

**UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO**

**BÁRBARA DE MORAES MALAVASI**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU  
RALOXIFENO SOBRE AS CÉLULAS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL E TECIDO ÓSSEO EM RATAS  
OSTEOPORÓTICAS**

**BAURU  
2012**

**BÁRBARA DE MORAES MALAVASI**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU  
RALOXIFENO SOBRE AS CÉLULAS DO LIGAMENTO  
PERIODONTAL E TECIDO ÓSSEO EM RATAS  
OSTEOPORÓTICAS**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado ao Centro de Ciências da  
Saúde, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Cirurgião-  
Dentista sob orientação da Profa. Dra.  
Mariza Akemi Matsumoto.

**BAURU  
2012**

Malavasi, Bárbara de Moraes

M2392e

Efeito do tratamento com alendronato ou raloxifeno sobre as células do ligamento periodontal e tecido ósseo em ratas osteoporóticas / Bárbara de Moraes Malavasi -- 2012.

39f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

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

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

**BÁRBARA DE MORAES MALAVASI**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM ALENDRONATO OU RALOXIFENO  
SOBRE AS CÉLULAS DO LIGAMENTO PERIODONTAL E TECIDO  
ÓSSEO EM RATAS OSTEOPORÓTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de Cirurgião-Dentista sob orientação da Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto.

Banca Examinadora:

---

Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto  
Universidade Sagrado Coração

---

Prof. Ms Leandro de Andrade Holgado  
Universidade Sagrado Coração

---

Mestrando João Paulo Bianchi Ximenez  
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 24 de Outubro de 2012.

Dedico este trabalho, primeiramente a **Deus**, por caminhar sempre ao meu lado, e aos meus **Familiares**, por me apoiarem sempre, me ensinarem muitos valores que norteiam minha vida. Se eu tenho algum espírito de luta, de não desistir facilmente dos sonhos, creio que devo a todos vocês! Muito obrigada por sempre me apoiarem e serem um porto seguro na minha vida. Desejo que **Deus** nos dê muita saúde para podermos desfrutar bons anos de vida juntos. Saibam que amo vocês e me orgulho em fazer parte desta família incomparável.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela força, sabedoria, paciência concedida por todos esses anos para que eu completasse mais esta etapa de minha vida.

Aos meus **pais Mário S. Edson Malavasi e Ivonete de Moraes Malavasi**, por me amarem de uma maneira especial, tornando esta caminhada mais fácil.

À minha **família**, que é o alicerce de tudo, e sempre estiveram ao meu lado, nos momentos difíceis.

Aos todos os meus **professores**, muito obrigada por me acompanharem por esses quatro anos e por contribuírem de maneira extremamente fundamental e especial para meu crescimento intelectual e profissional, me apoiando sempre na conquista de mais este sonho. Em especial às minhas orientadoras professoras Mariza Akemi Matsumoto e Roberta Okamoto, por sua disponibilidade, apoio e humildade. Obrigada por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus **amigos** verdadeiros, que são pessoas em quem posso confiar. Pessoas que me apoiam e me acolhem com tanto carinho. É certo que todos nós passamos por momentos muito difíceis. E conosco, estão sempre os amigos, nos apoiando. Estes ficarão para sempre em meu coração. Sou grata a Deus por ter conhecido tantas pessoas boas, de coração aberto que foram primordiais para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

A osteoporose é uma doença óssea metabólica que pode afetar os ossos maxilares de maneira importante, especialmente após a menopausa quando cessa a produção do estrógeno, dificultando os processos de reparação óssea após procedimentos cirúrgicos. Diferentes drogas têm sido utilizadas na tentativa de se inibir ou minimizar a perda óssea decorrente desta condição por meio de inibição osteoclástica, ou de se mimetizar a ação estrogênica com o uso de modeladores específicos para receptores de estrógeno, como os bisfosfonatos e o raloxifeno, respectivamente. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar as características histológicas 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, histométrica e imuno-histoquímica. Foram utilizadas 40 ratas Wistar fêmeas submetidas à extração do incisivo central superior direito, 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. A análise microscópica revelou ligamento periodontal ligeiramente desorganizado com preservação do cimento nos animais tratados com alendronato e raloxifeno. As ratas ovariectomizadas sem tratamento exibiram maior desorganização dos tecidos periodontais e áreas de reabsorção da superfície radicular. A imunomarcagem para osteoprotegerina mostrou-se mais intensa nos grupos experimentais que no grupo *sham*. A marcação para RANKL foi mais intensa nos osteócitos das ratas osteoporóticas sem tratamento e tratadas com o raloxifeno. As proteínas não-colagênicas da matriz óssea, osteocalcina e osteopontina, mostraram-se mais evidentes no osso alveolar do Grupo Alendronato. Maior atividade de diferenciação osteoblástica, revelada pela marcação de RUNX 2, foi observada no Grupo Osteoporose, enquanto que marcação mais intensa para células osteoclásticas (TRAP) foi evidenciada no Grupo Alendronato, porém, igualmente no Grupo Osteoporose. Os resultados do presente estudo mostram que ocorrem alterações na expressão de diferentes proteínas 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

Osteoporosis represents a metabolic bone disease that can significantly affect maxillary bone, especially after menopause when estrogen production is interrupted, making difficult bone healing repair after surgical procedures. Different drugs have been used in order to inhibit or minimize bone loss due to this condition, inhibiting osteoclastic activity, or mimicking estrogen action with selective estrogen receptor modulator, as the bisphosphonates and raloxifen, respectively. In this way, the aim of the present study was to evaluate the histological characteristics of the supporting periodontal tissues of upper incisors of osteoporotic rats under therapy with alendronate and raloxifen, by means of microscopic, histometric, and immunohistochemistry analysis. Forty female Wistar rats had their right upper central incisor extracted to be divided 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. Osteoporotic rats with no treatment showed a marked disorganization of periodontal tissues and areas of resorption of root surface. A more intense osteoprotegerin immunolabeling was observed in the experimental groups in comparison to sham. RANKL labeling was more intense in the osteocytes of osteoporotic rats without treatment and treated with raloxifen. Non-collagenic proteins of bone matrix, osteocalcin and osteopontin were more evident in alveolar bone of Group Alendronate. A more pronounced osteoblastic differentiation, revealed by RUNX 2 labeling, was observed in Group Osteoporosis, while a more intense labeling for the osteoclastic cells (TRAP) was noted in Group Alendronate, as well as in Group Osteoporosis. Results of the present study showed that changes in the expression of different proteins during the induction of osteoporosis and after the proposed anti-osteoporosis therapies occur. 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 Word:** Alendronate. Periodontal ligament. Osteoporosis. Ovariectomy. Raloxifen. Rats.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	8
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
3.1 CIRURGIA EXPERIMENTAL .....	16
<b>3.1.1 Animais</b> .....	16
<b>3.1.2 Ciclo estral</b> .....	16
<b>3.1.3 Castração bilateral</b> .....	17
3.2 TRATAMENTO MEDICAMENTOSO.....	17
<b>3.2.1 Grupo tratado com Alendronato</b> .....	17
<b>3.2.2 Grupo tratado com Raloxifeno</b> .....	17
<b>3.2.3 Grupos <i>sham</i> e osteoporose sem tratamento</b> .....	18
3.3 TÉCNICA HISTOLÓGICA EM PARAFINA.....	18
3.4 IMUNOISTOQUÍMICA.....	18
3.5 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES.....	19
<b>4 RESULTADOS</b> .....	20
4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	20
4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
ANEXO A.....	39

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das enfermidades com que o profissional da Odontologia se depara na clínica é a osteoporose, alteração sistêmica que interfere na dinâmica do tecido ósseo e conseqüentemente nos eventos biológicos que fazem parte das respostas desejadas dentro da terapêutica odontológica.

A perda da massa óssea na osteoporose é mais comum em indivíduos idosos e é causada pelo desequilíbrio entre os processos de formação e reabsorção, seja pela prevalência da reabsorção, pela redução da formação óssea ou pela combinação das duas situações. A osteoporose atinge ambos os sexos e é relativamente comum em mulheres após a menopausa. Na maioria dos casos de osteoporose pós-menopausa o problema se instala principalmente por um aumento anormal da reabsorção óssea (JEFFCOAT; CHESTNUT, 1993; MANOLAGAS; JILKA, 2000).

Dentre os fatores que predisõem a osteoporose destaca-se a deficiência de estrógeno, observada tanto em humanos como em animais de laboratório, os quais vêm sendo utilizados em investigações para esclarecimento da patogênese da osteoporose. A deficiência de estrógeno desenvolvida experimentalmente por meio da cirurgia de ovariectomia pode interferir diretamente na diferenciação das células ósseas, ou indiretamente, afetando a produção e/ou atividade de outros hormônios e fatores locais envolvidos no processo de formação e absorção óssea. Embora a deficiência de estrógeno seja um importante fator de risco para a osteoporose pós-menopausa, ela não é por si só suficiente para produzir esta disfunção, sendo necessária a interação com outros fatores (HARRIS et al., 1996, WHO, 1998, HERRERO et al., 1998).

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, tais como a restrição do consumo de cálcio, o alto consumo de fosfato, a 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 por meio da ovariectomia ou 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. 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 aos observados 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 a busca por um tecido ósseo de qualidade capaz de suportar as manobras reabilitadoras, que fazem parte da Odontologia, como a instalação de próteses e mesmo de implantes de titânio, o estudo do processo de reparo alveolar consiste numa manobra experimental de grande aplicabilidade e interesse.

Cronologicamente, este processo está bem definido. De acordo com Simpson (1969), após a exodontia, a reparação alveolar pode ser dividida em 4 etapas:

1. Preenchimento total do alvéolo por coágulo sanguíneo;
2. Proliferação celular (fibroblastos, células endoteliais e inflamatórias) para o interior do coágulo sanguíneo, formando o tecido de granulação;
3. Gradual reposição do tecido de granulação por trabéculas ósseas;
4. Maturação e remodelação do osso neoformado no interior do alvéolo.

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). Vale destacar que o ligamento periodontal remanescente no osso alveolar 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 mostram que a remoção do ligamento periodontal promove atraso significativo na formação óssea reparacional (OKAMOTO; RUSSO, 1973; CARVALHO et al., 1982; CHEN et al., 2006; OHTA et al., 2008). Estudos mais recentes mostram 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).

Existem poucos relatos de que a deficiência de estrógeno interfere com a neoformação óssea reparacional que se segue à extração dental. O primeiro deles refere-se à análise microscópica (qualitativa) do reparo alveolar de ratas ovariectomizadas submetidas à extração de incisivos superiores e que os resultados sugeriram um atraso na proliferação celular, na formação da matriz orgânica e na mineralização do osso (SALOMÃO et al., 1974). Hisieh et al., (1995) avaliaram o efeito da ovariectomia sobre o reparo ósseo após a extração do molar superior de ratas e observaram, nos períodos de 5 a 14 dias após a cirurgia, aumento da reabsorção óssea bucal e da formação óssea palatina, além de diminuição da superfície de mineralização do osso alveolar; os autores sugeriram que a deficiência de estrógeno altera o *turnover* ósseo pós extração dental.

Jahangiri et al., (1997) investigaram os efeitos da deficiência estrogênica e da terapia de reposição hormonal sobre a remodelação do rebordo residual de ratas submetidas à extração unilateral de molares. As análises microscópicas e moleculares mostraram maior atividade de reabsorção óssea e redução da expressão gênica de colágenos tipo I e II nas ratas ovariectomizadas, enquanto as ratas ovariectomizadas tratadas com estrógeno apresentaram menor formação de colágeno tipo I, com expressão aumentada do colágeno tipo II. Os resultados mostraram que a deficiência de estrógeno pode afetar a remodelação óssea do rebordo residual ao nível molecular.

Zecchin et al., (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 relataram uma perda óssea maior na região dos maxilares (TEÓFILO et al., 2003, 2004).

Frente à osteoporose, surge a questão de como estaria o ligamento periodontal nesta situação sistêmica quanto a possíveis alterações celulares, vasculares e sinalização proteica. Outra questão seria se as possíveis alterações observadas poderiam influenciar no processo de reparo alveolar. Este assunto é de grande interesse, pois uma vez que o ligamento periodontal constitui-se em peça chave para que o processo de reparo alveolar ocorra de maneira satisfatória, a sua caracterização frente a alteração sistêmica osteoporose seria um passo à frente na busca de como melhorar o metabolismo ósseo durante o processo de reparo alveolar nestas condições.

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-PEREIRA et al., 2006, BOONIN et al., 2006; XIONG et al., 2007; TSURUOKA et al., 2008; STUEMER et al., 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 et al., (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.

Sato et al. (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 mostram que tanto o estrógeno como o raloxifeno, de maneira semelhante, conseguiram 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 et al., (1996) observaram resultados semelhantes ao avaliarem a administração diária, durante 3 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 et al., (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.

Devem-se levar em conta que a avaliação da densidade do tecido ósseo osteoporótico e a avaliação do tecido ósseo osteoporótico formado durante o processo de reparação são condições experimentais que precisam ser diferenciadas.

Recentemente, estudos do nosso laboratório 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 imunomarcção 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 et al.,

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 et al., 2010b).

No entanto, questões ainda permanecem sobre o metabolismo ósseo e sobre as atividades das células envolvidas no processo de remodelação óssea. A condição de osteoporose torna este estudo muito interessante, considerando que grande parte dos pacientes atendidos na clínica odontológica pode apresentar enfermidade. A busca por um osso de melhor qualidade, que suporte os esforços mastigatórios e a etapa reabilitadora posterior a exodontia, faz com que este tema continue sendo estudado.

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, faz com que surjam mais questões para que se entendam as respostas promovidas pelo raloxifeno e pelo alendronato sobre o tecido ósseo. Estudos têm sido realizados associando comparativamente os dois medicamentos. No entanto, grande parte destes estudos aborda 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, faz 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. Consequentemente, surge a pergunta se a terapia com raloxifeno ou a terapia com alendronato poderiam melhorar as características do ligamento periodontal, uma vez que este tecido tem uma participação fundamental no processo de reparo alveolar. Vale destacar que junto à avaliação do ligamento periodontal, serão avaliados também o tecido cementário bem como o osso alveolar para que se tenha um parâmetro embasado no periodonto de inserção do dente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

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

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- as avaliações foram realizadas a partir de análise microscópicas e imuno-histoquímicas sobre o ligamento periodontal, buscando-se caracterizar as células osteoblásticas presentes neste tecido.

- com a associação dessas análises, procuramos comparar as respostas biológicas observadas em cada condição no intuito de entender quais as consequências dos diferentes mecanismos de ação dos medicamentos estudados, sobre o ligamento periodontal durante a osteoporose.

Portanto, constitui-se em objetivo do presente projeto, a avaliação do ligamento periodontal de ratas que apresentem um quadro clínico instalado de osteoporose pós-menopausa. Este estudo é de grande interesse, uma vez que permitirá avaliar as respostas celulares, as proteínas sinalizadoras que podem estar envolvidas no quadro de osteoporose presentes no ligamento periodontal, tecido fundamental para que ocorra o processo de reparo alveolar.

### 3 MATERIAIS 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% de Ca e 0,8% de 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 – Anexo A). 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% de  $\text{Ca}^{2+}$  e 0,5% de P (Rhostrer 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 – *Sham* (n= 10)
- Grupo II – Osteoporose (n = 10)
- Grupo III – Alendronato (n = 10)
- Grupo IV – Raloxifeno (n= 10)

##### 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 (técnica de Long & Evans, 1922) 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 dois 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 Grupos *sham* e osteoporose 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 raloxifeno ou alendronato.

### 3.3 TÉCNICA HISTOLÓGICA EM PARAFINA.

Todos os animais foram eutanasiados por dose letal anestésica, 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 semisseriados 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 cito-arquitetura tecidual e análise histológica qualitativa.

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os anticorpos primários utilizados foram contra a OPG, RANKL, RUNX2, Osteopontina, Osteocalcina e TRAP (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 são produzidos em cabras e portanto, o anticorpo secundário utilizado foi o biotilado anti-cabras produzido em coelhos (Pierce Biotechnology). A amplificação do sinal foi realizada pelo kit Avidina-Biotina (Vector laboratories) e o cromógeno foi a Diaminobenzidina (Dako). Ao término das reações imuno-histoquímicas, realizou-se a contracoloração 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 semiquantitativa, a partir das imagens capturadas do ligamento periodontal e do processo de reparo alveolar de todos os animais que fazem parte do experimento. Para a aquisição das imagens, foi utilizado o Fotomicroscópio Nikon Eclipse 80i, conectado a um microcomputador com monitor, teclado, mouse, drive de disquete, gravador de CD e DVD.

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 semiquantitativamente 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 HISTOLÓGICA

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

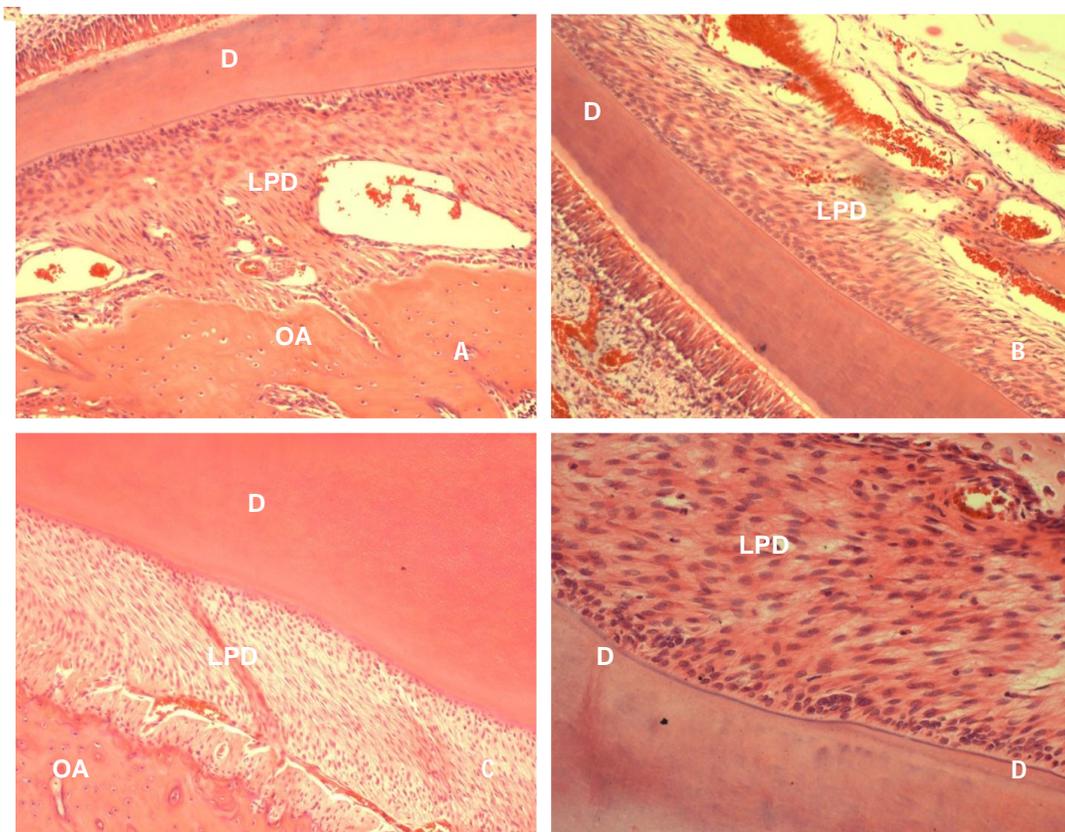
- Grupo I - *Sham*: a avaliação histológica da região do periodonto de inserção mostrou a integridade da região do cimento e dos cementoblastos. O ligamento periodontal apresentou-se organizado, com as suas fibras inseridas de acordo com os diferentes grupos que o constituem. O osso alveolar encontrou-se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

- Grupo II - Osteoporose: a avaliação histológica 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 cimento e osso alveolar, ou seja, foi observado um espessamento na região do ligamento periodontal. Em outros espécimes, este espaço encontrava-se diminuído. 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 III - Alendronato: a região do periodonto de inserção apresentou-se ligeiramente desorganizada. No entanto, cimento e cementoblastos apresentavam-se íntegros. Em alguns espécimes foram observadas reabsorções de superfície no elemento dental.

- Grupo IV - Raloxifeno: a região do periodonto de inserção apresentou-se desorganizada quanto à disposição das fibras do ligamento periodontal. No entanto, cimento 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 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 e OA representa osso alveolar). (Original, aumento 20x).

#### 4.2 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

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

A osteoprotegerina, novo membro da Família do Fator de Necrose Tumoral, mostrou uma marcação discreta no grupo *sham*, na região do ligamento periodontal. O cemento não apresentou marcação positiva para esta proteína. No entanto, osteócitos do osso alveolar mostraram marcação intensa para esta proteína. No grupo de ratas osteoporóticas e raloxifeno foram observadas imunomarcações semelhantes ao grupo *sham*. No grupo alendronato, foi observada uma imunomarcação mais marcante nos osteócitos do osso alveolar.

A RANKL, que também faz parte do novo membro da Família do Fator de necrose Tumoral, mostrou no grupo *sham*, uma imunomarcacão discreta na região do ligamento periodontal. Cementoblastos e cemento não apresentaram imunomarcacão positiva e discretos osteócitos apresentaram-se marcados para a RANKL. No entanto, após a indução da osteoporose, foi possível observar uma imunomarcacão intensa para a RANKL nos cementoblastos, bem como no ligamento periodontal e nos osteócitos do osso alveolar. A terapia com alendronato mostrou que a imunomarcacão para RANKL encontrava-se semelhante à observada no grupo *sham*. A terapia com raloxifeno mostrou uma imunomarcacão para RANKL bastante semelhante à observada no grupo osteoporose.

A imunomarcacão para osteocalcina, proteína não colágena que representa o grau de mineralização do tecido ósseo, mostrou no grupo *sham* uma discreta marcação no tecido dentinário, porém, ausência de marcações positivas no cemento e ligamento periodontal. Após a indução da osteoporose, foi observada imunomarcacão em células do ligamento periodontal bem como nos osteócitos do osso alveolar. A terapia com alendronato mostrou uma imunomarcacão discreta nas células do ligamento periodontal, no entanto, o osso alveolar estava marcado positivamente para esta proteína na sua matriz mineralizada bem como nos osteoblastos presentes. A terapia com raloxifeno mostrou marcações para esta proteína semelhantes, porém em menor intensidade do que o grupo osteoporose.

A osteopontina, proteína não colágena da matriz extracelular do tecido ósseo, apresentou marcações discretas no cemento das ratas dos grupos *sham*, osteoporose e raloxifeno. O grupo de ratas alendronato mostrou, além da marcação positiva no cemento, também mostrou uma marcação positiva no osso alveolar, caracterizando uma mineralização um pouco mais precoce do que a representada pela osteocalcina.

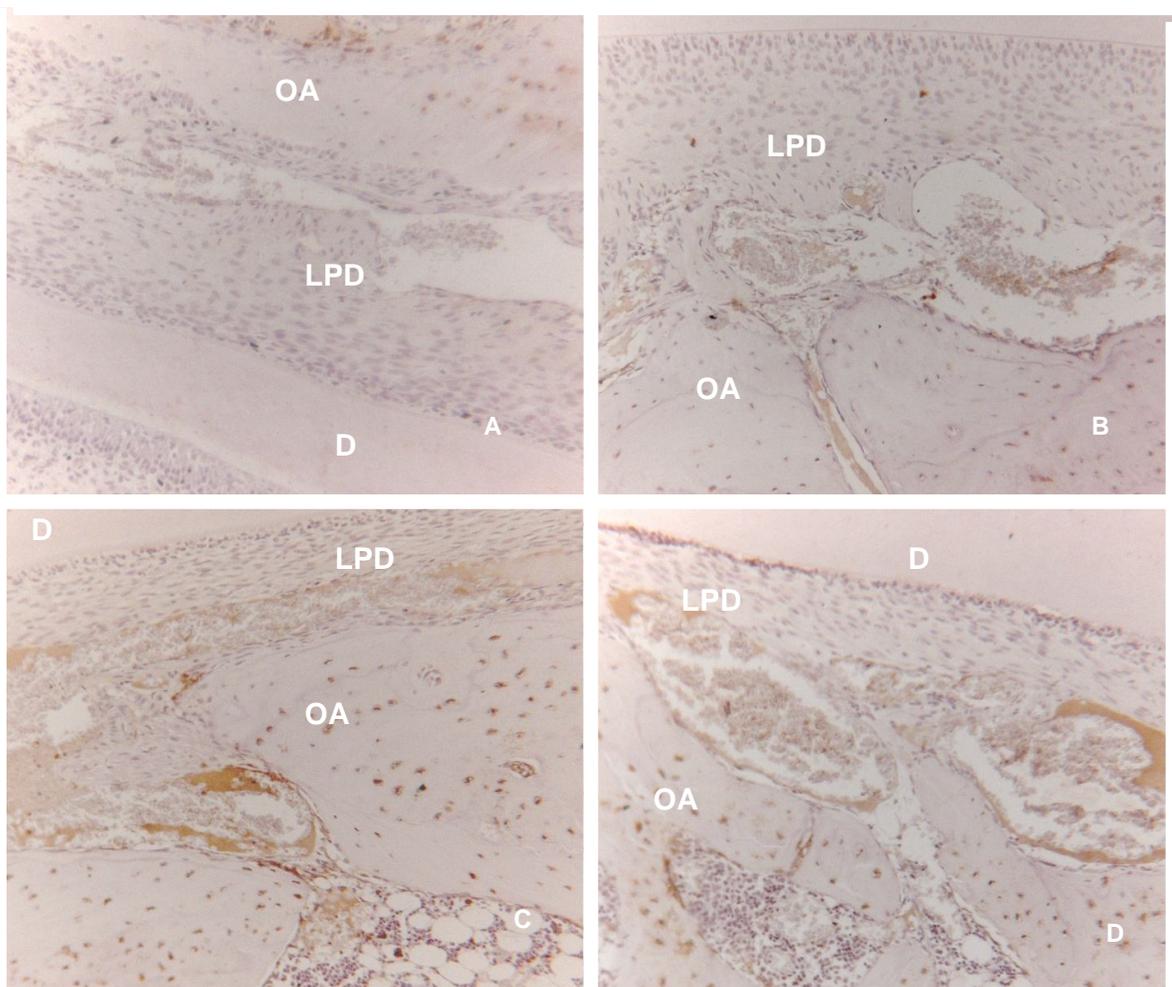
O RUNX-2, fator de transcrição que representa a diferenciação de pré-osteoblastos para osteoblastos, mostrou-se marcado positivamente em cementoblastos e osteoblastos presentes nos quatro grupos avaliados. No entanto, no grupo osteoporose, foi observada uma imunomarcacão positiva com intensidade maior do que a observada nos demais grupos.

A TRAP, que representa os osteoclastos em atividade de absorção óssea, mostrou-se bastante marcada nos grupos osteoporose e alendronato. Pouca marcação para trap foi observada nos grupos *sham* e raloxifeno.

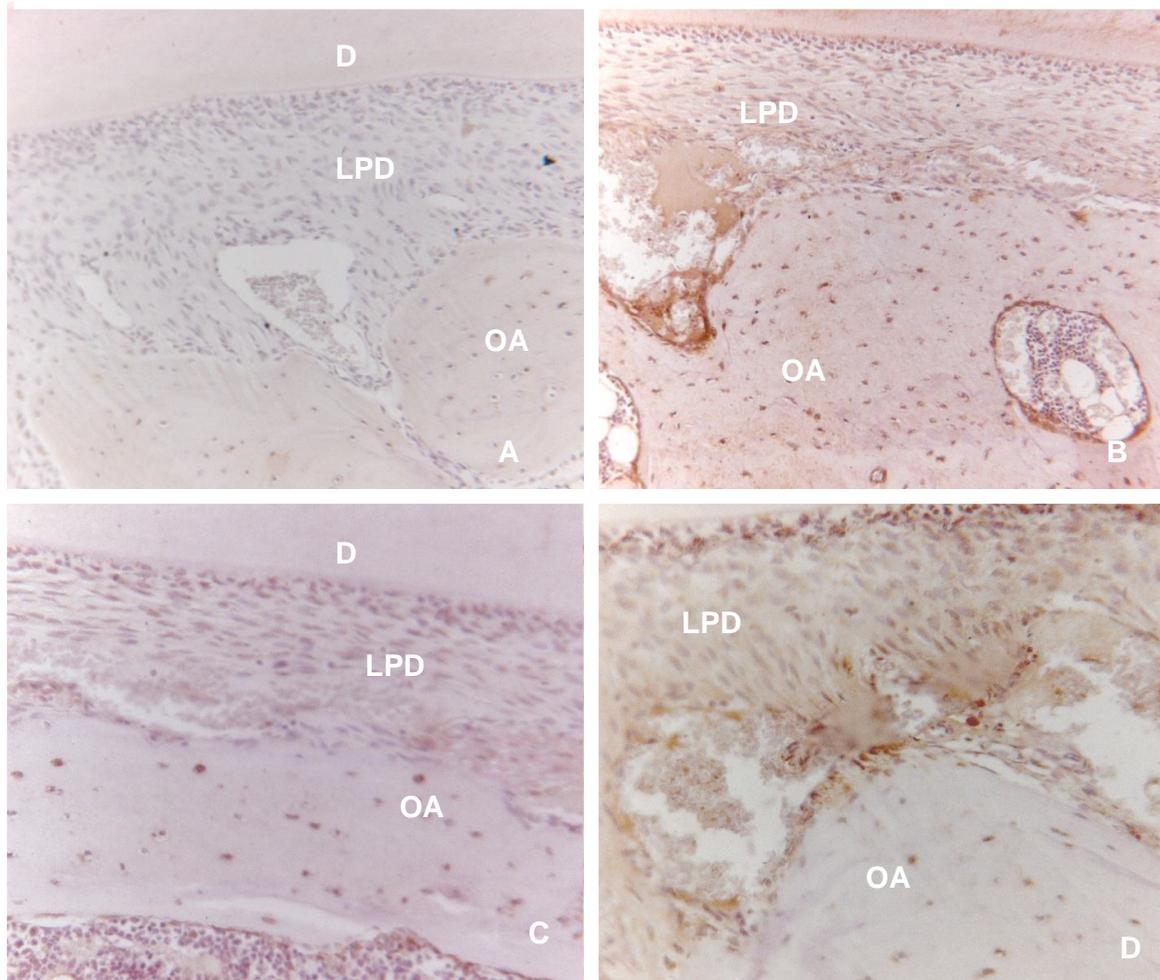
	<b>Grupo Sham</b>	<b>Grupo Osteoporose</b>	<b>Grupo Alendronato</b>	<b>Grupo Raloxifeno</b>
<b>OPG</b>	Discreta no LP. Intenso nos osteócitos.	Discreta no LP. Intenso nos osteócitos.	Intenso nos osteócitos.	Discreta no LP. Intenso nos osteócitos.
<b>RANKL</b>	Discreto no LP e eventuais osteócitos.	Intensa nos cementoblastos, LP e osteócitos.	Discreto no LP e eventuais osteócitos.	Intensa nos cementoblastos, LP e osteócitos.
<b>Osteocalcina</b>	Ausente no cimento e LP.	Osteócitos e LP.	Discreto no LP, osteócitos e osteoblastos.	Discreto nos osteócitos e LP.

	<b>Grupo Sham</b>	<b>Grupo Osteoporose</b>	<b>Grupo Alendronato</b>	<b>Grupo Raloxifeno</b>
<b>Osteopontina</b>	Discreto no cimento.	Discreto no cimento.	Discreto no cimento e osso alveolar.	Discreto no cimento.
<b>RUNX-2</b>	Cementoblastos e osteoblastos.	Cementoblastos e osteoblastos.	Cementoblastos e osteoblastos.	Cementoblastos e osteoblastos.
<b>TRAP</b>	Discreto.	Intenso.	Intenso.	Discreto.

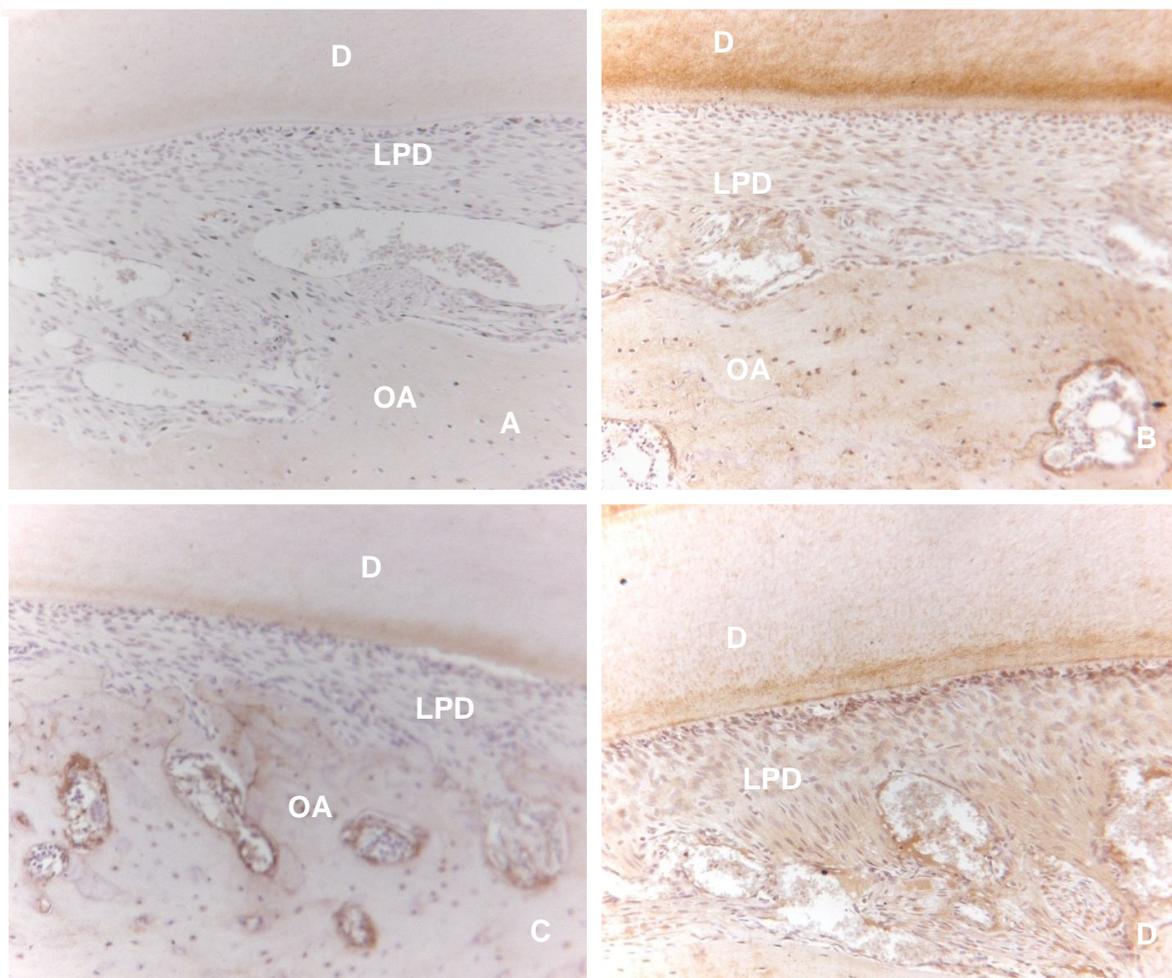
As pranchas histológicas com as imagens dos quatro grupos e cada uma das proteínas avaliadas estão representadas nas figuras de 2 a 7.



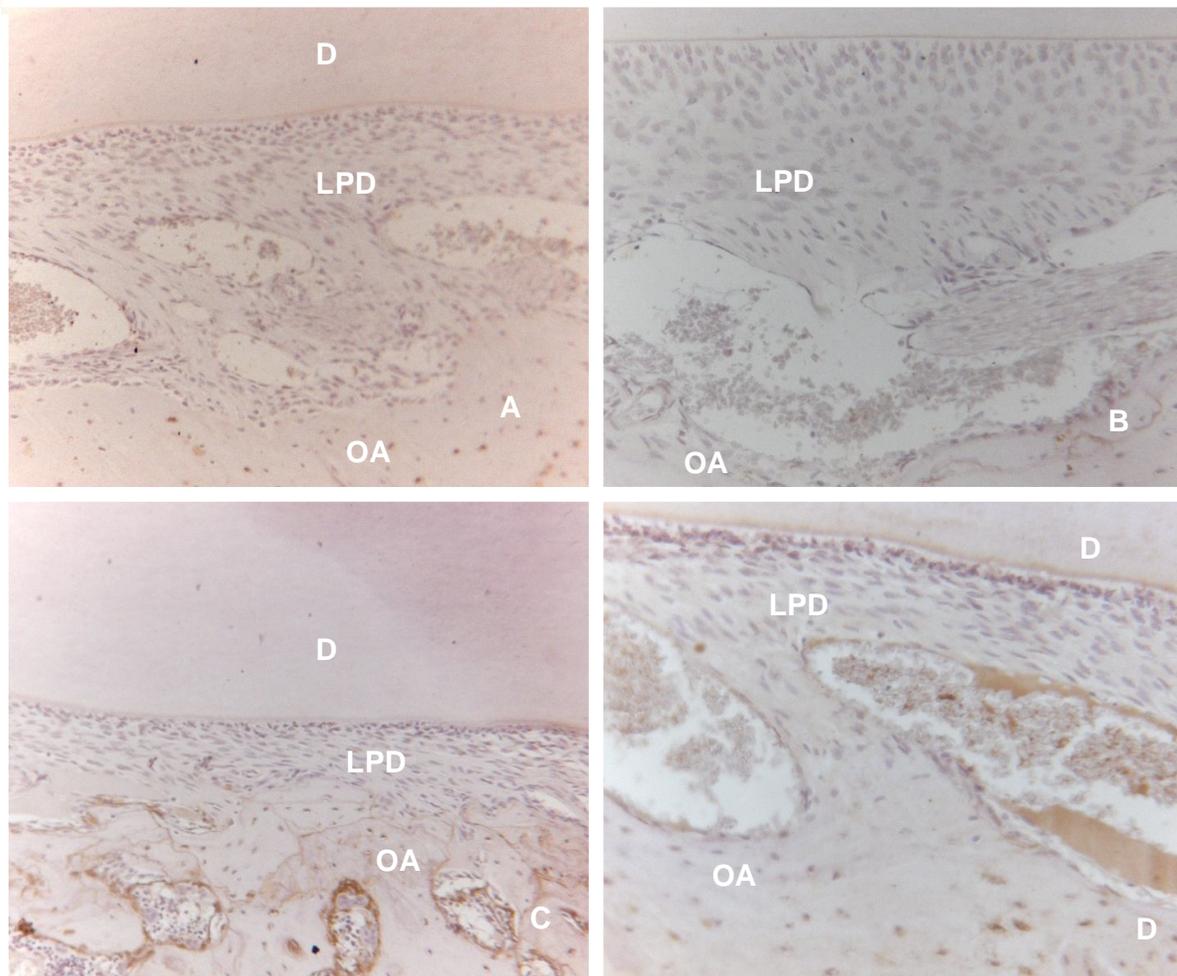
**Figura 2** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para osteoprotegerina nos grupos sham (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal e OA representa osso alveolar) (original, 16x).



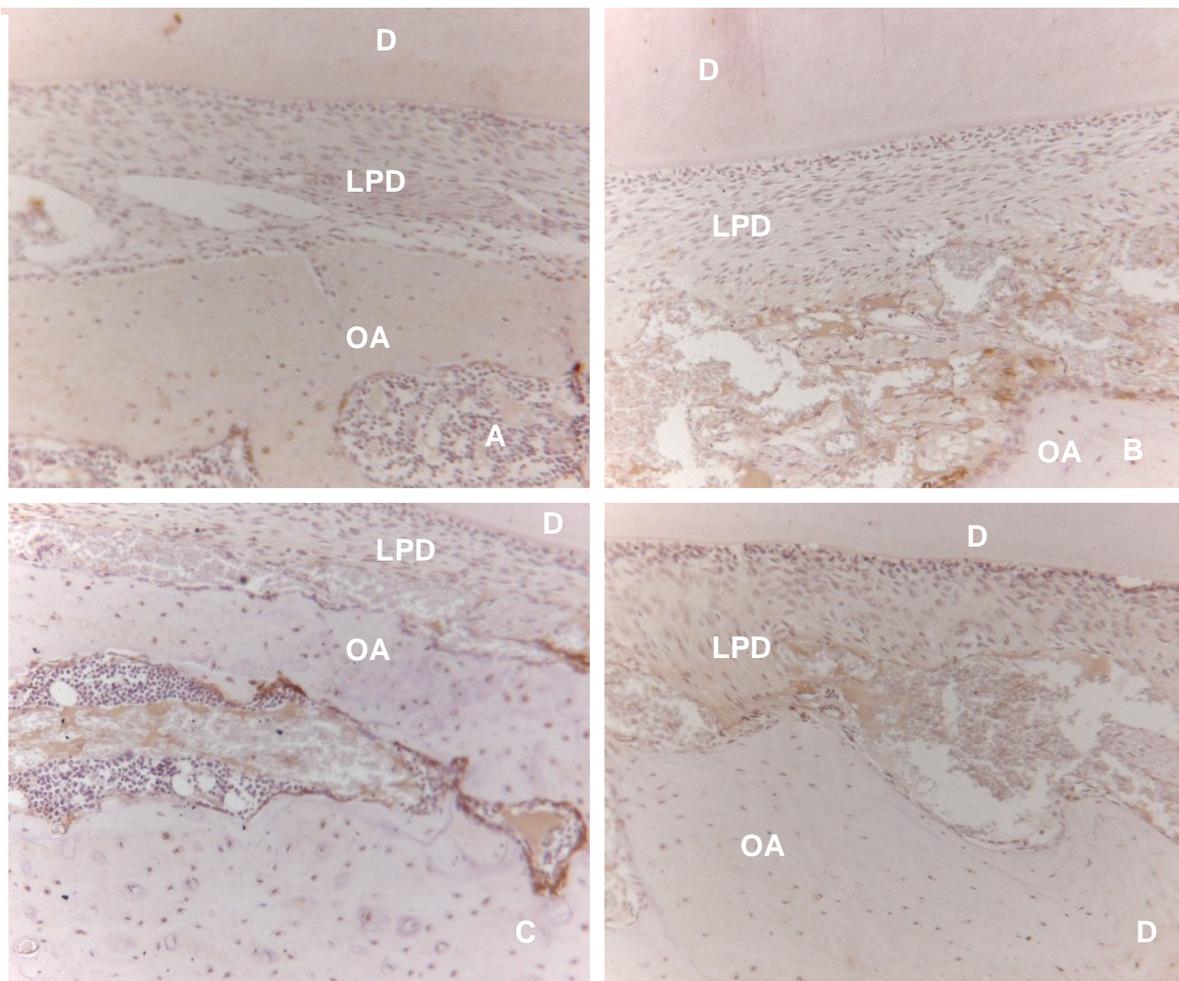
**Figura 3** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para RANKL nos grupos *sham* (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar). (original, 16x).



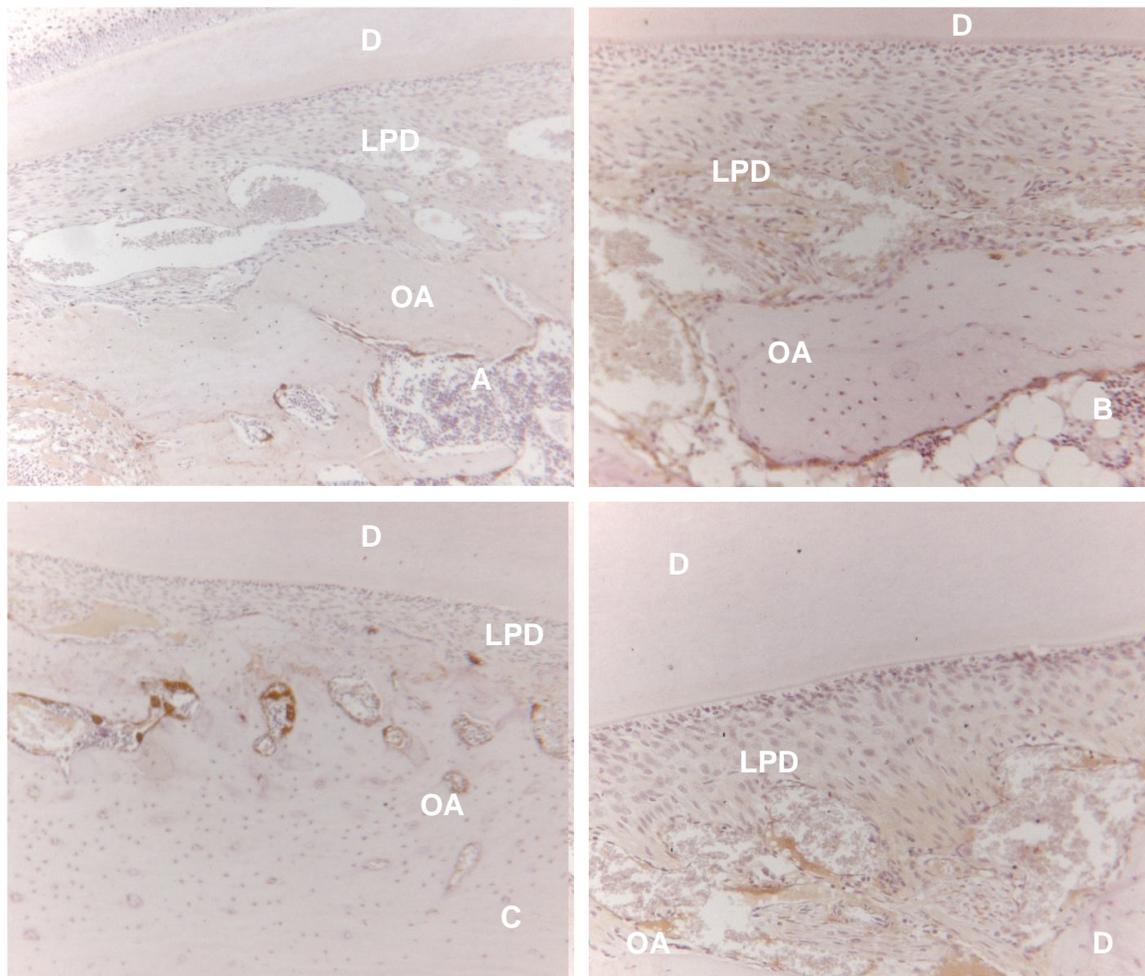
**Figura 4** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para osteocalcina nos grupos *sham* (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa a dentina, LPD representa o ligamento periodontal, OA representa osso alveolar). (original, 16x).



**Figura 5** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para osteopontina nos grupos *sham* (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar). (original, 16x).



**Figura 6** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para runx 2 nos grupos *sham* (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa a dentina, LPD representa o ligamento periodontal, OA representa osso alveolar). (original, 16x).



**Figura 7** – Prancha histológica mostrando a imunomarcção para TRAP nos grupos *sham* (A), osteoporóticas (B), osteoporóticas tratadas com alendronato (C), osteoporóticas tratadas com raloxifeno (D). (D representa dentina, LPD representa ligamento periodontal, OA representa osso alveolar)(original, 16x).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que a região do ligamento periodontal, ou mesmo do periodonto de inserção apresentam alterações nas sinalizações celulares frente a osteoporose e às diferentes terapias antiosteoporose. Esta observação é de grande importância, pois o ligamento periodontal é um tecido de fundamental 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 osteoprotegerina e RANKL, que sinalizam as respostas de remodelação óssea, mostram que há o predomínio de respostas que levam à absorção do tecido ósseo, uma vez que RANKL predomina sobre OPG (Khosla, 2000; Katagiri e Takahashi, 2002). As imunomarcações elevadas para OPG parecem ocorrer em decorrência do aumento da expressão de RANKL, principalmente após a indução da osteoporose. Os tratamentos com alendronato e raloxifeno não conseguem reverter completamente este quadro. As imunomarcações observadas para a TRAP confirmam esta observação.

A osteocalcina e a osteopontina, que representam a mineralização do tecido ósseo, apresentam uma expressão significativa no osso alveolar. A osteopontina, que faz parte da família das sialoproteínas, mostrou-se positiva no cimento, como descrito na literatura.

RUNX 2 apresenta-se marca positivamente em cementoblastos, bem como nos osteoblastos presentes no osso alveolar. No entanto, confirmando os achados com osteopontina e osteocalcina, após a indução da osteoporose e mesmo após os tratamentos com alendronato e raloxifeno, foi observado aumento na imunomarcação deste fator de transcrição nos osteoblastos do osso alveolar.

A manobra de ovariectomia associada à dieta pobre em cálcio, mostrou uma resposta aumentada quanto à expressão de proteínas como RANKL, osteocalcina, osteopontina e RUNX 2. Possíveis respostas derivadas destas sinalizações proteicas podem resultar em reabsorções de diferentes tipos: desde as reabsorções de superfície, inflamatórias e mesmo as reabsorções por substituição, resultando na formação de anquiloses. As células do periodonto de inserção respondem ao estímulo induzido pela manobra da osteoporose. É importante ressaltar que mesmo com as terapias propostas por raloxifeno ou alendronato, não é possível restaurar a fisiologia do periodonto semelhante à observada no grupo sham. Foi possível observar no presente estudo que as respostas celulares dos grupos alendronato e raloxifeno foram muito semelhantes ao grupo osteoporose.

Esta observação vem ao encontro das observações de Luvizuto e cols., 2010 onde após a manobra de ovariectomia foi observado um atraso no processo de reparo alveolar que não foi compensado completamente pela reposição com estrógeno. A terapia com raloxifeno foi capaz de restabelecer as características do osso alveolar em reparação a longo prazo ou seja, após um período maior de observação. Deve-se considerar a possibilidade de se avaliar o periodonto de inserção de animais com osteoporose e tratados com raloxifeno a longo prazo. O mecanismo de ação deste medicamento parece atuar a longo prazo e portanto, respostas mais favoráveis com este medicamento poderiam ser observadas caso se estendesse o tempo de observação.

Uma observação bastante interessante é quanto à presença de marcação positiva para RANKL em cementoblastos após a indução da osteoporose. A presença desta proteína, que sinaliza o processo de absorção óssea mostra que possivelmente cementoblastos estejam sinalizando para que se ocorra absorção do elemento dental. Esta seria apenas uma observação inicial e que deve ser

investigada com mais detalhe, inclusive, avaliando-se a imunomarcação para RANK, receptor transmembrana ao qual o RANKL se liga para ativar a atividade osteoclástica.

## **6 CONCLUSÕES**

Os resultados do presente estudo mostram que ocorrem alterações na expressão de diferentes proteínas durante a indução de osteoporose e após as diferentes terapias antiosteoporose 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.

## REFERÊNCIAS

1. BOONEM, S. et al. Optimizing the benefits of biphosphonates in osteoporosis. **Treat Endocrinol.**, Auckland, N.Z, v. 5, n. 6, p. 375-383, 2006.
2. 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.
3. 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.
4. CHEN, S.C.; MARINO, V.; GRONTHOS, S.; BARTOLD, P.M. Location of putative stem cells in human periodontal ligament. **Journal of Periodontal Research**, Denmark, v. 41, p. 547-553, 2006.
5. DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, New York, v. 289, p. 1501-1504, 2000.
6. DUARTE, P.M. et al. Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth supporting alveolar bone: a histometric study in rats. **Journal of Periodontal Research**, Denmark, v. 41, p. 541-546, 2006.
7. ELOVIC, R.P.; HIPPEL, J.A.; HAYES, W.C. Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, DC, v. 10, p. 1087-93, 1995.
8. FROLIK, C.A. et al. Time dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen and alendronate. **Bone**, Washington, DC, v. 18, n. 6, p. 621-627, 1996.
9. GEDDES, A.; Animal models of bone disease. In: Principles of bone biology. San Diego, **Academic Press**, Boston, p.1343, 1996.
10. HARRIS, S.A.; TAU, K.R.; TURNER, R.T.; SPELSBERG, T.C. Estrogens and progestins. In: Principles of Bone Biology. 1<sup>st</sup>. ed., New York, **Academic Press**, p.507, 1996.

11. 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**, New York, v. 68, p. 1225-1238, 2005.
12. HERRERO, S. et al. Low bone density with normal bone turnover in ovariectomized and streptozotocin induced diabetic rats. **Calcified Tissue Intern**, EUA, v. 62, p. 260-265, 1998.
13. 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, 2008.
14. HSIEH YD, DEVLIN H, MCCORD F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Arch Oral Biol.**, New York, v. 40, p. 529-31, 1995.
15. JAHANGIRI, L.; KIM, A.; NISHIMURA, I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodelling. **J. Prosthet. Dent.**, United States, v. 77, p. 435, 1997.
16. JEFFCOAT, M.K.; CHESTNUT, C.H. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. **JADA**, Chicago, v. 124, p. 49, 1993.
17. JOHNELL, O.; SCHEELE, W.H.; LU, Y.; REGINSTER, J.Y 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, Ill, v. 87, n. 30, p. 985-992, 2002.
18. KAYNAK, D. et al. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. **Journal of Periodontology**, Denmark, v. 74, p. 1348-1354, 2003.
19. LEKIC, P. et al. Bisphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. **The Anatomical Record**, New York, v. 247, p. 329-340, 1997.
20. LONG, J.A.; EVANS, H.M. Characteristics effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, India, v. 8, n. 3, p. 38-39, 1922.

21. LEKIC, P. et al. Biphosphonate modulates proliferation and differentiation of rat periodontal ligament cells during wound healing. **The Anatomical Record**, New York, v. 247, p. 329-340, 1997.
22. LUSTOSA-PEREIRA, A. et al. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rats teeth. **Dental Traumatology**, Chicago, v. 22, p. 30-35, 2006.
23. LUVIZUTO, E.R. 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.
24. LUVIZUTO, E.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**, Philadelphia, v. 55, p. 52-59, 2010.
25. MANOLAGAS, S.C.; JILKA, R.L. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. **N. Engl. Int. Med.**, England, V. 332, n. 5, p. 305, 1995.
26. MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TARINO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, USA, v. 62, p. 609-614, 2002.
27. MESSALI, E.M. et al. Raloxifene therapy interacts with serum osteoprotegerin in postmenopausal women. **Maturitas**, Amsterdam, v. 56, p. 38-44, 2007.
28. OHTA, S.; YAMADA, S.; MATUZAKA, K.; INOUE, T. The behavior of stem cells and progenitor cells in the periodontal ligament during wound healing as observed using immunohistochemical methods. **Journal of Periodontal Research**, Dinamarca, v. 43, p. 595-603, 2008.
29. OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction: histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, Araçatuba, v. 2, n. 2, p. 153-169, 1973.
30. Da PAZ, L.H.B.C. et al. 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**, Brasil, v.34, p. 1015-1022, 2001.

31. PERINPANAYAGAM, H. et al. Alveolar bone osteoblast differentiation and RUNX2/CBFA1 expression. **Archives of Oral Biology**, Philadelphia, v. 51, p. 406-415, 2006.
32. SALOMÃO, J.I.S.; GRANDINI, S.A.; OKAMOTO, T. Processo de reparo em feridas de extração dental em ratas ooforectomizadas. Estudo histológico. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, Araçatuba, v. 3, p. 183-196, 1974.
33. SATO, M. 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**, EUA, v. 279, n. 1, p. 298-305, 1996.
34. SCULEAN, A. et al. Immunohistochemical investigation on the pattern of vimentin expression in regenerated and intact monkey and human periodontal ligament. **Archives of Oral Biology**, Philadelphia, v. 48, p. 77-86, 2003.
35. SIMPSON, H.E. The healing of extraction wounds. **Br. Dent. J.**, USA, v.126, n.2, p. 550-557, 1969.
36. SONES, A.D.; WOLINSKY, L.E.; KRATOCHVIL, F.J. Osteoporosis and mandibular bone resorption: a prosthodontic perspective. **J. Prosthet Dent.**, USA, v. 56, n. 6, p. 732, 1986.
37. STUERMER, E.K. 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.**, Germany, v. 395, p. 163-172, 2010.
38. TANAKA, M.L ERIJI, S.; KOHNO, S.; OZAWA, H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. **J. Prosthet. Dent.**, USA, V. 79, n. 6, p. 685, 1998.
39. TEOFILO, M.JM. et al. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxila and proximal tibia of female rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 302-306, 2003.
40. 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**, Philadelphia, v. 49, n. 9, p. 755-762, 2004.

41. TSURUOKA, S. et al. Dosing time-dependent effect of raloxifene on plasma fibrinogen concentration in ovariectomized rats. **Chronobiology International**, New York, v. 25, n. 5, p. 808-818, 2008.
42. XIONG, H. et al. Effect of an estrogen deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. **J. Endod.**, New York, v. 33, p. 1304-1308, 2007.
43. ZECCHIN, K.G. et al. Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. **Calcified International Tissue**, New York, 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 OVARIETOMIZADAS 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 Luvizuto, 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

A handwritten signature in blue ink that reads "Tereza Cristina Cardoso da Silva".

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