TALES CANDIDO GARCIA DA SILVA

Avaliação da densidade radiográfica no reparo alveolar de ratas ovariectomizadas tratadas com o imunomodulador P-MAPA

ARAÇATUBA – SP
2010

TALES CANDIDO GARCIA DA SILVA

Avaliação da densidade radiográfica no reparo alveolar de ratas ovariectomizadas tratadas com o imunomodulador P-MAPA

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

Orientadora: Profa. Assist. Dra. Renata Callestini Filipini
Co-orientadora: Profa. Assist. Dra. Leda Maria Pescinini Salzedas

ARAÇATUBA – SP
2010

Dedicatória

Dedicatória

Aos meus pais **José Candido da Silva** e **Valdete Garcia de Souza e Silva** e às minhas irmãs **Taisa Garcia da Silva Del Pino** e **Tárcia Garcia da Silva Soto** pelo apoio, incentivo, amor e compreensão principalmente nas horas difíceis, que me fizeram chegar até aqui; pelos abraços, pelos sorrisos, por estarem sempre presentes nos momentos importantes de minha vida. Amo vocês, obrigado por tudo!

Agradecimentos

Agradecimentos

À **Deus** por todo amparo e proteção em todos os momentos de minha vida.

À minha orientadora **Profa. Assist. Dra. Renata Callestini Filipini** e minha co-orientadora **Profa. Assist. Dra. Leda Maria Pescinini Salzedas** pela confiança depositada em minha pessoa, disponibilidade, atenção, paciência e todo conhecimento adquirido com a convivência.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP** pela oportunidade de realização deste trabalho e por todo conhecimento oferecido durante minha graduação.

Aos amigos **Gabryela Nascimento Canedo**, **Leonardo Bueno Torcato**, **Priscilla Cardoso Lazari** e **Thalles Mayckon Vieira Araújo** por todo o tempo que passamos trabalhando juntos para que fosse possível a realização deste.

Aos professores **Alessandra Marcondes Aranega**, **Michel Saad Neto** e **Tetuo Okamoto** pela ajuda durante todos os procedimentos cirúrgicos.

Aos técnicos laboratoriais do departamento de Patologia **Marcelo** e **Elaine** e à técnica do laboratório radiográfico **Cidinha** pela disponibilidade, e auxílio quando solicitado.

À **Dra. Célia Tomiko** pela colaboração na parte estatística do trabalho.

À todo **corpo docente e funcionários** desta faculdade que foram responsáveis pela minha formação profissional nestes quatro anos.

À **Profa. Dra. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende** que durante a graduação acreditou em meu potencial, pelas oportunidades de trabalho, e por todo o conhecimento, não apenas acadêmico, que me auxiliaram e levarei sempre comigo.

À **Farmabrasilis** e **Iseu Nunes** por acreditar em nosso trabalho e fornecer a medicação (P-MAPA) para que pudéssemos realizar esta pesquisa.

Aos amigos e cunhados **Cristiano Soto Armindo** e **Thiago Fernandes Del Pino**, por estarem sempre presentes incentivando-me na caminhada diária.

À todos **meus amigos**, estejam eles perto ou longe, que presentes ou apenas em pensamento estiveram ao meu lado para que fosse possível a conclusão de mais esta etapa.

Aos amigos de república **Felipe Melhado Magri**, **Guilherme Henrique de Souza Poli**, **Eduardo Alves Jordão**, **Ícaro Franco de Toledo** e **Fábio Yudi Horikawa** que com a convivência diária, além de amigos-irmãos, se tornaram minha família nestes quatro anos longe de casa.

OBRIGADO!

Epígrafe

Epígrafe

"Quem espera que a vida seja feita de ilusão, pode até ficar maluco ou morrer na solidão, é preciso ter cuidado pra mais tarde não sofrer, é preciso saber viver".

(Roberto Carlos/Erasmo Carlos)

GARCIA-DA-SILVA, TC. **Avaliação da densidade radiográfica no reparo alveolar de ratas ovariectomizadas tratadas com o imunomodulador P-MAPA.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Resumo

A osteoporose é uma doença caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microaquitetural do tecido ósseo mineralizado gerado pela deficiência estrogênica apresentada pelos portadores da doença. Nos últimos tempos a osteoporose tem aparecido como grande problema de saúde pública e frente à relação entre a deficiência de estrógeno e o metabolismo ósseo. Os profissionais da área de saúde apresentam grande interesse no assunto, levando ao estudo de medicamentos que possam auxiliar o processo de remodelação e reparação ósseas. Com o objetivo de avaliar a eficácia de um novo imunomodulador, o P-MAPA, sobre o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas, através do método radiográfico, utilizou-se 60 ratas com três meses de idade. Trinta foram ovariectomizadas (OVZ) e as outras 30 foram falso-operadas (SHAM), sendo que metade de cada grupo citado recebeu a medicação. Foi realizada extração do incisivo central superior direito 15 dias após a cirurgia de ovariectomia ou Sham. Nos tempos de sete, 21 e 45 dias após a exodontia, ocorreu o sacrifício dos animais. Após análise estatística dos resultados obtidos, pelo teste de Tukey, verificou-se apenas diferença estatisticamente significante quando comparados os tempos de reparo em cada grupo, porém, a diferença não foi estabelecida quando comparados os grupos nos determinados tempos experimentais. Frente ao exposto, podemos concluir que o método radiográfico utilizado para análise dos alvéolos em reparo não permitiu verificar diferenças significantes entre os grupos OVZ ou SHAM, e tratados ou não nos diferentes tempos de reparo; que os animais do grupo tratado com P-MAPA pareceu sofrerem alguma influência do medicamento testado, gerando densidades ópticas mais moduladas quando examinados os tempos de experimento. Verificamos ainda a necessidade de experimentos adicionais com tempo de seguimento maiores para a verificação de diferenças através da metodologia de imagem radiográfica e que a associação dos achados experimentais deste trabalho com outras metodologias sensíveis, como a análise microscópica, deverá indicar o diagnóstico definitivo sobre a provável modulação do medicamento testado sobre o processo de reparo ósseo.

Palavras-chave: Ovariectomia. Imunomodulador. Reparo Alveolar. Radiografia

GARCIA-DA-SILVA, TC. **Avaliation of radiographic density with healing in ovariectomized rats treated with the immunomodulator P-MAPA.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.

Abstract

Osteoporosis is a disease characterized by low bone mass and deterioration of bone tissue mineralization microaquitetural generated by estrogen deficiency displayed by sufferers. Recently osteoporosis has emerged as a major public health problem and comes to the relationship between estrogen deficiency and bone metabolism. The health professionals have great interest in the subject, leading to the study drugs that may assist the process of bone remodeling and repair. Aiming to evaluate the effectiveness of a new immunomodulator, P-MAPA, the process of alveolar repair in ovariectomized rats through the radiographic method, we used 60 rats with three months of age. Thirty were ovariectomized (OVZ) and the other 30 were false-operated (SHAM), and half of each group received the medication mentioned. Was extracted from the upper right central incisor 15 days after ovariectomy or sham surgery. On day seven, 21 and 45 days after extraction, was the sacrifice of animals. After statistical analysis of results obtained by the Tukey test, there was only statistically significant difference when comparing the repair times in each group, however, the difference was not established when groups in certain experimental times. Based on these, we can conclude that the method used for radiographic analysis of alveolar repair in not possible to verify significant differences between groups OVZ or SHAM, and treated or not in different repair times, the treated group with P-MAPA appeared suffer any influence of the drug tested, generating more modulated optical densities when examined times of experiment. We also showed the need for additional experiments with larger follow-up time for the verification of differences using the methodology of radiological images and the association of the experimental findings of this study with other sensitive methods such as microscopic analysis should indicate the definitive diagnosis of the probable modulation of the drug tested on the process of bone repair.

Keywords: Ovariectomy. Immunomodulator. Alveolar Repair. Radiograph

Lista de Figuras

Figura 1 – Osso Normal 2o
Figura 2 – Osso Osteoporótico 21
Figura 3 – Fatores que interferem na Osteoporose 21
Figura 4 – Animais 34
Figura 5 – Dopalen e Anasedan 35
Figura 6 – Benzetacil 35
Figura 7 – Tricotomia e anti-sepsia 36
Figura 8 – Exposição do ovário 36
Figura 9 – Ligadura e Remoção do ovário 36
Figura 10 – Ovário removido 36
Figura 11 – P-MAPA 38
Figura 12 – Sindesmotomia 38
Figura 13 – Luxação dental 38
Figura 14 – Extração dental 39
Figura 15 – Separação do alvéolo 39
Figura 16 – Alvéolo pronto para fixação 39
Figura 17 – Grupo OVZ 40
Figura 18 – Grupo SHAM 40
Figura 19 – Aparelho de raio x GE-100 41
Figura 20 – Disposição do alvéolo, identificação e escada de alumínio sobre a placa óptica 41
Figura 21 – Alvéolo sendo radiografado 42
Figura 22 – Placa Óptica do Sistema Digora 42
Figura 23 – Escada de Alumínio 42
Figura 24 – Scanner (Sistema Digora) 42
Figura 25 – Áreas selecionadas para mensuração de desnisdade radiográfica 43
Figura 26 – Médias gerais de densidade óptica dos grupos experimentais, nos tempos de sacrifíco estudados 47
Figura 27 - Alvéolo com 7 dias de reparo 49
Figura 28 - Alvéolo com 21 dias de reparo 49
Figura 29 - Alvéolo com 45 dias de reparo 49

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Valores de densidade óptica em mmAl do grupo ovariectomizado tratadas, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo	45
Tabela 2 -	Valores de densidade óptica em mmAl do grupo ovariectomizado controle, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo reparo	45
Tabela 3 -	Valores de densidade óptica em mmAl do grupo sham tratadas, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo	46
Tabela 4 -	Valores de densidade óptica em mmAl do grupo sham controle, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo	47
Tabela 5 –	Teste de Tukey para comparação entre grupos nos tempos estudados	48
Tabela 6 –	Teste de Tukey para comparação entre os dias de reparo nos grupos experimentais	48

Lista de Abreviaturas

CEEA = Comitê de ética na Experimentação Animal

cm = centímetro

DMO = Densidade Mineral Óssea

g = grama

IL = interleucina

mA = miliamperes

mg/kg = miligrama por quilo

mg/kg/dia/animal = miligrama por quilo por dia por animal

ml = mililitro

ml/kg = mililitro por quilo

mm = milímetro

mmAl = milímetro de Alumínio

OVZ-C = Grupo Ovariectomizado Controle

OVZ-T = Grupo Ovariectomizado Tratado

P-MAPA = agregado polimérico de fosfolinoleato-palmitoleato de magnésio e amônio proteico com propriedades imunomoduladoras

PGE = prostaglandina

pl/mm = pares de linhas por milímetro

PTH = Hormônio paratireoidiano

SHAM-C = Grupo Cirurgia Simulada Controle

SHAM-T = Grupo Cirurgia Simulada Tratado

TNF = Fator de Necrose Tumoral

Sumário

1. Introdução 14
2. Revisão bibliográfica 18
    2.1 – Tecido Ósseo 19
    2.2 – Osteopenia 20
    2.3 – Modelo Experimental 23
    2.4 – Deficiência de Estrógeno e Metabolismo Ósseo 25
    2.5 – Radiografia 28
3. Proposição 31
4. Materiais e Métodos 33
    4.1- Animais 34
    4.2 – Ovariectomia e Cirurgia Simulada (SHAM) 34
    4.3 – Grupos Experimentais 36
    4.4 – Aplicação do P-MAPA 37
    4.5 – Exodontia 38
    4.6 – Sacrifício dos Animais 39
    4.7 – Análise Radiográfica 40
5. Resultados 44
6. Discussão 50
7. Conclusão 40
Referências bibliográfica 57
Anexo 60
    Anexo 1 61
Apêndices 62
    Apêndice A 63
    Apêndice B 64
    Apêndice C 65
    Apêndice D 66
    Apêndice E 67
    Apêndice F 68
    Apêndice G 69
    Apêndice H 70

Introdução

1. Introdução

O aumento da expectativa de vida da população brasileira, proporcionado por fatores como os avanços obtidos com as pesquisas e descobertas de novos tratamentos culmina na elevação do número de pessoas com idade acima dos 65 anos e vem acompanhado de alterações da senescência. Doenças crônicas como o diabetes, hipertensão, problemas vasculares, artrite e osteoporose são exemplos[1].

Nos últimos tempos a osteoporose tem aparecido como grande problema de saúde pública[2]. Projeções assustadoras são feitas em relação à incidência da doença, onde se estima que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sejam atingidas pela mais importante doença musculoesquelética, não artrítica. No Brasil, a cada ano, 70 mil pessoas fraturam o colo do fêmur, sendo que pelo menos 20% morrem de complicações nos primeiros seis meses e metade nunca mais tem uma vida independente. Além disso, 20% a 30% necessitarão de cuidados institucionais ou de enfermagem domiciliar[3]. Estima-se que em 2020, os custos com fratura de quadril chegarão a 62 bilhões de dólares (IQBAL, 2000), e dentro de 50 anos (Cummings *et. al.*, 1990) este custo alcançará 240 bilhões de dólares. Essa expectativa só mudará caso os pacientes com maior risco a desenvolver a doença forem precocemente identificados e tratados.

O tecido ósseo tem funções básicas como suporte, proteção e locomoção e está sob o controlo de fatores sistêmicos, como os hormônios e fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas. Os sistemas imune e esquelético encontram-se intimamente relacionados e esta área interdisciplinar de estudos intitula-se de Osteoimunologia.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, osteoporose é definida como desordem esquelética sistêmica caracterizada por redução da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade e aumento da susceptibilidade a fraturas (Consensus Development Conference, 1993).

A probabilidade da ocorrência de osteoporose está associada a diversos fatores de risco dependente de cada indivíduo, como fatores genéticos, dieta alimentar, estilo de vida, doenças crônicas e hormônios endógenos; A deficiência

do hormônio ovariano, o estrógeno, no período pós-menopausa[2] e envelhecimento[4] está principalmente relacionada. Com a diminuição da secreção de estrógenos, tem-se como consequência maior atividade metabólica óssea, ou seja, maior ritmo na remodelação óssea, sendo fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose[5].

Devido a relação entre o estrógeno e o metabolismo ósseo, alterando a microarquitetura dos ossos, inclusive os da face, várias áreas da medicina e da odontologia apresentam grande interesse no tecido ósseo e no seu conteúdo mineral, sob diferentes pontos de vista, levando ao estudo de medicamentos que possam auxiliar o processo de remodelação e reparação ósseas[1].

A Imunoterapia na atualidade está totalmente consolidada como uma opção terapêutica valiosa, como resultado do conhecimento científico acumulado e do desenvolvimento de novos fármacos que efetivamente são capazes de exercer atuação no sistema imunológico. Essa classe de substâncias está representada por uma série de moléculas e compostos que possuem a propriedade de auxiliar o controle da atividade imunológica, através da produção de citocinas, são pequenas proteínas secretadas primariamente pelas células do sistema imune que promovem a proliferação ou diferenciação de outras células, tendo um importante papel na regulação da extensão e intensidade da resposta imune[6].

O fármaco P-MAPA por apresentar propriedades biológicas, farmacológicas e terapêuticas extensamente estudadas em sistemas celulares, modelos animais e em estudos preliminares em seres humanos, é classificado, como um medicamento imunomodulador; comprovadamente capaz de estimular a proliferação de linfócitos T e de vários tipos de citocinas, dentre elas a Interleucina-2, IL-12, IL-7, os Interferons, os Fatores de Estímulo da Hematopoese (GM-CSF) e ainda os Fatores de Necrose Tumoral (TNF), incrementar a mielopoese restaurando a atividade das células Natural Killer (NK) quando defectiva ou bloqueada por processos infecciosos e neoplásicos, e mostra-se capaz de estimular a diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos de sangue periférico[6].

Como a principal ferramenta de diagnóstico na odontologia, a imagem radiográfica tem sido utilizada a mais de um século. São rotineiramente empregadas as tomadas radiográficas para determinar a existência, extensão e localização de patologias bucais, inclusive identificando as variações da

normalidade de todas as estruturas ósseas maxilomandibulares pelo acompanhamento do processo de reparação óssea[7].

Na tentativa de realçar a visualização e a interpretação das radiografias, como também diminuir o número de repetições, da dose da radiação e o tempo requerido para a realização das imagens e a eliminação de processamento químico, novas ferramentas foram desenvolvidas para a criação de imagens radiográficas digitais, como o sistema Digora[7].

Unindo a necessidade de pesquisas com novos medicamentos para melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores de osteoporose com a perspectiva de utilização de métodos de mensuração rotineiros para a detecção de suas aplicações, vislumbramos a possibilidade de verificar a variação da densidade óssea no processo de reparo alveolar de ratas com osteopenia tratadas com o imunomodulador P-MAPA, pelo ponto de vista radiográfico.

Revisão Bibliográfica

2- Revisão Bibliográfica

2.1- Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, constituído por células e um material extracelular mineralizado, a matriz óssea (ROSENBERG, 2000). Além disso, todos os ossos são revestidos em suas superfícies tanto externas quanto internas, por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o periósteo e o endósteo, respectivamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)[8].

A matriz óssea é uma estrutura bifásica, englobando uma porção orgânica e outra inorgânica. A parte inorgânica é formada por fibras colágenas (95%), constituídas de colágeno tipo I e pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas, e representa cerca de 35% da matriz óssea. Já o restante da matriz óssea é composta pela parte inorgânica, e os íons mais encontrados são o cálcio e o fósforo existentes basicamente na forma de cristais de hidroxiapatita, o fosfato de cálcio também na forma amorfa, magnésio, sódio, potássio, bicarbonatos. A principal característica de dureza e resistência do osso, são dadas pela associação da hidroxiapatita e as fibras colágenas (HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)[8].

As células que compõem o tecido ósseo são os osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e as osteoprogenitoras. Os osteoblastos ficam dispostos nas superfícies ósseas, sintetizam a parte oragânica da matriz óssea, e participam também da mineralização da mesma, representando assim, as células que produzem tecido ósseo. Os osteócitos, células maduras oriundas dos osteoblastos, ficam aprisionadas na matriz óssea, dentro de uma lacuna, depositando pequenas quantidades de matriz, e tem papel importante no controle da homeostasia do cálcio. Os osteoclastos, por sua vez se localizam na superfície óssea exposta e apresentam a função de reabsorver tecido ósseo. Por fim, as células osteoprogenitoras têm o objetivo de se multiplicarem por mitose e se diferenciarem em osteoblastos, desempenhando um importante papel no crescimento e reparo ósseo(JUNQUEIRA;CARNEIRO, 2004)[8].

Segundo NETO & FERNANDES em 2001, o tecido ósseo é remodelado durante toda a vida, havendo alterações na taxa de remodelamento em diferentes

períodos etários. Estudos avaliando a densidade mineral óssea, em mulheres com idade entre 20 e 50 anos, indicaram que o pico de massa óssea adulto é conseguido ao final ou logo após ter atingido o crescimento linear do esqueleto, meninas com 14 ou 15 anos já adquiriram cerca de 90% de seu pico de massa óssea, completando seu desenvolvimento ao redor da terceira ou quarta décadas de vida; fase essa, onde se inicia o declínio dessa massa acelerado pela menopausa[6]. A massa óssea é o resultado do equilíbrio entre a quantidade máxima de tecido ósseo alcançada durante toda a vida (pico de massa óssea) e a perda óssea associada a eventos fisiológicos ou patológicos (SZEJNFELD, 2000)[9].

2.2- Osteopenia

Diversas desordens resultam do desequilíbrio entre os processos de reabsorção e formação. Em 1941, ALBRIGHT *et. al.* definiram osteoporose do ponto de vista patológico como uma doença na qual há diminuição do tecido ósseo, mas o tecido remanescente encontra-se completamente calcificado, sem alteração de sua composição química. Esse fato fez com que a osteoporose pudesse ser diferenciada da osteomalácia, doença na qual ocorre um atraso no processo de mineralização da matriz óssea, uma vez que ambas as doenças foram consideradas sinônimas por muito tempo. Observações histológicas do osso osteoporótico indicam um espaço trabecular significativamente aumentado pela presença de uma delgada e descontínua estrutura óssea em um osso cortical ligeiramente fino[10].

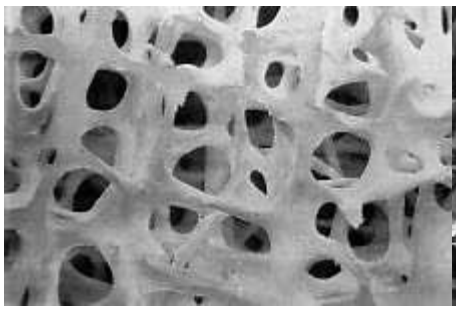


Figura 1 – Osso normal

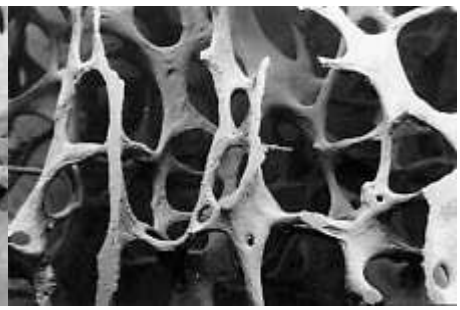


Figura 2 – Osso osteoporótico

A doença pode ser classificada de acordo com sua etiologia, em osteoporose primária e secundária. A osteoporose primária decorre do

envelhecimento ou da diminuição dos níveis plasmáticos de estrógeno na menopausa, sendo esta a causa mais comum de osteoporose na mulher. A secundária, por sua vez, surge em consequência de distúrbios endócrinos, como por exemplo, hiperparatireoidismo, hipertireoidismo e ingestão de glicocorticóides[10].

Segundo LINDSAY *et. al.* (1980), ocorre perda óssea acelerada num período de 10 anos após a menopausa, mas é relativamente maior entre os 2 a 3 primeiros anos. ROOBINS (1994), completa que entre os 30 a 40 anos após a menopausa, as mulheres podem ter perdido 35% de seu osso cortical e 50% de osso trabecular. No entanto, muitas mulheres não apresentam significativa perda de massa óssea durante os anos após a menopausa e talvez 25 a 30% das mulheres não experimentem qualquer fratura em suas vidas. Estas mulheres, provavelmente atingiram alto pico de massa óssea antes da menopausa, e/ou sofreram menos perda óssea após a menopausa, cita WASNICH em 1999[2].

A menor incidência de osteoporose nos homens é devido ao início tardio, ao redor dos 55 anos (EASTELL, 1999), e progressivamente mais lento do declínio de massa óssea. Não ocorre um período de rápida mudança hormonal, o que evita perda acelerada de massa óssea. RINGUE (1998) diz que as diferenças entre os sexos na geometria e remodelamento ósseo também contribuem para a menor taxa de osteoporose encontrada nos homens[2].

A osteoporose está associada principalmente ao envelhecimento e ao nível de estrógeno circulante no organismo, mas diversos fatores aumentam o risco, sejam eles fatores de risco existentes no indivíduo, sexo e/ou fatores externos.

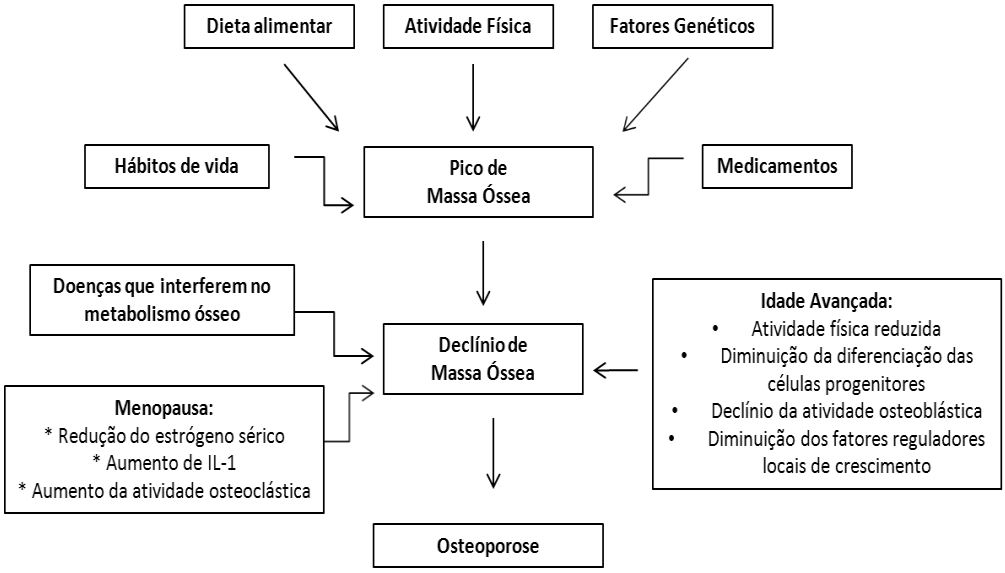


Figura 3 – Fatores que interferem na osteoporose (NETO & FERNANDES, 2001)

A ocorrência de colapso vertebral ou de fraturas provocados por tensão, impacto ou queda, geralmente associados à fragilidade óssea, possibilita detectar a osteoporose. Também se torna evidente através da diminuição da estatura, deformidades posturais (como aumento da cifose torácica) e dor, principalmente resultante do pinçamento de raízes nervosas provenientes do achatamento das vértebras quando de microfraturas (MUNDY, 1999). A osteoporose também pode causar perda de autoestima, necessidade de mudar costumes diários, medo de fratura e perder independência e outros problemas psicossociais e físicos (GOLD & DREZNER, 1995)[2].

Os sinais radiológicos da osteoporose são tardios, só aparecendo sinais de perda óssea quando a perda existente é de 30 a 40% da massa óssea (ARDRAN, 1951; SZEJNFELD, 1997), neste mesmo período, também aparecem as primeiras manifestações clínicas (DANOWSKI, 1996). Outro fator desafiador para a avaliação radiográfica é a grande dependência da imagem obtida com a técnica utilizada[2].

Segundo Lirani-Galvão *et. al.*, em 2006, a osteoporose e as fraturas consequentes dessa condição são complicações de grande importância social e médica nas mulheres pós-menopausa. Segundo os autores, formas de prevenção e tratamento de baixo custo e comum mínimo de efeitos colaterais são necessárias[11].

Relacionando a osteopenia e a odontologia, estudos como o de HIRAI *et. al.*, em 1993, que examinaram, através de radiografias laterais e frontais de vértebras, 44 pacientes idosos edêntulos portadores de osteoporose classificando-os de acordo com o grau de severidade da doença. Obteve-se através de radiografias panorâmicas, a redução da altura da crista alveolar residual. Os autores concluíram que a altura da crista óssea residual nesses pacientes foi correlacionada com a severidade da osteoporose. KRIBBS, em 1990, comparou o osso mandibular de mulheres osteoporóticas e normais e conclui que havia menor massa óssea e espessura de osso cortical e maior porcentagem de edentulismo em mulheres portadoras da doença. LI & NISHIMURA, em 1994, demonstraram histologicamente o efeito da deficiência do estrógeno no remodelamento da crista alveolar após exodontia, utilizando ratas ovariectomizadas. Os autores sugeriram que a deficiência sistêmica do hormônio alterou a diferenciação osteoblástica e o remodelamento ósseo[10].

Por outro lado, KLEMETTI *et. al.* (1993), demonstraram que a densidade óssea

mineral trabecular da espinha lombar e do fêmur não apresentava valores correspondentes na mandíbula. DAO *et. al.* também em 1993, afirmaram que a presença de osteoporose na vértebra não está necessariamente acompanhada de um estado ósseo similar na maxila e mandíbula[10].

Armada *et. al.*, em 2006, avaliaram os efeitos da deficiência dos hormônios sexuais no remodelamento ósseo da mandíbula. Para isso, ratos Wistar machos e fêmeas foram submetidos à remoção de gônadas. As fêmeas foram avaliadas 10, 30, 60 e 90 dias após a cirurgia. Já os machos foram avaliados 90 dias após a castração. Na análise morfológica das mandíbulas, foram observados sinais de reabsorção do osso alveolar 30 dias após a ovariectomia, mas a mesma foi mais intensa 90 dias após a cirurgia. Os machos apresentaram sinais de reabsorção semelhante ao grupo de 60 dias das fêmeas. Os autores concluíram que houve alteração nas mandíbulas em ambos os sexos, devido à deficiência dos hormônios sexuais e que essa foi mais precoce nas ratas dos que nos ratos. Eles defenderam que é importante para os profissionais da área de saúde conhecer o metabolismo ósseo para propiciar qualidade de vida para as pessoas idosas[11].

2.3- Modelo experimental

Os roedores têm sido utilizados há décadas na pesquisa experimental da osteoporose e importantes contribuições têm sido alcançadas com seu uso como modelo desde o final da década de 1950, quando estudos com este animal demonstraram a habilidade do osteoclasto em digerir tecido ósseo (SZEJNFELD, 2000).

Frost & Jee, em 1992, realizaram uma revisão da literatura e concluíram que as ratas podem proporcionar um modelo muito útil de osteopenia humana e de alguns outros problemas esqueléticos humanos importantes, havendo uma resposta similar entre ratas e humanos quanto às influências mecânicas, hormonais e de drogas[11]. Como resultado, a ovariectomia causa perda óssea em ossos como maxila, mandíbula, fêmur, entre outros. Contudo, considerando-se que os sintomas apresentados pelas mulheres acometidas pela doença não são idênticos aos que ocorrem nas ratas neste modelo, considera-se apropriada, a utilização do termo osteopenia, que reflete a diminuição da massa óssea nestes animais em

decorrência da deficiência estrogênica[12]. O mecanismo aceito para perda óssea por deficiência de hormônio estrógeno no esqueleto de ratas se baseia num desequilíbrio com reabsorção excedendo a formação óssea (KALU, 1991).

A utilização de modelos animais experimentais é importante para estudar a eficácia e segurança de novas terapias e analisar a atuação de determinada substância no desenvolvimento de novos medicamentos, o que não pode ser obtido através de pacientes que participam de experimentos clínicos. Alguns experimentos demonstram que o osso do rato e do homem não cresce continuamente durante a sua vida (KALU, 1991). Em ratas, ocorre um rápido crescimento até seis meses de idade. Observa-se um aumento rápido do comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio no fêmur de 1 a 3 meses de idade; depois deste período, a razão de crescimento é insignificante e cessa aos 18 meses.

O modelo de rata idosa (12 meses de idade) não possui mais crescimento ósseo devido ao fato de já ter estabelecido a maturidade óssea. Esse modelo possui uma característica de perda óssea semelhantes às que ocorrem na pós-menopausa humana. No entanto, ratas idosas são caras, sua disponibilidade é limitada e longo período decorre antes que se manifestem os efeitos da ovariectomia sobre seus ossos. Ratas jovens apresentam a fase de crescimento acelerado[12]. Em contraste, ratas maduras (aproximadamente 3 meses de idade) não são muito caras, são facilmente disponíveis, tem maturidade reprodutiva e os efeitos da ovariectomia sobre seus esqueletos se manifestam em um mês ou menos. As características da perda óssea são geralmente, semelhantes àqueles modelos de ratas idosas (KALU, 1991)[9].

Em relação ao reparo ósseo, o rato também provê um bom modelo para análise de agentes na regeneração desta estrutura corporal.

O tempo aguardado após a ovariectomia até o sacrifício dos animais constitui importante variante neste modelo experimental. WRONSKI *et. al.* relatam que nos animais com osteopenia, após 14 dias da cirurgia, uma fase de perda óssea inicial, que se torna gradualmente mais pronunciada e que coincide com o aumento máximo da remodelação óssea. Esta fase se estabiliza por volta dos 100 dias quando a reabsorção assume nível semelhante ao grupo controle. Os dados da taxa de aposição mineral revelam também uma forte evidência de aceleração

da formação óssea nas ratas ovariectomizadas. Infelizmente a taxa de reabsorção não pode ser medida diretamente por morfometria. Sendo assim, pode-se inferir que a perda de massa óssea indica um grande incremento ocorrido na formação óssea[12].

Estudando diferentes tempos de ovariectomia e orquiectomia (ratos machos), MOST *et. al.* perceberam que em cultura de células, a deficiência estrogênica causa aumento transitório na osteoclastogênese. Sete dias após a cirurgia, o potencial osteoclastogênico das células da medula hematopoiética foi acentuado e se estabilizou após 30 dias de deficiência hormonal. Seriam estas células, as responsáveis por uma fase precoce de rápida perda óssea justificando, por exemplo, os resultados encontrados por LANE *et. al.* que estabeleceram a perda da conectividade óssea nos períodos inicias pós-ovariectomia[14].

2.4- Deficiência de estrógeno e metabolismo ósseo

Os hormônios sexuais tem importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea[10]; possuindo várias atuações, entre elas o crescimento, a diferenciação e a função de muitos tecidos. HUGHES *et. al.* investigaram a capacidade do estrógeno afetar a função osteoclástica pela indução da apoptose, e os achados sugerem que os estrógenos podem prevenir perda óssea excessiva antes e após a menopausa pela indução de apoptose dos osteoclastos[13]. O estrógeno tem efeito direto supressivo sobre a atividade osteoclástica. Normalmente receptores de estrógeno estão presentes nos osteoblastos[1].

Quando o estrógeno se liga aos seus receptores, mediadores químicos são secretados, inibindo a atividade de osteoclastos (IQBAL, 2000). Os osteoblastos mediam a atividade osteoclástica por sinalização quando ativados por indutores como o hormônio paratireoidiano (PTH), a interleucina 1 (IL1), o fator de necrose tumoral (TNF) ou a prostaglandina (PGE-2), que estimulam os osteoblastos a secretar fatores que induzem os osteoclastos a reabsorverem osso. A diminuição do estrógeno aumenta a produção de citocinas envolvidas na reabsorção óssea[21,12].

O estrógeno protege o osso contra a ação do hormônio paratireoideano (PTH) e talvez interfira no aumento da síntese e secreção de diversos agentes que

influenciam a formação óssea (LINDSAY, 1995). O PTH é um potente hormônio de reabsorção óssea, o qual aumenta o número e atividade de osteoclastos, promovendo a liberação dos sais de cálcio dos ossos e aumento na absorção de cálcio pelo intestino e pelos túbulos renais. No entanto, PTH também tem um pronunciado efeito estimulador sobre formação de osso trabecular quando administrado, de forma intermitente, em doses relativamente baixas (RODAN & RODAN, 1995)[2].

Dentre as citocinas com propriedades de reabsorção, moduladas pelo estrógeno, destaca-se a interleucina 1 (IL-1), potente indutora da reabsorção óssea, secretada quando da deficiência de estrógeno. Já a IL-4 inibe a diferenciação dos osteoclastos. O TGF-beta, fator mais influenciado pelo estrógeno, diminui o recrutamento e a atividade dos osteoclastos. Os IGFs ao serem liberados (pela atividade osteoclástica), estimulam a proliferação e a diferenciação osteoblástica, além de possuir ação parácrina sobre os osteoclastos. Os estrógenos inibem a reabsorção óssea prevenindo a liberação desses fatores[14].

Segundo BLYTHE & BURCHSBAUM, o estrógeno não altera a fase de mineralização. XU et al. verificaram que a osteoporose influencia a quantidade e a qualidade do calo ósseo, podendo ter relação com o TGF-beta-1 em osteoblastos[1]. KUBO et. al., observaram alterações histológicas osteoporóticas, após 12 semanas de fratura em ratas ovariectomizadas e controle, e diminuição da densidade mineral óssea (DMO), sugerindo que a ovariectomia afeta a reparação óssea em seus períodos tardios e não interfere no processo em suas fases iniciais.

No homem, a primeira evidência de neoformação óssea intra-alveolar surge por volta do décimo dia após exodontia; no rato, tal ocorrência se dá entre o 3º e 5º dia. A cronologia da reparação alveolar após avulsão dental em ratos pode ser verificada em vários trabalhos, como os de GRANDINI *et. al.*, 1970OKAMOTO & RUSSO, 1973; CARVALHO *et. al.*, 1983; OKAMOTO & FIALHO, 1990, dentre outros. O resumo dos eventos ocorridos no processo de reparo alveolar nos dias que sucedem à extração dental pode ser descrito da seguinte maneira[15]:

- 24 horas de pós-operatório: presença de coágulo sanguíneo e feixes de fibras remanescentes do ligamento periodontal.

- 3-5 dias de pós-operatório: proliferação de fibroblastos e capilares neoformados em direção ao coágulo sanguíneo com aumento da quantidade de

células inflamatórias, principalmente linfócitos e neutrófilos, formando o tecido de granulação. Sinais de reabsorção das paredes alveolares com a presença de osteoclastos. Início da formação óssea no 5º dia de pós-operatório.

- 6-7 dias de pós-operatório: continuação da substituição do coágulo sanguíneo por tecido de granulação, proliferação de osteoblastos na periferia do alvéolo e formação de trabéculas ósseas delgadas nos terços apical e em parte do médio.

- 9-10 dias de pós-operatório: presença de tecido conjuntivo mais organizado, bem vascularizado e rico em fibroblastos. Espessamento das trabéculas ósseas dos terços apical e médio, tornando-as mais evidentes. Terço cervical e porção central de todo o alvéolo sem diferenciação óssea.

- 13-21 dias de pós-operatório: diminuição de áreas com remanescente do coágulo sanguíneo e células inflamatórias, intensa atividade osteoblástica com formação de tecido osteóide, preenchimento gradual de todo alvéolo por trabéculas ósseas, sendo que as trabéculas próximas às corticais nos terços apical e médio do alvéolo são mais espessas e bem definidas, enquanto que as do terço cervical são mais imaturas. Porção central do alvéolo ocupado por tecido de granulação, principalmente no terço cervical.

- 24-28 dias de pós-operatório: redução constante do tecido de granulação, ocupação gradual de todos os terços e porção central do alvéolo por trabéculas ósseas e espessamento das trabéculas com diminuição dos espaços intertrabeculares, caracterizando o início do remodelamento ósseo.

- Acima de 28 dias de pós-operatório: remodelação óssea do alvéolo dental e processo alveolar.

Especificamente nas pesquisas realizadas após a exodontia do incisivo superior de ratos, os resultados de análise de cortes histológicos realizados no alvéolo dental indicaram que a cronologia do processo de reparo alveolar se completa aproximadamente no 21º dia de pós-operatório (ALVES & OKAMOTO, 1989; SANTOS JÚNIOR & MELHADO, 1990). Para OKAMOTO & FIALHO, em 1990, o processo de reparo se conclui entre o 24º e 28º dias de pós-operatório.

VICTOR *et.al.* (1997) estabeleceram radiograficamente 30º dia de pós-operatório como término do processo de reparo alveolar após exodontia. BODNER *et. al.*, em 1993, concluíram que a partir do 28º dia de pós-operatório o osso

apresenta-se em fase de remodelação, já que não há deposição mineral suficiente no terço apical do alvéolo que propicie alterações consideráveis na radiopacidade da imagem radiológica. Estes estudos fornecem outros subsídios para corroborar os resultados encontrados por OKAMOTO & FIALHO (1990).

A influência da deficiência de estrógeno sobre o processo de reparo alveolar após exodontia foi descrita por SALOMÃO (1974) constatando histologicamente atraso na proliferação celular, na formação da matriz orgânica e na mineralização do alvéolo dental; e também por TANAKA *et. al.* (2001) que avaliaram quantitativamente a formação óssea alveolar por meio de microscopia eletrônica de varredura e afirmaram não haver atraso significativo influenciado pela deficiência estrogênica. Entretanto, ambos os autores concordam que ocorre um aumento da reabsorção da cortical óssea do alvéolo e do processo alveolar causado pela ovariectomia, podendo afetar o processo de remodelação óssea pós-exodontia.

Contudo, a experiência clínica em relação à alteração na reparação óssea causada pela osteoporose é inconsistente. Poucos estudos foram realizados sobre as diferenças de reparação entre indivíduos normais e com osteoporose e sugerem redução na capacidade de remodelação e de reparação desse tecido[16,17].

2.5- Radiografia

A imageologia sempre foi um recurso utilizado nas diversas áreas médica e odontológica. Desde sua descoberta em 1895, quando o cirurgião dentista alemão Frederic Otto Walkhoff arriscou fazer uma radiografia dentária em sua própria boca apenas 14 dias depois da descoberta dos raios X por Wihelm Röentgen, é utilizada para diagnóstico por imagem, documentações legais e material didático no ensino de áreas afins, conquistando seu lugar e a cada dia ampliando suas aplicações[7].

Frente a duas grandes desvantagens que os filmes radiográficos apresentavam, maior dose de radiação e processamento químico, em 1987 surgiu o primeiro sensor digital intrabucal para radiografias, tornando-se uma alternativa para as radiografias convencionais. Esse sistema foi a Radiovisiografia (RVG-Trohy Radiologie, Vincennes, França), que acoplava um equipamento de raio X convencional aos recursos de informática. Este sensor tem face ativa interligado por

um fio condutor que conecta o chip ao restante do equipamento, exibindo a imagem imediatamente após a sensibilização do sensor pelos raios X, sempre objetivando radiografias de melhor qualidade e uma dose de radiação reduzida (HORNER *et. al.* 1990; WELANDER 1992; VAN DER STELT 1997)[18].

Uma radiografia é composta de tons de cinza, que vão do branco ao preto, denominada assim de analógica por haver uma continuidade entre os vários tons. No processo de digitalização, a imagem é cortada (digitalizada) em pequenos pedaços chamados de pixels (*picture elements*), que representam a menor parte de uma imagem digital, e recebem uma orientação espacial e de densidade no sistema de memória digital. Esta sequência é armazenada e quando a imagem for requerida, cada pixel é decodificado e a imagem aparece no monitor, mostrando o nível de cinza correspondente a sua combinação binária. Os sistemas digitais apresentam de 6 a 20 pares de linhas por milímetro (pl/mm) sendo composto de 8 bits, variando em 256 tons de cinza. Sabe-se, no entanto, que o olho humano é capaz de discernir no máximo 6 pl/mm e 100 tons de cinza diferentes[7].

Esses sistemas digitais são capazes de realizar várias tarefas, como alterar brilho e contraste, girar a imagem, inverter a escala de cinza e aplicar pseudocores sobre os diferentes tons de cinza que facilitam na diferenciação de áreas mais ou menos densas, podendo ainda fazer medidas lineares e angulares[7]. (COSTA, 1999). Outra vantagem é a possibilidade de mensurar a média dos valores de pixels da área selecionada, quando se obtém a correspondência numérica de tais tons. Essa medida se a imagem oferecer uma maior variação de tons de cinza aumenta a capacidade de detectar diferenças sutis de densidade, mesmo que imperceptíveis ao olho humano[18].

As principais desvantagens da utilização do sistema digital seriam o alto custo inicial e no caso dos CCDs (Dispositivo de Carga Acoplada) que apresentam volume acentuado além de rigidez quando comparado ao filme radiográfico convencional.

A técnica radiográfica digital assemelha-se à convencional, mas a fase do processamento na câmara escura é substituída pelo computador, o que elimina os erros inerentes a essa fase. Vários sistemas passaram a ser confeccionados, como no caso, o Digora, introduzido em 1994 por Soredex (Orion Corporation – Helsinki – Filândia). Este sistema emprega uma placa foto-estimulada de fósforo (placa óptica

fósforo-ativada) que é sensibilizada pelos raios X, e a imagem captada fica armazenada na placa até a digitalização feita por um feixe de laser em uma "leitora" que capta a imagem e a transmite para o sistema. Outra vantagem frente aos métodos utilizando filmes convencionais, é que essas placas após exposição a um feixe luminoso branco forte, são despolarizadas, tornando os sensores novamente utilizáveis e as placas reutilizáveis[7].

Proposição

3. Proposição

O objetivo deste trabalho foi avaliar através de densidade radiográfica a influência do imunomodulador P-MAPA no processo de reparo alveolar de ratas ovariectomizadas nos tempos de 7, 21 e 45 dias.

Materiais e Métodos

4. Materiais e Métodos

4.1- Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 60 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 300g, mantidas no biotério do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, sob temperatura constante de 22ºC, alimentadas com 20 gramas de ração comercial padrão (Guabi Nutrilabor®) por dia, por animal e água *ad libitum*.

Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob o protocolo número 2009-002477.

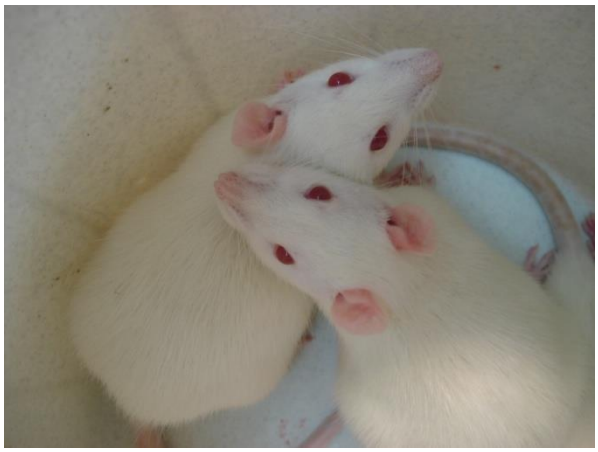


Figura 4 – Animais (ratas Wistar)

4.2- Ovariectomia e cirurgia simulada (SHAM)

Os procedimentos cirúrgicos para a realização da ovariectomia ou cirurgia *SHAM* foram todos realizados com materiais devidamente esterelizados e/ou descartáveis.

O procedimento anestésico utilizado foi anestesia geral com solução de 14,2 mg/kg de cloridrato de xilasina (Anasedan – Bayer do Brasil®), substância com propriedades sedativas, analgésicas e relaxante muscular; e 38,5mg/kg de ketamina base 10%(Dopalen – Agribands do Brasil Ltda®), anestésico geral, ambos com administração intraperitoneal.

Após pesagem inicial e anestesia geral, foi realizada tricotomia da região lateral do corpo, abaixo da costela mais inferior, em ambos os lados e anti-sepsia com álcool iodado. Realizou-se incisão cutânea longitudinal nos animais com extensão média de 1 cm, com tesoura. Em seguida, foi feita a divulsão do tecido subcutâneo e incisão da musculatura, expondo-se assim o ovário e tecidos circunjacentes.

Confeccionou-se ligadura no mesmo, com fio de sutura reabsorvível categute 4.0, para contenção da hemorragia e remoção com os tecidos moles circundantes. A camada muscular também foi suturada com fio reabsorvível categute 4.0; a pele com fio de seda 5.0 e realizada nova anti-sepsia com álcool iodado. Todo o procedimento foi repetido no lado oposto para retirada do segundo ovário.

No grupo que sofreu a falsa cirurgia ou cirurgia simulada (SHAM), o procedimento adotado foi o mesmo, com exceção da ligadura e remoção do ovário e tecidos circunjacentes. Essa técnica foi utilizada para que esse grupo sofresse o mesmo grau de estresse, gerando assim, resultados mais confiáveis.

Na tentativa de amenizar ou impedir o processo de instalação de infecções secundárias, após os procedimentos cirúrgicos foi administrado benzilpeniclina benzatina (Benzetacil) na concentração de 0,1ml/kg.





Medicamentos utilizados para anestesia geral e cobertura antibiótica. **Figura 5** – Dopalen, anestésico geral e Anasedan, sedativo, analgésico e relaxante muscular.
Figura 6 - Benzetacil, antibiótico.

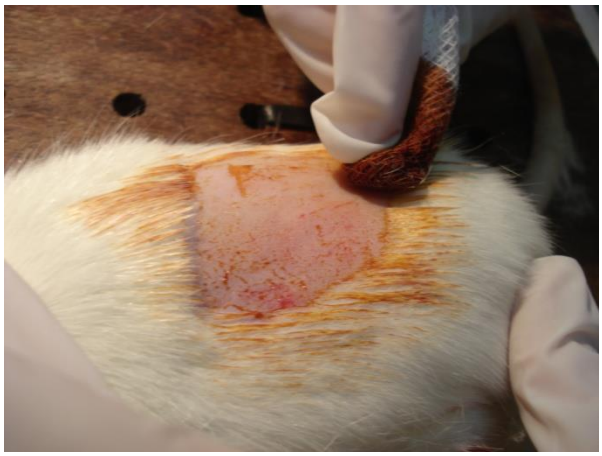
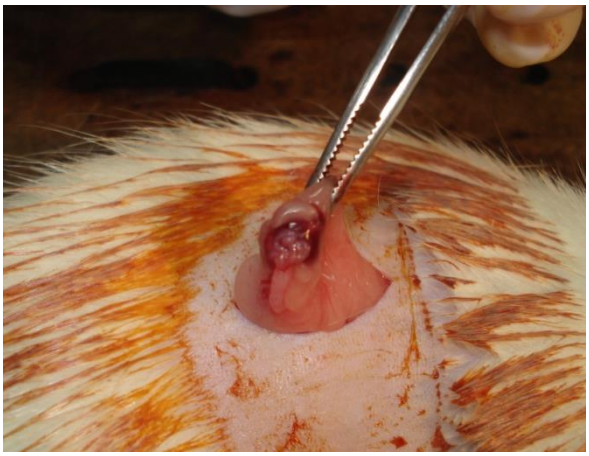



Figura 7 – Tricotomia e anti-sepsia da região a ser operada. **Figura 8** – Exposição do ovário

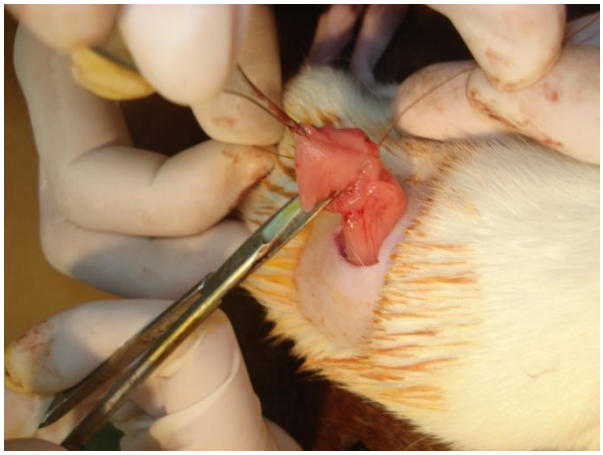
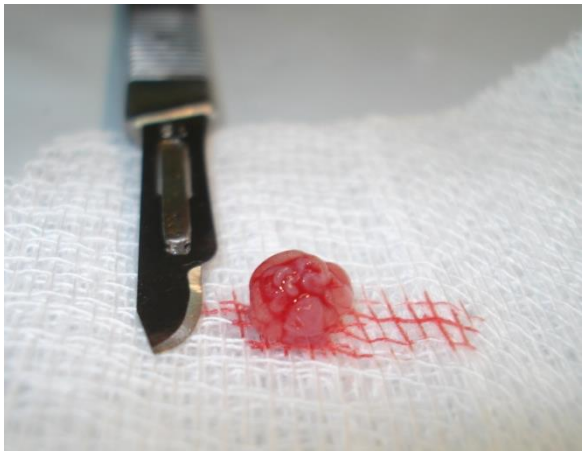



Figura 9 – Ligadura para evitar hemorragia e excisão do ovário. **Figura 10** – Ovário removido

4.3- Grupos Experimentais

Os animais foram divididos de acordo com o procedimento cirúrgico realizado e de acordo com o tratamento recebido, formando-se assim 4 grupos:

• Grupo Ovariectomizado Tratado (OVZ-T) – constituído por 15 ratas ovariectomizadas que receberam administração de P-MAPA.

• Grupo Ovariectomizado Controle (OVZ-C) – constituído por 15 ratas ovariectomizadas que receberam administração de soro fisiológico.

• Grupo SHAM Tratado (SHAM-T) – constituído por 15 ratas falsamente ovariectomizads que receberam administração de P-MAPA.

• Grupo SHAM Controle (SHAM-C) - constituído por 15 ratas falsamente ovariectomizads que receberam administração de soro fisiológico.

Cada gaiola continha 4 animais cada, recendo água *ad libitum*. Determinou-se a quantidade de 20g de ração por animal, ou seja 80g por gaiola, para assegurar o mesmo volume de alimento para todos os grupos, e na tentativa de amenizar a influência do aumento do tecido adiposo na compensação hormonal após a ovariectomia. As ratas foram pesadas duas vezes por semana para controle de peso e cálculo para administração do P-MAPA no grupo tratado, até o dia do sacrifício.

Em todos os animais foi realizada exodontia do incisivo central superior direito, 15 dias após a realização do procedimento cirúrgico (ovariectomia ou SHAM) para análise da reparação alveolar.

4.4- Aplicação do P-MAPA

Um dia antes da exodontia, iniciou-se a aplicação do imunomodulador P-MAPA diariamente, em todos os animais tratados. Para sua ministração, a pesagem das ratas que estavam recebendo o fármaco foi realizada duas vezes por semana, para controle da dosagem. A concentração indicada do imunomodulador é de 5mg para cada 1000 gramas de peso corporal por animal (5mg/kg/dia/animal), diluído em 1 ml de soro fisiológico e inoculado uma vez ao dia por via subcutânea, na região dorsal acima da perna traseira. As ratas tratadas receberam a medicação até o dia do sacrifício.

Os grupos controle, não receberam o imunomodulador, mas para evitar diferenças de estresse entre os grupos pela aplicação diária do fármaco, as ratas que compunham estes grupos receberam diariamente ministração de 1 ml de soro fisiológico, até o dia do sacrifício. A inoculação era subcutânea, na região dorsal acima da perna superior, como no grupo tratado.



Figura 11- Imunomodulador P-MAPA

4.5- Exodontia

Em todos os animais, após anestesia geral com solução de 14,2 mg/kg de cloridrato de xilasina (Anasedan – Bayer do Brasil®), substância com propriedades sedativas e analgésicas, e relaxante muscular; com 38,5mg/kg de ketamina base 10%(Dopalen – Agribands do Brasil Ltda®),anestésico geral, foi realizada a exodontia do incisivo superior direito, após 15 dias da ovariectomia, tempo necessário para a instalação da osteopenia.

Para tanto, após anti-sepsia com álcool iodado, realizou-se sindesmotomia, luxação e a extração do dente. Efetuou-se sutura tipo ponto simples com fio de seda 5.0 e nova anti-sepsia. Foi feita cobertura antibiótica com 0,1ml/kg de benzilpenicilina benzatina (Benzetacil).

Com o intuito de amenizar o desconforto pós-operatório, por dois dias conseguintes à exodontia, forneceu-se tanto ração comercial padrão (palete) como triturada para os animais.



Figura 12 – Sindesmotomia



Figura 13 – Luxação dental



Figura 14 – Extração dental

4.6- Sacrifício dos animais

Aos 7, 21 e 45 dias após a extração, foram sacrificadas 5 ratas de cada grupo com excesso de anestésico.

Os alvéolos foram removidos, separados em alvéolos em reparação (direito) e alvéolos com dente (esquerdo), estes últimos descartados, fixados em formol tamponado 10% e dissecados para posterior análise radiográfica.

No dia do sacrifício, também se avaliou a atrofia dos úteros nos animais ovariectomizados confirmando assim o sucesso da cirurgia.



Figura 15 – Separação do alvéolo

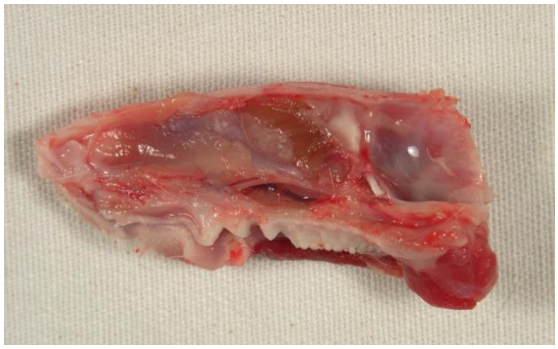
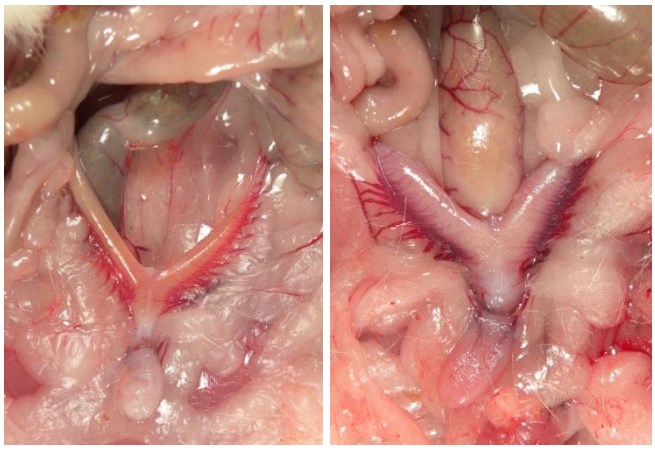


Figura 16 – Alvéolo pronto para fixação



Comparação do efeito da ovariectomia. **Figura 17** – Aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo OVZ e **Figura 18** – Aspecto macroscópico do útero de uma rata do grupo SHAM.

4.7- Análise radiográfica

Para obtenção das imagens radiográficas dos alvéolos submetidos à análise, após fixação em formol e dissecação para evitar interferência de tecidos moles na leitura, foi utilizado um aparelho de raios X GE-100 (General Eletric, Milwaukee, EUA), operando com 50 Kvp, 10 mA, 12 impulsos, e distância foco-placa de 40 cm com incidência do foco de radiação perpendicular ao plano do objeto. A imagem digital foi obtida pela sensibilização da placa óptica do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland), onde a face ativa foto-estimulada de fósforo é sensibilizada pelos raios X, assim como os filmes convencionais. Como referencial densitométrico foi utilizado um penetrômetro de alumínio. Sobre cada placa óptica colocou-se a hemimaxila submetida à extração com o plano sagital apoiado sobre a placa, o penetrômetro e a identificação em chumbo.

As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em scanner a laser do próprio equipamento Digora, e as imagens manipuladas no programa Digora for Windows 1.51. Para a análise densitométrica dos alvéolos, a divisão em terços foi necessária pela impossibilidade de seleção do alvéolo todo. Foram padronizadas áreas em pixels a serem utilizadas em cada um dos itens analisados (terço apical, médio de cervical dos alvéolos em reparação e penetrômetro de alumínio). No terço apical e cervical do alvéolo, a medida utilizada foi de 20x20 pixels; a medida do terço médio do alvéolo foi de 30x30 pixels, devido à sua maior

área mensurável; e por fim nos degraus do penetrômetro de alumínio a área medida foi de 30x70 pixels pelo fato do degrau ser um retângulo.

Selecionada a área de leitura o programa forneceu a média de densidade radiográfica. Foram efetuadas três repetições de medidas em cada um dos itens, em cada imagem, e calculadas as médias dessas repetições, correspondendo à densidade radiográfica do item, e usada a média dos terços como representação geral do alvéolo em análise. Assim como metodologia descrita por Salzedas et.al. (2006), este valor de densidade radiográfica foi convertido em mmAl a partir de uma equação obtida no gráfico de dispersão relacionando os valores de radiopacidade de cada degrau de alumínio e sua espessura correspondente. A equação de cada item foi obtida a partir de 3 valores do gráfico: o valor de radiopacidade do degrau de alumínio mais próximo ao da radiopacidade do item, o degrau acima e o degrau abaixo. Cumpre salientar que para cada imagem radiográfica foi feito um gráfico de dispersão, visto que a radiopacidade dos degraus varia entre as imagens.

Os resultados em mmAl foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre os grupos, nos três tempos.



Figura 19 - aparelho de raios X GE-100 (General Eletric, Milwaukee, EUA)

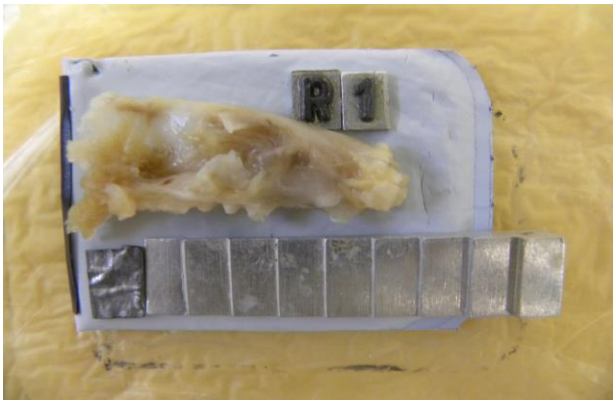


Figura 20 – Disposição do alvéolo, identificação e escada de alumínio sobre a placa óptica



Figura 21- Alvéolos sendo radiografados



Figura 22 – Placa óptica do sistema Digora

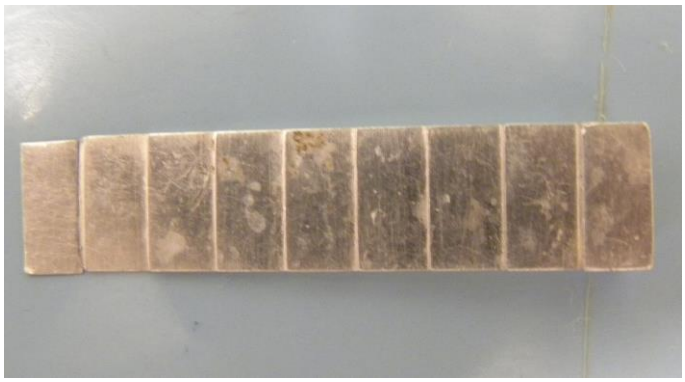


Figura 23 – Escada de Alumínio

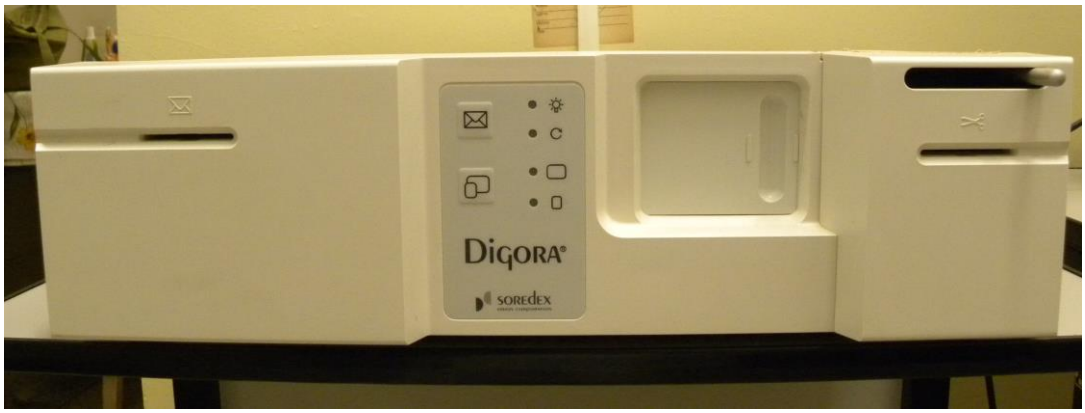


Figura 24 – Scanner (Sistema Digora)

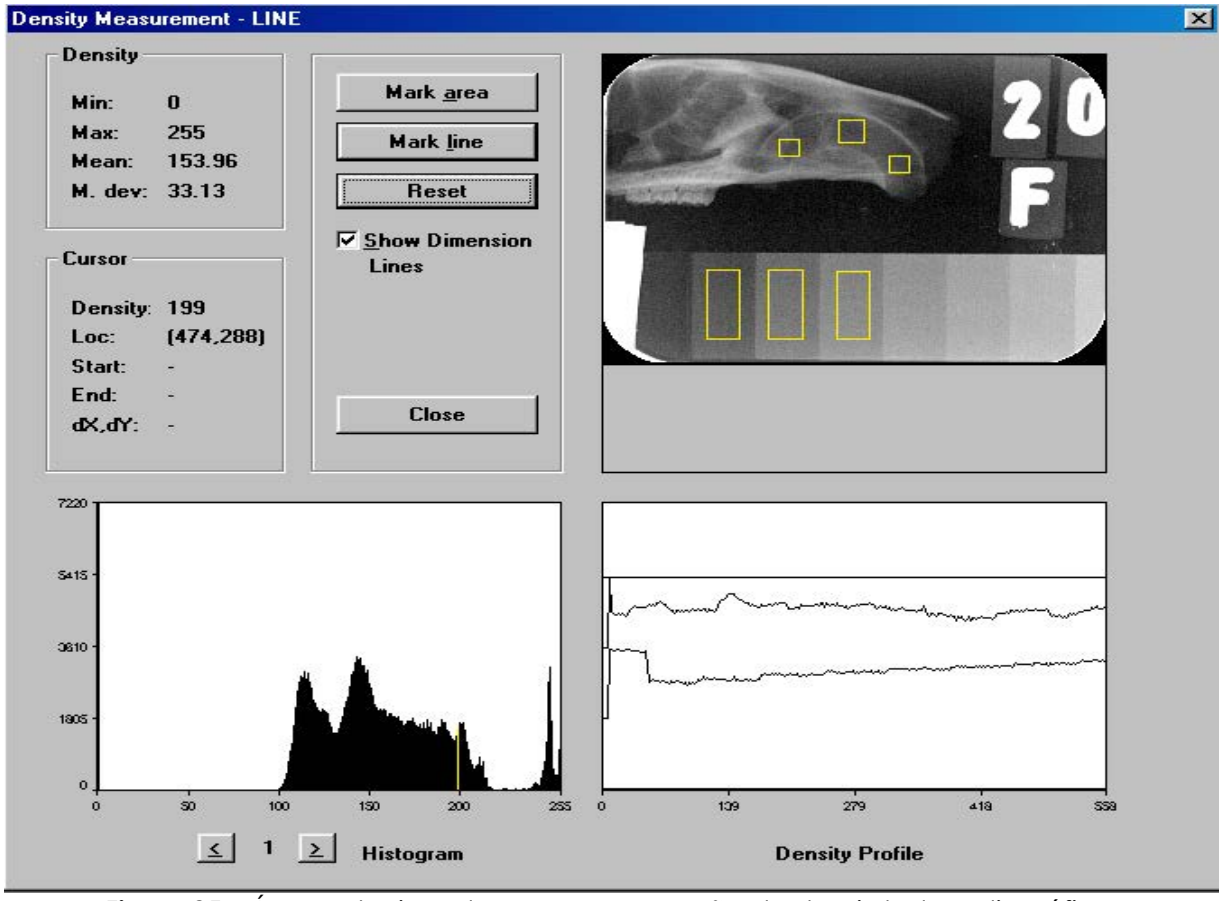


Figura 25 – Áreas selecionadas para mensuração de desnisdade radiográfica

Resultados

5. Resultados

Com a análise radiográfica dos alvéolos em reparação, obtivemos os seguintes resultados de densidade óptica em mmAl. Estes resultados mostram que todos os grupos exibiram médias de densidade crescente com o decorrer do tempo.

Tabela 1 – Valores de densidade óptica em mmAl do grupo ovariectomizado tratadas, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo

OVZ - TRATADAS

	Rata	Cervical	Médio	Apical	**Média**
7 DIAS	R8	0,9251	0,9142	0,8399	**0,8931**
	R5	0,6758	0,7393	0,8175	**0,7442**
	R3	0,8124	0,7215	0,8517	**0,7952**
	R2	0,9721	0,8719	1,0893	**0,9778**
	R1-3	0,7748	0,5782	0,0868	**0,4799**
				Média geral aos 7 dias	**0,7780**
21 DIAS	R8-2	0,4752	0,4713	0,5144	**0,4870**
	R2-4	0,8065	0,8471	1,0020	**0,8852**
	R8-4	1,1962	1,0325	1,2695	**1,1661**
	R9-4	0,8254	0,6243	1,0859	**0,8452**
	R7-4	0,9969	1,0523	0,7967	**0,9486**
				Média geral aos 21 dias	**0,8664**
45 DIAS	R3-2	1,0734	1,2048	1,2454	**1,1745**
	R4-2	1,0907	1,0455	1,1561	**1,0974**
	R5-2	0,9022	1,0273	1,2269	**1,0521**
	R6-2	1,1373	1,1579	1,3151	**1,2034**
	R7-2	1,1493	1,2808	1,2963	**1,2421**
				Média geral aos 45 dias	**1,1539**

Tabela 2 - Valores de densidade óptica em mmAl do grupo ovariectomizado controle, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo

OVZ - CONTROLE

	Rata	Cervical	Médio	Apical	**Média**
7 DIAS	R10	0,7024	0,6021	0,5891	**0,6312**
	R9	0,7287	0,8628	0,8545	**0,8153**
	R4-3	0,6939	0,6871	0,8263	**0,7358**
	R3-3	0,6562	0,6475	0,7715	**0,6917**
	R1-5	0,6998	0,7854	0,8153	**0,7668**
				Média geral aos 7 dias	**0,7282**

	R11-2	0,8833	0,8780	0,9910	**0,9174**
	R13-2	0,7481	0,8363	1,0539	**0,8794**
21 DIAS	R14-4	1,1219	1,1136	0,9700	**1,0685**
	R15-4	1,0593	1,1748	1,2147	**1,1496**
	R12-4	1,2784	1,0346	0,9951	**1,1027**
			Média geral aos 21 dias		**1,0235**
	R9-2	1,1082	1,1799	1,3868	**1,2250**
	R12-2	1,1694	1,1102	1,6655	**1,3150**
45 DIAS	R14-2	0,7537	0,7618	1,0102	**0,8419**
	R15-2	0,9367	1,0188	1,3404	**1,0986**
	R16-2	0,9298	1,2289	1,5736	**1,2441**
			Média geral aos 45 dias		**1,1449**

Tabela 3 - Valores de densidade óptica em mmAl do grupo SHAM tratadas, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo

SHAM - TRATADAS

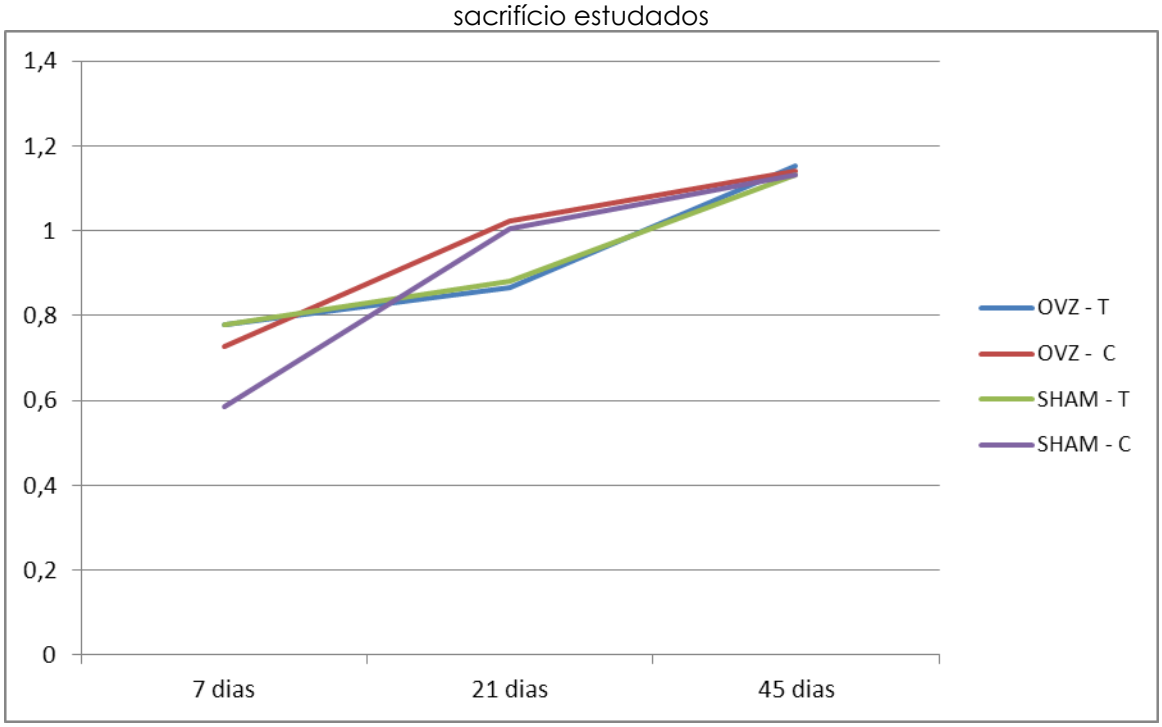
	Rata	Cervical	Médio	Apical	**Média**
	R22	0,8095	0,6750	0,7678	**0,7508**
	R17	0,6455	0,6396	0,6500	**0,6450**
7 DIAS	R16	0,6860	0,7618	0,8038	**0,7505**
	R5-3	0,8720	1,0273	1,2269	**1,0421**
	R6-3	0,7196	0,5361	0,8586	**0,7048**
			Média geral aos 7 dias		**0,7786**
	R10-4	0,9919	0,9867	1,2273	**1,0686**
	R27-2	1,0073	0,8860	1,1251	**1,0061**
21 DIAS	R21-4	1,0025	0,9127	1,3626	**1,0926**
	R23-4	0,6946	0,5436	0,6698	**0,6360**
	R24-4	0,3480	0,6563	0,8213	**0,6085**
			Média geral aos 21 dias		**0,8824**
	R17-2	1,0828	0,9370	0,9939	**1,0046**
	R18-2	1,3857	1,2245	1,4029	**1,3377**
45 DIAS	R19-2	0,5546	1,2475	1,4020	**1,0680**
	R22-2	1,1235	0,9292	1,1450	**1,0659**
	R25-2	1,2301	1,0033	1,3313	**1,1882**
			Média geral aos 45 dias		**1,1329**

Tabela 4 - Valores de densidade óptica em mmAl do grupo SHAM controle, de cada terço analisado do alvéolo em reparação, nos determinados tempos de reparo

SHAM - CONTROLE

	Rata	Cervical	Médio	Apical	**Média**
7 DIAS	R24	0,6552	0,6305	0,6863	**0,6573**
	R20	0,2490	0,2505	0,3155	**0,2717**
	R19	0,8746	0,8295	0,8059	**0,8367**
	R7-3	0,4228	0,4336	0,6077	**0,4880**
	R8-3	0,6789	0,6381	0,7102	**0,6757**
				Média geral aos 7 dias	**0,5859**
21 DIAS	R30-2	0,8922	0,7386	1,1411	**0,9240**
	R18-4	0,7834	0,9925	1,0614	**0,9458**
	R19-4	1,1213	0,9831	1,2256	**1,1100**
	R27-4	0,8893	0,8833	1,1041	**0,9589**
	R29-4	1,1547	0,9597	1,1533	**1,0892**
				Média geral aos 21 dias	**1,0056**
45 DIAS	R26-2	0,9243	0,9544	1,0788	**0,9858**
	R29-2	1,1717	1,1133	1,2643	**1,1831**
	R31-2	0,8726	1,0840	1,1761	**1,0442**
	R33-2	1,1379	1,1062	1,3364	**1,1935**
	R34-2	1,2947	1,1404	1,3193	**1,2515**
				Média geral aos 45 dias	**1,1316**

Figura 26 - Médias gerais de densidade óptica dos grupos experimentais, nos tempos de sacrifício estudados



Com o gráfico 1, podemos verificar a tendência ao mesmo comportamento dos grupos tratados e dos grupos controle, atingindo ao final do experimento, valores praticamente iguais, mesmo o grupo SHAM-C tendo valores iniciais abaixo dos outros grupos.

Tabela 5 – Teste de Tukey para comparação entre grupos nos tempos estudados

	7 dias		**21 dias**		**45 dias**	
OVZ – T	0,7780	**A**	0,8664	**A**	1,1539	**A**
OVZ – C	0,7282	**A**	1,0235	**A**	1,1419	**A**
SHAM – T	0,7786	**A**	0,8824	**A**	1,1329	**A**
SHAM - C	0,5859	**A**	1,0056	**A**	1,1316	**A**

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de Tukey aplicado aos dados dos grupos experimentais comparando os grupos em cada tempo de reparo permitiu avaliar que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos aos sete, 21 e 45 dias. Estes dados podem ser melhor avaliados na tabela 5.

Tabela 6 – Teste de Tukey para comparação entre os dias de reparo nos grupos experimentais

	OVZ-T		**OVZ-C**		**SHAM-T**		**SHAM-C**	
7 dias	0,7780	**A**	0,7282	**A**	0,7786	**A**	0,5859	**A**
21 dias	0,8664	**AB**	1,0235	**B**	0,8824	**AB**	1,0056	**B**
45 dias	1,1539	**B**	1,1419	**B**	1,1329	**B**	1,1316	**B**

*médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente

O teste de Tukey aplicado aos dados para comparação entre os dias em cada grupo possibilitou verificar que no grupo OVZ-T há diferença estatisticamente significante entre o tempo de 7 e 45 dias, assim também como ocorreu no grupo SHAM-T. Nos outros dois grupos, a diferença estatística se apresentou quando comparados os tempos de 7 e 21 dias e 7 e 45 dias.

Podemos observar visualmente através das radiografias as diferenças de radiopacidade intra-alveolar nos 3 tempos experimentais diferentes .

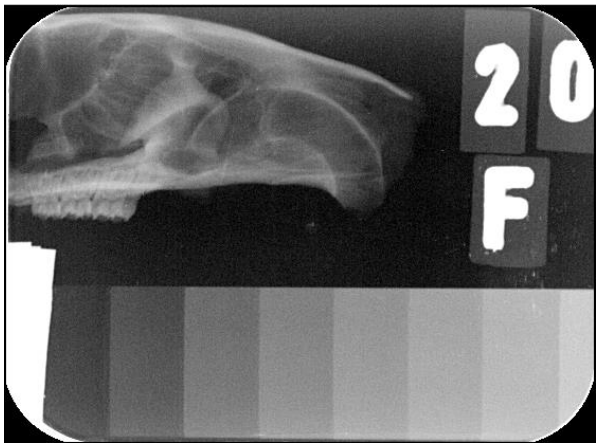


Figura 27 – Alvéolo com 7 dias de reparo

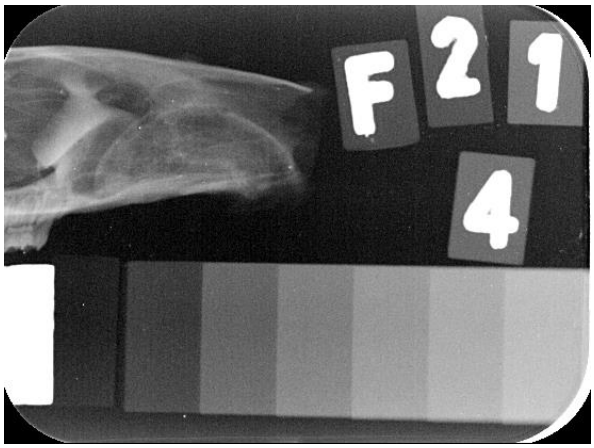


Figura 28 – Alvéolo com 21 dias de reparo



Figura 29 – Alvéolo com 45 dias de reparo

Discussão

6. Discussão

Frente ao envelhecimento da população e o aumento do número de pacientes portadores de osteoporose a doença já é considerada grande problema de saúde pública. Faz-se importante para os profissionais da área de saúde o conhecimento do metabolismo ósseo e suas características para nortear a conduta em pacientes portadores de alterações neste tecido. A utilização de modelos animais experimentais para estudar a eficácia e segurança de novas terapias e analisar a atuação de determinada substância no desenvolvimento de novos medicamentos é relevante porque não pode ser obtido através de pacientes que participam de experimentos clínicos[1,2].

A metodologia utilizada para simular os efeitos da osteoporose em mulheres pós-menopausa, que corresponde à indução experimental de osteopenia em ratas pelo procedimento de ovariectomia, constitui técnica bem consolidada e é considerada uma boa metodologia para o estudo das alterações osteopênicas e dos possíveis mecanismos de reparo alterados diante delas, de acordo com a literatura[4,12].

Após a ovariectomia, o tempo aguardado para a realização da cirurgia de exodontia foi determinado após revisão de estudos a respeito da remodelação óssea, determinando o menor período de deficiência estrogênica capaz de desencadear osteopenia. Verificou-se então, que após 14 dias da cirurgia, uma fase de perda óssea inicial, que se torna gradualmente mais pronunciada e que coincide com o aumento máximo da remodelação óssea. Diante desses dados, o período de quinze dias foi escolhido, considerando-se que já havia alteração da remodelação óssea[19, 20].

No presente trabalho, os grupos experimentais foram alimentados diariamente com ração comercial. A quantidade de ração de todos os grupos foi controlada, para evitar ganho de peso exagerado pelos animais ovariectomizados, fenômeno relatado na literatura. Foi revisto que o controle da quantidade de ração ministrada pode ser, por exemplo, o *pair feeding*, administrando-se na semana seguinte, a determinado grupo de animais, a média consumida pelo grupo controle na semana anterior. Outra maneira de controle foi relatada por KAWAMOTO & NAGAOKA, pesando-se a mesma quantidade diária de alimentação, para cada

animal a quantidade de 20 gramas, metodologia seguida neste estudo[21].

Tenta-se evitar o ganho de peso exagerado porque este poderia ser um mecanismo de proteção nas ratas ovariectomizadas que utilizam os tecidos adiposos como fonte de hormônios estrogênicos, podendo diminuir a perda óssea desejada no modelo de estudo. Encontrou-se que o osso, as glândulas mamárias, a placenta e o tecido adiposo expressam a aromatase, enzima envolvida na síntese dos estrógenos[22].

A escolha do fármaco imunomodulador P-MAPA para este experimento se deu pelo fato de ser um medicamento novo promissor que está em fase de experimentos e ainda não conhecemos sua atuação sobre processo de reparo de alveolar e em deficiências hormonais, no caso, osteoporose. No entanto, já estão bem estabelecidos os benefícios de sua atuação sobre efeito antiviral, efeito imunoprotetor e terapêutico em propriedades antitumorais com regressão tumoral e aumento da sobrevida. Apresenta-se com grande margem de segurança para utilização terapêutica, não apresentando toxicidade em todos os modelos experimentais utilizados. A influência nas atividades imunomoduladoras nos processos inflamatórios e reparatórios no alvéolo dentário se positivos, poderiam ser extrapolados à diária clínica em pacientes portadores ou não de osteoporose, em situações como extração dentárias, enxertos ósseos ou implantes dentários.

Neste experimento, obtivemos através da análise radiográfica os resultados de densidade óptica dos alvéolos, que foram posteriormente submetidos à estatística e teste de Tukey. Após avaliação dos dados, podemos verificar que não houve diferença estatisticamente significante quando se comparou a densidade dos alvéolos dos grupos nos três diferentes tempos estudados de sete, 21 e 45 dias.

Ao compararmos os tempos dentro de cada grupo estudado a diferença estatística apresentou-se entre os tempos de sete e 45 dias, em ambos os grupos tratados (OVZ-T e SHAM-T), sugerindo que a medicação aplicada nos animais tratados possa ter gerado algum tipo de influência modulando o reparo desses grupos e fazendo com que a densidade tivesse uma variação de valores entre os tempos de forma mais uniforme. Nos grupos controle (OVZ-C e SHAM-C), a diferença estatística mostrou-se tanto na comparação entre os tempos de sete e 21 dias, como também entre sete e 45 dias, verificando assim uma variação maior de densidade óptica nos grupos controle no intervalo dos sete aos 21 dias e uma

variação de valores menor dos 21 aos 45 dias pós-operatório. Todos os grupos apresentaram valores de densidades ópticas praticamente iguais aos 45 dias.

No tempo de 7 dias do grupo SHAM-C, mesmo não apresentando diferença estatisticamente significante, verificamos um valor médio abaixo do encontrado nos outros grupos, isto devido a dois animais apresentarem valores de densidade abaixo dos demais, provavelmente devido a grande variabilidade individual dos animais e suas respectivas respostas fisiológicas. Sendo um grupo não tratado, podemos inclusive inferir que processos infecciosos importantes poderiam estar instalados.

O uso das radiografias no atendimento odontológico é de uso rotineiro, mas vale lembrar que ao analisarmos uma imagem radiográfica a densidade radiográfica determinada não gera diagnóstico definitivo do local do reparo e por isso há necessidade de exames complementares. Dentro de um alvéolo podemos ter coágulo sanguíneo, tecido de granulação, trabéculas ósseas dentre outros, no entanto, a radiografia não distingue as estruturas ou tecidos. Ao analisarmos um alvéolo dental em reparo somente através da análise radiográfica podemos apenas inferir o que está ocorrendo, ou em que fase do reparo se encontra. A definição dos eventos apenas pelo método radiográfico não é possível porque a imagem radiográfica nos apresenta o grau de densidade da região e não de sua população celular e/ou tecidual.

No homem, a primeira evidência da neoformação óssea intra-alveolar surge por volta do décimo dia após a exodontia. No rato, tal ocorrência se dá entre o 3º e 4º dia. Uma vez iniciada a osteogênese, as trabéculas ósseas em formação circundadas por células osteoblásticas começam a projetar-se da periferia para o centro. Cortes histológicos perpendiculares às referidas trabéculas dão a falsa impressão de ser o calo ósseo intra-alveolar. Alvéolos completamente preenchidos por tecido imaturo geram imagens radiolúcidas quando analisada radiograficamente, isto explica a falta de coerência existente entre a imagem radiográfica e o aspecto histológico dos alvéolos em cicatrização.

Outro fator desafiador para a avaliação radiográfica é a grande dependência da imagem obtida com a técnica utilizada[2]. Mesmo com os avanços conseguidos pelos métodos radiográficos, como na imagem radiográfica digital, que diminui os erros que poderiam ocorrer quando da técnica comum, este ainda não é capaz de detectar pequenas alterações nas imagens radiográficas. Talvez

também pelo fato da osteoporose ser uma doença que atua sobre tecidos já mineralizados e não interferir no processo de mineralização, segundo BLYTHE & BURCHSBAUM, e assim os sinais radiológicos da osteoporose serem tardios, só aparecendo sinais de perda óssea quando a perda existente é de 30 a 40% da massa óssea (ARDRAN, 1951; SZEJNFELD, 1997).

A melhor maneira de se fazer uma análise por imagem que pudesse gerar resultados confiáveis frente à formação e reabsorção de tecido ósseo ou não dentro do alvéolo seria calculando-se a densidade mineral óssea (DMO), através da densitometria óssea. Devido ao tamanho reduzido do alvéolo do rato, este exame se torna incapaz de ser realizado neste tipo de estudo.

Assim, sugerimos que a não existência de diferenças estatísticas significantes entre os grupos possa ser gerada pelo maior tempo preconizado pelo trabalho, de 45 dias. Talvez em grupos mais tardios de 60, 90 ou 120 dias consigamos verificar as diferenças esperadas apenas pelo método radiográfico. Acrescentamos que haverá como próxima etapa dos grupos utilizados a confecção de processamento laboratorial e análise microscópica para que a associação com este método de avaliação nos mostre mais claramente o que se passa no processo de reparo das amostras coletadas.

Conclusão

7. Conclusão

A análise dos resultados obtidos com este experimento possibilitou concluir quanto à reparação alveolar sob efeito de imunomodulador em animais ovariectomizados que:

1 – O método radiográfico utilizado para análise dos alvéolos em reparo, não permitiu verificar diferenças significantes entre os grupos OVZ ou SHAM, e tratados ou não nos diferentes tempos de reparo;

2 – Os animais do grupo tratado com P-MAPA pareceu sofrerem alguma influência do medicamento testado, gerando densidades ópticas mais moduladas quando compara-se os tempos de experimento;

3 – Há a necessidade de experimentos adicionais com tempo de seguimento maiores para a verificação de diferenças através da metodologia de imagem radiográfica;

4 – A associação dos achados experimentais deste trabalho com outras metodologias sensíveis, como a análise microscópica, deverá indicar o diagnóstico definitivo sobre a provável modulação do medicamento testado sobre o processo de reparo ósseo.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. AMADEI, S. U. *et al*. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea, J Bras Patol Med Lab. v. 42 n. 1, p. 5-12, fevereiro 2006

2. CARVALHO, DCL (2001). Ação do Ultra-som de Baixa Intensidade em ossos de Ratas Osteopênicas. São Carlos. Dissertação (mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo

3. MOREIRA, C. Osteoporose. In: ROCHA, M. O. C. et al. *Terapêuticaclínica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. cap.67, p.588-604.

4. KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, H. Minireview: transcriptional regulation indevelopment bone. *Endocrinology*, v. 146, n. 3, p.1012-7, 2005.

5. BANDEIRA, F. *et al. Osteoporose*. 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi,2000. 390p.

6. Monografia de Produto, acesso em 26 de março de 2010. http://www.farmabrasilis.org.br/interna_periodicos_publicacoes.php?id=120

7. SALZEDAS, L.M.P.; LOUZADA, M.J.Q.; OLIVEIRA FILHO,A.B. Radiopacity of restorative materils using digital images. *J Appl Oral Sci* 2006;14(2):147-52

8. CONEGLIAN, PZA.; Avaliação do processoevolutivo de reparo ósseo frente ao Sulfato de cálcio e à Hidroxiapatita. Estudo microscópico em Alvéolos dentários de Ratos. Dissertação (mestrado). Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo. 2007

9. MALOSO, TG.; Análise de um modelo do processo de instalação de Osteopenia em Ossos Corticais de Ratas Ovariectomizadas. Dissertação (mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. São Carlos. 2004

10. DUARTE, PM. Efeito do estrógeno e da Calcitonina sobre o reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em ratas ovariectomizadas. Dissertação (mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas. Piracicaba. 2003

11. FREITAS, DQ. Avaliação do efeito radioprotetor do selenito de sódio na Reparação de Tíbias de Ratas Ovariectomizadas. Dissertação (doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de

Campinas. Piracicaba. 2007

12. PRADO, RF. Efeitos da osteopenia no reparo ósseo alveolar de ratas. 2008. Dissertação (mestrado). São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. 2008

13. GRAY, T. K. Estrogens and skeleton: cellular and molecular mechanisms. *J Steroid Biochem*, v. 34, n. 1-6, p. 285-7, 1989.

14. TURNER, R. T.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Rev*, v. 15, n. 3, p. 275-300, 1994.

15. MELO, A. estudo da reparação do alvéolo dental de ratos Wistar preenchidocom osso autógeno particulado após exodontia. Dissertação (mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo. São Paulo. 2007

16. 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.

17. CESNJAJ, M.; STAVLJENIC, A.; VUKICEVIC, S. Decrease osteoinductive potential of bone matrix from ovariectomized rats. *Acta Orthop Scand,* v. 62, n. 5, p. 471-5, 1991.

18. POLETI, ML. Análise morfométrica, radiográfica e molecular do processo de reparo alveolar após terapia fotodinâmica antimicrobiano em ratos Wistar.Dissertação (mestrado) Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Bauru. 2009

19. TANAKA, M. et.al.; Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. J Periodontal Res. 2002 Apr., 37(2): 161-5

20. WRONSKI, TJ, et. al., Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. Calcif tissue int. 1988 Sept., 43(3): 179-83

21. KAWAMOTO, S, NAGAOKA, E. The effect of oestrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. J Oral Rehabil. 200 July; 27(7): 587-94

22. HARRISON E, et.al. The effect of soybean protein on bone loss in a rat model of postmenopausal osteoporosis. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)1998. Apr,; 44(2): 257-68

Anexo

Anexo 1

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto ***"AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO IMUNOMODULADOR P-MAPA EM RATAS OVARECTOMIZADAS"*** sob responsabilidade do ***Profa. Dra. Renata Callestini Felipini*** e colaboração de **Gabryela Nascimento Canedo, Leonardo Bueno Torcato, Leonardo Bueno Torcato, Priscilla Cardoso Lazari, Tales Candido Garcia da Silva, Thalles Mayckon Vieira Araújo** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 23/04/2009 de acordo com o protocolo 2009-002477.

Araçatuba, 23 de Abril de 2009

Prof.ª Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária – Departamento de Apoio , Produção e Saúde Animal, Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba – SP
Tel (18) 3636- 1350 Fax (18) 3636- 1352 E-mail: dapsa@fmva.unesp.br

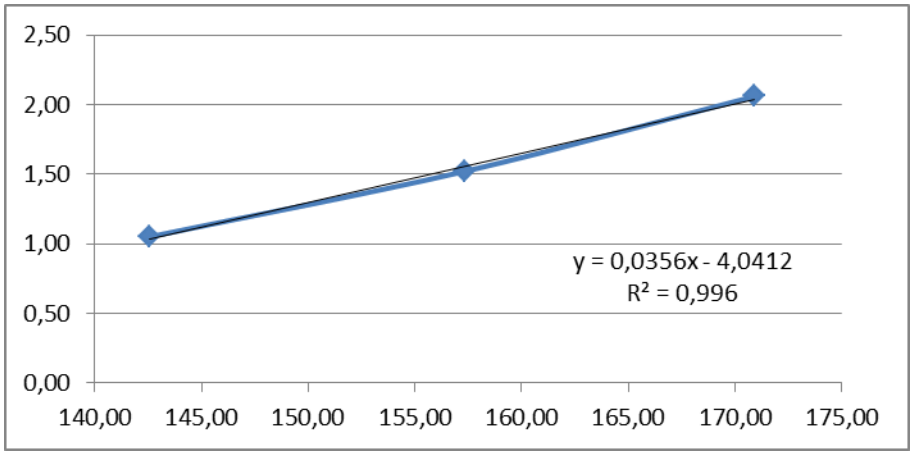
Apêndices

Apêndice A

Equivalêcia da Densidade do degrau em mmAl

Rata	Densidade do Degrau	Degrau (mmAl)
	142,57	1,05
R29-2	157,32	1,52
	170,91	2,06

Equação para encontrar a equivalência em mmAl nos terços dos alvéolos analisados



Apêndice B

Comparação dos grupos aos 7 dias

	OVZ – T	OVZ - C	SHAM - T	SHAM – C
Number of values	5	5	5	5
Minimum	0,4799	0,6312	0,645	0,2717
Median	0,7952	0,7358	0,7505	0,6573
Maximum	0,9778	0,8153	1,042	0,8367
Mean	0,778	0,7282	0,7786	0,5859
Std. Deviation	0,1894	0,07049	0,1535	0,2147
Std. Error	0,0847	0,03152	0,06866	0,09601
Lower 95% CI	0,5429	0,6406	0,588	0,3193
Upper 95% CI	1,013	0,8157	0,9693	0,8525
Normality Test				
KS distance	0,2291	0,1432	0,3719	0,2303
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	Ns	Ns	ns	Ns

Resultado do teste estatístico

One-way analysis of variance					
P value	0,2529				
P value summary	Ns				
Are means signif. different? (P < 0.05)	No				
Number of groups	4				
F	1,499				
R squared	0,2194				
Bartlett's test for equal variances					
Bartlett's statistic (corrected)	3,989				
P value	0,2626				
P value summary	Ns				
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No				
ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	0,1242	3	0,0414		
Residual (within columns)	0,442	16	0,02763		
Total	0,5662	19			
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff	
OVZ - TRATADAS vs OVZ - CONTROLE	0,04988	0,6711	P > 0.05	-0.2509 to 0.3506	
OVZ - TRATADAS vs SHAM - TRATADAS	-0,0006	0,008073	P > 0.05	-0.3013 to 0.3001	
OVZ - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	0,1922	2,585	P > 0.05	-0.1086 to 0.4929	
OVZ - CONTROLE vs SHAM - TRATADAS	-0,05048	0,6791	P > 0.05	-0.3512 to 0.2503	
OVZ - CONTROLE vs SHAM - CONTROLE	0,1423	1,914	P > 0.05	-0.1585 to 0.4430	
SHAM - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	0,1928	2,593	P > 0.05	-0.1080 to 0.4935	

Apêndice C

Comparação dos grupos aos 21 dias

	OVZ – T	**OVZ - C**	**SHAM - T**	**SHAM - C**
Number of values	5	5	5	5
Minimum	0,487	0,8794	0,6085	0,924
Median	0,8852	1,069	1,006	0,9589
Maximum	1,166	1,15	1,093	1,11
Mean	0,8664	1,024	0,8824	1,006
Std. Deviation	0,2456	0,1186	0,2397	0,08704
Std. Error	0,1098	0,05302	0,1072	0,03893
Lower 95% CI	0,5614	0,8763	0,5847	0,8975
Upper 95% CI	1,171	1,171	1,18	1,114
Normality Test				
KS distance	0,2656	0,2478	0,2971	0,3041
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	Ns	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,4386			
P value summary	Ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	4			
F	0,953			
R squared	0,1516			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	5,021			
P value	0,1702			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,09966	3	0,03322	
Residual (within columns)	0,5577	16	0,03486	
Total	0,6574	19		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
OVZ - TRATADAS vs OVZ - CONTROLE	-0,1571	1,882	P > 0.05	-0.4949 to 0.1807
OVZ - TRATADAS vs SHAM - TRATADAS	-0,01594	0,1909	P > 0.05	-0.3538 to 0.3219
OVZ - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	-0,1392	1,667	P > 0.05	-0.4770 to 0.1987
OVZ - CONTROLE vs SHAM - TRATADAS	0,1412	1,691	P > 0.05	-0.1967 to 0.4790
OVZ - CONTROLE vs SHAM - CONTROLE	0,01794	0,2149	P > 0.05	-0.3199 to 0.3558
SHAM - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	-0,1232	1,476	P > 0.05	-0.4610 to 0.2146

Apêndice D

Comparaçãodos grupos as 45 dias

	OVZ – T	**OVZ - C**	**SHAM - T**	**SHAM - C**
Number of values	5	5	5	5
Minimum	1,052	0,8419	1,005	0,9858
Median	1,175	1,225	1,068	1,183
Maximum	1,242	1,315	1,338	1,252
Mean	1,154	1,145	1,133	1,132
Std. Deviation	0,0778	0,1865	0,1324	0,1115
Std. Error	0,03479	0,08341	0,05923	0,04988
Lower 95% CI	1,057	0,9133	0,9684	0,9931
Upper 95% CI	1,25	1,377	1,297	1,27
Normality Test				
KS distance	0,2044	0,2662	0,2879	0,2778
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	Ns	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,9922			
P value summary	Ns			
Are means signif. different? (P < 0.05)	No			
Number of groups	4			
F	0,03159			
R squared	0,005888			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	2,754			
P value	0,4311			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,001678	3	0,000559	
Residual (within columns)	0,2833	16	0,0177	
Total	0,2849	19		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
OVZ - TRATADAS vs OVZ - CONTROLE	0,00898	0,1509	P > 0.05	-0.2318 to 0.2497
OVZ - TRATADAS vs SHAM - TRATADAS	0,02102	0,3532	P > 0.05	-0.2197 to 0.2618
OVZ - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	0,02228	0,3744	P > 0.05	-0.2185 to 0.2630
OVZ - CONTROLE vs SHAM - TRATADAS	0,01204	0,2023	P > 0.05	-0.2287 to 0.2528
OVZ - CONTROLE vs SHAM - CONTROLE	0,0133	0,2235	P > 0.05	-0.2275 to 0.2541
SHAM - TRATADAS vs SHAM - CONTROLE	0,00126	0,02117	P > 0.05	-0.2395 to 0.2420

Apêndice E

Comparação dos tempos de reparo no grupo OVZ-T

	7 DIAS	**21 DIAS**	**45 DIAS**
Number of values	5	5	5
Minimum	0,4799	0,487	1,052
Median	0,7952	0,8852	1,175
Maximum	0,9778	1,166	1,242
Mean	0,778	0,8664	1,154
Std. Deviation	0,1894	0,2456	0,0778
Std. Error	0,0847	0,1098	0,03479
Lower 95% CI	0,5429	0,5614	1,057
Upper 95% CI	1,013	1,171	1,25
Normality Test			
KS distance	0,2291	0,2656	0,2044
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,0185			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	5,666			
R squared	0,4857			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	3,983			
P value	0,1365			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,3862	2	0,1931	
Residual (within columns)	0,409	12	0,03408	
Total	0,7952	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
7 DIAS vs 21 DIAS	-0,08838	1,07	P > 0.05	-0.3999 to 0.2231
7 DIAS vs 45 DIAS	-0,3759	4,552	P < 0.05	-0.6874 to -0.06435
21 DIAS vs 45 DIAS	-0,2875	3,482	P > 0.05	-0.5990 to 0.02403

Apêndice F

Comparação dos tempos de reparo no grupo OVZ-C

	7 DIAS	**21 DIAS**	**45 DIAS**
Number of values	5	5	5
Minimum	0,6312	0,8794	0,8419
Median	0,7358	1,069	1,225
Maximum	0,8153	1,15	1,315
Mean	0,7282	1,024	1,145
Std. Deviation	0,07049	0,1186	0,1865
Std. Error	0,03152	0,05302	0,08341
Lower 95% CI	0,6406	0,8763	0,9133
Upper 95% CI	0,8157	1,171	1,377
Normality Test			
KS distance	0,1432	0,2478	0,2662
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,0011			
P value summary	**			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	12,81			
R squared	0,681			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	3,115			
P value	0,2107			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,4594	2	0,2297	
Residual (within columns)	0,2152	12	0,01794	
Total	0,6747	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
7 DIAS vs 21 DIAS	-0,2954	4,931	P < 0.05	-0.5213 to -0.06938
7 DIAS vs 45 DIAS	-0,4168	6,958	P < 0.001	-0.6427 to -0.1908
21 DIAS vs 45 DIAS	-0,1214	2,027	P > 0.05	-0.3474 to 0.1046

Apêndice G

Comparação dos tempos de reparo no grupo SHAM-T

	7 DIAS	**21 DIAS**	**45 DIAS**
Number of values	5	5	5
Minimum	0,645	0,6085	1,005
Median	0,7505	1,006	1,068
Maximum	1,042	1,093	1,338
Mean	0,7786	0,8824	1,133
Std. Deviation	0,1535	0,2397	0,1324
Std. Error	0,06866	0,1072	0,05923
Lower 95% CI	0,588	0,5847	0,9684
Upper 95% CI	0,9693	1,18	1,297
Normality Test			
KS distance	0,3719	0,2971	0,2879
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,0257			
P value summary	*			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	5,046			
R squared	0,4568			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	1,444			
P value	0,4859			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,3317	2	0,1658	
Residual (within columns)	0,3943	12	0,03286	
Total	0,726	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
7 DIAS vs 21 DIAS	-0,1037	1,279	P > 0.05	-0.4096 to 0.2022
7 DIAS vs 45 DIAS	-0,3542	4,37	P < 0.05	-0.6601 to -0.04836
21 DIAS vs 45 DIAS	-0,2505	3,09	P > 0.05	-0.5564 to 0.05536

Apêndice H

Comparação dos tempos de reparo no grupo SHAM-C

	7 DIAS	**21 DIAS**	**45 DIAS**
Number of values	5	5	5
Minimum	0,2717	0,924	0,9858
Median	0,6573	0,9589	1,183
Maximum	0,8367	1,11	1,252
Mean	0,5859	1,006	1,132
Std. Deviation	0,2147	0,08704	0,1115
Std. Error	0,09601	0,03893	0,04988
Lower 95% CI	0,3193	0,8975	0,9931
Upper 95% CI	0,8525	1,114	1,27
Normality Test			
KS distance	0,2303	0,3041	0,2778
P value	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (*=0.05)?	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns

One-way analysis of variance				
P value	0,0002			
P value summary	***			
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes			
Number of groups	3			
F	18,53			
R squared	0,7554			
Bartlett's test for equal variances				
Bartlett's statistic (corrected)	3,246			
P value	0,1974			
P value summary	Ns			
Do the variances differ signif. (P < 0.05)	No			
ANOVA Table	SS	df	MS	
Treatment (between columns)	0,8164	2	0,4082	
Residual (within columns)	0,2644	12	0,02204	
Total	1,081	14		
Tukey's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	q	P value	95% CI of diff
7 DIAS vs 21 DIAS	-0,4197	6,322	P < 0.01	-0.6702 to -0.1692
7 DIAS vs 45 DIAS	-0,5457	8,221	P < 0.001	-0.7962 to -0.2953
21 DIAS vs 45 DIAS	-0,126	1,899	P > 0.05	-0.3765 to 0.1244