

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
*CAMPUS* DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

**Luiza Tavares Moreira**

**A ação da genisteína no reparo ósseo alveolar e  
remodelação do colo do fêmur de ratas  
ovariectomizadas**

ARAÇATUBA  
2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

**Luiza Tavares Moreira**

**A ação da genisteína no reparo ósseo alveolar e  
remodelação do colo do fêmur de ratas  
ovariectomizadas**

Trabalho de conclusão de curso apresentada à Faculdade  
de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP  
Orientadora: Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA  
2017

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à **Deus**, que pela sua infinita bondade pôs em meu coração força, coragem, perseverança e colocou em meu caminho pessoas sem as quais não conseguiria ultrapassar os obstáculos que apareceram e aparecem diariamente.

*In memorium* dos meus pais, **Bernardo e Maria**, por serem minha base, por estarem sempre comigo, agora perto do nosso senhor me apoiando, dando forças nas horas que me sinto incapaz, confortando meu coração. Pelo amor, carinho, compressão, apoio incondicional. Pelos exemplos de honestidade, humildade e força de vontade que sempre transmitiram. E pelas experiências, educação, proteção e não proteção, por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos, que faz de mim quem eu sou hoje.

Ao meu irmão **José Luís**, que nunca mediu esforços para me ajudar. Por acreditar em mim e embarcar junto comigo nos meus sonhos, não importando quão difícil pareça, quanto de esforço e de coisas que teremos que abrir mão, sempre me apoiando e nunca deixando-me sentir desamparada.

À minha irmã **Anicia** pela parceria, amor, confiança. Já passamos por tantas situações e mesmo com as nossas diferenças cuidamos uma da outra. Por ter me dado o melhor presente, a **Alicia**, e por serem um dos motivos da minha luta diária.

À todos os meus irmãos, **Arcângela, Domingas, Pedro, Silvio, Antônio, Zé Tomás, Alda, Maria da Graça, Maria Elisa, Maria da Cruz, Maria Isabel, Vitor, Victor, Alcídia**, e **João**, que não mediram esforços, cada um dentro das suas possibilidades sempre me apoiando. Pelos conselhos e pela confiança que com certeza fazem de mim quem sou hoje também.

Aos meus sobrinhos, em especial a **Della**, pela amizade, conselhos, amor, paciência, apoio e por lutar junto comigo. Por estar sempre comigo, não importando o quão difícil esteja. E a toda minha família por acreditarem e torcerem por mim.

Não consigo imaginar o que seria de mim sem vocês na minha caminhada. Sou eternamente grata por tudo e por tê-los na minha vida. Amo muito vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

À Diretoria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP – O Diretor Prof. Titular Wilson Roberto e ao Vice- diretor Prof. Tit. João Eduardo Gomes Filho, por todo o apoio.

Ao auxílio financeiro do CNPq (Conselho Nacional de pesquisa) pela concessão de bolsa de iniciação científica.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Professora Rita Cássia Menegati Dornelles**, que me guiou com muita paciência todos estes anos, por todo auxílio sempre que precisei. Foi muito gratificante tê-la em minha formação.

À **Professora Camila Tami Stringhetti Garcia**, pelas orientações científicas, por todo carinho, ajuda, conselhos, por me amparar nos momentos que eu mais precisei. Você sempre será um exemplo para mim.

Ao **Professor Edilson Ervolino** pela sua colaboração neste projeto, pela ajuda, compreensão e atenção.

Às minhas amigas, **Paloma Silva e Jéssica Coelho**, pela amizade, parceria, momentos de estudos, confiança, força, compreensão e por toda ajuda. Por tornarem meus dias mais suportáveis, divertidos sem perder o foco. Sou muito grata por tudo e não tenho palavras para descrever o quanto a amizade de vocês é valiosa e especial para mim.

A **Daniela Alvim, Mariana Martins, Nathalia Dias, Morgana Fernandes e Willian Jacometo**, pela amizade, risadas, ajuda, momentos que vou levar pra sempre comigo em meu coração.

Ao pessoal do Laboratório, **Ângela, Melise, Fernanda e o Ricardo**, por toda ajuda, amizade, confiança, conselhos que vou levar sempre comigo, que com certeza tornou tudo menos pesado. Quantas vezes falei “não sei o que seria de mim sem as meninas!!” e realmente não sei que seria de mim sem vocês e sou muito grata por Deus ter colocado vocês em meu caminho. Muito obrigada gente, prometo dar menos trabalho.

A todos os meus professores da graduação, aos que tive mais contatos ou menos, agradeço por todos os conhecimentos compartilhados tanto em salas de aulas como em conversas nos corredores.

Ao **Diogo Reatto** que me ajudou desde do dia que eu soube que eu viria para o Brasil e me recebeu da melhor forma, sempre disposto, me ajudando no que fosse preciso. Muito obrigada!

Aos funcionários da faculdade, a todos que de uma forma ou de outra tornaram tudo mais fácil.

*“Eu aprendi que a coragem não é a ausência de medo, mas o triunfo sobre ele. O homem corajoso não é aquele que não sente medo, mas aquele que conquista por cima do medo.”*

*Nelson Mandela*

Moreira, LT. “A ação da genisteína no reparo ósseo alveolar e remodelação do colo do fêmur de ratas ovariectomizadas.” TCC – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## RESUMO

Nos ossos mandibulares e maxilares, o hipoestrogenismo afeta o processo de reparo alveolar, reduzindo a formação óssea após extração dentária. E no processo de remodelação do tecido ósseo proporciona progressiva diminuição da massa óssea. Entre os fármacos estudados na tentativa de minimizar esses efeitos, tem as isoflavonas derivadas da soja, como a genisteína (Gen), consideradas modulador natural do receptor de estrógeno, devido sua ligação conformacional. Entretanto, sua ação sobre o tecido ósseo permanece controversia. O objetivo deste estudo foi analisar a ação da Gen no reparo do osso alveolar e processo de remodelação do colo de fêmur em ratas ovariectomizadas (OVX). Foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar (6 meses), distribuídas aleatoriamente nos grupos: Sham/NaCl; Sham/Gen; OVX/NaCl; OVX/Gen. O esfregaço vaginal dos animais foi colhido diariamente para verificação do ciclo estral, durante 15 dias e foram aceitos somente animais com ciclo estral regular para nosso estudo. Posteriormente, as ratas dos grupos OVX, no 6<sup>o</sup> mês foram OVX, e as ratas dos grupos Sham foram submetidas à cirurgia fictícia de remoção dos ovários. Dez dias após as cirurgias, os grupos experimentais Sham/Gen e OVX/Gen receberam 5,76 mg/kg/dia de Gen, e os grupos Sham/NaCl e OVX/NaCl receberam 0,3 mL de NaCl, por gavagem, durante 90 dias. Foi realizada extração do incisivo central superior direito após 62 dias de terapia substitutiva. No final dos 90 dias, foram sacrificados, fez-se a separação do alvéolo direito e a coleta do fêmur esquerdo. A região do terço médio alveolar foi analisada por análise histométrica e análise imunoistoquímica das imunomarcações das proteínas, Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) e Osteocalcina (OCN). O colo do fêmur foi analisado com auxílio do microtomografo computadorizado. No reparo ósseo alveolar observou-se os efeitos da ovariectomia, com aumento significativo nas imunomarcações da TRAP, mas não houve diferença estatística na aposição óssea nos animais quando comparados com Sham. E no processo de remodelação do colo do fêmur a ovariectomia levou ao aumento na porosidade cortical e diminuição na espessura cortical. No grupo OVX/Gen notou-se maior aposição do tecido ósseo no terço médio quando comparados com os demais grupos, com diminuição estatisticamente nas imunomarcações da TRAP mas não houve diferença na expressão da OCN. No colo do fêmur observou-se que em ratas OVX houve aumento na espessura trabecular e diminuição da porosidade cortical do colo do fêmur. Portanto conclui-se que a Gen diminui os efeitos do hipoestrogenismo no reparo ósseo alveolar com aumento na formação óssea e no processo de remodelação do colo do fêmur apresentou-se também ação positiva, com aumento na espessura trabecular e diminuição da porosidade cortical.

**Palavras chave:** Estrógeno, genisteína, exodontia, reparo alveolar.

Moreira, LT. "The action of genistein on alveolar bone repair and remodeling of the femoral neck of ovariectomized rats". TCC – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

## **ABSTRACT**

In mandibular and maxillary bones, hypoestrogenism affects the alveolar repair process, reducing bone formation after tooth extraction. And in the process of remodeling the bone tissue provides progressive decrease of bone mass. Among the drugs studied in the attempt to minimize these effects, soy isoflavones, such as genistein (Gen), are considered natural modulators of the estrogen receptor because of their conformational binding. However, its action on bone tissue remains controversial. The objective of this study was to analyze the action of Gen in alveolar bone repair and remodeling of the femoral neck in ovariectomized rats (OVX). Forty Wistar rats (6 months) were randomly assigned to the following groups: Sham/NaCl; Sham/Gen; OVX/NaCl; OVX/Gen. The vaginal smear of the animals was collected daily to verify the estrous cycle for 15 days and only animals with regular estrous cycle were accepted for our study. Subsequently, the rats of the OVX groups at the 6<sup>0</sup> month were OVX, and the rats of the Sham groups underwent the ovarian removal mock surgery. Ten days after surgeries, the Sham/Gen and OVX/Gen experimental groups received 5.76 mg/kg/day of Gen, and the Sham/NaCl and OVX/NaCl groups received 0.3 mL of NaCl by gavage during 90 days. The right upper central incisor was extracted after 62 days of substitutive therapy. At the end of the 90 days, they were sacrificed, the right alveolus was removed and the left femur was collected. The alveolar middle third region was analyzed by histometric analysis and immunohistochemical analysis of protein immunolabeling, Tartarate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) and Osteocalcin (OCN). The femoral neck was analyzed using the computerized microtomograph. In alveolar bone repair the effects of ovariectomy were observed, with a significant increase in the immunoblot of the TRAP, but there was no statistical difference in the bone apposition in the animals when compared with Sham. And in the process of remodeling the femoral neck ovariectomy led to an increase in cortical porosity and a decrease in cortical thickness. In the OVX/Gen group it was observed a greater apposition of the bone tissue in the middle third when compared to the other groups, with a statistically decrease in the immunoblot of the TRAP, but there was no difference in the expression of the OCN. In the femoral neck it was observed that in OVX rats there was an increase in the trabecular thickness and a decrease in the cortical porosity of the femoral neck. Therefore, it is concluded that Gen decreases the effects of hypoestrogenism on alveolar bone repair with increased bone formation and on the remodeling process of the femoral neck. Positive action was also observed, with increase in trabecular thickness and decrease in cortical porosity.

**Keywords:** Estrogen, genistein, exodontia, alveolar repair.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de remodelamento - processo de reabsorção e formação do tecido ósseo (Lian *et al.*, 2012).
- Figura 2.** Esfregaço vaginal coletado a fresco para verificação do ciclo estral das ratas dos grupos experimentais. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).
- Figura 3.** Fases do ciclo estral observadas a fresco em microscópio óptico. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).
- Figura 4.** Cirurgia de ovariectomia das ratas experimentais. (A) incisão abdominal lateral; (B) exposição do ovário para ovariectomia (seta sinalizando o ovário); (C) fechamento da incisão na região abdominal. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).
- Figura 5.** Administração das soluções por gavagem. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).
- Figura 6.** Exodontia do incisivo central direito. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).
- Figura 7.** Sequência de eventos do protocolo experimental.
- Figura 8.** A: Etapas do processamento histológico. (A) peças emblocadas em parafina; (B) micrótomo para realização dos cortes semi-seriados; (C) lâminas foscas lapidadas para coloração H&E; (D) lâminas silanizadas para imunomarcagem
- Figura 9.** Esquema do processo alveolar dividido nos terços, Apical (I), médio (II) e cervical (III).
- Figura 10.** Esquema representativo da região de análise do terço médio alveolar das ratas de 9 meses 28 dias após exodontia. (A) Corte histológico (3

µm) no aumento de 10x, com representação do seio maxilar; (B) região de análise do terço médio alveolar; (C) região do terço médio alveolar no aumento de 20x; (D) região do terço médio alveolar no aumento de 40x.

**Figura 11.** (A) Lavagem em PBS das lâminas silanizadas; (B) Panela de pressão utilizada para recuperação do antígeno em tampão citrato.

**Figura 12.** (A) Aparelho Sky scanner 1272; (B) Região de interesse; (C) Região de Interesse manualmente interpolada para osso trabecular e cortical.

**Figura 13.** Peso corporal inicial (ratas de 6 meses), antes da OVX e final (ratas de 9 meses) Sham ou OVX que receberam Gen ou NaCl por 90 dias. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; + vs OVX/NaCl, & vs inicial.

**Figura 14.** Peso do útero normalizado por 100 gramas de peso corporal (pc) de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; \* vs Sham/NaCl, # vs Sham/Gen.

**Figura 15.** (A) Cortes histológicos (3µm) do terço médio alveolar de ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) ou Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. (B) Formação óssea no terço médio alveolar das ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias de administração da solução fisiologia (Sham/NaCl e OVX/NaCl) e Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl =

animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; # vs Sham/Gen, + vs OVX/NaCl; OVX/GEN indica interação.

**Figura 16.** Gráficos que mostram o padrão de imunorreatividade para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e osteocalcina (OCN), de ratas Sham ou ovariectomizadas (OVX) de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) e Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses durante 3 meses; Sham/Gen = animais—submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; \* vs Sham/NaCl; + vs OVX/NaCl.

**Figura 17:** Cortes histológicos (3µm) do terço médio alveolar de ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) ou Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem, mostrando as imunomarcações para TRAP e OCN. Sham/NaCl (A) = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; OVX/NaCl (B) = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen (C) = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/Gen (D) = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses;

**Figura 18.** Reconstrução 3D do colo do fêmur de ratas de 9 meses Sham ou OVX, que receberam por 3 meses NaCl ou Gen por 3 meses. Seleção dos slices que compreendem o colo do fêmur (A), delimitação da região de interesse trabecular (B) e cortical (C). Reconstrução em 3D do trabeculado e cortical ósseos dos animais Sham/NaCl (D e H),

Sham/Gen (E e I), OVX/NaCl (F e J) e OVX/Gen (G e K). Abreviaturas: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses.

**Figura 19.** Análise da região do osso trabecular do colo do fêmur de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; BV/TV (% - volume ósseo/ tecido ósseo), Tb.Th (mm – espessura trabecular), Tb.N (1/mm – número de trabéculas), Tb.Sp (mm – separação trabecular). \* vs Sham/NaCl; # vs Sham/Gen; + vs OVX/NaCl; OVX/Gen indica interação.

**Figura 20.** Análise do osso cortical do colo do fêmur de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; Ct.Ar (mm<sup>2</sup>, área cortical), Ct.Th (mm, espessura cortical), porosidade total (%), pMOI (mm<sup>4</sup>, média do momento polar de inércia). \* vs Sham/NaCl; # vs Sham/Gen; + vs OVX/NaCl; OVX/Gen indica interação.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Distribuição dos grupos experimentais e frequência dos tratamentos

## LISTA DE ABREVIACÃO

- ANOVA: Análise de variância
- BV/TV: volume ósseo/ tecido ósseo
- Ct.Ar: área cortical
- Ct.Th: mm, espessura cortical
- DMO: densidade mineral óssea
- E<sub>2</sub>: Estrógeno
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- EPM: erro padrão da média
- EUA: Estados unidos da América
- FGF: fator de crescimento fibroblástico
- Gen: Genisteína
- GPR30: Receptor 30 acoplado à proteína G
- h: horas
- H&E: hematoxilina e eosina
- IGF: fator de crescimento insulínico
- IL-1: interleucina-1
- IL-4: interleucina-4
- IL-1 $\beta$ : interleucina-1 $\beta$
- i.m.: intramuscular
- i.p.: intraperitoneal
- IR: células imunorreativas
- Marks: proteína-quinase ativado por mitógenos
- mg/Kg: miligrama por quilograma
- mg/Kg/dia: miligrama por quilograma por dia
- mL: mililitros
- mL/Kg: mililitros por quilograma
- mm: milímetros
- mm<sup>2</sup>: milímetro quadrado
- mm<sup>4</sup>: milímetro elevado à quarta potência
- NaCl: solução fisiológica de cloreto sódio a 0,9%

- NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappaB
- OBs: osteoblastos
- OCN: osteocalcina
- OCs: osteoclastos
- OPG: osteoprotegerina
- OVX: ovariectomizada
- OVX/NaCl: Animais submetidos a OVX que receberam NaCl durante 3 meses
- OVX/Gen: Animais submetidos a OVX que receberam Gen durante 3 meses
- pc: peso corporal
- PMOI: média do momento polar de inércia
- Ppary: receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
- PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
- pMOI:  $\text{mm}^4$ , média do momento polar de inércia
- RANK: receptor ativador do fator nuclear-Kb
- RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
- Sham/NaCl: Animais que receberam NaCl durante 3 meses
- Sham/Gen: Animais que receberam Gen durante 3 meses
- TNF: fator de necrose tumoral
- Tb.N: número de trabéculas
- Tb.Sp: separação trabecular
- Tb.Th: espessura trabecular
- TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante- $\beta$
- TGF- $\alpha$ : fator de crescimento transformante- $\alpha$
- TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato
- TRH: terapia de reposição hormonal
- °C: graus Celsius
- $\mu\text{m}$ : micrômetros
- $\mu\text{CT}$ : Microtomografia óssea
- $\mu\text{g}$ : micrograma
- 1/mm: 1 por milímetro

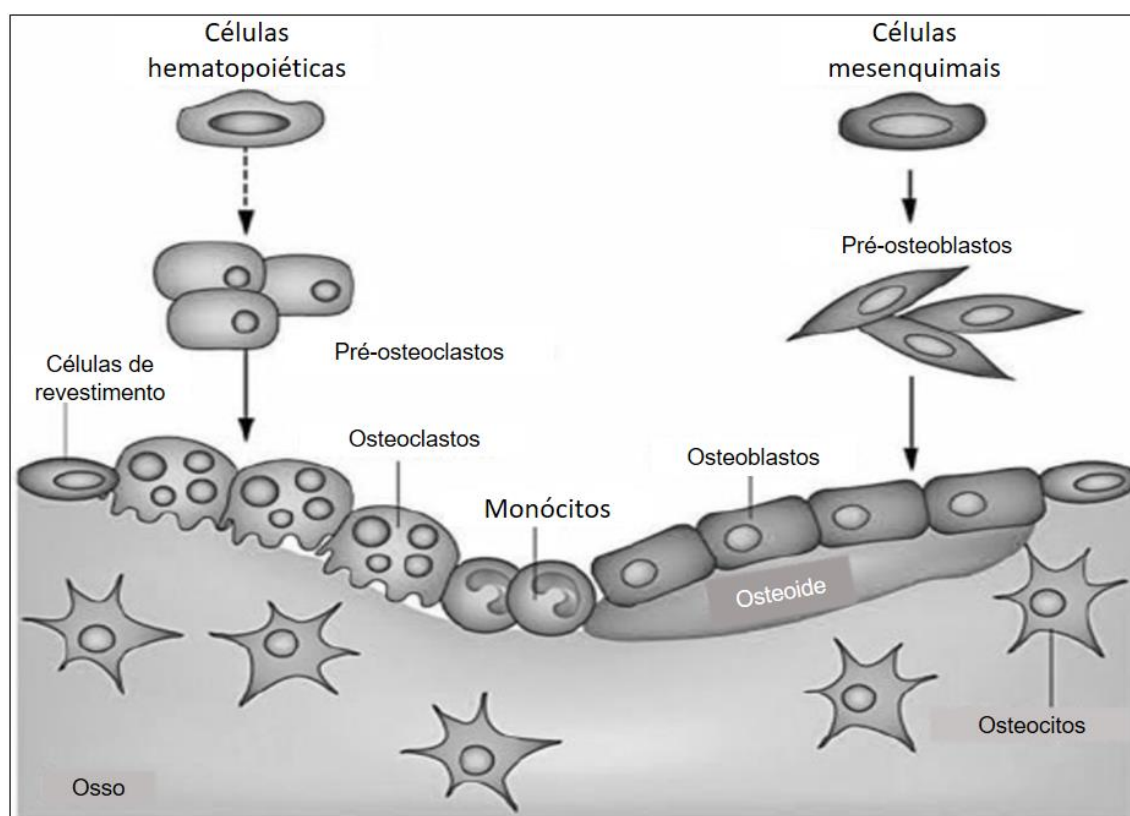
## SUMÁRIO

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                | 17 |
| 2. OBJETIVOS .....                                                 | 23 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAL .....                                         | 23 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                   | 23 |
| 3. METODOLOGIA .....                                               | 24 |
| 3.1. ANIMAIS .....                                                 | 24 |
| 3.2. CICLO ESTRAL .....                                            | 24 |
| 3.3. OVARECTOMIA .....                                             | 25 |
| 3.4. TERAPIA SUBSTITUTIVA .....                                    | 27 |
| 3.5. EXODONTIA .....                                               | 27 |
| 3.6. COLETA DO MATERIAL .....                                      | 28 |
| 3.7. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DAS AMOSTRAS.....                   | 29 |
| 3.7.1. ANÁLISE HISTOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR .....         | 29 |
| 3.7.2. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR.....      | 21 |
| 3.8. ANÁLISE DA MICROTOMOGRAFIA ÓSSEA ( $\mu$ CT) DO COLO DO FÊMUR | 32 |
| 3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                     | 33 |
| 4. RESULTADOS .....                                                | 33 |
| 4.1. PESO CORPORAL INICIAL E FINAL .....                           | 33 |
| 4.2. PESO DO ÚTERO .....                                           | 34 |
| 4.3. ANALISE HISTOMÉTRICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR .....           | 35 |
| 4.4. ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR.....        | 37 |
| 4.5. MICROTOMOGRAFIA ÓSSEA DO COLO DO FÊMUR .....                  | 39 |
| 5. DISCUSSÃO .....                                                 | 42 |
| 6. CONCLUSÃO .....                                                 | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS .....                                               | 47 |
| ANEXO .....                                                        | 57 |

## 1. INTRODUÇÃO

A remodelação do tecido ósseo é processo necessário para proporcionar integridade ao osso (Figura 1) (Katchburian *et al*, 2004). A dinâmica balanceada entre os osteoblastos (OBs), células de formação do tecido ósseo e os osteoclastos (OCs), células responsáveis pela reabsorção óssea, é fundamental para homeostasia do sistema esquelético (Andia *et al*, 2006).

As células precursoras dos OCs são encontradas nos tecidos hematopoiéticos e ativadas por células da linhagem osteoblástica (Meikle *et al*, 1992). A ativação e o recrutamento dos OCs resulta em atividades reabsortivas que, pela secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, degradam e liberam fragmentos minerais e colagenosos (Datta *et al*, 2008). A figura 1 ilustra o processo de remodelação do tecido ósseo.



**Figura 1.** Ciclo de remodelamento ósseo - processo de reabsorção e formação do tecido ósseo. Adaptado de Lian *et al.*, 2012.

Após a reabsorção, células mononucleadas da linhagem de macrófagos e monócitos preparam a superfície onde OBs irão se aderir e iniciar o processo de proliferação celular, síntese de proteínas e formação óssea (Sodek *et al.*,

2000). Algumas citocinas como, receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (RANK), RANK ligante (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF), foram identificadas como os principais fatores envolvidos no controle da osteoclastogênese (Simonet *et al.*, 1997; Riggs, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Katagiri *et al.*, 2002; Lerner, 2004). RANKL, produzida por células da linhagem osteoblástica, liga-se ao RANK, receptor localizado na membrana de pré-osteoclastos e osteoclastos maduros, desencadeando o recrutamento e ativação dos efetadores finais da osteoclastogênese (Suda *et al.*, 1999). As células da linhagem osteoblástica produzem também OPG, receptor solúvel que se liga a RANKL, tornando-a indisponível para ligar-se ao RANK, inibindo a diferenciação e ativação de OCs (Suda *et al.*, 1999).

A osteocalcina (OCN), é uma proteína do colágeno, sintetizada por osteoblastos e megacariócitos, dependente da vitamina K (Thiede *et al.*, 1994). A função da OCN no tecido ósseo ainda não está totalmente estabelecida, embora sua estreita associação com a fase mineral, indica função no processo de mineralização (Allen, 2003). É secretada pelos osteoblastos maduros no estágio final da sua diferenciação, durante o período da mineralização da matriz extracelular. A quantidade de osteocalcina que entra na circulação sanguínea depende da taxa de secreção individual dos osteoblastos e do número de osteoblastos que as secretam (Nielsen, 1994).

A fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é enzima originada dos osteoclastos e eritrócitos, tem sido proposta como marcador de reabsorção óssea, podendo ser utilizada para diagnóstico ou acompanhamento de terapias, visto que a atividade de TRAP aumentada no soro, foi demonstrada em pacientes com hiperparatireoidismo, doença de Paget, carcinomas ósseos e osteoporose (Price *et al.*, 1995; Bull *et al.*, 1999). Apesar da TRAP ser marcador típico dos osteoclastos, a literatura mostra que osteoblastos também apresentam atividade desta proteína. Lau e colaboradores (2003), ao realizarem comparação bioquímica entre TRAP proveniente dos osteoblastos e osteoclastos verificaram que suas propriedades eram diferentes. A dinâmica dessas células pode ser influenciada tanto por fatores sistêmicos como locais. Dentre os fatores sistêmicos destaca-se o estrógeno ( $E_2$ ) (Clowes *et al.*, 2005), hormônio que desempenha numerosas funções fisiológicas, como ações neuroendócrinas,

envolvidas no controle da ovulação, preparo cíclico do trato reprodutor para fertilização, implantação do óvulo e além de desempenhar ações no metabolismo de minerais, carboidratos, proteínas e lipídios (Williams *et al*, 1996).

A presença de receptores estrogênicos funcionais em OBs ou em células de linhagem osteoblástica humanas foi descrita por Eriksen e colaboradores (1988) e Sarma e colaboradores (1998) sugeriram que o estrógeno reduz o recrutamento de OC e/ou seus precursores; Kameda e colaboradores (1997) sugeriram que o efeito do estrógeno seria no aumento da apoptose de OCs. Além disso, existem evidências claras de que o hipoestrogenismo proporciona progressiva diminuição da massa óssea em decorrência do aumento da secreção de citocinas com ações na reabsorção do tecido ósseo (Borelli, 1998; Jama, 2001).

Entre as citocinas com propriedades reabsortivas moduladas pelo estrógeno, destaca-se a interleucina (IL)-1 e a interleucina (IL)-4, que inibem a diferenciação dos OCs (Bandeira, 2000). Porém, um dos fatores mais influenciados pelo estrógeno é o fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Este constitui importante agente mitogênico para os OBs, diminuindo o recrutamento e atividade reabsortiva dos OCs. Os fatores de crescimento insulínico (IGFs), inicialmente produzidos pelos OBs e incorporados dentro da matriz, como o TGF-  $\beta$ , são liberados com a atividade osteoblástica. Ao serem liberados estimulam a proliferação e diferenciação osteoblástica, porém possuem ação parácrina sobre os OCs (Turner *et al* 1994).

Tanto os estrógenos quanto o TGF-  $\beta$  aumentam a produção de OPG, diminuindo, conseqüentemente, a diferenciação e ativação dos OCs, induzindo a apoptose destas células (Steeve *et al*, 2004). A menor concentração plasmática deste hormônio na menopausa é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose (Jama, 2001), por acelerar a apoptose de OBs (Xing *et al* 2005) causando maior diferenciação, recrutamento e sobrevivência dos OCs. Esses eventos contribuem para intensa diminuição da massa óssea e maior perfuração nas trabéculas ósseas (Zhao, 2012).

A osteoporose é considerada relevante problema de saúde pública mundial (Cooper *et al.*, 2011; Jeon *et al.*, 2011), caracterizada pela diminuição

da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo resultante do desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, que conduz a fragilidade e ao aumento da incidência de fraturas ósseas (Kanis *et al.*, 1994). Nos EUA, no ano de 2005, o número de fraturas osteoporóticas foi estimado em mais de 2 milhões, com custos totais de 17 milhões de dólares. Mulheres com 65 anos ou mais representaram 74% do total das fraturas, estimando-se 89% dos custos relacionados (Ensrud, 2013). Estudos revelam que em 2025, a incidência anual e custos relacionados a fraturas por fragilidade óssea aumentará em 50%, sendo esta condição consideravelmente maior em mulheres menopausadas, por possuírem cerca de 40 a 50% da massa óssea a menos até o final da vida (Compston, 2001; Ensrud, 2013).

A complicação mais temida da osteoporose é a fratura proximal de fêmur. Esta fratura resulta em 15% da mortalidade no primeiro ano pós-fratura comparado ao grupo não afetado da mesma idade (Parker *et al.*, 1995). Representada perda significativa da autonomia e cerca da metade dos pacientes torna-se incapaz de andar, com necessidades de cuidados domiciliar prolongado (Riggs *et al.*, 1995). O risco da fratura proximal de fêmur nas mulheres na pós-menopausa é de 14–17% e a incidência de aumenta exponencialmente com a idade (Eddy *et al.*, 1998). Os pacientes com fratura prévia são duas a cinco vezes mais susceptíveis a fraturas futuras do que indivíduos sem fraturas (Solomon *et al.*, 2003).

O tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais criados por meio do processo de regeneração, com a formação de novo tecido (Schenk, 1994). O processo do reparo é ativado pela liberação de fatores de crescimento e citocinas no local (Hollinger *et al.*, 1996). Quando ocorre lesão no osso provocada ou não, o perióstio, vasos na cortical, medula e tecidos circundantes são rompidos. Ocorre sangramento oriundo das margens do tecido ósseo lesado e dos tecidos moles vizinhos, formando-se hematoma ou coágulo sanguíneo dentro do canal medular, entre as extremidades da fratura óssea e o perióstio (Mourad, 1997). O coágulo que ocorre após a fratura ou defeitos ósseos criados como a exodontia consiste em extravasamento de eritrócitos, fibrina e plaquetas, que liberam fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), TGF- $\alpha$ , fatores quimiotáticos e

reguladores da atividade celular (Hollinger *et al.*, 1996). Simultaneamente à formação do coágulo, o tecido imediatamente adjacente se necrose estimulando intensa resposta inflamatória, caracterizada por vasodilatação, exsudação do plasma, leucócitos e células mesenquimais (Mourad, 1997). Para que o reparo se inicie, o coágulo sanguíneo, os restos celulares e da matriz são removidos pelos macrófagos, dando início ao processo do reparo ósseo (Junqueira e Carneiro, 2002).

A influência da deficiência estrogênica no processo do reparo ósseo alveolar foi investigada por Kawamoto *et al.* (2000) e Hsieh *et al.* (2003), os quais observaram que as alterações ósseas alveolares induzidas por oclusão traumática e após exodontia são agravadas pelas baixas concentrações plasmáticas do estrógeno. Luvizuto *et al.* (2011) também analisaram ação do hipoestrogenismo no reparo ósseo alveolar e constataram que a deficiência do estrógeno induz a osteoclastogênese no processo da regeneração óssea.

Walsh *et al.* (1997) analisaram as propriedades mecânicas do reparo de fraturas em fêmures de ratas OVX e controle, verificaram que, nos menores períodos de sacrifício (duas e quatro semanas), a ovariectomia alterou a reparação da fratura. Estudos realizados sobre a diferença do reparo ósseo entre indivíduos com e sem osteoporose, sugeriram que há redução na capacidade de remodelação e de reparação desse tecido em indivíduos com osteoporose (Marie *et al.*, 1989; Namkung *et al.*, 2001).

A terapia de reposição hormonal (TRH) tem sido utilizada como primeira opção para o tratamento do hipoestrogenismo em decorrência da menopausa. Porém o tratamento prolongado com TRH está relacionado ao aumento na incidência de câncer de mama e endométrio, assim como manifestações cardiovasculares, como tromboembolia e infarto (Consensus, 2001). Entre outros fármacos estudados na tentativa de minimizar os efeitos do hipoestrogenismo, as isoflavonas derivadas da soja, como a Gensiteína (Gen), modulador natural do receptor de estrógeno, tem sido estudado devido sua ligação conformacional com o receptor de estrógeno (Setchell, 2011). As isoflavonas derivadas da soja são fitoestrógenos ou fitohormônios que fazem parte do grupo de compostos não esteróides encontrados em diversos vegetais. Este possui anel fenólico em sua estrutura, responsável pela capacidade de

ligação aos receptores hormonais, podendo agir como agonistas ou antagonistas dos receptores dos estrógenos, dependendo do sítio de atuação (Alves *et al.*, 2002).

Recentes estudos epidemiológicos têm sugerido que a incidência de osteoporose pós-menopausa é menor na Ásia que no ocidente. Uma das possíveis explicações para esta diferença se baseia na elevada ingestão de produtos de soja, ricos em isoflavonas pelas mulheres asiáticas (Potter *et al.*, 1998). Anderson *et al.* (1998) e Potter *et al.* (1998), mostraram em estudos com animais que a dieta rica em extratos de soja aumentaram a massa óssea e densidade mineral óssea (DMO). Marini *et al.* (2007) concluíram que a dieta rica em Gen, cálcio e vitamina D3 é capaz de modular positivamente a remodelação óssea em mulheres na pós-menopausa.

Possíveis mecanismos têm sido sugeridos para explicar os efeitos das isoflavonas de soja no tecido ósseo, os quais podem ajudar a prevenir o desenvolvimento da osteoporose. Estudos prévios com animais, mostraram que o tratamento com Gen aumentou a DMO e melhorou desempenho biomecânico óssea em ratas ovariectomizadas (OVX) (Li *et al.*, 2011). O efeito bifásico da Gen no tecido ósseo de ratas OVXs foi investigado por Anderson *et al.* (1998), os quais encontraram resultados consistentes quanto a ação da Gen, mostrando ser tão eficaz quanto a ação do estrógeno, com efeito benéfico sob a DMO. Nakajima *et al.* (2015), associaram tratamentos combinados com dosagem de Gen e exercícios de resistência, verificando que essa associação tem efeitos benéficos, prevenindo a perda óssea, tendo melhor resultado do que seus ensaios separados. Miao (2011) demonstra que em ratas OVX, a Gen em diferentes doses (4.5, 9 e 18 mg/Kg) preserva a DMO e força óssea.

Considerando a menor concentração de estrógeno em organismos femininos menopausados, maior atividade osteoclástica sobre o tecido ósseo e as consequências de terapias substitutivas, propomos a análise da ação da Gen, um substrato natural, sobre o reparo do processo alveolar. Nossas hipóteses são: 1) a diminuição da concentração plasmática de estrógeno afeta o processo de reparo ósseo alveolar de ratas Wistar OVXs alterando a expressão de proteínas envolvidas na formação e reabsorção óssea; 2) o tratamento com Gen melhora aposição de tecido ósseo no alvéolo de ratas Wistar OVXs; 3) o

tratamento com Gen melhora a expressão de proteínas presentes no processo de reparo ósseo alveolar de ratas Wistar OVXs; 4) a diminuição da concentração plasmática de estrógeno afeta o processo de remodelação óssea no colo do fêmur de ratas Wistar OVXs alterando a qualidade óssea trabecular e cortical e 5) o tratamento com Gen proporciona melhora da qualidade óssea trabecular e cortical do fêmur de ratas Wistar OVXs através da análise de microtomografia óssea.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a atuação da Gen no processo de regeneração do osso alveolar e o processo de remodelação do colo do fêmur em ratas Wistar OVXs após extrações do incisivo central superior direito.

### **2.2. Objetivos específicos**

Testar as hipóteses de que, *in vivo*:

- A diminuição da concentração plasmática de estrógeno afeta o processo de reparo ósseo alveolar de ratas Wistar OVXs alterando a expressão de proteínas envolvidas na formação e reabsorção óssea;
- O tratamento com Gen melhora aposição de tecido ósseo no alvéolo de ratas Wistar OVXs utilizando o método de coloração hematoxilina e eosina (H&E);
- O tratamento com Gen melhora a expressão de proteínas presentes no processo de reparo ósseo alveolar de ratas Wistar OVXs, utilizando imunoistoquímica;
- A diminuição da concentração plasmática de estrógeno afeta o processo de remodelação óssea no colo do fêmur de ratas Wistar OVXs alterando a qualidade óssea trabecular e cortical;

- O tratamento com Gen proporciona melhora da qualidade óssea trabecular e cortical do fêmur de ratas Wistar OVXs através da análise de microtomografia óssea.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Animais

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, *campus* de Araçatuba (FOA:2014-00558).

Foram utilizadas 40 ratas da linhagem Wistar (6 meses), mantidas em gaiolas coletivas (4 animais/caixa) em ambiente controlado (temperatura em  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; ciclo de luz 12/12 h; umidade  $55 \pm 10\%$ ) e acesso livre à água e ração (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil/12-13g/kg cálcio). Os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos experimentais:

| GRUPO          | IDENTIFICAÇÃO | TRATAMENTO                                                                     |
|----------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grupo 1</b> | Sham/NaCl     | Animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses |
| <b>Grupo 2</b> | Sham/Gen      | Animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses  |
| <b>Grupo 3</b> | OVX/NaCl      | Animais submetidos a OVX que receberam NaCl durante 3 meses                    |
| <b>Grupo 4</b> | OVX/Gen       | Animais submetidos a OVX que receberam Gen durante 3 meses                     |

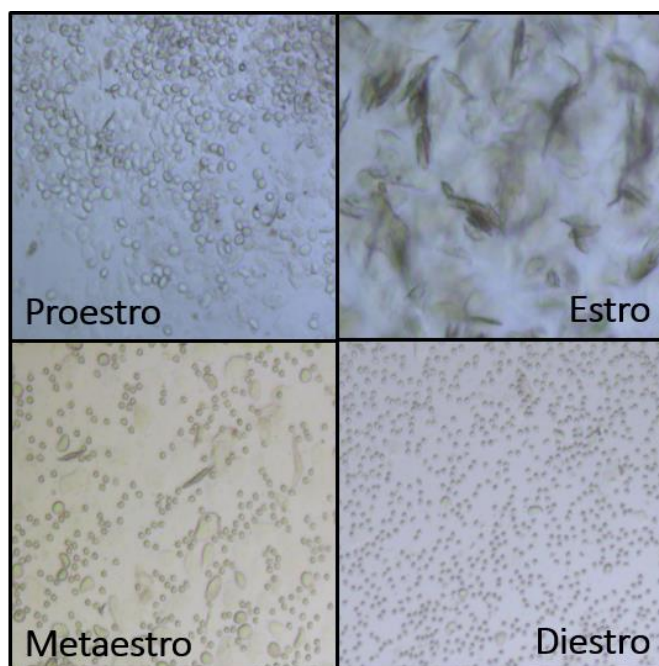
**Tabela 1.** Distribuição dos grupos experimentais e as soluções administradas.

#### 3.2. Ciclo estral

O esfregaço vaginal dos animais experimentais foi colhido durante 15 dias para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã e analisado a fresco ao microscópio óptico (Long e Evans, 1922). Foram aceitos no trabalho animais com ciclo estral regular. A figura 2 demonstra a coleta do esfregaço vaginal e a figura 3, as fases do ciclo estral.



**Figura 2.** Esfregaço vaginal coletado a fresco para verificação do ciclo estral das ratas dos grupos experimentais. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).



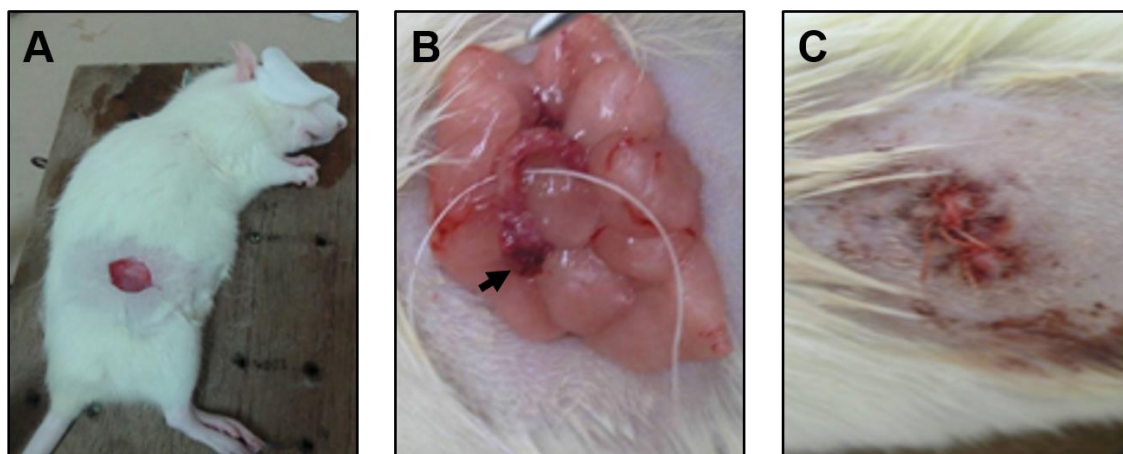
**Figura 3.** Fases do ciclo estral observadas a fresco em microscópio óptico. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

### 3.3. Ovariectomia

Após confirmação da regularidade do ciclo estral, os animais dos grupos OVX/NaCl e OVX/Gen foram OVXs e os animais dos grupos Sham/NaCl e Sham/Gen foram submetidos a cirurgia fictícia (Sham-ovariectomia), todos realizados em ratas de 6 meses. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados

utilizando instrumentais adequados e esterilizados. Para anestesia os animais foram pesados e foi utilizado solução de 13 mg/Kg de cloridrato xilazina (ANASEDAN®, i.p.) e 33 mg/Kg de cloridrato de quetamina (DOPALEN®, i.m.). Após anestesia, foi realizado tricotomia na região lateral do abdômen, abaixo do último arco costal e antissepsia com álcool iodado. Fez-se incisão longitudinal, em seguida foi feito divulsão do tecido subcutâneo e posterior incisão da musculatura (figura 4). O ovário foi exposto e removido, sendo este procedimento realizado bilateralmente. Ao fim dos procedimentos a camada muscular e pele foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon Johnson& Johnson), e por fim nova antissepsia com álcool iodado na região suturada. Para realização da cirurgia fictícia Sham de remoção de ovário, foi realizada a mesma técnica utilizada para os grupos OVX, com exposição dos ovários, posteriormente recolocados e a camada muscular e pele foram suturadas com fio de seda 4.0 (Ethicon Johnson& Johnson), e por fim nova antissepsia com álcool iodado na região suturada.

Após as cirurgias, todos os animais experimentais receberam dose profilática de antibiótico (0,1mL/kg, i.m.; Veterinary Pentabiotic; Fort Dodge Animal Health Ltd) e as ratas foram deixadas em caixas separadas nas primeiras 24 horas após a cirurgia.



**Figura 4.** Cirurgia de ovariectomia das ratas experimentais. (A) incisão abdominal lateral; (B) exposição do ovário para ovariectomia (seta sinalizando o ovário); (C) fechamento da incisão na região abdominal. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

### 3.4. Terapia Substitutiva

Dez dias após a realização das cirurgias Sham-OVX ou OVX, os animais experimentais receberam, 5 vezes por semana, por gavagem, 0,3 mL de NaCl (grupos Sham-NaCl e OVX-NaCl) ou tratamento com 5,76 mg/kg/dia de Gen (grupos Sham/Gen e OVX/Gen) (Miao, 2012), durante 90 dias. A figura 5 ilustra a administração das soluções por gavagem.



**Figura 5.** Administração das soluções por gavagem. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

### 3.5. Exodontia

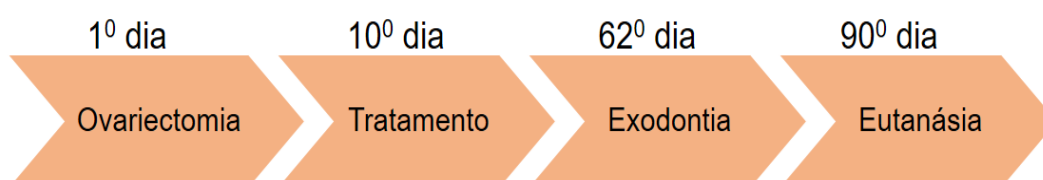
Após 62 dias de terapia substitutiva, tanto os animais OVXs, quanto os animais Sham, foi realizada a exodontia do incisivo central superior direito sob efeito de anestesia geral. Para anestesia foi utilizado solução de 13 mg/Kg de cloridrato xilazina (ANASEDAN ®, i.p.) e 33 mg/Kg de cloridrato de quetamina (DOPALEN ®, i.m.). Fez-se sindesmotomia, luxação e o dente foi removido, com instrumentos estéreis e adequados. Ao final do procedimento, a região do alvéolo foi suturada com ponto simples usando fio de seda nº 4.0. Todos os animais receberam dose de 0,1 mL de antibiótico (Veterinary Pentabiotic; Fort Dodge Animal Health Ltd) após a exodontia. A figura 6 mostra as etapas da exodontia.



**Figura 6.** Exodontia do incisivo central direito. Fonte: Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA-UNESP).

### 3.6. Coleta do material

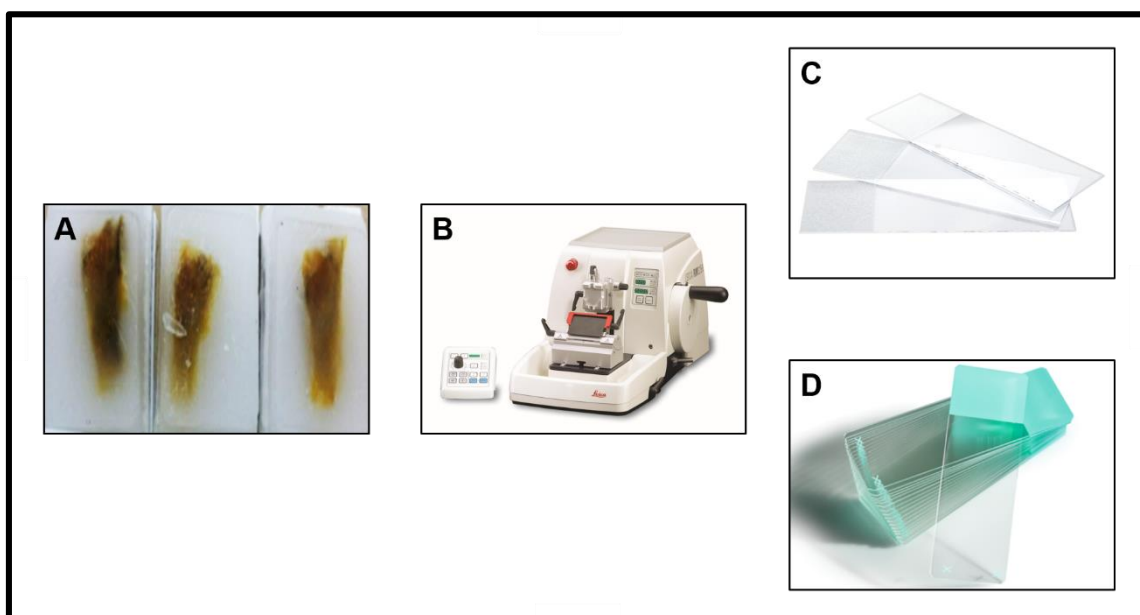
Após 90 dias de tratamento e 28 dias da exodontia, os animais experimentais foram pesados e anestesiados com solução de 13 mg/Kg de cloridrato xilazina (ANASEDAN®, i.p.) e 33 mg/Kg de cloridrato de quetamina (DOPALEN®, i.m.). Os animais foram eutanasiados por decapitação. Os úteros de todos os animais experimentais foram coletados e pesados. Posteriormente foi separado a mandíbula da maxila por corte nos músculos e ligamentos da articulação temporomandibular. A separação das hemi-maxilas direita e esquerda, foi realizada por meio de incisão sagital mediana, que acompanha a sutura inter-maxilar. O alvéolo direito foi obtido após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares, fixadas em formalina neutra 10% por 48 horas, em temperatura ambiente. Posteriormente lavadas em água corrente (12 horas) e descalcificadas em EDTA 10% por 90 dias. Os fêmures foram coletados e limpos removendo os tecidos moles e estocados em freezer -20° C. A figura 7 mostra a sequência dos eventos realizados.



**Figura 7.** Sequência de eventos do protocolo experimental

### 3.7. Processamento histológico das amostras

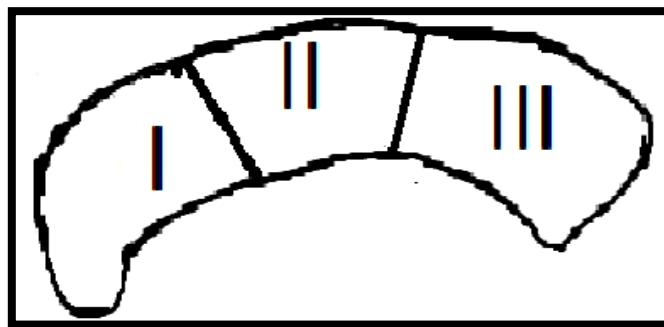
Após o processo da descalcificação, as peças foram lavadas em água corrente (12h), desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, usando o método de rotina. Em micrótomo *Leica* foram efetuados cortes semi-seriados com 3 micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura, orientando-os de forma a permitir cortes dos alvéolos no sentido vestibulo-lingual e paralelamente ao longo do eixo. Os cortes para análise histométrica foram colocados em lâminas foscas, lapidadas e posteriormente corados com H&E, e os cortes para análise imunoistoquímica das proteínas do metabolismo ósseo foram colocados em lâminas silanizadas (figura 8).



**Figura 8.** A: Etapas do processamento histológico. (A) peças emblocadas em parafina; (B) micrótomo para realização dos cortes semi-seriados; (C) lâminas foscas lapidadas para coloração H&E; (D) lâminas silanizadas para imunomarcação.

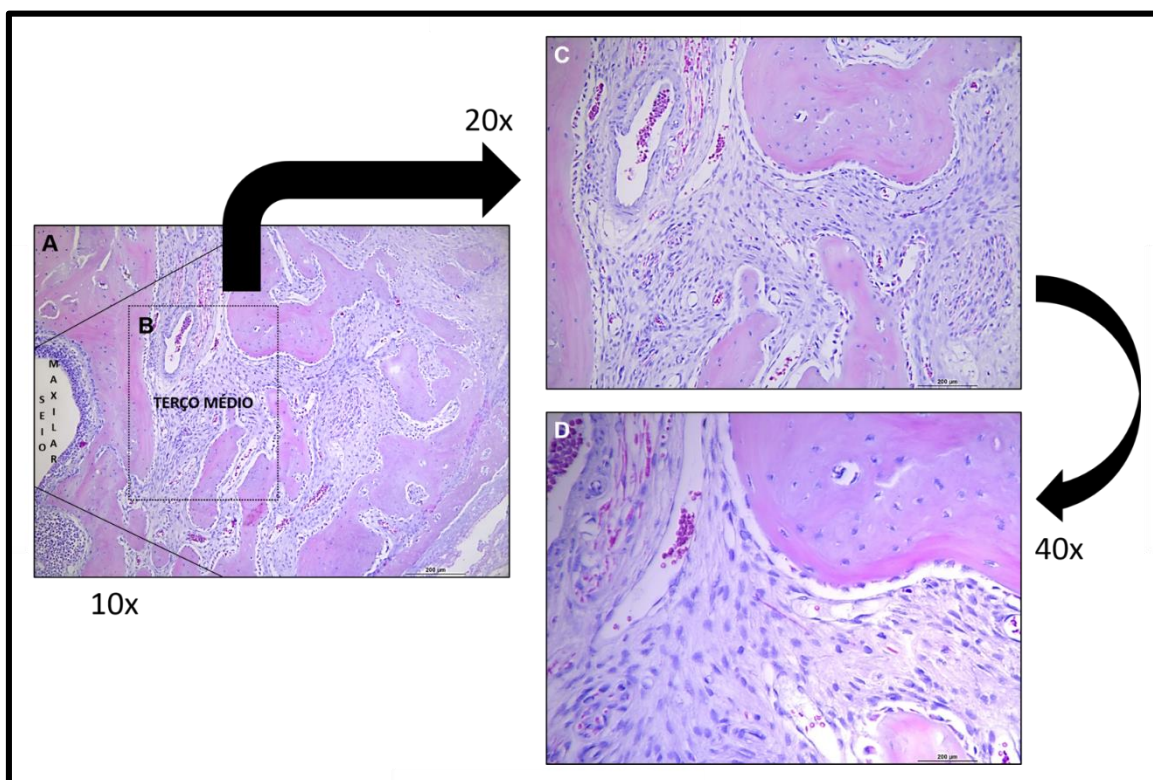
#### 3.7.1. Análise Histométrica do reparo ósseo alveolar

Para análise histométrica foi padronizada a mensuração do terço médio do processo alveolar para cada corte (figura 8). Foram analisados dois cortes por animal e os resultados expressos pela média.



**Figura 9.** Esquema do processo alveolar dividido nos terços apical (I), médio (II) e cervical (III).

A análise histométrica quantitativa da aposição do tecido ósseo alveolar foi realizada com auxílio do software *Leica Qwin Colour/RGB*. As imagens foram adquiridas no aumento de 10x, 20x e 40x (figura 10) em câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio óptico (Microscópio trinocular *Leica DM 4000B*) e conectada ao computador. Para quantificação do osso do terço médio alveolar foi utilizado programa de processamento de imagens baseado em Java (ImageJ, National Institutes of Health, versão 51.52.0.0) com 2.4 de distância em pixels, aumento de 40x. Os dados foram apresentados como percentual de área óssea.

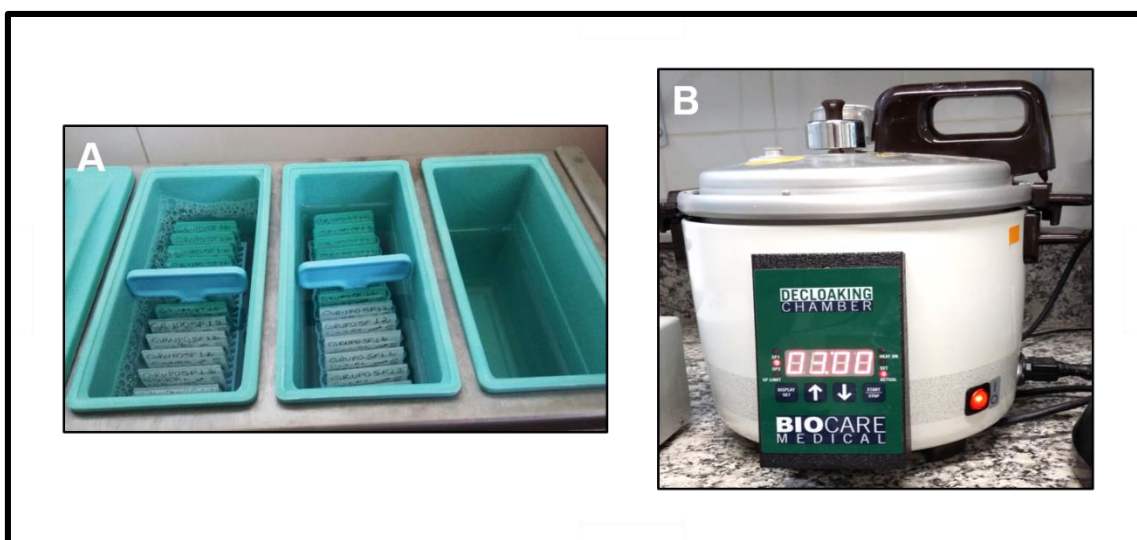


**Figura 10.** Esquema representativo da região de análise do terço médio alveolar das ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia. (A) Corte histológico (3  $\mu$ m) no aumento de 10x, com

representação do seio maxilar; (B) região de análise do terço médio alveolar; (C) região do terço médio alveolar no aumento de 20x; (D) região do terço médio alveolar no aumento de 40x.

### 3.7.2. Análise Imunoistoquímica do reparo ósseo alveolar

Os espécimes experimentais foram os mesmos utilizados para a realização da análise histométrica e o processamento laboratorial idêntico até o momento da obtenção dos cortes com 3  $\mu$ m de espessura. Posteriormente, os cortes foram submetidos à reações imunoistoquímicas através do método de detecção pela imunoperoxidase. As etapas do processamento imunoistoquímico incluem desparafinização, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 30%, recuperação antigênica com solução tampão fosfato citrato e bloqueio da biotina endógena utilizando leite desnatado. A figura 11 demonstra algumas etapas do processo de imunoistoquímica.



**Figura 11.** (A) Lavagem em PBS das lâminas silanizadas; (B) Panela de pressão utilizada para recuperação do antígeno em tampão citrato.

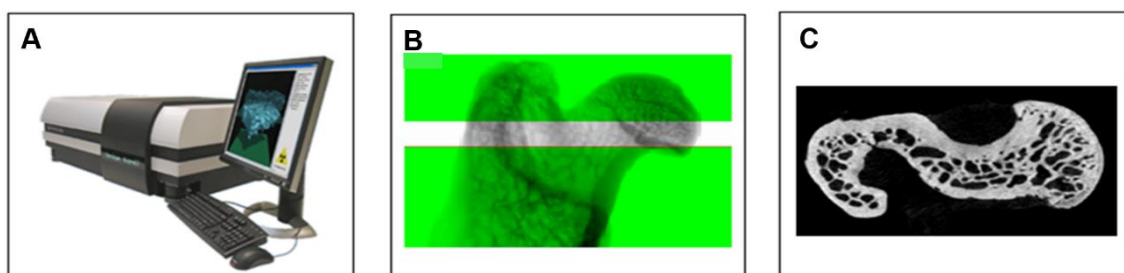
Na sequência, foi realizado protocolo de incubações, tendo como anticorpos primários: anti-OCN, produzido em cabras (goat anti osteocalcin polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, SC 18319) e anti-TRAP, produzido em cabras (goat anti trap polyclonal Santa Cruz Biotechnology, SC 30832). O anticorpo secundário utilizado foi o anticorpo biotinilado anticabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). A amplificação do sinal da reação foi realizada utilizando-se o kit Elite Avidina e Biotina e a reação foi revelada utilizando a

diaminobenzidina (DAB) como cromógeno. Na sequência, os cortes receberam contra coloração por hematoxilina de Harris (GARCIA *et al.* 2014). A imunomarcação foi definida como coloração acastanhada presente no citoplasma celular. As pontuações de imunomarcação para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) foram adaptadas de FARIA *et al.* (2008): escore 3 indica alto padrão, mais de 8 células imunorreativas (IR) por área; escore 2 indica padrão moderado, de 3 a 7 células IR por área; escore 1 indica baixo padrão, menos de 3 células IR por área; e escore 0 indica ausência de imunomarcação. Apenas as células TRAP-positivas multinucleadas perto da superfície óssea foram quantificadas. As pontuações de imunomarcação para osteocalcina (OCN) foram adaptadas de GARCIA *et al.* (2014): escore 3 indica alto padrão, aproximadamente 75% de células IR por área; escore 2 indica padrão moderado, cerca de 50% de células IR por área; escore 1 indica baixo padrão, cerca de 25% de células IR por área; e escore 0 indica ausência de imunomarcação. Estas pontuações de imunomarcação foram comparadas entre os grupos experimentais. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas em câmara úmida à temperatura de 25°C.

### **3.8. Análise de Microtomografia Óssea ( $\mu$ CT) do colo do fêmur**

A microtomografia óssea foi realizada com microtomógrafo computadorizado Skyscan 1272 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), utilizado para avaliação tridimensional não destrutiva da arquitetura óssea. A região de interesse de osso cortical e trabecular do colo do fêmur foi manualmente interpolada; foram realizados 150 slices (fatias) acima da placa de crescimento, com resolução de 6  $\mu$ m. O fêmur foi posicionado craniocaudalmente para a análise. Os parâmetros analisados para osso trabecular foram: BV/TV (% - volume ósseo/ tecido ósseo), Tb.Th (mm – espessura trabecular), Tb.N (1/mm – número de trabéculas), Tb.Sp (mm – separação trabecular), e do osso cortical: Ct.Ar ( $\text{mm}^2$ , área cortical), Ct.Th (mm, espessura cortical), porosidade total (%), pMOI ( $\text{mm}^4$ , média do momento polar de inércia). As análises foram realizadas pelo software de análise SkyScan (software SkyScan <sup>TM</sup> CT-analisador, a versão 1.6.0). As reconstruções em 3 dimensões foram realizadas utilizando-se o

software CTVox SkyScan. A figura 12 mostra o microtomógrafo (A) e a região de interesse analisada do colo do fêmur (B e C).



**Figura 12.** (A) Aparelho Skyscan 1272; (B) Região de interesse; (C) Região de interesse manualmente interpolada para osso trabecular e cortical.

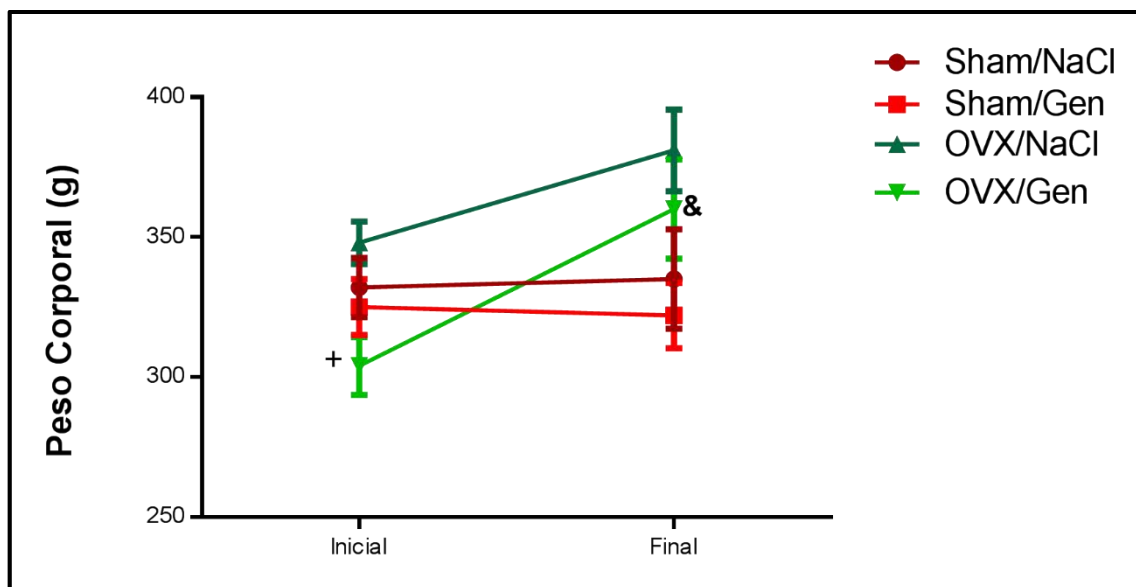
### 3.9. Análise Estatística:

Os resultados foram analisados através do *GraphPad Prism 6.0*, expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . As comparações múltiplas dos dados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) TWO-WAY seguida pelo pós-teste de Tukey. A análise imunoistoquímica foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* não paramétrico seguida por pós-teste de *Newman-Keuls*.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Peso corporal Inicial e Final

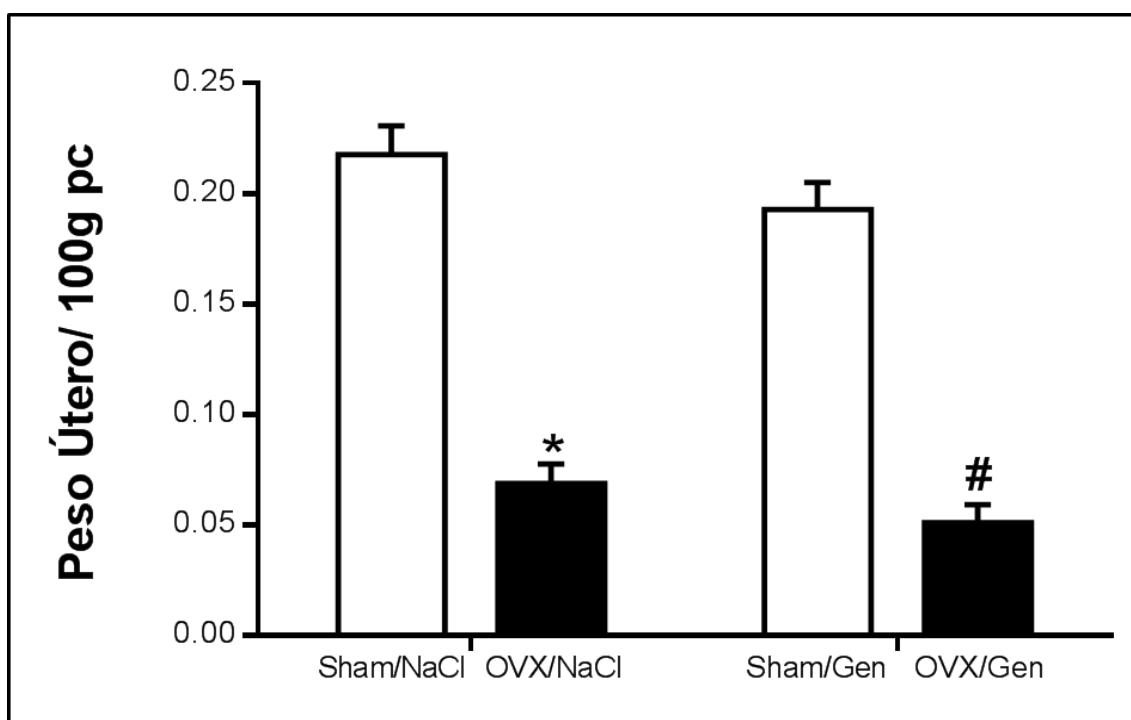
A figura 13 mostra o peso corporal inicial (ratas de 6 meses) e final dos animais experimentais (ratas de 9 meses). Os animais do grupo OVX/Gen apresentaram peso corporal final estatisticamente maior que o inicial, além de apresentarem peso corporal inicial menor quando comparados com o grupo OVX/NaCl ( $p = 0,0046$ ).



**Figura 13.** Peso corporal inicial (ratas de 6 meses), antes da OVX e final (ratas de 9 meses) de ratas Sham ou OVX que receberam Gen ou NaCl por 90 dias. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; + vs OVX/NaCl, & vs inicial.

## 4.2 Peso do útero

Com a finalidade de verificarmos se o tratamento com Gen exerceria alguma ação no útero dos animais experimentais, coletamos e pesamos o útero logo após a eutanásia dos animais, apresentado na figura 14. Os animais OVX/NaCl apresentaram peso uterino estatisticamente menor que os animais do grupo Sham/NaCl ( $p < 0,0001$ ) e os animais do grupo OVX/Gen apresentaram peso uterino menor em relação aos animais Sham/Gen ( $p < 0,0001$ ).



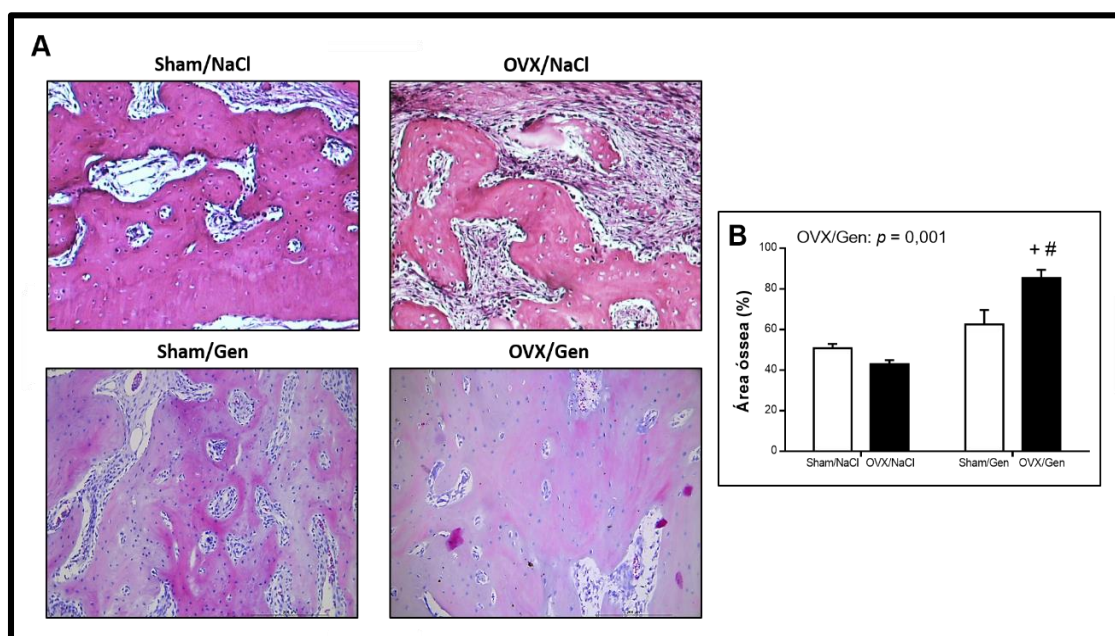
**Figura 14.** Peso do útero normalizado por 100 gramas de peso corporal (pc) de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; \* vs Sham/NaCl, # vs Sham/Gen.

### 4.3. Análise Histométrica do reparo ósseo alveolar

A análise da região do terço médio alveolar dos animais experimentais baseou-se na quantidade de tecido ósseo formado assim como na composição deste tecido, pela espessura e espaço trabecular. Os resultados expressos na figura 15 (A e B) evidenciaram maior formação óssea no grupo OVX/Gen quando comparado aos grupos OVX/NaCl ( $p < 0,0001$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0066$ ), notou-se aposição trabecular de forma regular no alvéolo, principalmente nas áreas centrais.

Nas análises dos grupos Sham/NaCl, OVX/NaCl e Sham/Gen não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, porém, no grupo Sham/NaCl notou-se áreas com trabéculas ósseas, deixando espaços ocupados por tecido conjuntivo com moderado número de fibroblastos. Também foram observadas ilhas de tecido ósseo neoformado caracterizadas por osso imaturo com grande quantidade de OBs ainda em processo de produção de matriz

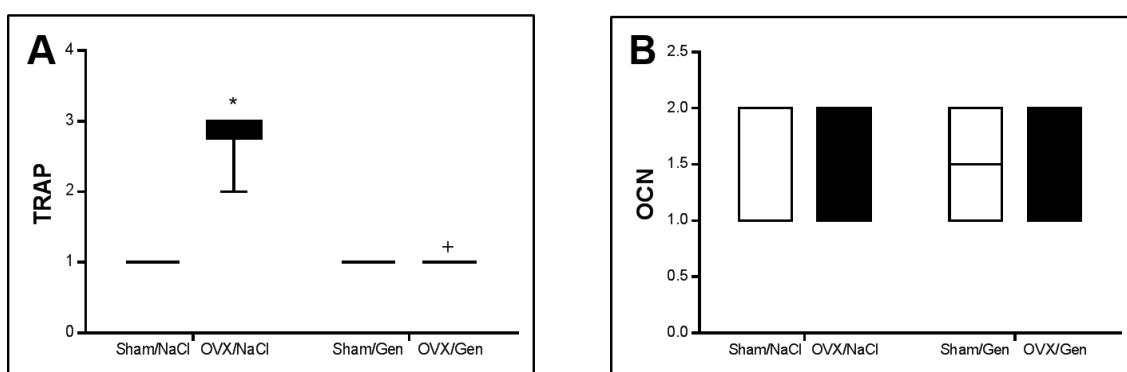
óssea; no grupo OVX/NaCl a análise histológica evidenciou tecido pouco organizado, com trabéculas delgadas, mais evidentes nas regiões centrais do alvéolo, com atraso no processo de reparo alveolar sendo bastante evidente a presença de tecido de granulação em sua maior área, com poucas ilhas de tecido ósseo neoformado, caracterizadas por osso imaturo com grande quantidade de OBs ainda em processo de produção de matriz óssea e pouco próxima uma das outras; e no grupo Sham/Gen notou-se maior quantidade do tecido neoformado preenchendo regularmente o espaço ao nível do terço médio e deposição de tecido mais organizado com espaços medulares menos extensos. A análise two-way ANOVA revelou interação ( $p = 0,0001$ ).



**Figura 15.** (A) Cortes histológicos (3µm) do terço médio alveolar de ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) ou Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. (B) Formação óssea no terço médio alveolar das ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias de administração da solução fisiologia (Sham/NaCl e OVX/NaCl) e Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; # vs Sham/Gen, + vs OVX/NaCl; OVX/GEN indica interação.

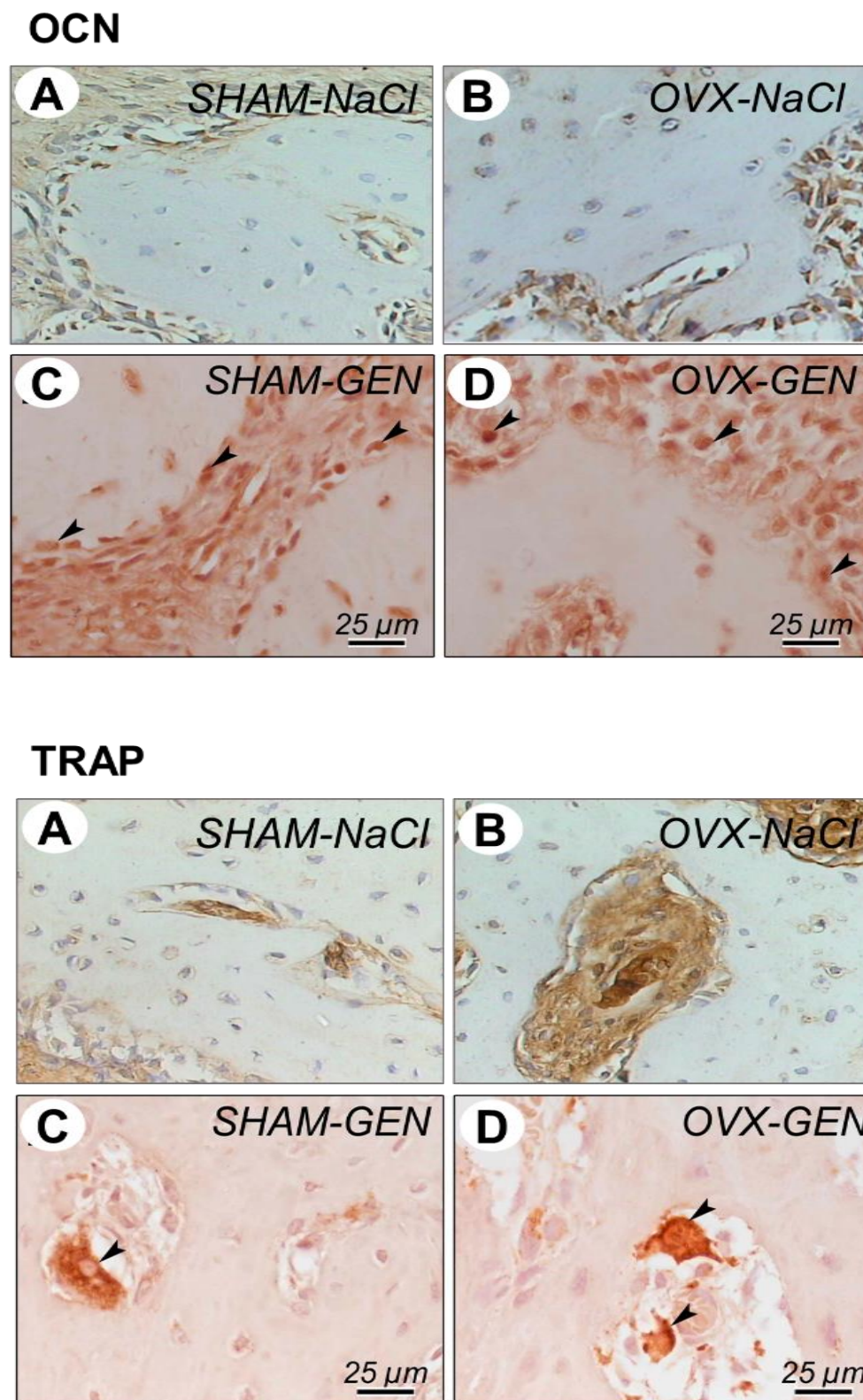
#### 4.4. Análise Imunoistoquímica do reparo ósseo alveolar

Nos animais do grupo OVX/NaCl houve aumento na imunomarcção TRAP quando comparados ao grupo Sham/NaCl ( $p = 0,0032$ ), enquanto que nos animais OVX/Gen, o tratamento com Gen resultou em diminuição estatisticamente significativa da expressão da proteína TRAP quando comparado ao grupo OVX/NaCl ( $p = 0,0032$ ) (figura 16 A). Os resultados obtidos não demonstraram diferença estatística para OCN nos grupos experimentais.



**Figura 16.** Gráficos que mostram o padrão de imunorreatividade para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e osteocalcina (OCN), de ratas Sham ou ovariectomizadas (OVX) de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) e Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses durante 3 meses; Sham/Gen = animais-submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; \* vs Sham/NaCl; + vs OVX/NaCl.

A figura 17, mostra as imunomarcações tanto para TRAP quanto OCN, padronizada como as colorações acastanhadas no citoplasma das células.

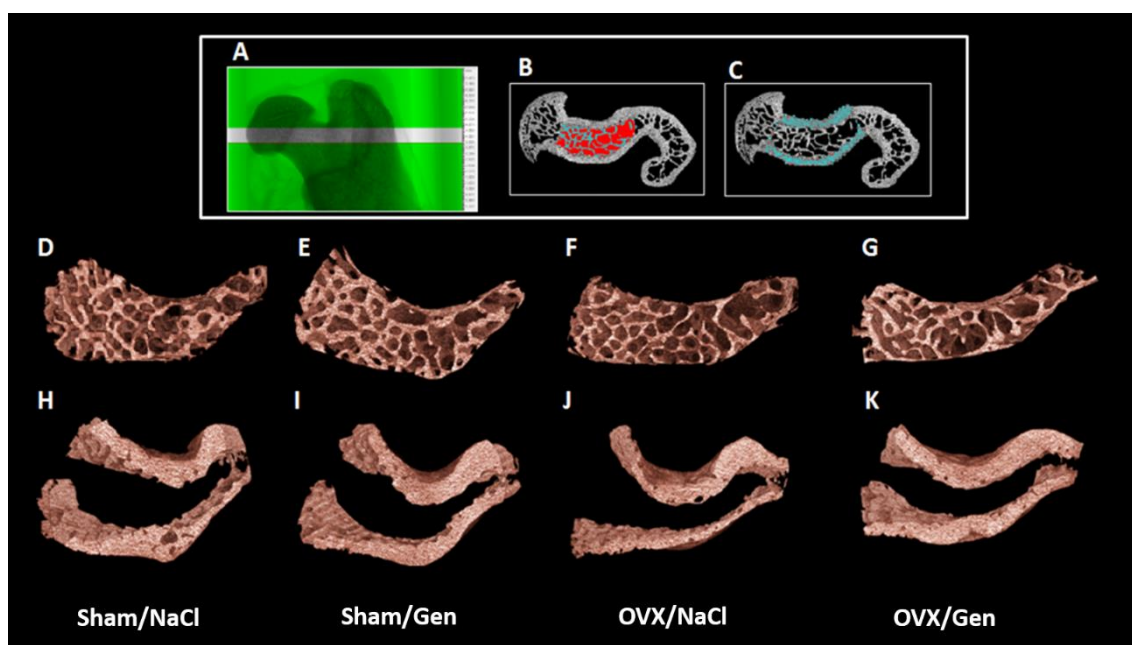


**Figura 17:** Cortes histológicos (3 $\mu$ m) do terço médio alveolar de ratas de 9 meses, 28 dias após exodontia e 90 dias da administração de NaCl (Sham/NaCl e OVX/NaCl) ou Gen (Sham/Gen e OVX/Gen) por gavagem, mostrando as imunomarcações para TRAP e OCN. Sham/NaCl (A) = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; OVX/NaCl (B) = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen (C) = animais

submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/Gen (D) = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses;

#### 4.5. Microtomografia óssea do colo do fêmur

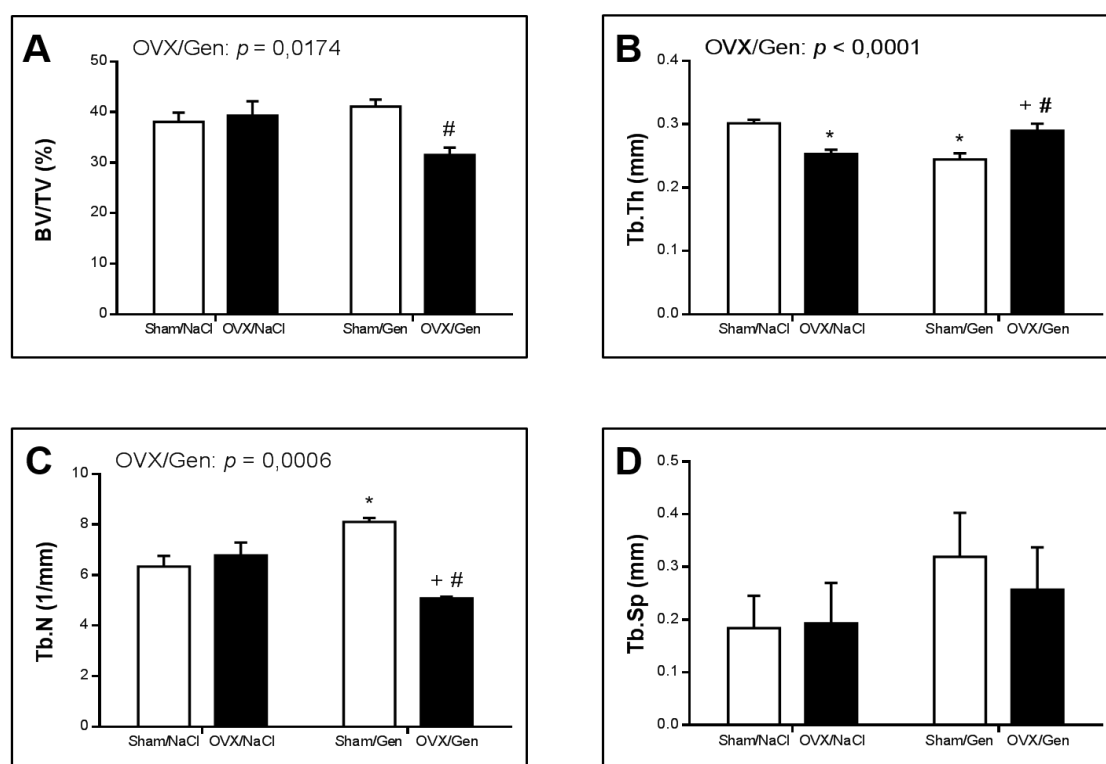
A figura 18 mostra a região de interesse (A) manualmente interpolada do osso trabecular (B) e cortical (C) do colo do fêmur, e as imagens representativas da reconstrução em 3D do trabeculado e cortical ósseos dos animais Sham/NaCl (D e H), Sham/Gen (E e I), OVX/NaCl (F e J) e OVX/Gen (G e K).



**Figura 18.** Reconstrução 3D do colo do fêmur de ratas de 9 meses Sham ou OVX, que receberam por 3 meses NaCl ou Gen por 3 meses. Seleção dos slices que compreendem o colo do fêmur (A), delimitação da região de interesse trabecular (B) e cortical (C). Reconstrução em 3D do trabeculado e cortical ósseos dos animais Sham/NaCl (D e H), Sham/Gen (E e I), OVX/NaCl (F e J) e OVX/Gen (G e K). Abreviaturas: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses.

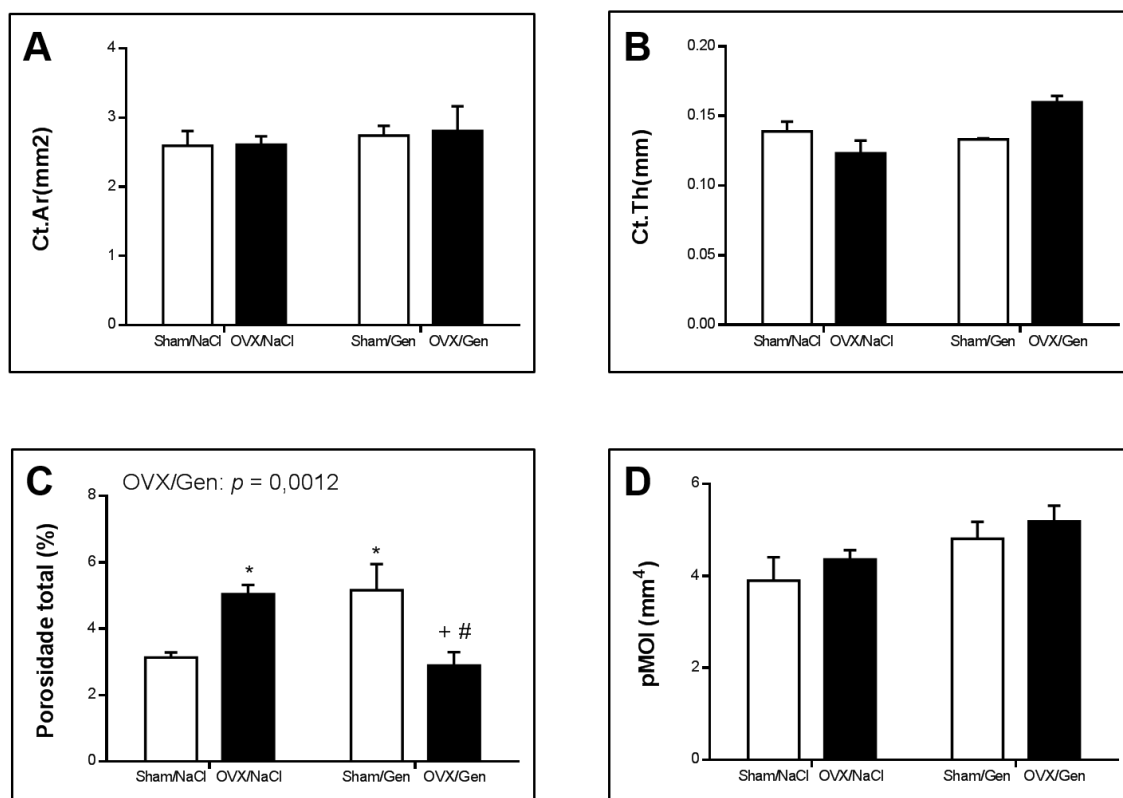
A figura 19 mostra a análise trabecular do colo do fêmur de animais de 9 meses Sham ou OVX que receberam NaCl ou Gen por 90 dias. Para o parâmetro Tb.Sp não houve diferença estatisticamente significantes, enquanto que para BV/TV, Tb.Th e Tb.N foram encontradas.

Em relação a BV/TV, o grupo OVX/Gen apresentou diminuição significativa neste parâmetro quando comparado aos animais Sham/Gen ( $p = 0,0214$ ). Na análise de Tb.Th, os grupos OVX/NaCl ( $p = 0,0094$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0025$ ) apresentaram menor Tb.Th quando comparado ao Sham/NaCl, e o grupo OVX/Gen apresentou Tb.Th estatisticamente maior que OVX/NaCl ( $p = 0,0390$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0099$ ). Para Tb.N, o grupo Sham/Gen apresentou Tb.N maior em relação ao Sham/NaCl ( $p = 0,0307$ ), e o grupo OVX/Gen apresentou Tb.N menor que OVX/NaCl ( $p = 0,0245$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0007$ ). A análise two-way ANOVA revelou interação nos parâmetros BV/TV ( $p = 0,0174$ ), Tb.Th ( $p < 0,0001$ ) e Tb.N ( $p = 0,0006$ ).



**Figura 19.** Análise da região do osso trabecular do colo do fêmur de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; BV/TV (%) - volume ósseo/ tecido ósseo), Tb.Th (mm – espessura trabecular), Tb.N (1/mm – número de trabéculas), Tb.Sp (mm – separação trabecular). \* vs Sham/NaCl; # vs Sham/Gen; + vs OVX/NaCl; OVX/Gen indica interação.

A figura 20 mostra a análise cortical do colo do fêmur de animais de 9 meses Sham ou OVX que receberam NaCl ou GEN por 90 dias. Para os parâmetros Ct.Ar, Ct.Th e pMOI não tiveram diferenças estatisticamente significantes, enquanto que para porosidade total foram encontradas. Os grupos OVX/NaCl ( $p = 0,0403$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0380$ ) apresentaram maior porosidade total quando comparados ao grupo Sham/NaCl, enquanto que para o grupo OVX/Gen este parâmetro foi menor quando comparado aos grupos OVX/NaCl ( $p = 0,0201$ ) e Sham/Gen ( $p = 0,0196$ ). A análise two-way ANOVA revelou interação na porosidade total ( $p = 0,0012$ ).



**Figura 20.** Análise do osso cortical do colo do fêmur de ratas wistar de 9 meses que receberam Gen ou NaCl por gavagem durante 3 meses. Abreviaturas e símbolos: Sham/NaCl = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam NaCl durante 3 meses; Sham/Gen = animais submetidos a cirurgia fictícia Sham que receberam Gen durante 3 meses; OVX/NaCl = animais submetidos a OVX e receberam NaCl durante 3 meses; OVX/Gen = animais submetidos a OVX e receberam Gen durante 3 meses; Ct.Ar (mm², área cortical), Ct.Th (mm, espessura cortical), porosidade total (%), pMOI (mm⁴, média do momento polar de inércia). \* vs Sham/NaCl; # vs Sham/Gen; + vs OVX/NaCl; OVX/Gen indica interação.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo revelam diferença estatisticamente significativa no reparo ósseo alveolar do terço médio dos animais OVX tratados com Gen. A administração da Gen auxilia no processo de reparo ósseo alveolar, com maior aposição do tecido ósseo trabecular no terço médio e redução estatisticamente significativa na imunomarcagem da TRAP. Analisando o colo do fêmur dos animais OVXs tratados com Gen, houve diminuição na porosidade cortical, e aumento estatisticamente significativo de Tb.Th, no entanto teve diminuição BV/TV e Tb.N.

A diminuição da secreção do estrógeno causada pela ovariectomia proporciona alteração nos parâmetros relacionados a reabsorção e formação do tecido ósseo alveolar, após a extração dentária. Portanto, ratas OVXs é modelo útil para análise do reparo ósseo alveolar, pelo fato de apresentar características semelhantes as desencadeadas pela menor concentração plasmática de estrógeno ocorridas em mulheres na pós-menopausa. Realizamos este estudo em ratas com 6 meses e em intenso período de atividade ovariana, cuja retirada das gônadas e a consequente menor concentração plasmática dos hormônios sexuais determina diminuição na formação e aumento na reabsorção óssea, sendo adequado para estudar questões relacionadas com a ocorrência de osteopenia e osteoporose na pós-menopausa (Kalu, 1991).

Ao analisar os dados referentes a massa corporal, verificou-se que houve diferença estatística significativa dos animais OVXs tratados com Gen. O aumento é considerado ser decorrente de decréscimo no metabolismo das ratas OVXs e não decorrente de aumento na ingestão do alimento (Deyhim *et al*, 2003). Nesse estudo, observamos que os animais OVXs apresentaram maiores médias do peso corporal que os grupos sham. Houve diferença estatística quando comparados os animais do grupo OVX/Gen no início do tratamento e no final. Podendo esta diferença ser justificada pela diminuição do metabolismo das ratas OVXs (Deyhim *et al*, 2003) e pela ação da Gen em induzir a diferenciação adipogênica, por regular positivamente a expressão de Ppar $\gamma$  (Zhang *et al*, 2016).

No presente estudo verificou-se que nos animais OVXs diminuiu o peso uterino estatisticamente significativo quando comparados com os animais sham. Ishimi *et al.* (2000) observaram que a administração de Gen a 0,7 mg/dia preveniu perda óssea trabecular, porém não provocou nenhum efeito hipertrófico no útero, enquanto a administração de Gen a 5 mg induziu hipertrofia uterina. Os autores sugeriram que existe diferença entre as doses de Gen que protegem a perda óssea e que induzem hipertrofia uterina. Neste estudo, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os animais OVX que receberam o tratamento com Gen (OVX/GEN) e os que receberam a solução de NaCl (OVX/NaCl).

A influência da menor concentração plasmática do estrógeno no reparo ósseo alveolar, tem sido bastante estudado e autores como Tanaka *et al* (2002), sugerem que há redução na formação óssea durante o hipoestrogenismo. Analisando nossos resultados, o efeito da menor concentração estrogênica sobre o volume trabecular do terço médio alveolar das ratas com 9 meses, não se observou diferenças estatisticamente significativa na formação óssea. Mas pode-se notar na análise histológica maior aposição do tecido ósseo no grupo sham.

A análise histométrica foi realizada no aumento de 40x com intuito de facilitar a visualização dos osteócitos e permitir avaliar a qualidade das trabéculas ósseas neoformadas. Nesse estudo pode-se verificar que a administração da Gen 5,76 mg, 5 vezes por semana favoreceu a formação do tecido ósseo, diminuiu os efeitos reabsortivos nos animais OVXs e observou-se maior aposição do tecido ósseo no terço médio alveolar quando comparado com os animais dos grupos OVX/NaCl e Sham/Gen. Esses resultados estão em consonância com estudos relatados na literatura, como por exemplo pesquisa realizada por Bhattarai *et al.* (2017) em que a administração da Gen inibiu a perda óssea alveolar mediada por degradação periodontal com diminuição na diferenciação dos OCs e a expressão de moléculas relacionadas a inflamação. Sukmanskii (2002), apresentou dados sobre a ação das isoflavonas no tecido ósseo mostrando seu efeito anabólico sobre o metabolismo do tecido ósseo, evitando a perda do osso em animais OVX, inibindo a reabsorção e aumento da formação óssea.

Outra análise importante para a compreensão da ação da Gen no processo de reparo alveolar é a imunomarcção da proteína TRAP, marcador de reabsorção. Os resultados indicam aumento no processo reabsortivo em ratas do grupo OVX/NaCl, uma vez que observou-se aumento estatisticamente significativo na imunomarcção da TRAP (Christenson, 1997). E quando comparados os animais do grupo OVX/Gen com os animais do grupo OVX/NaCl, a atividade da TRAP reduziu de forma estatisticamente significativa sugerindo que além de favorecer a formação óssea, a Gen inibiu a reabsorção nos animais com menor concentração plasmática de estrógeno.

A imunomarcção da OCN está relacionada com a qualidade óssea e a sua concentração no tecido ósseo se deve, possivelmente, a ação dos OBs maduros os quais secretam e determinam o processo de mineralização (ROBEY, 2003). No presente estudo não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais, na expressão da OCN realizada no tecido ósseo alveolar.

Luo, *et al*, (2012) mostraram que Gen regula a ativação induzida por IL-1 da Proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPKs) em células de ligamento periodontal humano através do receptor acoplado a proteína G 30. A destruição do tecido periodontal na periodontite é mediada por citocinas inflamatórias produzidas por tecido hospedeiro, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). A expressão do receptor 30 acoplado à proteína G (GPR30), também conhecido como receptor de estrogênio acoplado a proteína G em células do ligamento periodontal humana é regulada pela IL-1 $\beta$ . Em contraste, a Gen adia a ativação de MAPKs induzidas por IL-1 $\beta$ . Assim, a Gen desempenha função na regulação da ativação MAPK via GPR30.

Divergindo dos nossos resultados, Silveira *et al* (2007), analisaram os efeitos iniciais da ovariectomia e tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparo do osso alveolar e no útero de ratas. Nesse estudo utilizaram o estrato de soja a 40%, na concentração de 15 mg/kg/dia, por gavagem, iniciado o tratamento dois dias após a ovariectomia. 15 dias após a ovariectomia fez-se a exodontia e a eutanásia nos diferentes tempos após a exodontia (7, 21 e 45). E concluíram que, o tratamento com as isoflavonas de soja, na concentração utilizada não influenciou o processo do reparo e também não apresentou efeito uterotróficos. Porém não há relatos na literatura

demonstrando os efeitos benéficos da Gen no reparo do tecido alveolar. Nosso estudo evidencia maior formação óssea, possivelmente devido a diminuição da atividade osteoclástica.

Analisando o colo do fêmur, através da microtomografia ossea, o presente estudo demonstra que em ratas com 9 meses, OVXs desde os 6<sup>o</sup> meses de vida e que receberam Gen durante 90 dias, ocorreu diminuição da porosidade cortical, aumento da espessura das trabéculas, porém diminuição no volume ósseo e no número de trabéculas.

Muitas pesquisas indicam efeito positivo da Gen em humanos e em modelos animais, não apenas no tecido esquelético, mas também com efeito ansiolítico e antidepressivo, além de segurança cardiovascular e diminuição de risco ao desenvolvimento de câncer (Taylor, 2009). Pesquisadores tem discutido os efeitos benéficos da Gen na estrutura óssea de ratas OVXs. Miao (2012) demonstra que em ratas OVXs, a Gen em diferentes doses (4.5, 9 e 18 mg/Kg) preserva a densidade mineral e força óssea. Azboy (2016) afirma que a suplementação com Gen melhora as propriedades mecânicas ósseas. Zhou *et al.* (2013), sugeriram que a Gen pode modular significamente o nível de expressão gênica relacionada ao metabolismo ósseo do colo do fêmur de rato *in vitro*.

No entanto, Zhang *et al.* (2016), demonstraram que a suplementação com Gen induz a diferenciação adipogênica e suprime o potencial osteogênico de células estromais derivadas da medula óssea por regular positivamente a expressão de PPAR $\gamma$ . Turner (2013) mostra que os níveis séricos de Gen, semelhantes aos consumidos por mulheres com dieta alta de soja, são ineficazes na prevenção ou tratamento da perda óssea em modelos de ratas para osteoporose primária. Turner (2013), sugeriu que a Gen oral administrada como suplemento dietético em diferentes concentrações (485  $\mu$ g/dia e 9,07  $\mu$ g/dia) não influenciou nos efeitos da baixa concentração plasmática do estrógeno sobre a massa, arquitetura óssea, esponjosas e corticais. Cano, *et al* (2008) demonstraram que em ratas OVX, a suplementação com Gen não limitou a perda tibial de DMO e a deterioração da microestrutura óssea induzidas pela OVX, embora tenha apresentação pequenas alterações corticais.

## 6. CONCLUSÃO

A análise dos resultados, sob as condições experimentais utilizadas, possibilitou concluir que:

A) O efeito da ovariectomia não provocou alterações estatisticamente significantes na aposição do tecido ósseo alveolar porém os animais OVXs apresentaram aumento da imunomarcção de TRAP;

B) O tratamento com Gen, na concentração utilizada, influenciou no processo do reparo, pois desencadeou menor atividade osteoclástica, pela redução na marcação da TRAP e maior aposição óssea nos animais OVXs e tratadas com Gen;

C) A menor concentração plasmática de estrógeno propiciou a diminuição da espessura trabecular. No osso cortical, esses animais apresentaram aumento da porosidade cortical do colo do fêmur;

D) A administração da Gen nos animais OVXs proporcionou alteração da microarquitetura trabecular do colo do fêmur, com diminuição da porosidade cortical e aumento na espessura trabecular, no entanto diminuiu o número de trabéculas.

Os resultados obtidos evidenciam ação positiva da genisteína no processo de reparo ósseo alveolar bem como na remodelação do colo do fêmur de fêmeas ovariectomizadas. Todavia, há necessidade de mais estudos, utilizando as isoflavonas nas diferentes concentrações, análise de mais parâmetros relacionados à formação e remodelação de tecido ósseo e realizar ensaios separados e associados com outras terapias que apresentam ação no processo de remodelação e regeneração do tecido ósseo.

## REFERÊNCIAS

- Allen, M. J. "Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations." *Veterinary clinical Pathology* v.32,n.3,p.101-113,2003
- Andia, D. C., *et al.* "Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos." *Revista de Odontologia da UNESP* 35.2: 191-98, 2006.
- Anderson, J.J., *et al.* "Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model." *Proc Soc Exp Biol Med.*; 217 (3):345-50, 1998.
- Alves, D.L., *et al.* "Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal." São Paulo: Atheneu, 105p. 2002.
- Azboy, I., *et al.* "Biomechanical properties of osteoporotic rat femurs after different hormonal treatments: genistein, estradiol, and estradiol/progesterone." *SICOT-J* 2, 2016.
- Bandeira, F., *et al.* "Osteoporose." 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 390p,2000.
- Bhattarai, G., *et al.* "Anti-inflammatory, anti-osteoclastic, and antioxidant activities of genistein protect against alveolar bone loss and periodontal tissue degradation in a mouse model of periodontitis." *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017.
- Borelli, A. "Envelhecimento ósseo: osteoporose." In: Carvalho Filho ET, Papaléo Netto M. *Geriatrics: fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu;.p. 297-308, 1998.
- Bull, H., *et al.* "Demistified Acid phosphatases. *Mol Path.* p. 65-72, 1999.
- Burr, D. B., *et al.* "Bone microdamage and skeletal fragility in osteoporotic and stress fractures." *J Bone Miner Res*, v. 12, n. 1, p. 557-62, 1997.
- Cano, A., *et al.* "Comparative effects of 17 $\beta$ -estradiol, raloxifene and genistein on bone 3D microarchitecture and volumetric bone mineral density in the ovariectomized mice." *Osteoporosis international* 19.6: 793-800, 2008.
- Cesnjaj, M., *et al.* "Decrease osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats." *Acta Orthop Scand*, v. 62, n. 5, p. 471-5, 1991.
- Christenson, E. S., *et al.* "Osteoporosis management in post-menopausal women." *Minerva Ginecol.*, v. 64, n. 3, p. 181-194, Jun. 2012
- Clowes, J. A., *et al.* "The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis." *Immunol Rev* 208:207–227, 2005.

- Compston, J. "Bone quality: what is it and how is it measured?" *Arq Bras Endocrinol Metab* 50(4), 2006.
- Compston J.E. "Sex steroids and bone. *Physiol Rev.*" 81(1): 419-447, 2001 Jan.
- Consensus, N. I. H. "Development panel on osteoporosis: prevention, diagnosis and therapy." *J Am Med Assoc* 285.11, 2001.
- Cooper, C., *et al.* "Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures." *Osteoporos Int.*, v. 22, n. 5, p. 1277-1288, May 2011.
- Datta H.K., *et al.* "The cell biology of bone metabolism." *J Clin Pathol.*;61 (5):577-87, 2008.
- Demirtas, A.K., *et al.* "Effects of synthetic and plant-derived selective modulators of estrogen receptors on depression-like behavior of female rats." *Bull. Exp. Biol. Med.* 146, 73–76, 2008.
- Deyhim, *et al.* "The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats." *Nutrit Res.*; 23(1): 123-30, 2003 Jan.
- Eddy, D. M., *et al.* "Osteoporosis: Review of the evidence for prevention, diagnosis, and treatment and cost-effectiveness analysis." *Osteoporos Int* 1998;8(suppl. 4):1-88.
- Ensrud, K. E. "Epidemiology of fracture risk with advancing age." *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, v. 68, n. 10, p. 1236-1242, Oct. 2013
- Eshre Capri Workshop Group. "Bone fractures after menopause." *Hum. Reprod. Update*, v. 16, n. 6, p. 761-773, Nov/Dec. 2010.
- Eriksen, E. F., *et al.* "Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblas-like cells." *Science*, v. 241, p. 84-6, 1988.
- Faria, P.E.; *et al.* Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (4), p. 393–401, 2008.
- Fukata, M. V. S., *et al.* "Toll-like receptors (TLRs) and Nod-liketeceptors (NLRs) in inflammatory disorders." *Semin immunol* 21(4): 242-253, 2009.
- Garcia, V.G.; *et al.* Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats, *J. Periodontal Res.* 49 (5), p. 584–594, 2014.
- Glazier M.G., *et al.* "A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for tradicional estrogen replacement therapy." *Arch Intern Med.* 161(9): 1161-72 2001 May.

Granjeiro J.M., *et al.* "Effect of homologous series of n-alkyl sulfates and n-alkyl trimethylammoniumbromides on low molecular mass protein tyrosine phosphatase activity." *Mol Cell Biochem.* 265: 133-140, 2004.

Harms P.G., *et al.* "A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein." *J A P* 36:391-392, 1974.

Hsieh, Y. D., *et al.* "The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat." *Arch Oral Biol*, v. 40, n. 6, p. 529-31, 1995. São Paulo: Quintessence, cap. 7. p. 146-7, 1996.

Hollinger, J., *et al.* "The integrated processes of hard tissue regeneration with especial emphasis on fracture healing." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.

Hughes, D.E., *et al.* "Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-B." 2:1132-6; *Nature* 1996.

Hsu, W.L., *et al.* "Balance control in elderly people with osteoporosis." *J. Form Med Assoc* 113(6):334-339; 2014.

Ikeda, T., *et al.* "Expression profiles of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, receptor activator of nuclear  $\kappa$ B, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones." 16: 1416-25; *J Bone Miner Res* 2001.

Ishida, H., *et al.* "Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet." *Biological& Pharmaceutical Bulletin* 21(1):62-66, 1998.

Ishimi, Y., *et al.* "Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice." *Biochem Biophys Res Commun.* 274(3): 697-701; 2000 Aug.

Jama, N.H. "consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy." 285 785-95; 2001.

Jeon, Y. K. *et al.* "Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women." *Endocr. J.*, v. 58, n. 2, p. 87-93, 2011.

Jilka, R.L., *et al.* "Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by IL-6." 257:88-91; *Science* 1992.

Junqueira, J.C. *et al.* "Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats on blood cholesterol level." *J Oral Sci*, v. 44, n. 3/4, p. 117-24, 2002.

Kalu, D. N. "The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss." *Bone and mineral* 15.3: 175-191, 1991.

Kameda T., *et al.* "Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of bone resorbing osteoclast." 186:489-95; *J Exp Med* 1997.

Kanis, J. A., *et al.* "The diagnosis of osteoporosis." *J. Bone Miner. Res.*, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, Aug. 1994.

Katagiri, T., *et al.* "Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation." 8: 147-59; *Oral dis* 2002.

Katchburian, E., *et al.* "Histologia e embriologia oral. Texto-atlas-correlações clínicas." Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kalyvas, D. G., *et al.* "influence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on osseointegration." *J oral Sci* 50(3): 239-246; 2008.

Kawamoto, S., *et al.* "The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion." *J Oral Rehabil*, v. 27, n. 7, p. 587-94, 2000, 4 ed.

Komm, B. S., *et al.* "Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells." *Science*, v. 241, n. 4681, p. 81-3, 1988.

Lau, K.H.W., *et al.*, "osteoblastic tartrate-resistant acid phosphatase: its potencial role in the molecular mechanism of action of fluoride" *J Bone Miner Res.* v. 18 n. 10. P. 1897-00, 2003.

Lee, Y.B., *et al.* "Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats." *Biosci Bio technol Biochem*, 68(5):1040-5; 2004 May.

Lerner, U.H. "New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption." *Crit Rev Oral Biol Med*; 15: 64, 2004.

Li, Y.Q., *et al.* "Dose-dependent effects of genistein on bone homeostasis in rats' mandibular subchondral bone." *Acta Pharmacol Sin.* 2012 Jan; 33(1):66-74.

Lian, J.B., *et al.* "microRna control of bone formation an homeostasis." *Nature Reviews Endocrinology* 8.4: 212-227, 2012.

Long, J., "The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena." Berkeley: Univ. of California Press, 1922.

Luo, L.J., *et al.* "Genistein regulates the IL-1 beta induced activation of MAPKs in human periodontal ligament cells through G protein-coupled receptor 30." *Archives of biochemistry and biophysics* 522.1: 9-16, 2012.

Luvizuto, E.R., *et al.* "Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats." *Archives of oral biology* 56:984-990; 2011.

Marie, P.J. *et al.* "Osteocalcin and deoxyribonucleic acid synthesis in vitro and histomorphometric indices of bone formation in postmenopausal osteoporosis." *J Clin Endocrinol Metab*, v. 69, n. 2, p. 272-9, 1989.

Marini, H. *et al.* "Effects of the phytoestrogen genistein on bone metabolism in osteopenic postmenopausal women." *Ann Intern Med* 146.12: 839-847, 2007.

Marks S.C., *et al.* "Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton." *Am J Anat.*; 183:1-44, 1988.

Meikle, M. C., *et al.* "Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines." *J Cell Sci*, v. 103, p. 1093-9, 1992.

Miao, Q., *et al.* "The bone-protective effect of genistein in the animal model of bilateral ovariectomy: roles of phytoestrogens and PTH/PTHrP against postmenopausal osteoporosis." *International journal of molecular sciences* 13.1: 56-70, 2011.

Montagnani A. "Bone anabolics in osteoporosis: Actuality and perspectives." *World J Orthop* 5(3): 247-254; 2011.

Mourada, L. A. "Structure and function of the musculoskeletal system. In: McCANCE, K. L.; Huether, S. E. *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children.*" 3. ed. Saint Louis: Mosby, cap. 41, p. 1405-85, 1997.

Nakajima D., *et al.* "Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats" *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2001 Sep;20(5):285-91, 2015.

Namkung, M. H. *et al.* "Osteoporosis influences the early period of fracture in a rat osteoporotic model." *Bone*, v. 28, p. 80-6, 2001.

Nielsen, H.K. "Circadian and circatrigoneal changes in osteoblastic activity assessed by serum osteocalcin." *Danish Medical Bulletin*, v.41,p.216-227, 1994

Okamoto T., *et al.* "Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats." *Rev Fac Odontol Araçatuba* 2:153-69; 1973.

Parker, M.J., *et al.* "Prediction of rehabilitation after hip fracture." *Age Ageing* 1995;24(2):96-8. 3.

- Parker, M. J., *et al.* "Prediction of rehabilitation after hip fracture." *Age Ageing*;24(2):96-8, 1995.
- Pasco, J.A., *et al.* "J Bone and Min" *Res* 19(1):19-24; 2004.
- Pinheiro, M., *et al.* "Tratamento da osteoporose. "Sinopse de Reumatologia 6.4: 102-12, 2004
- Potter. S.M., *et al.* "Soy protein and isoflavones: Their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women." *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.68, n.6, p.1375S-1379S, Supplement, 1998.
- Riggs, B.L. "The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption." *J Clin Invest*; 106: 1203-4, 2000.
- Riggs, B.L., *et al.*, "The worldwide problem of osteoporosis: Insights afforded by epidemiology." *Bone* 1995;17 (suppl. 5):505-11. ,
- Robey, G. P. "Extracellular matrix and biomineralization of bone." *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*: 38-46, 2003.
- Sarma, U., *et al.* "Inhibition of bone resorption by 17 $\beta$ -estradiol in human bone marrow cultures." *J Cell Physiol*; 175:99-108, 1998.
- Schenk, R. K. "Bone regeneration: biologic basis. In: Buser. D.; Dahlin, C.; Schenk, R. K. *Guided bone regeneration in implant dentistry.*" Chicago: Quintessence Books, cap. 3, p. 49-100, 1994.
- Silveira, V.A.S. "Efeitos iniciais da ovariectomia e do tratamento com estrógeno e isoflavonas da soja, isolados e associados, na reparação óssea alveolar e no útero de ratas [tese]." São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.
- Simonet W.S., *et al.* "Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density." 89: 309-19, *Cell* 1997.
- Setchell, K.D.R. "Soy isoflavones - benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs)." *J Am Coll Nutr* 20:354-62, 2011.
- Schroder. K., *et al.* "the inflammasomes." *Cell* 140 (6): 821-832; 2010.
- Sodek, J., *et al.* "Molecular and cellular biology of alveolar bone." *Periodontology* 2000. 2000; 24:99-126. 9. Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res.*;26:213-7, 1991.
- Solomon, D.H., *et al.* "Underuse of Osteoporosis Medications in Elderly Patients with Fractures." *Am J Med* 2003; 115:398-400.

Steeve, K. T., *et al.* "IL-6, RANKL, TNF- $\alpha$ /IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology." *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 15, p. 49-60, 2004.

Suda, T., *et al.* "Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families." *Endocr rev*; 20: 345-57, 1999.

Sukmanskii, O. I. "Isoflavones and calcified tissues." *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* 33.2 (2002): 83-94.

Takayanagi, H. "Immunology and bone." *J Biochem*, 2013.

Tanaka, M., *et al.* "Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone." *Journal of periodontal research* 37.2: 161-165, 2002.

Taylor, C.K., *et al.* "The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: A review of in vitro, preclinical, and clinical studies." *Nutr. Rev.*, 67, 398–415, 2009.

Thiede, M.A., *et al.*, "Presence of messenger ribonucleic acid encoding osteocalcin, a marker of bone turnover, in bone marrow megacariócitos and peripheral blood platelets." *Endocrinology* v.135,p.929-937,1994

Turner, R.T., *et al.* "Skeletal effects of estrogen." *Endocrine Rev.*; 15(3): 275-300, 1994 June.

Turner, R. T., *et al.* "Genistein Delivered as a Once Daily Oral Supplement Had No Beneficial Effect on the Tibia in Rat Models for Postmenopausal Bone Loss." *Menopause* (New York, NY) 20.6: 677, 2013.

Walsh, W. R. *et al.* "Fracture healing in rat osteopenia model." *Clin Orthop*, v. 342, p. 218-27, 1997

Williams, C.L., *et al.* "Estrógenos e progestogênios." In: Goodman LS, Gilman A. *As bases farmacológica da terapêutica*. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill; 1996. Cap. 57, p. 1045-67.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of oestrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 2002, 288, 321–323.

Xing, *et al.* "Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells." *Biochemical and biophysical research communications* 328.3: 709-720, 2005.

Zhang, L. Y., *et al.* "Genistein induces adipogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells and suppresses their osteogenic potential by

upregulating PPAR $\gamma$ ." *Experimental and therapeutic medicine* 11.5 (2016): 1853-1858.

Zhao, R. "Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective." *Int J Med Sci* 9:825-32; 2012.

Zhou, J., *et al.* "Effect of genistein on rat femoral bone metabolic activity in vitro." *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica* 48.6: 960-964, 2013.

## ANEXO



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 Relatório Final do trabalho intitulado **"A ação da genisteína no reparo alveolar em ratas ovariectomizadas"**, Processo FOA nº 2014-00558, sob responsabilidade de Rita Cássia Menegati Dornelles e colaboração de Camila Tami Stringhetta Garcia, Gustavo Momesso, Fernanda Fernandes, Melise Jacon Perez Ueno, Ricardo de Paula de Almeida e Luiza Tavares foi aprovado pela CEUA em 15 de Março de 2017.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"The action of genistein in healing of ovariectomized rats"**, Process FOA nº 2014-00558, under the supervision of Rita Cássia Menegati Dornelles and collaboration of Camila Tami Stringhetta Garcia, Gustavo Momesso, Fernanda Fernandes, Melise Jacon Perez Ueno, Ricardo de Paula de Almeida and Luiza Tavares had its the Final Report approved by the CEUA on March 15, 2017.

**Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator