

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**JÉSSICA ROMANO MATACHANA GONZALEZ DE MOURA**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU  
RALOXIFENO SOBRE O COLÁGENO DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL EM RATAS OSTEOPORÓTICAS**

BAURU  
2012

**JÉSSICA ROMANO MATACHANA GONZALEZ DE MOURA**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU  
RALOXIFENO SOBRE O COLÁGENO DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL EM RATAS OSTEOPORÓTICAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde, como parte do requisito para obtenção do grau de Cirurgião Dentista, sob orientação da Profa. Dr<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto.

BAURU  
2012

M929e

Moura, Jéssica Romano Matachana Gonzalez de

Efeito do tratamento com alendronato ou raloxifeno sobre o colágeno do ligamento periodontal em ratas osteoporóticas/  
Jéssica Romano Matachana Gonzalez de Moura -- 2012.  
31f.

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Ligamento periodontal. 2. Osteoporose. 3. Ratas. 4. Ovariectomia. 5. Raloxifeno. I. Matsumoto, Mariza Akemi. II. Título.

**JÉSSICA ROMANO MATACHANA GONZALEZ DE MOURA**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU RALOXIFENO  
SOBRE O COLÁGENO DO LIGAMENTO PERIODONTAL EM RATAS  
OSTEOPORÓTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Saúde da Universidade Sagrado coração de Jesus como parte dos requisitos para obtenção do título de cirurgião dentista sob orientação da Profa Dr<sup>a</sup> Mariza Akemi Matsumoto.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Mariza Akemi Matsumoto.  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof. Ms. Leandro de Andrade Holgado  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof João Paulo Bianchi Ximenez  
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 24 de Outubro de 2012.

Dedico meu trabalho aos meus pais, a minha família que sempre esteve presente e aos meus professores que me apoiaram em toda minha jornada.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a **Deus** pela presença constante na minha vida e que sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Agradeço a minha professora orientada **Profª Drª Mariza Akemi Matsumoto** que teve paciência e que me ajudou bastante a concluir este trabalho.

Agradeço ao meu **Prof Dr Rodrigo Vivan** pelo estímulo, ensino, dedicação, e pela confiança em meu trabalho.

Aos demais **professores** que, durante estes quatro anos de formação, compartilharam comigo ferramentas de conhecimento, ou se tornaram pontes de ensinamentos.

Agradeço a minha **família** pela compreensão, amor, paciência e incentivo para a concretização deste sonho.

Agradeço aos meus **amigos**, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Agradeço ao meu **namorado, Rafael Saldanha Rodrigues** pelo amor e paciência nos meus “maus” momentos. Graças a sua presença foi mais fácil transpor os dias de desânimo e cansaço.

## RESUMO

O colágeno tipo I é uma proteína que caracteriza a matriz orgânica do tecido ósseo bem como as fibras que compõem o ligamento periodontal. A metaloproteinase 9 (MMP-9) é uma colagenase que parece estar envolvida nas respostas de reabsorção do colágeno presente principalmente no tecido ósseo. O objetivo do presente estudo foi o de avaliar as características microscópicas dos tecidos do periodonto de sustentação do incisivo superior de ratas osteoporóticas submetidas ou não à terapia com raloxifeno ou alendronato por meio de análises microscópica e imuno-histoquímica. Foram utilizadas 40 ratas Wistar fêmeas, divididas em quatro grupos, de acordo com o tratamento recebido: Grupo I – *Sham*: ratas submetidas a cirurgia fictícia de ovariectomia; Grupo II – Osteoporose: ratas submetidas à procedimento de ovariectomia; Grupo III – Alendronato: ratas submetidas à ovariectomia e tratadas com alendronato (0,1mg/Kg/dia); Grupo IV - Raloxifeno: ratas submetidas à ovariectomia e tratadas com raloxifeno (0,1mg.Kg/dia). Após 35 dias do início do tratamento medicamentoso todos os animais foram eutanasiados para remoção dos espécimes e análise do terço médio dos alvéolos. O colágeno do tipo I mostrou-se expresso de maneira discreta no ligamento periodontal dos quatro grupos experimentais avaliados. As células do tecido ósseo, osteócitos, apresentaram marcação positiva para o colágeno do tipo I nos quatro grupos experimentais avaliados. O tratamento com raloxifeno e alendronato promoveu um aumento na expressão de colágeno tipo I, especialmente no osso alveolar. A MMP-9 mostrou-se marcada em maior intensidade após a ovariectomia e mesmo após as terapias de raloxifeno e alendronato, quando os cementoblastos passaram a apresentar marcação positiva. Esta observação persistiu após o tratamento com raloxifeno e também com alendronato. Os resultados do presente estudo mostram que ocorrem alterações na expressão de colágeno e metaloproteinases durante a indução de osteoporose e após as diferentes terapias anti-osteoporose propostas. As respostas parecem se direcionar para a ativação da reabsorção tecidual, no entanto, mais estudos devem ser realizados no sentido de se elucidar principalmente como estas manobras podem ser evitadas.

**Palavras-chave:** Alendronato. Ligamento periodontal. Osteoporose. Ovariectomia. Raloxifeno. Ratas.

## ABSTRACT

Type I collagen is a characteristic protein of bone tissue organic matrix, along with the fibers of the periodontal ligament. Metalloproteinase 9 (MMP-9) is a collagenase that seems to be involved in collagen resorption, especially in bone tissue. The aim of the present study was to evaluate the microscopic characteristics of insertion periodontal tissues of the upper incisors of osteoporotic rats under raloxifen or alendronate therapy, by means of microscopic and immunoistochemical analysis. Forty female Wistar rats, into four groups, according to the treatment, as follows: Group I – Sham: sham-operated rats; Group II – Osteoporosis: ovariectomized rats; Group III – Alendronate: ovariectomized rats treated with alendronate (1.0mg/Kg/day); Group IV – Raloxifen: ovariectomized rats treated with raloxifen (0.1mg/Kg/day). After 35 days of the beginning of the drugs treatment, all the animals were euthanized for specimens removal and analysis of the third portion of the dental sockets. Microscopic analysis revealed a discrete disorganization of the periodontal ligament with cement preservation in the animals treated with alendronate and raloxifen. Immunolabeling of type I collagen was mild in periodontal ligament of all groups. The administration of raloxifen and alendronate increased Type I collagen labeling mainly in alveolar bone. MMP-9 was more intensely labeled after the ovariectomy and with the drugs therapy, when cementoblasts started to present positive labeling. This observation was maintained after the treatment with raloxifen and alendronate. Results of the present study showed that changes in collagen and MMP expression occur during the induction of the osteoporosis and after the proposed anti-osteoporosis therapies. These results seem to lead to an activation of tissue resorption; however, other studies must be made in order to answer how this situation can be avoided.

**Key words:** Alendronate. Osteoporosis. Ovariectomy. Periodontal ligament. Raloxifen. Rats.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	14
3.1 CIRURGIA EXPERIMENTAL .....	14
3.1.1 Animais.....	14
3.1.2 Ciclo estral.....	14
3.1.3 Castração bilateral.....	15
3.2 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO.....	15
3.2.1 Grupo tratado com Alendronato .....	15
3.2.2 Grupo tratado com Raloxifeno .....	15
3.2.3 Grupo tratado sem tratamento.....	15
3.3 TÉCNICA HISTOLÓGICA EM PARAFINA.....	16
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	16
3.5 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES.....	16
<b>4 RESULTADOS</b> .....	18
4.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	18
4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	19
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	23
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	25
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	26
ANEXO A.....	29

## 1 INTRODUÇÃO

A osteoporose é uma condição na qual a dinâmica do tecido ósseo se encontra em estado de desequilíbrio, com o predomínio dos eventos de absorção do tecido ósseo, em contraposição aos processos de formação óssea, resultando em perda da massa óssea, mais comum em indivíduos idosos (JEFFECOAT; CHESTNUT, 1993; MANOLAGAS; JILKA, 2000).

Alguns fatores predisõem a osteoporose e dentre eles, destacamos a deficiência do estrógeno, que sabidamente atua como um mecanismo protetor do tecido ósseo, inibindo a absorção osteoclástica através de sinalização parácrina osteoblástica (KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A, 2009). Experimentalmente, a diminuição do estrógeno pode ser obtida através da manobra de ovariectomia, onde, com a remoção dos ovários, o estrógeno deixa de ser secretado, dando início a condição sistêmica que predispõe ao aparecimento da osteoporose (LUVIZUTO et al., 2010a; LUVIZUTO et al. 2010b).

Como um substituto para a ovariectomia ou em combinação com ela, outros modelos experimentais que envolvem fatores de risco para a osteoporose têm sido desenvolvidos para promover, aumentar ou acelerar a perda óssea. As abordagens mais usualmente utilizadas são as manipulações dietéticas, como a restrição ao consumo de cálcio, o alto consumo de fosfato, lactação e ou gravidez e a imobilização (SONES et al., 1986; ELOVIC et al, 1995; GEDDES, 1996; TANAKA et al, 1998).

Teófilo et al. (2003) realizaram estudo comparativo entre a massa óssea perdida na maxila e na metáfise proximal da tíbia, após a indução de osteoporose através da ovariectomia ou através da ovariectomia associada a administração de uma dieta pobre em cálcio. Observaram que 35 dias após a ovariectomia associada à dieta pobre em cálcio, as ratas apresentaram uma redução da massa óssea de 17% na metáfise proximal e de 35% na maxila. Vale destacar que neste mesmo período, nas ratas que foram apenas ovariectomizadas, a massa óssea era semelhante às das ratas sham tanto na maxila como na metáfise proximal da tíbia. Após 77 dias, as ratas ovariectomizadas apresentaram uma redução de 14% da massa óssea na metáfise proximal da tíbia, enquanto que a massa óssea na maxila era semelhante às ratas sham. Entretanto, aos 77 dias, quando à ovariectomia foi associada a administração da dieta pobre em cálcio, foi observada redução de 30%

da massa óssea tanto na metáfise proximal da tíbia quanto na maxila. Com estes resultados, observou-se que quando a ovariectomia é associada à dieta pobre em Cálcio, observa-se uma diminuição da massa óssea, após 35 dias, duas vezes maior na maxila do que na metáfise proximal da tíbia. Portanto, com o intuito de avaliar o tecido ósseo na osteoporose, a associação das duas manobras (ovariectomia e administração de dieta pobre em Cálcio) parece oferecer resultados quanto ao metabolismo ósseo muito próximo ao observado clinicamente, principalmente quando se considera o osso maxilar. Portanto, este será o modelo experimental a ser utilizado no presente projeto.

Considerando o estudo do metabolismo ósseo e o processo de formação de um osso de qualidade e capaz de suportar as manobras reabilitadoras que fazem parte da Odontologia, como a instalação de próteses sobre implantes de titânio, o processo de reparo alveolar consiste numa modelo experimental de grande interesse, com os seus eventos cronológica e morfologicamente bem definidos (OKAMOTO;RUSSO et al, 1973; CARVALHO,1987).

Durante o processo de reparo ósseo, células típicas do tecido conjuntivo são recrutadas e dentre estas, as células osteogênicas são as fundamentais para o sucesso do reparo ósseo (OKAMOTO; RUSSO, 1973). Nesse aspecto, o ligamento periodontal constitui-se num fator de fundamental importância para que o processo de reparo alveolar ocorra de maneira satisfatória. O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo complexo, vascular e altamente celularizado, interposto entre os dois tecidos conjuntivos mineralizados, cemento e osso. Este tecido é importante na manutenção da posição dos dentes e na distribuição das forças mastigatórias para o osso alveolar. O ligamento periodontal contém uma mistura de populações celulares, incluindo células progenitoras de cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos. Estas células são essenciais para a remodelação fisiológica e para o reparo de feridas periodontais (LEKIC et al., 1997; SCULEAN et al , 2003; OHTA et al, 2008; HIRAGA et al, 2009). Com relação ao processo de reparo alveolar, estudos experimentais mostraram que a remoção do ligamento periodontal promove atraso significativo na formação óssea reparacional (OKAMOTO et al.;RUSSO et al., 1973; CARVALHO et al., 1982; CHEN et al., 2006; OHTA et al., 2008). Estudos mais recentes mostraram a expressão da RUNX 2, fator de transcrição importante para que ocorra a diferenciação osteoblástica (DUCY et al., 2000; PERINPANAYAGAM et al., 2006)

presente nas células do ligamento periodontal, caracterizando seu potencial osteogênico (HIRAGA et al., 2009).

Constituinte fundamental do ligamento periodontal, o colágeno necessita ser estudado com detalhes e melhor caracterizado, pois este pode ser um dos fatores que interfere no resultado final do processo de reparo alveolar após exodontia. Vale destacar que o colágeno do tipo I consiste no principal constituinte orgânico da matriz extracelular do tecido ósseo. Zecchi (2005) ao avaliarem a expressão das metaloproteinases 2 e 9 bem como a expressão dos colágenos do tipo I e III durante o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas, observaram que a ausência do estrógeno possivelmente pode contribuir com o atraso observado no processo de reparo alveolar em função de uma diminuição do *turnover* da matriz extracelular do tecido reparacional.

A necessidade em se buscar um modelo experimental próximo às situações encontradas em clínica e conseqüentemente trazendo condições menos favoráveis à formação do osso durante a reparação alveolar faz com que um modelo bastante interessante e característico da osteoporose seja a associação da ovariectomia com a administração de dieta pobre em Cálcio por 35 dias, onde estudos anteriores.

A terapia medicamentosa para a osteoporose tem sido objeto de estudo em muitos trabalhos experimentais (LEKIC et al., 1997; DA PAZ et al., 2001; KAYNAK et al., 2003; DUARTE et al., 2006, LUSTOSA P. , 2006, BOONIN et al., 2006; XIONG et al, 2007; TSURUOKA, 2008; STUEMER, 2010) e clínicos em pacientes (JOHNELL et al., 2002; MESSALLI et al., 2007). Medicamentos como o raloxifeno, um modulador seletivo para receptor de estrógeno tem sido utilizado rotineiramente para o tratamento de osteoporose, bem como os antagonistas do pirofosfato (alendronato). Vale destacar que estes dois medicamentos têm diferentes mecanismos de ação (HELVERING et al, 2009), uma vez que o raloxifeno atua como agonista estrogênico no tecido ósseo e o alendronato atua na inibição da atividade osteoclástica.

Vários estudos têm avaliado os dois medicamentos em questão, durante a terapia para osteoporose estabelecida utilizando ratas ovariectomizadas como modelo experimental. Na maior parte destes estudos, os parâmetros avaliados consistem na densidade óssea mineral, análise histomorfométrica e marcadores bioquímicos do *turnover* ósseo. Da Paz (2001) avaliaram os efeitos do  $17\beta$ -Estradiol ou do Alendronato sobre a densitometria, histomorfometria e metabolismo ósseo de

ratas ovariectomizadas. Os autores observaram que após 6 semanas de tratamento, tanto o alendronato quanto o estrógeno aumentaram a densidade óssea mineral comparativamente à ovariectomia. Quanto à avaliação histomorfométrica dos fêmures, foi observado que houve uma diminuição no volume das trabéculas ósseas das ratas ovariectomizadas e um aumento no número das trabéculas ósseas principalmente após o tratamento com Alendronato. No entanto, o aumento na espessura das trabéculas ósseas foi observado apenas após o tratamento com Estrógeno. O turnover ósseo foi diminuído tanto após a administração do Estrógeno como Alendronato. Portanto, os autores concluíram que ambas as drogas testadas inibiram a perda óssea, entretanto, o alendronato mostrou-se mais efetivo que o Estrógeno nas doses utilizadas.

A comparação das terapias de raloxifeno ou alendronato sobre o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas também tem sido bastante estudado experimentalmente.

Sato e tal (1996) avaliaram a densidade óssea na vértebra lombar e na tíbia proximal após a administração por 10 meses de estrógeno, alendronato e raloxifeno em ratas ovariectomizadas. Os resultados mostraram que tanto o estrógeno como o raloxifeno, de maneira semelhante, conseguiu preservar tecido ósseo. No entanto, o alendronato mostrou uma tendência a evitar a perda óssea, sem diferenças estatisticamente significativas quando comparado às ratas ovariectomizadas. Em função das análises realizadas, os autores concluíram que o raloxifeno parece apresentar uma ampla série de efeitos desejáveis sobre o osso, peso corporal, útero e níveis de colesterol do que o Alendronato e mesmo o Estrógeno administrados em ratas ovariectomizadas. Frolik (1996) observaram resultados semelhantes ao avaliarem a administração diária, durante três semanas, de raloxifeno, estrógeno, tamoxifeno e alendronato em ratas ovariectomizadas. Após a avaliação de parâmetros como níveis de colesterol e marcadores ósseos bioquímicos, o raloxifeno mostrou-se superior às respostas provocadas pelos demais medicamentos administrados.

Numa condição em que se avalia o processo de reparo de fraturas em ratas ovariectomizadas, utilizando-se como terapias medicamentosas, a administração de raloxifeno, estrógeno ou alendronato por 16 semanas, Cao e tal (2002) observaram que tanto o estrógeno quanto o raloxifeno tiveram efeitos semelhantes e similares ao grupo *sham* indicando que a supressão do *turnover* ósseo provocado por estes

agentes teve efeitos insignificantes sobre a progressão do reparo das fraturas. Já o tratamento com alendronato mostrou uma consistente e marcante supressão da reabsorção óssea e uma intensa atividade de formação óssea resultando num osso imaturo com grande conteúdo mineral e baixo conteúdo de osso lamelar, comparativamente aos demais grupos.

Estudos mostraram que durante o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas, a administração de raloxifeno por 60 dias mostrou efeitos favoráveis sobre o tecido ósseo formado através da imunomarcagem da osteocalcina, indicando um alto grau de mineralização, bem como a presença de trabéculas ósseas maduras que preenchem grande parte de alvéolo aos 42 dias pós exodontia (LUVIZUTO, 2010a). Também observamos que o *turnover* ósseo nas ratas ovariectomizadas mostrou-se maior aos 7 dias após a exodontia, no entanto, ao término do experimento, aos 42 dias após a exodontia, os grupos de ratas que receberam raloxifeno e estrógeno apresentaram *turnover* ósseo semelhante ao observado nas ratas *sham* (LUVIZUTO, 2010b).

A associação do estudo das terapias farmacológicas disponíveis, na tentativa de se obter um resultado final melhor quanto a qualidade do osso formado e mesmo com relação à cronologia do processo de reparo alveolar, fez com que surjam mais questões para que se entendam as respostas promovidas pelo raloxifeno bem e pelo alendronato sobre o tecido ósseo. Estudos têm sido realizados associando comparativamente os dois medicamentos; no entanto, grande parte destes estudos abordou o metabolismo de ossos longos. Dentro da odontologia, necessitamos avaliar o metabolismo em ossos maxilares, histológica e fisiologicamente diferentes dos ossos longos. A presença do ligamento periodontal, que tem um papel de suma importância no processo de reparo alveolar, fez com que novos questionamentos sejam levantados também em busca de uma melhor caracterização deste tecido em condições de normalidade bem como numa condição de osteoporose instalada.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Em função de todas essas indagações, podemos determinar que o objetivo do presente projeto é a avaliação do colágeno do ligamento periodontal na região do incisivo superior de ratas osteoporóticas que receberam o tratamento com raloxifeno ou alendronato.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar através de reações imuno-histoquímicas a presença do colágeno do tipo I bem como a presença da metaloproteinase 9, uma colagenase responsável pela síntese e degradação do colágeno

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CIRURGIA EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizadas 40 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), fêmeas, adultas, com peso corporal ao redor de 200g. Durante todo o experimento, as ratas foram mantidas em ambiente com temperatura estável ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e alimentados com ração sólida triturada (ração balanceada [Nuvilab, Curitiba, PR, Brasil]) contendo 1,4% Cálcio e 0,8% P e água “ad libitum”, exceto no período de 12 horas antecedentes ao ato cirúrgico. Este projeto está de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê Brasileiro de Ética em Experimentação Animal (protocolo número 2010/003045). Após a realização das cirurgias *sham* (cirurgia fictícia) e das cirurgias de ovariectomias, as ratas do grupo sham com dieta balanceada continuaram sendo alimentadas com a ração descrita acima, enquanto as ratas dos demais grupos experimentais (osteoporóticas) foram alimentadas com ração contendo 0,1% Cálcio e 0,5% P (Rhostr Ind. Com., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil) e água “ad libitum”.

Os grupos experimentais foram: ratas sham (cirurgia fictícia), ratas osteoporóticas, ratas osteoporóticas tratadas com alendronato, ratas osteoporóticas tratadas com raloxifeno. A distribuição das ratas de acordo com os grupos e períodos experimentais foi realizada da seguinte forma:

Grupo I – rata sham (n= 10 ratas)

Grupo II – rata osteoporótica (n = 10 ratas)

Grupo III – rata osteoporótica e tratamento com alendronato (n = 10 ratas).

Grupo IV – rata osteoporótica e tratamento com raloxifeno (n= 10 ratas).

##### 3.1.2 Ciclo estral

Para garantir que as ratas utilizadas nos experimentos estavam ciclando normalmente, elas foram colocadas em gaiolas individuais e diariamente foram introduzidas no interior da vagina 1-2 gotas de soro fisiológico que, em seguida,

foram aspiradas e colocadas em lâmina de histologia para leitura microscópica imediata para reconhecimento das fases do ciclo estral (Long & Evans, 1922; Marcondes e cols., 2002). As ratas foram utilizadas após a obtenção de 2 a 3 ciclos estrais regulares.

### **3.1.3 Castração bilateral**

A remoção cirúrgica dos 2 ovários foi realizada nas ratas anestesiadas com solução de Cloridrato de Cetamina 10% (Ketamina Agener, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil; 75mg/kg) associada à Xilazina (dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha; 10mg/kg), administrada por via intraperitoneal.

## **3.2 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO**

### **3.2.1 Grupo tratado com Alendronato**

Passados 8 dias da ovariectomia, ou seja, após 2 ciclos estrais completos e avaliados diariamente e constatando-se a ausência do ciclo, as ratas foram submetidas ao tratamento com Alendronato sódico por 35 dias, pela gavagem de 0,1mg/kg/dia (Da Paz e cols., 2001) dissolvido em solução aquosa. Passados os 35 dias, as ratas foram eutanasiadas.

### **3.2.2 Grupo tratado com Raloxifeno**

Passados 8 dias da ovariectomia, ou seja, após 2 ciclos estrais completos e avaliados diariamente e constatando-se a ausência do ciclo, as ratas foram submetidas ao tratamento com Raloxifeno por 35 dias através de gavagem de 1mg/kg/dia (Luvizuto e cols., 2010) dissolvido em solução aquosa. Passados os 35 dias, as ratas foram eutanasiadas.

### **3.2.3 Grupo tratado sem tratamento**

Os grupos *sham* e osteoporose sem tratamento receberam pelo mesmo período de tratamento, a gavagem de solução aquosa, com mesmo volume administrado para os grupos que receberam o tratamento com Raloxifeno ou Alendronato.

### 3.3 TÉCNICA HISTOLÓGICA EM PARAFINA

Todos os animais foram eutanasiados por dose letal de anestesia, as hemimaxilas contendo a região do incisivo superior direito foram coletadas, fixadas por imersão em solução de formol a 10% durante 48 horas e a seguir descalcificadas por 35 dias em solução de EDTA 4,13%, trocando-se a solução a cada 7 dias. Após lavagem por 24 horas em água corrente, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, orientadas de maneira a permitir cortes semi-seriados longitudinais de 6  $\mu\text{m}$  de espessura, a intervalos de 60  $\mu\text{m}$ . Cortes alternados de 5  $\mu\text{m}$  de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina (para avaliação da citoarquitetura tecidual e análise microscópica qualitativa)

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os anticorpos primários utilizados foram contra o Colágeno do tipo I e contra a Metaloproteinase 9 (anticorpos policlonais produzidos em cabras, Santa Cruz Biotechnology).

Foram realizados experimentos de imuno-histoquímica utilizando como método de detecção a imunoperoxidase. Os anticorpos primários utilizados foram produzidos em cabras e portanto, o anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). Ao término das reações imuno-histoquímicas, foi realizada a contra-coloração por Hematoxilina de Harris e na sequência as lâminas foram desidratadas para a montagem das lamínulas por permount.

### 3.5 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas através da atribuição de escores, por análise semi quantitativa, a partir das imagens capturadas do ligamento

periodontal e do processo de reparo alveolar de todos os animais que fazem parte do experimento.

Posteriormente, foi realizada análise das células presentes no ligamento periodontal, bem como no tecido ósseo formado durante o processo de reparo alveolar, tomando-se o cuidado para se avaliar separadamente quais células apresentaram imunomarcações positivas para cada proteína estudada neste projeto.

Portanto, as imunomarcações foram avaliadas semi-quantitativamente pelos escores, bem como através de análise individualizada das células do ligamento periodontal e do processo de reparo alveolar e suas respectivas marcações positivas para cada proteína estudada.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Os cortes histológicos, corados por Hematoxilina e Eosina foram analisados em nível de terço médio e serão descritas na sequência, separadas por grupo experimental.

- Grupo *Sham*: a avaliação microscópica da região do periodonto de inserção mostraram a integridade da região do cemento e dos cementoblastos. O ligamento periodontal apresentou-se organizado, com as suas fibras inseridas de acordo com os diferentes grupos que constituem. O osso alveolar encontrou-se em condições fisiológicas. Foram observados vasos sanguíneos no ligamento periodontal.

- Grupo *Osteoporose*: a avaliação microscópica mostrou que a região do periodonto de inserção apresentava diferenças em relação ao grupo *sham*. Em alguns espécimes foi observado um aumento na distância entre cemento e osso alveolar, ou seja, foi observado um espessamento na região do ligamento periodontal. Alguns animais apresentavam áreas de reabsorção de superfície no elemento dental. As fibras do ligamento periodontal apresentaram-se desorganizadas e com disposição diferente da habitual.

- Grupo *Alendronato*: a região do periodonto de inserção apresentou-se ligeiramente desorganizada. No entanto, cemento e cementoblastos apresentavam-se íntegros. Em alguns espécimes foram observadas reabsorções de superfície no elemento dental.

- Grupo *Raloxifeno*: a região do periodonto de inserção apresentou-se desorganizada quanto à disposição das fibras do ligamento periodontal. No entanto, cemento e cementoblastos mantiveram-se íntegros.

A figura 1 representa a prancha histológica que reúne as imagens representativas do periodonto de inserção corados por Hematoxilina e Eosina dos quatro grupos experimentais.

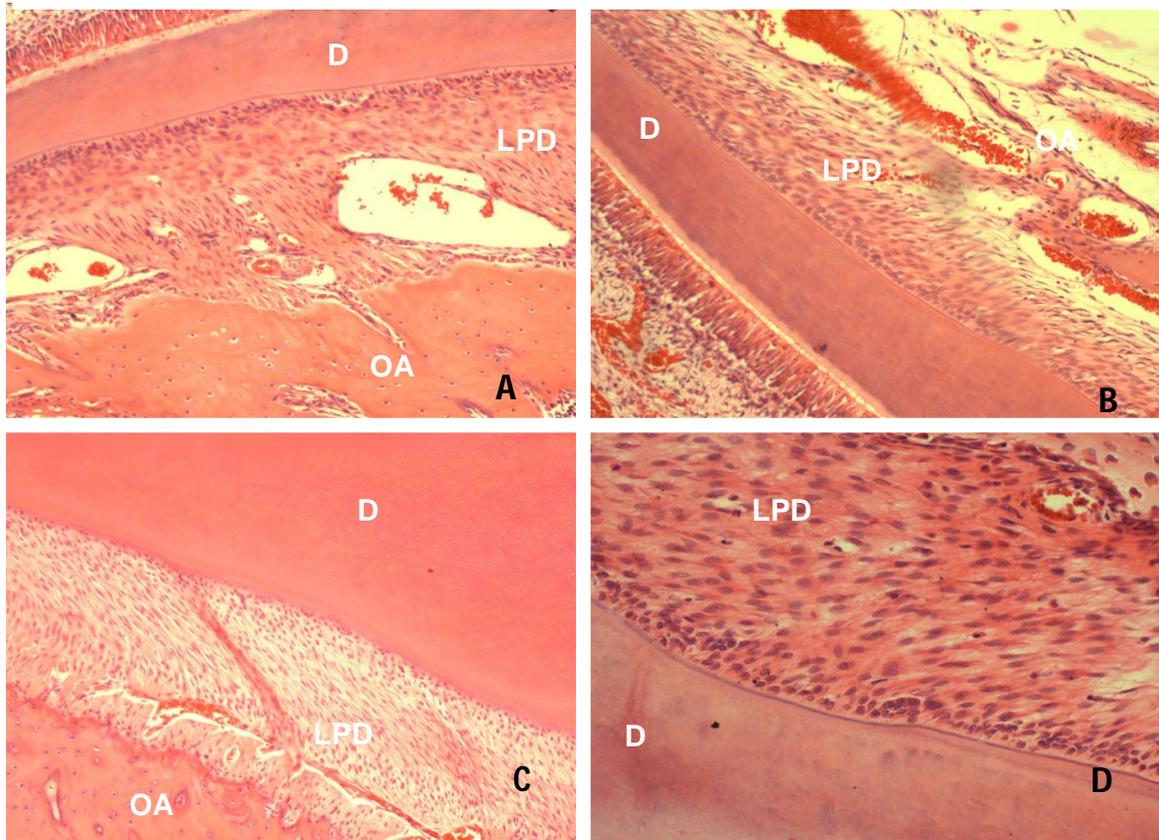


Figura 1 – Prancha histológica mostrando cortes corados por hematoxilina e eosina da região do terço médio do ligamento periodontal de ratos sham (A), ratos osteoporóticos (B), ratos osteoporóticos e tratados com alendronato (C) e ratos osteoporóticos e tratados com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar)

#### 4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As imunomarcações mostraram que para cada proteína avaliada foram notadas diferenças nos grupos experimentais estudados.

O colágeno do tipo I mostrou-se expresso de maneira discreta no ligamento periodontal dos quatro grupos experimentais avaliados. As células do tecido ósseo, osteócitos, apresentaram marcação positiva para o colágeno do tipo I nos quatro grupos experimentais avaliados.

A Metaloproteinase 9 mostrou-se marcada em maior intensidade após a ovariectomia e mesmo após as terapias de Raloxifeno e Alendronato. Foi possível observar que após a ovariectomia, cementoblastos passaram a apresentar

marcação positiva para MMP9. Esta observação persistiu após o tratamento com Raloxifeno e também com Alendronato.

As imagens das imunomarcações estão representadas na prancha microscópica 1 e relacionam grupos experimentais e proteínas avaliadas

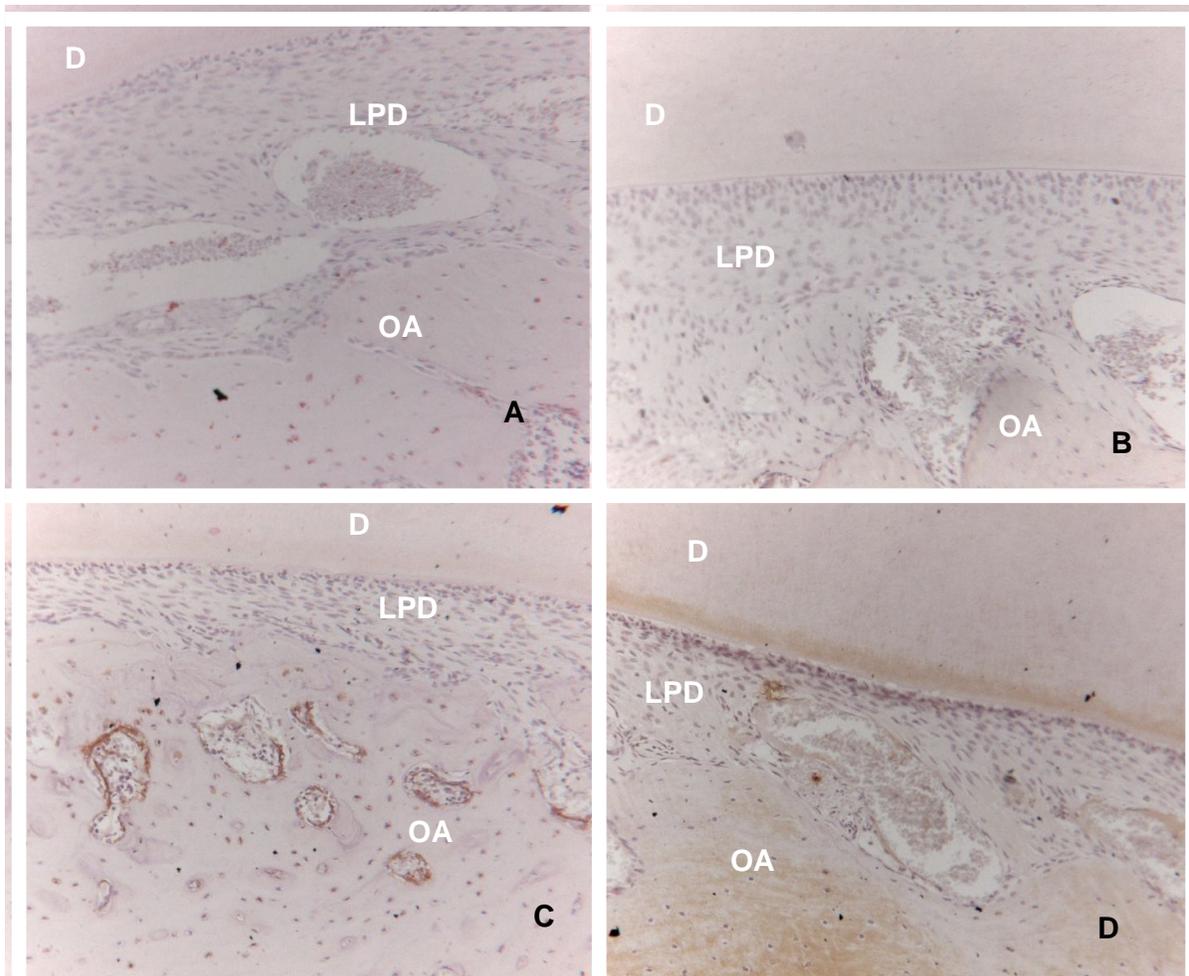


Figura 2: Imunomarcção para colágeno tipo I no terço médio do ligamento periodontal de ratas sham (A), ratas osteoporóticas (B), ratas osteoporóticas e tratadas com alendronato (C) e ratas osteoporóticas e tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar). (original, 16x)

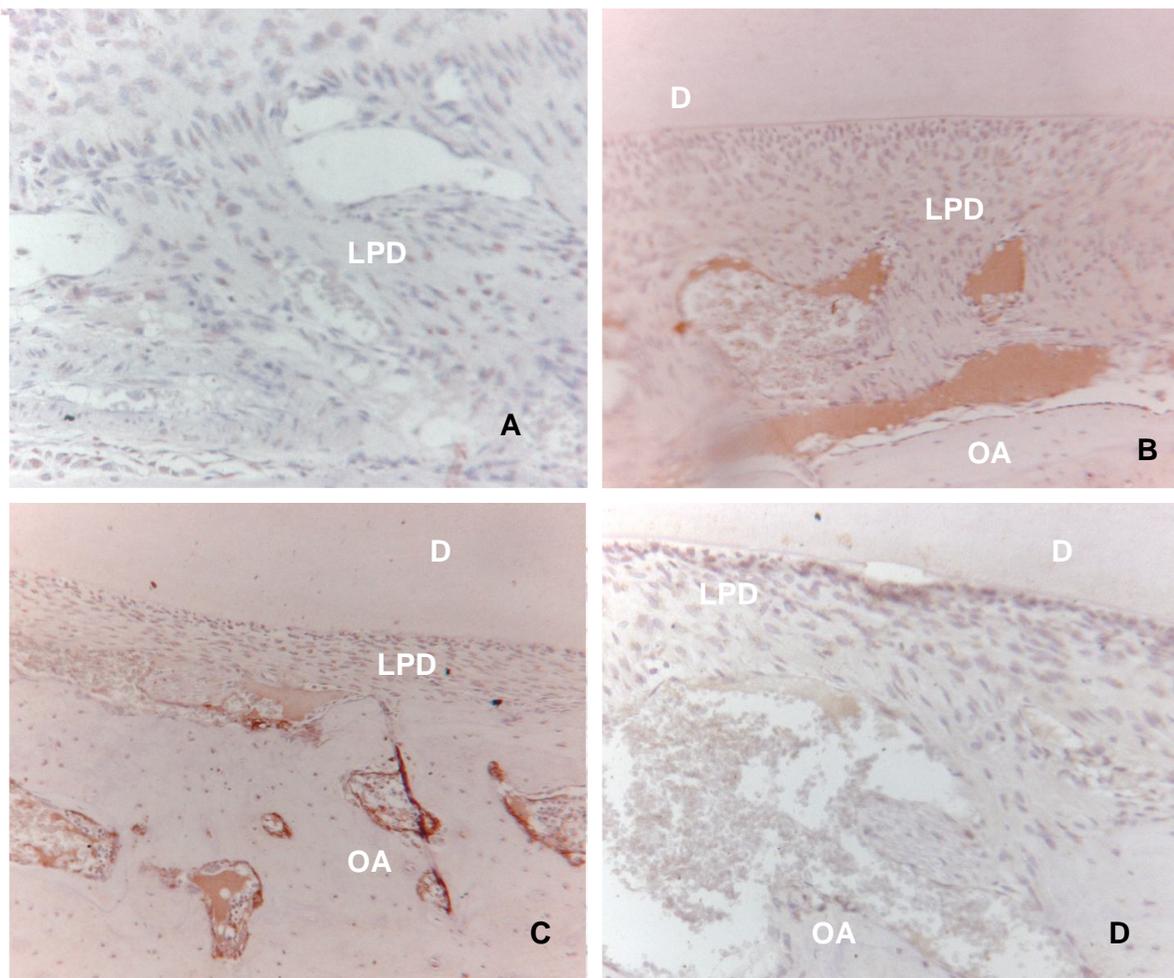


Figura 3: Imunomarcção para MMP9 no terço médio do ligamento periodontal de ratas sham (A), ratas osteoporóticas (B), ratas osteoporóticas e tratadas com alendronato (C) e ratas osteoporóticas e tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que a região do ligamento periodontal, ou mesmo do periodonto de inserção mostraram alterações nas sinalizações celulares frente a osteoporose e às diferentes terapias anti-osteoporose. Esta observação é de grande importância pois o ligamento periodontal é um tecido de grande importância para a conservação do elemento dental e após manobras de exodontia, são os remanescentes do ligamento periodontal que comandam as respostas celulares que desencadeiam os fenômenos reparacionais no interior do alvéolo dental (Okamoto e Russo, 1977; Carvalho e Okamoto, 1987).

A avaliação microscópica permitiu a observação de que a indução da osteoporose leva a alterações na organização dos tecidos que fazem parte do periodonto de inserção, especialmente quanto à disposição das fibras do ligamento periodontal. Alguns espécimes mostraram alterações na distância entre cimento e osso alveolar, mostrando um discreto espessamento do ligamento periodontal.

As imunomarcações mostraram que as células que fazem parte dos tecidos que constituem o periodonto de inserção respondem de maneira diferente a cada tratamento proposto nos grupos experimentais deste trabalho.

As imunomarcações para para colágeno do tipo I mostraram que em condições normais, representados pelos animais do grupo sham, há uma presença basal desta proteína que compõem ligamento periodontal bem como a matriz orgânica do tecido ósseo. É importante ressaltar a imunomarcação positiva observada para osteócitos do osso alveolar. Portanto, estas células expressam colágeno do tipo I e desta maneira contribuem para a estabilização da matriz óssea do tecido ósseo. Após a ovariectomia, poucas alterações foram observadas em relação ao grupo sham, o que poderia sugerir uma pequena participação desta proteína nas respostas fisiológicas observadas frente a interferência sistêmica e as terapias medicamentosas. No entanto, o aumento da imunomarcação para colágeno do tipo I nos grupos alendronato e raloxifeno mostraram que o organismo busca, através da maior expressão de colágeno tipo I, estabilizar as respostas fisiológicas buscando manter a integridade do periodonto de inserção.

A imunomarcação para metaloproteinase 9 vem ao encontro desta observação, uma vez que a indução da osteoporose leva a um aumento nas respostas de absorção óssea. Dentre as proteínas sinalizadoras do evento de

absorção óssea, temos a metaloproteinase 9, ou seja, uma colagenase que tem um papel importante na degradação do colágeno, componente principal da matriz orgânica do tecido ósseo. O aumento da metaloproteinase 9 foi observado especialmente nos grupos osteoporose, alendronato e raloxifeno. Uma observação interessante foi que os cementoblastos passaram a apresentar uma expressão positiva para metaloproteinase 9, sugerindo o papel desta molécula como um dos prováveis sinalizadores para as respostas de reabsorção que podem ocorrer na sequência.

É importante destacar que o cimento não apresentou interferências nas respostas observadas pelas imunomarcações de colágeno tipo I e metaloproteinase tipo 9.

## **6 CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo mostraram que ocorrem alterações na expressão de colágeno e metaloproteinases durante a indução de osteoporose e após as diferentes terapias anti-osteoporose propostas. As respostas pareceram se direcionar para a ativação da reabsorção tecidual, no entanto, mais estudos devem ser realizados no sentido de se elucidar principalmente como estas manobras podem ser evitadas.

## REFERÊNCIAS

BOONEM, S. et al. Optimizing the benefits of biphosphonates in osteoporosis. Treat Endocrinol., Auckland, N.Z, v. 5, n. 6, p. 375-383, 2006.

CAO, Y. et al. Raloxifene, estrogen and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. Journal of Bone and Mineral Research, Washington, DC, v. 17, n. 12, p. 2237-2246, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; OKAMOTO, T.; CARVALHO, A.C.P. The influence of intra-alveolar curettage on wound healing after tooth extraction. A histological study in rats. J. Nihon University School Dent, Tokyo: v. 24, p. 28-34, 1982

DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science, Washington, v. 289, p. 1501-1504, 2000.

HELVERING, L.M. et al. Expression profiling of rat femur revealed suppression of bone formation genes by treatment with alendronate and estrogen but not raloxifene. Molecular Pharmacology, United States, v. 68, p. 1225-1238, 2005.

HIRAGA, T. et al. Formation of bone-like mineralized matrix by periodontal ligament cells in vivo: a morphological study in rats. J. Bone Miner Metab, Tokyo : v.27,p.149-157,2009.

KOEPPE, B. M.; STANTON, B. A. (ed.). Fisiologia. 6.ed.Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

JEFFCOAT, M.K.; CHESTNUT, C.H.;MANOLAGAS et al. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. JADA, Chicago,v.124,p. 49,1993.

JOHNELL, O. et al. Additive effects of raloxifene and alendronate on bone density and biochemical markers of bone remodelling in postmenopausal women with osteoporosis. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism., Springfield, EUA, v. 87, p.985-992,2002.

LUVIZUTO, et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. Bone, Washington, DC, v.46, p. 1021-1029,2010.

LUVIZUTO, E.R.; OKAMOTO, T. et al; OKAMOTO, R. et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. Archives of Oral Biology, Oxford, v. 55, p. 52-59, 2010.

MESSALI, E.M.; MAININI, G.; SCAFFA, G.; CAFIERO, A.; SALZILLO, P.L.; RAGUCCI, A.; COBELLIS, A. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. Maturitas, Amsterdam, v.56, p.38-44, 2007.

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

Da PAZ, L.H.B.C.; de FALCO, V.; TENG, N.C.; PEREIRA, R.M.R.; JORGETTI, V. Effect of 17 $\beta$  estradiol or alendronate on the bone densitometry, bone histomorphometry and bone metabolism of ovariectomized rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, São Paulo, Brasil, v.34, p.1015-1022, 2001.

PERINPANAYAGAM, H.; MARTIN, T.; MITHAL, V.; DAHMAN, M.; MARZEC, N.; LAMPASSO, J.; DZIAK, R. Alveolar bone osteoblast differentiation and RUNX2/CBFA1 expression. Archives of Oral Biology, Oxford, v.51, p.406-415, 2006

SATO, M.; BRYANT, H.U.; IVERSEN, P.; HELTERBRAND, J.; S, OETAMA. F; et al. Advantages of raloxifene over alendronate or estrogen on nonreproductive and reproductive tissues in long-term dosing of ovariectomized rats. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, Baltimore, United States, v.279, p.298-305, 1996

SCULEAN, A.; BERAKDAR, M.; WINDISCH, P.; REMBERGER, K.; DONOS, N.; BRECX,. Immunohistochemical investigation on the pattern of vimentin expression in regenerated and intact monkey and human periodontal ligament. Archives of Oral Biology, Oxford, v.48, p.77-86, 2003

SONES, A.D.; WOLINSKY, L.E.; KRATOCHVIL, F.J Osteoporosis and mandibular bone resorption: a prosthodontic perspective. J. Prosthet Dent, New York, v.56, p.732, 1986

STUERMER, E.K.; SEHMISCH, S.; RACK, T.; WENDA, E.; SEIDLOVA-WUTTKE, D.; et al. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. Langenbecks Arch Surg, Berlin v.395, p.163-172, 2010

TEOFILO, M.JM.; AZEVEDO, A.C.B.; PETENUSCI, S.O.; MAZARO, R.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. Pesquisa Odontológica Brasileira, v.17, p.302-306,2003.

TEOFILO, J.M.; BRENTGANI, L.G.; LAMANO CARVALHO, T.L. Bone healing in osteoporotic female rats following intra alveolar grafting of bioactive glass. Archives of Oral Biology, Oxford,N.Y,v.49, p.755-762,2003

ZECCHIN, K.G.; PEREIRA, M.C.; COLETTA, R.D.; GRANER, E.; JORGE, M. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. Calcified International Tissue, Berlin, v.78,p.136-145,2005

## ANEXO A

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
(CEEA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO PROCESSO DE REPARO ALVEOLAR DE RATAS OVARECTOMIZADAS COM DIETA POBRE EM CÁLCIO E SUBMETIDAS À TERAPIA COM RALOXIFENO OU ALENFRONATO"** sob responsabilidade da **Profa. Dra. Roberta Okamoto** e colaboração de **Idelmo Rangel Garcia Junior, Leonardo Perez Faverani, Eloá Rodrigues Lavizuto, Tetuo Okamoto** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-003045.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010

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