



**SAMANTHA ROBERTO CORDEIRO**

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA MANDIBULAR DE RATAS  
PORTADORAS DE OSTEOPOROSE**

**DUQUE DE CAXIAS**

**2019**

SAMANTHA ROBERTO CORDEIRO

**AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA MANDIBULAR DE RATAS  
PORTADORAS DE OSTEOPOROSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Unigranrio, visando a obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Orientadora:

Prof.a Dr.a Sabrina de Castro Brasil

Duque de Caxias

2019

## **DEDICATÓRIA**

---

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse;  
Ele é o maior mestre que alguém pode conhecer!

Aos meus pais, Samuel e Zélia, por sempre acreditarem em mim e por terem abdicado  
de suas vidas em prol das realizações e da felicidade de seus filhos.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nessa vida. Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por Sua eterna compreensão e tolerância, por Seu infinito amor, pela Sua voz “invisível” que não me permitiu desistir em meio a tantas lutas.

Agradeço a Deus por ter me dado uma família tão especial, que é minha base, meu maior tesouro. Obrigada por toda dedicação e esforço! Quero agradecer em especial minha querida mãe, que é meu anjo da guarda aqui na terra, a mais amável e doce que pude ter a honra de ser filha, é meu maior exemplo de dignidade, de ser humano, de humildade, de perseverança, de esperança, de fé e gratidão. Obrigada pela dedicação, pela generosidade, doação e incentivo de sempre, pelos conselhos valiosos que levarei sempre comigo e por fim sou imensamente grata por não medir esforços para me ajudar nessa etapa tão importante da minha vida. Te amo mais que saiba dizer!

Agradeço aos meus queridos irmãos Danielle e Lucas, por todo carinho, dedicação e amor, por terem me impulsionado todos os dias, com palavras de apoio, vocês sempre confiaram no meu potencial e, por isso, me incentivam, ajudam, sonham comigo e torna meus dias muito mais felizes.

Agradeço ao meu amado esposo Kerllon, por todo amor, pelo companheirismo, pela amizade. Agradeço ainda, pela compreensão e paciência que teve durante os meses em que me ausentei do nosso lar. Obrigada por toda essa grandiosidade que você representa na minha vida, todos os desafios que me proporciona! Com você tudo tem um sentido especial.

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Jorge Lima Moreira, professor impecável. Como ele mesmo gosta de dizer, ele é Dr. de gente, ele cuida de gente e ensina gente a cuidar de gente, a mais pura verdade, me deu conselhos, me deu a mão no momento que mais precisava e me ensinou a caminhar nesse fantástico mundo da pesquisa. Atencioso, prestativo, de uma inteligência diferenciada e um senso de justiça minucioso. Minha admiração e respeito! Muito obrigada por tudo!

Agradeço ao Prof. Henrique Antunes onde tive a honra de ser aluna na graduação e no mestrado, com ele aprendi muito, aprendi principalmente em como amar meu próximo, é uma das pessoas com o coração mais bondoso que conheci, obrigada!

Agradeço a minha Orientadora Sabrina Castro Brasil, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos, por tanto se dedicar a mim, não somente por ter me ensinado, mas por ter me feito aprender. Você foi como um bálsamo na minha vida, como um anjo enviado por Deus, obrigada por toda dedicação, por toda amizade, por tudo!

Aos professores e colaboradores da Faculdade e do Programa de Pós-graduação e Pesquisa, que tanto colaboraram com a minha formação.

À Universidade UNIGRANRIO, pelas oportunidades que me ofereceu, pelo corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro, um horizonte novo, baseado na confiança, no mérito e ética aqui presentes.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Análise comparativa da espessura do ligamento periodontal entre os grupos.....30
- Figura 2** Cortes histológicos corados com HE de fêmeas ovariectomizadas. .... 30

## LISTA DE TABELA

Tabela 1 Espessura do ligamento periodontal.....	29
--	----

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
<b>2.1 Deficiência de estrogênio e a osteoporose .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Efeito de outros mediadores na fisiopatologia da osteoporose.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Osteoporose e a reabsorção perirradicular .....</b>	<b>20</b>
3. JUSTIFICATIVA .....	22
4. HIPÓTESE .....	23
5. OBJETIVOS .....	24
<b>5.1 Objetivo geral .....</b>	<b>24</b>
<b>5.2 Objetivos específicos .....</b>	<b>24</b>
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
<b>6.1 Seleção da Amostra .....</b>	<b>25</b>
<b>6.2 Determinação das Fases do Ciclo Estral .....</b>	<b>25</b>
<b>6.3 Castração .....</b>	<b>25</b>
<b>6.4 Desenvolvimento de Lesão Perirradicular .....</b>	<b>26</b>
<b>6.5 Microscopia Óptica.....</b>	<b>26</b>
<b>6.6 Morfometria do ligamento periodontal .....</b>	<b>26</b>
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
8. RESULTADOS .....	29
9. DISCUSSÃO .....	31
10. CONCLUSÃO.....	33
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	34
ANEXO.....	39

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar, através de análise morfológica, os efeitos da osteoporose na remodelação óssea de ratas em diferentes tempos experimentais (21 e 40 dias). Ratas adultas (n= 24), da linhagem Wistar, com 3 meses de idade foram incluídas no estudo. Doze animais foram ovariectomizados (grupo OVX) e 12 foram operados por simulação (grupo C). Noventa dias após a cirurgia todos os animais foram anestesiados, e a lesão perirradicular foi desenvolvida nos primeiros molares inferiores esquerdos através de abertura coronária na fóssula mesial da superfície oclusal até a exposição pulpar. Ao final de cada período experimental (21 e 40 dias após desenvolvimento da lesão), os animais foram sacrificados e as mandíbulas foram removidas e preparadas para análise quantitativa da espessura do ligamento periodontal em microscópio óptico. A análise comparativa dos dados realizada através dos testes não paramétricos *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison*. Foi possível verificar aumento significativo na espessura do ligamento periodontal do grupo C 21 quando comparado ao grupo OVX 40 dias ( $p < 0.01$ ) e C 40 comparado ao grupo OVX 40 dias ( $p < 0.01$ ). A osteoporose demonstrou sinais de reabsorção no osso alveolar em todas as amostras, através da presença de osteoclastos. Os resultados revelaram influência da osteoporose com espessamento do ligamento periodontal significativo em animais com maior tempo de exposição à doença.

Palavras-chave: Osteoporose, lesão perirradicular, ligamento periodontal

## ABSTRACT

The aim of this study was to verify, through morphological analysis, the effects of osteoporosis on bone remodeling of rats at different experimental times (21 and 40 days). Adult (n = 24) Wistar 3-month-old female rats were included in the study. Twelve animals were ovariectomized (group OVX) and 12 were operated by simulation (group C). Ninety days after surgery all animals were anesthetized, and the periradicular lesion was developed in the left lower first molars through a coronary opening in the mesial fossil of the occlusal surface until pulp exposure. At the end of each experimental period (21 and 40 days after lesion development), the animals were sacrificed and the mandibles were removed and prepared for quantitative analysis of periodontal ligament thickness under an optical microscope. The comparative analysis of the data performed through the nonparametric Kruskal-Wallis and Dunn's Multiple Comparison tests. It was possible to verify significant increase in the periodontal ligament thickness of group C 21 when compared to group OVX 40 days ( $p < 0.01$ ) and C 40 compared to group OVX 40 days ( $p < 0.01$ ). Osteoporosis showed signs of alveolar bone resorption in all samples, through the presence of osteoclasts. The results revealed the influence of osteoporosis with significant periodontal ligament thickening in animals with longer exposure to the disease.

Keywords: osteoporosis, apical periodontitis, periodontal ligament

## 1. INTRODUÇÃO

A osteoporose pode ser definida como uma doença do esqueleto caracterizada pelo comprometimento da resistência e da qualidade ósseas, com deterioração de sua microarquitetura, predispondo a aumento do risco de fraturas. Muitos fatores contribuem para o desenvolvimento da osteoporose: idade, o sexo e a raça estão entre os fatores determinantes da massa óssea e do risco de fraturas. Outros fatores como: níveis adequados de cálcio, vitamina D, fatores nutricionais, peso corporal, hábitos de vida e inatividade física também interferem para o aparecimento da doença (YAMASHIRO et al. 2001). A osteoporose ainda se classifica em primária (Idiopática ou Involucional) e secundária (doenças do aparelho digestivo, cirurgias, doenças inflamatórias crônicas, endocrinopatias, doenças infecciosas, ou fármacos). Nos homens, a osteoporose secundária é 30% a 60% mais frequente. A deficiência de esteroides sexuais, característica da osteoporose, quebra a homeostase natural de remodelação óssea, levando a um aumento da porosidade óssea e do risco ao desenvolvimento de fraturas.

Estima-se que 200 milhões de pessoas em todo o mundo sejam atingidas pela osteoporose, e mais de 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e os Estados Unidos possuem risco de fraturas em torno de 15% (EGHBALI FATOURECHI et al. 2003; JEONG et al. 2005). Trinta por cento dos norte-americanos adultos são afligidos por dores articulares, inchaços e restrição de movimentos devido às desordens músculo - esqueléticas. No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), cerca de 15 milhões de brasileiros apresentavam-se propensos à osteoporose em 2000, sendo estimado que em 2020 esse número atinja 18 milhões de indivíduos.

Segundo YAMASHIRO et al. (2001), TANAKA et al (2002), o principal fator da osteoporose pós-menopausa humana é a diminuição dos níveis de estrogênio, acarretando aceleração da atividade de reabsorção, levando a uma perda óssea excessiva e sustentada, que resulta em um balanço negativo de cálcio na mandíbula, maxila e ossos longos.

Durante o período reprodutivo, o estrogênio predominante na circulação é o estradiol, hormônio sintetizado primariamente pelos ovários, que constitui 60% do estrogênio circulante nas mulheres na pré-menopausa e que, adicionalmente, pode ser secretado pela placenta ou ser convertido periféricamente em certos tecidos, como o adiposo (EGHBALI FATOURECHI et al. 2003; JEONG et al. 2005).

No climatério ou perimenopausa (meses ou anos próximos ao último ciclo menstrual), ocorre uma redução na produção de estrogênios e consequente inabilidade responsiva à gonadotropina, ao hormônio folículo-estimulante (FSH) e ao hormônio luteinizante (LH).

HENDRIX (2005) afirma que no período pós-menopausa os ovários continuam a produção de androgênios que são convertidos em estrogênios. Porém, MAELEY & MORTITZ (2003) e BUENO et al. (2004) mostram que a produção extra glandular do estrogênio se torna predominante, sendo que o principal estrogênio plasmático verificado nesse período é a estrona, hormônio mais fraco que o estradiol e que não demonstra alterações cíclicas em sua concentração.

As lesões perirradiculares constituem uma resposta inflamatória e imune contra patógenos bacterianos que infectam e destroem a polpa dental em consequência a formação de cáries dentárias e traumas. Este processo inflamatório resulta em destruição do osso alveolar ao redor do ápice dentário (FUMISHIGE *et al.* 2009).

Embora existam protocolos altamente eficazes à erradicação da doença de origem endodôntica, respostas diferentes à infecção podem ocorrer ao mesmo tipo de tratamento, quando estes apresentam fatores que, embora não sejam a causa, possam influenciar na susceptibilidade, desenvolvimento ou severidade da doença, principalmente por deficiências na resposta do sistema imunológico. Tal fato pode esclarecer o surgimento de sintomatologia dolorosa em casos assintomáticos, a cura tardia de algumas lesões, e explicar por que canais bem tratados podem resultar em fracasso. Os modificadores da doença com potencial de influenciar a lesão perirradicular incluem condições sistêmicas (diabetes e infecções virais), genética (polimorfismo genético), e hábitos adquiridos (fumo) (SIQUEIRA, 2011).

Os principais mecanismos biológicos responsáveis pelo ganho e perda óssea durante o crescimento normal e a vida adulta são os mesmos em seres humanos e ratos. Sabe-se também que ratos e humanos respondem similarmente à terapia

hormonal. Por isso, murinos são ideais para a avaliação do agente terapêutico para a prevenção da osteoporose (OLIVERA *et al.* 2003; FITTS *et al.* 2004)

Os resultados de BRASIL *et al.* (2016) demonstraram através de PCR alterações ósseas resultante de longo período de deficiência de estrogênio em ratas, influenciando na progressão de lesões perirradiculares.

Outros trabalhos demonstraram forte associação entre a osteoporose e a Lesão Perirradicular. Entretanto, a comparação entre os achados é dificultada pela diferença existente entre as metodologias (GILLES *et al.* 1997; LIU *et al.* 2012; LÓPEZ-LÓPEZ *et al.* 2015; BRASIL *et al.* 2016).

A osteoporose causada pela deficiência de estrogênio leva a um aumento da reabsorção óssea e a uma diminuição na possibilidade de reparo. É provável que esta condição exerça influência sobre a evolução das lesões perirradiculares, que são processos inflamatórios que resultam em destruição do osso alveolar ao redor do ápice dentário, podendo promover espessamento do ligamento periodontal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Deficiência de estrogênio e a osteoporose

Os hormônios sexuais têm importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea. Existem claras evidências que a diminuição ou ausência de estrogênio leva a progressiva redução da massa óssea. Assim, na menopausa precoce, pode-se observar acelerada perda óssea com instalação mais rápida da osteoporose (AIRES et al.,1991).

BANDEIRA et al. 2000, afirmam que a diminuição do estrogênio é o fator determinante e responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa, sendo a perda óssea mais intensa nos cinco anos seguintes. Por isso, essa condição é mais frequente e mais dramática nas mulheres, que chegam a perder cerca de 40%-50% da massa óssea até o final da vida.

Com a diminuição da secreção de estrogênio na menopausa ocorre maior atividade metabólica óssea, ou seja, maior ritmo na remodelação óssea. Segundo RUSSO et al., 2001, com a diminuição do estrogênio na menopausa, algumas mulheres perdem densidade mineral óssea de 1 a 5% ao ano, e em 5 anos perderam acima de 25%.

SILVA & JUDAS (2013) afirmam que o osteoclasto é uma das células mais especializadas do corpo humano, tendo como principal função a reabsorção óssea, através de um conjunto de enzimas, moléculas de adesão e mecanismos de reconhecimento, que permitem um equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo. Ele é fundamental na manutenção de uma massa e estrutura óssea adequada ao longo da vida, mas ao mesmo tempo está também envolvida em vários processos patológicos do esqueleto, nomeadamente a osteoporose, a Doença de Paget e as metástases ósseas.

Os osteoclastos produzem várias enzimas que promovem a reabsorção do osso, mas a principal é a fosfatase ácida. Estas enzimas são capazes de remover o cálcio e fósforo inorgânico a partir do tecido ósseo, decompor materiais orgânicos, tais como o colágeno (que constitui o próprio osso). Quando um osteoclasto digere o tecido ósseo, ele veda-se acima de um entalhe no osso. Isto cria uma região conhecida como um poço de reabsorção abaixo da célula.

O processo de remodelação ocorre em pequenos conjuntos de células chamadas de unidades multicelulares básicas de remodelação óssea (BMU), sendo caracterizado pelo acoplamento das funções dos osteoclastos e osteoblastos (BORELLI, 1994). O sinal que inicia a remodelação não está completamente identificado, mas é evidente que forças mecânicas podem ser capazes de alterar a arquitetura óssea local (TURNER & ROBLING, 2004).

O primeiro estágio da remodelação envolve o recrutamento das células precursoras de osteoclasto para o osso. Essas, presentes em tecidos hematopoéticos, como na medula óssea, respondem a sinais físicos e hormonais, e, concentrando sobre determinada região da superfície óssea que será reabsorvida, fundem-se e transformam-se em osteoclastos multinucleados (KOBAYASHI & KRONENBERG, 2005).

A diferenciação das células progenitoras em osteoclastos ocorre por meio de um mecanismo que envolve a interação célula a célula com células osteoblásticas (SUDA, 1997). Para MEIKLE, (1992), após a diferenciação, a superfície óssea é preparada com a remoção da camada de osteóide não-mineralizado pelos osteoblastos de revestimento que produzem enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases, collagenases e gelatinases. Esse processo facilita o acesso dos osteoclastos ao osso subjacente. Já YASUDA (1998) afirma que os mecanismos de recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoclastos não são totalmente conhecidos. Novas descobertas têm contribuído para uma melhor compreensão destes mecanismos e de sua sequência de eventos. A osteoprotegerina (OPG), uma proteína homóloga aos membros da superfamília de receptores do TNF, que atua como um inibidor solúvel da maturação e ativação dos osteoclastos.

A regulação do remodelamento ósseo ocorre por meio de fatores locais e sistêmicos, que atuam sobre a replicação de células indiferenciadas, recrutamento e a função das células ósseas. Entre os fatores locais, o sistema osteoprotegerina (OPG) /receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANK)/ ligante de RANK (RANKL), indica que o processo de reabsorção e formação são acoplados. A interação entre RANK e RANKL é a via mais conhecida na diferenciação e ativação osteoclástica. O RANK promove a maturação osteoclástica por meio do aumento da expressão de genes específicos, incluindo o fator de transcrição c-Fos. Hormônios da tireóide e estrógeno influenciam diretamente o metabolismo ósseo. O T3 aumenta a expressão do RANKL em células pré-osteoblásticas, ativando a osteoclastogênese. Níveis adequados de

estrógeno no organismo garantem a supressão de citocinas que induzem a proliferação e a diferenciação de osteoclastos. (NOGUEIRA, 2012)

LIANZA (1982), AIRES (1991) mostram que a perda de hormônios, principalmente do estrogênio, causa a perda de massa óssea, pois, esse hormônio estimula os osteoblastos, inibe os osteoclastos e aumenta os níveis de paratormônio (PTH), levando à descalcificação dos ossos e eliminação do excesso de cálcio através da urina.

Pacientes submetidas a ovariectomia também vivenciam alteração no metabolismo ósseo, porém de manifestação aguda, acarretando uma maior atividade de reabsorção óssea quando comparada à atividade neo-formadora, o que resulta em uma diminuição da densidade mineral inicial maior que em pacientes em menopausa fisiológica (WHITE et al. 2002).

De acordo com BERNICK (1963), WEINSTEIN (2000), o estrogênio é um hormônio esteróide que inibe a reabsorção óssea, e que inicialmente, desenvolve um quadro de osteopenia e, em seguida, a osteoporose.

KAWAMOTO & NAGAOKA (2000) avaliaram influência da deficiência de estrogênio na reparação óssea alveolar, observando ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que as alterações ósseas alveolares induzidas por oclusão traumática foram agravadas pelos baixos níveis de estrogênio. Eles verificaram que a dinâmica óssea alveolar induzida pelo trauma oclusal foi aumentada pela deficiência de estrogênio consequente à remoção dos ovários.

CAO et al (2001) avaliaram a densidade mineral óssea trabecular e cortical do rebordo edêntulo de coelhas submetidas a ovariectomia através de tomografias computadorizadas, objetivando avaliar a associação entre perda da função ovariana e as mudanças na densidade mineral óssea mandibular. Os autores concluíram que há uma associação entre perda da função ovariana e redução da massa óssea mandibular, especialmente no osso trabecular.

Em estudo experimental, ORRICO et al. (2007) verificaram que o período de indução da ovariectomia em ratas influencia tanto a densidade óssea femoral quanto a perda óssea vertical em molares com doença periodontal induzida por ligaduras, sendo todos grupos expostos ao mesmo período de indução da doença.

WACTAWSKI-WENDE et al. (2005) investigaram a associação entre osteoporose e altura da crista óssea alveolar em estudo realizado com pacientes no

período pós-menopausa. Os autores verificaram uma forte associação entre essas variáveis. Outro estudo que também avaliou a inter-relação entre osteoporose e perda óssea foi o de TEZAL et al. (2000). Foram examinadas 70 mulheres na pós-menopausa (51 a 78 anos), verificando a densidade mineral dos ossos da coluna lombar e do fêmur com o uso de absorciometria de raio-x de dupla energia. Como resultados, os autores demonstraram que a perda óssea mineral do esqueleto estava substancialmente relacionada a osteoporose causada pela pós-menopausa.

MEALEY & MORITZ (2003) em seus estudos, chegaram a concluir que baixos níveis de estrogênio alteram o metabolismo do colágeno, incluindo a manutenção óssea, o que pode exercer uma tendência ao desenvolvimento da osteoporose.

Para MANOLAGAS (2000), a deficiência de estrogênio promove perda de massa óssea em decorrência do desequilíbrio da remodelação óssea, a qual determina maior reabsorção em relação à neoformação óssea, e FRIBERG et al. (2001), afirmam que os efeitos da osteoporose são maiores nos ossos longos, como o fêmur, ou nos ossos da coluna.

ORWOLL (2000) reafirma que em mulheres durante e imediatamente após a menopausa, a taxa de perda óssea se acelera devido à deficiência de estrogênio. A diminuição acelerada da massa óssea, após a última menstruação, pode ser até 10 vezes maior do que a observada no período de pré-menopausa, sendo que nos primeiros 5 a 10 anos que seguem a última menstruação essa perda pode ser de 2% a 4% ao ano para osso trabecular e de 1% ao ano para osso cortical.

BONNELLYE et al. (2002) estudaram ratas após ovariectomia e sugeriram que o ERR (Estrogen Receptor-Related) é importante não só em osteoblastos mas também em osteoclastos e no desenvolvimento de adipócitos. O ERR pode ter uma função em deficiência de estrogênio / osteoporose pós-menopausa por meio de ações em todos os três tipos de células. Com base em nossos dados, a diminuição de ERR no modelo de rato ovariectomizado de osteoporose pós-menopausa pode participar na regulação do decréscimo da formação de osso e no aumento da reabsorção óssea também em humanos na osteoporose pós-menopausa. Portanto, o bloqueio da diminuição de ERR observado após ovariectomia com deficiência de estrogênio ou o uso apropriado de agonistas e antagonistas de ERR apresenta uma nova abordagem terapêutica para perturbações osteopênicas, tais como a osteoporose.

## **2.2 Efeito de outros mediadores na fisiopatologia da osteoporose**

A visão revisionista proposta por Manolagas (2000), que indica que a perda óssea relacionada com a idade é independente da deficiência de estrogênios e é impulsionada não por fatores relacionados com a idade de células-autônoma, podem ser em grande parte correta para o osso trabecular. Na verdade, a causa de perda de osso trabecular antecedeu o início da deficiência de esteróides sexuais em ambos os sexos, devido a processos independente de mais estrogênio, ou seja, o osso trabecular pode exigir níveis mais elevados para a sua regulação. No entanto, para o osso cortical, (compreende mais de 80% do esqueleto e que é o principal contribuinte para o risco de fraturas), os dados ainda apoiam a visão de que a deficiência de estrogênio é a principal causa de perda óssea pós-menopausa em mulheres e perda óssea relacionada com a idade em ambos os sexos. Porém, com base em inúmeros estudos previamente citados, os processos de envelhecimento contribuem para a perda óssea no osso trabecular e cortical. Além disso, uma série de fatores secundários (por exemplo, deficiência de vitamina D) também tem um impacto sobre a perda óssea subjacente com o envelhecimento em cada indivíduo. De forma sucinta e à luz de novos dados mecanicistas de investigação e básicos clínicos, modificações no modelo original tem sido propostas. O modelo unitário (que continua a enfatizar o papel central de estrogênio), e o modelo revisionista (que enfatiza a dependência do envelhecimento para alterações em células ósseas), são complementares e cada um é mais apropriado em lugares específicos no esqueleto.

FINKELSTEIN et al. (2008) e RIGGS et al. (2008) afirmam que a perda óssea começa antes da menopausa e tal afirmativa é suportada por resultados de outros estudos recentes. A perda de osso parece ocorrer no osso trabecular interior, em vez do córtex exterior. MARTIN & GADDY (2006), acrescentam que desde que apenas a perda de estrogênio não pode explicar as mudanças, o interesse centrou-se sobre outros hormônios cujos níveis mudam em menopausa precoce. Hormônios que tenham sido previamente pensadas para regular a única função reprodutiva, tal como a hormona folículo-estimulante e as activinas e inibinas, agora têm sido associados a efeitos diretos importantes sobre a densidade óssea e podem ser responsáveis por esta perda precoce. COOPER (2002) finaliza dizendo que um aumento progressivo na sensibilidade de osso para glicocorticóides endógenos tem sido proposta como uma causa da perda óssea relacionada com a idade.

Realizaram um estudo transversal com 368 mulheres adultas saudáveis, com idade entre 35 e 60 anos foi realizado por XI-YUWU et al. (2013). Foram medidos a densidade mineral óssea, e calculadas as taxas de diminuição da DMO e avaliados os níveis séricos de hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e estradiol. Após estas análises, os autores concluíram que, em mulheres chinesas, a diminuição da densidade mineral óssea durante a menopausa está associada a FSH e LH níveis, em vez de estradiol.

SAIF-ABDUL et al. (2012) verificaram a ação de delta-tocotrienol em combinação de lovastatina sobre os parâmetros bioquímicos e de histomorfometria óssea estáticos em um modelo de rato pós-menopausa. Foram utilizadas 48 ratas aleatoriamente divididas em 6 grupos: controle de controle operado por simulação, controle ovariectomizados, ovariectomizados e 11 mg/kg de lovastatina, ovariectomizados e 60 mg/kg de deltatocotrienol, ovariectomizados e 60 mg/kg de delta-tocotrienol + 11 mg / kg de lovastatina. Estes tratamentos foram realizados diariamente via sonda oral durante 8 semanas. A associação de delta-tocotrienol com a lovastatina demonstrou um aumento significativo da formação e reabsorção ósseas reduzida em comparação com os outros grupos. Portanto, o tratamento combinado, sinérgico ou aditivo, tem o potencial para ser usado como um agente antiosteoporótico em pacientes que estão em risco de osteoporose e hipercolesterolemia, especialmente em mulheres na pós-menopausa.

CRANNEI et al. (2006) concluíram que nos pacientes com osteoporose grave, o hormônio paratiróide humano reduz o risco de novas fraturas vertebrais e não vertebrais nas mulheres na pós-menopausa com fraturas anteriores e aumenta a densidade mineral óssea da espinha lombar e colo do fêmur, demonstrados através de ensaios clínicos durante um ano em 9 mulheres na pós menopausa e com osteoporose, e 3 homens com osteoporose.

DEQUEKER et al. (2012) avaliaram a relação da IL-17 com a osteoporose. Inspirados nos estudos de ADAMOPOULOS et al (2010) ratas foram submetidas a ovariectomia, e após 4 semana de deficiência de estrogênio, o grupo de ratas demonstrou diminuição substancial no osso trabecular; enquanto os que não possuíam IL-17 foram totalmente protegidos. Estes dados sugerem que a IL-17 média a perda óssea induzida por ovariectomia e a redução de IL-17 protege contra a osteoporose pós-menopausa. Para confirmação do estudo, foi aplicado um

anti-IL-17 em ratas com ovariectomia ou operação simulada. Em 2 semanas, o osso trabecular foi significativamente diminuído nas ratas de controle, enquanto que as ratas que receberam, anti-IL-17 não demonstraram nenhuma alteração. As diferenças chegaram a 40% em 4 semanas, enquanto nos animais controle, foi completamente abolida pelo anticorpo. Portanto, foi estabelecido que o IL-17 media a osteoporose com deficiência de estrogênio.

TYAGI et al. (2012) estudaram que as células Th17 produzem IL-17, e este promove perda óssea na artrite induzida por colágeno em camundongos. Quando se bloqueia a ação da IL-17, os sintomas da doença são reduzidos. Estas observações sugerem que as células Th17 podem estar envolvidas na patogênese da perda óssea. Estes achados indicam que a deficiência de estrogênio leva ao aumento da diferenciação de células Th17 com a regulação de STAT3, ROR- $\gamma$ t e ROR- $\alpha$  e a desregulação de Foxp3, faz a diferenciação de células Th17. Como o aumento da produção de IL-17, por sua vez, induz perda óssea pelo aumento de citocinas pró-osteoclastogênicas, incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6 e RANKL de osteoblastos, e que o bloqueio funcional de IL-17 pode prevenir a perda óssea.

### **2.3 Osteoporose e a reabsorção perirradicular**

De acordo com RODAN (2000), a maioria das doenças do esqueleto adulto ocorrem devido à excessiva atividade osteoclástica, levando a um desequilíbrio na remodelação do osso, o que favorece a reabsorção. Tais doenças incluem a osteoporose, a doença periodontal, a artrite reumatóide, o mieloma múltiplo e câncros metastáticos.

A lesão perirradicular se caracteriza pela desordem inflamatória dos tecidos perirradiculares causada por agentes etiológicos de origem endodôntica, cuja progressão resulta na reabsorção do osso perirradicular. Sendo assim, no processo de reabsorção, as principais células envolvidas são os osteoclastos, que degradam a matriz óssea resultando na lesão óssea perirradicular (BOYLE, 2003; YAO et al; 2005).

PILOTO et al. (2017) afirmam que as lesões perirradiculares são uma ocorrência comum em endodontia, podendo ser sintomáticas ou não, causando grandes reabsorções ósseas quando se tornam extensas. Elas podem ser tratadas

cirurgicamente (tratamento endodôntico seguido de apicectomia), ou apenas com o tratamento endodôntico.

ARMADA et al. (2006) afirmaram que os efeitos da deficiência de esteroides sexuais causados pela castração são distintos entre ratos machos e fêmeas em longo prazo, com alterações ósseas mais acentuadas nas mulheres. As fêmeas ovariectomizadas tiveram um aumento no peso corporal, remodelação óssea oral resultante da falta de esteroides sexuais (após 30 dias), sendo mais evidente depois de 60 e 90 dias de castração. O mesmo ocorre com espessura do ligamento periodontal com a idade e o tempo de ovariectomia. Conclui-se que a falta de hormônios esteroides sexuais e a idade das fêmeas são prejudiciais para a saúde óssea.

Entre outros fatores, os estrógenos e andrógenos são necessários para assegurar o normal esqueleto o crescimento, maturação e rotatividade. Os receptores de estrogênio (EEI e / ou ERb) estão presentes em osteoblastos, e estrogênio e androgênio retirada aumento da reabsorção óssea, através de um aumento na síntese e sensibilidade de citocinas locais, como as interleucinas 1 e 6, TNF e prostaglandinas. Apesar de receptores androgênicos foram identificados na cultura de osteoblastos, aceita-se que o estrogênio é essencial para o desenvolvimento do esqueleto nos machos. A perda de massa óssea observada após ovariectomia ou orquiectomia, mostra a importância de hormônios esteroides sexuais na gênese da osteoporose. Osteoblastos e osteoclastos são dois tipos de células que formam o tecido ósseo, cada um com funções específicas. Os primeiros são responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea e localizam-se na superfície do osso. Já os osteoclastos permitem a remodelação óssea (BOYLE, 2003).

Recentes evidências têm sugerido que o osteoclasto é uma célula secretora que produz fatores que podem estimular sua própria formação e atividade. Estudos demonstraram que células osteoclásticas, formadas em cultura de células medulares de pacientes com doença de Paget, produzem IL-6 capaz de estimular a formação de osteoclastos e reabsorção óssea (AMADEI, 2006).

Finalizando, podemos afirmar que quando os osteoclastos são regulados por hormônios, a taxa de reabsorção do osso pode se apresentar menor que a síntese.

### 3. JUSTIFICATIVA

As alterações no metabolismo ósseo características da osteoporose, levam a um aumento da reabsorção óssea e a uma diminuição na possibilidade de reparo. É provável que esta condição exerça influência sobre a evolução das lesões perirradiculares, que são processos inflamatórios que resultam em destruição do osso alveolar ao redor do ápice dentário, podendo demonstrar a nível histológico, espessamento do ligamento periodontal e predominância de células osteoclásticas. Entender os mecanismos biológicos e contribuir para melhorar o tratamento de pacientes com osteoporose.

#### **4. HIPÓTESE**

O estado de hipoestrogenismo, acelera a reabsorção óssea, levando a osteoporose.

Considerando a fisiopatologia da infecção endodôntica, espera-se verificar aumento no espessamento do ligamento periodontal de ratas com lesões perirradiculares portadoras de osteoporose.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar a morfologia perirradicular de ratas portadoras de osteoporose, com lesão perirradicular.

### **5.2 Objetivos específicos**

-Identificar possíveis alterações morfológicas de primeiros molares inferiores com lesões perirradiculares por microscopia óptica.

- Quantificar através de Morfometria a espessura do ligamento periodontal.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

O projeto de pesquisa está de acordo com Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e obteve aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa Animal da UFF (CEPA), sob o número de protocolo 00134/09.

### **6.1 Seleção da Amostra**

Para realização deste estudo foram utilizadas ratas adultas (n= 24), da linhagem Wistar, isogênicas e virgens, com 3 meses de idade, mantidas em gaiolas, com temperatura ambiente controlada (25 a 27°C), umidade constante e ciclo claro/escuro de 12 horas (6:00h às 18:00h), recebendo água e ração (Nuvilab, Sogorb Indústria e Comércio LTDA, SP, Brasil) fornecidas ad libitum. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de Fisiofarmacologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF).

### **6.2 Determinação das Fases do Ciclo Estral**

Coletas diárias de esfregaço vaginal foram realizadas entre 9:00 e 10:00 horas por um período de quinze dias, com a finalidade de selecionar os animais que apresentavam ciclo estral regular. A coleta do fluido vaginal foi realizada com auxílio de ponteira plástica contendo solução de cloreto de sódio a 0.9%, que foi depositado em lâminas de vidro e analisado a fresco em microscópio óptico (Leica DM500, Heerbrugg, Suécia) com objetiva de 10x e classificadas de acordo com as proporções dos tipos celulares encontrados em cada fase do ciclo estral (MARCONDES, 2002).

### **6.3 Castração**

Após esta etapa de avaliação e seleção da amostra, metade das ratas foi submetida à remoção bilateral dos ovários (ovariectomia), sob anestesia com Tiopental (Thiopentax, Cristália, São Paulo, Brasil) (0,1ml /100 g peso corporal), enquanto as ratas restantes, grupo controle, sofreram apenas estresse cirúrgico (pseudo-operadas).

#### 6.4 Desenvolvimento de Lesão Perirradicular

Noventa dias após a cirurgia, todos os animais foram anestesiados com Tiopental (0,1ml /100g peso corporal), e o esmalte e a dentina dos primeiros molares inferiores esquerdos foram desgastados com broca carbide esférica de ½ (KG Sorensen, São Paulo, Brasil) com motor de baixa rotação (Dentec, CS 421, Brasil). A abertura foi realizada na fóssula mesial da superfície oclusal até a exposição pulpar.

Desta forma, 4 grupos experimentais foram formados:

Grupo Controle com lesão de 21 dias (C 21 dias): n=6

Grupo Ovariectomizado com lesão de 21 dias (OVX 21 dias): n=6

Grupo Controle com lesão de 40 dias (C 40 dias): n=6

Grupo Ovariectomizado com lesão de 40 dias (OVX 40 dias): n=6

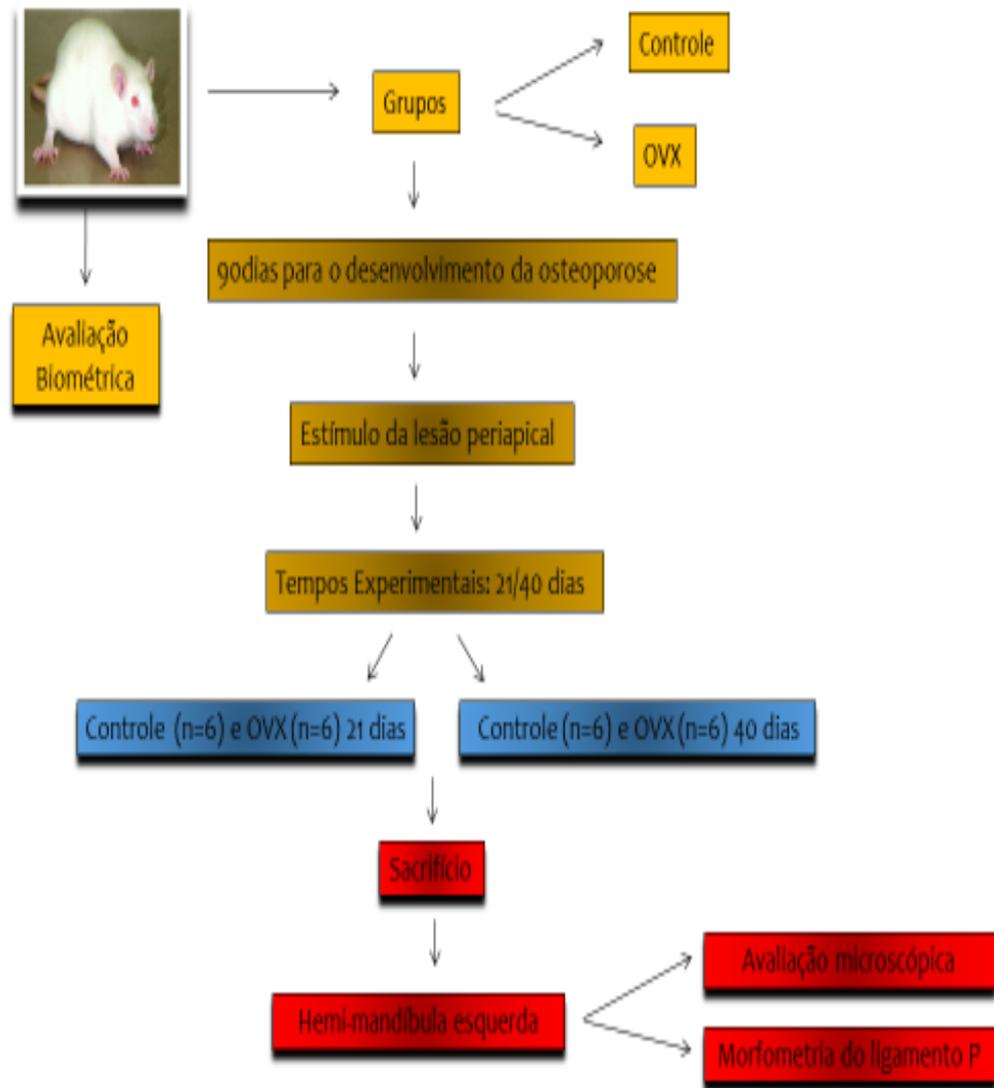
Ao final de cada período experimental (21 e 40 dias após desenvolvimento da lesão), os animais foram sacrificados por exsanguinação, sob anestesia com Tiopental (0,2 ml/100 g peso corporal), e as hemi-mandíbulas esquerdas foram removidas.

#### 6.5 Microscopia Óptica

Após a remoção, as hemi-mandíbulas esquerdas foram colocadas em fixador (Bouin alcoólico) por 24 horas na geladeira (3-10°C), e em seguida, foram imersas em solução descalcificante FAS (ácido acético a 10%, NaCl a 0,85% e solução de formalina a 10%), por cerca de 30 dias em temperatura ambiente. Terminado o período de descalcificação as peças foram incluídas em parafina e os cortes seriados de 6µm, no sentido méso-distal, e foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). (Beçak & Paulete, 1976; Lillie & Fullmei, 1976) e observados ao Microscópio Óptico (marca Leica, modelo DMRBE).

#### 6.6 Morfometria do ligamento periodontal

Uma análise morfométrica do ligamento periodontal foi realizada com imagens de cortes mandibulares corados com hematoxilina eosina, utilizando sistema de vídeo microscópio (model DMRBE, sony vídeo câmera; Leica). A espessura do ligamento periodontal foi determinada pela distância entre a região apical e o osso alveolar adjacente através do programa do *software* Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).



## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise comparativa dos dados obtidos foi realizada através de testes não paramétricos *Kruskal-Wallis* e *Dunn's Multiple Comparison* utilizando o programa *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, Inc, California, USA). A significância estatística considerada foi de  $p < 0.05$ .

## 8. RESULTADOS

No grupo das ratas ovariectomizadas, a superfície óssea mostrou-se com algumas irregularidades associadas à maior presença de osteoclastos, os quais apresentaram citoplasma amplo e vários núcleos.

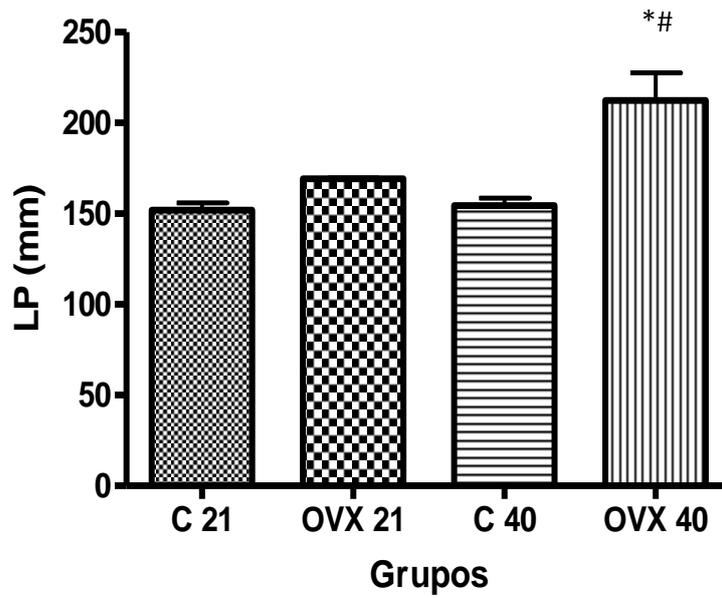
Os valores numéricos das médias da espessura do ligamento periodontal podem ser observados na Tabela 1. Os grupos OVX demonstraram maior espessura do ligamento periodontal quando comparados aos grupos C. Porém, esta diferença foi estatisticamente significativa nas comparações C40 x OVX40 (Figura 1). Imagens obtidas através de microscopia óptica podem ser observadas na Figura 2.

**Tabela 1:** Espessura do ligamento periodontal.

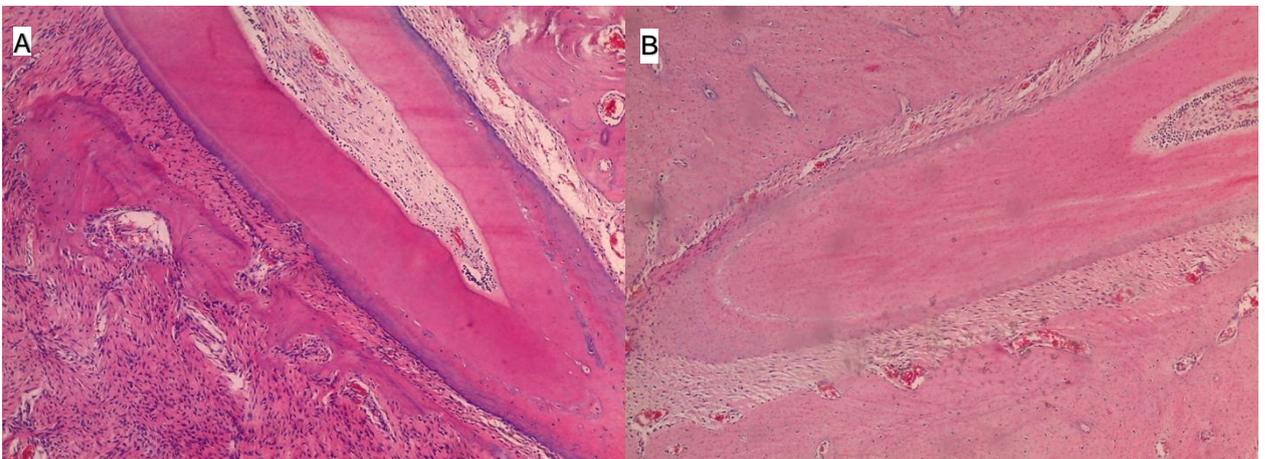
Grupos	Média	Desvio Padrão
C 21	151.9	9.0
OVX 21	169.2	1.2
C 40	154.5	9.4
OVX 40	212.3	33.8

Os resultados são expressos por média e desvio padrão. C: controle de 21, 40 dias e OVX: ovariectomizadas de 21, 40 dias. Teste *Kruskal-Wallis*  $p < 0,0083$  (valor ajustado pelo teste de Múltipla Comparação de *Dunn*).

**Figura 1.** Análise comparativa da espessura do ligamento periodontal entre os grupos. C: controle, OVX: ovariectomizadas. Teste *Kruskal-Wallis* \*C 21 vs OVX 40  $p < 0,01$  e #C40 vs OVX 40  $p < 0,01$  (valor ajustado pelo teste de Múltipla Comparação de *Dunn*).



**Figura 2:** Cortes histológicos corados com HE de fêmeas ovariectomizadas.



## 9. DISCUSSÃO

A osteoporose compromete a resistência e da qualidade ósseas, com deterioração da sua microarquitetura. Este comprometimento pode estar associado ao aumento das lesões perirradiculares, considerando que a qualidade e a quantidade do osso podem ser afetadas com o curso da doença.

Nossos resultados demonstraram que a reabsorção óssea perirradicular induzida pela exposição pulpar foi observada em todos os grupos experimentais. No entanto, o grupo submetido a osteoporose por longo período de tempo demonstrou alterações morfológicas no osso alveolar com espessamento do ligamento periodontal significativo quando comparados ao grupo de C40 dias. Em estudo experimental, ORRICO et al. (2007) verificaram que o período de indução da ovariectomia em ratas influencia tanto a densidade óssea femoral quanto a perda óssea vertical em molares com doença periodontal induzida por ligaduras, sendo todos grupos expostos ao mesmo período de indução da doença periodontal (51 e 150 dias).

Brasil et al. (2016) verificaram que longo período de deficiência de estrogênio pode influenciar a progressão da periodontite apical após 40 dias de indução da lesão, esses resultados estão de acordo com nosso estudo, e com estudos prévios que também constataram aumento das lesões de periodontite apical em ratas OVX (Gilles et al. 1997, Xiong et al. 2007, Liu et al. 2010).

ARMADA, et al. (2006) perceberam que os efeitos da deficiência de esteroides sexuais, causados pela castração são distintos entre ratos machos e fêmeas, ao longo prazo, com alterações ósseas mais acentuadas nas fêmeas. As fêmeas ovariectomizadas tiveram um aumento no peso corporal, remodelação óssea oral resultante da falta de esteroides sexuais (após 30 dias), sendo mais evidente depois de 60 e 90 dias de castração. O mesmo ocorre com o ligamento periodontal e espessura do osso alveolar, que aumenta com a idade e o tempo de ovariectomia. Concluiu-se que a falta de hormônios esteroides sexuais e a idade das fêmeas, mas não dos machos, são prejudiciais para a saúde óssea, a análise radiográfica revelou que as lesões de periodontite apical em animais OVX foram significativamente maiores em comparação aqueles de grupo controle, esse trabalho está de acordo com o presente estudo onde foi observado espessamento do ligamento periodontal

significativamente maior em OVX em relação ao grupo C em ratas de 40 dias. C21 vs OVX40  $p < 0,01$  e C40 vs OVX40  $p < 0,01$ .

## 10. CONCLUSÃO

A redução dos níveis de estrogênio causados pela castração de ratas demonstrou promover aumento significativo no espessamento do ligamento periodontal dos animais expostos a osteoporose por maior período de tempo. Estes resultados sugerem que alterações ósseas como resultado de longo período de deficiência estrogênica podem influenciar na progressão de lesões perirradiculares.

A perda óssea oral oriunda da osteoporose é um grande problema para os dentistas. A quantidade e qualidade do osso mandibular é importante principalmente para profissionais no planejamento de tratamento protético, implantes e tratamento endodôntico.

O conhecimento das doenças e a anamnese criteriosa se mostra fundamental para o correto atendimento desses pacientes, ajuda o dentista a aconselhar os pacientes sobre os riscos de perda óssea sistêmica e oral.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOPOULOS, IE, et al. ***A interleucina-17A upregulates activador de receptor de NF-kappaB em precursores de osteoclastos.*** Arthritis Res Ther. 2010; 12: R29.
- AIRES, M. M. et al. ***Fisiologia.*** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 795p.
- AMADEI, S. U. et al. ***A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea*** • J Bras Patol Med Lab, v. 42, n. 1, p. 5-12: fevereiro 2006.
- ARMANDA, Et al. ***Mandible analysis in sex steroid-deficient rats.*** Department of Physiological Sciences, IBRAG; University of Rio de Janeiro State; University Estácio de Sá. Rio de Janeiro, 2006.
- BANDEIRA, F. et al. ***Osteoporose.*** 1 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 390p.
- BERNICK, S; ERSHOFF, BH. ***Histochemical study of bone in estrogen-treated rats.*** J Dent Res.1963;42:981-9.
- BONNELYE, Edith, et al. ***Estrogen Receptor-Related Receptor e Impinges on the Estrogen Axis in Bone: Potential Function in Osteoporosis*** 2002.
- BORELLI, A. ***Envelhecimento ósseo: osteoporose.*** In: CARVALHO FILHO, E. T.; PAPALÉO NETTO, M. Geriatria: fundamentos, clínica e terapêutica. São Paulo: Atheneu, 1994. cap.22, p. 297-308.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. ***Osteoclast differentiation and activation.*** Nature. 2003;423:337-42.
- BUENO, JGR. ***Considerações médicas sobre climatério e menopausa.*** In: Brunetti MC, organizadora. Periodontia médica: uma abordagem integrada. São Paulo: Senac; 2004. p. 251-71.
- CAO, T,et al. ***Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits.*** Clin Oral Implants Res. 2001; 12(6): 604-8.
- COOPER, MS, et al. ***Osteoblastic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity increases with age and glucocorticoid exposure.*** J Bone Miner Res 2002;17:979-86.

CRANNEY, A, et al. **Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review.** CMAJ. 2006;175:52-9.

DEQUEKER, J; Et al. **Fracture and osteoporosis in a XIIIth Dynasty female skeleton from Lisht, upper Egypt.** J Bone Miner Res 12: 881-888, 1997.

EGHBALI-FATOURECHI, G, et al. **Role of RA K ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women.** J Clin Invest. 2003; 111(8): 1221-30.

FINKELSTEIN, JS, et al. **Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women.** J Clin Endocrinol Metab 2008;93:861-8.

Fitts JM, Klein RM, Powers CA. (2004). **Comparison of tamoxifen and testosterone propionate in male rats: differential prevention of orchidectomy effects on sex organs, Bone Mass, Growth, and the Growth Hormone–IGF-I Axis.** Journal of Andrology 25.

FRIBERG, B, et al. **Branemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study.** Clin Implant Dent Relat Res. 2001;3:50-6.

Fumishige O, Toshiro Y, Yuki A, Narisato K, Yoichiro I, Jiro I, Masakazu K (2009). **IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions.** Microbiol Immunol 53: 287 - 294.

Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF (1997). **Oral bone loss is increased in ovariectomized rats.** J Endod 23: 419-422.

HENDRIX, SL. **Bilateral oophorectomy and premature menopause.** Am J Med. 2005; 118 Suppl 12B: 131-5.

KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. **The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion.** J Oral Rehabil, v. 27, n. 7, p. 587-94, 2000.

KOBAYASHI, T.; KRONENBERG, h. **Minireview transcriptional regulation in development bone.** Endocrinology, v. 146, n. 3, p. 1012-7, 2005.

KURODA, S, et al. **Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyse using dual energy x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography.** Oral Dis 2003; 9: 24-28.

LIANZA, S. **Medicina de Reabilitação. Osteoporose**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 15.

Liu L, Zhang C, Hu Y, Peng B (2012). **Protective effect of metformin on periapical lesions in rats by decreasing the ratio of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin**. J Endod 38: 943-947.

Lopez-Lopez J, Castellanos-Cosano L, Estrugo-Devesa A, Gomez-Vaquero C, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ (2015). **Radiolucent periapical lesions and bone mineral density in post-menopausal women**. Gerodontology 32:195–201.

MANOLAGAS, SC. **Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and Implications or the pathogenesis and treatment of osteoporosis**. Endocr Rev. 2000;21:115-37.

MANOLAGAS, SC. **From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis**. Endocr Rev. 2010;31:266–300.

MARCONDES, et al. **Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations** 2002.

MARTIN, TJ; GADDY, D. **Bone loss goes beyond estrogen**. Nat Med 2006;12:612-3.

MEALEY, BL; MORITZ, AJ. **Hormonal influences: effects of diabetes mellitus and endogenous female sex steroid hormones on the periodontium**. Periodontol 2000. 2003; 32: 59-81.

MEIKLE, M. C. et al **Human osteoblasts in cultures synthesize collagen and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines**. J Cell Sci, v. 103, p. 1093-9, 1992.

NOGUEIRA, Célia Regina. **Avaliação da via de ativação osteoclástica RANKL em osteoblastos humanos derivados de tecido adiposo**. São Paulo: Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista, 2012.

Olivera, MI, Bozzini C, Meta IF, Bozzini CE & Alippi RM. (2003). **The development of bone mass and bone strength in the mandible of the female rat**. Growth Dev Aging 67: 85-93.

ORRICO, SR, et al. **Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on induced periodontal disease**. J Periodontol. 2007 Jan;78(1): 164-9.

ORWOLL, E. *Perspective - Assessing Bone Density in Men*. J Bone Miner Res 15: 1867-1870, 2000.

PILOTO, Cleane Silva; SILVA, Wilker de Oliveira; MACHDO, Manoel Eduardo de Lima; PAULO, Anderson de Oliveira. **Tratamento Endodôntico de Lesão Periapical Extensa – Relato de Caso**. Associação Brasileira de Cirurgiões Dentistas- Distrito Federal; Faculdade de Odontologia de São Paulo; Faculdade de Ciências do Tocantins, 2017.

RIGGS, BL; KHOSLA, S; MELTON, LJ III. **A unitary for involuntional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and typ II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to boné loss in aging men**. J BoneMiner Res. 1998;13:763–773.

RIGGS, BL; KHOSLA, S; MELTON, LJ. **Sex steroids and the construction and conservation ofthe adult skeleton**. Endocr Rev. 2002;23:279–302.

RIGGS, BL; MELTON, LJ III. **Evidence for twodistinct syndromes of involuntional osteoporosis**. Am J Med. 1983;75:899–901.

RIGGS, BL; MELTON; LJI, ROBB, RA. **A population-based assessment of rates of boné lossat multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adultwomen and men**. J Bone Miner Res. 2008;23:205–214.

RODAN, GA & Martin, TJ **Abordagens terapêuticas para doenças ósseas**. Ciência 289, 1508-1514 (2000).

Russo LAT. **Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas**. Arq. bras. endocrinol. metab. 2001;45(4):401-6.

SAIFABDUL, Majeed, et al. **Effects of Tocotrienoland Lovastatin Combination on Osteoblast andOsteoclast Activityin Estrogen-DeficientOsteoporosis**. 2012.

SILVA, Patrícia; JUDAS, Fernando. **O Papel do Osteoclasto na Fisiopatologia de Doenças do Aparelho Locomotor e na Condição de Alvo Terapêutico**. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2013.

STUERMER, EK, et al. **Estrogen and raloxifeneimprove metaphyseal racture healing in the earlyphase of osteoporosis. A new fracture-healingmodel at the tibia in rat**. 2008.

SUDA, T. et al. **Regulation of osteoclast function**. J Bone Miner Res, v. 12, n. 6, p. 869-79, 1997.

TEZAL, M, et al. ***The relationship between boneminerall densit and periodontitis in postmenopausal women.*** J Periodontol. 2000; 71(9): 1492-8.

TURNER, C. h.; ROBLING, ***Mechanical loadingand boné formation Bonekey-Osteovision,*** v. 1, n. 9, p. 15-23, 2004.

A.

WACTAWSKI-WENDE, J, et al. ***The associationbetween osteoporosis and alveolar crestal heightin postmenopausal women.*** J Periodontol. 2005; 76(11 Suppl): 2116-24.

WEINSTEIN, RS; MANOLAGAS, SC. ***Apoptosisand osteoporosis.*** Am J Med. 2000;108:153-64.

WHITE, SC. ***Oral radiographic predictors ofosteoporosis. Dentomaxillofac Radiol.*** 2002; 31(2): 84-92.

XI-YUWU,Shan-JiangYu, et al. ***Early boné mineral density decrease is associated with FSH and LH, not estrogen.*** 2013.

YAMASHIRO, T; TAKANO-YANANOTO, T.***Influences Of ovariectomy on experimental toothmovement in the rat.*** J Dent Res. 2001; 80(9): 185861.

Yao GQ, tokawa T, Paliwal I, Insogna K. ***CSF-1 induces for gene transcription and activates thetranscription fator Elk-1 in mature osteoclasts.*** Calcif Tissu Int. 2005;76:371-8.

YASUDA, et al. ***Osteoclast differentiation fator isa ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory fator and is identical to TRANCE/RANKL.*** Proc Natl Acad Sci USA, 95:3597, 1998.

## ANEXO



Serviço Público Federal  
Universidade Federal Fluminense  
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto n° 302, intitulado "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA OSTEOPOROSE SOBRE LESÕES PERIRRADICULARES DE RATAS" sob a orientação da Prof. Drª Rachel Moreira Moraes dos Santos do Instituto Biomédico está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal da SBCAL e obteve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em 13 de dezembro de 2012.

Niterói, 13 de dezembro de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da C.E.U.A.