

ANA CLÁUDIA ROSSI

**Análise da regeneração óssea alveolar de ratas
ovariectomizadas tratadas com Raloxifeno e água fluoretada**

ARAÇATUBA – SP

2009



ANA CLAUDIA ROSSI

**Análise da regeneração óssea alveolar de ratas
ovariectomizadas tratadas com Raloxifeno e água fluoretada.**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA – SP

2009

Agradecimentos

Meu **agradecimento especial** à minha orientadora **Prof.^a Dr.^a Rita Cássia Menegati Dornelles** por acreditar em mim, por me ensinar seus conhecimentos científicos e experiências, obrigada pelas oportunidades únicas a mim oferecidas, pela alegria, entusiasmo, pela amizade e por ter me mostrado através da palavra e do exemplo que a busca do conhecimento deve ser contínua.

Aos professores doutores **Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, Mário Jefferson Quirino Louzada e Roelf Justino Cruz Rizzolo** por terem contribuído na idealização das análises desse projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo auxílio financeiro concedido a este projeto de pesquisa.

Ao Funcionário **Arnaldo César dos Santos** pelo cuidado aos animais do biotério do departamento de fisiologia e alegria de viver.

Aos companheiros do Laboratório de Fisiologia pela atenção e amizade em todos os momentos. Em especial à **Bruna Babler Igreja, Claudiel Batista de Oliveira e Luciana Roberta Barreto de Almeida**.

A todos os **docentes e funcionários do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pelo apoio, carinho e atenção em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora: **Prof.^a Dr.^a Roberta Okamoto e prof.^o Dr.^o Antônio Augusto Ferreira de Carvalho** por terem aceito avaliar este projeto de pesquisa.

Agradeço ao meu namorado **Alexandre Rodrigues Freire** pela paciência, pelo seu amor, por sempre estar disposto a me ajudar em qualquer situação e principalmente pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste projeto, meu eterno agradecimento!

Epígrafe

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

ROSSI, AC. **Análise da regeneração óssea alveolar de ratas ovariectomizadas tratadas com Raloxifeno e água fluoretada.** 2009. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2009.

RESUMO

A diminuição da concentração plasmática de estrógeno (E_2) altera a função de sistemas e resulta em perda significativa de massa óssea. A reposição hormonal mostra-se passível de prevenir a reabsorção óssea e reduzir o risco de fraturas. Além disso, estudos apontam a importância do fluoreto na composição e incorporação ao cálcio presente no osso, conferindo-lhe maior resistência. O objetivo deste trabalho foi verificar se a associação de fluoreto e raloxifeno alteraram o processo de regeneração alveolar e a qualidade óssea de ratas ovariectomizadas. Sete dias após a ovariectomia (OVX), ratas Wistar (6 m) receberam raloxifeno, através de gavagem, durante 6 meses. Durante este período os animais receberam, para beber, água destilada ou água destilada + NaF/20 ou 40 ppm. Vinte e oito dias antes do término do período determinado realizou-se a exodontia para análise da regeneração óssea alveolar dos animais experimentais. Após seis meses de tratamento, os animais foram anestesiados para coleta de sangue. Os fêmures e as maxilas foram removidos para a realização das análises biomecânica e do processo de regeneração óssea alveolar, respectivamente. Com o plasma, realizou-se dosagens de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina. A associação dessas terapias não ocasionou melhora na resistência mecânica dos grupos experimentais. Os resultados obtidos sugerem que a associação de terapia anabólica e anti-reabsortiva desencadeou alteração no metabolismo de fósforo e da fosfatase alcalina, porém não alterou a concentração plasmática de cálcio entre os grupos experimentais. Na regeneração óssea alveolar verificou-se melhoras qualitativa e quantitativa ao administra-se RLX associado a NaF 20 ppm.

Palavras-chave: Osteoporose. Raloxifeno. Água Fluoretada. Ovariectomia. Regeneração Óssea Alveolar. Menopausa.

ROSSI, AC. **Analysis of alveolar bone regeneration in ovariectomized rats treated with Raloxifene and fluoridated water.** 2009. 34 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2009.

Abstract

Decreased plasma concentration of estrogen (E_2) alters the function of systems and results in significant loss of bone mass. The hormone replacement seems to be able to prevent bone resorption and reduce the risk of fractures. Furthermore, studies indicate the importance of fluoride in the composition and incorporation of the calcium present in bone, giving it greater resistance. This research established whether the combination of fluoride and raloxifene (selective modulator of estrogen receptors) improve bone quality in ovariectomized rats. Seven days after ovariectomy (OVX), Wistar rats (6 m) received raloxifene (1 mg / kg bw / day) to gavage for 6 months. During this period the rats drank distilled water and distilled water + NaF/20 or 40 ppm. Twenty eight days before the specified period, the tooth extraction was performed to analyze the process of alveolar bone regeneration in animals subjected to different treatments. After six months of treatment, animals were anesthetized for blood collection. Femurs and the jaws were removed for analysis during biomechanics and the process of alveolar bone regeneration, respectively. With plasma, there was total serum calcium, phosphorus and alkaline phosphatase. The combination of these therapies didn't result in improvement in mechanical strength of experimental groups. The results suggest that the association of anabolic therapy and antiresorptive triggered changes in the metabolism of phosphorus and alkaline phosphatase, but didn't alter the plasma calcium concentration between experimental groups. Alveolar bone regeneration was found qualitative and quantitative improvements to administrative RLX is associated with NaF 20 ppm.

Keywords: Osteoporosis. Raloxifene. Fluoridated Water. Ovariectomy. Alveolar Bone Regeneration. Menopause.

Lista de Figuras

Figura 1	12
Figura 2	13
Figura 3	15
Figura 4	16
Figura 5	17
Figura 6	18
Figura 7	19
Figura 8	20

Lista de Abreviaturas

DH₂O = Água Destilada

EDTA = Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

HE = Hematoxilina e Eosina

NaF = Fluoreto de Sódio

OVX = Ovariectomia

ppm = partes por milhão

RLX = Raloxifeno

SERM = Modulador Seletivo do Receptor de Estrógeno

SUMARIO

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS E METODOLOGIA	7
RESULTADOS	13
DISCUSSÃO	20
CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO	34

INTRODUÇÃO

A microarquitetura óssea se organiza de modo a suportar os estresses mecânicos gerados pelas atividades normais do ser humano. Essa relação estrutura/função e a manutenção da homeostase mineral conduzem ao processo de formação e reabsorção do tecido ósseo, que perdura por toda a vida do indivíduo, denominado remodelação óssea (EINHORN, 1996). É estimado que, no tecido ósseo de adultos, aproximadamente 25% do osso trabecular e 3% do osso cortical são renovados anualmente (DEMPSTER, 1995). A remodelação óssea é um processo contínuo, que possibilita a substituição de osso envelhecido e danificado por tecido novo. Este processo contínuo é de tal precisão, que a partir da aquisição do pico de massa óssea, esta se mantém constante até a instalação da falência gonadal. O remodelamento ocorre simultaneamente em vários locais do esqueleto e é caracterizado por fase inicial de reabsorção óssea, realizada pelos osteoclastos, seguida de formação de osso novo pelos osteoblastos, adicionando tecido ósseo ou removendo osso redundante de acordo com as exigências das cargas (MANOLAGAS, 1995).

O processo de remodelação óssea é altamente regulado por fatores sistêmicos e locais. Os hormônios reguladores de cálcio, paratormônio, 1,25-dihidroxitamina D e calcitonina constituem fatores sistêmicos de relevância para o metabolismo ósseo. Outros hormônios que não participam do metabolismo do cálcio no organismo podem exercer efeitos importantes sobre o esqueleto, dentre eles, hormônio do crescimento, glicocorticóides e hormônios tireoidianos. Contudo, o hormônio mais importante na manutenção do *turnover* ósseo normal é o estrógeno. A deficiência estrogênica conduz aumento na remodelação óssea com reabsorção excedendo a formação, diminuindo a massa óssea, como observado em mulheres pós-menopausadas (HARDY, OSIS e MARTINEZ, 2002).

A osteoporose é uma patologia óssea que se caracteriza pela perda de massa óssea e pelo comprometimento da microarquitetura do tecido ósseo, conduzindo à fragilidade esquelética e conseqüentemente ao aumento do risco de fraturas (FALONI e CERRI, 2007). Em todo o mundo, aproximadamente 200 milhões de mulheres têm osteoporose. Após a menopausa, devido à redução dos estrógenos, algumas mulheres passam a perder massa óssea acima de 1% ao ano, sendo que algumas chegam a perder 5% e, no final de 5 anos, estão com perda superior a 25%, caracterizando a osteoporose pós-menopausa (RUSSO, 2001).

Os efeitos dessa doença são maiores nos ossos longos, como o fêmur, ou nos ossos da coluna vertebral. Apesar disso, estudos têm demonstrado que, diante da deficiência estrogênica, existe relação entre perda óssea sistêmica e perda óssea nos maxilares (RUSSO, 2001). Grodstein e colaboradores (1996) descrevem os sinais de osteoporose detectados na região do viscerocrânio, caracterizados pela diminuição da densidade mineral óssea da mandíbula e redução da espessura da sua porção cortical, severa reabsorção do rebordo residual, extensa reabsorção óssea alveolar pós-exodontia, redução do número de trabéculas ósseas e conseqüentemente do volume ósseo na região interradicular, além de aumento do número de dentes perdidos.

Binte e colaboradores (2007) relatam que em estudos *in vivo* da influência do estrógeno sobre o osso alveolar, observa-se perda de massa óssea no septo alveolar interradicular de molares de ratas ovariectomizadas. Por outro lado, mediante a terapia de reposição estrogênica as perdas do osso alveolar propriamente dito bem como do processo alveolar são prevenidas (DUARTE et al., 2006). Em osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno, observa-se diminuição do número de osteoclastos; além disto, os osteoclastos exibem características típicas de apoptose (FALONI et al, 2007). Portanto, em ratas tratadas com estrógeno, a apoptose deve ser responsável, pelo menos em parte, pela redução do número de osteoclastos e conseqüentemente pela diminuição da reabsorção óssea.

O processo de reparo alveolar é modelo interessante para estudar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente. Os eventos histológicos que ocorrem no processo de reparo alveolar foram investigados em várias espécies animais, assim como em humanos. Esses estudos utilizaram diferentes técnicas como fluorescência microscópica, autoradiografias, histoquímica e técnica histológica (OKAMOTO, 1973; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999) e mostraram que o processo de reparação alveolar ocorre de forma dinâmica, e envolve várias etapas celulares, iniciando-se pela proliferação fibroblástica, principalmente, a partir do ligamento periodontal remanescente, originando tecido conectivo sobre o qual ocorre a deposição de cálcio, levando à formação de trabéculas ósseas, que preencherão o alvéolo. No entanto, só é considerado completo quando o alvéolo encontra-se totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar adjacente remodelada, o que ocorre, em ratos, aos 28 dias pós-exodônticos e aos 64 dias em humanos (JOHANSEN, 1970).

Diversas drogas têm sido estudadas como possíveis agentes terapêuticos para osteoporose. A eficácia da terapêutica de reposição hormonal é bem estabelecida, já que reduz os sintomas da menopausa, inclusive prevenindo doenças cardiovasculares. Contudo, efeitos colaterais como ganho de peso e risco de carcinoma de mama e de endométrio são preocupantes, levando ao seu desuso (GIACOMINI e MELLA, 2006).

Os moduladores seletivos do receptor de estrógeno (SERMs) constituem classe de moléculas não hormonais que se ligam a receptores de estrógeno e podem funcionar como agonistas ou antagonistas do estrógeno na dependência do tecido-alvo. Os receptores de estrógeno são distribuídos e encontrados no sistema nervoso central, no coração, no sangue, no útero, na glândula mamária, na bexiga, no ovário, no intestino, na próstata e no osso. O Raloxifeno (RLX), derivado benzotiofênico classificado como modulador seletivo do receptor de

estrógeno de segunda geração, mimetiza os efeitos benéficos do estrógeno sem estimular tecidos como mama e endométrio. O RLX é absorvido no trato gastrointestinal e sofre metabolização de primeira passagem no fígado. É amplamente distribuído nos tecidos e convertido em metabólito ativo no fígado, pulmões, ossos, baço, útero e rins. Sua meia-vida é de 32 horas, sendo eliminado, principalmente, nas fezes (RANG, DALE e RITTER, 2007).

O mecanismo de ação molecular do RLX envolve afinidade de alta ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos resposta do DNA, já tendo sido descritos sítios de ligação do DNA, elementos resposta específicos para o RLX e distintos do estrógeno (RAMALHO et al., 2000). O receptor de estrógeno possui múltiplas funções ativadoras transcricionais (sítios AF-1 e AF-2) que contribuem para alguns dos efeitos seletivos do RLX. Também, diferentes conformações do receptor induzidas pelos ligantes podem ser responsáveis pelo amplo efeito farmacológico dos SERMs (BRYANT & DERE, 1998).

Estrógeno e RLX podem ativar a transcrição de genes que codificam **TGF- β** e **que juntamente com outras citocinas induzem a produção de** osteoblastos e inibem a atividade e/ou a vida média dos osteoclastos. A habilidade do RLX de provocar resposta do tecido-seletivo parece estar relacionada com a diversidade de proteínas associadas ao receptor nos tecidos com a distribuição diferente dos subtipos do receptor de estrógeno (alfa e beta). O receptor alfa predomina nos órgãos reprodutores (mama e útero), enquanto que o receptor beta predomina no osso e sistema cardiovascular. Alguns estudos sugerem que o RLX é capaz de estimular as vias estrogênicas através do receptor beta, mas não é capaz de ativar via receptor alfa, podendo este ser um dos mecanismos pelos quais este fármaco exerce ação diferencial nos tecidos (DIEZ-PEREZ, 2006).

Estudos histomorfométricos no osso confirmaram que RLX previne reabsorção do osso trabecular após ooforectomia de maneira similar ao

estrógeno. Além disso, o RLX tem atividade antiproliferativa na mama, não induz mastalgia e tem sido demonstrada a redução de incidência de novos casos de câncer de mama em mulheres que utilizam este fármaco em grandes estudos clínicos para osteoporose (LOPES-COSTA et. al., 2007). No útero, o RLX não estimula o endométrio e não aumenta a incidência de sangramento vaginal ou carcinoma endometrial (KAYATH, 1999).

O flúor tem sido investigado como agente terapêutico da osteoporose. O flúor é altamente reativo e está presente na água sob a forma de sais de sódio e potássio, sendo que sua concentração varia de acordo com a localização geográfica. No início da década de 60, o flúor foi administrado a pacientes com osteoporose e demonstrou aumentar a retenção de cálcio nestes. Em humanos, 50% do flúor absorvido, é excretado na urina, do percentual remanescente, 99% é seqüestrado pelo esqueleto e pelos dentes (MCDOWELL, 1992).

O flúor desloca os íons hidroxila (OH^-) da apatita óssea, formando fluorapatita. Este processo resulta em fase mineral de maior cristalinidade e diminuição da solubilidade e reatividade química. Grynps e Cheng (1988), analisando a dissolução dos ossos de ratos tratados com dieta normal e dieta contendo altas quantidades de flúor constataram que a incorporação de flúor ao tecido ósseo reduz a solubilidade dos ossos em soluções ácidas. O flúor apresenta também ação mitogênica promovendo aumento da proliferação e diferenciação de células precursoras dos osteoblastos. Zhang e colaboradores (2000) investigaram o efeito do fluoreto de sódio na dose de 1,0 mg de NaF/Kg de peso corporal sobre os parâmetros histomorfométricos da tíbia e vértebras de ratas ovariectomizadas. Tais autores demonstraram efeito protetor do flúor contra a perda de massa óssea. Trabalho realizado pelo grupo de Rubin (2002) afirma que o fluoreto de sódio estimula diretamente as células osteoblásticas para formar novo osso, elevando a deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos em cada ciclo de remodelação, enquanto apresenta pouco efeito nos osteoclastos.

Recentemente, o flúor está sendo associado a agentes anti-reabsortivos. Durante 96 semanas, o flúor foi administrado simultaneamente com terapia hormonal substitutiva em mulheres pós-menopausadas, observando-se aumento de 11,8% na densidade mineral óssea das vértebras, porcentagem maior que somente a administração do agente anti-reabsortivo (ALEXANDERSEN, 1999). O fluoreto de sódio, portanto, possui o potencial de ser agente eficaz no tratamento da osteoporose. Quando administrado em baixas doses, único ou associado com agente anti-reabsortivo, resulta em elevação da densidade mineral óssea. Além disso, o flúor apresenta a vantagem de ser menos dispendioso em relação a outros agentes anabólicos (RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

Turner e colaboradores (2001) demonstram que concentrações altas de flúor parecem provocar não-pareamento da mineralização óssea, sendo esse a causa primária da diminuição da força mecânica dos ossos analisados. Reid e colaboradores (2007) concluíram que o fluoreto de sódio produz aumento substancial na densidade mineral óssea, porém interfere na mineralização do osso, o que indica a necessidade da realização de estudos mais abrangentes a fim de definir a dose exata que deverá ser administrada para se alcançar com satisfação o efeito anabólico do íon flúor sobre o tecido ósseo e a sua eficácia no tratamento da osteoporose.

O avanço na busca de conhecimentos a cerca da prevenção e do tratamento da osteoporose está relacionado com a descoberta de fármacos que visam funcionar como alternativa à terapia hormonal estrogênica e compensarem as desvantagens dessa terapêutica. Fármacos como o RLX demonstrou ser eficaz em melhorar a qualidade e quantidade de massa óssea, sem causar efeitos colaterais malignos como os carcinomas de mama e útero. Em vários estudos, o fluoreto de sódio apresentou-se como agente terapêutico eficaz no combate às fraturas, conseqüentes da osteoporose.

OBJETIVOS

- Analisar o processo de regeneração óssea alveolar em ratas ovariectomizadas pré-tratadas com RLX associado ou não a fluoreto de sódio.
- Analisar e comparar as concentrações dos marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo entre os grupos experimentais.
- Avaliar a resitência óssea entre ratas ovariectomizadas pré-tratadas com RLX associado ou não a fluoreto de sódio.

METODOLOGIA

Animais:

Para realização deste trabalho, foram utilizadas 30 ratas da linhagem Wistar (6 m), mantidas em gaiolas coletivas (cinco animais/caixa; n= 10/ grupo) em ambiente com temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo de luz controlada (12/12 h) e acesso livre à água e ração.

O protocolo experimental (N.º 2007- 004020) do presente trabalho foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia da UNESP, *campus* de Araçatuba.

Ciclo estral:

O esfregaço vaginal de todos os animais foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9h da manhã, segundo a técnica de Long & Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico, durante 15 dias. Somente foram aceitos no trabalho animais que apresentam ciclo estral regular.

Ovariectomia:

A ovariectomia (OVX) foi realizada, nas ratas em metaestro, através de incisões laterais e exposição das porções distais do útero para a remoção dos ovários, sob anestesia com cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge/ 50 mg/Kg p.c., i.p.) e xilazina (Coopazine - Coopers Brasil Ltda/25 mg/Kg p.c., i.p.). Após a cirurgia os animais receberam dose profilática de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, 0,2 mL/animal, i.m.).

Terapia Substitutiva e Ingestão de Água Fluoretada:

Após 7 dias da OVX e durante 180 dias, os animais receberam água destilada (DH₂O-grupos 1 e 4) ou água destilada + NaF (NaF/20 ou 40 partes por milhão (ppm) - grupos 2,3, 5 e 6) para beber. Durante este período foi realizada a terapia com RLX (Aarti Drugs, Índia) por gavagem diária (1 mg/Kg p.c./dia), com a utilização de cânula guia conectada a seringa para liberação da droga no estômago.

Aleatoriamente, as ratas foram divididas nos grupos seguintes:

n ^o	Grupo (n=10/grupo)	Obs:
1	OVX + DH ₂ O	DH ₂ O= água destilada
2	OVX + NaF - 20 ppm	
3	OVX + NaF - 40 ppm	
4	OVX/RLX + DH ₂ O	RLX= raloxifeno
5	OVX/ RLX + NaF - 20 ppm	
6	OVX/ RLX + NaF - 40 ppm	

Observação: até a data de entrega do texto do trabalho de conclusão de curso, os grupos 2, 3 e 4 ainda estavam sob processamento experimental.

Exodontia:

Para análise do processo de reparo alveolar de 28 dias, foi realizada extração do incisivo central superior direito, sob efeito de anestesia geral com xilazina/quetamina, com instrumental apropriado e adaptado por Okamoto e Russo (1973), após 152 dias de terapia substitutiva e ingestão de água fluoretada nos animais dos diferentes grupos experimentais. Imediatamente após a exodontia, as bordas das feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de seda 4-0 (Johnson e Johnson) e os animais receberam dose única de antibiótico (Pentabiótico Veterinário, Wyeth, São Bernardo do Campo, SP, Brasil - 0,2 ml/rato/i.m.). Alimentação dos animais foi pastosa durante as primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas e retornando à normalidade após este período.

Experimento:

Após 180 dias da ingestão de água fluoretada e RLX, os animais foram anestesiados para coleta sanguínea, de acordo com técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). As amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados e submetidas a centrifugação a 2500 rpm, por 15 minutos na temperatura de 2°C. O sobrenadante foi coletado, fracionado em alíquotas e estocado em freezer -20°C até o momento das determinações dos marcadores de atividade celular do metabolismo ósseo. Em seguida, foram sacrificados por dose excessiva de anestésico e realizada a separação da maxila direita da esquerda, por meio de incisão sagital mediana, que acompanha a sutura intermaxilar. Obtendo-se, então, a peça com o alvéolo direito, após cortes com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares. Os fêmures dos animais foram removidos cirurgicamente.

As peças foram fixadas em formalina neutra (10%), durante 24 horas, em temperatura ambiente. Foram lavadas em água corrente, por 12 horas e descalcificadas em solução de EDTA (5%). Após descalcificadas, as peças foram lavadas em água corrente, por 24 horas, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina pelo método de rotina,

com o cuidado de orientá-las de forma a permitir cortes dos alvéolos, no sentido vestibulo-lingual e paralelamente ao seu longo eixo.

Análises Bioquímicas:

Foram realizadas análises bioquímicas para verificação da atividade celular do metabolismo ósseo (cálcio, fósforo e fosfatase alcalina). As dosagens foram realizadas através dos seguintes métodos:

Cálcio: As determinações de cálcio foram realizadas através de método espectrofotométrico, utilizando Kit marca Labtest (cat. 90) e 20 μL de plasma. O cálcio reagiu com a púrpura de ftaleína em meio alcalino, formando um complexo de cor violeta, que teve a absorvância determinada em 570 nm (Espectrofotômetro Hitachi U 1100). Os resultados foram expressos em mg dL^{-1} .

Fósforo: As determinações de fósforo foram realizadas utilizando como amostra 10 μL de plasma, através de uma modificação do método de Daly e Ertingshausen (1972) - kit da marca Labtest (Cat. 12). O fósforo inorgânico reagiu com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico, resultando na formação de um complexo de fosfomolibdato não reduzido, que teve a absorvância determinada em 340 nm (Espectrofotômetro Hitachi U 1100). Os resultados foram expressos em mg dL^{-1} .

Fosfatase Alcalina: A atividade enzimática (U/L) foi verificada através de método cinético, utilizando como substrato *p*-nitrofenilfosfato de sódio na concentração de 100 mmol L^{-1} , em pH 9,8. A velocidade de formação do produto *p*-nitrofenil foi acompanhada através da determinação da absorvância em 405 nm. Todo o procedimento experimental foi realizado segundo o protocolo fornecido pela empresa KATAL, fabricante do kit, tendo sido utilizados 20 μL de plasma como amostra biológica.

Análise Histológica:

Nos blocos obtidos, foram efetuados cortes semi-seriados, com 6 micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina e eosina para proceder análise histológica. Os cortes foram analisados em microscópio óptico (Carl Zeiss – Axiolab).

Análise Histométrica:

A análise histométrica do terço médio foi realizada com o auxílio do “software ImageLab 2000” (Diracom 3). Para a aquisição de imagens, foi utilizada câmera digital (JVC TK-1270 Color Vídeo Câmera) acoplada ao microscópio (Carl Zeiss – Axiolab) e conectada ao computador. As imagens foram capturadas num aumento de 40x (microscópio Carl Zeiss – Axiolab) e transferidas para o “software” (ImageLab 2000 – Diracom 3).

Ensaio Biomecânicos:

O ensaio biomecânico (Fig. 1a) de compressão axial, com distância entre apoio de 20 mm em superfície e com velocidade de aplicação da carga (força) de 0,25mm/min, foram realizados na Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000. Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur.

O ensaio biomecânico (Fig. 1b) de flexão em três pontos, com distância entre apoio de 20 mm em superfície e com velocidade de aplicação da carga (força) de 0,25mm/min, foram realizados na Máquina de Ensaio Universal EMIC/Mod DL3000. Os valores foram registrados em sistemas computacionais do próprio fabricante, que fornece diretamente os valores de força máxima admitidos pelo fêmur.

Na oportunidade dos ensaios, as peças ósseas foram retiradas do freezer para serem descongeladas em temperatura ambiente. Nestas análises foi aplicada força ântero-posterior, com velocidade de 0,25 mm/minuto e célula de carga de 2000 N. Devido à baixa velocidade com que a força é aplicada, o ensaio é do tipo Estático. Os dados foram transferidos e analisados no programa EXCEL[®].

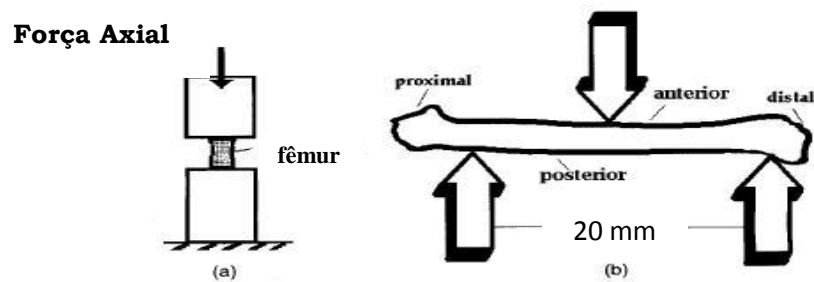


Figura 1: Esquema dos testes biomecânico. (a) teste de resistência (compressão axial); (b) ensaio de flexão em três pontos.

Com o programa EXCEL[®] foi traçada a curva carga (força) versus deslocamento (Fig. 2). Esta curva fornece os parâmetros de força máxima e rigidez óssea. Esses parâmetros foram obtidos pela avaliação da curva de força X deslocamento na qual se evidencia: 1) a resistência óssea, analisando a força máxima admitida pelo tecido ósseo; 2) a força na ruptura; 3) a deflexão na força máxima.

A rigidez foi obtida através da tangente do ângulo α que indica a inclinação da curva carga X deslocamento na fase elástica (até o limite de proporcionalidade).

As forças máximas (F_{max}) foram utilizadas como critério de avaliação da resistência e é o maior valor de carga admitida em cada ensaio.

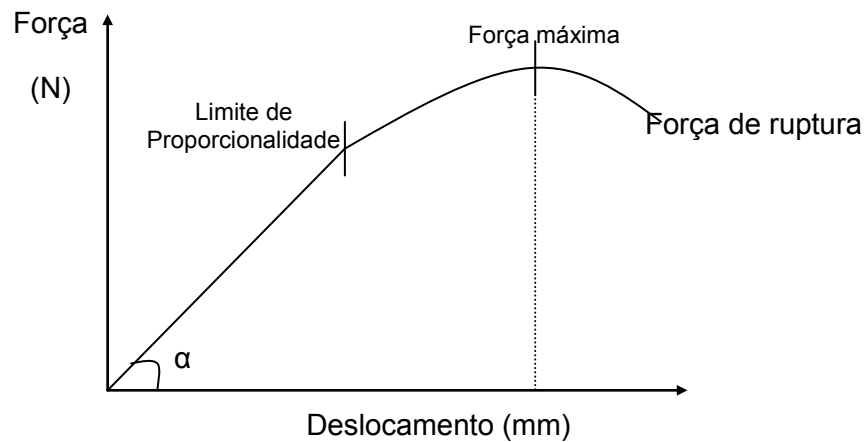


Figura 2: Esquema da curva Força X Deslocamento obtida no ensaio mecânico.

Análise Estatística:

Foram utilizadas as médias \pm EPM para apresentação dos resultados. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $P < 0,05$ para todas comparações.

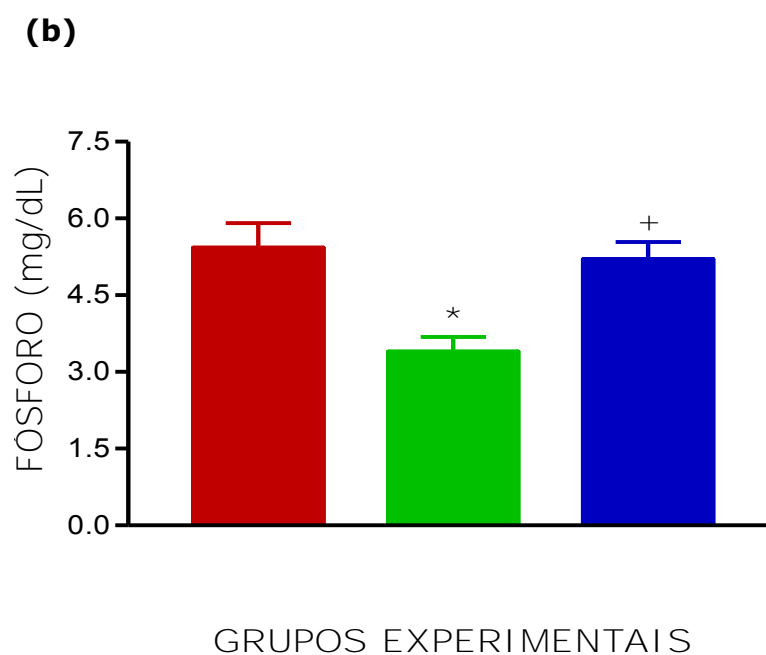
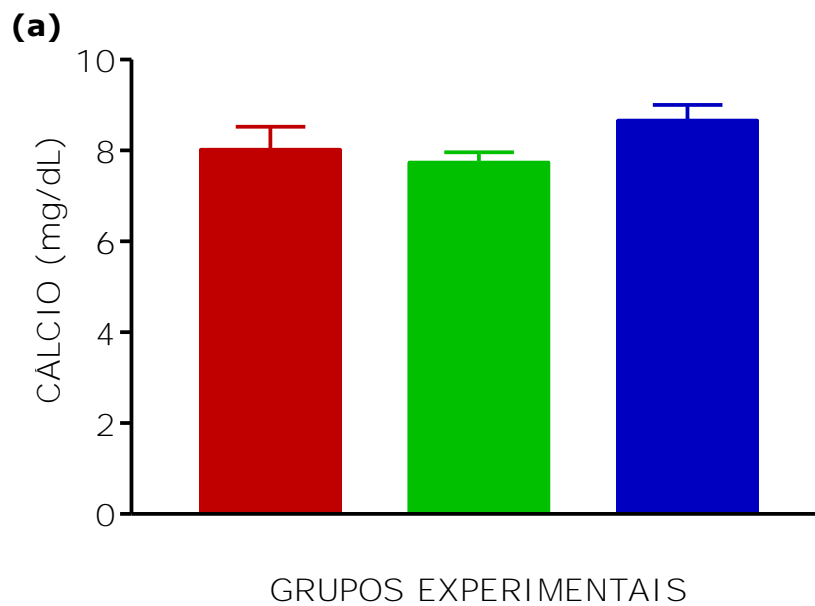
RESULTADOS

Análises Bioquímicas

A associação de RLX com água fluoretada (20 ou 40 ppm) não desencadeou alteração na concentração plasmática de cálcio quando comparado com as ratas OVX que receberam água destilada durante 180 dias. A concentração plasmática de fósforo nos grupos de animais que receberam água destilada e nos tratados com adição de 40 ppm de fluoreto foi semelhante. Entretanto, água destilada com 20 ppm de NaF^- desencadeou diminuição significativa na concentração plasmática de fósforo. A concentração plasmática de fosfatase alcalina apresentou-se reduzida em relação aos grupos de ratas OVX que receberam RLX

associado à água fluoretada de 20 ou 40 ppm, sendo que neste último a concentração de fosfatase alcalina foi a menor no plasma sanguíneo dos animais experimentais quando comparada aos outros dois grupos. Os gráficos da figura 3 apresentam as médias e os erros padrões das médias dos diferentes grupos experimentais.

■ OVX/ DH₂O ■ OVX/ RLX/ 20 ppm ■ OVX/ RLX/ 40 ppm



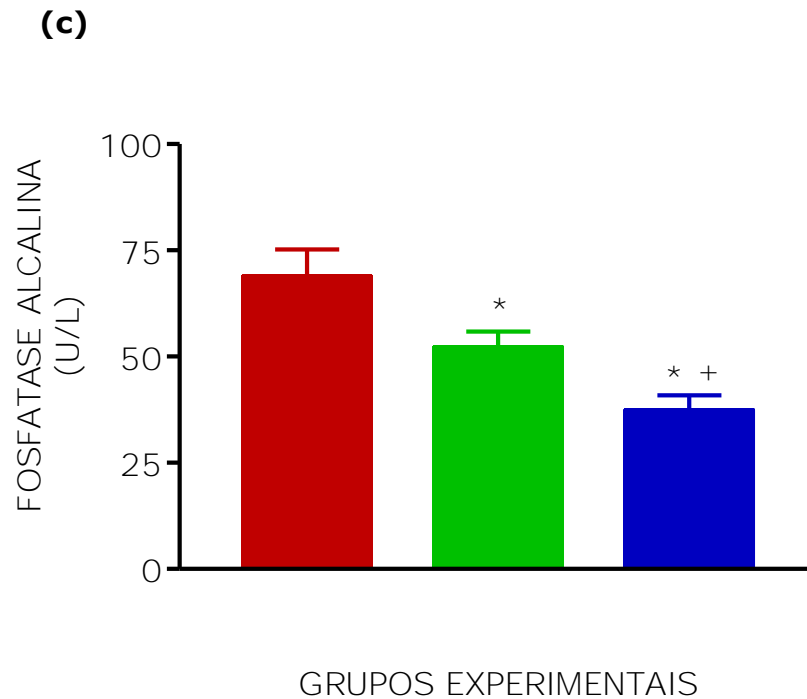


Figura 3: Concentração plasmática de cálcio (a), fósforo (b) e fosfatase alcalina (c) dos animais dos diferentes grupos experimentais. N=10 animais/grupo. * $p < 0,05$ vs OVX/DH₂O; + $p < 0,05$ vs OVX/RLX/20 ppm.

Ensaio Biomecânicos

O ensaio mecânico de flexão de três pontos (fig. 4a) bem como o de compressão do colo do fêmur (fig. 4b) não detectou diferença significativa na força máxima aplicada para verificar se os tratamentos promoveram alteração na resistência óssea. Entretanto, é importante ressaltar que a força máxima aplicada fraturou o colo dos fêmures dos animais dos três grupos.

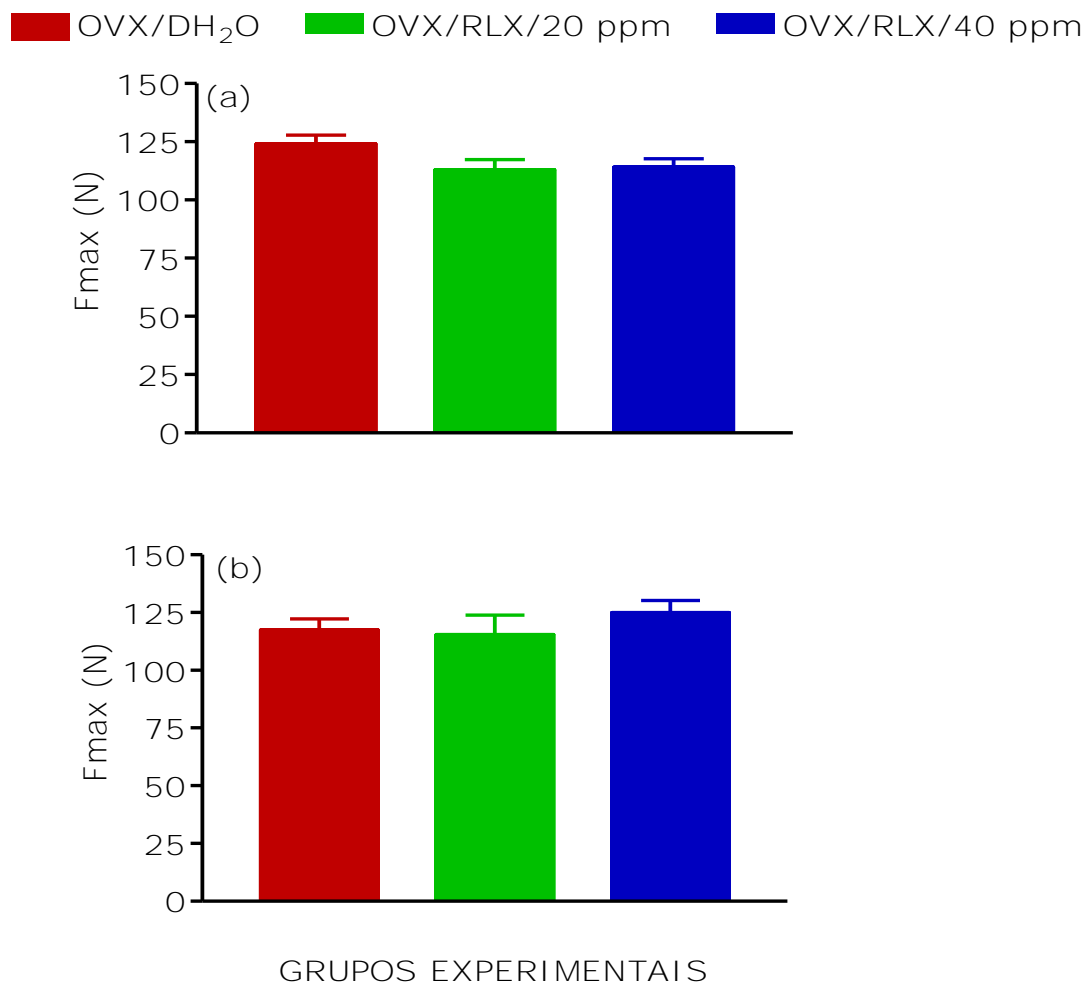


Figura 4: Teste de flexão de três pontos (a) e de compressão (b) no colo dos fêmures dos animais experimentais. N=10 animais/grupo.

Análise Histológica/Histométrica

A análise da região do terço médio do alvéolo baseou-se na quantidade de tecido ósseo formado assim como na composição deste tecido onde se considerou a presença de células características como osteoblastos atuando na produção de matriz óssea, osteócitos ocupando lacunas no interior desta matriz e osteoclastos atuando na reabsorção. A análise histométrica evidenciou diferença significativa na regeneração óssea alveolar entre os grupos experimentais, sendo no grupo de animais OVX/RLX que ingeriram água com 20 ppm de NaF a formação óssea foi significativamente maior (figura 5).

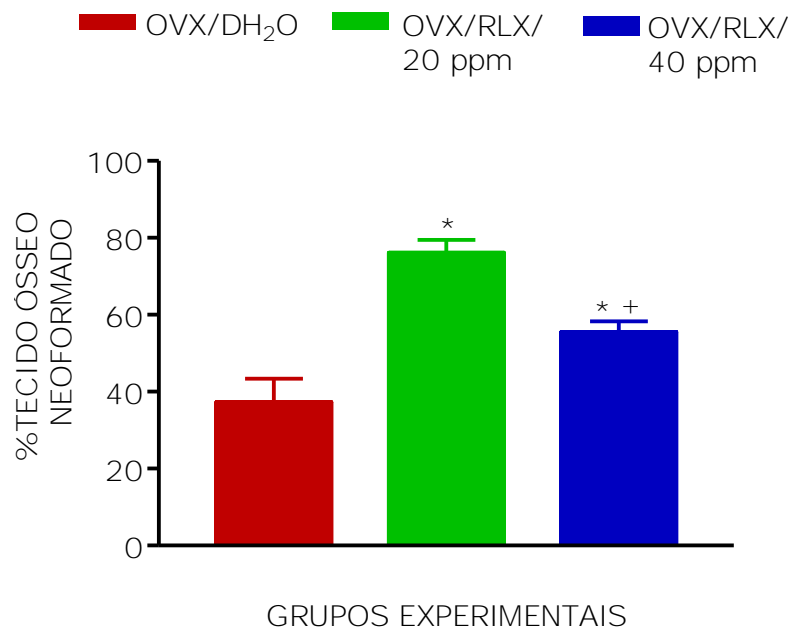


Figura 5: Análise Histométrica do terço médio do alvéolo direito dos animais dos diferentes grupos experimentais, quantificando a % de tecido ósseo neoformado. * $p < 0,05$ vs OVX/DH₂O; + $p < 0,05$ vs OVX/RLX/20 ppm. N=10 animais/grupo.

O aspecto histológico observado em cada grupo apresentou as seguintes características:

Grupo OVX/DH₂O:

Grupo formado por ratas com doze meses de idade e ovariectomizadas há seis meses e que receberam para beber água destilada durante 180 dias. A análise histológica evidenciou tecido pouco organizado principalmente nas regiões centrais do terço médio do alvéolo aos 28 dias pós exodontia. Observou-se atraso no processo de reparação alveolar sendo bastante evidente a presença em sua maior área de tecido de granulação com poucas ilhas de tecido ósseo neoformado (figura 6), sendo essas ilhas caracterizadas por osso imaturo com grande quantidade de osteoblastos ainda em processo de produção de matriz óssea e pouco próxima uma das outras. Observou-se também que próximo às corticais ósseas alveolares há maior desenvolvimento do tecido ósseo neoformado

sendo que nestas corticais verificou-se a presença de osteoclastos formando lacunas de reabsorção (figura 6 A e 6 B).

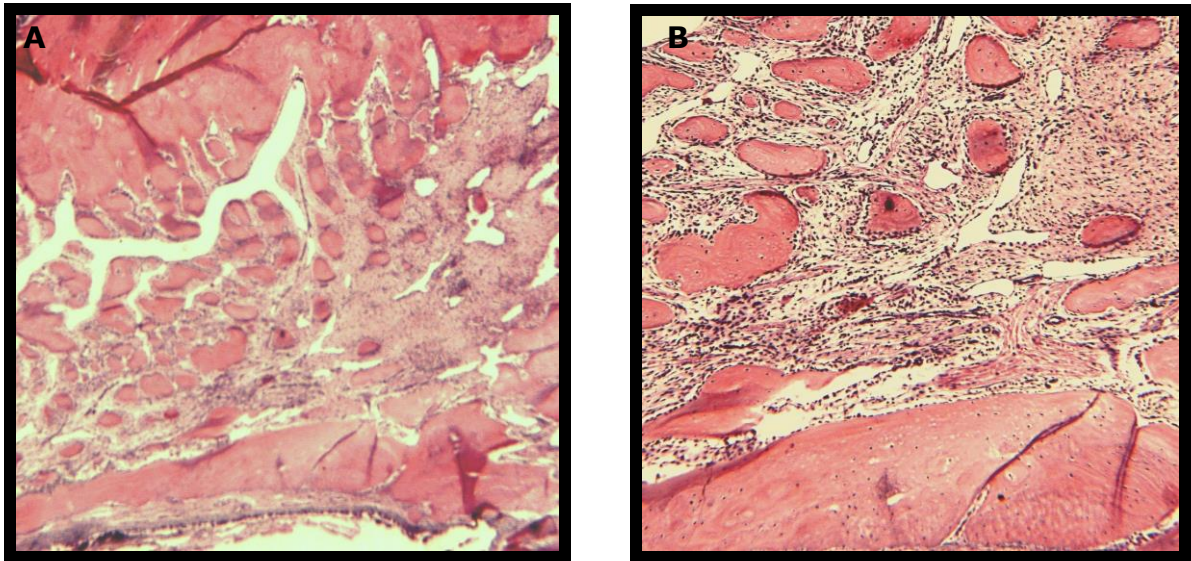


Figura 6 – Corte histológico do terço médio de alvéolo de rato do grupo OVX/DH₂O, 28 dias após a exodontia. A) Aumento de 40 X; B) Aumento de 100x (coloração HE).

Grupo OVX/RLX + NaF 20 ppm:

Neste grupo experimental as ratas OVX receberam RLX e água destilada contendo 20 ppm de NaF. Observou-se formação de ilhas de tecido ósseo em maior extensão e mais desenvolvido (períodos finais de formação óssea) (figura 7), com a presença de osteoblastos e também osteócitos em maior quantidade quando se observa em maior aumento no microscópio de luz (figura 7B). Há presença de tecido de granulação em menor quantidade (presença de tecido conjuntivo provido de vasos sanguíneos, fibras colágenas esparsas, fibroblastos e substância fundamental amorfa). Verificou-se também que o trabeculado ósseo neste grupo apresentou-se mais compacto, ou seja, houve maior fusão das trabéculas (figura 7) quando se compara ao outros grupos, no qual as trabéculas encontraram-se mais isoladas (figura 6 e 8).

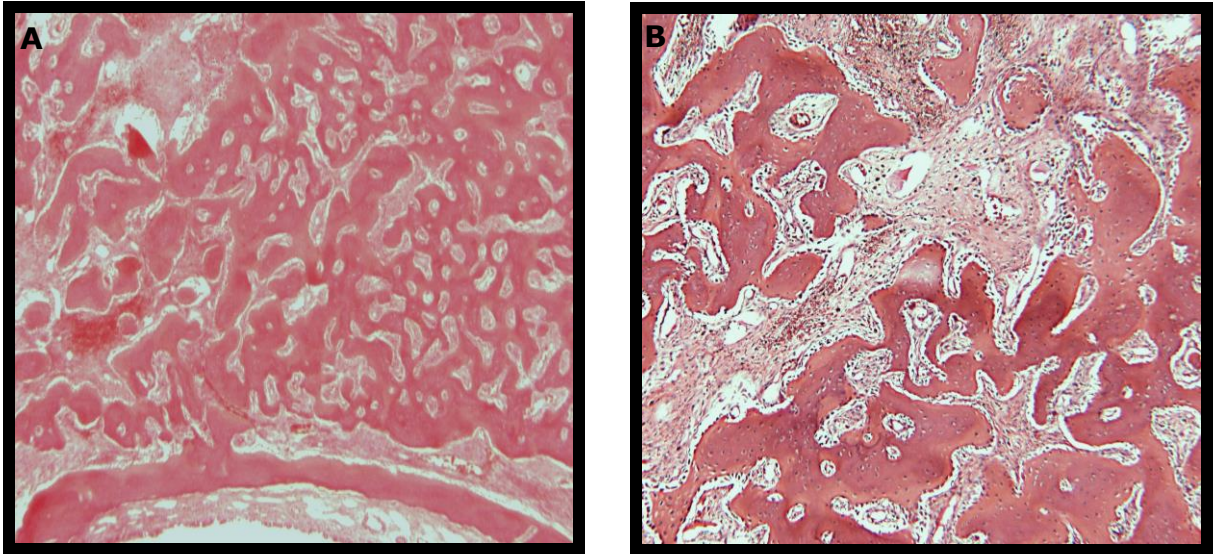


Figura 7 – Corte histológico de alvéolo de rata do grupo OVX/RLX + 20 ppm de NaF, 28 dias após a exodontia. A) Aumento de 40x; B) Aumento de 100x (coloração HE).

Grupo OVX/RLX + NaF 40 ppm:

No grupo de ratas OVX tratadas com RLX associado à água fluoretada em concentração de 40 ppm, observou-se extensão menor de tecido ósseo neoformado (figura 8), quando comparado ao grupo associado a 20 ppm de NaF. Quando observado em maior aumento ao microscópio de luz nota-se que o tecido ósseo apresentou-se bem desenvolvido com grande presença de osteoblastos e também presença de osteócitos sendo mais localizado próximo às corticais ósseas alveolares (figura 8B). Na porção mais central há considerável quantidade de tecido fibroso (figura 8).

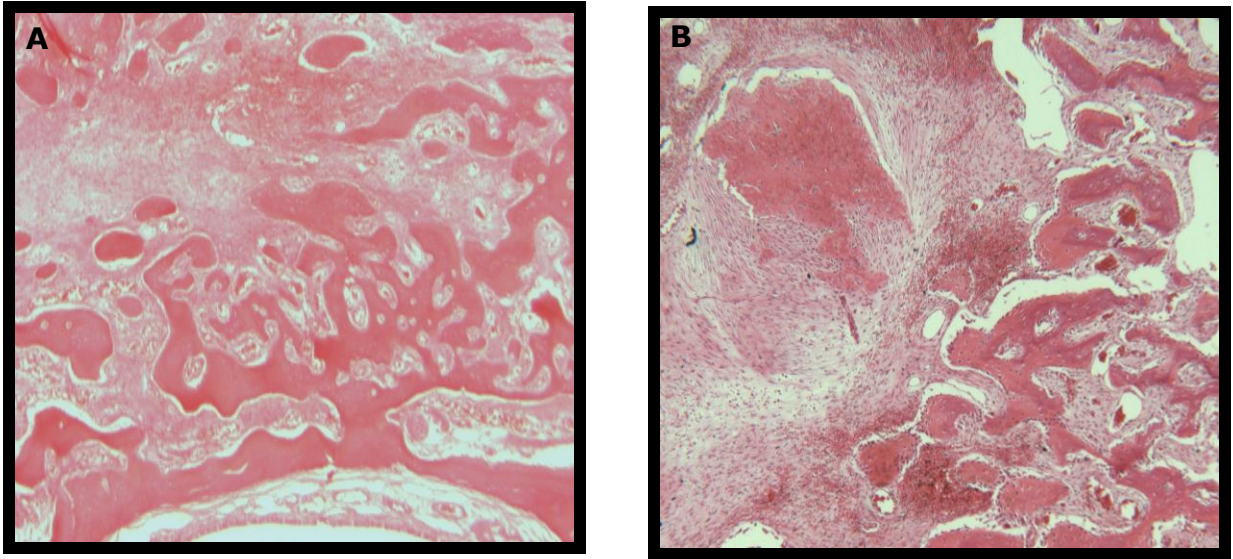


Figura 8– Corte histológico de alvéolo de rata do grupo OVX/RLX + 40 ppm de NaF, 28 dias após a exodontia. A) Aumento de 40x; B) Aumento de 100x (coloração HE).

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a associação de RLX com água fluoretada nas concentrações de 20 e 40 ppm, durante seis meses, não interferiu na resistência óssea dos animais ovariectomizados, portanto, não ocorreu maior efetividade na associação de terapia anti-reabsortiva e anabólica para o tratamento da osteoporose. Entretanto, a associação de RLX com NaF/20 ppm gerou alteração no metabolismo do fósforo. Nesse trabalho, a regeneração óssea alveolar (analisada 28 dias pós exodontia) foi melhor qualitativa e quantitativamente no grupo de animais tratados com RLX associado à água fluoretada/20 ppm quando comparado com os grupos controle e o tratado com RLX e água fluoretada/40 ppm.

Diversos fatores externos e locais, como mecanismos regulatórios intracelulares e secreção hormonal, regulam o processo fisiológico constante da remodelação óssea, cuja formação é correspondente à reabsorção (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). O processo de remodelação,

caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos, ocorre nas unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU). Cada unidade é geográfica e cronologicamente separada de outros conjuntos, sugerindo que a ativação de seqüência de ocorrências celulares responsáveis pela remodelação seja também controlada localmente por fatores gerados no microambiente ósseo. O sinal que inicia a remodelação não está completamente identificado, mas é evidente que forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1999). Alterações nesse processo podem resultar em diferentes distúrbios, entre eles a osteoporose.

Apesar de certas limitações, como a ausência do remodelamento haversiano e fraturas frágeis, o rato consiste em bom modelo para o estudo da osteoporose em humanos, pois os mecanismos responsáveis pelo ganho e perda de massa óssea são semelhantes e o esqueleto de ambos reage similarmente a influências mecânicas, hormônios e drogas.

É sabido que os marcadores do metabolismo ósseo e a força mecânica são características importantes para avaliação do tecido ósseo. Ao serem analisadas as concentrações plasmáticas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina, verificou-se que a associação de RLX com NaF desencadeia algumas alterações. A concentração plasmática de cálcio (Fig. 3a) não apresentou alteração significativa entre os grupos experimentais, sugerindo-se que a administração de RLX associado a fluoreto de sódio (20 e 40 ppm) não promoveu mudança no metabolismo de cálcio, provavelmente devido ao metabolismo elevado e controle homeostático bastante rigoroso do sistema endócrino nestes animais, que afeta sua absorção pelo intestino e excreção pelo rim e regula o grande reservatório esquelético de onde o cálcio é retirado nos momentos de necessidade (BORELLI, 1998; KIM *et al.*, 2003).

A concentração de fósforo no plasma sanguíneo dos animais tratados com RLX e NaF/20 ppm apresentou-se reduzida em relação aos grupos OVX/DH₂O e RLX associado a NaF/40 ppm (Fig. 3b). Sugere-se, então, que a associação de RLX com 20 ppm de NaF diminuiu o fósforo

plasmático, provavelmente, por diminuir a reabsorção pelos túbulos renais distais desse marcador plasmático elevando a excreção renal do mesmo. Esta sugestão poderia ser elucidada com a análise da urina desses animais. A concentração plasmática de fósforo detectada nos animais dos grupos controle e de RLX associado à NaF/40 ppm poderá estar relacionada com maior atividade metabólica óssea, ou seja, maior ritmo na remodelação óssea.

A concentração plasmática de fosfatase alcalina (fig. 3c) dos animais tratados com RLX associado a ambas as concentrações de fluoreto de sódio (20 ppm e 40 ppm) apresentou-se diminuída em comparação com o grupo de ratas OVX que ingeriu água destilada, sendo que o grupo tratado com RLX e NaF/40 ppm demonstrou a menor concentração plasmática em relação ao grupo de RLX associado a 20 ppm de fluoreto de sódio e água destilada. Assim, a redução na concentração plasmática de fosfatase alcalina nos grupos de animais com tratamento (RLX + 20 ppm ou RLX + 40 ppm) sugere provável atuação da enzima na fase de mineralização do reparo ósseo alveolar ocasionando a cristalização dos minerais na matriz óssea neoformada. Verificou-se que essa redução foi mais significativa no grupo tratado com maior concentração de água fluoretada (40 ppm) associado ao RLX, então, sugere-se que os íons flúor podem ter influenciado na atuação da fosfatase alcalina sobre a mineralização da matriz de tecido ósseo neoformada (BORELLI, 1998).

Nesse trabalho, verificou-se que os fêmures das ratas ovariectomizadas tratadas com a terapia anti-reabsortiva associada à anabólica não demonstraram melhora na resistência mecânica em relação aos ossos do grupo OVX quando submetidos às forças de compressão e flexão em 3 pontos. Portanto, os resultados obtidos evidenciam que a capacidade do tecido ósseo de resistir às forças mecânicas aplicadas não foi influenciada pelo tratamento administrado, já que os grupos tratados apresentaram resultado semelhante ao do grupo não tratado (OVX/água destilada). Assim, com base na Lei de Wolff (1897), a qual relata que a

capacidade do osso de adaptar-se às alterações de tamanho, forma e estrutura depende dos estresses mecânicos submetidos a esse tecido (CORDEY, 2000), sugere-se que a resistência mecânica do tecido ósseo depende da disposição arquitetônica das trabéculas ósseas. Essa organização conformacional do trabeculado ósseo determinará a dissipação das forças mecânicas empregadas nesse tecido, sendo pouco considerada a sua composição química.

A reparação óssea é semelhante tanto para fraturas ósseas quanto para defeitos cirúrgicos (como a exodontia). O processo de reparo alveolar é caracterizado por eventos biológicos que ocorrem em diferentes períodos de tempos após a exodontia. A formação do coágulo sangüíneo é a primeira ocorrência histológica a ser verificada após exodontia. O processo de organização com formação do tecido de granulação inicia-se nas regiões periféricas do coágulo adjacente à cortical óssea alveolar. A reparação inicia-se na periferia do coágulo e se estende em direção ao centro. Além disso, inicia-se no sentido apical em direção ao cervical. De imediato, os macrófagos são observados na periferia do coágulo a fim de fagocitá-lo e permitir que os fibroblastos (originados de células mesenquimais indiferenciadas advindas do ligamento periodontal e de capilares sangüíneos) formem o tecido de granulação constituído por vasos sangüíneos, fibras colágenas e células inflamatórias. O tecido de granulação, por sua vez maduro, é importante para o início da formação óssea, onde ocorre a migração de células mesenquimais indiferenciadas (osteoprogenitoras) advindas principalmente do ligamento periodontal com o intuito de ocorrer à diferenciação osteoblástica (células mesenquimais originando osteoblastos). Os osteoblastos formados se agrupam produzindo pequenas áreas de matriz óssea (orgânica) também denominada tecido **osteóide. Estas "ilhas" de tecido ósseo imaturo, caracterizadas por inúmeros osteoblastos e presença reduzida de osteócitos, se unem primeiramente nas porções mais periféricas em direção ao centro formando o trabeculado ósseo. Nesta fase, a matriz óssea entra em processo de mineralização e posteriormente remodelação (PERRI DE CARVALHO & OKAMOTO, 1987).**

Nesse estudo, 28 dias antes do término do tratamento anti-reabsortivo e anabólico realizou-se a exodontia dos animais de todos os grupos experimentais. De acordo com Okamoto & Russo (1973), esse é o período necessário para que se ocorra efetiva regeneração óssea alveolar em ratos. Analisou-se histológica e histometricamente o terço médio do alvéolo das ratas experimentais. O grupo tratado com RLX associado à NaF/20 ppm apresentou maior regeneração óssea alveolar em relação aos outros grupos experimentais, demonstrando melhor organização das fibras colágenas que compõem a matriz óssea, maior grau de formação de matriz na periferia e avanço da reparação em direção ao centro do alvéolo com início de mineralização do trabeculado ósseo neoformado, presença em menor quantidade de osteoblastos e aparecimento de osteócitos aprisionados na matriz. No grupo em que foi administrado RLX associado à NaF/40 ppm, verificou-se que a regeneração óssea iniciou-se na periferia, porém observou-se atraso na neoformação de trabeculado ósseo na região central do alvéolo. Além disso, em tal grupo observou-se lacunas de reabsorção óssea com presença de células osteoclásticas e áreas extensas de coágulo sendo notável a imaturidade do osso neoformado, características evidentes de retardo na regeneração óssea alveolar, as quais foram verificadas também, porém com maior intensidade, no grupo de ratas OVX/água destilada. Pode-se sugerir que a associação do RLX com fluoreto na concentração de 40 ppm ocasionou atraso na regeneração óssea alveolar, demonstrando semelhança de regeneração com o grupo de ratas osteoporóticas (OVX/água destilada). Assim, acredita-se que a efetividade na regeneração óssea alveolar do tratamento anti-reabsortivo associado ao anabólico apenas ocorreu no grupo experimental em que a concentração de fluoreto de sódio foi de 20 ppm.

Hsieh e colaboradores (1995) analisaram o efeito da ovariectomia no reparo de alvéolos dentários em ratas e verificaram que a deficiência estrogênica pode afetar a remodelação óssea pós-exodontia. O aumento da reabsorção óssea decorrente da carência estrogênica pode ser conseqüente de aumento da secreção pelos osteoblastos ou pelas células do estroma da

medula óssea de fatores, como as citocinas, capazes de estimular a osteoclastogênese. Dentro desse modelo pode-se incluir ainda o efeito do estrógeno na apoptose de osteoclastos e/ou de seus precursores (Jilka et al., 1992; Sarma et al., 1998).

Estudos realizados por Pacifici (1996) e Manolagas e Jilka (1995) indicam o possível envolvimento de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF α) na perda óssea ligada a deficiência de estrógeno. Estes autores demonstraram que menopausa natural ou cirúrgica aumenta a concentração de IL-1, IL-6, TNF e IL-6rs. Jilka e colaboradores (1992) verificaram que a ação do estrógeno é mediada por IL-6. Estudando camundongos normais, evidenciaram que a ooforectomia aumenta o recrutamento de osteoclastos e esse efeito foi revertido com estrógeno e anticorpo anti-IL-6. Assim, sugerem que IL-6 estimula a osteoclastogênese nos estados de *deficit* de estrógeno e que a ooforectomia aumenta não só a produção, mas também a resposta de precursores de osteoclasto a IL-6. Em outro estudo do mesmo grupo, Girasole e colaboradores (1992) demonstraram efeito do estrógeno em reduzir a concentração basal de IL-6 e pós estímulo com IL-1 e TNF em células estromais de medula óssea em camundongos.

Estudo multicêntrico europeu em 602 mulheres recém menopausadas, mostrou que o RLX induz ganho mineral ósseo de 2-4% na coluna lombar, fêmur proximal e corpo total, em comparação à perda significativa do grupo placebo. Este efeito está ligado à redução da remodelação óssea, com as taxas dos marcadores de reabsorção e formação óssea tornando-se semelhante aos valores de mulheres não menopausadas (DELMAS *et al.*, 1997). Informações complementares foram dadas pelo estudo MORE (*Multiple Outcomes of Raloxifen Evaluation*), realizado em 7.705 mulheres pós-menopausadas osteoporóticas, quando foi evidenciada diminuição em 50% na incidência de fraturas vertebrais novas em 36 meses de tratamento com RLX, em comparação com placebo (ETTINGER *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação molecular do RLX envolve afinidade alta de ligação com o receptor de estrógeno, provocando alteração conformacional

na estrutura do receptor, sua dimerização e associação com elementos resposta do DNA, já tendo sido descrito sítios de ligação do DNA, elementos resposta específicos para o RLX e distintos do estrógeno. Estrógeno e RLX podem ativar a transcrição de genes que codificam TGF- β e que junto com outras citocinas induzem a produção de osteoblasto e inibem a atividade e/ou a vida média do osteoclasto (YANG *et al.*, 1997). Provavelmente, o processo de regeneração óssea alveolar nos animais OVX que receberam RLX associado ao NaF/20 ppm resulte de ações semelhantes as descritas acima. Entretanto, a concentração de 40 ppm de NaF bloqueou os mecanismos de ação do RLX e/ou estimulou fatores externos ou locais que interferiram na regeneração óssea alveolar.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a associação de RLX com água fluoretada (20 e 40 ppm), durante seis meses, não interfere na resistência óssea, portanto, não houve maior efetividade das terapias anti-reabsortiva e anabólica.

A associação de RLX com fluoreto de sódio a 20 ppm altera o metabolismo do fósforo plasmático ocasionando a sua redução. A associação de RLX com fluoreto de sódio (20 e 40 ppm) altera a atividade da fosfatase alcalina em ratas OVX com 12 meses de idade.

A regeneração óssea alveolar, quando comparada a dos animais OVX, demonstra melhora quantitativa e qualitativa ao administrar-se RLX associado ao fluoreto de sódio na concentração de 20 ppm. Porém ao elevar-se a concentração de fluoreto para 40 ppm, gera-se atraso na regeneração do alvéolo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDERSEN, P.; RIIS, B. J.; CHRISTIANSEN, C. Monofluorophosphate combined with hormone replacement therapy induces a synergistic effect on bone mass by dissociating bone formation and resorption in postmenopausal women: a randomized study. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(9):3013–3020, 1999.

AMADEL, S. U.; SILVEIRA, A. S.; PEREIRA, A. C.; CARVALHO, Y. R.; ROCHA, R. F. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. *J. Bras. Patologia Médica Lab.* 42(1): 5-12, 2006.

BINTE, A. R.; TANAKA, M.; KOHNO, S.; IKEGAME, M.; WATANABE, N. Relationship between porotic changes in alveolar bone and spinal osteoporosis. *J Dent Res.* 86:52-7, 2007.

BORELLI, A. Envelhecimento ósseo: osteoporose. In: Carvalho Filho ET, Papaléo Neto M. *Geriatrics: Fundamentos, Clínica e Terapêutica.* 2ª. ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

BRYANT, H.U.; DERE, W.H. Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *P.S.E.B.M.* 217:45-52, 1998.

BURCKHARDT, P. Selective estrogen receptor modulators (SERM): new substances for hormone replacement therapy. *Schweiz Med. Wochenschr.* 11:129-49, 1999.

CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana; 1987.

CORDEY, J. "Introduction: basic concepts and definitions in mechanics".

In: Injury, International Journal of the care of the injured, 2000.

DELMAS, P.D.; BJARNASON, N.H.; MITLAK, B.H. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. N Engl J Med; 337(23):1641-7, 1997.

DEMPSTER, D.W.; BIRCHMAN, R.; XU, R.; LINDSAY, R.; SHEN, V. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. Bone. 16(1):157-61, 1995.

DIEZ-PEREZ, A. Selective Estrogen Receptor Modulators. Arquivo brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo. 50(4): 720-34, 2006.

DUARTE, P.M.; GONÇALVES, P.F.; CASATI, M.Z.; DE TOLEDO, S. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. J Periodontal Res. 41:541-6, 2006.

EINHORN, T.A. The bone organ system: form and function. Osteoporosis, san diego: academic press. 3-22, 1996.

FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. *Rev Odontol UNESP*. 36(2): 181-88, 2007.

GIACOMINI, D. R.; MELLA, E. A. C. Hormonal Replacement: advantages and disvantagens. *Semina: Ciências Biológicas e Saúde, Londrina*. 27(1): 71-92, 2006.

GRODSTEIN, F.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J. Post-menopausal hormone use and tooth loss: a prospective study. *J Am Dent Assoc*. 127:370-7, 1996.

GRYNPAS, M.D. Fluoride effects on bone crvstals. *J Bone Min Re*. 169-175, 1990.

GRYNPAS, M.D.; CHENG, P.T. Fluoride reduces the rate of dissolution of bone. *Bone Miner*.5: 1-9, 1988.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: *Histologia básica*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 8, 1999. : 111-28 p.

HARMS, P.G.; OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *J Appl Physiol*. 36: .391-392, 1974.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone Remodelling. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*. 4 (2): 56-62, 1999.

HOSOI, T. Hormone replacement up-to-date. Selective estrogen receptor modulator (SERM) for the treatment of osteoporosis. *Clin Calcium*. 17(9): 1419-23, 2007.

HSIEH, Y. D.; DEVLIN, H.; MCCORD, F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol*, 40 (6): 529-31, 1995.

GIRASOLE, G.; JILKA, R.L.; PASSERI, G.; BOSWELL, S.; BODER, G.; WILLIAMS, D.C.; MANOLAGAS, S.C. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest*. 89(3):883-91, 1992.

JILKA, R.L.; HANGOC, G.; GIRASOLE, G. Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by IL-6. *Science*; 257:88-91, 1992.

JILKA, R.L.; WEINSTEIN, R.S.; TAKAHASHI, K.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. Linkage of decreased bone mass with impaired osteoblastogenesis in a murine model of accelerated senescence. *J Clin Invest*. 97(7):1732-40, 1996.

JOHANSEN, J.R. Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat: a histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol Scand*. 28:441-461, 1970.

KATO, S. Molecular mechanism of tissue-specific actions of SERM. *Clin Calcium*. 16(9): 1469-74, 2006.

KAYATH, M. J. RLX e Osteoporose: revisão de um novo modulador seletivo do receptor de estrogênio. Arquivo brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo. 43(6): 433-41, 1999.

KIM, S.; LEE, M.; RHEE, M. Studies on the effects of biomedical agents on serum concentration of Ca²⁺, P and ALP activity in osteoporosis-Induced rats. J Vet Sci 4(2):151-4, 2003.

LONG, J. A; EVANS, H.M. The oestrus cycle in the rat and its related phenomena. Mem. Univer.Calif. 6:1-148,1922.

LOPES-COSTA, P. V.; SANTOS, A. R.; PIRES, C. G.; FILHO, J. D. P.; SILVA, B. B. Effects of raloxifene on angiogenesis of the breast carcinoma of menopausal women. Revista brasileira de Ginecologia e Obstetria. 29 (7): 337-41, 2007.

MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. N Engl J Med ;332:305-11, 1995.

MCDOWELL, L.R. Fluorine. Minerals in animal and human nutrition. London: Academic Press; 1992.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. Rev Fac Odontol Araçatuba. 2: 153-169, 1973.

PACIFICI, R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. J Bone Miner Res; 11:1043-51, 1996.

PINTO NETO, A.M.; PEDRO, A.O.; HARDY, E.; OSIS, M.J.; COSTA-PAIVA, L.H.; MARTINEZ, E.Z. Characterization of hormone replacement therapy users in Campinas, São Paulo. *Caderno Saúde Pública*. 18 (1): 121-127, 2002.

RAMALHO, A. C. R.; CASTRO, M. L.; SOLAL, M. E. C.; VERNEJOU, M. C. Por que estrógeno e RLX melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. *Arquivo brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 44 (6): 471-82, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER J. R. *Farmacologia*. Editora Elsevier. 6: 467, 2007.

REID, I. R.; CUNDY, T.; GREY, A.B.; HORNE, A.; CLEARWATER, J.; AMES, R.; ORR-WALKER, B.J.; WU, F.; EVANS, M.C.; GAMBLE, G.D.; KING A. Addition of monofluorophosphate to estrogen therapy in postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. *J. Clin. Endocr. & Met.* 92(7): 2446–2452, 2007.

RUBIN, M. R.; BILEZIKIAN, J. P. New anabolic therapies in osteoporosis. *Curr Opin Rheumatol*. 14: 433–440, 2002.

RUSSO, L. A. T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. *Arquivo brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo*. 45(4): 401:6, 2001.

TURNER, C.H. Combined effects of diets with reduced calcium and phosphate and increased fluoride intake on vertebral bone strength and histology in rats. *Calcif. Tiss, Int.* 69 (1): 51-57, 2001.

VEIGL, D.; NIEDERLOVÁ, J.; KRYSTUFKOVÁ, O. Periprosthetic Osteolysis and its Association with RANKL Expression. *Physiol. Res.* 56: 455-462, 2007.

WOLFF, J. "The Law of Bone Remodeling". Berlin Heidelberg New York: Springer, 1986.

YANG, N.N.; VENOGOPALAN, M.; HARDIKAR, S.; GLASEBROOK, A. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. *Science* 1996; 273:1222-6.

ZHANG, M.; HUANG, F.; TAN, Y.; ZHAO, H.; JIN, M.; MA, S. Effect of sodium fluoride on bone turnover and bone loss of vertebrae and tibia in ovariectomized rats. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi.* 29(1): 49-52, 2000.

ANEXO