

**UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO**

**PAULA KENNERLY HERRERA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO  
FLUORETO NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM  
CAMUNDONGOS COM DENSIDADES ÓSSEAS  
DIFERENTES**

BAURU  
2013

**PAULA KENNERLY HERRERA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO  
FLUORETO NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM  
CAMUNDONGOS COM DENSIDADES ÓSSEAS  
DIFERENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título em bacharel em Odontologia, baseado na dissertação da aluna Andressa Pelissari Zambolin Sabino da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e sendo aqui apresentado sobre a orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU  
2013

H5655a Herrera, Paula Kennerly

Avaliação histológica do efeito do fluoreto no reparo ósseo alveolar em camundongos com densidades ósseas diferentes / Paula Kennerly Herrera -- 2013.  
66f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pinto Saraiva.  
Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Reparo ósseo. 2. Fluoreto. 3. Tecido ósseo. I. Saraiva, Patricia Pinto. II. Oliveira, Rodrigo Cardoso de. III. Título.

**PAULA KENNERLY HERRERA**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DO FLUORETO NO  
REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS COM  
DENSIDADES ÓSSEAS DIFERENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título em bacharel em Odontologia, baseado na dissertação da aluna Andressa Pelissari Zambolin Sabino da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e sendo aqui apresentado sobre a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Pinto Saraiva.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Mariza Matsumoto  
Universidade do Sagrado Coração

---

Profa. Dra. Mirella Lindoso Gones Campos  
Univerdade do Sagrado Coração

Bauru, 13 de dezembro de 2013.

Com muito carinho, dedico esse trabalho à minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos e que se não fosse por eles não estaria aqui hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus pelo Seu propósito em minha vida, porque sem mesmo eu merecer Ele me reserva sempre o melhor, guiando, protegendo e abençoando. Este trabalho, este curso, tudo que tenho e tudo que sou é graças à Ele, que deu o Seu Filho em meu lugar e ainda assim dirige o meu viver de maneira inexplicável. Obrigada Deus por todos os Seus milagres!

A minha família, que são um presente divino. Meu pai, Péricles Fransciquette Herrera pelo exemplo de luta e sacrifício, minha mãe Cilma Kennerly Herrera que me deu força, coragem e junto com o meu pai as possibilidades que me fizeram estar aqui. À minha irmã Laís Kennerly Herrera que com paciência e amizade me faz ver a vida de uma maneira mais engraçada e leve. Aos meus avós Oscar Kennerly e Iraídes Caramel Kennerly que são meus anjos da guarda, pois criaram-me com simplicidade, bondade e generosidade, fazendo com que eu busque ser cada dia melhor e mais parecida com eles. Só quero dizer que os amo muito e que são de fundamental importância para tudo isso fosse possível.

Aos professores Leandro de Andrade Holgado e Patrícia Pinto Saraiva que abriram as portas dessa casa, despertando em mim o gosto pela pesquisa e a vontade de me espelhar neles, mostrando uma Odontologia mais profunda, diferente e dando-me sempre apoio.

À minha eterna parceira de clínica Érika Tiemi Kurimori que dividiu comigo grandes momentos de aprendizagem de maneira comprometida, sem deixar a diversão de lado. Ouvindo meu choro e compartilhando sorrisos, além do material! Uma amizade especial que tem um lugar de reserva infinita no meu coração.

À FAPESP pelo apoio financeiro durante a minha iniciação científica de Processo 2012/02229-2.

Ao Professor Rodrigo Cardoso de Oliveira e à Mestra Andressa Pelissari Zambolin Sabino pela oportunidade, confiança e aprendizagem que me proporcionaram através deste trabalho, que vai além de uma experiência acadêmica e sim de vida. Pois o tempo voltado para o estudo e realização deste trabalho, me motivou a ter força, dedicação e responsabilidade. O meu sincero obrigado!

Aos meus amigos que me apoiaram e fizeram essa caminhada mais alegre e divertida, sendo eles da faculdade ou aqueles com quem já dividia a minha história, meu muito obrigado por poder compartilhar mais essa grande etapa!

## RESUMO

Entre as várias terapêuticas propostas para o tratamento da osteoporose, a administração do fluoreto é uma alternativa que ainda apresenta controvérsia na literatura. No entanto, o mecanismo de ação do fluoreto em células ósseas ainda não está bem esclarecido. Deste modo, este trabalho visou avaliar a reparação óssea alveolar de ratos sob o efeito do fluoreto administrado na água de beber. Neste trabalho foram utilizados 4 grupos com camundongos das linhagens C57BL/6J (total de 32) e C3H/HeJ (total de 32) de 60 dias de vida, os quais receberam água deionizada e água com 50 ppm de fluoreto. Foram realizadas extrações do incisivo superior esquerdo. A coleta da maxila esquerda foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 dias, para análise histológica por meio de microscopia ótica. Foram quantificados, por meio de morfometria, os dados de formação/reabsorção de coágulo sanguíneo, formação de tecido conjuntivo de granulação e neoformação óssea. As análises estatísticas comparativas foram feitas por meio do teste estatístico one-way ANOVA complementado pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Em geral, para todos os grupos, a análise histológica mostrou neoformação óssea a partir das paredes do alvéolo e formação de ilhotas ósseas invadindo o centro dos alvéolos, substituindo o tecido conjuntivo existente. O tecido ósseo neoformado substituiu aos poucos o tecido conjuntivo ao longo dos períodos experimentais, sendo esse fenômeno ligeiramente mais evidente nos camundongos da linhagem C57BL/6J. A análise morfométrica confirmou os achados histológicos em relação à quantidade de tecido ósseo neoformado e mostrou diminuição do tecido ósseo neoformado no último período (28 dias) nos animais C3H/HeJ (grupos controle e experimental). Concluímos que o processo de reparo ósseo alveolar é semelhante nas duas linhagens estudadas, porém apresentam padrão de formação óssea diferentes entre elas. O fluoreto parece influenciar as etapas do processo de reparo alveolar nas duas linhagens, aumentando a quantidade de osso neoformado, no entanto, a linhagem de camundongos C57BL/6J é mais propensa aos efeitos do flúor.

**Palavras-chave:** Reparo ósseo. Fluoreto. Tecido ósseo.

## ABSTRACT

Among the various therapeutic proposed for the osteoporosis' treatment, the fluoride's administration is an alternative that still is controversy in the literature. However, the mechanism of fluoride's action on bone cells is not well understood. Thus, the study aimed to evaluate the alveolar bone repair in mouse under the fluoride's effect when administrated in the drinking water. In this study, four groups of mouse, of the strains C57BL/6J (32 total) and C3H/HeJ (32 total) 60 days old, who received deionized water and water with 50ppm of fluoride. The upper left central incisor was extracted. And the left maxilla was collected at 7, 14, 21 and 28 days for histological analysis by light microscopy. The analysis of data were quantified by morphometric about formation/resorption of blood clot, formation of the granulation's connective tissue and new bone formation. The comparative statistical analyzes were performed using the statistical test by using one-way ANOVA, test complemented by Tukey ( $p < 0, 05$ ). In general, for all groups, histological analysis showed new bone formation from the alveolar walls and formation of bone islets invading the center of the alveoli, replacing the existing connective tissue. The new bone formed gradually replaced the connective tissue along the experimental periods, being this phenomenon more evident in the C57BL/6J strain. The morphometric analysis confirmed the histological findings in relation to the new bone tissue amount and showed decrease this tissue in the last period (28 days) in animals C3H/HeJ (control and experimental groups). We concluded that the process of alveolar bone repair is similar in both strains studied, but present different pattern of bone formation between them. The fluoride seems to influence the phases of the alveolar repair process in both cell lines, increasing the amount of newly formed bone, however, the mice strain C57BL/6J is more prone to the fluoride's effects.

**Keywords:** Bone repair. Fluoride. Bone tissue.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Exodontia do incisivo. A) Dissecção da mucosa gengival e luxação do incisivo com auxílio de uma sonda exploradora. B) Com uma pinça clínica foi realizada a exodontia do incisivo ..... 22
- Figura 2 - Divisão do alvéolo dental de camundongo em terços: apical, médio e cervical, para facilitar análise ..... 23
- Figura 3: Análise morfométrica do alvéolo dental de camundongo com determinação da área total do alvéolo (linha vermelha) e área de tecido ósseo neoformado (contornos em azul) ..... 24
- Figura 4 - Período de 7 dias - Grupo II: A) Nesta área cervical (A1), pode-se observar o alvéolo preenchido por tecido conjuntivo (TC) e pequena neoformação óssea (NO). Alguns vasos podem ser notados (V) entre o tecido ósseo e o conjuntivo. B) Camada de osteoblastos (setas) pode ser notada. Coloração H.E. .... 27
- Figura 5: Grupos III e I, período de 14 dias. A) Grupo III apresenta neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P) com projeções para o centro do alvéolo, além da presença de tecido conjuntivo (TC). B) Grupo I: o alvéolo está preenchido por tecido conjuntivo (TC) e pequena neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P), sem muitas projeções para o centro. Alguns vasos podem ser notados (V). Coloração H.E. .... 30
- Figura 6: Grupo IV períodos de 14 e 21 dias. A) Grupo IV (14 dias), apresenta neoformação óssea (NO) dentro do alvéolo oriundo das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC). B) No Grupo IV (21 dias), o alvéolo apresenta as mesmas estruturas e mantendo as características que no período de 14 dias, porém na neoformação óssea (NO) as trabéculas apresenta-se mais espessas Aumento de 4X. Coloração H.E. .... 32
- Figura 7: Grupo II períodos de 21 e 28 dias. A) Grupo II (21 dias), apresenta neoformação óssea (NO) dentro do alvéolo e próximas as paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC). B) No Grupo II (28 dias), o alvéolo está preenchido por tecido conjuntivo (TC) e pequena neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P). Coloração H.E. .... 34

Figura 8 - Grupo I (período de 7 e 28 dias). A) Grupo I (7dias), apresenta uma neoformação óssea (NO) a partir da parede alveolar (P) e ao centro do alvéolo encontra-se tecido conjuntivo (TC), também é visto a presença de vasos (V). B) Grupo I (28 dias), a neoformação óssea (NO) está trabecularmente espalhada por todo o alvéolo, sendo oriunda da parede alveolar (P), mas ainda encontra-se tecido conjuntivo (TC) pela extensão do alvéolo juntamente com vasos (V) ..... 36

Figura 9 - Grupo II (períodos de 7 e 28 dias). A) Grupo II (7 dias), apresenta pouca neoformação óssea (NO) a partir das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) ocupando a maioria do alvéolo. B) No Grupo II (28 dias), o alvéolo está preenchido por neoformação óssea (NO) que apresenta-se de forma trabecular, desde as paredes (P), porém com presença significativa de tecido conjuntivo (TC) e com vasos (V). Coloração H.E. .... 37

Figura 10 - Grupo III períodos de 7 e 28 dias. A) Grupo III (7 dias), apresenta pequena neoformação óssea (NO) a partir das paredes do alvéolo (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) ao centro. B) No Grupo III (28 dias), o alvéolo está preenchido por grande neoformação óssea (NO) que preenche todo o espaço que não há presença tecido conjuntivo (TC) e vasos (V), desde as paredes (P). Coloração H.E. .... 38

Figura 11 - Grupo IV períodos de 7 e 28 dias. A) Grupo IV (7 dias), apresenta neoformação óssea (NO) por todo o alvéolo e a partir das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) mais ao centro. B) No Grupo IV (28 dias), o alvéolo está preenchido por grande neoformação óssea (NO) que preenche todo o espaço que não há presença tecido conjuntivo (TC) e com mais vasos (V) quando comparado com o Grupo III, desde as paredes (P). Coloração H.E. .... 39

Figura 12 - Terço Cervical: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço cervical (A1) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV ..... 41

Figura 13 - Terço Medial: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço medial (A2) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV. 42

Figura 14 - Terço Apical: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço apical (A3) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV ... 44

Figura 15 - Área de tecido ósseo neoformado (%) em alvéolo (A1+A2+A3) dos animais C3H, submetidos a diferentes tratamentos nos diferentes períodos experimentais ..... 45

Figura 16 - Área de tecido ósseo neoformado (%) em alvéolo (A1+A2+A3) dos animais C57, submetidos a diferentes tratamentos nos diferentes períodos experimentais ..... 45

Figura 17 - Comparação da área (%) de tecido ósseo neoformado (A1+A2+A3) em animais C3H e C57 submetidos ao tratamento com água deionizada (controle) nos diferentes períodos experimentais ..... 46

Figura 18 - Comparação da área (%) de tecido ósseo neoformado (A1+A2+A3) em animais C3H e C57 submetidos ao tratamento com água fluoretada (50ppm) nos diferentes períodos experimentais ..... 46

## SÚMARIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 TECIDO ÓSSEO .....	14
2.2 REPARO ALVEOLAR .....	15
2.3 OSTEOPOROSE.....	16
2.4 FLUORETO.....	17
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	21
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	21
4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS (MAXILAS).....	22
4.4 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO DAS PEÇAS PARA MICROSCOPIA .....	23
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	25
<b>5 RESULTADOS</b> .....	26
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA .....	26
5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE OS PERÍODOS INICIAL (7 DIAS) E FINAL (28 DIAS) .....	35
5.3 DESCRIÇÃO DA MORFOMETRIA .....	40
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	47
6.1 DENSIDADE ÓSSEA .....	47
6.2 COMPARAÇÃO ENTRE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR NAS DUAS LINHAGENS.....	47
6.3 EFEITO DO FLUORETO NO REPARO ALVEOLAR DAS DIFERENTES LINHAGENS.....	50
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>APÊNDICE A – ÁREAS DE TECIDO ÓSSEO E CONJUNTIVO, RESULTANTES DA MORFOMETRIA</b> .....	61
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA EM ANIMAIS DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU - USP</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

Com grande capacidade de regeneração após injúrias o tecido ósseo é um tecido conjuntivo extremamente especializado, vascularizado e dinâmico, pois sofre reabsorções e neoformações fisiológicas constantes, principalmente quando comparado com os outros tipos de tecidos como: muscular esquelético, nervoso, tendões e etc. Rosen e Thies (1992), Hing (2004) e Bahar et al. (2007) afirmam que processos moleculares e celulares muito semelhantes entre si envolvem as etapas da regeneração e da formação embriogênica óssea. E segundo Enlow e Hans (1998) uma neoformação óssea graças ao processo fisiológico de remodelamento e adaptação funcional, acaba adquirindo características iguais ao do tecido adjacente.

É conhecido por serem eventos dinâmicos, pela formação e reabsorção óssea. Baron e Hesse (2012) dizem que pode ocorrer certas patologias como a osteoporose, quando existe um desequilíbrio entre esses sistemas no tecido ósseo, tendo a sua homeostase comprometida.

Para o tratamento da osteoporose diversas substâncias vem sendo usadas e entre elas o fluoreto que foi o primeiro agente anabólico, porque é capaz de estimular a neoformação óssea resultando a integridade do esqueleto, a ser investigado e por destacar-se como um elemento que parece alterar sobremaneira a atividade de osteoblastos. (LAU et al., 1993; YOON et al., 1995; XU et al., 2010). Yan et al. (2011) mostra que o íon F<sup>-</sup> tem influência sobre as células de efeito mitogênico, mineral e arquitetura óssea, ainda aparentando ser dose-dependente.

Para colaborar na exploração do efeito da ação do flúor na formação e no desenvolvimento de esmalte e na homeostase óssea, estudos foram realizados estudos genéticos em diferentes espécies de camundongos (EVERETT et al., 2002; EVERETT et al., 2009; VIEIRA et al., 2005; MOUSNY et al., 2006; MOUSNY et al., 2008; YAN et al., 2007; CARVALHO et al., 2009).

Entretanto, ainda não foi bem esclarecido o mecanismo de ação do fluoreto em osteoblastos, principalmente entre duas linhagens de camundongo com densidades ósseas diferentes, C3H/HeJ de maior densidade e C57BL/6J de menor. No decorrer do estudo as informações avaliadas poderão auxiliar em trabalhos

futuros utilizando o flúor como agente anabólico, além de diferenciar o reparo ósseo das duas linhagens de camundongos utilizados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

Sendo um tecido metabolicamente ativo, o tecido ósseo, sofre remodelações fisiológicas constantes (reabsorção e neoformação). Radominski (2004) explica que mantendo suas propriedades mecânicas e funcionando como reserva de cálcio para o organismo, o processo de remodelação acontece em velocidades diferentes nas diferentes partes do corpo, permitindo com que o osso se renove constantemente. Para Giannoudis, Einhorn e March (2007) além do processo de remodelação, mesmo na fase adulta, o osso apresenta grande capacidade regenerativa.

O componente celular do tecido ósseo pode ser dividido entre células da linhagem osteoblástica e osteoclástica. (JUDAS et al., 2012; NANJI, 2008). As células da linhagem osteoblástica são responsáveis pelos processos de formação e mineralização da matriz óssea. Compreende os osteoblastos – responsáveis pelo processo de síntese, secreção, maturação e mineralização da matriz óssea. Nesta série ainda estão os osteócitos (osteoblastos incorporados na matriz óssea mineralizada, responsáveis pela manutenção do osso maduro, regulação da reabsorção óssea pelos osteoclastos e modulação das respostas ao estímulo mecânico). (HUGHES; AUBIN, 1997).

Teitelbaum (2000); Hadjidakis e Androulakis (2006) afirmam que a linhagem osteoclástica relaciona-se com a reabsorção óssea e compreendem os osteoclastos, que são células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células de origem hematopoiéticas (percursores de linhagem monócito-fagócito).

Ao longo da vida do ser humano há momentos em que pode haver um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, como durante o envelhecimento e as alterações metabólicas. Judas et al. (2012), traz que em casos como esses, a função estrutural é quase sempre sacrificada a favor da metabolização e Maclean et al. (2008) complementa dizendo que deslocando o processo a favor da reabsorção óssea, tendo resultantes doenças como a osteoporose. Porém, podem ocorrer situações em que a reabsorção óssea esteja deficiente, levando à ocorrência de Osteoporose (MANKIN & MANKIN, 2008).

## 2.2 REPARO ALVEOLAR

O processo de reparo alveolar ocorre de forma bastante dinâmica, que envolve várias etapas celulares e caracteriza-se por eventos biológicos que ocorrem em diferentes períodos de tempo (ROSSI et al., 2010).

Os eventos biológicos e histológicos podem ser enumerados considerando-se quatro fases principais na evolução do reparo alveolar (SATO & TAKEDA, 2007; ROSSI et al., 2010):

1. Estágio Exsudativo: preenchimento do alvéolo dental por coágulo sanguíneo (1 a 7 dias após a exodontia em alvéolo de ratos);
2. Estágio Proliferativo: intensa proliferação celular, com desenvolvimento e maturação do tecido conjuntivo de granulação. A formação deste tecido de granulação inicia-se nas regiões periféricas do coágulo adjacente à cortical óssea (7 a 14 dias após a exodontia em alvéolo de ratos). O reparo tem início no sentido da periferia do coágulo para o centro, e da apical em direção à cervical. De imediato macrófagos podem ser observados na periferia do coágulo, com o intuito de fagocitá-lo e permitir que os fibroblastos (originados das células mesênquimais indiferenciadas advindas do ligamento periodontal e dos capilares sanguíneos) formem o tecido de granulação constituído por vasos sanguíneos, fibras colágenas e células inflamatórias. O tecido de granulação maduro é de grande importância para o início da formação óssea.
3. Estágio Reparativo: gradual reposição do tecido conjuntivo por trabéculas ósseas (14 a 21 dias após a exodontia em alvéolo de ratos). Neste estágio ocorre a migração de células mesênquimais indiferenciadas (osteoprogenitoras), derivadas do ligamento periodontal, para se diferenciarem em osteoblastos. Os osteoblastos se agrupam produzindo pequenas áreas de matriz óssea (orgânica), também denominada tecido osteóide. Este tecido ósseo imaturo se unem nas porções mais periféricas em direção ao centro formando as trabéculas e tendo início o processo de mineralização.
4. Estágio de Remodelamento: caracterizado pelo processo de substituição do tecido ósseo primário por tecido ósseo secundário (a partir de 21 dias após a exodontia em alvéolo de ratos).



O reparo ósseo ocorre de forma semelhante tanto para fraturas ósseas, como para defeitos cirúrgicos, como a exodontia. O processo de reparo alveolar somente é considerado completo quando o alvéolo encontra-se totalmente preenchido por tecido ósseo neoformado e a crista alveolar adjacente remodelada, o que ocorre aos 28 dias pós exodontia em ratos, e 64 dias em humanos (AMLER, 1999).

## 2.3 OSTEOPOROSE

Segundo Faloni e Cerri (2007), a osteoporose pode ser definida como uma patologia óssea que se caracteriza pela perda de massa óssea e pelo comprometimento da microarquitetura óssea, levando à fragilidade esquelética e por consequência aumentando o risco de fraturas. Sendo assim, a reabsorção predomina sobre a formação óssea, resultando em diminuição da massa óssea. As influências mais importantes para a ocorrência deste desequilíbrio em mulheres são a idade e o hipostrogenismo que ocorre na pós-menopausa. O processo é controlado por uma complexa interrelação de hormônios sistêmicos, força mecânica, citocinas, prostaglandinas e fatores locais de crescimento. (RIGGS & MELTON, 1995).

A diminuição dos níveis de estrogênios circulantes leva a uma ativação nos ciclos de remodelação óssea, com predomínio nas fases de reabsorção em relação à formação, devido ao aumento do número de osteoclastos na superfície dos ossos trabeculares. Também tem sido sugerido que os osteoclastos tornam-se mais ativos, possivelmente pela diminuição nas taxas de apoptose ao final da fase de reabsorção, resultando em grandes cavidades que são parcialmente reparadas pela atividade dos osteoblastos. (KEATING; MANASSIEV; STEVENSON, 2000).

Existem diversas terapias utilizadas para o tratamento da osteoporose. A terapia de reposição hormonal, apesar dos benefícios que propicia para a manutenção da saúde e consequentemente da qualidade de vida das mulheres, deve ser utilizada com cuidado, pois em algumas pode acarretar riscos, um dos mais importantes é o aumento na incidência de casos de câncer de mama e de endométrio. (GIACOMINI; MELLA, 2006). É recomendada para prevenção da osteoporose, pois possui a capacidade de aumentar a massa óssea como demonstrado por vários estudos. (TORGENTON & BELL-SYER, 2001). Baixas

doses de estrogênios e progestogênios também são efetivas para a proteção do osso. A individualização é fundamental para que os benefícios superem os riscos, principalmente em usuárias de longa duração, e segurança para a maioria das mulheres, propiciando benefícios adicionais, além da prevenção de fraturas. (RADOMINSKI, 2004).

Os bifosfonatos são análogos sintéticos de pirofosfato caracterizados por ligações de P-C-P (fosfato-cálcio-fosfato), são mais resistentes à hidrólise química e enzimática. Esses compostos exercem efeitos de inibição da reabsorção osteoclástica e inibição da mineralização óssea. (FLEICH et al., 1970; MEYER & NANCOLLAS, 1973 apud PINTO, 2006). Os efeitos adversos mais freqüentes são os relacionados ao aparelho gastrointestinal.

O uso de fluoretos aumenta a densidade mineral óssea na coluna lombar, porém este aumento na massa óssea não acarreta redução da incidência de fraturas. A adição de bifosfonatos e fluoretos à terapia de reposição hormonal aumentou a densidade mineral óssea em mulheres hysterectomizadas na pós-menopausa com baixa massa óssea. (RADOMINSKI et al., 2004).

## 2.4 FLUORETO

O flúor é um elemento químico, não metálico e altamente reativo, sendo por esse motivo, geralmente encontrado quimicamente ligado a diversas substância formando fluoretos. Seus efeitos biológicos, a princípio, ficaram confinados à sua toxicidade. Somente na década de 40 que seus primeiros efeitos benéficos começaram a serem explorados, correlacionando-o à prevalência de cárie. (VILLAR, 2004).

Em 1964 teve início a administração de fluoretos no tratamento da osteoporose. (BERNSTEIN; COHEN, 1967). Mostrando aumentar a deposição de cálcio nos ossos, seguido da descrição de alguns eventos desfavoráveis como: aumento da reabsorção óssea, formação excessiva de osteóide e pobre mineralização. Estudos posteriores, no final da década de 60 e início de 70, demonstraram que esses efeitos desfavoráveis do tratamento com fluoretos eram dependentes de três fatores: (1) duração do tratamento, (2) uso de suplementos de cálcio e (3) dose de fluoreto administrada. (VILLAR, 2004).

No tecido ósseo, o íon flúor desloca os íons hidroxila (OH-) da apatita óssea, formando fluorapatita, resultando em uma fase mineral de maior cristalinidade e diminuição da solubilidade e reatividade química. O fluoreto se acumula no tecido ósseo, que pode ser considerado um biomarcador para exposição crônica e aguda ao fluoreto. (DUNIPACE et al., 1995; BEZERRA de MENEZES et al., 2003; BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2005).

Rubin et al. (2001), afirmaram que o fluoreto apresenta estímulo direto sobre as células osteoblásticas e pouco efeito sobre as células osteoclásticas. Sua ação mitogênica se dá sobre células progenitoras dos osteoblastos (células indiferenciadas/pré-osteoblastos), não tendo ação direta sobre a proliferação de osteoblastos maduros. (MATSUDA, 2010).

Após muitos anos de pesquisa, esse tratamento continua controverso, já que o fluoreto possui um efeito duplo nos osteoblastos. Se, por um lado, ele aumenta o número de osteoblastos no tecido, por outro, possui um efeito tóxico considerando-se a célula individualmente, prejudicando a mineralização e reduzindo a taxa de aposição mineral, sendo essa ação dose dependente. (DEQUEKER; DECLERCK, 1993).

Em um estudo conduzido por Raffi et al. (1997), foi verificado aumento da espessura do osso cortical, assim como também de sua porosidade, na presença do fluoreto. A espessura das trabéculas do osso trabecular também aumentou com o tratamento com fluoreto, porém, em doses altas ou muito prolongadas, foi verificada uma redução da espessura trabecular, decorrente da ação tóxica do fluoreto nos osteoblastos. (BOIVIN et al., 1987). No ano de 1978 em bovinos e nos anos de 1984 e 1986 em humanos, em bovinos, foi encontrado lesões de osteomalacia e osteoporose em consequência da ingestão de altas doses de fluoreto durante um longo período de tempo; essa osteoporose seria consequência de intoxicações graves que causariam osteonecrose e lesões nos osteoblastos. (DAIJEI, 1984; KRISHNAMACHARI, 1986; COUTELIER et al., 1978; KROOK & MAYLIN, 1979 apud RAFFI; MENDEZ; RIET-CORREA, 1997). No entanto, outros autores evidenciaram osteoporose sem osteonecrose, provavelmente em consequência de que a lesão sobre os osteoblastos foi mais grave que a lesão sobre os osteócitos. (RIET-CORREA et al., 1983 apud RAFFI; MENDEZ; RIET-CORREA, 1997). Segundo Kragstrup et al. (1984) as alterações ósseas induzidas pelo fluoreto não são decorrentes da ação deste em apenas um tipo celular ósseo. Os autores sugerem

que o fluoreto afeta todas as células envolvidas, direta ou indiretamente, no mecanismo de remodelação óssea. Lagier (1978) e Boivin et al. (1987) consideram que a fluorose esquelética está associada com um aumento das superfícies de remodelação; porém, ocorre um desequilíbrio em favor da formação óssea, com frequentes defeitos de mineralização, devidos provavelmente ao duplo efeito sobre os osteoblastos.

Nos anos 90, estudos duplo-cego e placebo-controlados verificaram que pacientes com osteoporose tratados com altas doses de fluoreto apresentaram notável aumento do conteúdo ósseo mineral (BMC) sem qualquer alteração nas taxas de fraturas vertebrais. (ERIKSEN, MELSEN & MOSEKILDE, 1985).

Recentemente, o flúor está sendo associado a agentes anti-reabsortivos (terapia hormonal substitutiva). Tendo sido observado aumento da densidade mineral óssea das vértebras em 11,8%, após um tratamento de 96 semanas. Porcentagem maior que somente a administração do agente reabsortivo. (ROSSI et al., 2010).

Fica nítido que o fluoreto além de sua interação com a hidroxiapatita, também possui um efeito sobre as células do tecido ósseo, causando alterações na morfologia e no metabolismo das células, e que o flúor apresenta estreita janela terapêutica. (MOHR, 1990; CHENG et al., 2005; QU & WEI, 2006; COOPER et al., 2006; XU et al., 2010; COLLAERT et al., 2011). No entanto, o mecanismo de ação do fluoreto no tecido ósseo ainda não foi bem esclarecido.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito do fluoreto no processo de reparo ósseo alveolar em diferentes espécies de camundongo: C3H/HeJ e C57BL/6J, que apresentam maior e menor densidade óssea, respectivamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar morfológicamente o processo de reparo ósseo com diferentes tipos de tratamento com flúor na água de beber, em diferentes períodos e regiões dos alvéolos neoformadas dos camundongos C3H/HeJ e C57BL/6J;

- Descrever histologicamente o processo de neoformação frente a administração de diferentes dosagens de flúor na água de beber;

- Identificar qual o tipo de densidade óssea apresenta mais susceptibilidade ao efeito do flúor e qual o período em que isso ocorre.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

A pesquisa foi realizada segundo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pelo Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa com animais da FOB-USP, Processo 07/2010 (Anexo A).

Foram utilizados camundongos das linhagens C3H/HeJ e C57BL/6J, machos, com 60 dias de vida, provenientes e mantidos no Biotério Central da FOB-USP, em gaiolas com boas condições de alimentação e higiene, recebendo ração e água ad libitum (com temperatura controlada de  $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e em regime de fotoperíodo 12h/12h (período começando às 7h). Foi utilizado um total de 64 animais ( $n=4$  para cada grupo de cada espécie) divididos aleatoriamente em 8 grupos para cada linhagem, os quais foram eutanasiados 7, 14, 21 e 28 dias após os procedimentos cirúrgicos.

Após o desmame, os animais receberam água de acordo com a divisão entre grupos, como descrito abaixo:

**Grupo I:** animais da linhagem C3H/HeJ que receberam água deionizada.

**Grupo II:** animais da linhagem C3H/HeJ que receberam água com 50 ppm de fluoreto.

**Grupo III:** animais da linhagem C57BL/6J que receberam água deionizada.

**Grupo IV:** animais da linhagem C57BL/6J que receberam água com 50 ppm de fluoreto.

Para alimentação dos animais foi utilizada ração isenta de fluoreto (AIN-93M, REEVES et al., 1993) adquirida da empresa Rhoster Indústria e Comércio, pois estudos prévios têm relatado que os níveis de fluoreto presentes nas rações comerciais são superiores a 20 ppm (BUZALAF et al., 2004, BUZALAF et al., 2005), o que poderia interferir nos resultados.

### 4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A exodontia do incisivo superior esquerdo foi realizada com os animais sob anestesia por meio da administração de uma mistura de Dopalen® (cloridrato de

quetamina) e Anasedan® (cloridrato de xilazina), na proporção 1:1 em v/v, dosado de acordo com a massa corporal do animal na proporção de 0,14 mL / 100g de peso, por via intramuscular. Logo após a antisepsia da cavidade bucal com Listerine® realizou-se, com auxílio de uma sonda exploradora, o descolamento do tecido gengival ao redor do incisivo central (**Figura 1A**). Com a própria sonda buscou-se um ponto de apoio ósseo por vestibular e por palatino no intuito de promover a luxação do dente através de movimento firmes e curtos, deslocando-o o máximo possível dentro do alvéolo. Em seguida, com uso de uma pinça clínica realizou-se a remoção do dente com um movimento circular da vestibular para a lingual, atentando em extraí-lo por completo. (OKAMOTO; RUSSO, 1973) (**Figura 1B**).

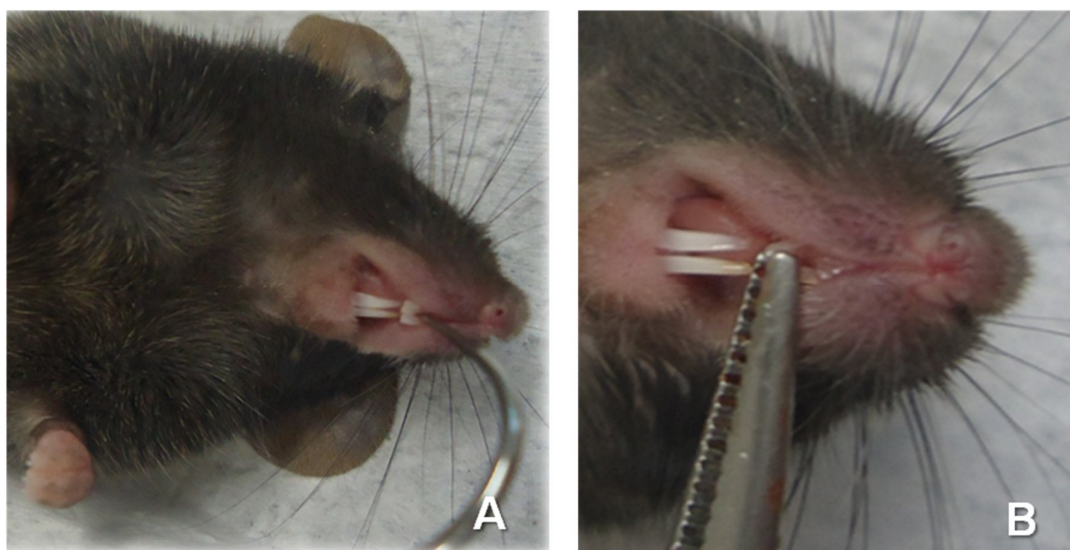


Figura 1 - Exodontia do incisivo. A) Dissecção da mucosa gengival e luxação do incisivo com auxílio de uma sonda exploradora. B) Com uma pinça clínica foi realizada a exodontia do incisivo.

Fonte: Elaborado pela autora.

#### 4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS (MAXILAS)

Ao término dos períodos experimentais de 7, 14, 21 e 28 dias, os animais foram eutanasiados por meio de inalação excessiva de CO<sub>2</sub>. Imediatamente removeu-se a maxila completa com utilização de tesoura para dissecção dos tecidos moles e de bisturi com lâmina 10 na distal dos molares. As peças coletadas foram

destinadas a análise microscópica (fixadas em formol 10% tamponado) e histomorfometria.

#### 4.4 PROCESSAMENTO HISTOTÉCNICO DAS PEÇAS PARA MICROSCOPIA

As peças anatômicas foram submetidas ao processo de fixação em formol 10% em tampão fosfato, durante 48 horas. Em seguida as peças foram submetidas ao processo de desmineralização em solução de EDTA 0,05M, pH 7,4, e diafanizadas para inclusão em parafina. (CARVALHO et al., 2008).

As peças foram incluídas, em parafina, de forma que o focinho do animal ficasse voltado para a base do bloco de parafina.

Os cortes semi-seriados, com espessura de 4 $\mu$ m, foram obtidos no micrótomo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha). Para obtenção dos cortes iniciou-se a microtomia pela base do bloco (focinho do animal) e estabeleceu-se como primeiro corte aquele em que fosse possível delimitar toda a área do alvéolo.

Para maior facilidade de análise do alvéolo dental, este foi dividido e avaliado em terços: cervical, medial e apical.

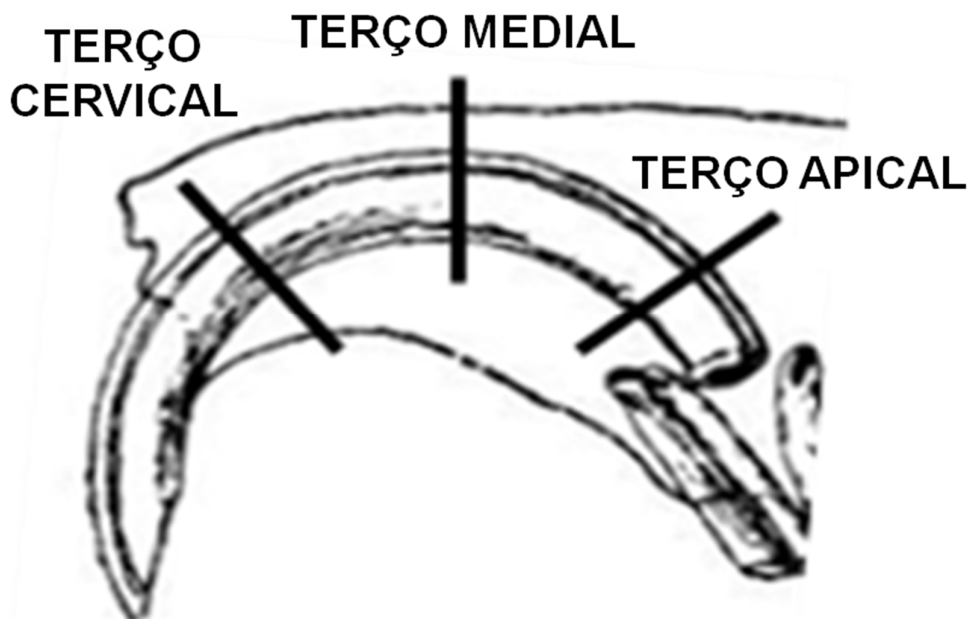


Figura 2 - Divisão do alvéolo dental de camundongo em terços: apical, médio e cervical, para facilitar análise. Fonte: Nordisk familjebok (1908, p. 1357, v. 9) – modificado.



Foram coletados para análise 8 cortes de cada terço. Após a coleta dos 8 cortes do terço cervical, realizou-se o desbaste da peça com 100 cortes na espessura de 10 $\mu$ m cada para então dar início à coleta dos cortes do terço médio. O mesmo procedimento foi utilizado para coleta dos cortes do terço apical. A coloração dos cortes obtidos foi feita com hematoxilina-eosina (H.E).

A resposta biológica foi analisada em função dos processos reparatórios (presença de coágulo sanguíneo, tecido de granulação, grau de fibrosamento do tecido conjuntivo, proliferação angioblástica e neoformação óssea) em lâminas coradas em H.E.

Na análise morfométrica foi determinada a área ( $\mu$ m<sup>2</sup>) dos tecidos analisados (Área Total do Alvéolo = Área do Tecido Ósseo Neoformado + Área do Tecido Conjuntivo) utilizando o Programa Olympus CellSens Imaging Software® (versão 1.5). Os dados de área foram convertidos em porcentagem para permitir a comparação entre os grupos.

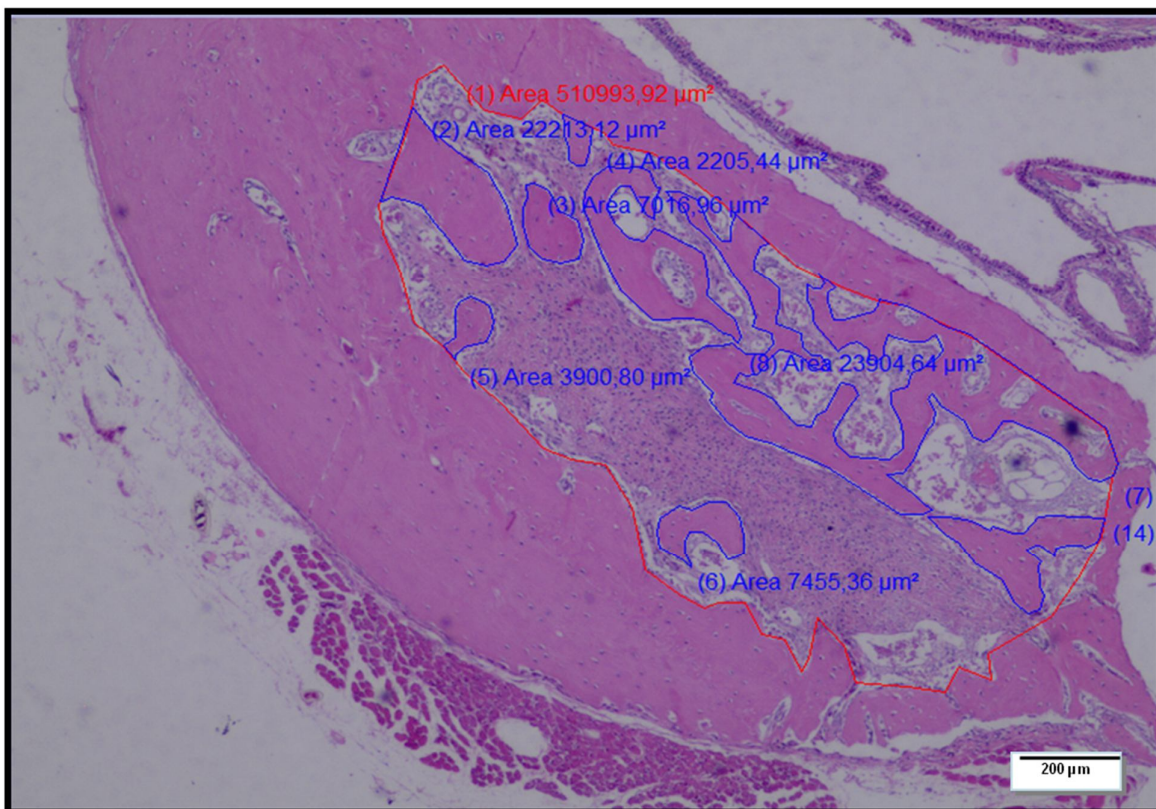


Figura 3 - Análise morfométrica do alvéolo dental de camundongo com determinação da área total do alvéolo (linha vermelha) e área de tecido ósseo neoformado (contornos em azul). Fonte: Sabino, Andressa Pelissari Zambolin ( 2013, p.48)

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise ANOVA seguida da análise de Tukey. Para todas as análises, valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes estatísticos, adequados aos experimentos, grupos e valores obtidos foram aplicados através do programa Statistica 11.0.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

Como já descrito anteriormente, para facilitar a análise histológica, o alvéolo dental foi dividido em 3 regiões: cervical (**A1**), medial (**A2**) e apical (**A3**). A análise foi feita em todos os grupos nos diferentes períodos experimentais: 7, 14, 21 e 28 dias. Porém, a descrição aqui feita será das três regiões juntas, destacando as características mais importante de cada uma e as suas diferenças.

#### **Período de 7 dias:**

**Grupo I** (*C3H/HeJ tratado com água deionizada*): Neste primeiro período experimental foi observado tecido conjuntivo abundante nas três regiões analisadas, a presença de vasos se mostrou variável tanto na localização (sítio do alvéolo) como na quantidade de uma área para outra. O tecido ósseo na região cervical (**A1**) apresentou uma neoformação a partir das paredes do alvéolo. Na região medial (**A2**) o que mudou foi o aspecto do ósseo neoformado que apareceu de maneira mais espessa nas laterais e periferias, sendo rarefeito na porção central do alvéolo. Na área apical (**A3**) o destaque foi a maior presença de tecido ósseo neoformado em relação as outras regiões, porém de forma trabecular na parede posterior preenchendo sua superfície.

**Grupo II** (*C3H/HeJ tratado com água fluoretada*): Neste grupo o tecido conjuntivo mostrou-se presente em todas as áreas preenchendo o alvéolo. Já o tecido ósseo neoformado primeiramente foi visto na região mais posterior, depois esse tecido aparece somente nas paredes laterais e não há muita neoformação na região mais apical. Foi notada pequena quantidade de vasos na periferia do alvéolo, perto do tecido ósseo. Na área mais cervical do alvéolo (**A1**) (**FIGURA 4A**), observamos que o tecido conjuntivo encontra-se em quase toda a extensão do alvéolo. Também há neoformações ósseas próximas as paredes do alvéolo. Os vasos são vistos em menor densidade e muito próximos as paredes ósseas. Na região medial (**A2**) encontramos as mesmas características que na região cervical (**A1**), com a neoformação óssea contornando as paredes do alvéolo. Sendo que a região alveolar mais perto da parede do palato quase não apresenta tecido ósseo. Na última área, apical (**A3**), encontramos um tecido ósseo neoformado mais

presente na região próxima ao palato e na parede interna. O tecido conjuntivo preenche todas as partes onde não há tecido ósseo. É bem visível, em algumas regiões, fileiras de osteoblastos circundando o tecido ósseo neoformado (**FIGURA 4B**).

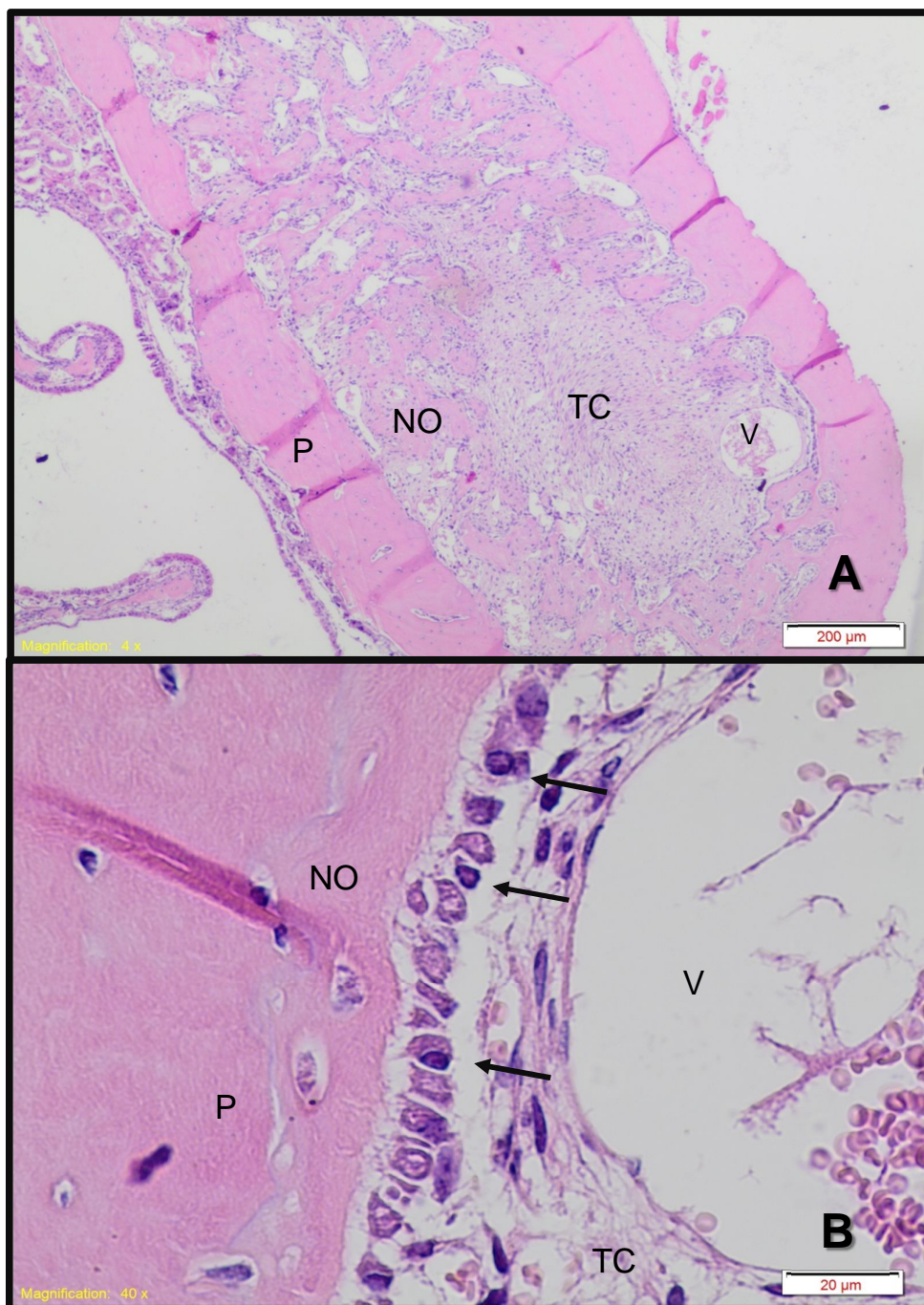


Figura 4 - Período de 7 dias - Grupo II: A) Nesta área cervical (A1), pode-se observar o alvéolo preenchido por tecido conjuntivo (TC) e pequena neoformação óssea (NO). Alguns vasos podem ser notados (V) entre o tecido ósseo e o conjuntivo. B) Camada de osteoblastos (setas) pode ser notada. Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

**Grupo III** (*animais C57BL/6J tratados com água deionizada*): Foi observado tecido conjuntivo preenchendo praticamente toda a área do alvéolo. O tecido ósseo neoformado está presente em quase todas as paredes ósseas do alvéolo. Os vasos encontraram-se em diferentes regiões do alvéolo (centro e periferia). Quando comparada a área mais cervical (**A1**) à medial (**A2**), percebe-se um aumento de tecido ósseo neoformado nesta última. O osso neoformado localiza-se por todas as paredes do alvéolo, alternando eventualmente com o tecido conjuntivo.

**Grupo IV** (*animais C57BL/6J tratados com água com 50 ppm de fluoreto*): Por meio da análise das lâminas notou-se que os vasos estão em grande densidade e bem distribuídos por todo o alvéolo. Nas paredes e centro do alvéolo há grande neoformação óssea, e conforme a análise dos cortes foram feitas, aprofundando-se os cortes, o número de vasos e tecido conjuntivo diminui. Em contrapartida a neoformação óssea aumenta em área ocupada. Analisando a área mais cervical (**A1**) nota-se uma parte preenchida por tecido conjuntivo, mas nas paredes a predominância é de neoformação óssea. Em alguns casos essa neoformação óssea apresenta “projeções” até o centro do alvéolo. Na área medial do alvéolo (**A2**) pode-se notar que houve uma grande neoformação óssea ocupando quase todas as paredes do alvéolo dentário. Nesta região também observa-se poucos vasos. Em relação ao tecido conjuntivo, este aparece preenchendo “espaços” entre o tecido ósseo neoformado. Na área mais apical (**A3**), o tecido conjuntivo sofre uma grande diminuição dando espaço para mais tecido ósseo neoformado que está presente em mais de dois terços do alvéolo. Também é notada a presença de vasos de maior diâmetro. Na parede interna (voltada para as conchas nasais) percebe-se maior neoformação óssea que na parede externa (região divisória com o osso zigomático).

#### **Período de 14 dias:**

**Grupo I** (*C3H/HeJ tratado com água deionizada*): Neste grupo praticamente não havia coágulo sanguíneo. Quantidade considerável de tecido conjuntivo denso foi visto (grande quantidade de fibras colágenas) mais ao centro do alvéolo. Existência de tecido ósseo neoformado seguindo um padrão de neoformação óssea à partir das paredes do alvéolo (**FIGURA 5A**), com ilhotas de tecido ósseo em direção ao centro do alvéolo. A região **A2** dos alvéolos apresentou mais “projeções” de tecido ósseo

neoformado para o centro do alvéolo e também um maior número de vasos sanguíneos, quando comparada com **A1**. A região **A3**, assim como **A2**, apresentou neoformação de tecido ósseo em direção ao centro do alvéolo e vasos sanguíneos de maior calibre.

**Grupo II** (*C3H/HeJ tratado com água fluoretada*): Neste grupo, que fez o uso de água com flúor, o tecido conjuntivo mostrou-se presente em todas as áreas preenchendo o alvéolo. A região mais cervical (**A1**) apresentou tecido ósseo neoformado a partir das paredes do alvéolo, com grande quantidade de tecido conjuntivo mais ao centro e poucas ilhotas de tecido ósseo. Já as regiões **A2** e **A3** apresentaram neoformação óssea partindo das paredes do alvéolo com maior número de projeções para o centro deste, conseqüentemente apresentando menor quantidade de tecido conjuntivo. A presença de vasos foi vista em pequena quantidade e na periferia do alvéolo perto do tecido ósseo neoformado.

**Grupo III** (*animais C57BL/6J tratados com água deionizada*): Os alvéolos deste grupo apresentaram áreas de neoformação óssea também à partir das paredes do alvéolo, caracterizando-se por pequenas ilhas de tecido ósseo, em direção ao centro do alvéolo. Porém, quando comparado aos **Grupos I e II**, essas “ilhotas ósseas” apresentam maior espaços entre si e estavam circundadas por tecido conjuntivo mais frouxo e vasos sanguíneos de pequeno diâmetro, na comparação entre os **Grupos I e III** foi visto que o **Grupo III** apresenta mais neoformação óssea em todo o alvéolo em forma trabecular (**FIGURA 5B**). Analisando as diferentes regiões do alvéolo, verifica-se que segue o mesmo padrão dos grupos anteriores com maior neoformação óssea na região medial (**A2**). Região apical **A3**, apresenta pequena neoformação óssea, tecido conjuntivo frouxo e maior quantidade de vasos sanguíneos.

**Grupo IV** (*animais C57BL/6J tratados com água com 50 ppm de fluoreto*): No grupo IV o padrão de formação óssea diferencia-se um pouco dos outros grupos, pois, embora também apresenta-se com ilhotas de tecido ósseo, essas estão dispostas por todo o alvéolo e circundadas por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos de médio calibre (**FIGURA 6A**). Na análise das diferentes regiões do alvéolo verifica-se que o número de ilhotas de tecido ósseo é aparentemente maior na região **A2** que em **A1**

e **A3**, sendo que esta última apresenta pequena neoformação óssea e tecido conjuntivo frouxo (muito semelhante ao **Grupo III**).

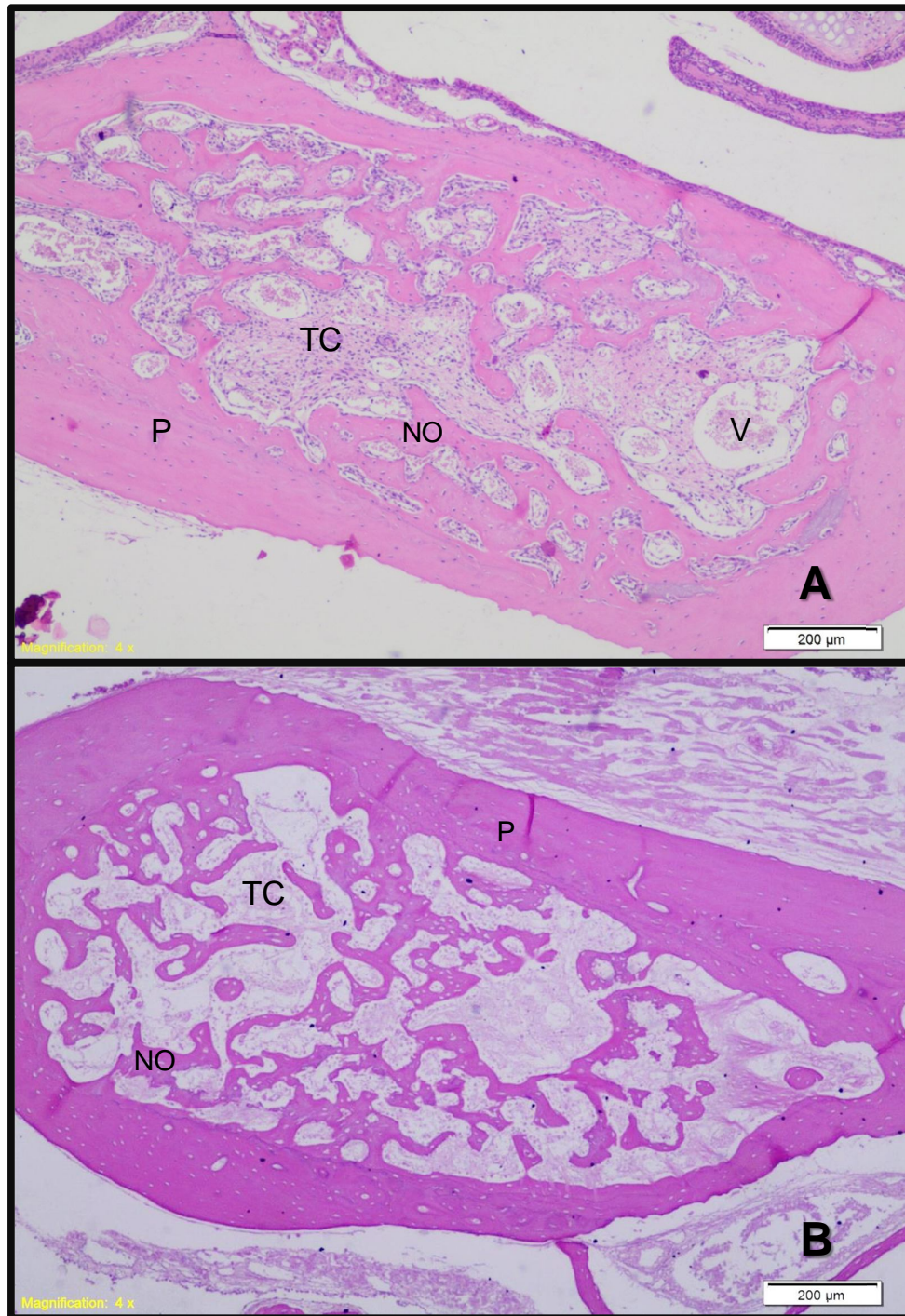


Figura 5 - Grupos I e III, período de 14 dias. A) Grupo I: o alvéolo está preenchido por te tecido conjuntivo (TC) e pequena neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P), sem muitas projeções para o centro. Alguns vasos podem ser notados (V). B) Grupo III: apresenta neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P) com projeções para o centro do alvéolo, além da presença de tecido conjuntivo (TC).ColoraçãoH.E. Fonte: Elaborado pela autora.

**Período de 21 dias:**

**Grupo I** (*C3H/HeJ tratado com água deionizada*): Neste grupo nota-se a presença de tecido conjuntivo por toda a porção central do alvéolo e um pouco nas margens do tecido ósseo. Os vasos são encontrados em pequeno número. Já o tecido ósseo ocupa grande parte do alvéolo sendo que a sua neoformação se dá das paredes para o centro, esse tecido é visto como trabecular. Os espaços trabeculares são preenchidos por tecido conjuntivo. Na área medial (**A2**) temos um aumento da área ocupada pelo tecido ósseo. Em contrapartida, na região apical (**A3**) existe uma aparente diminuição da área ocupada pelo osso neoformado.

**Grupo II** (*C3H/HeJ tratado com água com 50ppm de fluoreto*): Neste grupo nota-se a presença de tecido ósseo neoformado por todo o alvéolo. Neste grupo também encontra-se vasos em pouca densidade, dentro do alvéolo, além do conjuntivo que está presente entre as trabéculas. Entre as áreas analisadas observa-se um aumento do tecido ósseo e a diminuição do conjuntivo.

**Grupo III** (*C57BL/6J tratado com água deionizada*): O osso neoformado, aparentemente, ocupa dois terço da área do alvéolo, na forma trabecular, sendo evidente nas áreas medial (**A2**) e apical (**A3**). O tecido conjuntivo pode ser encontrado por toda a área do alvéolo, mas principalmente entre os espaços ósseos (osso trabecular). A densidade de vasos oscilou entre as áreas deste grupo, porém com aspecto semelhante aos do **Grupo I** e **Grupo II**.

**Grupo IV** (*animais C57BL/6J tratados com água com 50 ppm de fluoreto*): Nas três áreas analisadas deste grupo, **A1**, **A2** e **A3**, percebe-se uma grande neoformação óssea por toda a extensão do alvéolo de forma trabecular. Entre os espaço do osso trabecular formado encontra-se tecido conjuntivo e/ou vasos. Porém na área apical (**A3**) o tecido neoformado não se encontra por todo o alvéolo como nas outras duas áreas. Mesmo assim, o tecido ósseo neoformado ainda é o tecido mais abundante dessa região. Quando comparado a região **A1** do **Grupo IV** dos períodos considerados intermediários, 14 e 21 dias, (**FIGURA 6B**), conclui-se que as trabéculas de neoformação óssea, que são abundantes e bem distribuídas pelo alvéolo, são encontradas de forma mais espessa no período mais tardio (21dias).



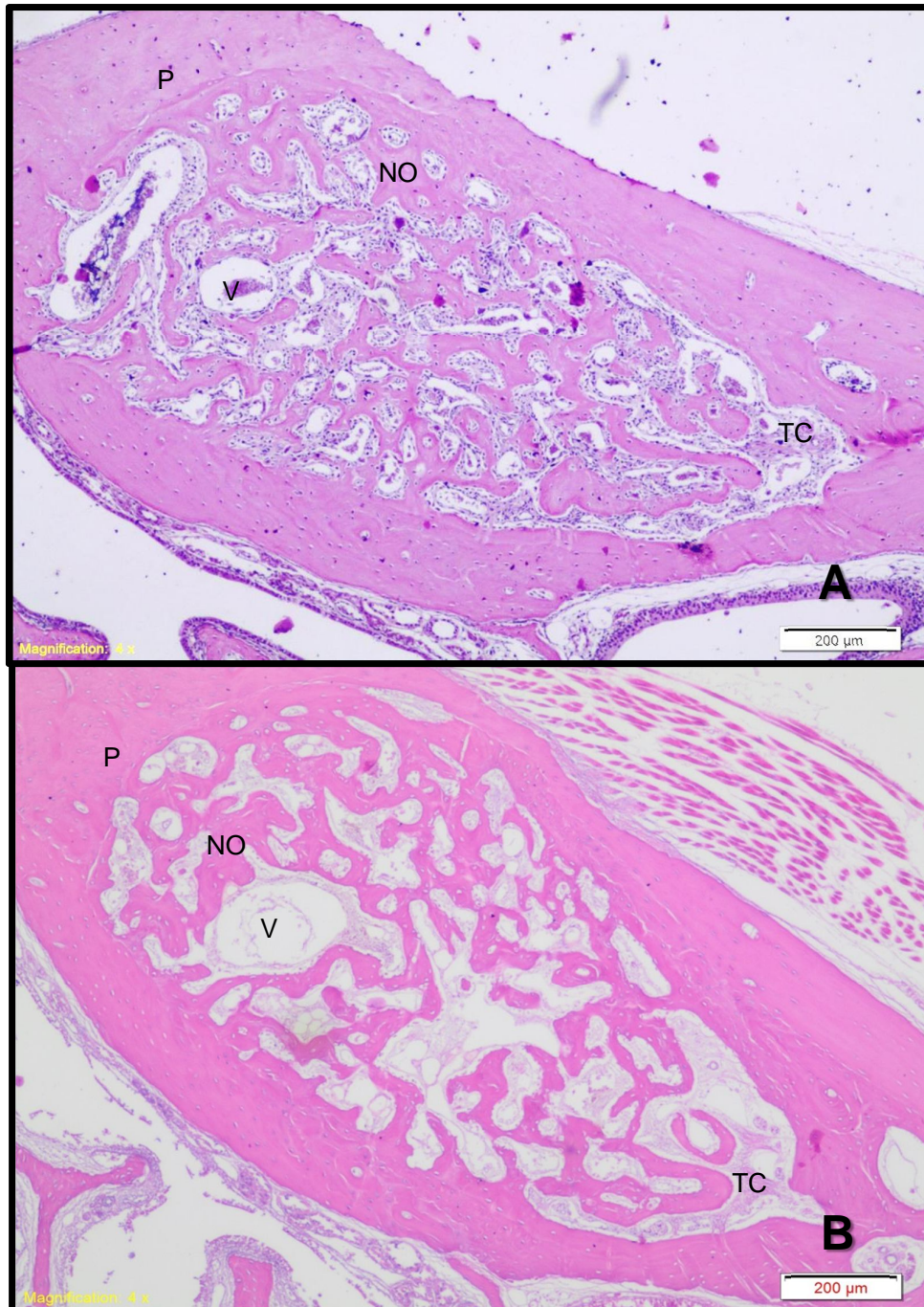


Figura 6 - Grupo IV períodos de 14 e 21 dias. A) Grupo IV (14 dias), apresenta neoformação óssea (NO) dentro do alvéolo oriundo das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC). B) No Grupo IV (21 dias), o alvéolo apresenta as mesmas estruturas e mantendo as características que no período de 14 dias, porém na neoformação óssea (NO) as trabéculas apresenta-se mais espessas Aumento de 4X. Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

### **Período de 28 dias**

**Grupo I** (*C3H/HeJ tratado com água deionizada*): Os aspectos histológicos, encontrados nesse período, se diferenciam do Grupo I aos 14 dias, apenas por apresentar uma diminuição na quantidade de tecido conjuntivo. Este tecido conjuntivo se localiza na região mais central do alvéolo, em contrapartida o tecido ósseo neoformado ocupa uma área maior, principalmente próximo às paredes do alvéolo. Analisando-se as diferentes regiões do alvéolo pode-se observar, na região **A1**, uma quantidade considerável de tecido conjuntivo mais fibroso ao centro. Em **A2** e **A3** há crescimento do tecido ósseo mais ao centro do alvéolo e este encontra-se circundado por um tecido conjuntivo mais frouxo e vasos sanguíneos.

**Grupo II** (*C3H/HeJ tratado com água com 50ppm de fluoreto*): Este grupo apresentou um padrão de formação óssea muito semelhante ao grupo correspondente com 21 dias, não havendo aumento na neoformação óssea (**FIGURA 7**). As trabéculas ósseas são permeadas por grandes vasos sanguíneos e tecido conjuntivo frouxo. Quando comparado com o grupo controle (C3H/HeJ tratado com água deionizada) notou-se, como observado nos períodos anteriores, menor quantidade de tecido ósseo neoformado e, conseqüentemente, maior quantidade de tecido conjuntivo. Nas regiões apical (**A3**) e medial (**A2**), verificou-se maior quantidade de tecido ósseo que na região cervical (**A1**).

**Grupo III** (*C57BL/6J tratado com água deionizada*): Neste grupo pode-se observar que foi mantido o padrão de neoformação óssea com trabéculas ósseas se estendendo por todo o alvéolo, com quantidade muito pequena de tecido conjuntivo e muitos vasos sanguíneos circundando essas trabéculas. Praticamente não houve diferenças entre as diferentes regiões do alvéolo.

**Grupo IV** (*C57BL/6J tratado com água com 50ppm de fluoreto*): A análise histológica deste grupo demonstra que manteve-se o padrão de formação ósseo do **Grupo IV** 14 dias, porém havendo maior quantidade de tecido ósseo. As trabéculas ósseas deste grupo aparentam ser mais espessas que aquelas encontradas no **Grupo III**. Praticamente não houve diferenças entre as diferentes regiões do alvéolo.

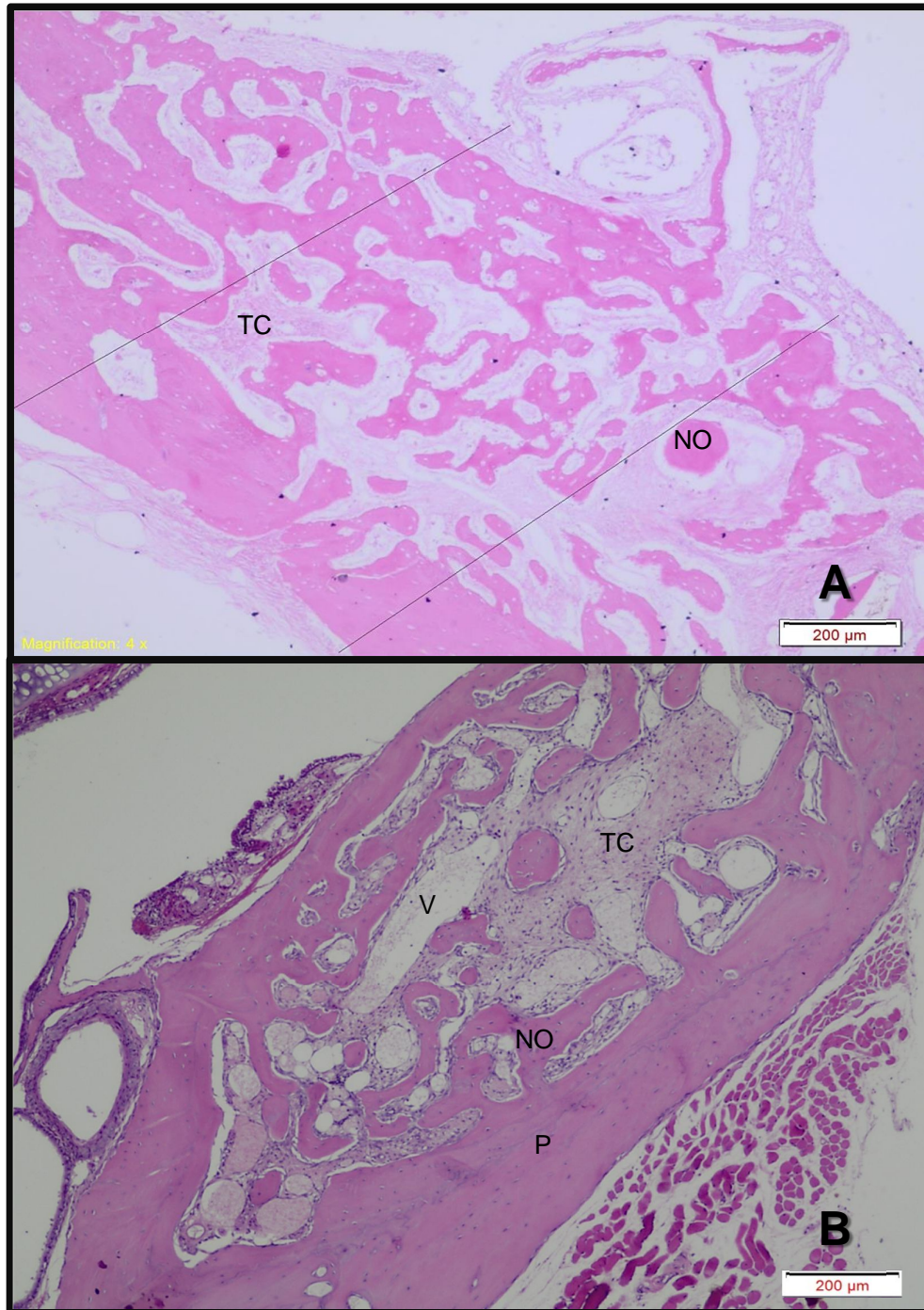


Figura 7 - Grupo II períodos de 21 e 28 dias. A) Grupo II (21 dias), apresenta neoformação óssea (NO) dentro do alvéolo, além da presença de tecido conjuntivo (TC). B) No Grupo II (28 dias), o alvéolo está mais preenchido por tecido conjuntivo (TC) e com uma pequena neoformação óssea (NO) próxima as paredes do alvéolo (P). Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA COMPARATIVA ENTRE OS PERÍODOS INICIAL (7 DIAS) E FINAL (28 DIAS)

De acordo com os resultados obtidos, através da análise histológica, a linhagem de camundongos C57BL/6J se mostrou mais propensa aos efeitos do flúor. Podemos observar que todas os grupos tiveram um aumento de tecido ósseo neoformado com o decorrer dos períodos experimentais (**FIGURAS 8, 9, 10 e 11**). Aparentemente houve uma maior formação óssea no Grupo III (controle) quando comparado ao Grupo IV (tratado com fluoreto) (**FIGURAS 10 e 11**). Outra comparação de relevância é a das linhagens diferentes com o mesmo tratamento. Na linhagem C3H/HeJ tratada com o flúor (Grupo II) (**FIGURA 9A**), a neoformação mostra-se na região mais na circunferência da parede alveolar e não há muita formação óssea, durante o período de 7 dias. Já com 28 dias (**FIGURA 9B**), a neoformação óssea é maior, porém quando comparada com os outros períodos e principalmente com outra linhagem (Grupo IV) (**FIGURA 11B**) foi notado que a neoformação não é vista de maneira tão abundante, dando espaço para tecido conjuntivo e alguns vasos que ocupam parte representativa do alvéolo.

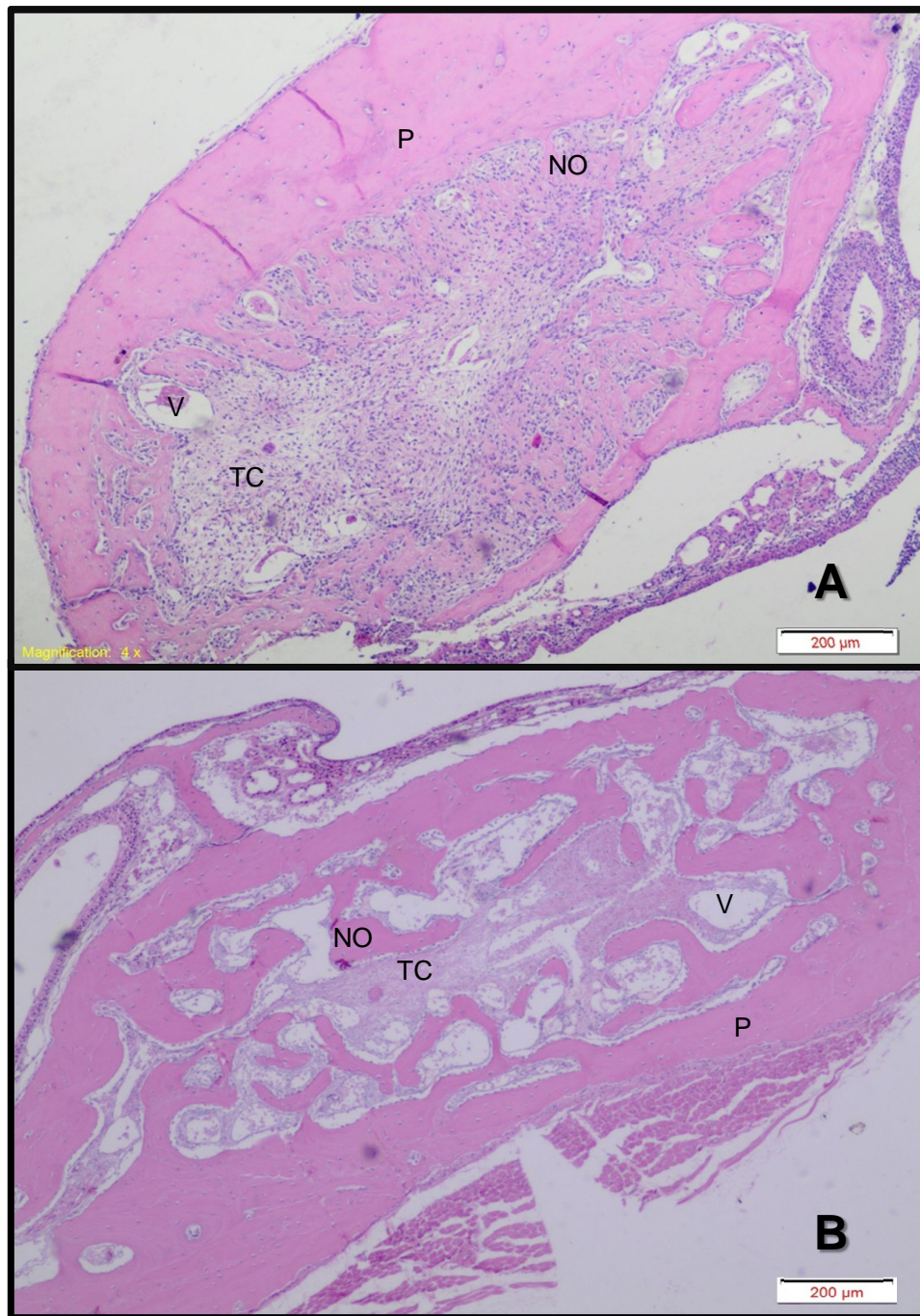


Figura 8 - Grupo I (período de 7 e 28 dias). A) Grupo I (7dias), apresenta uma neoformação óssea (NO) a partir da parede alveolar (P) e ao centro do alvéolo encontra-se tecido conjuntivo (TC), também é visto a presença de vasos (V). B) Grupo I (28 dias), a neoformação óssea (NO) está trabecularmente espalhada por todo o alvéolo, sendo oriunda da parede alveolar (P), mas ainda encontra-se tecido conjuntivo (TC) pela extensão do alvéolo juntamente com vasos (V). Coloração: H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

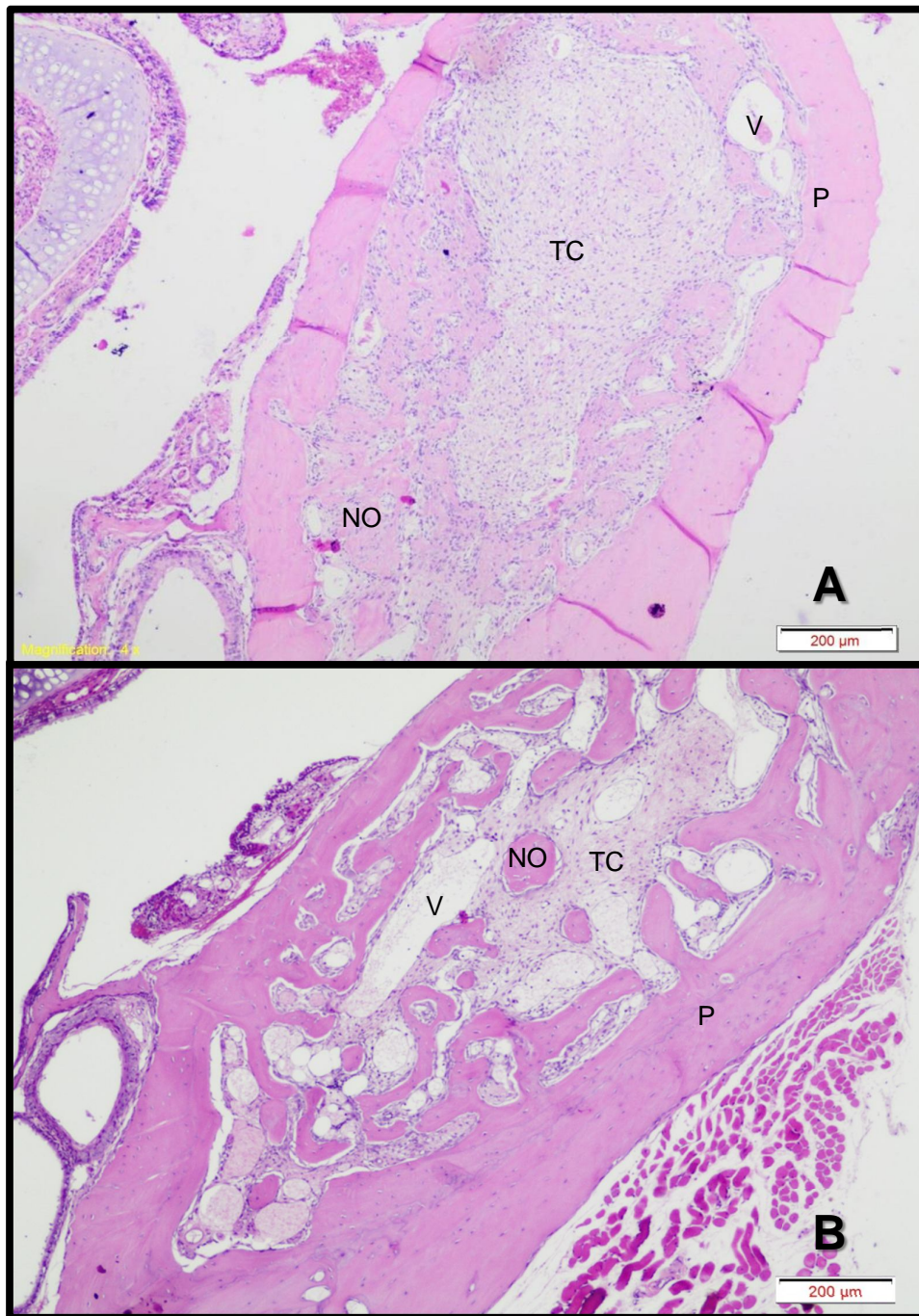


Figura 9 - Grupo II (períodos de 7 e 28 dias). A) Grupo II (7 dias), apresenta pouca neoformação óssea (NO) a partir das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) ocupando a maioria do alvéolo. B) No Grupo II (28 dias), o alvéolo está preenchido por neoformação óssea (NO) que apresenta-se de forma trabecular, desde as paredes (P), porém com presença significativa de tecido conjuntivo (TC) e com vasos (V). Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

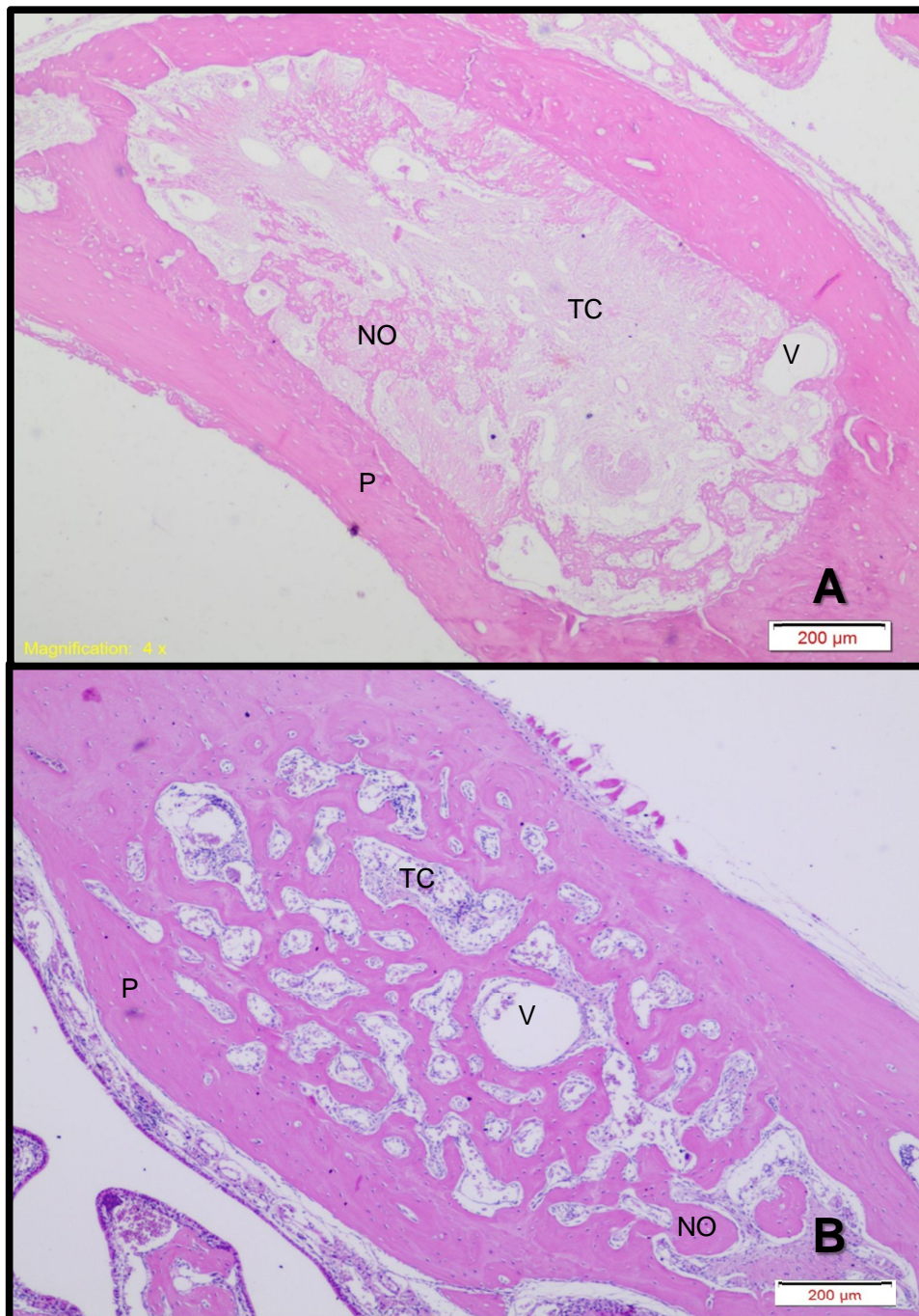


Figura 10 - Grupo III períodos de 7 e 28 dias. A) Grupo III (7 dias), apresenta pequena neoformação óssea (NO) a partir das paredes do alvéolo (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) ao centro. B) No Grupo III (28 dias), o alvéolo está preenchido por grande neoformação óssea (NO) que preenche todo o espaço que não há presença tecido conjuntivo (TC) e vasos (V), desde as paredes (P). Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.

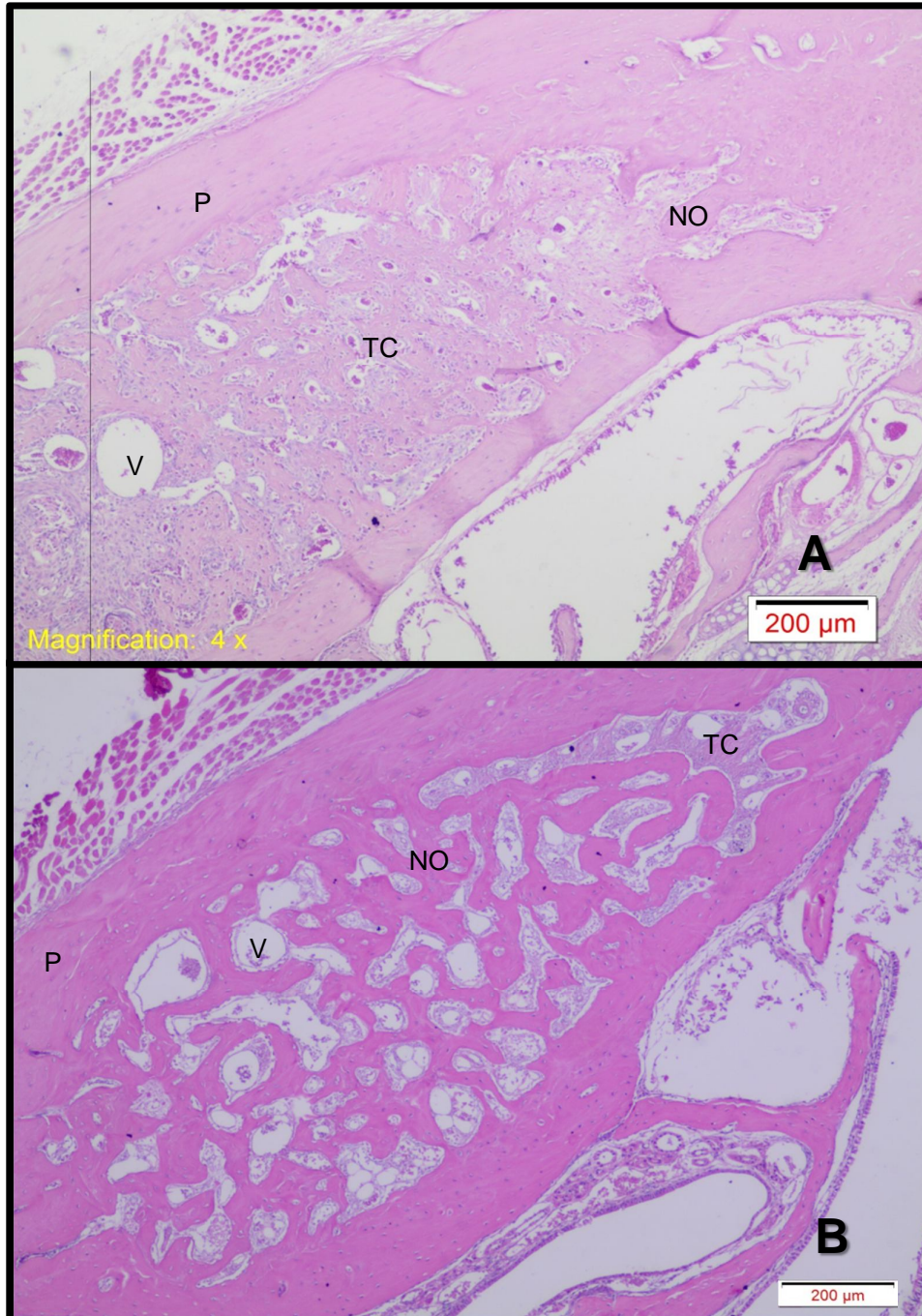


Figura 11 - Grupo IV períodos de 7 e 28 dias. A) Grupo IV (7 dias), apresenta neoformação óssea (NO) por todo o alvéolo e a partir das paredes (P), além da presença de tecido conjuntivo (TC) mais ao centro. B) No Grupo IV (28 dias), o alvéolo está preenchido por grande neoformação óssea (NO) que preenche todo o espaço que não há presença tecido conjuntivo (TC) e com mais vasos (V) quando comparado com o Grupo III, desde as paredes (P). Coloração H.E. Fonte: Elaborado pela autora.



### 5.3 DESCRIÇÃO DA MORFOMETRIA

A amostra inicial composta de 4 animais por grupo, que foi reduzida em alguns subgrupos devido a perda de animais, ou mesmo a permanência da raiz do dente no alvéolo, impedindo a análise morfométrica. Os resultados de morfometria foram descritos e apresentados por regiões do alvéolo.

#### TERÇO CERVICAL

Houve semelhança na quantidade de tecido ósseo neoformado entre os períodos de 7 e 14 dias para todos os grupos analisados (valores próximos à 30%), ocorrendo um aumento na proporção tecido ósseo/tecido conjuntivo nos períodos de 21 e 28 dias, que também mostraram-se semelhantes (valores entre o intervalo de 38% - 56%). Em geral, o aumento de tecido ósseo neoformado entre os diferentes períodos experimentais não foi significativo para os grupos estudados ( $p > 0,05$ ). A única exceção foi a linhagem de animais C57, em 21 dias, que apresentou diferença significativa do grupo controle ( $52,40 \pm 1,44\%$ ) e o grupo tratado com o fluoreto ( $53,86 \pm 22,97\%$ ). A diferença do tecido ósseo neoformado, entre os períodos de um mesmo grupo, foi menor na linhagem C3H/HeJ (26,56% – 39,07% no grupo controle e 30,02% – 34,85% no fluoretado). Em contrapartida, a linhagem de camundongos C57 obteve uma maior variação no tecido ósseo neoformado com o decorrer do tempo (38,63 – 51,42% no grupo controle e 26,83% – 56,72% no grupo fluoretado).

Também foi registrada diferença na quantidade de osso neoformado entre as linhagens de camundongos, tanto no grupo controle como no grupo tratado com água com 50ppm de flúor, sendo mais significativa nos períodos de 21 e 28 dias. Os animais C57 obtiveram média de 44,05% (média do período de 21 e 28 dias) para o grupo controle e de 42,61% para o fluoretado, enquanto C3H obteve 33,09% para o controle e 33,62% para o fluoretado ( $p > 0,05$ ) (**Figura 12**).

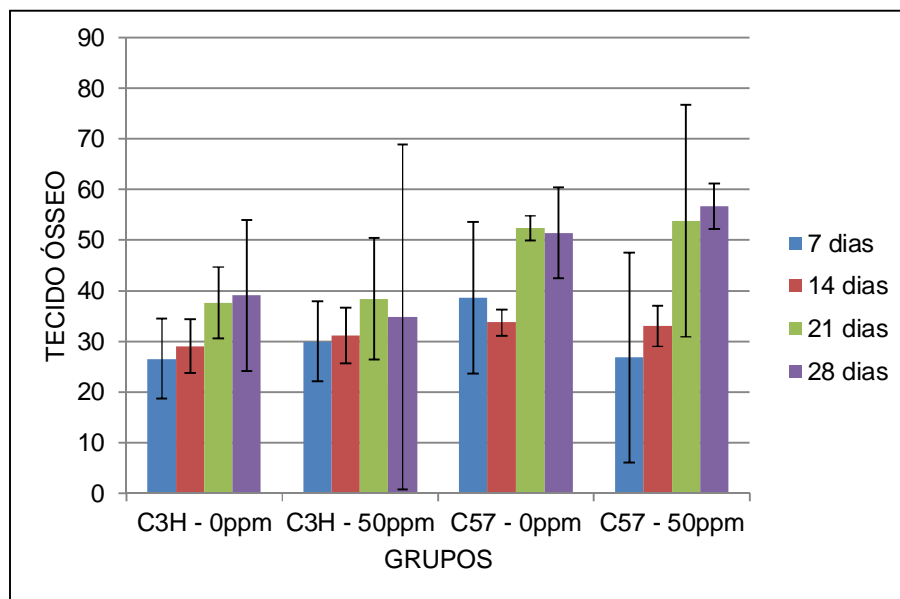


Figura 12 - Terço Cervical: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço cervical (A1) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV. Fonte: Elaborado pela autora.

### TERÇO MEDIAL

Na região do terço médio do alvéolo, nos camundongos da linhagem C57, a neoformação óssea apresentou um padrão semelhante ao encontrado no terço cervical, com maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos períodos de 21 e 28 dias (**Figura 13**). Nestes animais o fluoreto promoveu uma oscilação nos resultados de neoformação óssea quando comparados ao controle, com aumento de neoformação óssea nos períodos iniciais (7 e 14 dias) e estabilidade e diminuição nos períodos de 21 e 28 dias. (**Figura 13**).

Nos animais da linhagem C3H, o terço médio apresentou maior neoformação óssea no período de 21 dias ( $45,00 \pm 9,87\%$  para o grupo controle e  $43,87 \pm 7,95\%$  para o grupo fluoretado), e posterior redução deste tecido no período de 28 dias ( $27,16 \pm 5,80\%$  - controle e  $29,94 \pm 3,47\%$  - grupo fluoretado) (**Figura 13**).

Não houve diferença na quantidade de tecido ósseo neoformado entre as linhagens, com algumas exceções: linhagem C57, grupo fluoretado 21 dias e os grupos controle e fluoretado 28 dias, que apresentaram maior neoformação óssea quando comparados com os mesmos grupos da linhagem C3H (**Figura 13**).

Nesta região o tecido conjuntivo apresentou comportamento semelhante entre todos os grupos das duas linhagens, sofrendo diminuição com o passar do tempo: 1) C3H controle:  $75,61 \pm 16,26\%$  –  $62,25 \pm 14,55\%$ ; 2) C57 controle:  $61,77 \pm 8,90\%$  –

52,23±7,29%; 3) C57 fluoretado: 62,61±% – 48,35±%. O grupo C3H fluoretado apresentou-se como exceção a essa tendência, sofrendo diminuição do tecido ósseo neoformado até o período de 21 dias (65,75±10,30% – 53,03±5,07%) e aumento no período de 28 dias (70,06±3,47%) ( $p>0,05$ ) (**Figura 13**).

Os camundongos da linhagem C3H não apresentaram grandes diferenças entre os grupos controle e fluoretado, nos diferentes períodos (média 64,34% - controle e 63,85% - fluoretado). Já os animais da linhagem C57 apresentaram sutil diferença, com menor quantidade de tecido conjuntivo no grupo tratado com fluoreto (média 56,98% - controle e 54,50% - fluoretado), nos diferentes períodos. Por meio destas médias também podemos concluir que os animais C57 mostraram-se com menor quantidade de tecido conjuntivo que os animais C3H (**Figura 13**).

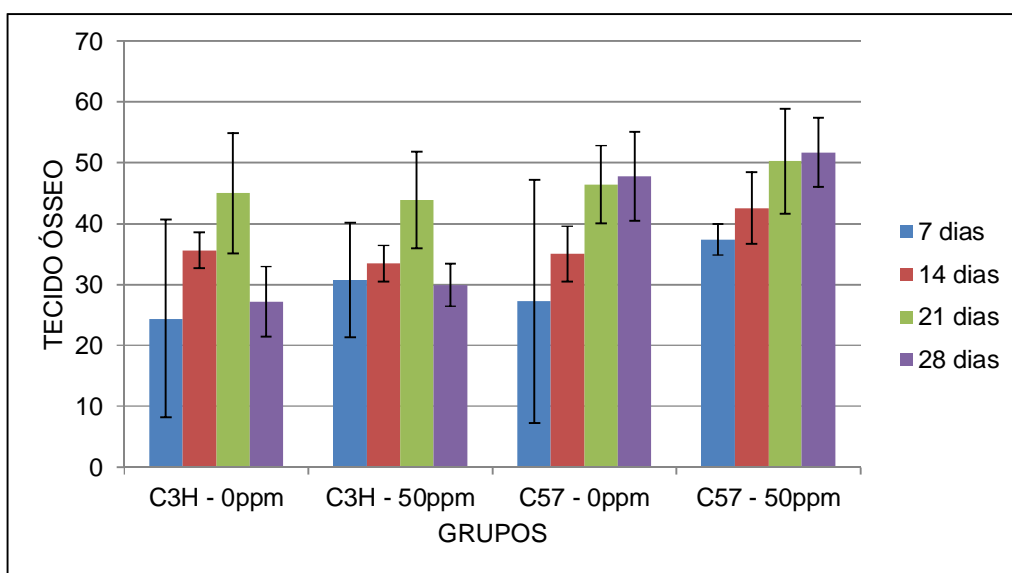


Figura 13 - Terço Medial: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço medial (A2) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV. Fonte: Elaborada pela autora.

### TERÇO APICAL

Esta região do alvéolo apresentou-se como a área com menor quantidade de tecido ósseo neoformado, na maioria dos grupos e períodos estudados (**Figura 14**).

Os animais do grupo controle, da linhagem C57, apresentaram aumento na quantidade de tecido ósseo neoformado com o passar do tempo, alcançando 42,49±7,64% no período de 28 dias. Já os animais do grupo fluoretado tiveram o pico de neoformação óssea no período de 21 dias (44,24±6,63%), com posterior diminuição no período de 28 dias (18,80±2,02%) (**Figura 14**).

Enquanto isso os animais do grupo C3H mostraram maior uniformidade entre todos os grupos, não havendo aumento no tecido ósseo neoformado com o passar do tempo. Sendo no período de 21 dias, do grupo tratado com flúor, o pico de neoformação de tecido ósseo ( $31,47 \pm 11,54\%$ ) (**Figura 14**).

A quantidade de tecido conjuntivo deste terço mostrou-se muito semelhante dentro de cada linhagem, isto é, os animais da linhagem C3H, de diferentes períodos e tratamento (controle e fluoretado), apresentaram quantidades parecidas de tecido conjuntivo (aproximadamente 73%); o mesmo ocorreu com a linhagem C57 (aproximadamente 58%) (**Figura 14**).

Como nos outros terços, a linhagem C57 apresentou menor quantidade de tecido conjuntivo (média: 60,38% - controle e 55,89% - fluoretado), quando comparada com a linhagem C3H (média: 72,83% - controle e 72,67% - fluoretado).

Baseado nas médias descritas no parágrafo anterior fica nítido que o tratamento com o fluoreto influenciou na diminuição da quantidade de tecido conjuntivo nos animais C57 (7 dias:  $69,68 \pm 2,05\%$  - 28 dias:  $37,72 \pm 6,73\%$ ) ( $p > 0,05$ ), o que não ocorreu na linhagem C3H (7 dias:  $74,70 \pm 0,17\%$  - 28 dias:  $74,42 \pm 1,75\%$ ) (**Figura 14**).

A linhagem C57 apresentou diminuição na porcentagem de tecido conjuntivo com o passar do tempo em ambos os grupos ( $65,54 \pm 0,06\%$  –  $57,51 \pm 7,64\%$  grupo controle e  $69,68 \pm 2,05\%$  –  $37,72 \pm 6,73\%$  grupo tratado com fluoreto). Nos animais C3H essa diminuição foi muito sutil no grupo controle ( $71,82 \pm 9,08\%$  –  $66,30 \pm 13,24\%$ ) e no grupo tratado com fluoreto houve diminuição até o período de 21 dias ( $74,70 \pm 0,17\%$  –  $68,53 \pm 11,54\%$ ) sofrendo aumento no período de 28 dias ( $74,42 \pm 1,75\%$ ) (**Figura 14**).

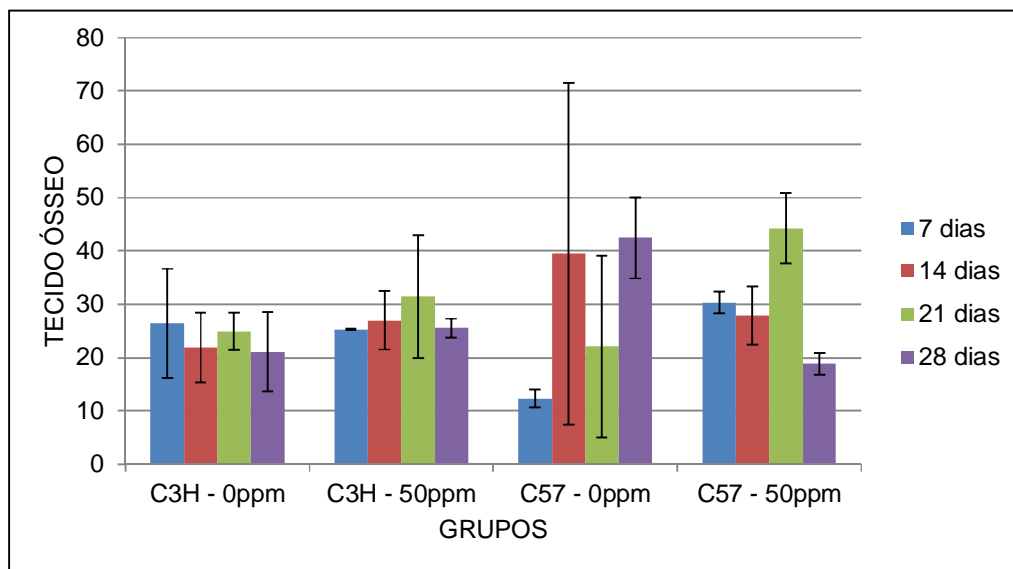


Figura 14 - Terço Apical: Áreas (%) de tecido ósseo e tecido conjuntivo formados no terço apical (A3) de alvéolos dos grupos experimentais. Abreviaturas: C3H 0ppm = Grupo I; C3H 50ppm = Grupo II; C57 0ppm = Grupo III; C57 50ppm = Grupo IV. Fonte: Elaborado pela autora.

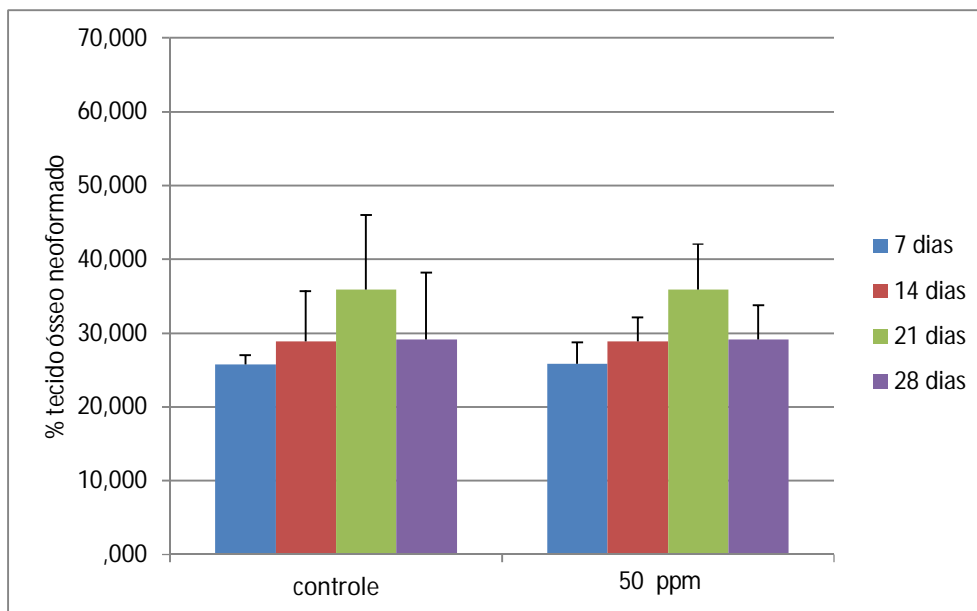


Figura 15 - Área de tecido ósseo neoformado (%) em alvéolo (A1+A2+A3) dos animais C3H, submetidos a diferentes tratamentos nos diferentes períodos experimentais. Fonte: Sabino, Andressa Pelissari Zambolin (2013).

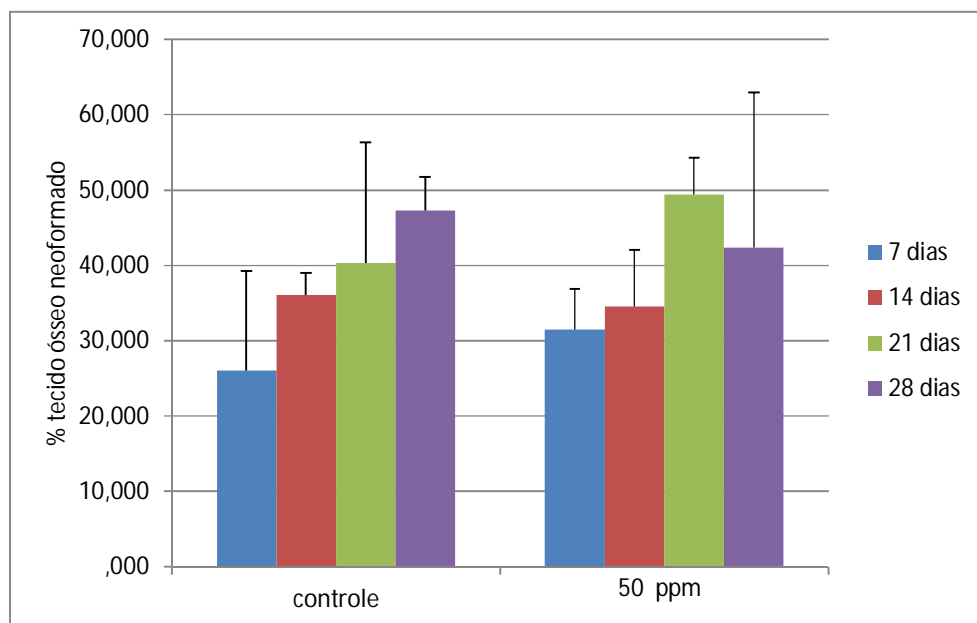


Figura 16 - Área de tecido ósseo neoformado (%) em alvéolo (A1+A2+A3) dos animais C57, submetidos a diferentes tratamentos nos diferentes períodos experimentais. Fonte: Sabino, Andressa Pelissari Zambolin (2013).

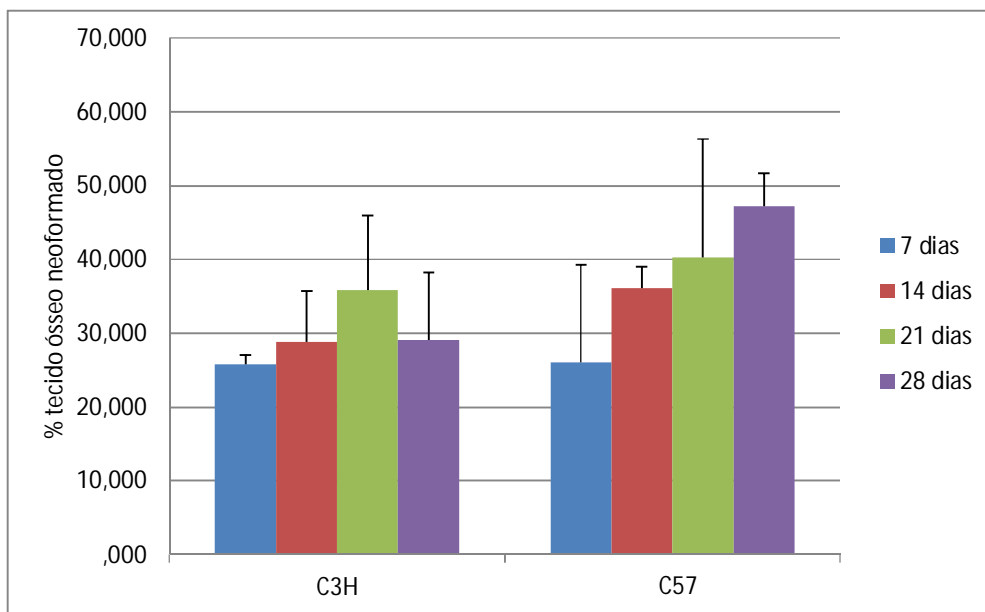


Figura 17 - Comparação da área (%) de tecido ósseo neoformado (A1+A2+A3) em animais C3H e C57 submetidos ao tratamento com água deionizada (controle) nos diferentes períodos experimentais. Fonte: Sabino, Andressa Pelissari Zambolin (2013).

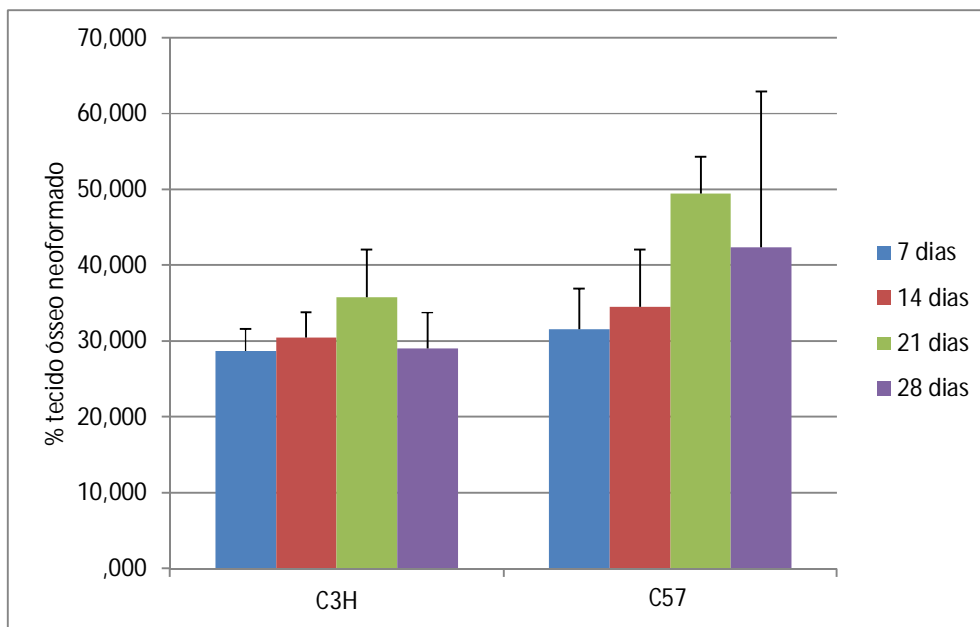


Figura 18 - Comparação da área (%) de tecido ósseo neoformado (A1+A2+A3) em animais C3H e C57 submetidos ao tratamento com água fluoretada (50ppm) nos diferentes períodos experimentais. Fonte: Sabino, Andressa Pelissari Zambolin (2013).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 DENSIDADE ÓSSEA

A diversidade genética existente entre as espécies de camundongos fornece fenótipos relevantes à saúde humana, como a susceptibilidade ao câncer, envelhecimento, obesidade, desordens neurossensoriais, entre outras (EVERETT, 2011).

As linhagens de camundongos C3H/HeJ e C57BL/6J são os modelos hoje mais utilizados para estudos da biomecânica do esqueleto, apresentando maior e menor massa óssea respectivamente. (BEAMER et al., 1996).

Foi utilizado neste estudo essas duas linhagens no intuito de compararmos o processo de reparo ósseo alveolar nas mesmas, sendo C3H/HeJ comparada a um organismo com densidade óssea normal e C57BL/6J com um organismo que apresenta perda de massa óssea, fenômeno que ocorre na doença osteoporose. (BEAMER et al., 1996).

Estudos mostram que a diferença entre essas linhagens de camundongos está na disposição e espessura das trabéculas ósseas e não na composição elemental do esqueleto. (RUBIN ; RUBIN; JASIUK, 2004). A mesma diferença se dá em humanos, onde o osso osteoporótico difere do osso normal nas mesmas características – trabéculas ósseas mais finas, o que demonstra ser este um modelo de estudo adequado para a referida comparação. (GRYNPAS & HOLMYARD, 1988).

Esta diferença descrita em alguns trabalhos foi confirmada nos resultados deste trabalho, através da análise histológica, com os animais C3H/HeJ apresentando trabéculas ósseas mais espessas que a linhagem C57BL/6J. Notamos uma estruturação diferente de trabéculas ósseas como descrito na literatura (JUDEX et al., 2002).

### 6.2 COMPARAÇÃO ENTRE O REPARO ÓSSEO ALVEOLAR NAS DUAS LINHAGENS

O estudo do reparo ósseo em modelo de alvéolo dental também é usado em modelos de deficiência hormonal, tratamentos de patologias ósseas (farmacos para osteoporose) e marcadores do processo de osteoclastogenesis (OPG, RANKL e



TRAP). (LUVIZUTO et al., 2010; 2011). Como citado anteriormente escolhemos as linhagens de camundongos devido as características ósseas específicas.

Em geral, ao observarmos as fases do reparo alveolar em nossos animais, os eventos encontrados condizem com os descritos na literatura por Sato e Takeda (2007), descrevendo o reparo alveolar em ratos, e por Rodrigues (2005), descrevendo o mesmo evento em humanos.

Nas análises obtidas não foi possível observarmos o estágio descrito como primário – exsudativo – pois praticamente não visualizamos coágulo sanguíneo, mesmo nos períodos de 7 dias, condizente com os achados de Sato e Takeda (2007), ao analisar o reparo alveolar em ratos, onde detectaram neoformação óssea trabecular a partir do quinto dia após a extração. De acordo com Marzola et al. (2009), a análise histológica do reparo alveolar em humanos mostra que no período de 7 dias existe uma substituição de coágulo por tecido de granulação, como os achados desse estudo.

Outros autores encontraram resultados parecidos com nestes achados aos 7 dias de reparo alveolar: pequena quantidade de coágulo sanguíneo aos 7 dias, porém em alvéolo de ratos. (MACHADO et al., 2010).

Em nosso trabalho, no período de 7 dias, já observamos a presença de células mononucleares, desenvolvimento e maturação do tecido conjuntivo caracterizando o que é descrito na literatura como a segunda etapa do processo de reparo alveolar. (RODRIGUES, 2005; SATO & TAKEDA, 2007).

Na análise do período de 14 dias, do presente trabalho, verificou-se a deposição de tecido ósseo primário próximo às paredes do alvéolo, o qual começava a estabelecer uniões entre si formando trabéculas, da mesma forma que descrito por Sato e Takeda (2007), e invadir o centro do alvéolo (mais marcante no terço medial).

Nos períodos mais tardios, de 21 e 28 dias, os achados mostravam o alvéolo praticamente preenchido por tecido ósseo neoformado, assim como descrito na literatura. (SATO & TAKEDA, 2007).

Ao estabelecer um comparativo entre o reparo ósseo dos animais das diferentes linhagens em questão, pode-se verificar um padrão de neoformação óssea diferenciado, mas não diferente estatisticamente (quantidade de tecido-morfometria). Os animais C3H/HeJ apresentam um padrão de formação óssea mais restrito às proximidades das paredes do alvéolo, formando trabéculas mais espessas. Enquanto na linhagem de camundongos C57BL/6J as trabéculas

neoformadas avançam mais em direção ao centro do alvéolo formando trabéculas ósseas mais finas, com maior quantidade de tecido conjuntivo entremeando-as. Mostrando que a arquitetura óssea encontrada em nosso estudo condiz com o descrito na literatura. (JUDEX et al., 2002; RUBIN et al., 2004).

A diferença na arquitetura das trabéculas é que faz os animais da linhagem C3H/HeJ apresentarem maior densidade óssea quando comparado com os camundongos da linhagem C57BL/6J. (JUDEX et al., 2002; RUBIN et al., 2004). Essas características foram confirmadas pelas nossas análises histológicas e morfométricas.

Esta diferença na densidade óssea é explicada na literatura como resultado especialmente da atividade osteoblástica. Estabelecendo um comparativo entre as atividades periostal basal das duas linhagens, tem-se que a dos animais da linhagem C3H/HeJ é maior que dos animais da linhagem C57BL/6J. A resposta basal dos osteoblastos em um camundongo C3H/HeJ de 32 semanas de idade se iguala à atividade de um camundongo C57BL/6J de 16 semanas. (POLIACHIK et al., 2008).

Sheng et al. (2004), mostraram que a cultura de osteoblastos do C3H/HeJ apresentou maior capacidade de diferenciação, atividade enzimática de fosfatase alcalina, formação de nódulos mineralizados, maior expressão gênica de colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina e menor índice de apoptose quando comparados com osteoblastos do C57BL/6J, reafirmando que a diferença no índice de densidade e massa óssea relacionam-se com a atividade metabólica dos osteoblastos. (SHENG et al., 2006).

Ainda sobre as diferenças entre as linhagens, no trabalho de Judex et al. (2002), os autores demonstraram diferenças estruturais e nas propriedades mecânicas nos ossos das linhagens de camundongos C3H/HeJ e C57BL/6J. Sob diferentes situações (estímulo e desuso) a linhagem C57BL/6J foi quem apresentou maior diferença do grupo controle. Notamos, além dos resultados histológicos, diferenças marcantes entre as duas espécies (dados não apresentados), como tamanho dos animais. O que nos levou a escolher a porcentagem de tecidos neoformados para padronizar a apresentação de nossos resultados. Uma vez que a área do alvéolo para cada animal era diferente em função da diferença no tamanho das linhagens.

### 6.3 EFEITO DO FLUORETO NO REPARO ALVEOLAR DAS DIFERENTES LINHAGENS

Em relação à susceptibilidade à fluorose dental, sabemos que a linhagem de camundongos 129P3/J são considerados mais “resistentes”, enquanto a linhagem de animais A/J é considerada a mais “susceptível” ou “vulnerável”. A linhagem de camundongos C57BL/6J foi classificada no grupo de linhagens com susceptibilidade “intermediária”, enquanto a linhagem dos animais C3H/HeJ foi incluída no grupo de animais considerados “sensíveis” ao fluoreto. (CARVALHO et al., 2009; EVERETT et al., 2002).

O osso tem sido estudado como biomarcador para exposição aguda ou crônica ao flúor devido a afinidade do flúor por tecidos mineralizados. (CARVALHO et al., 2008; LEITE et al., 2008; CARVALHO et al., 2006; BUZALAF et al., 2005). Dessa maneira a literatura destaca a influência do fluoreto diretamente sobre a atividade dos osteoblastos e sua ação mitogênica sobre as células progenitoras de osteoblastos (RUBIN et al., 2001; MATSUDA, 2010). Estudos evidenciam o tratamento de indivíduos com osteoporose com altas doses de flúor apresentando aumento do conteúdo ósseo mineral (BMC). (ERIKSEN; MELSEN; MOSEKILDE, 1985).

Sabe-se também que o fluoreto apresenta uma estreita janela terapêutica, podendo ter ação tóxica às células osteoblásticas provocando alterações ósseas como a fluorose esquelética (CHENG et al., 2005; COLLAERT et al., 2011; BOIVIN et al., 1987).

Em ratos, o flúor em alta dose (50 ppm) pode atrasar a remissão do coágulo sanguíneo e conseqüentemente o reparo alveolar. (FERNANDES et al., 2012a). Os mesmos autores mostraram também que essa dose de fluoreto (50 ppm) pode alterar a expressão de TRAP. Em nossos resultados não foi observado atraso na reabsorção do coágulo sanguíneo, diferentemente da descrição de FERNANDES et al. (2012a).

Durante o estudo ficou evidente que o tratamento com o fluoreto teve uma certa influência no reparo alveolar de camundongos de ambas linhagens de camundongos (C3H/HeJ e C57BL/6J), porém sua ação foi restrita à alguns momentos, isto é, promoveu o aumento da neoformação óssea em algumas situações e diminuiu em outras, nos diferentes terços e períodos. As diferenças

promovidas pelo tratamento com o fluoreto, na neoformação óssea, foram mais acentuadas no grupo C57BL/6J, sendo estatisticamente significantes no terço cervical. No grupo dos animais da linhagem C3H/HeJ as diferenças encontradas não foram significantes estatisticamente.

Outros trabalhos da literatura testaram o efeito do fluoreto em linhagens de camundongos. No trabalho de Mousny et al. (2006), os autores trataram 3 diferentes linhagens de camundongos (A/J, SWR/J e 129P3/J) com diferentes concentrações de flúor na água de beber. Os autores descreveram alterações nas propriedades mecânicas de ossos em especial na linhagem A/J. Em um trabalho do mesmo grupo, os autores demonstraram diferenças no efeito do flúor nas linhagens de camundongos A/J, SWR/J e 129P3/J em relação ao tecido osteóide e cristais de apatita (extensão do cristal). (MOUSNY et al., 2008). No trabalho de Kobayashi (2012), também foi demonstrado a expressão de diferentes proteínas nos animais A/J e 129P3/J quando tratados com fluoreto na água de beber, comprovando a influência genética na susceptibilidade ao fluoreto.

No trabalho de Yan et al. (2007), os autores usaram as linhagens C3H/HeJ e C57BL/6J, tratados com diferentes concentrações de flúor (0, 50 e 100 ppm) em diversos experimentos in vitro. Em geral, os dados analisados mostraram alterações em marcadores ósseos, com o tratamento com 100 ppm, em especial na linhagem C57BL/6J. A linhagem de camundongos C3H/HeJ mostrou-se mais “resistente” às mudanças ocasionadas pelo fluoreto. Esse último trabalho, no qual os autores usaram as mesmas linhagens, os resultados apresentam um ponto em comum com os nossos resultados, uma vez que a linhagem C3H/HeJ mostrou menores alterações sob o efeito do flúor. (YAN et al., 2007). Em contrapartida, tanto no trabalho de YAN et al. (2007) como neste trabalho, a linhagem de camundongos C57BL/6J apresentou alterações mais significantes.

Ainda sobre as diferenças entre as linhagens, dois outros trabalhos merecem destaque por encontrarem resultados congruentes com estes aqui apresentados e os de YAN et al. (2007): os trabalhos de Robling e Turner (2002) e o de Akhter et al. (1998). Nesses dois trabalhos os autores testaram a resposta das linhagens C3H/HeJ e C57BL/6J à estímulos e forças mecânicas para maximizar a formação óssea. Em ambos os casos os autores descreveram menor resposta na linhagem C3H/HeJ em comparação com a linhagem de camundongos C57BL/6J.

Esses dados da literatura em conjunto com os dados aqui mostrados, somos levados a acreditar que a linhagem C3H/HeJ apresenta, o que poderíamos chamar de maior “estabilidade” ou “resistência” à fatores/agentes que podem modificar o metabolismo do tecido ósseo. (ROBLING & TURNER, 2002; AKHTER et al., 1998; MOUSNY et al., 2006; YAN et al., 2007; MOUSNY et al., 2008).

A alta densidade óssea de C3H/HeJ é causada preponderantemente aumento da atividade dos osteoblastos e não pelo aumento proliferativo das células. (SHENG et al., 2004; 2006). De acordo com Sheng et al. (2004), são os osteoblastos mais diferenciados de C3H/HeJ que apresentam maior atividade de formação óssea e menor índice de apoptose, o que implica em uma população de osteoblastos mais madura e mais ativa funcionalmente. Estes dados também podem justificar os resultados nossos discutidos sobre o efeito do fluoreto, além de outros agentes, sob o tecido ósseo dessa linhagem de camundongos. Lembrando que células ainda não diferenciadas, ou comprometidas, podem ser mais facilmente estimuladas tanto para proliferação como diferenciação celular. Sendo assim, as células ósseas (osteoblastos) da linhagem C3H/HeJ estariam comprometidas com seu fenótipo, enquanto as células da linhagem de camundongos C57BL/6J poderiam apresentar maior “plasticidade”.

Matsuda (2010), realizou ensaios da mineralização óssea de células provenientes da calvária de camundongos da linhagem C3H/HeJ e obteve que os osteoprogenitores mais diferenciados de C3H/HeJ são mais resistentes à ação inibitória do fluoreto. Este é outro resultado/trabalho que parece colaborar com os achados aqui presentes e também com a hipótese levantada sobre a linhagem C3H/HeJ.

A utilização do flúor em tratamento de osteoporose foi avaliada por Balena et al. (1998). O autores apresentaram em sua revisão um estudo feito com idosos que receberam alta dose de flúor, onde obtiveram aumento progressivo do tecido ósseo nas primeiras 40 semanas e com diminuição deste valor sequencialmente, sendo que o índice retornou aos níveis da 10ª semana após a 85ª semana. O mesmo ocorreu neste estudo. Onde se obteve, em praticamente todos os grupos fluoretados um aumento da porcentagem de tecido ósseo neoformado até 21 dias e diminuição destes valores no período de 28 semanas. Segundo esses mesmos autores, essa diminuição pode ser explicada pela ação do flúor sobre as células quiescentes que

revestem as superfícies ósseas, diferenciando-as em osteoblastos ou substituindo-as por osteoblastos novos, nos primeiros períodos.

Autores sugerem que a incorporação de fluoreto nos tecido mineralizados modifica a dinâmica deste tecido em diversos aspectos como resistência e tração e no processo de síntese e reabsorção. (MOUSNY et al., 2006). O mesmo grupo, mais tarde, especulou que o efeito do flúor pode estar acontecendo na interface mineral/orgânico interferindo no crescimento do cristal de apatita. (MOUSNY et al., 2008).

Recentemente Yan et al. (2011), semelhantemente aos descritos da revisão de Everett (2011), levantam a hipótese do fluoreto ter efeito sobre a matriz óssea mineral e efeitos sobre células ósseas (osteoblastos e osteoclastos) via hormônios. Os autores se basearam em resultados próprios, e da literatura, na alteração que o fluoreto causa na produção de paratormônio, fosfatase alcalina, expressão de RANKL/OPG e outros reconhecidos agentes de controle do metabolismo ósseo. Além desses marcadores Everett (2011), cita a interferência do flúor na atividade de enzimas quinases, em alguns casos inibindo sua atividade. Estes efeitos sobre as enzimas poderiam acarretar efeitos secundários em eventos importantes como o ciclo celular e atividade de síntese celular.

Carvalho et al. (2008), também demonstraram a influência inibitória do flúor na formação óssea ectópica. Onde os autores seguiram o modelo de implantação de matriz óssea desmineralizada em músculos de ratos. Os animais foram tratados com água de beber com diferentes concentrações de flúor. Na biópsia dos tecidos os autores confirmaram, por meio de morfometria, menor formação óssea ectópica nos animais tratados com 50 ppm de flúor.

Em resumo, os trabalhos da literatura em conjunto com os presentes resultados podem sustentar a diferença metabólica no tecido ósseo dos diferentes animais (linhagens C3H/HeJ e C57BL/6J) e conseqüentemente no reparo ósseo alveolar. Além de demonstrar um efeito diferencial do flúor nas duas linhagens, confirmando um componente genético na susceptibilidade ao flúor.

## 7 CONCLUSÃO

Pode-se concluir através dos resultados obtidos durante a realização do trabalho, mostrado através de modelo experimental do reparo alveolar de camundongos que o processo de reparo alveolar é igual quando relacionado as fases de reparo, mas apresenta um padrão diferente de formação óssea entre C3H/HeJ e C57BL/6J. Ainda foi visto que o fluoreto promove um pequeno aumento no tecido ósseo neoformado nessas duas linhagens e este apresenta um efeito mais expressivo na linhagem C57BL/6J.

## REFERÊNCIAS

AKHTER, M.P. et al. Bone response to in vivo mechanical loading in two breeds of mice. **Calcified tissue international**, New York, v. 63, n. 5, p. 442-449, Nov. 1998.

AMLER, M.H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, St. Louis, v.27, n.3, p.308-318, Mar. 1969.

BAHAR, H. et al. Molecular signaling in bone regeneration. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, Boca Raton, v. 17, n.2, p. 87-101, 2007.

BALENA M. et al. Effects of different regimens of sodium fluoride treatment for osteoporosis on the structure, remodeling and mineralization of bone, **Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA**, London, v. 8, n.5, p. 428-435, 1998.

BARON, R; HESSE, E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, Springfield, v.97 , n.2 , p.311-325, Feb. 2012.

BEAMER, W.G. et al. Genetic variability in adult bone density among inbred strains of mice. **Bone**, Bar Harbor, v.5, n. 18, p.397-403, 1996.

BERNSTEIN, D. S.; COHEN, P. Use of sodium fluoride in the treatment of osteoporosis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, United States. v.27, n.2, p.197-210, Feb. 1967.

BEZERRA DE MENEZES, L. M. et al. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. **Forensic Science International**, Lausanne. v. 137, n.3, p.209-14, 2003.

BOIVIN, G. et al. Skeletal fluorosis: Iliac bone histomorphometry and bone fluoride content. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Abstract. In: **9<sup>th</sup> Annual. Science. Meet. Am. Soc. Bone and Mineral Res.** v.2, Suppl. I, 1987.

BUZALAF, M.A.R. et al. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles. v. 29, n. 8, p. 810-813, 2005.

BUZALAF, M.A.R. et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles. v. 28, n. 4, p. 249-252, 2004.

CARVALHO, J.G. et al. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. **Journal of dental research**, Chicago. v. 88, n. 11, p. 1054-1058, Nov. 2009.



CARVALHO, J.G. et al. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, Barcelona. n.30, p. 287-294, 2008.

CARVALHO, J.G.; DE OLIVEIRA, R.C.; BUZALAF, M.A. Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. **Journal of applied oral science : revista FOB**, Bauru. v. 14, n. 4, p. 238-241, Ago, 2006.

CHENG, K. et al. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials**, Guilfort. v. 26, n. 32, p. 6288-95, 2005.

COLLAERT, B.; WIJNEN, L.; DE BRUYN, H. A 2-year prospective study on immediate loading with fluoride-modified implants in the edentulous mandible. **Clinical oral implants research**, Copenhagen. v. 22, n. 10, p. 1111-1116, Out. 2011.

COOPER, L.F. et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO<sub>2</sub> grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. **Biomaterials**, Guilfort. v. 27, n. 6, p. 926-36, Feb, 2006.

DEQUEKER, J.; DECLERCK, K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. **Schweizerische medizinische Wochenschrift**, Basel. v. 123, n. 47, p. 2228-34, 1993.

DUNIPACE, A.J. et al. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **Journal of dental research**, Chicago. v. 74, n. 1, p. 358-68, 1995.

ENLOW, D.H., HANS, M.G. **Noções Básicas sobre crescimento facial**. São Paulo, Brasil: Editora Santos, 1998.

EVERETT, E.T. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics. **Journal of dental research**, Chicago. v. 90, n. 5, p. 552-60, Maio, 2011.

EVERETT, E.T. et al. Detection of dental fluorosis-associated quantitative trait Loci on mouse chromosomes 2 and 11. **Cells, tissues, organs**, Basel. v. 189, n. 1-4, p. 212-218, 2009.

EVERETT, E.T. et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **Journal of dental research**, Chicago. v.81, n.11, p. 794-798, Nov. 2002.

ERIKSEN, E.F.; MELSEN, F.; MOSEKILDE, L. Effect of Sodium Fluoride, Calcium, Phosphate, and Vitamin D2 on Trabecular Bone Balance and Remodeling in Osteoporotics. **Bone**, New York.. v.6, n.5, p.421-428, 1985.

FALONI, A. P. S.; CERRI, P. S. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. **Revista de Odontologia de UNESP**, Araraquara, v.36, n.2, p.181-188, 2007.

FERNANDES, M.D. et al. Effects of fluoride in bone repair: an evaluation of RANKL, OPG and TRAP expression. **Odontology**, Tokyo. 10 Ago, 2012a.

FERNANDES, M.D. et al. Fluoride effect on the process of alveolar bone repair in rats: evaluation of activity of MMP-2 and 9. **RSBO - South Brazilian Dentistry Journal**, Joinville. v.9, n.3, p.229-237, Jul-Set, 2012b.

GIACOMINI, D.R.; MELLA, E.A.C. Reposição Hormonal: vantagens e desvantagens. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, Londrina, v. 27, n.1, p. 71-92, jan/jun. 2006.

GIANNOUDIS, P.V; EINHORN, T.A.; MARSH, D. Fracture healing: a harmony of optimal biology and optimal fixation? **Injury**, Bristol. 2007.

GRYNPAS, M.D.; HOLMYARD, D. Changes in quality of bone mineral on aging and in disease. **Scanning microscopy**, Chicago, v.2, p.1045-1054, 1988.

HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1092, p. 385-396, jun 2009.

HUGHES, F.J.; AUBIN, J.E. Culture of cells of osteoblast lineage. In **Methods in Bone Biology** (ed. T.R. Arnett and B. Henderson), in press. London, Chapman & Hall, 1997.

HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? Philosophical transactions. Series A, **Mathematical, physical, and engineering sciences**, London, v. 362, n. 1825, p. 2821-50, 2004.

JUDAS, F. et al. **Estrutura e dinâmica do tecido ósseo**. Coimbra, Portugal, 2012. 51f. Texto de apoio para os alunos do Mestrado Integrado em Medicina Disciplina de Ortopedia. Disponível em: <<http://rihuc.huc.min-saude.pt/bitstream/10400.4/1346/1/TECIDO%20%C3%93SSEO%20.pdf>>. Acesso em: 03 dez. 2012

JUDEX, S.; DONAHUE, L.R.; RUBIN, C. Genetic predisposition to low bone mass is paralleled by an enhanced sensitivity to signals anabolic to skeleton. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v. 16, n. 10, p. 1280-1282, 2002.

KEATING, F.S.J.; MANASSIEV, N.; STEVENSON, J.C. Estrogens and Osteoporosis in Lobo, R.A., Kelsey, J. & Marcus, R. Menopause: Biology and Pathobiology. **Academic Press: Sand Diego, CA.**, p. 509-533, 2000.

KOBAYASHI, C. A. N. **Efeito do Fluoreto no Osso de Camundongos com Diferentes Susceptibilidade Genéticas à Fluorose: uma Análise Proteômica**. 2012. 215f. Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, 2012.

KRAGSTRUP, J.; RICHARDS, A.; FEJERSKOV, O. Experimental osteo-fluorosis in the domestic pig: a histomorphometric study of vertebral trabecular bone. **Journal of dental research**, Chicago. v. 63, n. 6, p. 885-889, Jun, 1984.

LAGIER, R. Effects of fluorine on bone morphology. In: COURVOISIER, B.; DONATH, A.; BAUD, C.A. **Fluoride and bone: second Symposium CEMO (Centre d'étude des maladies ostéo-articulaires de Genève)**. Geneva: Médecine at Hygiène. p. 32-41, 1978.

LAU, K.H; BAYLINK, D.J. Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. **Critical reviews in oncogenesis**, Boca Raton, v.4, n.4, p.451-71, 1993.

LEITE, A.L. et al. Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, Barcelona. v. 30, n. 3, p. 209-14, April, 2008.

LUVIZUTO, E.R. et al. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Archives of oral biology**, Oxford. v. 56, n. 10, p. 984-90, Oct. 2011.

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**, Oxford. v. 55, n.1, p. 52-9, Nov. 2010.

MACHADO, G.J. et al. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, Philadelphia. v.68, n.11, p. 2675-81, Nov. 2010.

MACLEAN, C. et al. Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. **Annals of internal medicine**, Philadelphia. 148, n. 3, p. 197-213, Feb, 2008.

MANKIN, H.J.; MANKIN, C.J. Metabolic bone disease: a review and update. **Instructional course lectures**, St. Louis. v. 57, p. 575-593, 2008.

MARZOLA, C. et al. **Processo de Reparo Alveolar Aspectos Clínicos e Microscópicos**, 2009. Disponível em:  
<[http://www.actiradentes.com.br/revista/2009/textos/48RevistaATO-Processo\\_de\\_reparo\\_alveolar-2009.pdf](http://www.actiradentes.com.br/revista/2009/textos/48RevistaATO-Processo_de_reparo_alveolar-2009.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2012.

MATSUDA, S.S. **Efeito diferencial do flúor na mineralização de osteoblastos de duas espécies de camundongos com diferentes densidades ósseas**. 2010. 139f. Tese (Doutorado em Biologia Oral). Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - Bauru.

MOHR, H. Fluoride effect on bone formation - an overview. **Tandlaegebladet**, København, v. 94, n. 18, p. 761-3, Dec. 1990.

MOUSNY, M. et al. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. **Bone**, Bar Harbor, v. 39, n.6, p. 1283-1289, Dec. 2006.

MOUSNY, M. et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. **Bone**, Bar Harbor. v. 43, n.6, p.1067-74, 2008.

NANCI, A. **Tem Cate's Oral Histology Development, Structure and Function**, Philadelphia, USA: Elsevier. p. 411, 2008.

PINTO, A.S. et al. Efeitos de tratamento combinado de alendronato de sódio, atorvastatina cálcica e ipriflavona na osteoporose induzida com dexametasona em ratas. **Revista Brasília de Ciências Farmacêuticas / Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.42 n.1 p.99-107, 2006.

POLIACHIK, S.L. et al. 32 wk old C3H/HeJ mice actively respond to mechanical loading. **Bone**, Elmsford, v.42, n.4, p.653-9, 2008.

QU, H.; WEI, M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. **Acta biomaterialia**, Kidlington. v. 2, n. 1, p. 113-119, 2006.

RADOMINSKI, SC et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, São Paulo.v. 44, n. 6, p. 426-434, 2004.

RAFFI, M.B.; MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F. Estudos histomorfométricos e histológicos das lesões ósseas causadas por flúor em aves. **Pesquisa Veterinária Brasileira (Brazilian Journal of Veterinary Research)**, Rio de Janeiro. v. 17, n. 2, p. 69-76, 1997.

RIGGS, B.L.; MELTON, L.J. Osteoporosis: Etiology, **Diagnosis and Management** , 2ª Ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Press, p.524, 1995.

ROBLING, A.G.; TURNER, C.H. Mechanotransduction in bone: genetic effects on mechanosensitivity in mice. **Bone**, Elmsford. v.31, n.5, p.562-569, Nov, 2002.

RODRIGUES, T.S. **Avaliação da dinâmica do Processo de Reparo Alveolar utilizando fluorocromos**. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia – Campus de Araçatuba – UNESP.

ROSEN, V.; THIES, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. **Trends in genetics : TIG**, Amsterdam. v, 8, n. 3, p.97-102. Mar, 1992.

ROSSI, A.C.; FREIRE, A.R.; DORNELLES, R.C.M. Osteoporose: considerações sobre terapêuticas atuais e metabolismo ósseo. **International Journal of Dentistry**, Recife, v. 9 n. 4, p. 210-14, out/dez 2010.

RUBIN, C.D. et al. Sustained-release sodium fluoride in the treatment of the elderly with established osteoporosis. **Archives of internal medicine**, Chicago,. v. 161, n. 19, p. 2325-2333, Out, 2001.

RUBIN, M.A.; RUBIN, J.; JASIUK, I. SEM and TEM study of the hierarchical structure of C57BL/6J and C3H/HeJ mice trabecular bone. **Bone**, Elmsford, v.35, n.1, p. 11-20, 2004.

SABINO, A.P.Z. **EFEITO DO FLUORETO NO REPARO ÓSSEO EM ALVÉOLOS DE CAMUNDONGOS COM DIFERENTES DENSIDADES ÓSSEAS. ANÁLISE MORFOMÉTRICA.** 2013. 183f. Dissertação (Mestrado em Biologia Oral – Bioquímica). Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

SATO, H.; TAKEDA, Y. Proliferative activity, apoptosis and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. **Cells, tissues, organs**, Basel. v.186, n.2, p.104-11, 2007.

SHENG, M.H. et al. High osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is associated with low apoptosis in C3H/HeJ osteoblasts. **Calcified tissue international**, New York, v.78, p.293-301, 2006.

SHENG, M.H.; LAU, K.H.; BEAMER, W.G.; BAYLINK, D.J.; WERGEDAL, J.E. In vivo and in vitro evidence that the high osteoblastic activity in C3H/HeJ mice compared to C57BL/6J mice is intrinsic to bone cells. **Bone**, Elmsford v. 35, p. 711-719, 2004.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science (New York, N.Y.)**, New York, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, Sep, 2000.

TEM CATE, A. R. **Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função.** 5. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001.

TORGENTON, D.J.; BELL-SYER, S.E. Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randomized trials. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, Chicago. v.285, p. 2891-2897, 2001.

VILLAR, L.D. **Efeito do fluoreto de sódio sobre a qualidade óssea das vértebras lombares de ratas ovariectomizadas.** 2004, 93f. Dissertação (Mestrado). Programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

XU, H. et al. Activation of PERK signaling through fluoride-mediated endoplasmic reticulum stress in OS732 cells. **Toxicology**, Amsterdam v.277, n.1-3, p. 1-5, Nov, 2010.

YAN, D. Phenotypic variation of fluoride responses between inbred strains of mice. **Cells, tissues, organs**, Basel. v.194, n.2-4, p. 261-7, 2011.

YAN, D. et al. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. **Bone**, Elmsford. v. 41, n. 6, p. 1036-44, Dec. 2007.

YAN, X. et al. Fluoride induces apoptosis and alters collagen I expression in rat osteoblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington. v.200, n. 3, p. 133-138, Feb. 2011.

YOON, B.S. et al. Bmpr1a and Bmpr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, n. 14, p. 5062-7, April. 2005.

## APÊNDICE A – ÁREAS DE TECIDO ÓSSEO E CONJUNTIVO, RESULTANTES DA MORFOMETRIA

**Tabela 1:** Área ( $\mu\text{m}^2$ ) de tecido ósseo neoformado das diferentes linhagens, em diferentes períodos e terços de alvéolos. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ).

	ÁGUA	LINHAGEM	PERÍODOS	TERÇO	N	MÉDIA $\pm$ DP
1	DEIONIZ	C57	7	CERVICAL	4 <sup>abc</sup>	302335,505 $\pm$ 121864,6
2	DEIONIZ	C57	7	MEDIO	4 <sup>abc</sup>	344508,95 $\pm$ 32076,8
3	DEIONIZ	C57	7	APICAL	3 <sup>abc</sup>	604669,86 $\pm$ 90054,8
4	DEIONIZ	C57	14	CERVICAL	4 <sup>abcdetg</sup>	464325,625 $\pm$ 93278,9
5	DEIONIZ	C57	14	MEDIO	4 <sup>abc</sup>	256827,4425 $\pm$ 86423,9
6	DEIONIZ	C57	14	APICAL	4 <sup>abc</sup>	250207,65 $\pm$ 57283,0
7	DEIONIZ	C57	21	CERVICAL	4 <sup>f</sup>	324526,325 $\pm$ 160897,3
8	DEIONIZ	C57	21	MEDIO	3 <sup>abcdetg</sup>	192095 $\pm$ 33740,1
9	DEIONIZ	C57	21	APICAL	1 <sup>abc</sup>	306439,7
10	DEIONIZ	C57	28	CERVICAL	4 <sup>cdetg</sup>	288198,125 $\pm$ 24913,8
11	DEIONIZ	C57	28	MEDIO	4 <sup>abcdetg</sup>	573066,38 $\pm$ 27994,1
12	DEIONIZ	C57	28	APICAL	4 <sup>abcdetg</sup>	581545,75 $\pm$ 22089,7
13	DEIONIZ	C3H	7	CERVICAL	3 <sup>abc</sup>	305500,61 $\pm$ 79290,5
14	DEIONIZ	C3H	7	MEDIO	4 <sup>abc</sup>	280371,73 $\pm$ 54791,4
15	DEIONIZ	C3H	7	APICAL	3 <sup>abcdetg</sup>	482937,06 $\pm$ 105783,3
16	DEIONIZ	C3H	14	CERVICAL	3 <sup>abc</sup>	273224 $\pm$ 30553,5
17	DEIONIZ	C3H	14	MEDIO	3 <sup>abcf</sup>	201395,94 $\pm$ 152927,7
18	DEIONIZ	C3H	14	APICAL	4 <sup>a</sup>	275496,06 $\pm$ 76451,2
19	DEIONIZ	C3H	21	CERVICAL	3 <sup>abcdf</sup>	411551,58 $\pm$ 15092,5
20	DEIONIZ	C3H	21	MEDIO	4 <sup>bcdetg</sup>	380089,75 $\pm$ 60165,9
21	DEIONIZ	C3H	21	APICAL	3 <sup>ab</sup>	227273,07 $\pm$ 199260,5
22	DEIONIZ	C3H	28	CERVICAL	4 <sup>abc</sup>	301653,81 $\pm$ 67722,1
23	DEIONIZ	C3H	28	MEDIO	4 <sup>abc</sup>	422186,8 $\pm$ 54098,0
24	DEIONIZ	C3H	28	APICAL	3 <sup>abc</sup>	200946,41 $\pm$ 46304,3
25	FLUOR	C57	7	CERVICAL	1 <sup>abcdetg</sup>	332991,4
26	FLUOR	C57	7	MEDIO	4 <sup>abcdetg</sup>	311931,72 $\pm$ 38359,1
27	FLUOR	C57	7	APICAL	4 <sup>abcdetg</sup>	413597,77 $\pm$ 31523,4
28	FLUOR	C57	14	CERVICAL	4 <sup>abc</sup>	401050,12 $\pm$ 46125,2
29	FLUOR	C57	14	MEDIO	3 <sup>abcf</sup>	390443,19 $\pm$ 73659,8
30	FLUOR	C57	14	APICAL	4 <sup>abc</sup>	251359,5 $\pm$ 48223,7
31	FLUOR	C57	21	CERVICAL	2 <sup>abc</sup>	604030,25 $\pm$ 112017,7
32	FLUOR	C57	21	MEDIO	3 <sup>bcdetg</sup>	201148,05 $\pm$ 18683,7
33	FLUOR	C57	21	APICAL	1 <sup>abcdetg</sup>	99431,7
34	FLUOR	C57	28	CERVICAL	4 <sup>e</sup>	241678,63 $\pm$ 148206,5
35	FLUOR	C57	28	MEDIO	2 <sup>abcdetg</sup>	208280,62 $\pm$ 196476,1
36	FLUOR	C57	28	APICAL	3 <sup>abc</sup>	375166,16 $\pm$ 139494,1
37	FLUOR	C3H	7	CERVICAL	2 <sup>abcdf</sup>	278809,6 $\pm$ 150989,6
38	FLUOR	C3H	7	MEDIO	4 <sup>abcdetg</sup>	160351 $\pm$ 85379,2
39	FLUOR	C3H	7	APICAL	4 <sup>abcdetg</sup>	178298,56 $\pm$ 114448,0
40	FLUOR	C3H	14	CERVICAL	3 <sup>abc</sup>	203098,9 $\pm$ 79288,4
41	FLUOR	C3H	14	MEDIO	1 <sup>abc</sup>	281658,5
42	FLUOR	C3H	14	APICAL	3 <sup>abc</sup>	241130,16 $\pm$ 81851,3
43	FLUOR	C3H	21	CERVICAL	3 <sup>cdetg</sup>	375675,81 $\pm$ 27262,8
44	FLUOR	C3H	21	MEDIO	2 <sup>detg</sup>	174975,8 $\pm$ 30695,9
45	FLUOR	C3H	21	APICAL	1 <sup>abcdetg</sup>	349161,9
46	FLUOR	C3H	28	CERVICAL	4 <sup>abc</sup>	214708,625 $\pm$ 80648,3
47	FLUOR	C3H	28	MEDIO	1 <sup>abc</sup>	283298,3
48	FLUOR	C3H	28	APICAL	1 <sup>abcdetg</sup>	198799,7

Abreviaturas: **DEIONIZ**: água deionizada; **FLUOR**: água fluoretada; **N**: número da amostra.\*Letras sobreescritas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.

**Tabela 2:** Área ( $\mu\text{m}^2$ ) de tecido conjuntivo das diferentes linhagens, em diferentes períodos e terços. Valores de média e desvio padrão ( $\pm$ ).

	ÁGUA	LINHAGEM	PERÍODOS	TERÇO	N	MÉDIA $\pm$ DP
1	DEIONIZ.	C57	7	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	470633,37 $\pm$ 117484,8
2	DEIONIZ.	C57	7	MEDIO	2 <sup>ab</sup>	412117,945 $\pm$ 95369,8
3	DEIONIZ.	C57	7	APICAL	1 <sup>ab</sup>	528501
4	DEIONIZ.	C57	14	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	678546,4 $\pm$ 55893,3
5	DEIONIZ.	C57	14	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	530563,38 $\pm$ 146901,6
6	DEIONIZ.	C57	14	APICAL	4 <sup>ab</sup>	587186,3375 $\pm$ 40518,8
7	DEIONIZ.	C57	21	CERVICAL	3 <sup>ab</sup>	545214,06 $\pm$ 40518,8
8	DEIONIZ.	C57	21	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	456756,65 $\pm$ 54876,8
9	DEIONIZ.	C57	21	APICAL	2 <sup>ab</sup>	535623,075 $\pm$ 98371,3
10	DEIONIZ.	C57	28	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	425488,325 $\pm$ 40219,9
11	DEIONIZ.	C57	28	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	432388,91 $\pm$ 42922,4
12	DEIONIZ.	C57	28	APICAL	3 <sup>ab</sup>	484754,36 $\pm$ 62254,7
13	DEIONIZ.	C3H	7	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	658598,86 $\pm$ 118230,2
14	DEIONIZ.	C3H	7	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	606890,02 $\pm$ 264217,2
15	DEIONIZ.	C3H	7	APICAL	2 <sup>ab</sup>	739680,3 $\pm$ 42044,1
16	DEIONIZ.	C3H	14	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	600646,88 $\pm$ 75476,8
17	DEIONIZ.	C3H	14	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	531916,49 $\pm$ 196788,7
18	DEIONIZ.	C3H	14	APICAL	4 <sup>ab</sup>	558745,85 $\pm$ 185280,8
19	DEIONIZ.	C3H	21	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	519077,725 $\pm$ 250876,3
20	DEIONIZ.	C3H	21	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	547464,8 $\pm$ 161932,1
21	DEIONIZ.	C3H	21	APICAL	4 <sup>ab</sup>	568326,83 $\pm$ 278645,0
22	DEIONIZ.	C3H	28	CERVICAL	3 <sup>ab</sup>	386841,85 $\pm$ 74188,1
23	DEIONIZ.	C3H	28	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	472230,3875 $\pm$ 64905,6
24	DEIONIZ.	C3H	28	APICAL	3 <sup>ab</sup>	646880,26 $\pm$ 113466,8
25	FLUOR	C57	7	CERVICAL	1 <sup>ab</sup>	830897
26	FLUOR	C57	7	MEDIO	1 <sup>ab</sup>	493993
27	FLUOR	C57	7	APICAL	1 <sup>ab</sup>	647550
28	FLUOR	C57	14	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	597257,76 $\pm$ 144301,0
29	FLUOR	C57	14	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	447237,31 $\pm$ 13493,4
30	FLUOR	C57	14	APICAL	3 <sup>ab</sup>	509503,2 $\pm$ 217448,9
31	FLUOR	C57	21	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	490933,85 $\pm$ 48635,7
32	FLUOR	C57	21	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	412143,45 $\pm$ 76370,9
33	FLUOR	C57	21	APICAL	3 <sup>ab</sup>	459688,78 $\pm$ 66759,8
34	FLUOR	C57	28	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	447689,83 $\pm$ 80433,0
35	FLUOR	C57	28	MEDIO	4 <sup>a</sup>	370648,72 $\pm$ 45109,6
36	FLUOR	C57	28	APICAL	2 <sup>ab</sup>	354958,32 $\pm$ 61246,4
37	FLUOR	C3H	7	CERVICAL	3 <sup>ab</sup>	720537,29 $\pm$ 130922,9
38	FLUOR	C3H	7	MEDIO	4 <sup>ab</sup>	641152,9 $\pm$ 280157,5
39	FLUOR	C3H	7	APICAL	1 <sup>b</sup>	1030722
40	FLUOR	C3H	14	CERVICAL	4 <sup>ab</sup>	594503,9 $\pm$ 95678,2
41	FLUOR	C3H	14	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	489250,5 $\pm$ 48960,0
42	FLUOR	C3H	14	APICAL	4 <sup>ab</sup>	574053,5 $\pm$ 169263,0
43	FLUOR	C3H	21	CERVICAL	3 <sup>ab</sup>	756582,75119839,5
44	FLUOR	C3H	21	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	630842,96 $\pm$ 173838,9
45	FLUOR	C3H	21	APICAL	1 <sup>ab</sup>	561422
46	FLUOR	C3H	28	CERVICAL	3 <sup>ab</sup>	521152,11134085,8
47	FLUOR	C3H	28	MEDIO	3 <sup>ab</sup>	469798,7139603,5
48	FLUOR	C3H	28	APICAL	1 <sup>ab</sup>	577677

Abreviaturas: **DEIONIZ.**: água deionizada; **FLUOR.**: água fluoretada; **N**: número da amostra.\*Letras sobrescritas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativa na comparação entre os grupos.

**ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA E PESQUISA EM ANIMAIS  
DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU - USP**



**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73  
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

*Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais*

Fone: (14)3235-8356

e-mail: [mferrari@fob.usp.br](mailto:mferrari@fob.usp.br)

**CEEPA-Proc. Nº 007/2010**

Bauru, 5 de maio de 2010.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **"Efeito do fluoreto no reparo ósseo em alvéolos de camundongos com diferentes densidades ósseas. Análise morfométrica e zimográfica"**, de autoria de Andressa Pelissari Zambolin Sabino, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprova**ndo o projeto foi aceito em reunião desta Comissão realizada no dia **4 de maio de 2010**, considerando que não haver impedimentos éticos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

**Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**

Docente do Departamento de Ciências Biológicas