença de imunomarcações positivas para TRAP mais acentuada nos animais aos 15 dias independente do grupo estudado.

CONCLUSÃO

Após análise histomorfométrica e imunoistoquímica não foi possível observar diferença no processo de reparo do reimplante dentário imediato entre ratas OVX e Sham nos períodos estudados.

REFERÊNCIAS

Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopause osteoporosis. It's clinical features. JAMA 1941; 116:2465-2474.

Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kima DG Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. Archives of Oral Biology 2010;55:599–605.

Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, Rocha RF. Estrogen Deficiency and Periodontal Condition in Rats - A Radiographic and Macroscopic Study. Braz Dent J 2006;17: 201-207.

Andreasen JO. A time-related study of periodontal healing and root resorption activity after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Swed Dent J 1980;4:101-10.

Andreasen JO. Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Int J Oral Surg 1981;10:43-53.

Andreasen JO. Guidelines for the evaluation and management of traumatic dental injuries. Int Dent Traumatol. 2001 Oct;17(5):193-8.

Anraku Y, Mizuta H, Sei A, Kudo S, Nakamura E, Senba K, Hiraki Y. Analyses of early events during chondrogenic repair in rat full-thickness articular cartilage defects. J Bone Miner Metab 2009;27:272-86.

Boivin G, Farlay D, Bala Y, Doublier A, Meunier PJ, Delmas PD. Influence of remodeling on the mineralization of bone tissue. *Osteoporosis Int* 2009;20:1023–6.

Budden FH, Bayley TA, Harrison JE, Josse RG, Murray TM, Sturtridge WC, et al. The effect of fluoride on bone histology in postmenopausal osteoporosis depends on adequate fluoride absorption and retention. *J Bone Miner Res* 1988;3(2):127-32.

Cesnjjaj M, Stavljenic A, Vukicevic S. Decreased osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. *Acta Orthop Scand* 1991;62:471-5.

Dervis E. Oral implications of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:349-56.

differentiation and hormonal regulation. *Physiol Rev* 1986;66:855-886.

Duarte PM, Gonçalves PF, Casati MZ, de Toledo S, Sallum EA, Nociti Jr FH. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodont Res* 2006; 41: 541–546.

Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 2000;289:1501-1504.

Eriji S, Toyooka E, Tanaka M, Anwar RB, Hohno S. Histological and histomorphometrical changes in rat alveolar bone following antagonistic tooth extraction and/or ovariectomy. *Archives of Oral Biology* 2006; 51: 941-950.

G Giro, Gonçalves D, Sakakura CE, Pereira RMR, Marcantonio Júnior E, Orrico SRP. Influence of estrogen deficiency and its treatment with alendronate and estrogen on bone density around osseointegrated implants: radiographic study in female rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:162-7.

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

Hammarström L, Blomlöf L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:163-75.

Jabbar S, Drury J, Fordham J, Datta H, Francis R, Tuck S. Osteoprotegerin, RANKL AND bone turnover in postmenopausal. *Osteoporos Int* 2009; 20 (Suppl 4):S271.

Jeffcoat MK and Chesnut CH 3rd. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. *J Am Dent Assoc* 1993;124(11):49-56.

Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*. 1991;62(1):59-73.

Kook SH, Son YO, Hwang JM, Kim EM, Lee CB, Jeon YM, Kim JG, Lee JCJ. Mechanical force inhibits osteoclastogenic potential of human periodontal ligament fibroblasts through OPG production and ERK-mediated signaling *Cell Biochem*. 2009; 106: 1010-9.

Kuroda S, Mukohyama H, Hondo H, Aoki K, Ohyama T, Kasugai S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;9:24-28.

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem Univ Calif* 1922;6:1-148.

Lustosa-Pereira A, Garcia RB, de Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006;22:30-5.

CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats' teeth. *Dent Traumatol* 2006; 22:30-5.

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002; 62(4A): 609-614.

Maruyama Z, Yoshida CA, Furuichi T ET al. Runx2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. *Dev Dyn* 2007;236:1876-90.

Min HJ, Lee MJ, Kim JY, Cho SW, Park HD, Lee SI, Kim HJ, Jung HS. Alteration of BMP-4 and Runx2 expression patterns in mouse temporomandibular joint after ovariectomy. *Oral Dis* 2007;13:220-7.

Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of the bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev.* 1986 Oct;66(4):855-86.

Panzarini SR, Perri de Carvalho AC, Poi WR, Sonoda CK. Use of vitamin C in delayed tooth replantation. *Braz Dent J* 2005;16:17-22.

Pohl Y, Filippi A, Kirschner H. Results after replantation of avulsed permanent teeth. II. Periodontal healing and the role of physiologic storage and antiresorptive-regenerative therapy. *Dent Traumatol* 2005;21:93-101.

Rogers A, Eastell R. Circulating osteoprotegerin and receptor activator for nuclear factor kB ligand: clinical utility in metabolic bone disease assessment. *J Clin Endocrinol Metabol* 2005; 90:6323-6331.

Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K. Bone mineralization density distribution in health and disease. *Bone* 2008;42:456–66.

Ruffoni D, Fratzl P, Roschger P, Klaushofer K, Weinkamer R. The bone mineralization density distribution as a fingerprint of the mineralization process. *Bone* 2007;40:1308–19.

Saad-Neto M, Carvalho ACP, Okamoto T, Callestini EA. Immediate dental replantation with root surface treatment with phosphoric acid and calcium hydroxide: histological study in rats. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1986; 40:314-20.

Sato K, Muramatsu T, Tsuchiya Y, Masaoka T, Enokiya Y, Hashimoto S, Shimono M. Proliferation, migration and apoptosis of periodontal ligament cells after tooth replantation. *Oral Dis* 2010;16:263-8.

Shu L, Guan SM, Fu SM, Guo T, Cao M, and Ding Y. Estrogen Modulates Cytokine Expression in Human Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res* 2008; 87(2):142-147.

Sonoda CK, Poi WR, Okamoto T, Toyota E, Takeda RH. Mediate teeth reimplantation after root treatment with 1%, 2,5%, 5% and 10% sodium hypochlorite solution. *Rev Bras Odontol* 2000;57:293-6.

Vico L, Prallet B, Chappard D, Pallot-Prades B, Pupier R, Alexandre C. Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. *Osteoporos Int* 1992; 2(3):153-158.

Wang YL, Fei LS, Jin CX, Liu SY. Effect of estrogen-deficiency on expression of osteoprotegerin in alveolar bone: experiment with rats with periodontitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008 Jun 24;88(24):1715-8.

Wattanaroonwong N, Schoenmaker T, de Vries TJ, Everts V. Oestrogen inhibits osteoclast formation induced by periodontal ligament fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2011;56:212-9.

Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endod* 1975;1:395-402.

www.censo20120.ibge.gov.br

Yoon KH, Cho DC, Yu SH, Kim KT, Sung JY. The Change of Bone Metabolism in Ovariectomized Rats: Analyses of MicroCT Scan and Biochemical Markers of Bone Turnover. *J Korean Neurosurg Soc* 2012; 51:323-327.

Zhou Y, Fu Y, Li JP, Qi LY. The role of estrogen in osteogenic cytokine expression in human periodontal ligament cells. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2009;29:507-513.