



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

IRACEMA MATOS DE MELO

**EFEITOS DO TAMOXIFENO E DO ANASTROZOL NA PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

**FORTALEZA
2017**

IRACEMA MATOS DE MELO

**EFEITOS DO TAMOXIFENO E DO ANASTROZOL NA PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vilma de Lima.

FORTALEZA
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M485e Melo, Iracema Matos.

Efeitos do tamoxifeno e do anastrozol na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas. / Iracema Matos Melo. – 2016.

131 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima .

1. Reabsorção óssea. 2. Periodontite. 3. Ovariectomia. 4. Tamoxifeno. 5. Anastrozol. I. Título.

CDD 617.6

IRACEMA MATOS DE MELO

**EFEITOS DO TAMOXIFENO E DO ANASTROZOL NA PERIODONTITE INDUZIDA
POR LIGADURA EM RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia. Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vilma de Lima.

Aprovada em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Vilma de Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha
Universidade de São Paulo (USP)

Prof.^a Dr.^a Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof.^a Dr.^a Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Ao meus pais, Ducelino e Dorotéa.

Ao meu irmão, Ivens.

Ao meu noivo, Wagner.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof^a. Dr^a. Vilma de Lima, pela dedicação, atenção e paciência que ela dispensou a mim, não só para a elaboração dessa tese, mas durante os 10 anos que já estamos trabalhando juntas. Pela imensa contribuição para a minha formação profissional e científica, que me permitiram estar inserida no meio da docência e da pesquisa, que me foi apresentado por ela.

Ao professor Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, *in memoriam*, pela pronta cessão de seu espaço do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer e materiais necessários para a realização de algumas fases desse estudo, bem como por sua disponibilidade e sugestões pertinentes no decorrer deste trabalho.

Aos professores doutores, Roberto César Pereira Lima Júnior e Deysi Viviana Tenazoa Wong, por estarem sempre dispostos a ajudar nos experimentos e repassando seus conhecimentos.

Às professoras doutoras, Nylane Maria Nunes de Alencar e Renata Ferreira Carvalho Leitão, pela pronta cessão de seus espaços laboratoriais para realização de algumas fases deste estudo.

A todos os professores dos Programas de Pós-graduação em Odontologia e em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará que contribuíram em minha formação.

Aos professores doutores, Ana Maria Sampaio Assreuy, Nylane Maria Nunes de Alencar, Fernando de Queiróz Cunha e Roberto César Pereira Lima Júnior, por terem aceitado participar da comissão avaliadora deste estudo.

A todos os meus colegas do Laboratório de Osteofarmacologia, que conviveram comigo desde a época da minha iniciação científica e com os quais estabeleci laços especiais de amizade. Especialmente aos que participaram ativamente de diversas fases deste estudo, Larice Monteiro, Vilana Araújo, Bianca Kurita, Rafael Reis, Thyanne Brasil e Mariana Guimarães.

Aos alunos de iniciação científica, que foram fundamentais para realização desta pesquisa, bem como contribuíram para o meu processo de aprendizagem, e que sempre forneceram um ambiente descontraído. Especialmente, Edgar Lassance, Tereza Cristina Forte, Marina Sarte e Lorena Araújo.

Às turmas de monitoria da disciplina de Farmacologia Geral para Odontologia pelo convívio e contribuição no meu processo de aprendizagem.

Aos meus colegas de pós-graduação, pelos bons momentos que passamos juntos.

Aos técnicos administrativos da Universidade Federal do Ceará, pelos bons serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico (FUNCAP), pelos suportes financeiros a este estudo.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio do Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão de bolsa estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, o Senhor da minha vida e minha fonte paz, pela força e capacitação para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus pais, Ducelino Gomes de Melo e Dorotéa M^a Santos Matos de Melo, que mesmo a quilômetros de distância, estão sempre presentes na minha vida, apoiando, em todos os aspectos, as minhas escolhas e alegrando-se com as minhas conquistas.

Ao meu irmão, Ivens Matos de Melo, que esteve sempre comigo, sendo minha segurança em Fortaleza, pelo carinho e momentos de descontração que sempre me proporciona.

Ao meu noivo, Wagner Freitas Matos, que tem sido meu porto seguro, pela ajuda e compreensão, bem como pelo carinho e amor dispensados a mim. Por ter entendido minhas ausências e apoiado minhas escolhas.

À toda minha família, pela compreensão, amor e ajuda dispensados a mim. Em especial, minha tia, Dalila M^a Santos Matos, e à minha prima, Diana Alves dos Santos, pela pronta disposição a ajudarem-me.

À Maria Lima, pelos bons momentos que me proporciona, pela atenção e carinho dedicados a mim.

A todos os meus amigos e irmãos em Cristo, que compreenderam minha ausência em momentos dos quais queria participar, e por toda alegria que me proporcionam, bem como pelas orações.

“Deus não espera que submetamos a nossa fé a Ele sem razão, mas os próprios limites da nossa razão tornam a fé uma necessidade”. Agostinho de Hipona.

RESUMO

Tamoxifeno (TMX) e anastrozol (ANA) são fármacos moduladores dos receptores de estrogênio e inibidores da aromatase, respectivamente, utilizados na terapia do câncer de mama, com repercussões no tecido ósseo. Avaliou-se o efeito do TMX e do ANA na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas (OVX). Inicialmente, 170 ratas *Wistar* foram falso-ovariectomizadas (F-OVX) ou OVX. No dia 7, a periodontite foi induzida por ligadura (náilon 3.0) do 2º molar superior esquerdo, e contralateral como controle. Grupos de animais receberam por gavagem água destilada (Normal, F-OVX e OVX), TMX (OVX/TMX 1, 3 e 9 mg/kg) ou ANA (F-OVX/ANA 0,5 ou OVX/ANA 0,02, 0,1 e 0,5 mg/kg), diariamente, por 28 dias, quando foram eutanasiados. A gengiva foi analisada por dosagens de atividade de mieloperoxidase (MPO) e de TNF- α por ELISA, e a reabsorção óssea alveolar (ROA) por macroscopia, histometria, histologia, e imunohistoquímica para TNF- α , RANKL, OPG e TRAP. Sistemicamente, foram avaliados o fêmur por histologia; as dosagens séricas de estradiol (EST), fosfatases alcalinas total (FAT) e óssea (FAO); o leucograma; o peso úmido do útero (PUU) e a variação de massa corpórea (VMC). A OVX causou hipoestrogenia em relação aos valores basais e de F-OVX; não sendo alterada por TMX, mas reduzida por ANA. O PUU foi reduzido nos animais OVX, OVX/TMX, OVX/ANA e F-OVX/ANA em relação aos animais Normal e F-OVX. A ligadura do 2º molar induziu ROA (macroscopia e microscopias), aumento dos níveis gengivais de MPO e TNF- α , das imunomarcações de RANKL, razão RANKL/OPG e TRAP, e redução de OPG e FAO. A hipoestrogenia por OVX aumentou somente a MPO em relação a F-OVX. TMX reduziu a ROA, além da MPO, da imunomarkação para TNF- α , RANKL e TRAP, e a razão RANKL/OPG; aumentou os níveis de FAO, e manteve os níveis de OPG semelhantes ao Normal. O ANA em animais F-OVX não alterou os parâmetros avaliados. Porém, quando combinada à OVX, a hipoestrogenia adicional vista no grupo OVX/ANA, apesar de não ter aumentado MPO e TNF- α em relação ao observado em animais OVX não tratados, aumentou a ROA, associada ao aumento de MPO em relação aos animais F-OVX, bem como aumento de RANKL, razão RANKL/OPG e TRAP; e diminuiu ambas OPG e FAO. A análise do fêmur mostrou que a OVX não promoveu alterações significantes nesse osso em comparação ao Normal e F-OVX, assim como de animais tratados com TMX. O ANA promoveu alterações no fêmur de animais F-OVX e OVX, com presença de tecido conjuntivo fibroso na epífise, inflamação no periósteo e espaços medulares amplos, sobretudo no de animais OVX. A periodontite induziu leucocitose, à custa de neutrofilia e linfomonocitose, e somada à OVX observou-se aumento dessa leucocitose. Esta foi prevenida pelo TMX, e não alterada por ANA. Por fim, a OVX promoveu maior ganho de peso em relação ao de animais Normais e F-OVX. OVX/TMX resultou em menor ganho de peso, e OVX/ANA, curva semelhante ao de OVX. Em suma, a modulação de receptores de estrogênio por TMX preveniu reabsorção óssea por reduzir a resposta inflamatória e potencialmente favorecendo a formação óssea, via modulação de citocinas osteoclastogênicas, ao passo que a inibição da síntese estrogênio por ANA, além de aumentar a destruição óssea, ainda reduziu os mecanismos formadores ósseos.

Palavras-chave: Reabsorção óssea. Periodontite. Ovariectomia. Tamoxifeno. Anastrozol.

ABSTRACT

Tamoxifen (TMX) and anastrozole (ANA) are selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitors drugs, respectively, used in the therapy of breast cancer, impacting on the bone tissue. The effect of TMX and ANA on the ligature-induced periodontitis in ovariectomized (OVX) rats was evaluated. Initially, 170 *Wistar* rats were sham-ovariectomized (S-OVX) or OVX. On day seven, periodontitis was induced by ligature (nylon 3.0) on the upper left second molar and the contralateral one as control. Groups of animals received through gavage distilled water (Normal, S-OVX, and OVX), TMX (OVX/TMX 1, 3, and 9 mg/kg) or ANA (S-OVX/ANA 0.5 or OVX/ANA 0.02, 0.1, and 0.5 mg/kg), daily, for 28 days, when were subjected to euthanasia. The gingiva was analyzed through dosages of myeloperoxidase activity (MPO) and TNF- α by ELISA, and the alveolar bone resorption (ABR) was assessed by macroscopic, histometric, histological, and immunohistochemical analysis for TNF- α , RANKL, OPG, and TRAP. Systemically, the following parameters were analyzed: the femur by histological analysis, estradiol serum dosages (ESD), total alkaline phosphatase (TALP) and bone alkaline phosphatase (BALP), the leukogram, the uterus wet weight (UWW), and body mass variation (BMV). The OVX caused hypoestrogenism in relation to basal values and S-OVX animals; without altering by TMX, but reduced by ANA. The UWW was reduced in OVX, OVX/TMX, OVX/ANA and in the S-OVX/ANA animals in relation to normal and S-OVX animals. The second molar ligature caused ABR (macroscopic and microscopies), increase in the gingival levels of MPO and TNF- α , in the immunolabelling for RANKL, ratio RANKL/OPG and TRAP, and reduction of OPG and BALP. The hypoestrogenism due to OVX increased only MPO in relation to the S-OVX. TMX reduced the ABR, besides the MPO, the immunolabelling for TNF- α , RANKL, and TRAP, with a lower ratio of RANKL/OPG, and increased the BALP levels, maintaining the OPG levels close to the normal group values. ANA in S-OVX animals did not alter the evaluated parameters. However, when combined with OVX, the additional hypoestrogenism seen in the OVX/ANA group, albeit it did not increase the MPO and TNF- α in relation to what was observed in non-treated OVX animals, it did increase the ABR associated with the increase in the MPO in relation to S-OVX animals as well as the rise in the RANKL, RANKL/OPG ratio, and TRAP, and it reduced both OPG and BALP. The femoral analysis showed that the OVX did not promote significant bone alterations in comparison with the Normal and S-OVX groups, as well as compared with TMX-treated animals. ANA promoted changes in the femur of S-OVX and OVX animals, with presence of fibrous connective tissue in the epiphysis, inflammation in the periosteum and broad spinal spaces, especially in OVX animals. The periodontitis induced leukocytosis at the expenses of neutrophilia and lymphomonocytosis, and added to OVX observed a leukocytosis increasing. This was prevented by TMX and did not alter by ANA. Finally, the OVX promoted a higher weight gain in relation to the Normal and S-OVX animals. OVX/TMX resulted in lower weight gain, and OVX/ANA, curve similar to that of OVX. In summary, the modulation of estrogen receptors by TMX prevented the bone resorption due to a reduction in the inflammatory response and potentially favoring the bone formation via the modulation of osteoclastogenic cytokines, while the estrogen synthesis inhibition by ANA, besides increasing bone destruction, it even reduced the mechanisms of bone formation.

Keywords: Bone resorption. Periodontitis. Ovariectomy. Tamoxifen. Anastrozole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Patogênese da periodontite.	26
Figura 2	Fotografia ilustrando a ovariectomia.	42
Figura 3	Fotografia ilustrando a indução da periodontite.	43
Figura 4	Esquema do protocolo experimental.	44
Figura 5	Desenho esquemático da mensuração da área de reabsorção óssea alveolar na análise macroscópica.	46
Figura 6	Desenho esquemático da mensuração da reabsorção óssea alveolar na análise histométrica.	47
Figura 7	Aspectos macroscópico (A-C) e histológico (D-F) da maxila Normal (A e D) ou da maxila de animais falso-ovariectomizados (B e E) ou ovariectomizados (C e F) submetidos à periodontite.	55
Figura 8	Aspecto histológico do fêmur de animais Normais (A) ou falso-ovariectomizados (B) e ovariectomizados (C) submetidos à periodontite.	59
Figura 9	Efeito da ovariectomia na variação de massa corpórea de animais submetidos à periodontite.	61
Figura 10	Efeito do tamoxifeno (TMX) na reabsorção óssea alveolar (ROA) em animais ovarictomizados (OVX) submetidos à periodontite.	63
Figura 11	Aspectos macroscópico (A-D) e histológico (E-H) da maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	65
Figura 12	Efeitos do tamoxifeno (TMX) na atividade de mieloperoxidase (A) e nos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite.	66
Figura 13	Efeitos do tamoxifeno (TMX) na imunomarcção para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C), RANKL/OPG (D) e TRAP (E) no periodonto de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite.	67
Figura 14	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TNF- α na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	68

Figura 15	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para RANKL na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	69
Figura 16	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para OPG na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	70
Figura 17	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TRAP na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	71
Figura 18	Aspecto histológico do fêmur de animais ovariectomizados submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX).	72
Figura 19	Efeito do tamoxifeno (TMX) nos níveis séricos de fosfatases em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite	73
Figura 20	Efeito do tamoxifeno (TMX) na variação de massa corpórea de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite.	74
Figura 21	Efeito do anastrozol (ANA) na reabsorção óssea alveolar (ROA) em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite.	77
Figura 22	Aspectos macroscópico (A-E) e histológico (F-J) da maxila Normal (A e D) ou da maxila de animais falso-ovariectomizados (B e E) ou ovariectomizados (C e F) submetidos à periodontite.	78
Figura 23	Efeitos do anastrozol (ANA) na atividade de mieloperoxidase (A) e nos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite.	79
Figura 24	Efeitos do anastrozol (ANA) na imunomarcação para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C), RANKL/OPG (D) e TRAP (E) no periodonto de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite	81
Figura 25	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TNF- α na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA).	82
Figura 26	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para RANKL na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA).	83

Figura 27	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para OPG na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA).	84
Figura 28	Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TRAP na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA).	85
Figura 29	Aspecto histológico do fêmur de animais ovariectomizados submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA).	87
Figura 30	Efeito do anastrozol (ANA) nos níveis séricos de fosfatases em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite.	88
Figura 31	Efeito do anastrozol (ANA) na variação de massa corpórea de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite.	89
Figura 32	Mecanismos de ação propostos para os efeitos do tamoxifeno (TMX) e o anastrozol (ANA) no tecido ósseo.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeitos da ovariectomia nos níveis séricos de estradiol e índice uterino de ratas submetidas à periodontite.	54
Tabela 2	Efeitos da ovariectomia nos aspectos macroscópicos e microscópicos do periodonto de ratas submetidas à periodontite.	56
Tabela 3	Efeitos da ovariectomia na atividade de mieloperoxidase (MPO) e nos níveis de TNF- α no tecido gengival de ratas submetidas à periodontite.	57
Tabela 4	Efeitos da ovariectomia na marcação imunohistoquímica (IHQ) para TNF- α , RANKL, OPG, RANKL/OPG e TRAP no periodonto de ratas submetidas à periodontite.	58
Tabela 5	Efeitos da ovariectomia nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas submetidas à periodontite.	58
Tabela 6	Efeitos da ovariectomia nos níveis séricos de fosfatases e no leucograma de ratas submetidas à periodontite.	60
Tabela 7	Efeitos do Tamoxifeno (TMX) nos níveis séricos de estradiol e no índice uterinos de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	62
Tabela 8	Efeitos do Tamoxifeno (TMX) nos aspectos microscópicos do periodonto de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	63
Tabela 9	Efeitos do Tamoxifeno (TMX) nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	72
Tabela 10	Efeitos do Tamoxifeno (TMX) no leucograma de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	74
Tabela 11	Efeitos do Anastrozol (ANA) nos níveis séricos de estradiol e no índice uterinos de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	76
Tabela 12	Efeitos do Anastrozol (ANA) nos aspectos microscópicos do periodonto de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	77

Tabela 13	Efeitos Anastrozol (ANA) nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	86
Tabela 14	Efeitos do Anastrozol (ANA) no leucograma de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	Complexo avidina-biotina
ANA	Anastrozol
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
c-FMS	Receptor para o fator estimulador de colônia de macrófagos
CYP	Citocromo P450
DMO	Densidade mineral óssea
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
FAO	Fosfatase Alcalina Óssea
FAT	Fosfatase Alcalina Total
FDA	Administração de Alimentos e fármacos (do inglês "Food and drug administration")
F-OVX	Falso-ovariectomizado
H-TAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
H ₂ O _d	Água destilada
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Inibidores da aromatase
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
Md	Mediana
Me	Média
MMP	Metaloproteinase de matriz
MPO	Mieloperoxidase
MSRE	Modulador seletivo dos receptores de estrógeno
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO ₄	Fosfato de sódio
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia ou Ovariectomizado

PBS	Solução tamponada de fosfato
PG	Prostaglandina
RANK	Receptor ativador do fator nuclear κ B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
ROA	Reabsorção óssea alveolar
RE	Receptor de estrógeno
TMB	Tetrametilbenzidina
TMX	Tamoxifeno
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Metabolismo ósseo	21
2.1.1	<i>Osteoporose pós-menopausa</i>	23
2.1.2	<i>Periodontite</i>	25
2.2	Moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (MSRE)	28
2.2.1.	<i>Tamoxifeno (TMX)</i>	31
2.3	Inibidores da aromatase (IA)	34
2.3.1	<i>Anastrozol (ANA)</i>	36
3	JUSTIFICATIVA	39
4	OBJETIVOS	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	Animais	41
5.2	Fármacos, reagentes e anticorpos	41
5.3	Protocolo experimental	42
5.4	Grupos experimentais	44
5.4.1	<i>Grupo Normal</i>	44
5.4.2	<i>Grupo falso-ovariectomizado (F-OVX)</i>	45
5.4.3	<i>Grupo ovariectomizado (OVX)</i>	45
5.4.4	<i>Grupo OVX tratado com TMX (OVX/TMX)</i>	45
5.4.5	<i>Grupo F-OVX tratado com ANA (F-OVX/ANA)</i>	45
5.4.6	<i>Grupo OVX tratado com ANA (OVX/ANA)</i>	45
5.5	Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental	46
5.5.1	<i>Análise macroscópica do osso alveolar</i>	46
5.5.2	<i>Análises histológicas</i>	46
5.5.2.1	<i>Análise histométrica</i>	47
5.5.2.1	<i>Análise histológica semiquantitativa</i>	48
5.5.2.3	<i>Análise imunohistoquímica do periodonto</i>	48
5.5.3	<i>Análise da atividade de mieloperoxidase (MPO)</i>	49
5.5.4	<i>Análise de ELISA para TNF-α</i>	50

5.6	Análise histológica do fêmur	51
5.7	Parâmetros sistêmicos	51
5.7.1	<i>Dosagem sérica de estradiol</i>	51
5.7.2	<i>Dosagem sérica de fosfatase alcalina óssea (FAO)</i>	51
5.7.3	<i>Leucograma</i>	52
5.7.4	<i>Análise do útero</i>	52
5.7.5	<i>Análise da variação de massa corpórea</i>	53
5.8	Análise estatística	53
6	RESULTADOS	54
6.1	Efeitos da ovariectomia em animais submetidos à periodontite	54
6.2	Efeitos do tamoxifeno (TMX) em animais ovariectomizados submetidos à periodontite	62
6.3	Efeitos do anastrozol (ANA) em animais ovariectomizados ou não submetidos à periodontite	75
7	DISCUSSÃO	90
8	CONCLUSÃO	108
	REFERÊNCIAS	109
	APÊNDICE A – CONTROLES NEGATIVOS NAS ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS PARA TNF- α , RANKL, OPG, TRAP	129
	ANEXO A – APROVAÇÃO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	130

1 INTRODUÇÃO

Diversas doenças ósseas crônicas são debilitantes e, portanto, requerem atenção em saúde pública. Dentre estas, incluem-se as osteoporoses e as periodontites. A primeira é uma doença óssea metabólica sistêmica caracterizada por uma redução na massa e na qualidade ósseas e deterioração da sua microarquitetura. Clinicamente, é a maior responsável pelo aumento de fraturas ósseas e sua característica redução da densidade mineral do tecido ósseo é especialmente comum na fase pós-menopausa ou em resposta a terapias imunossupressoras (HERNLUND *et al.*, 2013; CHOI *et al.*, 2016). A periodontite crônica consiste em uma resposta imunoinflamatória de origem microbiana subjacente aos tecidos periodontais, culminando na destruição de osso alveolar, ligamento periodontal e cimento radicular (PAGE; KORNMAN, 1997; SANZ; WINKELHOFF, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). É uma doença de alta prevalência mundial (BURT, 2005), e responsável pelas maiores perdas dentárias em adultos, incluindo o território brasileiro (SB BRASIL, 2004 e 2010).

Embora a etiologia da osteoporose pós-menopausa e a periodontite sejam diferentes, as perdas ósseas que ocorrem em ambas as doenças compartilham várias características em comum. Como os receptores de estrógenos são expressos em células ósseas e imunes, tem sido considerada a hipótese de que a deficiência de estrogênio pode influenciar a remodelação óssea alveolar com processos inflamatórios, uma vez que as células do ligamento periodontal expressam receptores específicos para estrogênios (CAO *et al.*, 2007), de tal modo que a osteoporose tem sido identificada como um indicador de risco da doença periodontal (TEZAL *et al.*, 2000; HASS *et al.*, 2009; BERTULUCCI *et al.*, 2012; LAMONTE *et al.*, 2013). De fato, tem sido relatado que a deficiência estrogênica favorece a reabsorção óssea por aumento da osteoclastogênese (D'AMELIO *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010), e combinadas às condições tipicamente inflamatórias, como na periodontite (PAGE; KORNMAN, 1997; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013), pode resultar em aumento da destruição do aparato periodontal.

Nesse contexto, fármacos que afetem a interação do estrógeno com seu receptor, como os moduladores seletivos dos receptores do estrógeno (MSRE), ou os que diminuam a síntese estrogênica, como os inibidores da aromatase (IA), podem

interferir no efeito desse hormônio no tecido ósseo. De fato, a literatura tem mostrado que os MSRE, como o tamoxifeno (TMX), e os IA, como o anastrozol (ANA), apresentam efeitos protetores ou deletérios no osso, respectivamente (LOVE *et al.*, 1992; BAUM *et al.*, 2002). A maioria desses estudos demonstram os efeitos desses fármacos em ossos como o fêmur, a tíbia e a vértebra, e os considerando o osso alveolar são bastante escassos, havendo apenas um ensaio clínico em que os parâmetros periodontais em pacientes tratados com IA foram avaliados (EAGLE *et al.*, 2016), o que evidencia um campo, embora muito importante, ainda pouco explorado. Este fato somado às diferenças morfológicas e funcionais entre o osso alveolar e o fêmur evidenciam a carência de estudos que avaliem a resposta inflamatória no osso alveolar, sob os efeitos do tamoxifeno e do anastrozol, fármacos utilizados no tratamento do câncer de mama e relacionados a efeitos benéficos e deletérios nesses ossos, respectivamente. Assim sendo, este trabalho buscou investigar as repercussões da modulação de receptores de estrógenos, por TMX, e da inibição da aromatase, por ANA, nas respostas inflamatória e reabsortiva inerentes à periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas (OVX).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Metabolismo ósseo

Macroscopicamente, o sistema ósseo aparenta ser estático, no entanto, em nível microscópico, configura-se como um tecido extremamente dinâmico, estando em contínuo processo de remodelação óssea, que consiste em uma atividade equilibrada e integrada entre osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, a fim de substituir o osso antigo por um osso novo (ERIKSEN, 2010; ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016). Este processo é regulado tanto por fatores locais, quanto sistêmicos, de forma que desvios significativos neste equilíbrio resultam em reabsorção ou formação ósseas aumentadas (ERIKSEN, 2010).

Particularmente sobre a reabsorção do osso, o ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL), presente na superfície de osteoblastos e osteócitos, liga-se ao receptor ativador do fator nuclear κ B (RANK) presente na superfície celular de pré-osteoclastos, promovendo a diferenciação, a maturação e a ativação dessas células (KHOSLA, 2001; PACIFICI, 2010; NAKASHIMA *et al.*, 2011). A osteoprotegerina (OPG) é outro receptor no qual o RANKL pode se ligar, de forma que consiste em um importante fator antiosteoclastogênico, pois compete com o RANK pela ligação ao RANKL (KHOSLA, 2001; PACIFICI, 2010). A diferenciação osteoclástica também é regulada pelo fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que agindo sobre seu receptor (cFMS), é essencial para proliferação, sobrevivência e fusão de células mononucleadas precursoras de osteoclastos, assim como pelo aumento da sobrevivência de osteoclastos maduros (TAKAYANAGI, 2007; PACIFICI, 2010).

Considerando os fatores locais que afetam a remodelação óssea, especificamente a reabsorção óssea, o RANKL e o M-CSF são essenciais para a renovação osteoclástica fisiológica, enquanto citocinas adicionais são responsáveis pela suprarregulação de osteoclastos. De fato, tal processo envolve diversas células, citocinas e receptores, estando, portanto, intrinsecamente relacionado ao sistema imune e à resposta inflamatória (PACIFICI, 2010; BRAUN; SCHETT, 2012). Nesse contexto, o eixo RANK/RANKL/OPG é estimulado ou inibido por diferentes mediadores, sendo a reabsorção óssea facilitada na presença de mediadores inflamatórios como as interleucinas- 1β (IL- 1β), IL-6, e o fator de necrose tumoral α (TNF- α), uma vez que estes aumentam a expressão de RANKL e diminuem a

expressão de OPG (NAKASHIMA *et al.*, 2000). A IL-17 também favorece a reabsorção óssea por agir sinergicamente aumentando a expressão de RANK em precursores de osteoclastos (ADAMOPOULOS *et al.*, 2010) e de RANKL em osteoblastos (ADAMOPOULOS; BOWMAN, 2008). O aumento de citocinas não está relacionado ao aumento da reabsorção óssea somente por facilitar a interação RANK/RANKL, mas também por aumentar a produção de M-CSF, como tem sido descrito para o TNF- α (ZHAO; HUANG; ZHANG, 2016).

No que concerne aos fatores sistêmicos que afetam o metabolismo ósseo, há alguns hormônios, tais como: o estrógeno, o andrógeno e o paratormônio (LI *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2017). Particularmente sobre o estrógeno, tem sido relatado que a deficiência estrogênica favorece a osteoclastogênese (D'AMELIO *et al.*, 2008), com conseqüente aumento da reabsorção óssea (LIU *et al.*, 2010). Assim, a redução nos níveis de estrógeno aumenta a reabsorção do tecido ósseo pelo aumento no número de osteoclastos e o tempo de vida dessas células (MARTIN-MILLAN *et al.*, 2010; NAKAMURA *et al.*, 2007), sendo o TNF- α uma citocina importante relacionada ao aumento da osteoclastogênese durante a deficiência de estrógeno, devido, sobretudo, ao aumento numérico de células T produtoras de TNF (ROGGIA *et al.*, 2001), com o possível adicional na expressão de RANKL. Consistente com esse possível aumento de RANKL, em situações de deficiência estrogênica, Eghbali-Fatourehchi *et al.* (2003) relataram o aumento da produção de RANKL por células T em mulheres pós-menopausa em comparação ao observado em mulheres pré-menopausa.

O estrógeno relaciona-se com o tecido ósseo também por interferir nos osteoblastos, prevenindo a apoptose dessas células (KOUSTENI *et al.*, 2001). O tratamento de osteoblastos com estradiol também promove uma redução significativa da produção de citocinas pró-reabsortivas, tais como IL-6, IL-1 β e IL-1 α (CHEUNG *et al.*, 2003). Além disso, o estrógeno está relacionado com a diferenciação osteoclástica devido ao aumento da síntese e expressão de OPG nos osteoblastos (HOFBAUER *et al.*, 1999), assim como à supressão do RANKL (SHEVDE *et al.*, 2000), de forma que durante a deficiência estrogênica, a síntese de OPG encontra-se reduzida e a de RANKL aumentada, favorecendo a osteoclastogênese (D'AMELIO *et al.*, 2008).

Ademais, vários estudos também demonstraram o aumento de células B na medula óssea de roedores, em situações de redução dos níveis circulantes de

estrógeno, o que pode indicar a importância dessas células na perda óssea que ocorre em decorrência da deficiência estrogênica (ALMEIDA *et al.*, 2017). Essa hipótese pode ser suportada pelo aumento de osteoclastos e reabsorção óssea em camundongos por meio da elevação de células B, promovida pela administração de IL-7 (MIYAURA *et al.*, 1997), bem como pela prevenção do aumento de osteoclastos e da reabsorção em camundongos ovariectomizados, cuja produção de RANKL por células B foi completamente inibida (ONAL *et al.*, 2012).

Percebe-se, portanto, que a redução dos níveis circulantes de estrógeno e condições inflamatórias estão relacionadas ao favorecimento de processos reabsortivos. De fato, a associação entre os baixos níveis de estrógeno, observados em mulheres que passaram pela menopausa, e o desenvolvimento da osteoporose tem sido descrita desde 1940, quando Fuller Albright cunhou o termo osteoporose pós-menopausa (ALBRIGHT; BLOOMBERG; SMITH, 1940). No que concerne às condições inflamatórias interferindo nos processos reabsortivos, algumas doenças tipicamente inflamatórias são associadas à reabsorção óssea, como artrite reumatoide (SAPIR-KOREN; LIVSHITS, 2016) e periodontite (PAGE; KORNMAN, 1997; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). Além disso, pode haver associação entre a deficiência estrogênica e tais condições, interferindo, portanto, na reabsorção óssea subjacente (SAPIR-KOREN; LIVSHITS, 2016; HASS *et al.*, 2009; LAMONTE *et al.*, 2013).

2.1.1 Osteoporose pós-menopausa

A osteoporose é definida, pelo Instituto Nacional de Saúde, como uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da força óssea que predispõe a pessoa ao aumento do risco de fraturas (ALMEIDA *et al.*, 2017), sendo resultante do desacoplamento entre a formação de osso mediada por osteoblastos e a reabsorção desse tecido mediada por osteoclastos (D'AMELIO *et al.*, 2008). Nesse contexto, é considerado normal o valor de densidade mineral óssea de 0 a -1 desvio padrão do encontrado na população de adultos jovens (escore T); aplicado a o termo de osteopenia para os valores entre -1,0 e 2,5 e fornecido o diagnóstico de osteoporose quando o valor de densidade mineral óssea for menor que -2,5 desvio padrão (KANIS *et al.*, 1994).

De forma geral, mulheres apresentam duas fases de perda óssea relacionadas à idade. A primeira inicia-se na menopausa e ocorre, sobretudo, no osso trabecular, em decorrência da deficiência estrogênica, sendo resultante do aumento desproporcional da reabsorção óssea em comparação à formação. Após 4 a 8 anos, a segunda fase inicia-se, exibindo uma perda óssea mais lenta e persistente, resultante principalmente do decréscimo na formação do tecido ósseo (RIGGS; KHOSLA; MELTON, 2002). Russo (2001), em revisão de literatura, afirmou que, devido à redução dos estrógenos em decorrência da cessação da função ovariana característica da menopausa, mulheres passam a perder massa óssea acima de 1% ao ano, sendo que algumas chegam a perder 5% e, no final de 5 anos, estão com perda superior a 25%, caracterizando a osteoporose pós-menopausa. A perda óssea associada à redução estrogênica na menopausa é mais crítica na coluna vertebral, quando comparada aquela observada no quadril e no corpo total (RECKER *et al.*, 2000), assim como é mais proeminente no osso trabecular em relação ao cortical (FERRETI *et al.*, 2010; SHIN *et al.*, 2012, BRITTON *et al.*, 2014; ALMEIDA, *et al.*, 2017).

Existe, portanto, diferenças nas taxas de perda óssea antes e após a menopausa. Além disso, existem diferenças na remodelação óssea conforme o osso, se no esqueleto axial ou apendicular (RIGGS *et al.*, 1986). Riggs *et al.* (1986) demonstraram que a densidade mineral óssea da coluna lombar, caracterizada sobretudo por osso trabecular, diminui mesmo antes da menopausa, o que foi mínimo no rádio, caracterizado sobretudo por osso cortical, cuja densidade mineral óssea reduziu somente após a menopausa.

Além dos fatores já descritos de como a deficiência estrogênica que ocorre na menopausa pode aumentar a reabsorção óssea, a literatura também tem demonstrado que a osteoporose pós menopausa pode ser compreendida pela diminuição da sensibilidade do osso à carga mecânica, uma vez que o receptor de estrógeno (RE) melhora à resposta desse tecido à carga mecânica, independente da ligação do hormônio (AGUIRRE *et al.*, 2007; WINDAHL *et al.*, 2013). Assim, provavelmente os baixos níveis de estrógeno afetam essa resposta por diminuírem a expressão do seu receptor (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Em contrapartida, tem sido relatado que a carga mastigatória pode contrabalançar o efeito da redução de estrógeno no osso alveolar (TANAKA *et al.*,

2000; KURODA *et al.*, 2003). Aparentemente, as forças fisiológicas da mastigação estão relacionadas à manutenção da massa, espessura e densidade ósseas, bem como do volume ósseo (BRESIN; KILIARIDIS; STRID, 1999; VON WOWERN; HJORTING-HSANSEN; STOLTZE, 1979; SHIMARA *et al.*, 1991). A origem embrionária membranosa dos ossos maxilares também tem sido ressaltada para justificar os menores efeitos da hipoestrogenia pós-menopausa nesses ossos (YANG, PHAM; CRABBE, 2003). No entanto, alguns estudos mostram relação entre a densidade mineral óssea sistêmica e a densidade mineral óssea oral (JEFFCOAT *et al.*, 2000; SOUTHARD *et al.*, 2000). Percebe-se, portanto, que os efeitos da diminuição dos níveis circulantes de estrógeno no osso alveolar não são totalmente estabelecidos, tornando-se necessária investigação da repercussão da menopausa, não somente em ossos como as vértebras e o fêmur, mas também nos maxilares.

Nesse contexto, o modelo de ovariectomia em ratas tem sido amplamente utilizado para estudar os efeitos da menopausa na massa óssea, microestrutura trabecular e risco à fratura, uma vez que mimetiza as várias características observadas clinicamente (FROST; JEE, 1992; WRONSKI *et al.*, 1989; MOSEKILDE, 1995). Esse modelo de remoção dos ovários também é extensamente utilizado para a investigação dos efeitos da hipoestrogenia no osso alveolar, submetido ou não à periodontite (LIU *et al.*, 2010; BEZERRA *et al.*, 2013).

2.1.2 Periodontite

A periodontite crônica é uma doença inflamatória de alta prevalência mundial (BURT, 2005), incluindo o território brasileiro (SB BRASIL, 2004), caracterizada pela destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes, tais como o ligamento periodontal e o osso alveolar (PAGE; KORNMAN, 1997). Essa doença envolve a interação entre produtos bacterianos e numerosas populações celulares e mediadores inflamatórios em indivíduos susceptíveis (Figura 1) (PAGE; KORNMAN, 1997; SANZ; WINKELHOFF, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013).

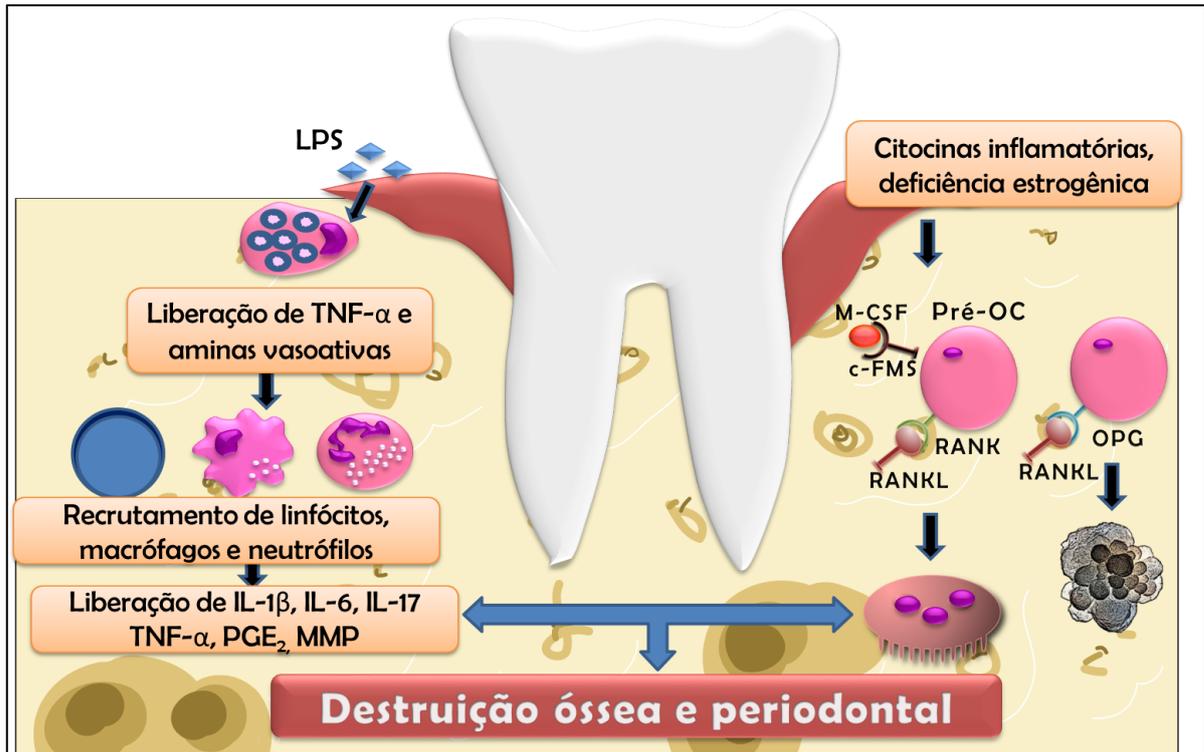


Figura 1: Patogênese da periodontite. O lipopolissacarídeo (LPS) de membrana estimula a liberação de aminas vasoativas e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), seguida pelo recrutamento de outras células inflamatórias, que liberam diversas interleucinas (IL), TNF- α , prostaglandina E₂ (PGE₂) e metaloproteinase de matriz (MMP). Essas citocinas inflamatórias favorecem a reabsorção óssea por estimularem a diferenciação de pré-osteoclastos (pré-OC) em osteoclastos maduros, pela interação do ligante do receptor ativador do fator nuclear κ -B (RANKL) com seu receptor (RANK) e do fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) como seu receptor (cFMS), assim como por diminuírem a expressão de osteoprotegerina (OPG). Baseado em YUCELLINDBERG; BÅGE, 2013.

Inicialmente, diante do desafio microbiano, os mastócitos liberam aminas vasoativas e TNF- α pré-formado, assim como ocorre o aumento da liberação de mediadores inflamatórios por células residentes do tecido gengival, aumentando a permeabilidade vascular e a expressão de moléculas de adesão. Diante disso, ocorre o recrutamento de células inflamatórias para a gengiva, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos (YUCELLINDBERG; BÅGE, 2013). Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra os patógenos periodontais, no entanto, essas células também participam da destruição do periodonto (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011), uma vez que liberam uma variedade de fatores, como espécies reativas de oxigênio, colagenases e outras proteases (KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; YUCELLINDBERG; BÅGE, 2013), assim como são capazes de produzir diversas citocinas, como o TNF- α

(NATHAN, 2006; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; PRESHAW; TAYLOR, 2011;). Nesse cenário, ocorre a destruição dos tecidos periodontais, o que favorece a invasão desses tecidos por macrófagos e linfócitos (KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). De fato, o infiltrado neutrofílico diminui com a progressão da doença, havendo predominância de linfócitos na periodontite (KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011).

Percebe-se, portanto, que citocinas pró-inflamatórias possuem papel fundamental na patogênese dessa doença. Assim, a IL-1 β e o TNF- α , sintetizados não somente por linfócitos, mas também por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, células epiteliais e osteoblastos (GRAVES; COCHRAN, 2003), assim como uma grande variedade de outros mediadores inflamatórios, como IL-6, IL-17, prostaglandina E₂, metaloproteinases de matriz e óxido nítrico são responsáveis pela destruição dos tecidos mole e duro periodontais (LIMA *et al.*, 2008; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013).

Particularmente, sobre a destruição dos tecidos duros periodontais, essas interleucinas e o TNF- α , que estão aumentados na periodontite, favorecem a reabsorção óssea por facilitarem a osteoclastogênese e a ativação osteoclástica, por meio do aumento da expressão de RANK e RANKL e da diminuição da expressão de OPG (NAKASHIMA *et al.*, 2000; ADAMOPOULOS; BOWMAN, 2008; ADAMOPOULOS *et al.*, 2010). Portanto, assim como na osteoporose, a regulação do metabolismo ósseo nesta doença também envolve o eixo RANK/RANKL/OPG (COCHRAN, 2008). Estudos pré-clínicos têm demonstrado o papel do RANKL, produzido por células T ativadas, em modelos de periodontite (TENG *et al.*, 2000; TENG, 2002), assim como, têm relatado a expressão de RANKL sendo diretamente aumentada pela presença do patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* (REDDI; BROWN; BELIBASAKIS *et al.*, 2011). Além disso, clinicamente, há relatos de que os níveis de RANKL são mais elevados em pacientes com doença periodontal (CROTTI *et al.*, 2003; KAWAI *et al.*, 2006; WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007), associado à redução dos níveis de OPG (CROTTI *et al.*, 2003).

Considerando, ainda, a patogênese da periodontite, algumas doenças ou condições sistêmicas específicas podem afetar seu início, progressão e gravidade, tais como diabetes (CHEN *et al.*, 2010), artrite reumatoide (MIRRIELEES *et al.*, 2010) e a menopausa ou osteoporose pós-menopausa, sendo esta última considerada um

indicador de risco da doença periodontal (TEZAL *et al.*, 2000; HASS *et al.*, 2009; BERTULUCCI *et al.*, 2012; LAMONTE *et al.*, 2013). Particularmente, os efeitos prejudiciais da menopausa na saúde periodontal devem-se à redução estrogênica típica desse período e, portanto, são decorrentes dos resultados dessa supressão no metabolismo ósseo (ALMEIDA *et al.*, 2017) e nas respostas inflamatória (CHEUNG *et al.*, 2003) e imunológica (TYAGI *et al.*, 2011), com consequente aumento da reabsorção óssea, o que explica a osteoporose ser apontada como indicador de risco da periodontite. Assim, de forma semelhante ao que ocorre nos demais ossos do esqueleto, o estrógeno apresenta papel protetor nos ossos maxilares, demonstrado tanto pela presença de RE nos tecidos periodontais (JONSSON *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2008; NEBEL *et al.*, 2011), quanto pelo aumento dos níveis de OPG e diminuição dos níveis de RANKL, após o tratamento de células do ligamento periodontal com esse hormônio (LIANG *et al.*, 2008).

Os efeitos da deficiência estrogênica não são observados somente no osso alveolar. Na realidade, as mudanças hormonais, seja em situações fisiológicas, como na gravidez ou na menopausa, ou não-fisiológicas, como em casos de reposição hormonal, promovem alterações no periodonto. Particularmente, na menopausa, a redução dos níveis séricos de estrógeno torna o epitélio periodontal mais fino e atrófico, mais suscetível aos processos inflamatórios, típicos da doença periodontal (SACARDINA; MESSINA, 2012). Adicionalmente, mulheres sob terapia de reposição hormonal parecem ter algum benefício no controle da infecção por periodontopatógenos, como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (TARKKILA *et al.*, 2010).

Nesse contexto, fármacos que interfiram na interação do estrógeno com seu receptor, ou na síntese desse hormônio podem repercutir nos efeitos do estrógeno no metabolismo ósseo, a saber fármacos utilizados no tratamento hormonal do câncer de mama positivo para receptores hormonais, como os moduladores seletivos dos receptores hormonais (MSRE) e os inibidores da aromatase (IA) (LOVE *et al.*, 1992; BAUM *et al.*, 2002), e consequentemente, interferir no desenvolvimento de doenças ósseas, como a osteoporose e a periodontite.

2.2 Moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (MSRE)

A terapia hormonal do câncer de mama positivo para receptores hormonais envolve abordagens diferentes, como o bloqueio dos receptores de estrógeno (RE)

por meio de moduladores seletivos dos RE (MSRE), como o tamoxifeno (TMX); a redução dos níveis circulantes de estrógeno, pela depleção da síntese periférica extragonadal desse hormônio através de inibidores da aromatase (IA), como o anastrozol (ANA) e a degradação de RE, por infrarreguladores seletivos desses receptores, como o fulvestranto (SINI *et al.*, 2016), sendo as duas principais estratégias terapêuticas a modulação dos RE e a inibição da biossíntese do estrógeno (LUMACHI; SANTEUFEMIA; BASSO, 2015). Independente da abordagem escolhida dentre essas opções, todas objetivam antagonizar o crescimento tumoral promovido pelo estrógeno, em mulheres pré e pós-menopausa, a depender da classe farmacológica em questão, e estão bem estabelecidas como possibilidades de terapia hormonal adjuvante do câncer de mama (ROSSI; PAGANI, 2015; GLÜCK, 2016; SINI *et al.*, 2016).

Os MSRE são fármacos que apresentam atividade agonista ou antagonista sobre os RE, a depender do tecido alvo (LEWIS; JORDAN, 2005, AN *et al.*, 2016), desenvolvidos na década de 1970 para o tratamento do câncer de mama (COLE; JONES; TODD, 1971; WARD, 1973). De forma geral, esses compostos apresentam efeitos semelhantes ao do estrógeno no osso, fígado e sistema cardiovascular e efeitos contrários ao desse hormônio no cérebro e na mama, justificando o seu uso no tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais. Além disso, os MSRE apresentam atividade mista no útero, variável, conforme o fármaco (LEWIS; JORDAN, 2005; AN *et al.*, 2016).

Ainda não é completamente compreendido como esses fármacos podem apresentar efeitos distintos de acordo com o tecido e células nos quais estão ligados, entretanto, Lewis e Jordan (2005), em revisão de literatura, relataram três mecanismos que possivelmente explicam a farmacodinâmica dos MSRE. Assim, acredita-se que após a interação do fármaco com o receptor, este possa apresentar diferentes conformações; que exista expressão diferenciada de proteínas regulatórias e do próprio RE, bem como ativação de genes sem ser por elementos responsivos ao estrógeno (LEWIS; JORDAN, 2005).

De fato, o estrógeno possui seus efeitos mediados por dois tipos de receptores, RE α e RE β , diferenciados principalmente por sua porção N-terminal (HALL; MCDONNELL, 1999), o que justifica algumas diferenças de resposta na presença de ligantes (LEWIS; JORDAN, 2005). Esses receptores são codificados por

genes dos cromossomos 6 (RE α) e 14 (RE β), e apresentam diferenças na expressão tecidual, podendo ser expressos em níveis semelhantes ou com predominância de um subtipo em diferentes tecidos e órgãos, o que também explica as respostas distintas dos MSRE, conforme o tecido nos quais estão ligados (LEWIS; JORDAN, 2005; NILSSON; GUSTAFSSON, 2011).

Nesse contexto, a literatura tem relatado que, enquanto os RE α estão principalmente expressos em mama, células tecais de ovário, osso, epidídimo, estroma da próstata, fígado, tecido adiposo, rim e adrenal, os RE β estão principalmente expressos em epitélio da próstata, bexiga, células granulosa do ovário, pulmão, cólon, tecido adiposo e sistema imune (KUIPER, 1997; PATERNI *et al.*, 2014). Ambos os subtipos estão marcadamente presentes nos sistemas cardiovascular e nervoso central, bem como são igualmente importantes para o desenvolvimento e função dos ovários e proteção do sistema cardiovascular (PATERNI *et al.*, 2014). Ainda, Nelson, Wardell e McDonnell (2013) ressaltam que o RE α é o mais importante mediador das ações do estrógeno no tecido ósseo, embora também seja encontrado o subtipo β . Por outro lado, apesar de o RE α ser encontrado na gengiva e nas células do ligamento periodontal, o RE β é o subtipo predominante nesses sítios (JONSSON *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2008; NEBEL *et al.*, 2011).

Os MSRE são classificados em gerações, conforme desenvolvimento e liberação para uso no mercado, sendo a primeira geração representada pelo TMX e utilizada primariamente para o tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais. As demais gerações, segunda e terceira, foram desenvolvidas considerando os efeitos semelhantes ao do estrógeno no tecido ósseo que os MSRE apresentam, objetivando o tratamento da osteoporose. Fármacos como raloxifeno e bazedoxifeno são representantes da segunda e terceira gerações de MSRE, respectivamente, e diferem do TMX, sobretudo por não apresentarem atividade agonista nos receptores de estrógeno presentes no útero (AN, 2016). Os MSRE também podem ser classificados conforme o grupo químico dos quais fazem parte, a saber: os trifeniletílenos, benzotiofenos, tetrahidronaftílenos, indols e benzopiranos, que determinam diferenças de afinidade e efeito tecidual, tanto entre os fármacos, quanto entre os fármacos e o estradiol (BRYANT, 2002).

2.2.1 Tamoxifeno (TMX)

O TMX, quimicamente pertencente ao grupo dos trifeniletílenos, foi o primeiro MSRE desenvolvido, sendo por este motivo classificado como MSRE de primeira geração (BRYANT, 2002; AN, 2016). Esse fármaco passa por um processo de bioativação, mediado pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) (DESTA *et al.*, 2004), resultando na formação de metabólitos ativos, que apresentam diferenças em relação à afinidade pelo RE e à potência após ligado a este (LIM *et al.*, 2005; JOHNSON *et al.*, 2004), sendo considerando, assim, um pró-fármaco (MURDTER *et al.*, 2011). Os principais metabólitos do TMX são o *N*-desmetil-tamoxifeno e o 4-hidroxi-tamoxifeno, formados por reações de fase 1 do metabolismo, catalisadas por CYP3A4/5 e CYP2D6, respectivamente (DESTA *et al.*, 2004). Relatos anteriores demonstraram que o 4-hidroxi-tamoxifeno apresenta maior afinidade e potência de 30 a 100 vezes maior que a do TMX na supressão do crescimento celular dependente de estrógeno (BORGNA; ROCHEFORT, 1981; COEZY; BORGNA; ROCHEFORT, 1982).

Metabólitos secundários são, ainda, formados a partir do *N*-desmetil-tamoxifeno e do 4-hidroxi-tamoxifeno, dentre estes, o 4-hidroxi *N*-desmetil-tamoxifeno (endoxifeno), cuja afinidade pelo RE e efeito antiestrógeno têm se mostrado semelhantes ao do 4-hidroxi-tamoxifeno (DESTA *et al.*, 2004; JOHNSON *et al.*, 2004; LIM *et al.*, 2005). O TMX e seus metabólitos são, subsequentemente, metabolizados a outros metabólitos de fase 1, assim como a conjugados, por reações de biotransformação de fase 2, sendo eliminados nas fezes, bile e urina (LIEN *et al.*, 1989; MURDTER *et al.*, 2011).

Considerando as particularidades da farmacodinâmica do TMX, tem sido relatado que o RE α é o seu principal alvo, enquanto o papel do RE β ainda está sendo investigado, ao passo que pacientes que apresentam tumores sem quantidades significativas do subtipo α desse receptor raramente respondem ao tratamento com esse fármaco (LEWIS; JORDAN, 2005; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). Nesse contexto, a literatura mostra que, embora o estrógeno induza alterações conformacionais em seus receptores, que favoreçam a ligação de co-ativadores nos subtipos α e β e co-repressores no subtipo β , o TMX recruta co-repressores quando ligado no RE α , mas não no RE β (SMITH; NAWAZ; MALLEY, 1997; WEBB *et al.*, 2003; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). Além disso, Hall e McDonnell (1999) ressaltaram

que a atividade agonista parcial do TMX nos RE α é abolida com a co-expressão de RE β .

O uso clínico do TMX foi primeiramente descrito no tratamento do câncer de mama no ano de 1971, quando Cole *et al.* trataram 46 mulheres com idade entre 30 e 89 anos, por mais de 3 meses, e observaram redução substancial do tamanho do tumor e evidências radiológicas da regressão de metástases pulmonares ou ósseas em 10 pacientes (COLE *et al.*, 1971). Anos depois, foi aprovado para o tratamento do câncer de mama avançado, inicialmente no Reino Unido, em 1973, seguida por liberação pela associação norte americana “Food and Drug Administration” (FDA), em 1977 (PARK; JORDAN, 2002).

Nas décadas de 1980, o TMX foi aprovado como terapia adjuvante do câncer de mama em mulheres pós-menopausa, associado ou não ao tratamento quimioterápico; sendo liberado para uso em mulheres pré-menopausa no ano de 1990. Esse fármaco também foi aprovado, em 1998, para a prevenção da ocorrência do câncer de mama em mulheres, pré e pós-menopausa, com alto risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (PARK; JORDAN, 2002). Outra possibilidade terapêutica do TMX é seu uso neoadjuvante no tratamento do câncer de mama (DAM *et al.*, 2016). Nesse contexto, durante muitos anos, o TMX tem sido o pilar do tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais (SINI *et al.*, 2016), reduzindo substancialmente a ocorrência de recidivas dessa neoplasia, assim como as taxas de mortalidade decorrente da doença (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP, 2005).

O tratamento clínico adjuvante com o TMX, comumente, tem a duração de 5 anos e seus efeitos persistem após esse período, reduzindo consideravelmente as taxas de recidiva durante a primeira década e de mortes decorrentes do câncer, em um terço, nos 15 primeiros anos (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP, 2011). Considerando estes mesmos parâmetros de avaliação da eficácia do TMX, o tempo de tratamento por 5 anos apresenta melhores resultados em relação ao tratamento por 1 a 2 anos, embora esse tempo também seja efetivo (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP, 2005). Resultados do estudo “Adjuvant tamoxifen: Longer against shorter (ATLAS)” demonstraram que a continuação do tratamento com TMX por mais 5 anos, totalizando 10 anos de tratamento, promoveu maior redução de recidivas e mortes

quando comparado ao tratamento por 5 anos. Diante disso, esse grupo de pesquisadores sugeriu que o tratamento com TMX seja de 10 anos, particularmente em mulheres pré-menopáusicas, pois neste grupo de pacientes o risco de efeitos adversos, como complicações vasculares e desenvolvimento de câncer endometrial, é menor (DAVIES *et al.*, 2013).

Em relação a estes efeitos adversos, a utilização do TMX tem sido, de fato, associada ao aumento das ondas de calor típicas da menopausa e a alterações no endométrio, relacionadas ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer endometrial invasivo, hiperplasia endometrial com ou sem atipias, leiomiomas, pólipos e endometriose, assim como corrimento e sangramentos vaginais, devido, sobretudo, a sua ação mista nos receptores de estrógeno do útero. Além disso, têm sido relatadas complicações vasculares, como embolia pulmonar e trombose venosa profunda (FISHER *et al.*, 1998; PEREZ-MEDINA *et al.*, 2011; RUNOWICZ *et al.*, 2011).

Especificamente sobre a ação semelhante ao do estrógeno, o TMX apresenta efeitos protetores no tecido ósseo, observados tanto em estudos com animais, quanto em estudos com humanos. De fato, na década de 1980, estudos em ratas, ovariectomizadas ou não, demonstraram que o TMX não causou efeitos semelhantes à deficiência estrogênica no osso, por outro lado, manteve a densidade óssea estável nas ratas cujos ovários haviam sido removidos (JORDAN; PHELPS; LINDGREN, 1987; TURNER *et al.*, 1987). Perry *et al.*, em 2005, também mostraram que a administração diária de TMX nas doses de 0,1, 1,0 e 10 mg/kg, durante 28 dias em camundongos não-ovariectomizados promoveu a formação de novo osso esponjoso. Ainda, quando administrado a camundongos ovariectomizados, o TMX aumentou a densidade mineral óssea, o conteúdo mineral ósseo e a resistência biomecânica em fêmures e vértebras lombares (CHEN *et al.*, 2011; NUNEZ *et al.*, 2004), assim como aumentou o volume de osso trabecular (SUGIYAMA *et al.*, 2010). Resultados semelhantes também foram observados no osso de ratas *Wistar* ovariectomizadas que receberam TMX em doses diárias de 2 e 4 mg/kg por 3 meses, com prevenção da redução da massa óssea e aumento da densidade e do conteúdo mineral ósseos (CZERNY *et al.*, 2003).

Clinicamente, os resultados em relação ao efeito do TMX no tecido ósseo mostraram-se semelhantes aos achados em animais, sendo observada tanto a preservação da densidade mineral óssea em mulheres pós-menopáusicas que usam

tal medicamento para o tratamento de câncer de mama (LOVE *et al.*, 1992), como o aumento dessa densidade no decorrer do tratamento com TMX (KALDER, *et al.*, 2014). Adicionalmente, em comparação ao placebo, o tamoxifeno reduziu a taxa de fraturas decorrentes da osteoporose (FISHER *et al.*, 2005).

2.3 Inibidores da aromatase (IA)

Os IA, outra possibilidade de tratamento hormonal do câncer de mama, são fármacos que inibem a biossíntese do estrógeno, apresentando, portanto, mecanismo de ação diferente daquele dos MSRE, que agem via receptor (SINI *et al.*, 2016). A síntese do estrógeno é catalisada pela aromatase, uma enzima da superfamília do CYP (CYP19A1) que catalisa a conversão dos andrógenos, testosterona e androstenediona, em estrógenos, estradiol e estrona, respectivamente (SIMPSON *et al.*, 1994). Essa enzima é encontrada em uma variedade de tecidos e órgãos, tais como ovário (ANTONIO-RUBIO *et al.*, 2011), tecido adiposo (BULUN; SIMPSON, 1994) placenta (KELLIS; VICKERY, 1987), tecido vascular (HARADA *et al.*, 1999), osso (NAWATA *et al.*, 1995), além de células mesenquimais do tecido adiposo mamário (O'NEILL; ELTON; MILLER, 1988), cérebro (BALTHAZART *et al.*, 2003), fígado (CASTAGNETTA *et al.*, 2003) e fibroblastos da pele (BERKOVITZ; BROWN; FUJIMOTO, 1987). Entretanto, em mulheres pós-menopausa a principal fonte de estrógeno é proveniente dos sítios extragonadais (CZAJKA-ORANIEC; SIMPSON, 2010), sobretudo do tecido adiposo (NELSON; BULUN, 2001).

Considerando essas fontes não ovarianas de síntese do estrógeno, associada à expressão de receptores hormonais no tecido adiposo mamário malignos (HOWLANDER *et al.*, 2014), bem como às expressão e atividade aumentadas da aromatase nesse tecido em comparação ao tecido normal (CHETRITTE *et al.*, 2000), a inibição dessa enzima configura-se em um importante manejo para o tratamento do câncer de mama positivo para esses receptores hormonais. Nesse contexto, o desenvolvimento dos IA proporcionou outra possibilidade de terapia endócrina adjuvante do câncer de mama, particularmente de mulheres pós-menopausa, e resultou no delineamento de pesquisas clínicas com o propósito de avaliar a eficácia e a segurança desses fármacos em comparação aos MSRE, sobretudo ao TMX (GEISLER *et al.*, 1996; BAUM *et al.*, 2002; DOWSETT *et al.*, 2010; RYDÉN *et al.*, 2016).

Em relação à eficácia, uma meta-análise delineada por Dowsett *et al.* (2010) demonstrou que a utilização de IA como monoterapia ou em combinação com o TMX está associada à redução das taxas de recorrência do câncer de mama em comparação à monoterapia com TMX, além da redução da mortalidade devido à doença quando da combinação de IA com o TMX. Rydén *et al.* (2016) mostraram, também por uma meta-análise, que embora as diferenças absolutas tenham sido relativamente pequenas, a monoterapia por 5 anos com IA aumentou as taxas de sobrevida livre de doença e sobrevida global, em relação à monoterapia com TMX. Considerando os tratamentos iniciados pela administração de TMX, durante os primeiros 2 a 3 anos, seguida pela administração de IA até o 5º ano, ou vice-versa, há um aumento da sobrevida livre de doença em comparação à monoterapia com TMX por 5 anos, mas não em relação à monoterapia com IA (RYDÉN *et al.*, 2016).

No que concerne à segurança, Amir *et al.* (2011), a partir de uma revisão sistemática com meta-análise, concluíram que, comparado ao TMX, o uso de IA como tratamento do câncer de mama diminui o risco de trombose venosa e carcinoma endometrial; no entanto, aumenta a probabilidade do desenvolvimento de problemas cardiovasculares e fraturas ósseas, dado os IA interferirem no metabolismo ósseo, aumentando a taxa de fraturas nas pacientes em uso desses medicamentos. Os achados concernentes ao efeito dos IA no osso podem ser encontrados em estudos longitudinais que comparam diferentes IA ao TMX, delineados por grandes grupos de pesquisa, como: o “Breast International Group 1-98” (COATES *et al.*, 2007), “Intergroup Exemestane Group” (COOMBES *et al.*, 2007) e “The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination (ATAC)” (BAUM *et al.*, 2002).

Os IA são classificados em duas categorias: esteroidais ou tipo I e não-esteroidais ou tipo II. Os compostos esteroidais, representados por formestano e exemestano, são análogos dos substratos naturais da aromatase, a androstenediona e a testosterona, e ligam-se à enzima de forma covalente e irreversível, o que resulta em sua inativação permanente, sendo por esse motivo também chamados de inativadores. Os compostos não-esteroidais, representados por aminoglutetimida, fadrozol, letrozol, anastrozol e vorozol, interagem de forma reversível com a aromatase e a inativação sustentada da enzima depende da presença constante do fármaco no organismo. Ainda, de acordo com a cronologia do seu desenvolvimento, os IA designam-se como de 1ª, 2ª e 3ª geração, sendo a aminoglutetimida de 1ª; o

formestano e o fadrozol, de 2^a; e o exemestano, letrozol, anastrozol e vorozol, de 3^a geração (SAAD *et al.*, 2002; OSBORNE; TRIPATHY, 2005).

2.3.1 Anastrozol (ANA)

O ANA é um derivado triazol (SMITH; DOWSETT, 2003), classificado como IA não-esteróide de terceira geração, e um potente IA administrado por via oral, que reduz substancialmente os níveis circulantes de estrógeno, em aproximadamente 97%, em mulheres pós-menopausa com câncer de mama positivo para receptores hormonais (GEISLER *et al.*, 1996, 2002). Esse fármaco é principalmente metabolizado no fígado, sofrendo oxidação à hidroxianastrozol por CYP3A4 e em menor extensão, por CYP3A5 e CYP2C8. Uma vez formado, esse metabólito sofre glucoronidação, por ação das enzimas UGT1A4, UGT1A3 e UGT2B7, sobretudo da UGT1A4 (KAMDEM *et al.*, 2010), sendo os 3 principais metabólitos do ANA detectados no plasma de pacientes, o hidroxianastrozol e os conjugados de anastrozol e de hidroxianastrozol (INGLE *et al.*, 2010).

O tempo de uso clínico do ANA, assim como o do TMX, comumente é de 5 anos (GEISLER *et al.*, 1996). Vale ressaltar que ambos os fármacos podem ser utilizados combinados, com os primeiros 2 a 3 anos de tratamento com o TMX, sendo trocado pelo ANA até completar o 5^o ano, e vice-versa (RYDÉN *et al.*, 2016). A literatura tem relatado que o ANA pode ser usado tanto como tratamento adjuvante do câncer em mulheres pós-menopausa (BAUM *et al.*, 2002), como também no tratamento neoadjuvante dessas neoplasias (DAM *et al.*, 2016). Ainda, Mocellin *et al.* (2015) relataram que o ANA é uma alternativa para prevenção do câncer de mama e em mulheres de alto risco.

O ANA, no mercado desde 1995 (GEISLER *et al.*, 1996), foi aprovado como medicamento de primeira linha na terapia de mulheres pós-menopausa com câncer de mama, como terapia adjuvante dessas neoplasias em estágios iniciais, em 2002 pelo FDA, uma vez que os IA, incluindo o ANA, têm se mostrado superiores ao TMX (DOWSETT *et al.*, 2010; RYDÉN *et al.*, 2016; BAUM *et al.*, 2002). De fato, a eficácia e a segurança do ANA em comparação ao TMX têm sido amplamente avaliadas por um grupo de pesquisa denominado grupo “The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination” (ATAC). Já em sua primeira publicação, no ano de 2002, foi demonstrando que o ANA era uma opção efetiva e bem tolerada para a terapia endócrina de pacientes com câncer de mama positivo para receptores hormonais,

uma vez que em comparação ao TMX aumentava a sobrevida livre de doença e diminuía a incidência de câncer de mama contralateral, assim como reduzia a incidência de efeitos colaterais, como: câncer endometrial, sangramento vaginal, eventos cerebrovasculares e tromboembólicos (BAUM *et al.*, 2002). No entanto, esses primeiros resultados também demonstraram que o tratamento com ANA aumentava desordens musculoesqueléticas e fraturas, principalmente na coluna (BAUM *et al.*, 2002).

As publicações seguintes do grupo ATAC corroboraram os resultados preliminares descritos por BAUM *et al.* (2002), demonstrando eficácia e segurança superiores do ANA em relação ao TMX quando utilizado como tratamento adjuvante do câncer de mama em mulheres pós-menopausa (BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; ATAC, 2008; CUZICK *et al.*, 2010). Especificamente sobre o efeito do ANA no osso, publicações desse grupo relataram a maior ocorrência de fraturas em pacientes tratadas com esse fármaco (BAUM *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; ATAC, 2008; CUZICK *et al.*, 2010), que, no entanto, não perduram após o término do tratamento (CUZICK *et al.*, 2010). Estes achados podem ser explicados considerando a importância do estrogênio no metabolismo ósseo (EASTELL *et al.*, 2006) e os pesquisadores envolvidos nesse ensaio clínico sugerem que a menor taxa de fraturas em pacientes tratadas com TMX deve-se ao efeito protetor, semelhante ao estrogênio, que o TMX apresenta no osso (BAUM *et al.*, 2002). Além disso, no período de acompanhamento de 10 anos, foi observado que os casos de fraturas no quadril foram semelhantes entre os grupos tratados com ANA e TMX, de forma que seja possível que os efeitos da redução estrogênica promovida pela ANA possam ser maiores em determinados ossos (BAUM *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; ATAC, 2008; CUZICK *et al.*, 2010).

Os efeitos do ANA no osso são observados tanto quando comparado aos efeitos do TMX nesse tecido, como também em diversos estudos que avaliam o ANA sem compará-lo a nenhum outro fármaco, com animais e, sobretudo, em humanos. Especificamente em relação ao uso do ANA, tem sido associado, à maior ocorrência de fraturas que em relação ao TMX, e também à redução da densidade mineral óssea (DMO) no decorrer de 1 a 2 anos de tratamento, enquanto o TMX aumenta essa DMO. Ainda, essa redução de DMO é acompanhada pelo aumento de marcadores de

turnover ósseo, tanto de reabsorção, como também de formação ósseas (EASTELL *et al.*, 2006).

A literatura apresenta poucos estudos em animais acerca do efeito do ANA no osso, e ainda com resultados conflitantes entre si. Assim, enquanto há relatos que o tratamento de ratas não ovariectomizadas por 4 semanas com ANA na dose de 0,2 mg/kg-gavagem reduz a densidade óssea no fêmur desses animais e aumenta os níveis séricos de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e cálcio, indicando aumento da reabsorção óssea (VEKARIYA; KAUR; TIKOO, 2013), existem relatos que uso de ANA por 16 semanas, nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg-gavagem não altera a DMO na vértebra ou no fêmur de ratas não ovariectomizadas (KUMRU *et al.*, 2007).

Clinicamente, o ANA tem evidenciado induzir efeitos deletérios no tecido ósseo em pacientes, visto que diversos ensaios clínicos têm mostrado redução da DMO no decorrer do tratamento com ANA, em diferentes ossos, tais como trocânter, vértebras lombares e quadril, já a partir do primeiro ano (SERGI *et al.*, 2012; KALDER *et al.*, 2013; TAKEUCHI *et al.*, 2014) ou mesmo mais precocemente, aos 6 meses, no fêmur (RASTELLI *et al.*, 2011). Além disso, há relatos de que pacientes não osteoporóticas desenvolveram osteoporose aos 24 meses de tratamento com ANA (SERGI *et al.*, 2012). Szabo *et al.* (2011) também relataram redução do conteúdo total ósseo, e especificamente de osso cortical, de forma que esses autores sugeriram que este achado justifique o risco aumentado de fraturas em pacientes em uso do ANA.

Considerando os efeitos adversos do ANA no osso durante a terapia endócrina do câncer de mama, diversos protocolos sugerem o uso de bisfosfonatos por mulheres com baixa DMO, osteopênicas e osteoporóticas (REID *et al.*, 2008), tais como o risedronato e o alendronato (SESTAK *et al.*, 2014; GREENSPAN *et al.*, 2015; INOUE *et al.*, 2015). Além de bisfosfonatos, também tem sido recomendado o uso de denosumab durante a terapia com IA, particularmente para mulheres osteoporóticas (OTTANELLI, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Diversas doenças podem acometer o sistema ósseo, pelo favorecimento ou detrimento dos processos de reabsorção e formação ósseas. Dentre as doenças reabsortivas, destacam-se a osteoporose e a periodontite, doenças prevalentes e que podem ser modificadas por fatores locais e sistêmicos, tais como processos inflamatórios e a deficiência estrogênica típica da menopausa.

A utilização de fármacos que modulem os receptores de estrógeno ou inibam a síntese desse hormônio afetam a homeostase óssea e, portanto, podem interferir nas doenças decorrentes desse desequilíbrio. Dentre estes fármacos, o tamoxifeno e o anastrozol têm sido cada vez mais utilizados devido à elevada prevalência de cânceres de mama positivos para receptores hormonais. O tamoxifeno, ao modular os receptores de estrógeno no osso apresenta efeitos protetores nesse tecido, enquanto o anastrozol, ao reduzir a síntese de estrógeno, promove efeitos deletérios no osso, como aumento da taxa de fraturas, devido à redução da densidade mineral óssea.

De maneira geral, esses fármacos são bastante estudados em diferentes ossos do esqueleto, como fêmur, tíbia e vértebras, os quais possuem origem embrionária semelhante, endocondral. Ao passo que os efeitos desses fármacos no osso alveolar, cuja origem embrionária é membranosa, não têm sido explorados, havendo um único estudo que investigou a correlação de parâmetros clínicos periodontais ao uso de inibidores da aromatase. Ao nosso conhecimento, essa pesquisa consiste no primeiro trabalho pré-clínico em que se avaliaram os efeitos do tamoxifeno e do anastrozol no osso alveolar submetido à periodontite em ratas ovariectomizadas.

4 OBJETIVOS

4.3 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da modulação dos receptores de estrógeno por tamoxifeno (TMX) e da inibição da síntese desse hormônio por anastrozol (ANA) na periodontite induzida por ligadura em ratas hipoestrogênicas por ovariectomia.

4.4 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos da ovariectomia na resposta inflamatória vista na periodontite por ligadura em ratas;
- Avaliar os efeitos do TMX e do ANA na resposta inflamatória da periodontite por ligadura em ratas hipoestrogênicas;
- Avaliar as repercussões sistêmicas do TMX e do ANA nos níveis séricos de estradiol e de fosfatases alcalinas total e óssea, no leucograma, no peso úmido uterino, na variação massa corpórea e nos fêmures de ratas hipoestrogênicas.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizadas 170 ratas *Wistar (Rattus norvegicus)*, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC, transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (FaMed, UFC-Fortaleza), e mantidos em gaiolas apropriadas, com o máximo de 6 animais em cada uma delas. As ratas receberam ração comercial balanceada própria à espécie e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais, e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em uso de Animais da Universidade Federal do Ceará-CE, Brasil (número de protocolo 84/13).

5.2 Fármacos, reagentes e anticorpos

Para as abordagens farmacológicas, foram utilizados o Cloridrato de Tamoxifeno 20 mg (Citrato de Tamoxifeno™, Salutas Pharma GmbH, Barleben, Alemanha), e o Anastrozol 1 mg (Arimidex, Astrazeneca™, Newark, DE, EUA), ambos diluídos em água destilada (H₂O_d).

Para anestesia dos animais, foi utilizada a combinação de quetamina (Cetamin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) com cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil). O formol, o álcool etílico absoluto, o EDTA e a solução pronta de hematoxilina de Harris, utilizados nas diferentes análises, foram obtidos da Dinâmica (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil).

O brometo de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB), a albumina sérica bovina (BSA), a tetrametilbenzidina (TMB) e o Tween-20 foram comprados da Sigma (St Louis, Missouri, EUA).

Para os ensaios imunológicos por Elisa, foram utilizados kits da R&D Systems (Minneapolis, MS, EUA) para TNF- α . Para os ensaios de imunohistoquímica foram utilizados os anticorpos primários policlonais de cabra TNF- α , TRAP, RANKL e OPG, com os respectivos secundários anti-cabra e sistema ABC, todos fornecidos pela Santa Cruz (Dallas, TX, EUA) e diluídos no diluente de anticorpo com redução

de *background* da DAKO (Carpinteria, CA, EUA). O sistema de coloração para imunohistoquímica, cromógeno 3,3`diaminobenzidine DAB/peróxido, foi adquirido da DAKO (Carpinteria, CA, EUA).

Para quantificação dos níveis séricos das enzimas fosfatases alcalinas, foi utilizado o kit do fabricante LABTEST® (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil). O kit de coloração utilizado para realização do leucograma dos animais foi obtido da Instant Prov Stain Set® (Newprov Produtos para Laboratório, Pinhais, PR, Brasil).

5.3 Protocolo experimental

Inicialmente, no momento denominado dia 0, os animais tiveram seus ovários removidos ou somente expostos para simulação do estresse cirúrgico. Após anestesia com a combinação de quetamina (90 mg/kg-im) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg-im) e tricotomia da região abdominal, a pele e o músculo foram incisados longitudinalmente abaixo da última costela. Os ovários foram, então, identificados e expostos (Figura 2).

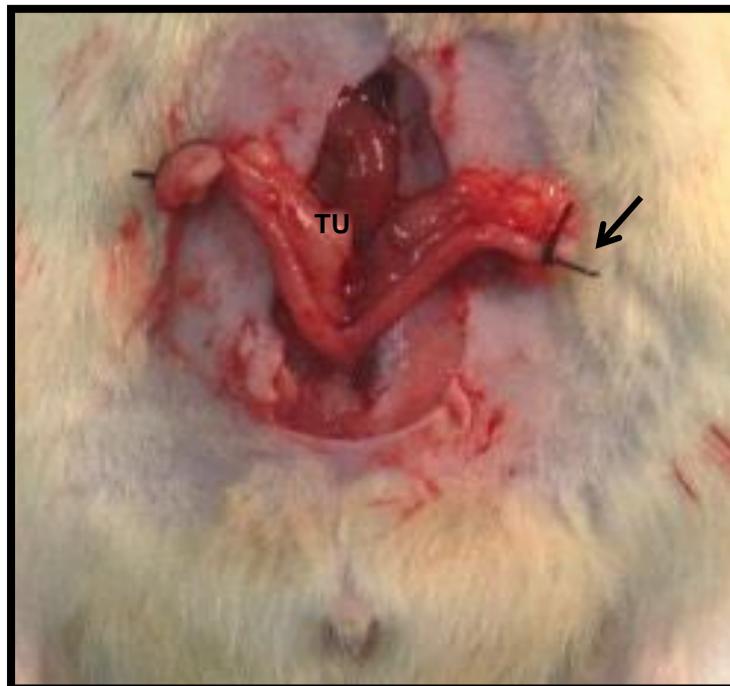


Figura 2: Fotografia ilustrando a ovariectomia. Após a hemostasia, através de ligadura (seta) da tuba uterina (TU), os ovários foram removidos juntamente com o tecido adiposo circunvizinho. Arquivo pessoal.

Nos animais ovariectomizados, após a hemostasia, por meio de ligadura das tubas uterinas com fio de seda (4.0; TechNew[®], Rio de Janeiro, RJ, Brasil), os ovários foram removidos juntamente com o tecido adiposo circunvizinho (Figura 2). Nos animais falso-ovariectomizados, os ovários foram expostos e reposicionados na cavidade abdominal (ANBINDER *et al.*, 2007). A camada de músculo e, posteriormente, a pele foram suturadas com fio de náilon (4.0; Procare[®], Barueri, SP, Brasil).

Uma semana após a cirurgia de ovariectomia (LIU *et al.*, 2010), no dia 7, a periodontite foi induzida como descrito por Lima *et al.* (2000), através da inserção de um fio de náilon (3.0; Procare[®], Barueri, SP, Brasil) em torno do segundo molar superior esquerdo de uma rata sob anestesia com a combinação de quetamina (90 mg/kg-im) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg-im). Previamente à passagem do fio, uma guia foi utilizada nos espaços interproximais mesial e distal do dente citado. Logo em seguida, o fio foi passado, de forma que o nó cirúrgico ficou voltado para a face vestibular da cavidade oral do animal, resultando em uma posição sub-gengival no lado palatino e supra-gengival no lado vestibular (Figura 3). A hemiarcada contralateral foi utilizada como controle sem ligadura. No dia 0, foi iniciada a administração diária de H₂O_d, de Anastrozol (ANA) ou de Tamoxifeno (TMX). Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, 21 dias após a indução da periodontite e 28 dias após a ovariectomia (LIU *et al.*, 2010), no momento denominado dia 28.

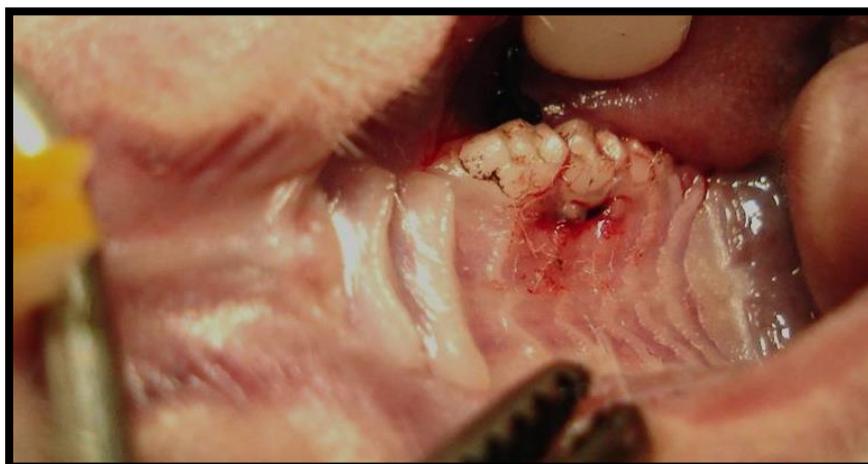


Figura 3: Fotografia ilustrando a indução da periodontite. A periodontite foi induzida pela inserção do fio de náilon 3.0 em torno do 2º molar superior esquerdo, com o nó voltado para a face vestibular do dente citado. Arquivo pessoal.

A Figura 4 resume o protocolo experimental.

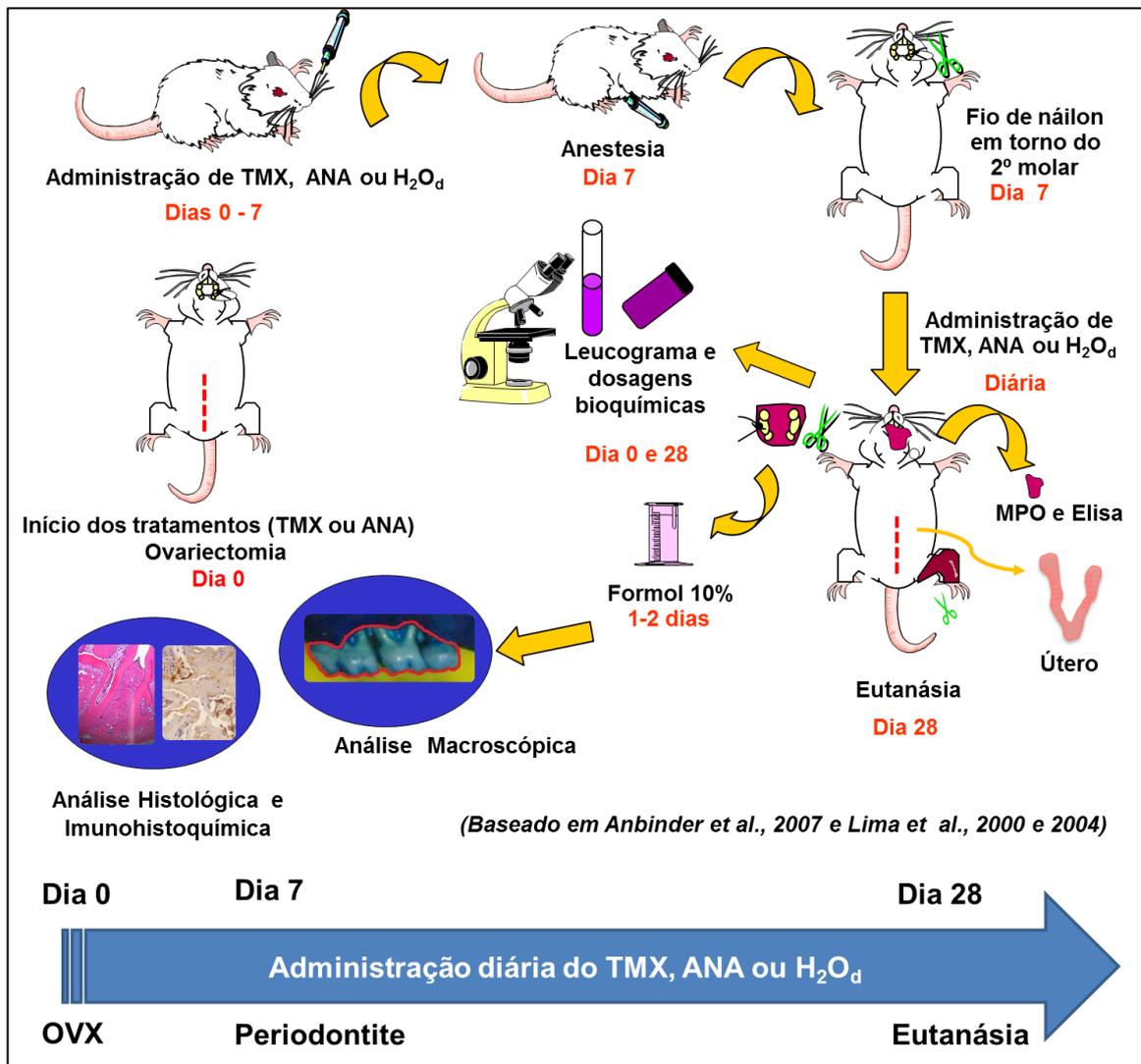


Figura 4: Esquema do protocolo experimental. No dia 0, foi iniciada a administração de água destilada (H₂O_d), de tamoxifeno (TMX) ou de anastrozol (ANA), bem como foi realizada a ovariectomia (OVX) nos animais, sob anestesia com a combinação de quetamina e cloridrato de xilazina. Sete dias após este procedimento, no dia 7, a periodontite foi induzida por ligadura. No dia 28, os animais foram eutanasiados e a gengiva, maxila, fêmur e útero foram removidos para posteriores análises. Nos dias 0 e 28, foi realizado o leucograma e coletadas amostras sanguíneas para dosagens de fosfatase alcalina óssea e estradiol.

5.4 Grupos experimentais

5.4.1 Grupo Normal

Grupo constituído por 10 ratas que não foram submetidas às cirurgias de ovariectomia e de indução da periodontite. Esses animais foram acompanhados durante todo o período experimental, sendo eutanasiados no final deste.

5.4.2 Grupo falso-ovariectomizado (F-OVX)

Para cada tratamento, houve um grupo constituído por 10 ratas falso-ovariectomizadas e submetidas à periodontite. Os animais receberam por gavagem H₂O_d (2 ml/kg) diariamente por todo o período experimental, sendo então, eutanasiados 21 dias após a indução da periodontite.

5.4.3 Grupo ovariectomizado (OVX)

Para cada tratamento, houve um grupo constituído por 10 ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite. Os animais receberam por gavagem H₂O_d (2 ml/kg) diariamente por todo o período experimental, sendo então, eutanasiados 21 dias após a indução da periodontite.

5.4.4 Grupo OVX tratado com TMX (OVX/TMX)

Esse grupo foi constituído por 3 subgrupos com 10 ratas ovariectomizadas em cada e submetidas à periodontite. Os animais receberam por gavagem TMX nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg (CZERNY *et al.*, 2003; GOSS; QI; HU, 2009; PERRY *et al.*, 2005), respectivamente, diariamente por todo o período experimental, sendo então, eutanasiados 21 dias após a indução da periodontite.

5.4.5 Grupo F-OVX tratado com ANA (F-OVX/ANA)

Esse grupo foi constituído por 10 ratas F-OVX submetidas à periodontite. Os animais receberam por gavagem ANA na dose de 0,5 mg/kg, diariamente por todo o período experimental, sendo então, eutanasiados 21 dias após a indução da periodontite.

5.4.6 Grupo OVX tratado com ANA (OVX/ANA)

Esse grupo foi constituído por 3 subgrupos com 10 ratas ovariectomizadas em cada e submetidas à periodontite. Os animais receberam por gavagem ANA nas doses de 0,02; 0,1 e 0,5 mg/kg (HOZUMI *et al.*, 2002; KUMRU *et al.*, 2007; VEKARIYA; KAUR; TIKOO, 2013), respectivamente, diariamente por todo o período experimental, sendo então, eutanasiados 21 dias após a indução da periodontite.

5.5 Parâmetros avaliados na doença periodontal experimental

5.5.1 Análise macroscópica do osso alveolar

Após 21 dias da indução da periodontite, os animais foram eutanasiados (LIU *et al.*, 2010) e suas maxilas removidas e fixadas em formol tamponado a 10%, durante 24 horas. Em seguida, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas, dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade (LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea alveolar (ROA), estas hemiarcadas esquerdas foram acomodadas com massa de modelar em lâminas para posterior registro fotográfico em câmera digital. As imagens foram, então, avaliadas junto ao programa de computador Image J (ImageJ 1.48x, National Institute of Health; EUA), considerando demarcação desde a ponta de cúspide até a borda óssea remanescente, subtraída da respectiva área da hemiarcada contralateral normal. Essa área foi comparada à outra previamente conhecida (5 x 5 mm²) (GUIMARÃES *et al.*, 2016) (Figura 5).

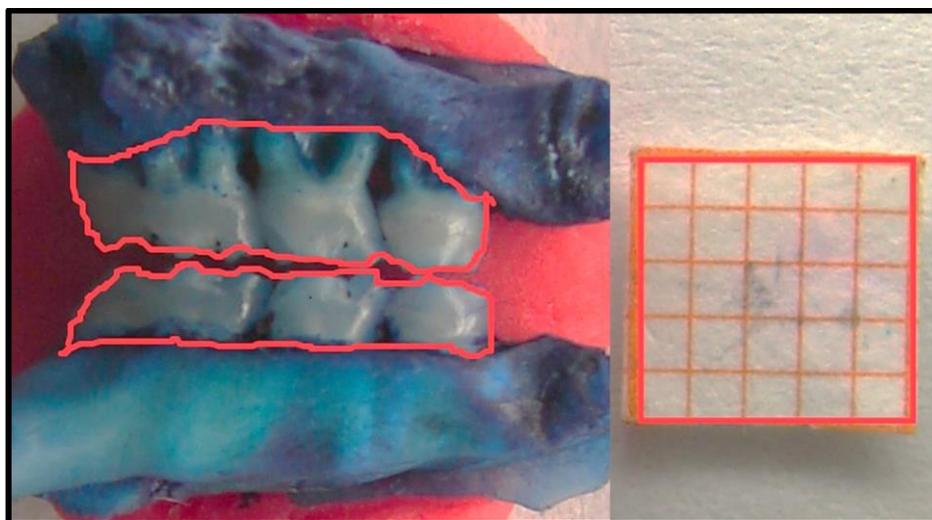


Figura 5: Desenho esquemático da mensuração da área de reabsorção óssea alveolar na análise macroscópica. Linha vermelha demarcando a área entre a ponta de cúspide e a borda óssea remanescente da hemiarcada submetida à periodontite e da contralateral normal. Essas áreas, obtidas em pixels, são subtraídas e comparadas com a área conhecida do quadrado milimetrado, fotografado junto com as hemiarcadas.

5.5.2 Análises histológicas

As análises histológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada maxilar. Para tanto, o mesmo protocolo de indução da periodontite foi novamente realizado nos grupos F-OVX, OVX, OVX/TMX 9 mg/kg, F-OVX/ANA 0,5

mg/kg e OVX/ANA 0,5 mg/kg, com 10 animais em cada grupo, totalizando um adicional de 50 animais. Para tanto, as hemiarcadas foram submetidas à desmineralização com EDTA a 10%, por aproximadamente 30 dias. Posteriormente, essas foram suspensas em banho em água corrente por 12 horas e desidratadas em banhos sucessivos de etanol. As peças foram, então, incluídas em parafina para realização de cortes longitudinais seriados de 4 μm em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina.

5.5.2.1 Análise histométrica

A área de furca do segundo molar foi considerada para avaliação histométrica. Para tal, imagens foram obtidas dessa região em microscópio (x40) e lançadas em um programa de computador Image J (ImageJ 48x, National Institute of Health; EUA) para quantificação da área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca (Figura 6), sendo esta comparada com uma medida conhecida (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

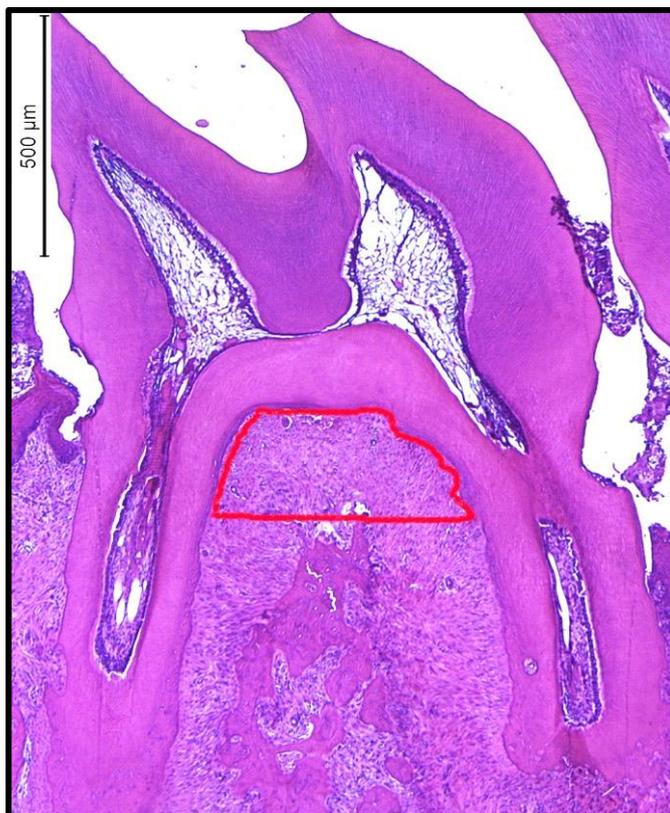


Figura 6: Desenho esquemático da mensuração da reabsorção óssea alveolar na análise histométrica. Reabsorção óssea alveolar correspondente ao valor da área entre o ponto mais alto da crista óssea remanescente e o teto da furca, comparada a um valor conhecido em mm^2 .

5.5.2.2 Análise histológica semiquantitativa

Para a análise histológica da hemiarcada, a região entre os 1^o e 2^o molares do periodonto de proteção e do periodonto de sustentação foi considerada (x40 e 400), sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular e de osteoclastos, além do estado de preservação do processo alveolar e do cimento, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 3, de acordo com a intensidade dos achados (LIMA *et al.*, 2000):

Escore 0: Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado.

Escore 1: Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado.

Escore 2: Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento.

Escore 3: Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento.

5.5.2.3 Análise imunohistoquímica do periodonto

Para tal análise, os mesmos blocos utilizados na análise histológica foram cortados em cortes seriados (4 μ m) em lâminas com poli L-lisina (Probe on Plus[®]) adequadas para a técnica de imunohistoquímica. Em seguida, os cortes seriados foram desparafinizados em estufa a 60 °C, re-hidratados e imersos em tampão de citrato 0,1 M (pH 6,0) sob aquecimento a 60-100 °C em banho-maria, por 30 minutos. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foi feita lavagem com solução tamponada de fosfato (PBS), seguida pelo bloqueio da peroxidase endógena, com solução de H₂O₂ a 3% para todos os anticorpos. Para a imunohistoquímica para marcação de OPG, RANKL e TRAP, previamente a incubação com o anticorpo primário, foi realizado o bloqueio de proteína com albumina sérica bovina (BSA) a 5%. A seguir, a incubação com um dos anticorpos primários anti-TNF- α , anti-OPG, anti-RANKL e anti-TRAP, diluídos nas concentrações de 1:100 no diluente de anticorpo com redução de *background* da Dako, foi feita *overnight*. Após a lavagem, foi feita incubação com anticorpo (secundário) biotilado anti-IgG, também diluído no diluente de anticorpo com redução de *background* da Dako, por 30 minutos.

Durante esse período, o complexo ABC foi preparado, para incubação posterior, conforme instruções do fabricante. Após nova lavagem com PBS, uma coloração com o cromógeno 3,3`diaminobenzidine DAB/peróxido foi feita, seguida por uma nova contracoloração com hematoxilina de Harries. Os controles negativos foram processados simultaneamente como descritos acima, sendo que o primeiro anticorpo foi substituído por PBS-BSA 5%. Por fim, foi realizada a desidratação em uma série de concentrações de alcoóis, e clareamento em xilol das amostras e finalmente, as respectivas montagens das lâminas e lamínulas.

A região interproximal entre o primeiro e segundo molares, bem como a área de furca desses dentes foi considerada para análise das lâminas obtidas por imunohistoquímica. Para tal, imagens de 2 campos da região interproximal e 3 campos de cada região de furca foram obtidas em microscópio (x400) e lançadas em um programa de computador Image J (ImageJ 48x, National Institute of Health; EUA) para quantificação das células imunomarcadas, utilizando a ferramenta “cell counter”. As células foram contadas de forma cega. Os dados foram apresentados como número de células imunomarcadas para TNF- α , OPG, RANKL ou TRAP por campo.

5.5.3 Análise da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Após a eutanásia dos animais utilizados para análise histológica, delicadamente foram removidas amostras do tecido gengival subjacente à área desafiada na hemiarcada esquerda, bem como na hemiarcada direita dos animais F-OVX, mantidos a -80 °C em freezer e posteriormente homogeneizados e processados para a análise em Leitor Automático de Placas da atividade da mieloperoxidase, enzima abundante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. Essa enzima tem sido utilizada como um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos ativos nos processos inflamatórios em vários tecidos, e foi realizado protocolo usando uma versão modificada de Bradley; Christensen; Rothstein, 1982 (LIMA *et al.*, 2005).

Para isso, a gengiva de animais foi pesada e triturada usando Polytron Ultraturrax em solução tampão, sob resfriamento com gelo [100 mM (p/v) NaCl, 15 mM (p/v) EDTA; 20 mM (p/v) NaPO₄; pH: 4,7] e o homogenato será centrifugado a 4 °C durante 15 min (3 g). O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C para o ensaio de ELISA. O *pellet* foi, então, ressuspendido em solução hipotônica [900 μ l de 0,2% (p/v) NaCl; 900 μ l de 1,6% (p/v) NaCl; 900 μ l de 5% (p/v) glicose] e centrifugado

novamente a 4 °C durante 15 min (3 g). O *pellet* final foi ressuspenso numa solução tampão [50 mM NaPO₄, 0,5% (p/v) brometo de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB) sólido; pH: 5,4], homogeneizado e centrifugado novamente a 4 °C durante 15 min (10 g). O sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO usando tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM), e a concentração de MPO foi determinada por meio da medição da mudança da absorvância a 450 nm. Os valores foram expressos em quantidade de atividade de MPO por grama de gengiva em comparação à curva padrão de neutrófilos, obtidos da cavidade peritoneal de ratos através da indução da migração neutrofílica pela injeção intraperitoneal de carragenina (300 µg por animal). A curva padrão relacionando número de neutrófilos (>90% de pureza) e absorvância foi obtida por processamento de neutrófilos purificados, como descrito acima, e ensaiado por atividade de MPO.

5.5.4 Análise de ELISA para TNF-α

O sobrenadante obtido no ensaio de MPO foi utilizado para quantificar os níveis TNF-α por ELISA. Inicialmente, placa de 96 poços foi incubada *overnight* a 4 °C com anticorpo anti-TNF-α, diluído em PBS na concentração de 1:1000. A placa foi, então, lavada com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05%) e incubada por 4 h com BSA 1% para bloqueio de proteína. Em seguida, as amostras foram adicionadas e a curva padrão foi adicionada em várias diluições e incubada *overnight* a 4 °C. A placa foi, então, lavada três vezes com solução tampão PBS/Tween-20 (0,05%) e incubada com anticorpo monoclonal biotilado anti-TNF-α (1:1000 com BSA/Tween 1%). Após o período de incubação à temperatura ambiente por 2 h, a placa foi lavada e 100 µl do complexo HRP-estreptavidina diluído 1:5000 foram adicionados. Decorridos 20 min, o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 µl) foi adicionado e a placa foi incubada na ausência de luz a 37 °C por 20 min. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (1M) e a densidade óptica foi medida a 490 nm em leitor de placas tipo ELISA. A concentração da citocina contida nas amostras foi calculada a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida por diluição seriada, sendo a concentração inicial de 4000 pg/ml. O resultado foi expresso em picograma de citocinas por miligrama de tecido (CUNHA *et al.*, 1993).

5.6 Análise histológica do fêmur

Para a avaliação histológica, o fêmur direito dos animais utilizados para análise histológica da maxila foi removido e dissecado, fixado em formol tamponado a 10%, durante 24 horas, e submetido à desmineralização com EDTA a 10%. Posteriormente, foi suspenso em banho em água corrente por 12 horas e desidratadas em banhos sucessivos de etanol. As peças foram, então, incluídas em parafina para realização de cortes longitudinais seriados de 5 µm em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina e analisadas por patologista experiente, de forma cega. Após a descrição das características feita pelo patologista, o sistema de escores abaixo foi desenvolvido para fornecer uma análise semiquantitativa:

Escore 0: Sem alterações na epífise ou no periósteo.

Escore 1: Presença de tecido conjuntivo fibroso com raros ou sem osteoclastos na epífise.

Escore 2: Presença de tecido conjuntivo fibroso com raros ou sem osteoclastos na epífise, além de espaços medulares amplos.

Escore 3: Presença de tecido conjuntivo fibroso com raros ou sem osteoclastos na epífise, além de espaços medulares amplos e inflamação no periósteo.

5.7 Parâmetros sistêmicos

5.7.1 Dosagem sérica de estradiol

Nos dias 0 e 28, amostras sanguíneas foram coletadas do plexo orbital dos animais dos grupos F-OVX, OVX, OVX/TMX 9 mg/kg, F-OVX/ANA 0,5 mg/kg e OVX/ANA 0,5 mg/kg, com microcapilares heparinizados, centrifugadas (1.800 g x 10 min) e o sobrenadante congelado a -80 °C até o momento da dosagem de estradiol, realizado pelo método de quimioluminescência.

5.7.2 Dosagem sérica da fosfatase alcalina óssea (FAO)

Nos dias 0 e 28, amostras sanguíneas foram coletadas do plexo orbital dos animais dos grupos F-OVX, OVX, OVX/TMX 9 mg/kg, F-OVX/ANA 0,5 mg/kg e OVX/ANA 0,5 mg/kg, com micro-capilares heparinizados, centrifugadas (1.800 g x 10 min) e o sobrenadante congelado a -80 °C e a atividade osteoblástica foi avaliada

através da dosagem indireta da isoforma óssea da Fosfatase Alcalina Total (FAT), Fosfatase Alcalina Óssea (FAO). A quantificação foi feita utilizando a metodologia da inativação térmica de amostras (MOSS; WHITBY, 1975), por meio de “Kits” do fabricante LABTEST®. O procedimento de dosagem de Fosfatase Alcalina total como descrito a seguir:

Após a identificação dos tubos de ensaio em Branco, Amostra e Padrão, adicionou-se, em todos os tubos, a quantidade de 250 µl do tampão e 25 µl de substrato. Posteriormente, adicionou-se 25 µl da amostra nos tubos assim identificados e 25 µl de padrão no tudo assim identificado inicialmente. Após homogeneização, todos os tubos foram submetidos ao aquecimento indireto a 37 °C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 1 ml do reagente de cor em todos os tubos para que fossem efetuadas as leituras espectrofotométricas em 590 nm. A FAO é determinada pela diferença da dosagem da FAT (constituída pelas isoformas: hepática, entérica e óssea) subtraída da dosagem realizada com a amostra aquecida a 56 °C por 10 min, seguindo a mesma sequência de passos descritos acima

5.7.3 Leucograma

Nos dias 0 e 28, os animais dos grupos F-OVX, OVX, OVX/TMX 9 mg/kg, F-OVX/ANA 0,5 mg/kg e OVX/ANA 0,5 mg/kg sob anestesia com a combinação de quetamina (90 mg/kg-im) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg-im) tiveram a ponta da cauda do animal seccionada com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Adicionalmente, outra gota de sangue foi colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método hematoxilina e eosina para as contagens diferenciais usando kit de coloração.

5.7.4 Análise do útero

Na eutanásia, o útero dos animais foi removido e pesado. Os valores foram expressos como o índice uterino (peso úmido do órgão dividido pelo peso do animal no dia da eutanásia) (SILVA *et al.*, 2010).

5.7.5 Análise da variação de massa corpórea

Todos os animais tiveram suas massas corpóreas medidas no dia 0, antes da exposição ou remoção dos ovários, e após esta, diariamente, durante todo o período experimental. Os valores encontrados foram expressos como a variação de massa corpórea (g) em relação à massa inicial.

5.8 Análise estatística

Os resultados paramétricos, de acordo com a normalidade, foram expressos em média (Me) \pm erro padrão da média, e para comparações entre os grupos foram utilizados One Way Anova seguida pelo teste de Bonferroni ou Two Way Anova seguida pelo teste de Tukey. Os dados não paramétricos foram expressos como Mediana (Md) seguida dos seus valores extremos, e os testes estatísticos aplicados foram Kruskal-Wallis e Dunn. Em todas as situações, foi adotado o nível de significância $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPadPrism® versão 6.0, com cópia autorizada (La Jolla-CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Efeitos da ovariectomia em animais submetidos à periodontite

A tabela 1 mostra que após 28 dias de remoção dos ovários, houve redução significativa ($p < 0,05$) dos níveis séricos de estradiol em 50,35%, quando comparados aos valores basais (Normal), e em 43,20% em relação aos animais falso-ovariectomizados (F-OVX), caracterizando, assim, um estado de hipoestrogenia. Corroborando esses achados, os animais ovariectomizados (OVX) apresentaram índice uterino significativamente menor ($p < 0,05$) que o de animais Normais e F-OVX, em 53,14% e 59,91%, respectivamente.

Tabela 1 – Efeitos da ovariectomia nos níveis séricos de estradiol e índice uterino de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
		Periodontite	
Estradiol (pg/ml)	33,9±6,2	29,7±3,1	16,8±1,1 ^{#,*}
Índice uterino ($\times 10^{-3}$)	3,9±0,0007	4,6±0,0003	1,8±0,0001 ^{#,*}

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a média±erro padrão da média dos níveis séricos de estradiol e índice uterino (razão entre peso úmido do órgão e o peso dos animais no dia da eutanásia) de animais Normais (valores basais ou um grupo de animais não manipulados), de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) e OVX, de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. ^{#,*} $p < 0,05$ em relação ao Normal e ao F-OVX, respectivamente.

Macroscopicamente, a ligadura do segundo molar superior esquerdo causou importante reabsorção óssea alveolar (ROA) (tabela 2) nos animais F-OVX, com exposição radicular e lesão de furca (figura 7B). A redução sérica do estradiol induzida pela ovariectomia (OVX) não aumentou a ROA em relação à observada no grupo F-OVX (tabela 2), com aspectos semelhantes entre ambos os grupos ($p > 0,05$; figura 7B e 7C). Confirmando esses achados, a histometria da área de furca do segundo molar indicou que a periodontite induzida por ligadura aumentou ($p < 0,05$) a área entre o teto da furca e a crista óssea remanescente nos animais F-OVX ou OVX, em 451,72% e 448,28%, respectivamente, quando comparada à área correspondente contralateral (Normal) de animais F-OVX (tabela 2), indicando ROA significativa nessa região. A ovariectomia não aumentou a ROA na região de furca em relação à observada em animais F-OVX (tabela 2).

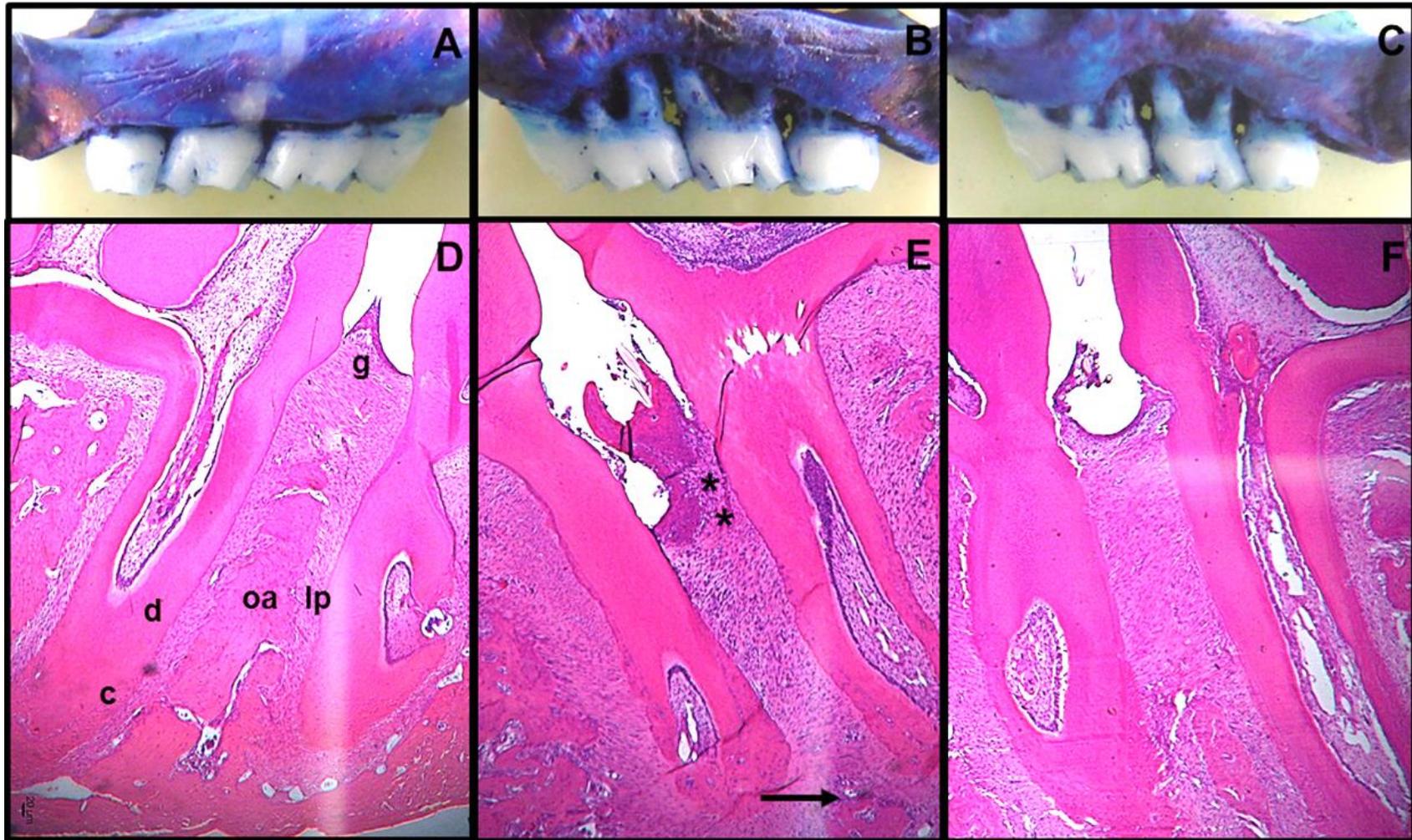


Figura 7: Aspectos macroscópico (A-C) e histológico (D-F) da maxila Normal (A e D) ou da maxila de animais falso-ovariectomizados (B e E) ou ovariectomizados (C e F) submetidos à periodontite. Os animais foram ovariectomizados e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após a eutanásia, no 28º dia, as maxilas foram processadas para análise macroscópica ou histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 20 µm). g, lp, oa, c e d representam gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar, cimento e dentina, respectivamente. Os asteriscos indicam infiltrado leucocitário e a seta indica reabsorção óssea alveolar.

Somando aos achados da macroscopia e da histometria do osso alveolar, a análise histológica do periodonto demonstrou que a indução da periodontite em animais F-OVX e OVX, considerando a região entre primeiro e segundo molares, causou ($p < 0,05$) intenso infiltrado inflamatório leucocitário na gengiva e no ligamento periodontal, acentuada ROA, destruição parcial do cemento radicular, com poucos osteoclastos, em relação ao periodonto normal sem ligadura, caracterizado por infiltrado inflamatório ausente ou esparso restrito na região da gengiva marginal, ausência ou poucos osteoclastos, e processo alveolar e cemento radicular preservados [Normal: Md=0 (0-0); F-OVX: Md=2 (1-3); OVX: Md=2,5 (1-3)] (tabela 2, figura 7D, E e F). A ovariectomia não aumentou a ROA na região de furca em relação à observada em animais F-OVX (tabela 2). A ovariectomia, contudo, não aumentou o infiltrado inflamatório, a ROA e a destruição do cemento radicular na região considerada, quando comparada ao periodonto de animais F-OVX ($p > 0,05$; tabela 2, figura 7E e F).

Tabela 2 – Efeitos da ovariectomia nos aspectos macroscópicos e microscópicos do periodonto de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
		Periodontite	
Macroscopia (mm ²)	-	5,32±0,26	5,59±0,23
Histometria (mm ² x 10 ⁻⁷)	5,8±0,6	32,0±3,8 [#]	31,8±4,8 [#]
Histologia periodonto (escores)	0 (0-0)	2 (1-3) [#]	2,5 (1-3) [#]

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a média±erro padrão da média da reabsorção óssea alveolar (macroscopia), da área na região de furca do 2º molar superior (histometria) ou a mediana (valores extremos) dos escores (histologia) de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizado (F-OVX) ou OVX, de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. [#] $p < 0,05$ em relação ao Normal.

Particularmente quanto ao infiltrado inflamatório leucocitário aumentado visto histologicamente, observou-se que a indução da periodontite resultou no aumento ($p < 0,05$) da atividade de mieloperoxidase (MPO), uma enzima utilizada como marcador da presença neutrofílica, em 45,45% e 418,18% no tecido gengival de animais F-OVX ou OVX, respectivamente, em relação à observada no tecido de hemiarçadas normais (tabela 3), indicando um aumento da quantidade de neutrófilos ativos nesse tecido. A OVX promoveu um aumento adicional ($p < 0,05$) da atividade de

MPO no tecido gengival em 256,25% em relação à observada no grupo F-OVX (tabela 3).

Quanto aos níveis de TNF- α avaliados por Elisa, os animais F-OVX e OVX apresentaram valores maiores ($p < 0,05$) dessa citocina no tecido gengival quando comparados ao tecido gengival normal (F-OVX: 221,05% e OVX: 210,53%) (tabela 3). A OVX não aumentou os valores de TNF- α em relação aos observados em animais F-OVX (tabela 3). Corroborando esses achados, as imunomarcações de TNF- α no periodonto de animais F-OVX e OVX submetidos à periodontite foram maiores ($p < 0,05$) quando comparadas às do periodonto normal sem ligadura, assim como a OVX não aumentou essas imunomarcações em relação às de periodonto de animais F-OVX (tabela 4, figuras 14 e 25).

Tabela 3 – Efeitos da ovariectomia na atividade de mieloperoxidase (MPO) e nos níveis de TNF- α no tecido gengival de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
	-	Periodontite	
MPO (Ux10 ³ /mg de gengiva)	0,33±0,03	0,48±0,05 [#]	1,71±0,48 ^{#,*}
TNF- α (pg/mg de gengiva)	0,19±0,07	0,61±0,07 [#]	0,59±0,13 [#]

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a média±erro padrão da média da atividade de MPO e dos níveis de TNF- α no tecido gengival de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizado (F-OVX) ou OVX, de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. ^{#,*} $p < 0,05$ em relação ao Normal e ao F-OVX, respectivamente.

Considerando os marcadores de metabolismo ósseo, observou-se aumento significativo da imunomarcação para RANKL em hemiarçadas de animais F-OVX e OVX em relação à observada em hemiarçada normal, não desafiada com a ligadura (tabela 4, figuras 15 e 26). Esse aumento foi acompanhado pela redução ($p < 0,05$) da imunomarcação para OPG no periodonto de animais submetidos à periodontite, F-OVX e OVX, quando comparada à imunomarcação do periodonto normal (tabela 4, figuras 16 e 27), o que de fato está coerente com a razão entre RANKL/OPG, que se encontra aumentada naqueles animais, em relação aos animais em que a periodontite não foi induzida (Normal) (tabela 4). Corroborando, foi observado um aumento ($p < 0,05$) de células imunomarcadas para TRAP na maxila de animais F-OVX e OVX em relação ao periodonto Normal (tabela 4, figuras 17 e 28). A OVX, por sua vez, não interferiu nas imunomarcações para RANKL (figuras 15 e 26),

OPG (figuras 16 e 27), RANKL/OPG e TRAP (figuras 17 e 28) quando comparadas às imunomarcações observadas no periodonto de animais F-OVX (tabela 4).

Além dos ossos alveolares, foram também avaliados os fêmures quanto aos efeitos da ovariectomia em ratas submetidas à periodontite por ligadura. A redução dos níveis séricos de estradiol nos animais OVX por 28 dias não causou alterações significantes ($p > 0,05$) na epífise e no periósteo do fêmur desses animais, em relação ao fêmur de animais Normais ou F-OVX [Normal: Md= 0 (0-0); F-OVX: Md=0 (0-0); OVX: Md=0 (0-1); $p < 0,05$]. De forma interessante, alguns animais OVX apresentaram tecido conjuntivo fibroso com raros ou ausência de osteoclastos na epífise do fêmur (tabela 5, figura 8).

Tabela 4 – Efeitos da ovariectomia na marcação imunohistoquímica (IHQ) para TNF- α , RANKL, OPG, RANKL/OPG e TRAP no periodonto de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
		Periodontite	
IHQ - TNF- α (células/campo)	34,06 \pm 5,19	89,5 \pm 9,21 [#]	79,96 \pm 8,69 [#]
IHQ - RANKL (células/campo)	8,03 \pm 2,93	40,94 \pm 3,25 [#]	39,88 \pm 3,44 [#]
IHQ - OPG (células/campo)	67,25 \pm 4,65	45,53 \pm 4,38 [#]	41,31 \pm 6,03 [#]
IHQ - RANKL/OPG (células/campo)	0,13 \pm 0,05	0,94 \pm 0,16 [#]	0,93 \pm 0,20 [#]
IHQ - TRAP (células/campo)	1,67 \pm 0,30	3,19 \pm 0,19 [#]	3,15 \pm 0,43 [#]

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de células marcadas para TNF- α , RANKL, OPG e TRAP, assim como a razão RANKL/OPG de 3-8 campos por lâmina na maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizado (F-OVX) ou OVX, de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. [#] $p < 0,05$ em relação ao Normal.

Tabela 5 – Efeitos da ovariectomia nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
		Periodontite	
Histologia fêmur (escores)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a mediana (valores extremos) dos escores de análise de fêmur de animais Normais, falso-ovariectomizado (F-OVX) ou OVX, de 7-10 animais por grupo. Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, $p > 0,05$.

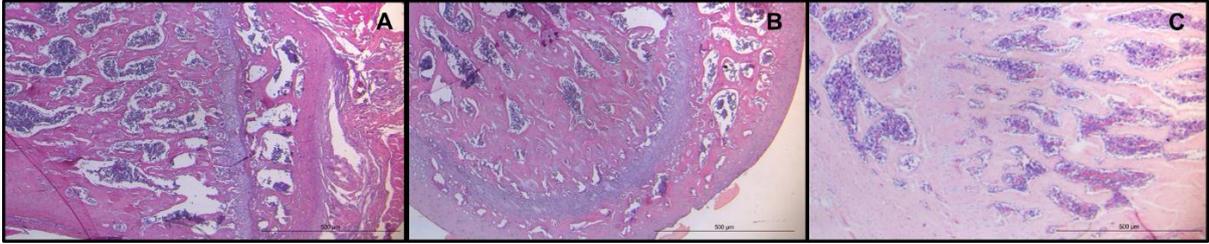


Figura 8: Aspecto histológico do fêmur de animais Normais (A) ou falso-ovariectomizados (B) e ovariectomizados (C) submetidos à periodontite. Os animais foram ovariectomizados e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após a eutanásia, no 28º dia, os fêmures foram processados para análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 500 µm).

Sistemicamente, as dosagens séricas da fosfatase alcalina óssea (FAO), um marcador indireto da atividade osteoblástica, bem como seus respectivos níveis de fosfatase alcalina total (FAT) foram avaliados. A indução da periodontite em animais F-OVX ou OVX promoveu redução significativa dos níveis séricos de FAT e FAO (F-OVX: 75,28% e 82,86%; OVX: 71,98% e 77,91%, respectivamente), em relação aos valores basais Normais (tabela 6). A ovariectomia não diminuiu os valores de ambas as enzimas em relação aos observados em animais F-OVX (tabela 6), corroborando os achados macro e microscópicos observados nos animais OVX, cuja remoção dos ovários não promoveu aumento de reabsorção óssea em relação à induzida nos animais F-OVX.

Considerando os demais parâmetros sistêmicos, a indução da periodontite resultou em leucocitose ($p < 0,05$), à custa de neutrofilia e linfomonocitose em animais F-OVX ou OVX, comparados aos valores basais Normais (tabela 6). Além disso, a redução dos níveis séricos de estradiol nos animais OVX aumentou ($p < 0,05$) a leucocitose em comparação à observada no grupo F-OVX, devido a uma linfomonocitose (tabela 6).

Tabela 6 – Efeitos da ovariectomia nos níveis séricos de fosfatases e no leucograma de ratas submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX
		Periodontite	
FAT (U/L)	169,5±5,8	41,9±4,2 [#]	47,5±3,3 [#]
FAO (U/L)	131,3±5,5	22,5±3,5 [#]	29,0±3,8 [#]
Leucócitos totais (células x10 ³ /mm ³)	11,46±0,23	14,98±0,87 [#]	19,43±1,04 ^{#,*}
Neutrófilos (células x10 ³ /mm ³)	1,30±0,08	3,38±0,37 [#]	3,55±0,47 [#]
Mononucleares (células x10 ³ /mm ³)	10,15±0,20	11,60±0,68 [#]	15,88±0,76 ^{#,*}

Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais foram eutanasiados 28 dias após a remoção dos ovários. Os valores representam a média±erro padrão da média dos níveis séricos de fosfatase alcalina total (FAT) e óssea (FAO) e do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares basais (Normal), de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) e OVX, de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. ^{#,*}p<0,05 em relação ao Normal e ao F-OVX, respectivamente.

Ao longo de todo o período experimental, os animais tiveram suas massas corpóreas avaliadas. Observou-se que animais normais apresentaram aumento progressivo até 28^o dia. Os animais F-OVX e OVX, ambos os grupos submetidos aos procedimentos cirúrgicos, apresentaram queda significativa de massa corpórea na 24^a h, quando comparados aos seus valores basais e a valores de animais Normais. O grupo F-OVX retomou seus níveis basais no 5^o dia, e o grupo OVX, no 3^o dia. No 7^o dia, devido a novo trauma cirúrgico em decorrência da ligadura periodontal, os animais F-OVX e OVX apresentaram leve perda de peso (p>0,05), retomando a cinética de ganho de massa corporal anterior. Os animais F-OVX apresentaram aumento progressivo, sem atingir os valores dos animais Normais, ou dos animais OVX. Enquanto isso, os animais OVX, com hipoestrogenia, tiveram suas massas corpóreas semelhantes às de animais Normais por volta do 11^o dia (p>0,05), e ultrapassando os valores dos Normais a partir do 24^o até o 28^o dia. Quando comparados aos animais F-OVX, o grupo OVX apresentou-se com maior ganho de peso desde o 5^o dia, e assim permaneceram até o 28^o dia (figura 9).

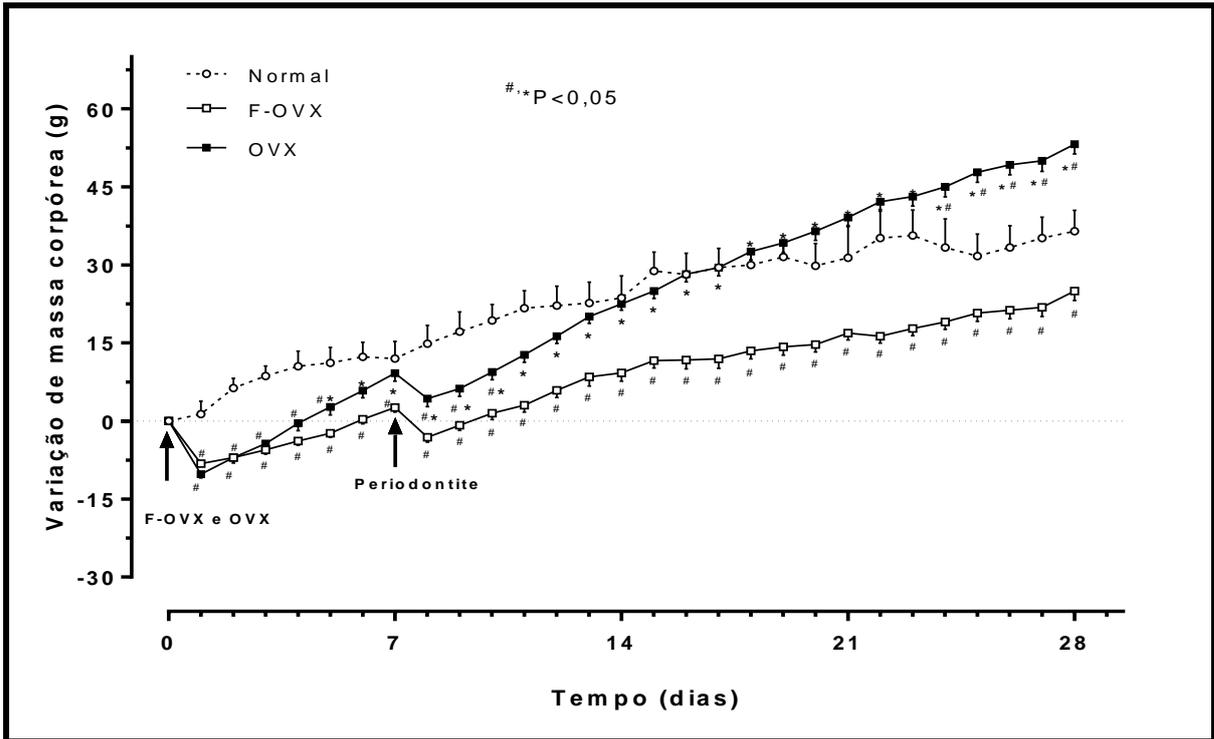


Figura 9: Efeito da ovariectomia na variação de massa corpórea de animais submetidos à periodontite. Os animais foram ovariectomizados (OVX) e a periodontite induzida por ligadura do molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os animais tiveram suas massas corpóreas aferidas, diariamente, até o dia 28, quando foram eutanasiados. Os valores representam a média±erro padrão da média da variação de massa corpórea em relação à massa inicial de 7-10 animais por grupo. Two-Way ANOVA e teste de Tukey. #,*p<0,05 em relação ao Normal e aos animais falso-ovariectomizados (F-OVX), respectivamente.

6.2 Efeitos do tamoxifeno (TMX) em animais ovariectomizados submetidos à periodontite

O tratamento com a maior dose de TMX, durante 28 dias de ovariectomia (OVX) e 21 dias de periodontite, não promoveu redução adicional ($p>0,05$) nos níveis séricos de estradiol em relação à redução promovida pela OVX. De forma semelhante, o TMX não reduziu ($p>0,05$) o índice uterino em relação ao índice uterino de animais OVX (tabela 7).

Tabela 7 – Efeitos do Tamoxifeno (TMX) nos níveis séricos de estradiol e no índice uterinos de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	OVX TMX 9 mg/kg
			Periodontite	
Estradiol (pg/ml)	33,92±6,2	29,7±3,1	16,8±1,1 ^{#,*}	13,5±4,3 ^{#,*}
Índice uterino	3,9±0,0007	4,8±0,0004	2,0±0,0002 ^{#,*}	2,1±0,0001 ^{#,*}

Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média±erro padrão da média dos níveis séricos de estradiol, do índice uterino (razão entre peso úmido do órgão e o peso dos animais no dia da eutanásia) basais (Normal), de animais falso-ovariectomizados (F-OVX), ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com TMX de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. ^{#,*} $p<0,05$ em relação ao Normal e ao F-OVX, respectivamente.

A figura 10 mostra que o tratamento com TMX, nas doses de 1, 3 e 9 mg/kg, reduziu ($p<0,05$) a ROA de forma significativa em relação à ROA observada nos animais F-OVX em 25,29%, 29% e 25,71%, respectivamente, assim como àquela obtida nos animais OVX, em 23,76%, 27,55% e 24,20%, respectivamente, diminuindo a exposição radicular e a lesão de furca (figura 11B, C, D). Considerando que as 3 doses utilizadas diminuíram a ROA de forma semelhante, foi selecionada a maior dose de TMX para as demais análises. Corroborando os achados macroscópicos de ROA, a avaliação por histometria do 2º molar superior revelou que o TMX 9 mg/kg diminuiu ($p<0,05$) a área entre o teto da furca e a crista óssea remanescente, quando comparada à correspondente de animais F-OVX e OVX, em 51,56% e 51,26%, respectivamente, indicando redução da ROA nessa região (tabela 8).

esparcos osteoclastos, mínima ROA e cemento radicular intacto [F-OVX: Md=2 (1-3); OVX: Md=2,5 (1-3); TMX=1 (0-2)] (tabela 8, figura 11F, G, H).

Particularmente, sobre o infiltrado inflamatório leucocitário reduzido no periodonto de animais tratados com TMX, observou-se que o tratamento com este fármaco preveniu em 61,52% ($p < 0,05$) o aumento de atividade de MPO gengival em relação à observada no tecido de hemiarçadas de animais OVX (figura 12A). Em relação à quantificação de TNF- α por Elisa, o TMX não alterou os níveis dessa citocina no tecido gengival quando comparados aos do tecido gengival de animais OVX ou F-OVX (figura 12B). Por outro lado, nas análises de imunohistoquímica, o TMX reduziu significativamente as imunomarcações para esta citocina quando comparadas às de animais F-OVX ($p < 0,05$), não sendo diferentes ($p > 0,05$) de animais normais ou OVX (figuras 13A e 14).

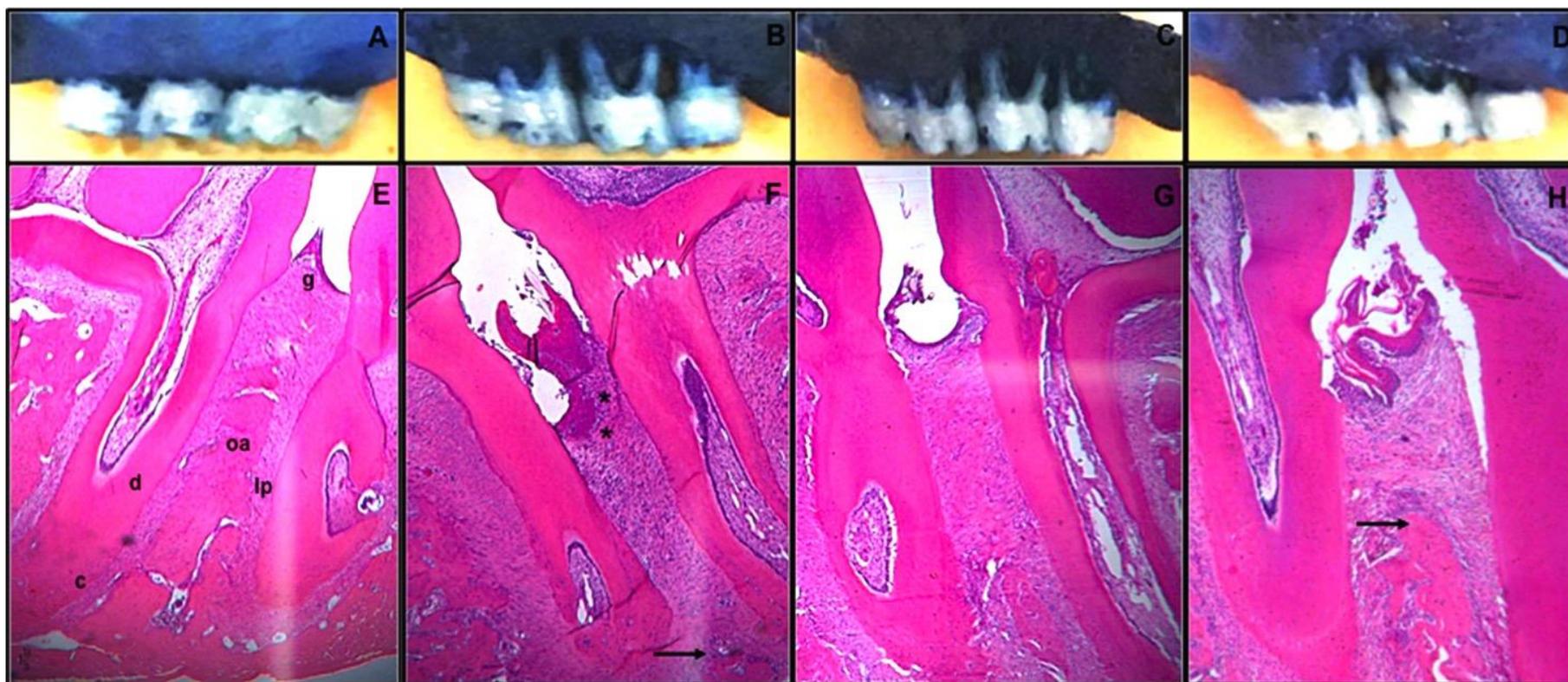


Figura 11: Aspectos macroscópico (A-D) e histológico (E-H) da maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após a eutanásia, no 28º dia, as maxilas de animais Normais (A e E), falso-ovariectomizados (B e F), OVX (C e G) e OVX tratados com TMX (D e H) foram processadas para análise macroscópica ou histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 20 µm). g, lp, oa, c e d representam gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar, cemento e dentina, respectivamente. Os asteriscos indicam infiltrado leucocitário e a seta indica reabsorção óssea alveolar.

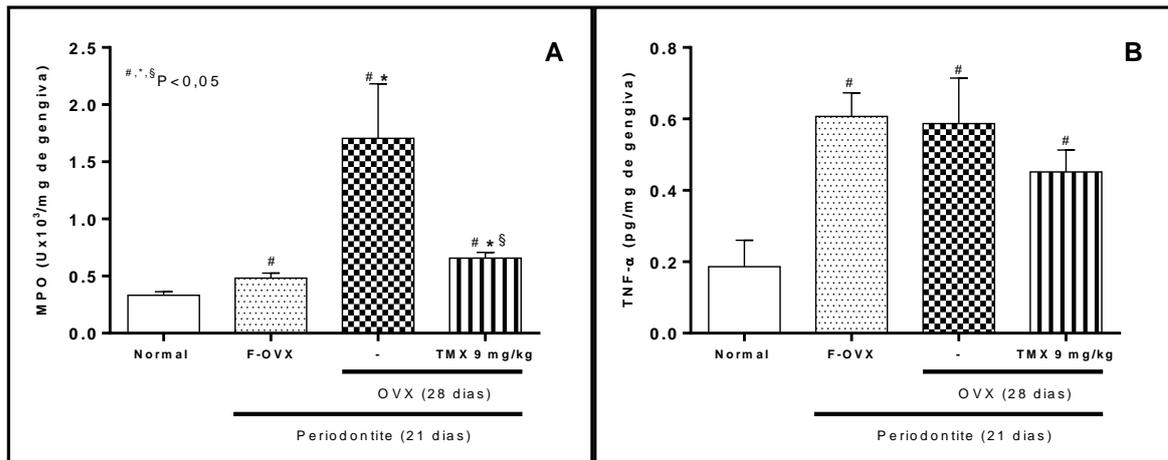


Figura 12: Efeitos do tamoxifeno (TMX) na atividade de mieloperoxidase (A) e nos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da atividade de MPO (A) e dos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX) de, no mínimo, 7-10 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. #,*§ $p < 0,05$ em relação ao Normal; ao F-OVX e ao OVX, respectivamente.

Em relação aos marcadores ósseos, o TMX reduziu de forma significativa as imunomarcações para RANKL quando comparadas as de animais F-OVX e OVX (figuras 13B e 15). Nesse contexto, enquanto as imunomarcações para OPG foram reduzidas para F-OVX e OVX ($p < 0,05$), o TMX não mostrou redução significativa ($p > 0,05$), quando comparadas às de animais normais (figuras 13C e 16). Em conjunto, esses achados sugerem o efeito protetor do TMX no tecido ósseo, o que de fato está coerente com a razão entre RANKL/OPG, que se encontra reduzida em relação à observada nos animais F-OVX e OVX (figura 13D). Corroborando, o TMX reduziu significativamente as imunomarcações para TRAP, quando comparadas às de F-OVX ou OVX, e semelhantes às de animais normais ($p > 0,05$) (figuras 13E e 17).

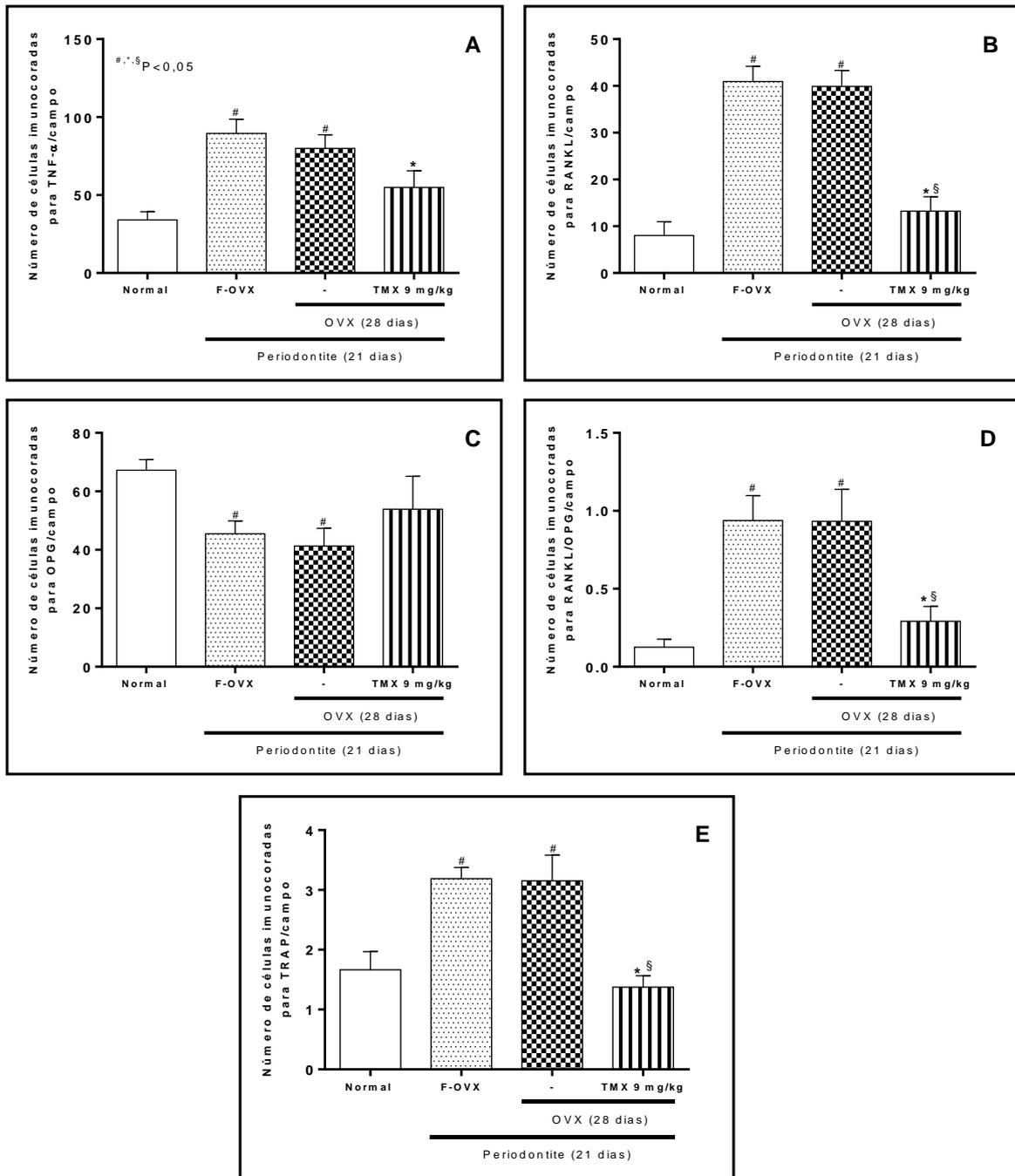


Figura 13: Efeitos do tamoxifeno (TMX) na imunomarcção para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C), RANKL/OPG (D) e TRAP (E) no periodonto de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de células marcadas para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C) e TRAP (E), assim como a relação RANKL/OPG (D) de 3-8 campos por lâmina na maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX) 7-10 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. #,*§ $p < 0,05$ em relação ao Normal; ao F-OVX e ao OVX, respectivamente.

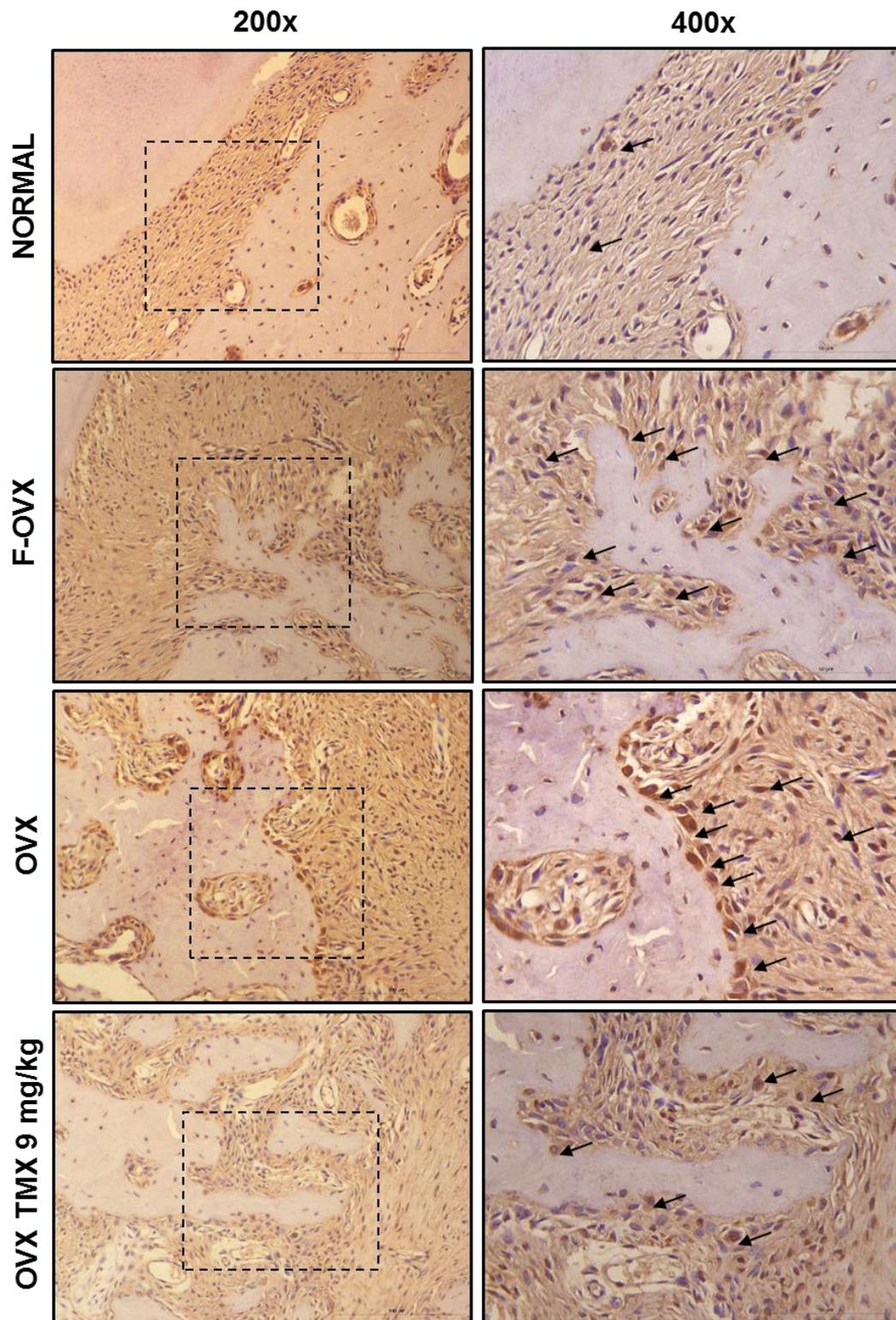


Figura 14: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TNF- α na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

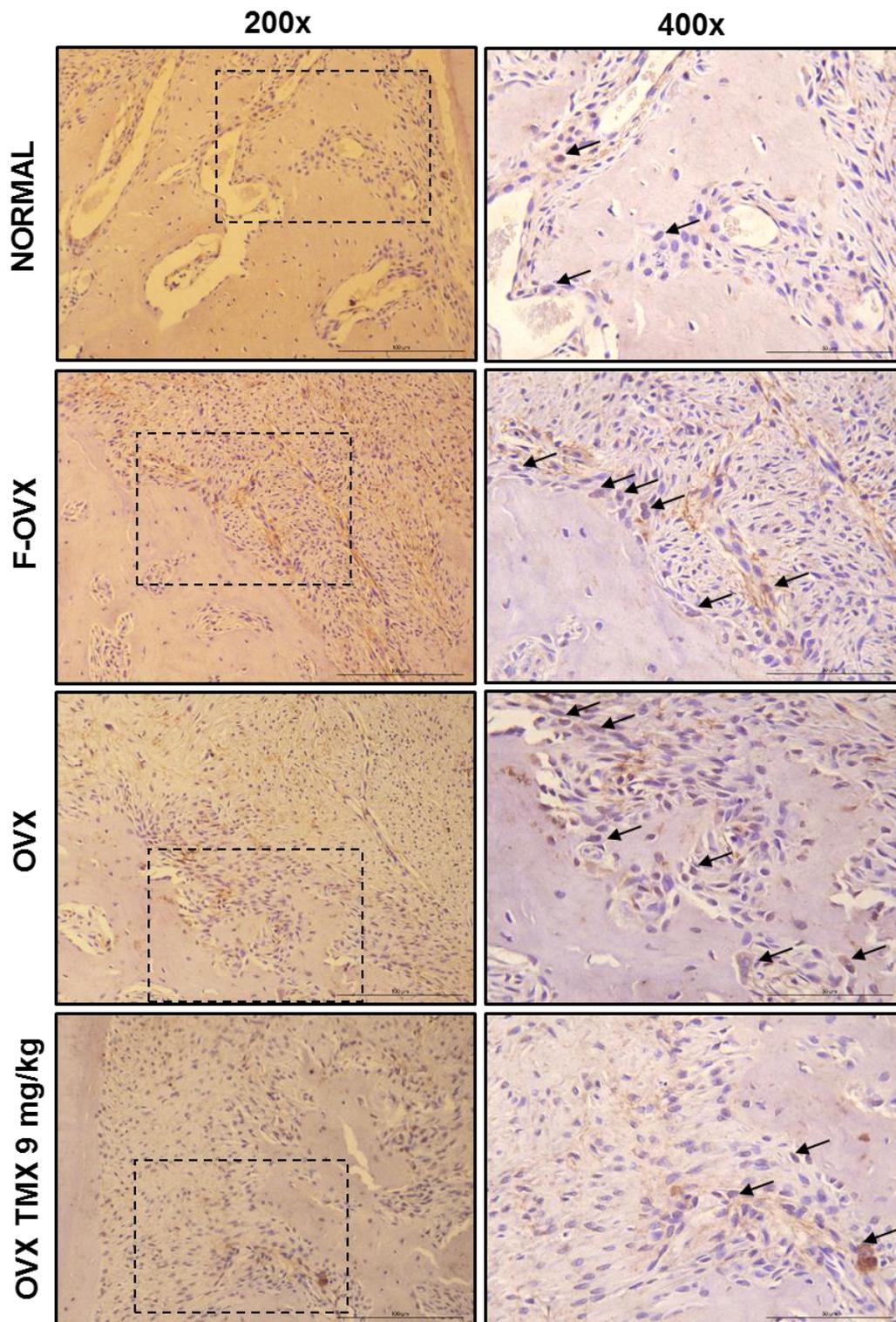


Figura 15: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para RANKL na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

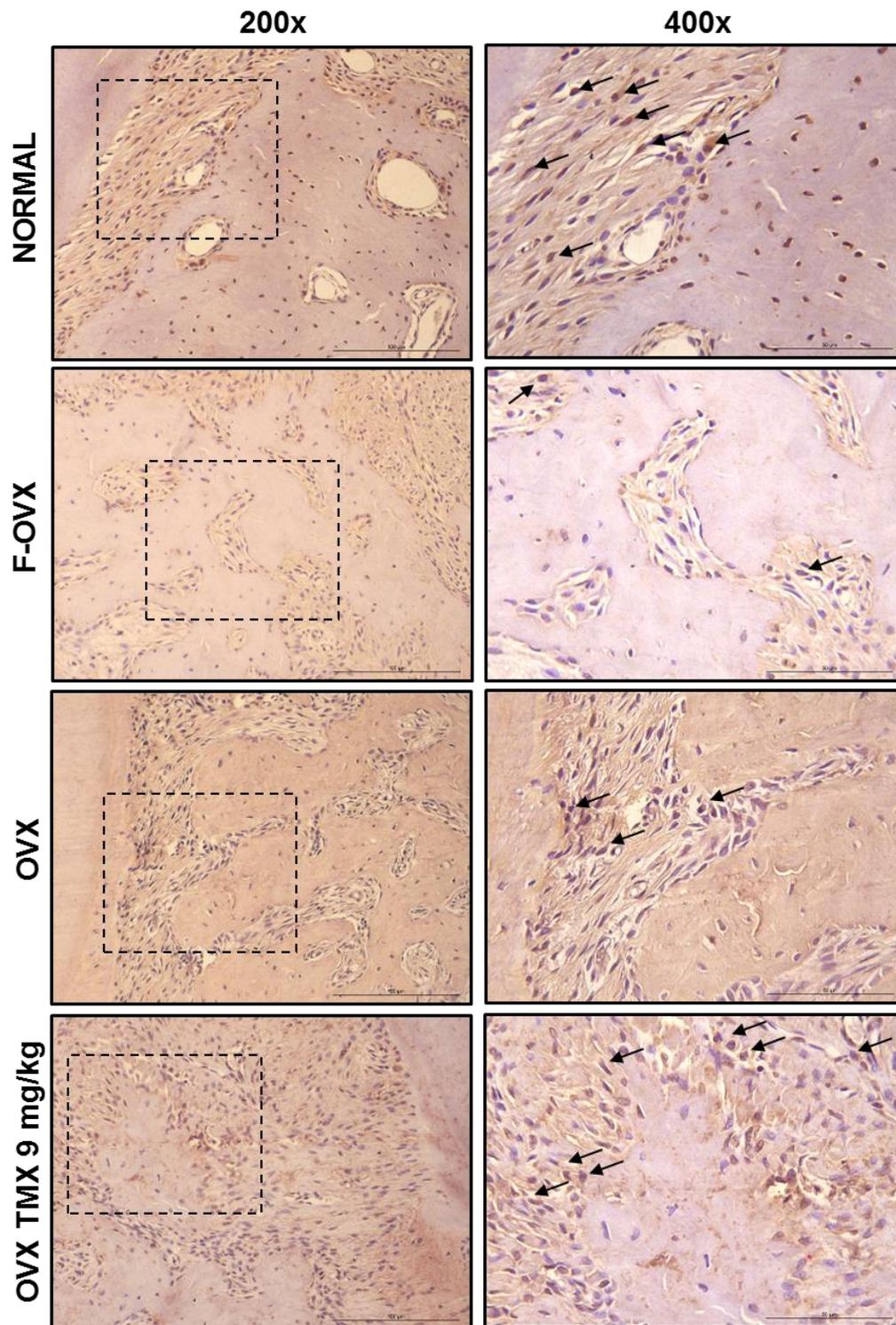


Figura 16: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para OPG na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

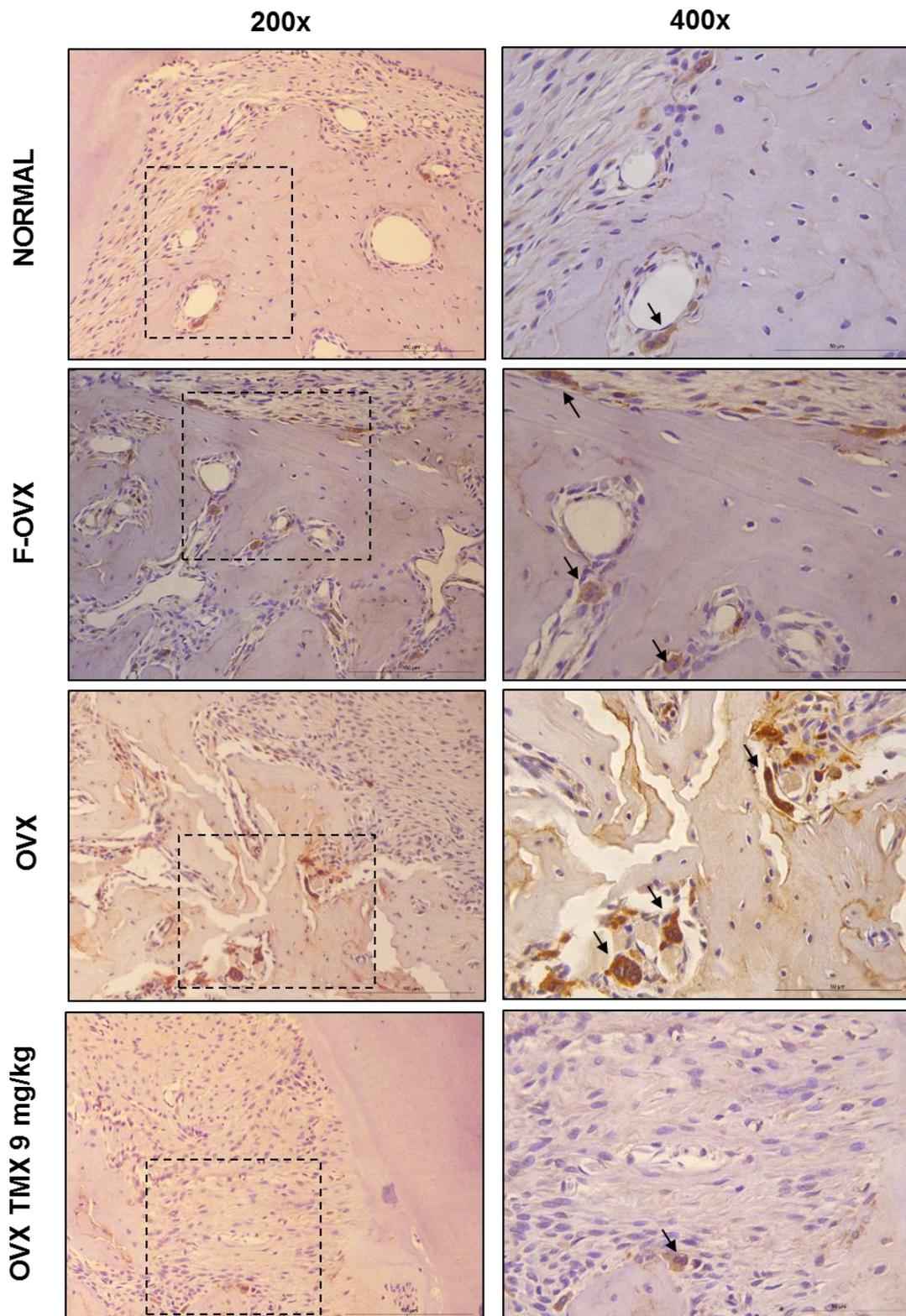


Figura 17: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TRAP na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

Quando os fêmures foram avaliados, o tratamento com a maior dose de TMX, assim como nos grupos F-OVX e OVX, não promoveu alterações significantes nas epífises e nos periósteos, apresentando aspecto histológico semelhante a fêmures normais (tabela 9, figura 18).

Tabela 9 – Efeitos do Tamoxifeno (TMX) nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	OVX TMX 9 mg/kg
			Periodontite	
Histologia (escores)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	0,5 (0-1)

Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a mediana (valores extremos) dos escores de análise do fêmur de animais Normais, falso-ovariectomizados (F-OVX), e ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com TMX (OVX/TMX) de 7-10 animais por grupo). Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, $p > 0,05$.

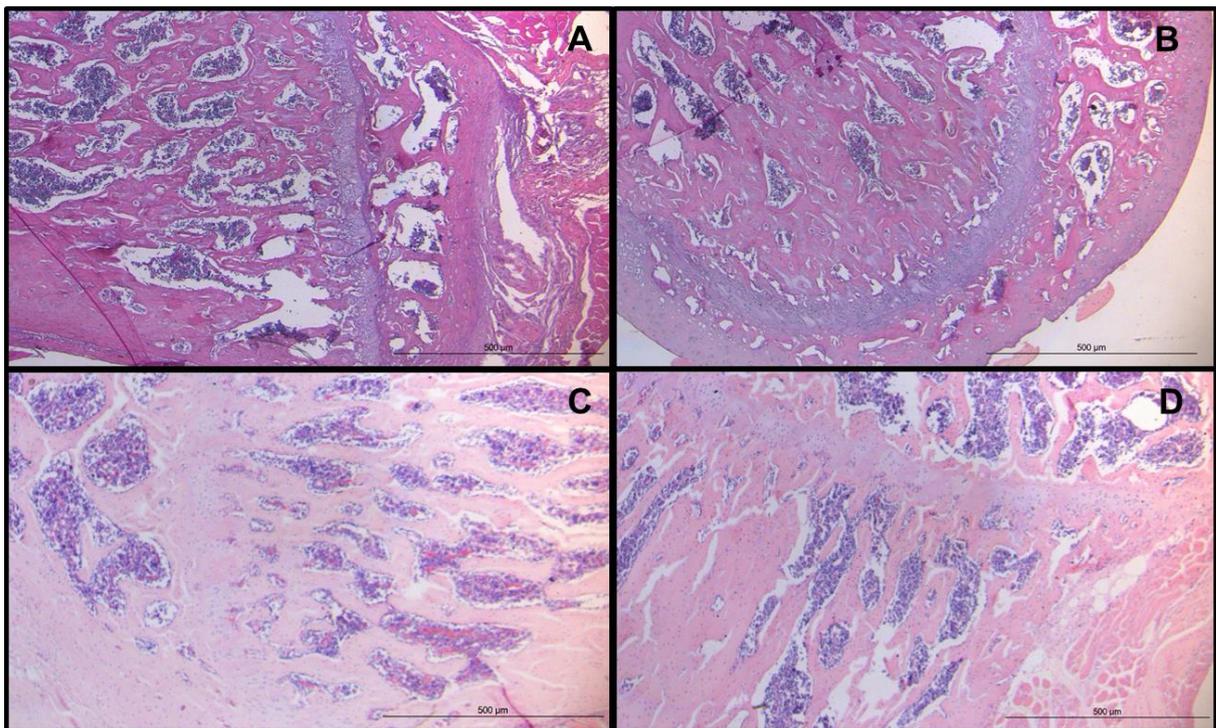


Figura 18: Aspecto histológico do fêmur de animais ovariectomizados submetidos à periodontite e tratados com tamoxifeno (TMX). Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após os animais terem sido eutanasiados, no dia 28, os fêmures de animais Normais (A), falso-ovariectomizados (B) e OVX não tratados (C) ou tratados com TMX (D) foram processados para análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 500 µm).

Sistemicamente, a figura 19 mostra que o TMX aumentou ($p < 0,05$) os níveis séricos de FAT em 114,4% e 89,5% e, de FAO em 233,7% e 158,7% quando

comparados aos do grupo F-OVX e OVX, respectivamente, indicando que o TMX está associado a um aumento da atividade de osteoblastos, corroborando, assim, os achados macro, microscópicos e de imunomarcção para OPG de proteção óssea observados nos animais tratados.

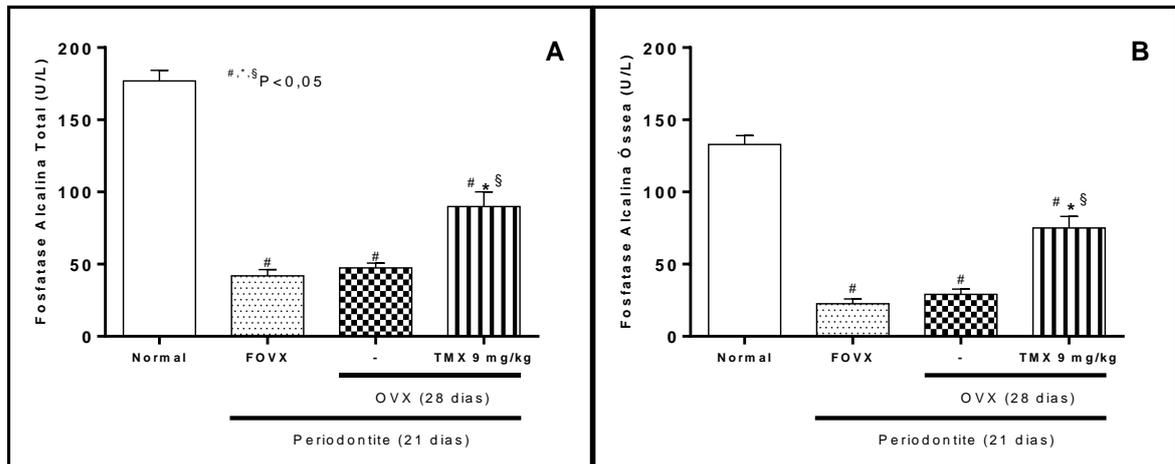


Figura 19: Efeito do tamoxifeno (TMX) nos níveis séricos de fosfatases em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média dos níveis séricos de fosfatase alcalina total (FAT; A) e óssea (FAO; B) basais (Normal) e de animais falso-ovariectomizados (F-OVX) ou OVX não tratados ou OVX tratados com TMX (OVX/TMX) de 7-30 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. #, *, § $p < 0,05$ em relação ao Normal, ao F-OVX e ao OVX, respectivamente.

Considerando os demais parâmetros sistêmicos, o TMX preveniu o aumento adicional do número total de leucócitos circulantes promovido pela ovariectomia. Assim, o TMX reduziu ($p < 0,05$) a leucocitose, à custa da redução do número de neutrófilos e mononucleares em relação à quantidade dessas células nos animais OVX (tabela 10).

Ao longo de todo o período experimental, os animais tiveram suas massas corpóreas avaliadas. Enquanto os animais OVX apresentaram ganho progressivo de massa corporal desde o 1º dia, observou-se que animais tratados com TMX apresentaram queda significativa de massa corpórea na 24ª h, decorrente do trauma cirúrgico, apresentando tendência a retomar seus valores basais até o 7º d ($p > 0,05$). Nesse dia, porém, novo trauma cirúrgico por ocasião da indução da periodontite causou nova queda de massa corpórea nos animais, e o TMX não preveniu tal queda, porém, novamente, recomeçou sua tendência a retornar aos seus valores basais,

atingindo-os por volta do 13º dia em diante, contudo, não mais atingindo os valores de ganho de massa corporal dos animais OVX (figura 20).

Tabela 10 – Efeitos do Tamoxifeno (TMX) no leucograma de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	OVX TMX 9 mg/kg
				Periodontite
Leucócitos totais (células x10 ³ /mm ³)	12,10±0,34	16,95±1,47 [#]	21,62±1,30 ^{#,*}	16,10±1,68 ^{#,§}
Neutrófilos (células x10 ³ /mm ³)	1,46±0,12	3,58±0,63 [#]	4,15±0,56 [#]	3,37±0,62 [#]
Mononucleares (células x10 ³ /mm ³)	10,63±0,30	13,37±1,13 [#]	17,47±0,99 ^{#,*}	12,73±1,20 ^{#,§}

Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média±erro padrão da média do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares basais (Normal), de animais falso-ovariectomizados (F-OVX), ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com TMX de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. ^{#,*}p<0,05 em relação ao Normal, ao F-OVX e ao OVX, respectivamente.

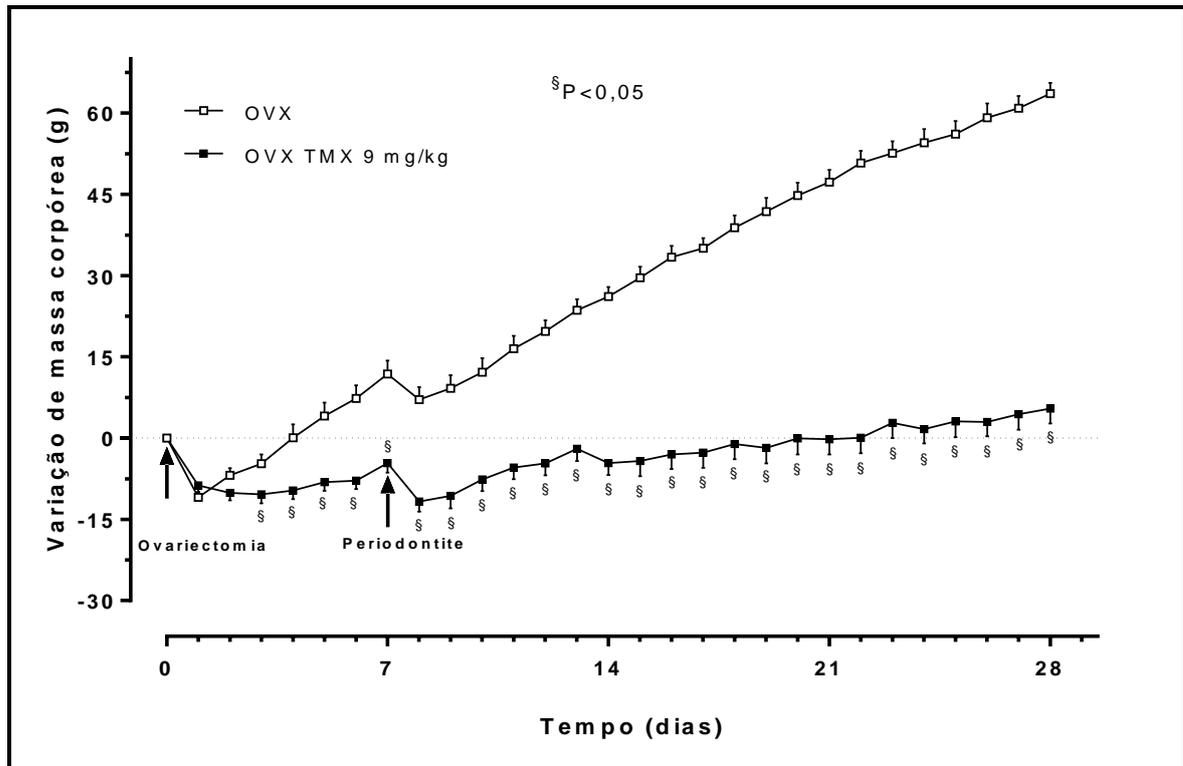


Figura 20: Efeito do tamoxifeno (TMX) na variação de massa corpórea de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com TMX (9 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As massas corpóreas aferidas, diariamente, até o dia 28, quando foram eutanasiados. Os valores representam a média±erro padrão da média da variação de massa corpórea em relação à massa inicial de animais OVX não tratados ou tratados com TMX (OVX/TMX) 7-10 animais por grupo. Two-Way ANOVA e teste de Tukey. [§]p<0,05 em relação ao OVX.

6.3 Efeitos do anastrozol (ANA) em animais ovariectomizados ou não submetidos à periodontite

A ovariectomia (OVX) causou redução significativa dos níveis séricos de estradiol, quando comparados aos valores basais (Normal), enquanto que no grupo F-OVX, esses níveis não foram alterados ($p > 0,05$). O tratamento com a maior dose de ANA em animais F-OVX, durante 28 dias, promoveu redução significativa nos níveis séricos de estradiol em relação aos níveis basais (Normal) e aos dos grupos F-OVX ou OVX não tratados (Normal: 68,84%; F-OVX: 64,35% e OVX: 37,23%), indicando que somente a supressão química da produção desse hormônio foi capaz de reduzir seus níveis circulantes a valores inferiores aos obtidos pela remoção dos ovários (tabela 11). Os animais com OVX, os quais apresentam níveis baixos de estradiol, e tratados com ANA 0,5 mg/kg, apresentaram redução ($p < 0,05$) adicional dos níveis séricos de estradiol em 63,69% quando comparada à redução obtida somente pela ovariectomia, e em 42,48% quando comparada à redução induzida somente pelo tratamento com ANA, no grupo F-OVX/ANA (tabela 11). Corroborando esses achados, o índice uterino de animais F-OVX tratados com ANA foi 53,85% e 58,14% menor ($p < 0,05$), quando comparado ao de animais dos grupos Normal e F-OVX não tratado, respectivamente (tabela 11). Embora o grupo OVX/ANA não tenha apresentado redução adicional no índice uterino em relação à observada nos animais OVX, apresentou valores menores ($p < 0,05$) desse índice quando comparado ao de animais Normal e F-OVX não tratados, em 48,72% e 46,51%, respectivamente (tabela 11). Em conjunto, a hipoestrogenia induzida por OVX foi somada à redução química de estradióis pelo ANA, resultando em uma redução final de 79,94%, quando comparados aos níveis basais (Normal).

Tabela 11 – Efeitos do Anastrozol (ANA) nos níveis séricos de estradiol e no índice uterinos de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	F-OVX ANA 0,5 mg/kg	OVX ANA 0,5 mg/kg
		Periodontite			
Estradiol (pg/ml)	33,9±6,2	29,7±3,1	16,8±1,1 ^{#,*}	10,6±1,3 ^{#,*,§}	6,1±0,7 ^{#,*,§,+}
Índice uterino	3,9±0,0007	4,3±0,0003	1,7±0,0001 ^{#,*}	1,8±0,0001 ^{#,*}	2,0±0,0002 ^{#,*}

A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior, 7 dias após a ovariectomia. Os animais receberam ANA durante os 28 dias. Os valores representam a média±erro padrão da média dos níveis séricos de estradiol e do índice uterino (razão entre peso úmido do órgão e o peso dos animais no dia da eutanásia) basais (Normal), de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX), tratados com ANA (F-OVX ANA), ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com ANA (OVX ANA) 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. [#]p<0,05 em relação ao Normal; ^{*}p<0,05 em relação ao F-OVX, ao OVX e ao F-OVX ANA 0,5, respectivamente.

A figura 21 mostra que os animais F-OVX, somente submetidos à periodontite, tratados com a maior dose de ANA não apresentaram aumento da ROA em relação à observada nos animais F-OVX não tratados, apresentando, portanto, aspecto macroscópico semelhante ao deste último grupo (figura 22B e D). A redução adicional dos níveis séricos de estradiol promovida pelo tratamento de animais OVX com ANA, por sua vez, aumentou (p<0,05) a ROA dos animais que receberam ANA nas doses de 0,1 e 0,5 em relação à ROA dos grupos F-OVX e OVX não tratados, bem como a do grupo F-OVX tratado com ANA (F-OVX: 31,54% e 30,73%; OVX: 21,35% e 20,60%; F-OVX/ANA: 33,23% e 32,41%, respectivamente) (figuras 21 e 22), apresentando maiores exposição radicular e lesão de furca (figura 21). Considerando que as 2 maiores doses utilizadas aumentaram a ROA de forma semelhante, foi selecionada a maior dose de ANA para as demais análises.

A avaliação por histometria do 2º molar superior revelou que o ANA 0,5 mg/kg não aumentou (p>0,05) a área entre o teto da furca e a crista óssea remanescente em animais F-OVX ou OVX, quando comparada à correspondente de animais F-OVX ou OVX não tratados (tabela 12). A análise histológica também mostrou que o tratamento de animais F-OVX ou OVX com ANA 0,5 mg/kg não esteve relacionado à maior destruição periodontal desses animais em relação aos respectivos grupos não tratados [F-OVX: Md=0 (0-0); OVX: Md=0 (0-1); F-OVX/ANA: Me=3 (2-3); OVX/ANA: Me=2 (1-3)] (tabela 12, figura 22).

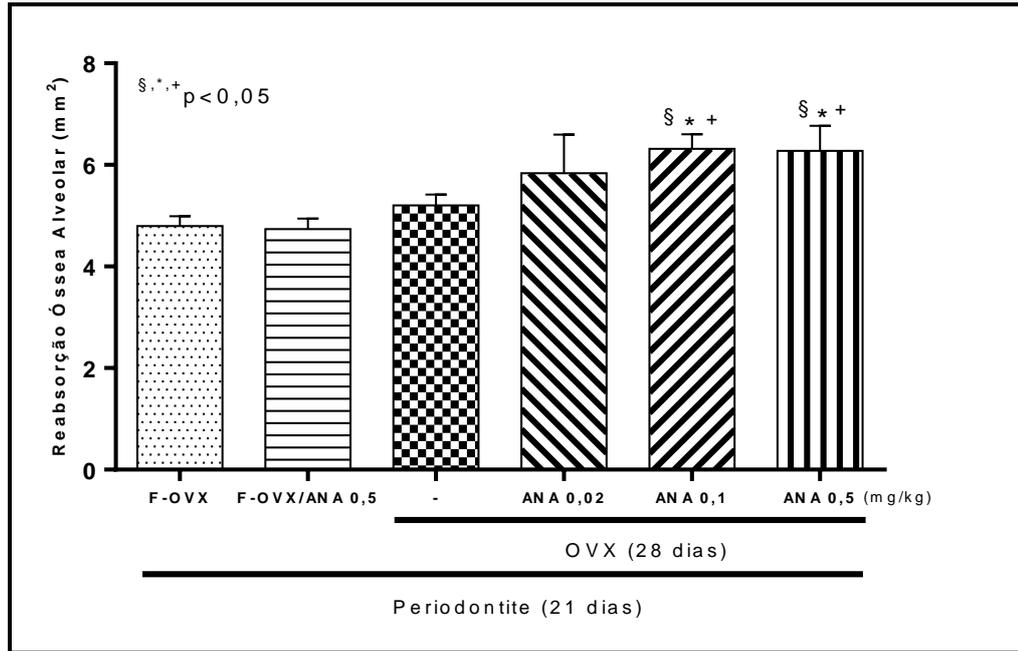


Figura 21: Efeito do anastrozol (ANA) na reabsorção óssea alveolar (ROA) em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com ANA durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média±erro padrão da média da ROA de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com ANA (OVX/ANA), no mínimo, de 7-10 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. *§,+p<0,05 em relação ao F-OVX, ao OVX e ao F-OVX/ANA, respectivamente.

Tabela 12 – Efeitos do Anastrozol (ANA) nos aspectos microscópicos do periodonto de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	F-OVX ANA 0,5 mg/kg	OVX ANA 0,5 mg/kg
		Periodontite			
Histometria (mm ² x 10 ⁻⁷)	5,8±0,56	32,0±3,8 [#]	31,8±4,8 [#]	34,9±6,6 [#]	31,4±3,9 [#]
Histologia (escores)	0 (0-0)	2 (1-3) [#]	2,5 (1-3) [#]	3 (2-3) [#]	2 (1-3) [#]

Os animais foram OVX e tratados com ANA durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média±erro padrão da média da área na região de furca do 2º molar superior ou a mediana (valores extremos) dos escores de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX ANA) ou ovariectomizados não tratados (OVX) e tratados com ANA (OVX ANA) de 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. [#]p<0,05 em relação ao Normal.

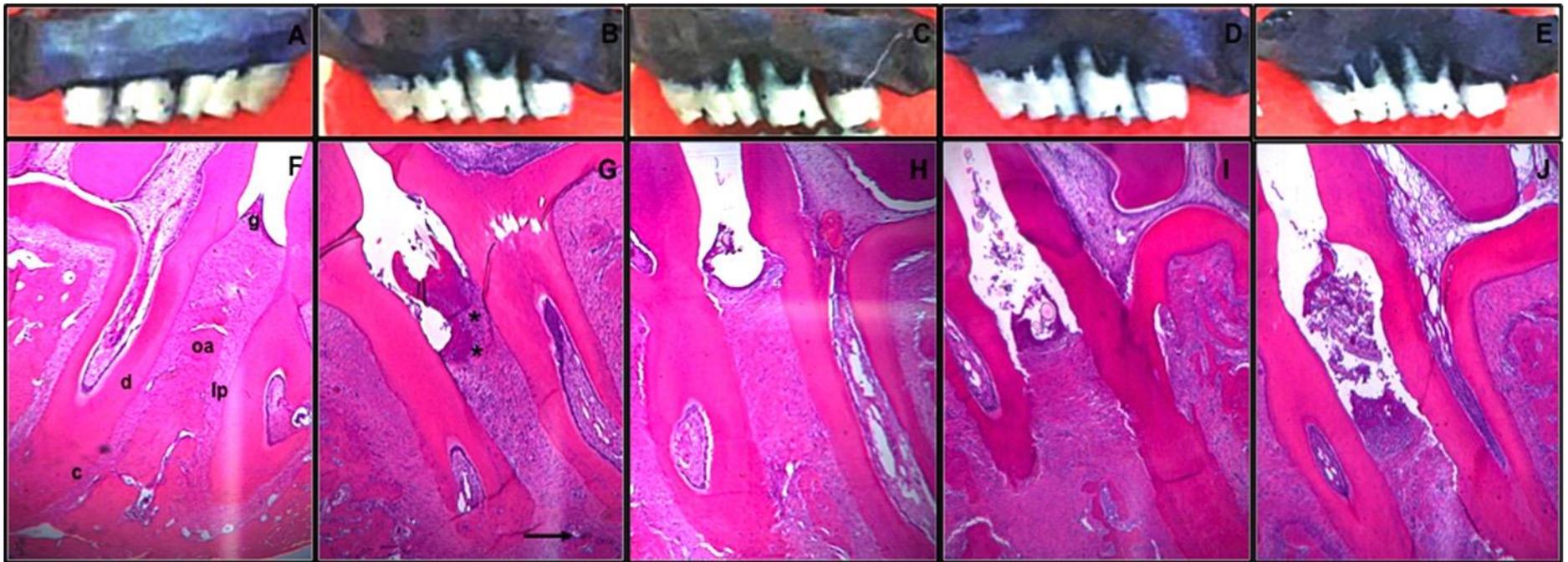


Figura 22: Aspectos macroscópico (A-E) e histológico (F-J) da maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após a eutanásia, no 28º dia, as maxilas de animais Normais (A e F), falso-ovariectomizados (B e G), OVX (C e H), e F-OVX ou OVX tratados com ANA (D e I; E e J, respectivamente) foram processadas para análise macroscópica ou histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 20 µm). g, lp, oa, c e d representam gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar, cimento e dentina, respectivamente. Os asteriscos indicam infiltrado leucocitário e a seta indica reabsorção óssea alveolar.

Considerando o infiltrado inflamatório subjacente à periodontite experimental, enquanto os animais F-OVX tratados com ANA não apresentaram maior atividade de MPO no tecido gengival, em relação à observada em animais F-OVX ou OVX não tratados, os animais OVX tratados com ANA apresentaram maior ($p < 0,05$) atividade dessa enzima em 243,51 e 282,25%, quando comparada à observada em animais F-OVX não tratados ou tratados com ANA, respectivamente, indicando um aumento de neutrófilos ativos na gengiva daqueles animais. A redução adicional dos níveis circulantes de estradiol promovida pelo ANA nos animais OVX, não aumentou, por sua vez, a atividade de MPO, em relação à encontrada nos animais OVX não tratados (figura 23A).

Em relação aos níveis gengivais de TNF- α por Elisa, o tratamento com ANA não aumentou os valores de TNF- α , tanto em animais F-OVX como em animais OVX, quando comparados aos respectivos animais não tratados com ANA (figura 23B). Corroborando esses achados, nas análises de imunohistoquímica, o tratamento de animais F-OVX ou OVX com ANA não aumentou as imunomarcações para TNF- α , quando comparadas às de animais F-OVX ou OVX não tratados com ANA, sendo diferentes apenas dos níveis de imunomarcações de animais normais ($p < 0,05$) (figuras 24A e 25).

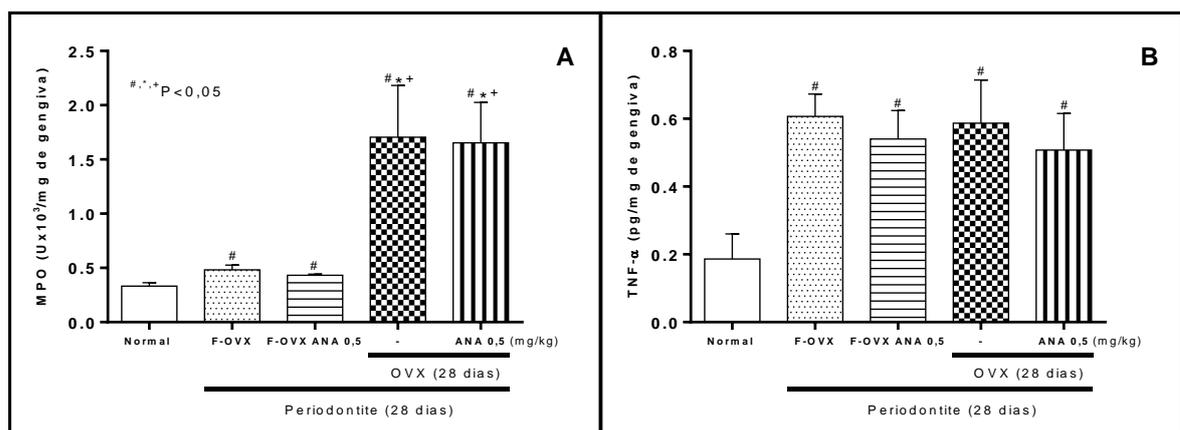


Figura 23: Efeitos do anastrozol (ANA) na atividade de mieloperoxidase (A) e nos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com ANA durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da atividade de MPO (A) e dos níveis de TNF- α (B) no tecido gengival de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA) 7-10 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ em relação ao Normal; *,+ $p < 0,05$ em relação ao F-OVX e ao F-OVX/ANA, respectivamente.

Em contrapartida, embora o tratamento de animais F-OVX com ANA não tenha aumentado as imunomarcações para RANKL em relação às observadas em animais não tratados F-OVX ou OVX, a redução adicional de estradiol obtida em animais OVX tratados com ANA aumentou essas imunomarcações quando comparadas às de animais Normais, F-OVX, F-OVX/ANA e OVX (figuras 24B e 26).

Enquanto as imunomarcações para OPG foram reduzidas para F-OVX, F-OVX/ANA e OVX ($p < 0,05$) quando comparadas somente às de animais normais ($p < 0,05$), as imunomarcações para OPG no grupo de animais OVX e tratados com ANA apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) em relação às imunomarcações de animais normais, como também, em comparação às de animais apenas com periodontite (F-OVX) (figuras 24C e 27). Essas alterações são coerentes com a razão RANKL/OPG que, embora não tenha sido aumentada nos animais F-OVX/ANA em relação aos F-OVX e OVX não tratados, aumentou ($p < 0,05$) nos animais OVX tratados com ANA em relação aos animais F-OVX tratados ou não com ANA e OVX não tratados (figura 24D). Concernente ao TRAP, apesar de não ter havido significância estatística, observou-se que o ANA tendeu a aumentar o número de células imunomarcadas para o TRAP, em animais OVX, quando comparados aos respectivos grupos não tratados, apresentando aumento somente em comparação às imunomarcações no periodonto normal (figuras 24E e 28).

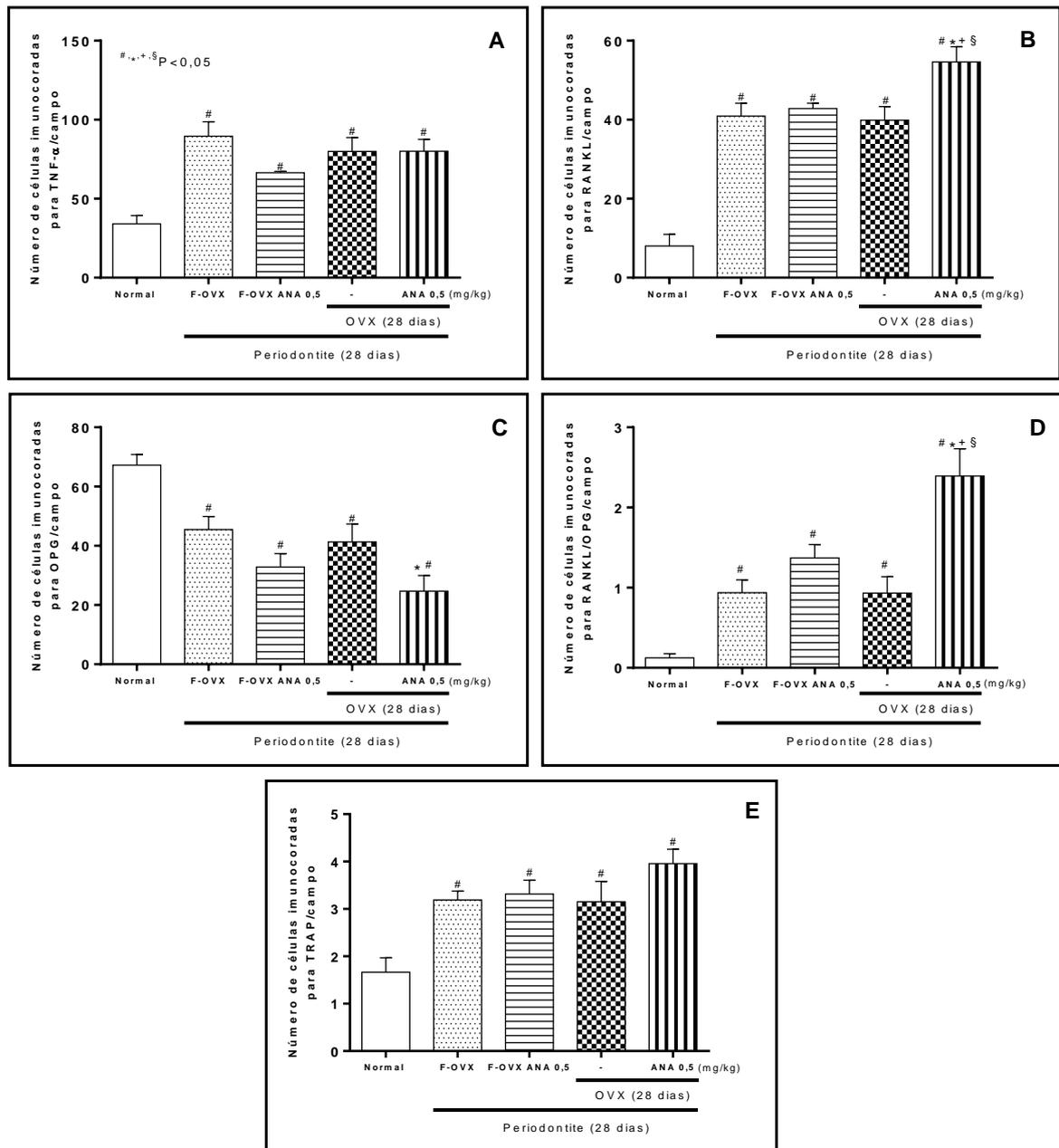


Figura 24: Efeitos do anastrozol (ANA) na imunomarcção para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C), RANKL/OPG (D) e TRAP (E) no periodonto de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número de células marcadas para TNF- α (A), RANKL (B), OPG (C) e TRAP (E), assim como a relação RANKL/OPG (D) de 3-8 campos por lâmina de maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA) 7-10 animais por grupo One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. #,*§ $p < 0,05$ em relação ao Normal; ao F-OVX e ao OVX, respectivamente.

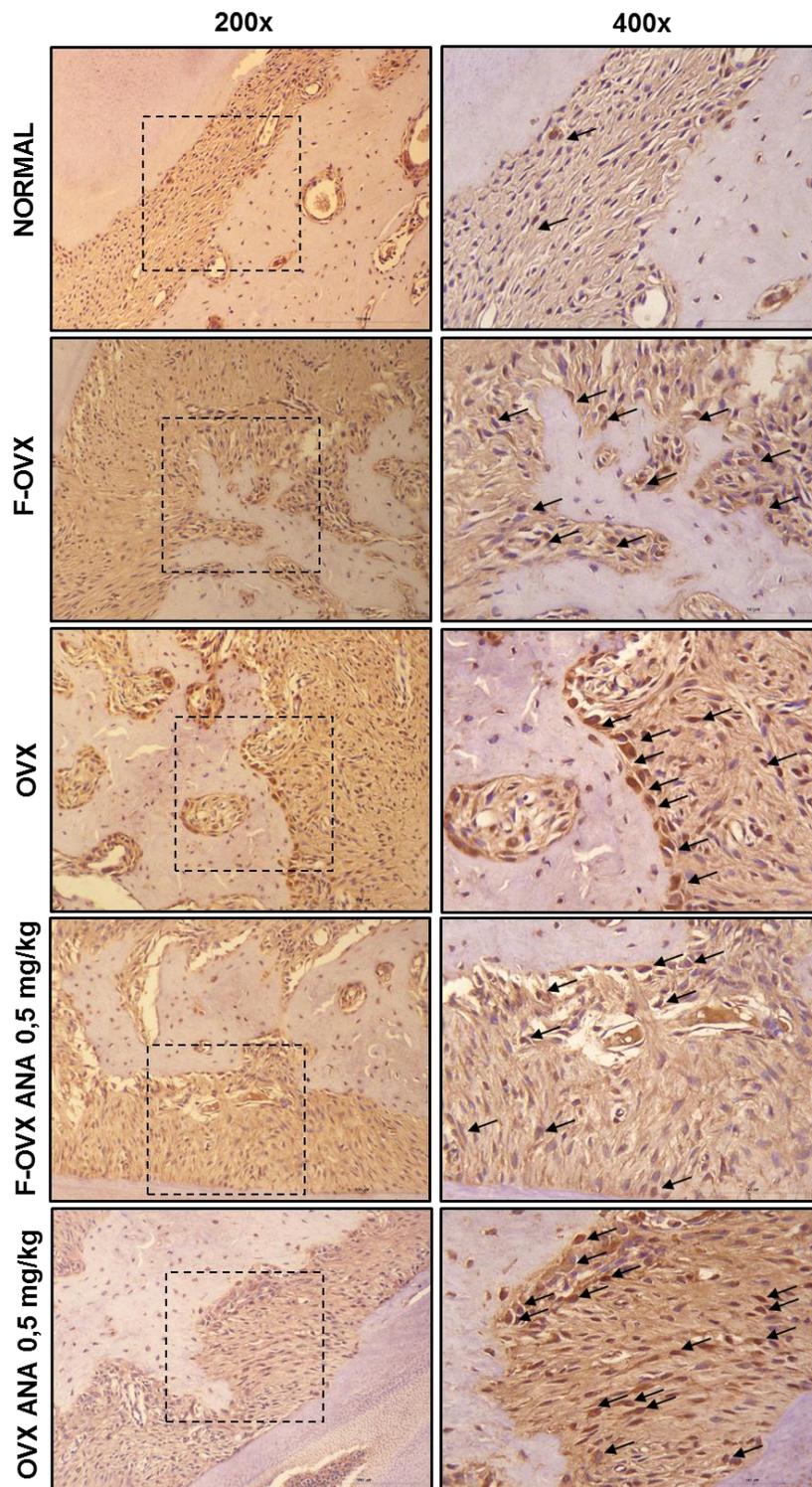


Figura 25: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TNF- α na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

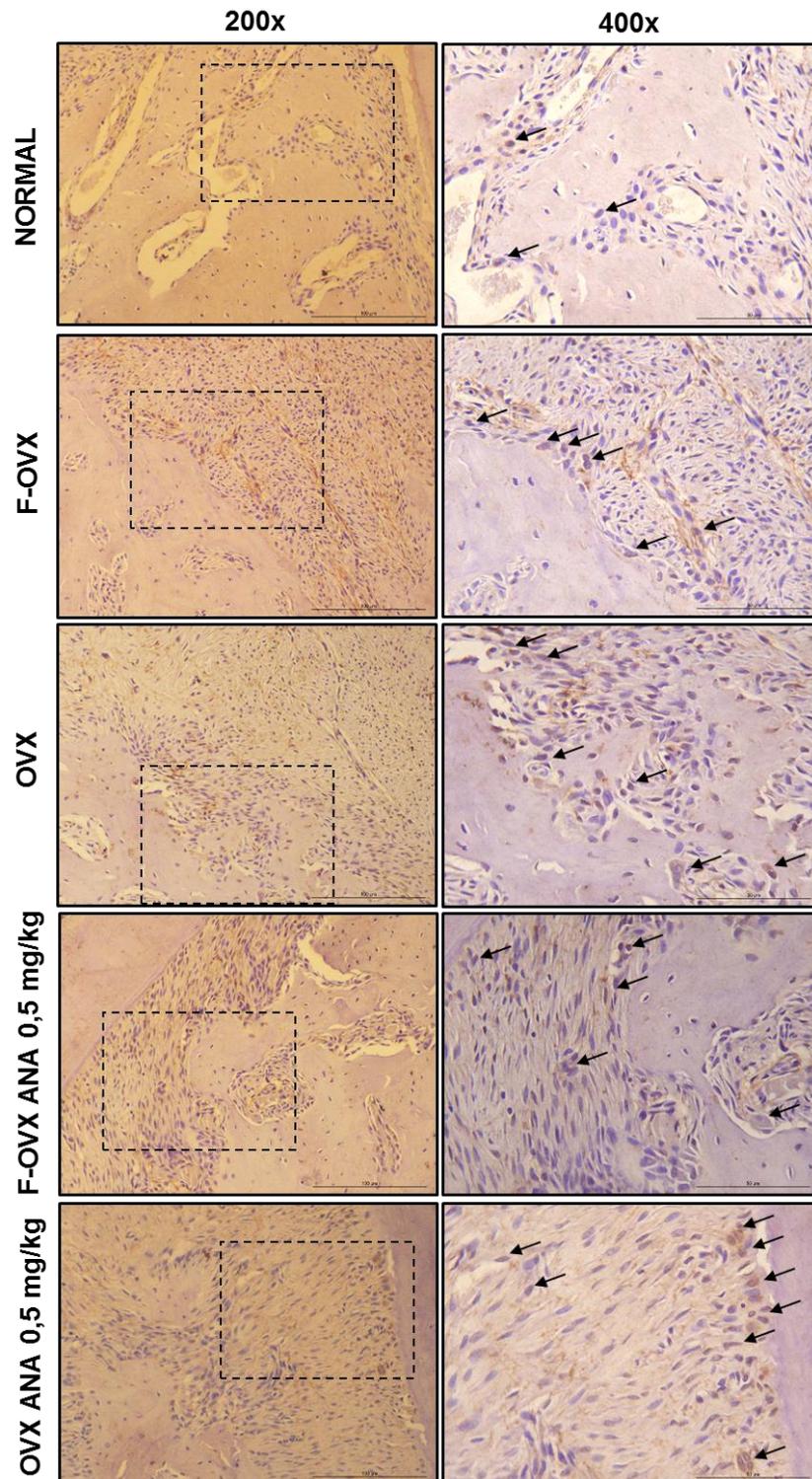


Figura 26: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para RANKL na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

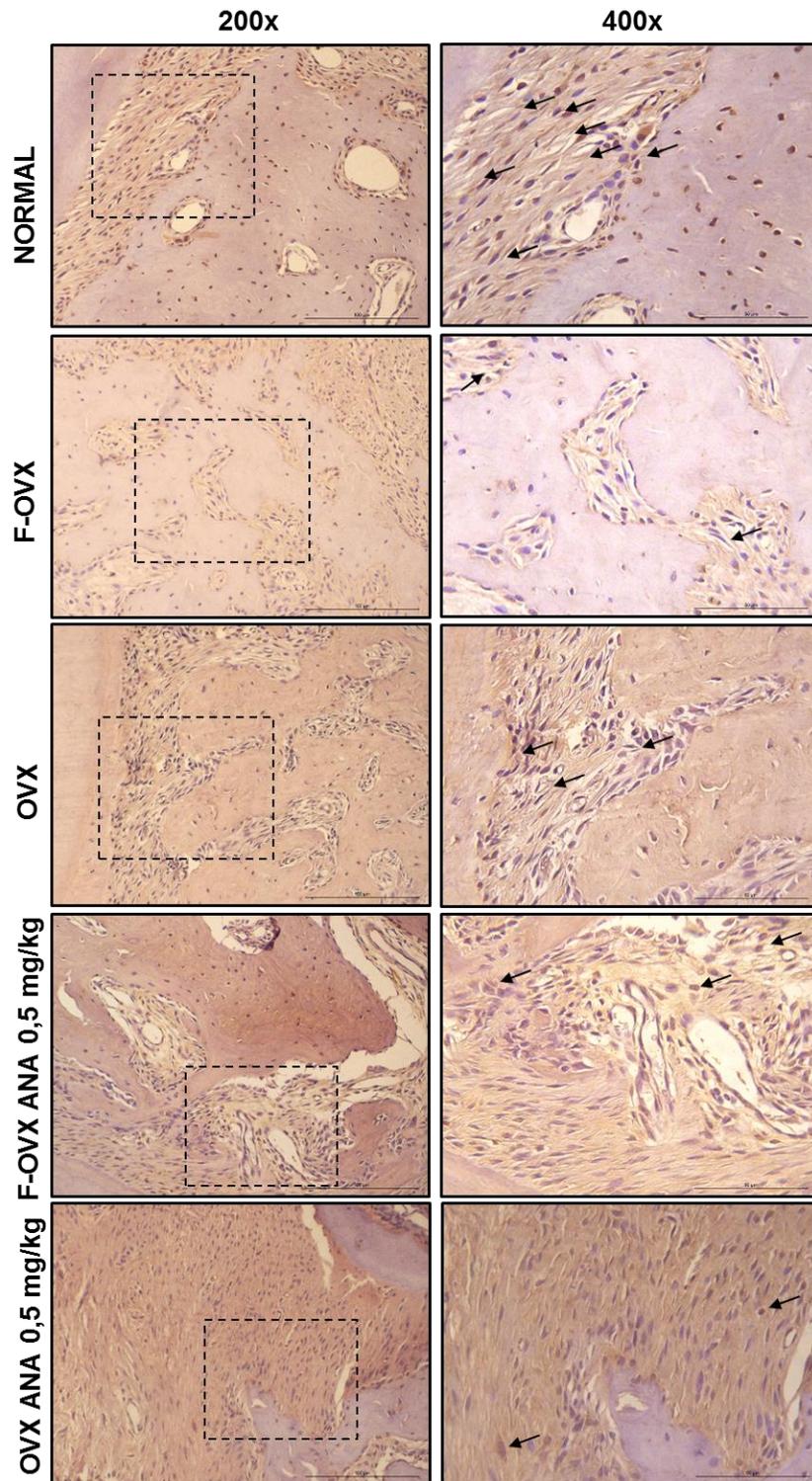


Figura 27: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para OPG na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

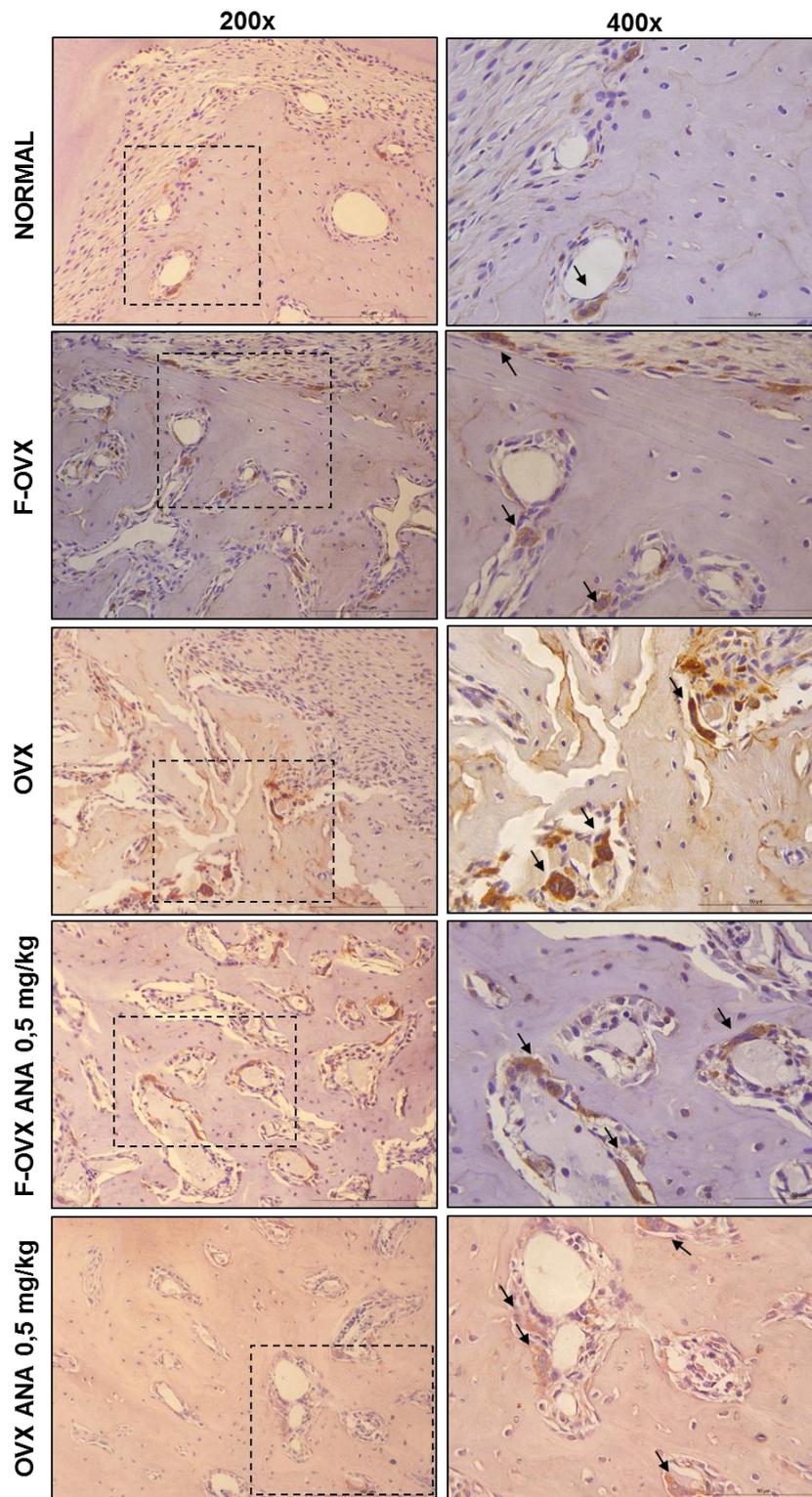


Figura 28: Aspectos imunohistoquímicos da marcação para TRAP na maxila de animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As fotomicrografias representam a maxila contralateral de animais falso-ovariectomizados não tratados (Normal), maxila desafiada de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA). As maxilas foram processadas para análise imunohistoquímica nos aumentos de 200x (barra representa 100 μ m) e 400x (barra representa 50 μ m). Setas representam células marcadas.

Considerando a avaliação dos fêmures, enquanto a redução devida somente à ação farmacológica do ANA na síntese de estradiol (F-OVX/ANA) não tenha promovido aumento significativo da reabsorção óssea na maxila de animais submetidos à periodontite, tal redução química de estradiol promoveu alterações significantes ($p < 0,05$) no aspecto histológico dos fêmures desses animais, em relação ao fêmur de animais F-OVX ou normais, apresentando tecido conjuntivo fibroso na epífise e ausência ou raros osteoclastos [F-OVX: Md=0 (0-0); OVX: Md=0 (0-1) e FOVX/ANA: Md=1 (0-2), tabela 13, figura 29]. A redução da síntese de estradiol promovida pela remoção cirúrgica dos ovários, associada à redução farmacológica promovida pelo ANA resultou em características histológicas significativamente diferentes daquelas dos grupos F-OVX ou OVX, ambos não tratados, como também do grupo F-OVX/ANA, com tecido conjuntivo fibroso, com raros ou sem osteoclastos na epífise dos fêmures, além de espaços medulares amplos e inflamação no perióstio [OVX/ANA: Md=3 (2-3), tabela 13, figura 29].

Tabela 13 – Efeitos Anastrozol (ANA) nos aspectos microscópicos do fêmur de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	F-OVX ANA 0,5 mg/kg	OVX ANA 0,5 mg/kg
		Periodontite			
Histologia (escores)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-1)	1 (0-2) ^{#,*}	3 (2-3) ^{#,*,+,\$}

Os animais foram OVX e tratados com ANA durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a mediana (valores extremos) dos escores de análise de fêmur de animais Normais, falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA 0,5 mg/kg (F-OVX/ANA), e de ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com ANA (OVX/ANA), de 7-10 animais por grupo. Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. ^{#,*,+,\$} $p < 0,05$ em relação ao Normal, F-OVX, F-OVX/ANA e OVX, respectivamente.

Sistemicamente, a figura 30 mostra que o tratamento de animais F-OVX com ANA não promoveu redução adicional nos níveis séricos de FAT e FAO, em relação à promovida pela indução da periodontite em animais F-OVX ou OVX não tratados. Por outro lado, o tratamento de animais OVX com ANA intensificou a redução dos níveis séricos de FAT e FAO em 24,55% e 36,27%, respectivamente, em relação à redução promovida pela indução da periodontite em animais OVX não tratados.

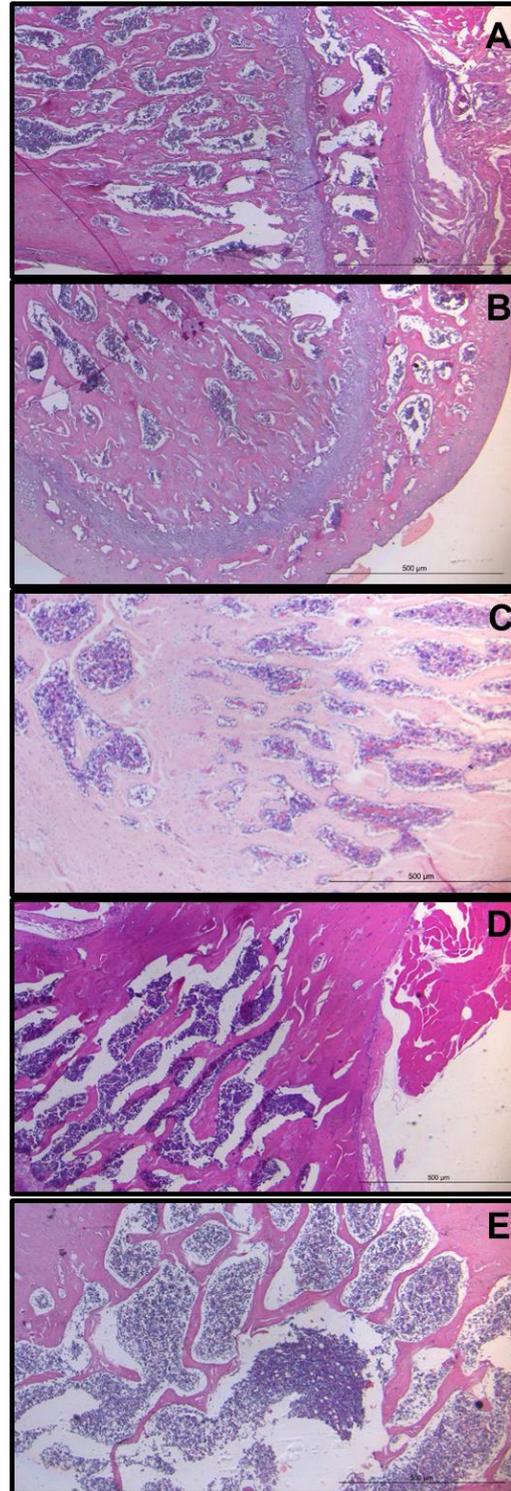


Figura 29: Aspecto histológico do fêmur de animais ovariectomizados submetidos à periodontite e tratados com anastrozol (ANA). Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Após os animais terem sido eutanasiados, no dia 28, os fêmures de animais Normais (A), falso-ovariectomizados não tratados (B) ou tratados com ANA 0,5 mg/kg (D), e de ovariectomizados não tratados (C) ou tratados com ANA (E) foram processados para análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina; magnificação de 40X; barra representa 500 µm).

Considerando os demais parâmetros sistêmicos, nos quais os animais com 28 dias de F-OVX ou OVX e 21 dias de periodontite apresentaram leucocitose, à custa de neutrofilia e linfomonocitose, o tratamento com ANA em animais F-OVX ou OVX não alterou a leucocitose observada no dia 28, nem a neutrofilia ou linfomonocitose, respectivamente (tabela 14).

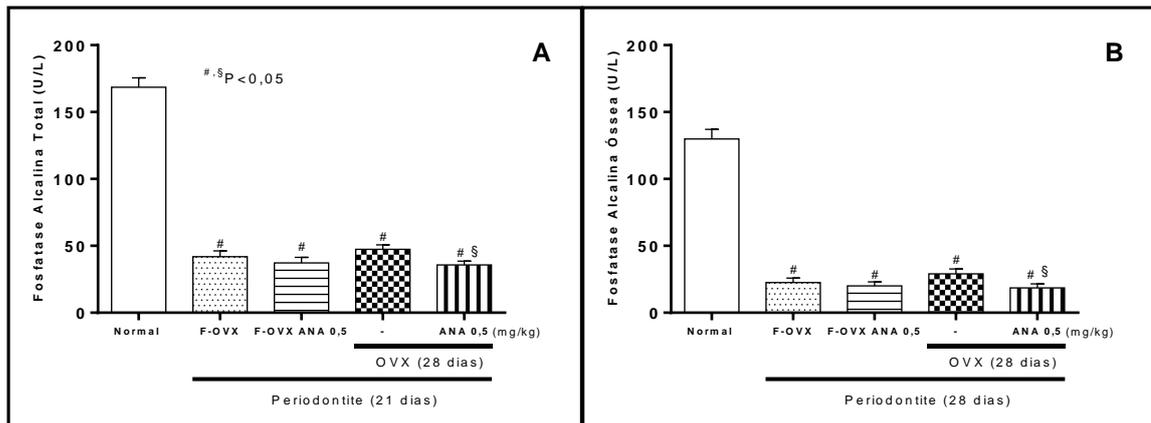


Figura 30: Efeito do anastrozol (ANA) nos níveis séricos de fosfatases em animais ovariectomizados (OVX) submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. Os valores representam a média±erro padrão da média dos níveis séricos de fosfatase alcalina total (FAT; A) e óssea (FAO; B) basais (Normal) e de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX) ou tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA) de 7-10 animais por grupo. One-Way ANOVA e teste de Bonferroni. [#],^Sp<0,05 em relação ao Normal e ao OVX, respectivamente.

Ao longo de todo o período experimental, os animais tiveram suas massas corpóreas avaliadas. Os animais OVX apresentaram queda significativa de massa corpórea na 24^a h, decorrente do trauma cirúrgico, retomando ganho progressivo de massa até o 28^o dia. De forma semelhante, os animais OVX e tratados com ANA, também apresentaram ganho de massa corpórea. Os animais F-OVX, apenas tratados com ANA, apresentaram cinética de ganho de massa corpórea semelhante ao de animais OVX não tratados até o 17^o dia, quando então, esses animais tiveram menor ganho de massa corpórea até o 28^o dia (figura 31).

Tabela 14 – Efeitos do Anastrozol (ANA) no leucograma de ratas ovariectomizadas e submetidas à periodontite.

Parâmetros	Normal	F-OVX	OVX	F-OVX ANA 0,5 mg/kg	OVX ANA 0,5 mg/kg
	Periodontite				
Leucócitos totais (células $\times 10^3/\text{mm}^3$)	10,7 \pm 0,27	13,2 \pm 0,72 [#]	16,1 \pm 1,24 ^{#,*}	14,4 \pm 0,96 [#]	17,0 \pm 1,07 ^{#,*}
Neutrófilos (células $\times 10^3/\text{mm}^3$)	1,1 \pm 0,12	3,2 \pm 0,43 [#]	2,7 \pm 0,76 [#]	3,4 \pm 0,66 [#]	3,7 \pm 0,43 [#]
Mononucleares (células $\times 10^3/\text{mm}^3$)	9,6 \pm 0,23	10,0 \pm 0,49	13,5 \pm 0,85 ^{#,*,+}	11,1 \pm 0,70	14,3 \pm 1,26 ^{#,*,+}

A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior, 7 dias após a ovariectomia. Os animais receberam ANA durante os 28 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão da média do número total de leucócitos, neutrófilos e mononucleares basais (Normal), de animais falso-ovariectomizados não tratados (F-OVX), tratados com ANA (F-OVX/ANA), ovariectomizados não tratados (OVX) ou tratados com ANA (OVX ANA) 7-10 animais por grupo. ANOVA e Teste de Bonferroni. [#]p<0,05 em relação ao Normal; ^{*}p<0,05 em relação ao F-OVX e ao F-OVX/ANA 0,5, respectivamente.

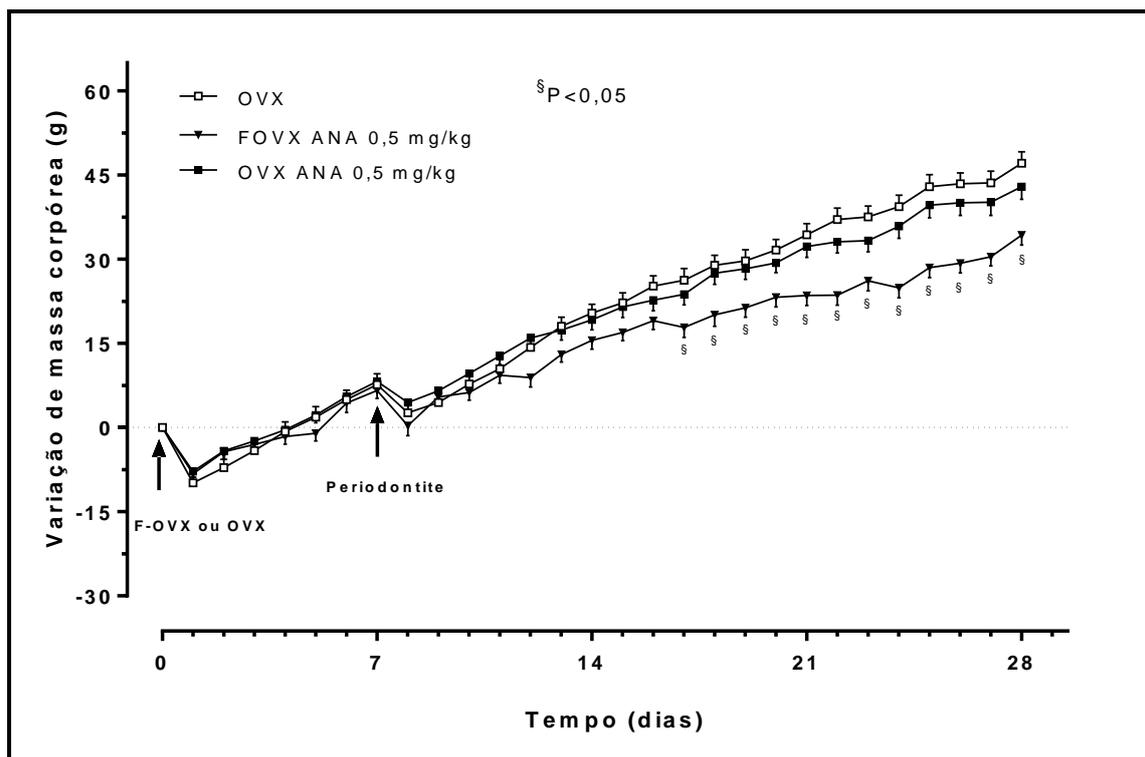


Figura 31: Efeito do anastrozol (ANA) na variação de massa corpórea de animais ovariectomizados (OVX) e submetidos à periodontite. Os animais foram OVX e tratados com ANA (0,5 mg/kg) durante 28 dias. A periodontite foi induzida por ligadura do segundo molar superior 7 dias após a ovariectomia. As massas corpóreas dos animais foram aferidas, diariamente, até o dia 28, quando foram eutanasiados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média da variação de massa corpórea em relação à massa inicial de animais falso-ovariectomizados tratados com ANA (F-OVX/ANA) e OVX não tratados ou tratados com ANA (OVX/ANA) 7-10 animais por grupo. Two-Way ANOVA e teste de Tukey. [§]p<0,05 em relação ao OVX.

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram utilizados dois modelos animais, um deles, o de ovariectomia (OVX), o qual induz um estado de hipoestrogenia, semelhante ao observado em mulheres especialmente pós-menopausa, e o modelo de indução de reabsorção óssea alveolar, que mimetiza as principais características da periodontite crônica em humanos. A literatura tem relatado que a supressão ovariana, tal como ocorre em mulheres pós-menopausa, afeta o metabolismo ósseo, favorecendo a osteoclastogênese (D'AMELIO *et al.*, 2008), comum em doenças ósseas como a osteoporose (ALBRIGHT; BLOOMBERG; SMITH, 1940) e a periodontite (TEZAL *et al.*, 2000; HASS *et al.*, 2009; BERTULUCCI *et al.*, 2012; LAMONTE *et al.*, 2013).

Logo, os 28 dias de remoção de ovários (OVX) induziram o estado de hipoestrogenia caracterizado pela redução de cerca de 50% dos níveis séricos de estradiol, bem como pela redução do peso úmido relativo do útero, aqui definido por índice uterino dos animais ovariectomizados (OVX). Esses dados estão de acordo com outros autores, os quais relataram que a ovariectomia reduziu os níveis desse hormônio decorridos 28 dias da cirurgia (LIU *et al.*, 2010; SHIN, *et al.*, 2012), assim como foi observada diminuição significativa do peso do útero desses animais (VEKARYA; KAUR; TIKOO, 2013; LAMAS *et al.*, 2015).

Tem sido demonstrado que a hipoestrogenia experimental pode surgir a partir de uma semana de OVX (LIU *et al.*, 2010), enquanto que a periodontite induzida por ligadura é caracterizada por apresentar pico de reabsorção óssea alveolar a partir do 7º dia (LIMA *et al.*, 2000). Desse modo, a periodontite induzida nesse estudo, após 1 semana de OVX, foi considerada ter sido iniciada concomitantemente com o estado de hipoestrogenia estabelecido (LIU *et al.*, 2010). A partir de então, o fio permaneceu em torno do 2º molar durante 21 dias, coincidindo com os 28 dias de OVX.

Para efeitos comparativos, a periodontite foi induzida em animais, além de OVX, também nos que não foram submetidos previamente à OVX, isto é, em animais falso-ovariectomizados (F-OVX). Neste caso, ambas as hemiarcadas foram utilizadas: a com a ligadura, como controle (positivo), e a contralateral, denominada Normal. Dessa forma, observou-se um aumento da reabsorção óssea alveolar (ROA) induzida por ligadura, quando comparado às hemiarcadas contralaterais, sem a ligadura, tanto nos animais OVX, como nos F-OVX. Apesar de não ter se observado diferenças

significantes entre ambos os grupos OVX e F-OVX por análise direta de toda a face vestibular das hemiarcadas, estas foram coerentes com os achados por histometria nas respectivas regiões de furca dos segundos molares no período estudado. Vale salientar, no entanto, que de forma geral, os dados obtidos foram compreensíveis, uma vez que a periodontite por si só induz uma intensa ROA em decorrência da permanência da ligadura (MARTINS *et al.*, 2016).

Sabe-se que o modelo animal de ligadura em molares induz uma resposta inflamatória à presença de micro-organismos diversos subjacente à área ligada, caracterizada por infiltrado inflamatório leucocitário no tecido gengival e por reabsorções óssea alveolar e cementária, mimetizando as principais características da periodontite em humanos (LIMA *et al.*, 2000 e 2004; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013). De fato, as análises histológicas desse estudo evidenciaram, além das intensas reabsorções óssea alveolar e cementária, o aumento de leucócitos nos tecidos gengivais considerados entre os primeiro e segundo molares dos animais. De maneira complementar, foi observado que o tecido gengival subjacente à ligadura apresentou um intenso aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima abundante em grânulos azurófilos de neutrófilos (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982; LIMA *et al.*, 2005). Tais aspectos estão de acordo com outros estudos descritos por nosso grupo em que a periodontite induzida por ligadura aumentou a atividade MPO na gengiva, bem como aumentou o infiltrado leucocitário no periodonto (GOES *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016). Sabe-se que a permanência da ligadura resulta em acúmulo de bactérias e seus produtos induzem o recrutamento de neutrófilos para o local da lesão (GUIMARÃES *et al.*, 2016), e estes são fundamentais para a defesa do organismo contra patógenos periodontais, bem como favorecem a continuidade do processo imunoinflamatório (BEZERRA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004).

Entretanto, quando os agentes lesivos não são debelados a contento, os neutrófilos passam, então, a participar da destruição dos tecidos do periodonto de sustentação (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011). A participação dessas células na destruição periodontal tem sido descrita, assim como para outras condições, como sepse (CZAIKOSK *et al.*, 2016) e artrite reumatoide (MARTELLI-PALOMINO *et al.*, 2016), especialmente a partir da degranulação de diversas enzimas líticas e proteínas. De fato, os neutrófilos apresentam um papel importante na transição de gengivite estabelecida para periodontite crônica (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011).

Assim como os neutrófilos, os quais dominam o processo inflamatório inicial, monócitos também migram da corrente sanguínea para o foco da lesão e, então, são diferenciados em macrófagos. Os macrófagos são capazes de exercer diversas funções no organismo; além de fagocitose, atuam como células apresentadoras de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (PRESHAW; TAYLOR, 2011; YUCEL-LINDBERG; BÅGE, 2013).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, destaca-se o TNF- α (GRAVES; COCHRAN, 2003; KINANE; PRESHAW; LOOS, 2011; PRESHAW; TAYLOR, 2011), que exerce um papel crítico no processo de reabsorção óssea por facilitação da osteoclastogênese e da ativação osteoclástica (NAKASHIMA *et al.*, 2000). TNF é produzido principalmente por macrófagos, e também por uma grande variedade de outras células, incluindo células linfoides, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e tecido neuronal (BREMER, 2013).

Neste estudo, os animais com periodontite apresentaram elevação dos níveis gengivais de TNF- α e da marcação imunohistoquímica para essa citocina no periodonto, o que estão de acordo com relatos prévios da literatura que associam a ROA com aumento dos níveis de TNF- α (GUIMARÃES *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2016), e com estudos em que houve uma inibição significativa da ROA pela utilização de inibidores seletivos dessa citocina (LIMA *et al.*, 2004). Sabe-se que o TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, consiste em um mediador primário que induz a produção de mediadores secundários, tais como quimiocinas, prostaglandinas e enzimas líticas, que promovem a amplificação da inflamação. Portanto, o TNF- α é essencial, para o início da resposta inflamatória e para a destruição subsequente dos tecidos moles e duros periodontais (GRAVES; COCHRAN, 2003). Assim, o papel da inflamação nos processos reabsortivos não envolvem somente a elevação de uma molécula isoladamente. De fato, a superfamília do TNF consiste em um grande grupo de ligantes e receptores relacionados estrutural e funcionalmente, que exercem efeitos nas respostas imunes. Dentre as moléculas dessa família, destacam-se o RANKL e a OPG (PACIFICI, 2010; RICHARD *et al.*, 2015), cujas expressões são aumentadas ou reduzidas dependentemente do TNF- α , respectivamente (NAKASHIMA *et al.*, 2000).

O RANKL, um fator chave na diferenciação e ativação dos osteoclastos, é encontrado na forma solúvel e presente na superfície de uma variedade de células,

como osteoblastos, osteócitos e linfócitos T e B (KHOSLA, 2001; KAWAI *et al.*, 2006; PACIFICI, 2010; NAKASHIMA *et al.*, 2011). Tem sido demonstrado que as duas formas de RANKL, ligada à membrana celular ou a solúvel, são detectadas em lesões periodontais, sendo os linfócitos B e T as principais fontes de RANKL ligado à membrana em pacientes com periodontite (KAWAI *et al.*, 2006). No entanto, os mecanismos subjacentes à formação e o papel do RANKL na sua forma solúvel em pacientes com doença periodontal não haviam sido estabelecidos. Nesse contexto, recentemente, foi demonstrado que a clivagem de RANKL ligado à membrana, sobretudo, de linfócitos B, por meio da atividade da enzima conversora de TNF- α , está ativamente envolvida na osteoclastogênese em pacientes com doença periodontal (KANZAKI *et al.*, 2016), corroborando a importância dessas moléculas na patogênese dessa doença.

Ademais, tem sido evidenciado que os linfócitos T-helper (Th) 17, por produzirem IL-17, além de possuírem um papel importante na estimulação de RANKL (LEE, 2013), têm sido relacionados ao aumento do RNA mensageiro de TNF- α (JOVANOVIĆ *et al.*, 1998) e, quando da combinação de ambas as citocinas, IL-17 e TNF- α , foi observada estimulação da reabsorção óssea em ossos longos em fêmur de camundongos (VAN BEZOOIJEN *et al.*, 1999).

Prosseguindo com os nossos dados, foram observados aumento da imunomarcagem para RANKL e diminuição da imunomarcagem para OPG, com consequente aumento da razão RANKL/OPG. Esses achados estão de acordo com Guimarães *et al.* (2016) que, em modelo semelhante, relacionaram a ROA aumentada nos animais não tratados ao aumento da expressão de RANKL, diminuição da expressão de OPG, bem como ao aumento da sua razão RANKL/OPG. Tal razão aumentada indica maior diferenciação e ativação de osteoclastos, por facilitar a interação RANK/RANKL (NAKASHIMA *et al.*, 2000; KHOSLA, 2001; PACIFICI, 2010). De fato, quando se avaliou a imunomarcagem para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), observou-se um aumento significativo dessa enzima, o que está de acordo com Guimarães *et al.* (2016). A fosfatase ácida tartarato-resistente tipo 5 (TRAP ou Acp5) é uma enzima encontrada em humanos e em diversas espécies de murinos. Sua ocorrência inclui vários tipos de tecidos, como ossos e cartilagens (HAYMAN *et al.*, 2000; HAYMAN; COX, 2003). TRAP é altamente expressa em condroblastos e em osteoclastos e, portanto, é usado como um marcador histoquímico para estas últimas

células (BURSTONE, 1959; MINKIN, 1982; GUIMARÃES *et al.*, 2016; PANAGOPOULOS *et al.*, 2017; YAMANAKA, *et al.*, 2006).

Sabe-se que a destruição óssea pode resultar tanto por um aumento da reabsorção óssea, como de uma redução do anabolismo ósseo, ou por uma combinação de ambos os processos (ERIKSEN, 2010). Nesta pesquisa, foi verificado que a destruição óssea induzida na periodontite foi acompanhada por redução dos níveis séricos da fosfatase alcalina total (FAT) em relação aos valores basais. A FAT é constituída por 3 isoformas principais, a hepática, a entérica, bem como a fosfatase alcalina óssea (FAO). Esta última consiste em um importante marcador indireto da atividade osteoblástica, portanto, dos processos de formação do osso, sobretudo na fase de mineralização (COLEMAN *et al.*, 2008; MIKAMI *et al.*, 2010; WHYTE, 2010). Neste estudo, os níveis séricos de FAO foram significativamente reduzidos após 21 dias de periodontite em animais F-OVX. Em corroboração, observou-se redução da imunomarcagem de OPG nesse período. A OPG é uma molécula que se encontra na forma solúvel e também presente em osteoblastos. Sua interação com o RANKL impede a ligação deste ao RANK, conseqüentemente, reduzindo a atividade osteoclástica. Então, quando a OPG se encontra em baixos níveis, como nesta pesquisa, indica o favorecimento de processos reabsortivos (KHOSLA, 2001; PACIFICI, 2010). Recentemente, demonstramos ocorrer redução dos níveis séricos de FAO após a indução da periodontite em ratos, coincidente com o aumento da ROA nesses animais (GOES *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2016). Assim, os baixos níveis séricos de FAO indicam que o potencial anabólico pode estar comprometido nesse modelo.

Em suma, a ROA observada em animais submetidos à periodontite ocorreu devido ao aumento da resposta imunoinflamatória, caracterizada pelo aumento do número de neutrófilos e de TNF- α , o que favoreceu a osteoclastogênese em detrimento da atividade de osteoblastos.

Em sequência, foi considerado o efeito da periodontite em animais submetidos previamente à OVX, um modelo padrão ouro para a indução de osteopenia/osteoporose em animais (FROST; JEE, 1992; WRONSKI *et al.*, 1989; MOSEKILDE, 1995). Foi observado que no 28º dia o estado de hipoestrogenia per si não aumentou a reabsorção óssea alveolar (ROA) nas análises macroscópica, histométrica e histológica quando comparados à periodontite em animais F-OVX.

Entretanto, a periodontite observada nos animais cujos ovários foram removidos foi acompanhada pelo aumento significativo de atividade de MPO, esta além daqueles observados no tecido gengival de animais F-OVX, denotando aumento do infiltrado neutrofílico (LIMA *et al.*, 2005). A literatura mostra que a atividade dessa enzima é influenciada pelos níveis de estrógeno. Tais níveis apresentam-se reduzidos por doses suprafisiológicas de 17β -estradiol em camundongos com colite induzida por ácido dinitrobenzeno sulfônico, o que indicou que o estradiol apresentou efeitos anti-inflamatórios nesse modelo de sepse, embora a literatura mostre que os efeitos do estradiol em inflamações intestinais sejam complexos e conflitantes (VERDU *et al.*, 2002). Ainda, animais ovariectomizados apresentam aumento da atividade de MPO, tanto em modelo de sepse (ALBAYRAK *et al.*, 2011) como de feridas cutâneas (COSKUN *et al.*, 2014), quando comparados àqueles cujos ovários não foram removidos.

O aumento no número de neutrófilos ativos nos animais OVX, no entanto, não foi seguido por aumento de TNF- α , de marcadores relacionados aos processos de reabsorção, RANKL e TRAP, ou de alterações nos de formação ósseas, OPG e FAO, além daqueles observados em animais F-OVX. Por conseguinte, a hipoestrogenia por OVX não causou aumento de ROA em animais submetidos à periodontite, quando comparados ao grupo de animais com periodontite F-OVX. Em relação aos nossos achados, apesar de não ser o que esperávamos, os mesmos não estão completamente dispares da literatura. Embora estudos com protocolos semelhantes ao utilizado nesta pesquisa, ou abordando maiores períodos de tempo de ovariectomia, como de 35 a 84 dias, e periodontite variando entre 7 e 14 dias, demonstrem que animais ovariectomizados apresentaram maior ROA (LIU *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2014), nossos resultados estão de acordo com diversos outros estudos, nos quais também não se observaram diferenças significantes de ROA entre animais F-OVX e OVX, inclusive nos estudos onde foram considerados tempos semelhantes ou maiores de ovariectomia, desde 30 até 150 dias, associados a 30 ou 35 dias de periodontite por ligadura, sem haver aumento da ROA ou diminuição da DMO (ORRICO *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2005; ANBIDER *et al.*, 2007; VAZIRI *et al.*, 2007; BEZERRA *et al.*, 2013). Adicionalmente, o estudo de Amadei *et al.* (2011), avaliando a periodontite com 30, 60 e 90 dias em animais ovariectomizados, somente aos 90 dias, a ROA macroscópica foi aumentada,

enquanto que nos períodos de 30 e 60 dias, a ROA manteve-se semelhante aos animais F-OVX. Assim sendo, consideramos que nossos resultados estão de acordo com a maioria de estudos, não obstante às diferenças relacionadas à grande variedade de protocolos empregados.

Por outro lado, sabe-se que existem algumas diferenças entre os ossos maxilar e mandibular e os demais ossos do organismo, como o fêmur, mais extensamente avaliado nesse modelo de osteoporose induzida por ovariectomia. Assim, Yang, Pham e Crabbe (2003) ressaltaram, a diferença embrionária da tíbia e da mandíbula para justificarem o maior efeito da redução estrogênica, promovida por 16 semanas de ovariectomia, sobre a tíbia. De fato, foi relatado que enxertos ósseos obtidos de ossos de origem endocondral, que têm como exemplos a tíbia e o fêmur, perderam mais volume que aqueles obtidos de ossos de origem membranosa, como é o caso dos maxilares (ZINS; WHITAKER, 1983). Além dessas diferenças embrionárias, tem sido relatado que a carga mastigatória pode contrabalançar o efeito da redução de estrógeno no osso alveolar (TANAKA *et al.*, 2000; KURODA *et al.*, 2003). Aparentemente, o estresse mecânico promovido pela mastigação é crucial para a manutenção da estrutura e do volume ósseos, pois a extração dos dentes superiores em animais normais, bem como a imobilização mandibular causaram modificações osteoporóticas na mandíbula ou osteopênicas, respectivamente (VON WOWERN; HJORTING-HSANSEN; STOLTZE, 1979; SHIMARA *et al.*, 1991).

No presente estudo, embora os fêmures de animais OVX não tenham apresentado alterações significantes, quando comparados aos de animais Normal e F-OVX, foram pontuadas algumas alterações no grupo OVX, como presença de tecido conjuntivo fibroso e raros osteoclastos, o que sugeriu o efeito precoce da hipoestrogenia nesse osso em relação à maxila em alguns animais OVX. Possivelmente, um maior tempo de avaliação confirmaria esses resultados ou, ainda, como descrito adiante, tais alterações serem importantes quando da associação da ovariectomia com a redução medicamentosa da síntese de estrógeno.

A redução dos níveis circulantes de estrógeno, tal como vista nos animais OVX, além de ser importante em mulheres que passaram pela menopausa, considerando as possíveis repercussões ósseas que essa hipoestrogenia pode

causar (ALMEIDA *et al.*, 2017), é relevante, ainda, em mulheres com câncer de mama positivo para receptores hormonais. De fato, a relação do câncer de mama com os níveis de estrógeno já foi relatada há mais de um século, quando em 1986 o médico George Beatson demonstrou que a remoção dos ovários em uma paciente pré-menopausa esteve associada com a redução do tumor (BEATSON, 1986), que pode ser compreendida pela grande expressão de receptores hormonais, estrógeno e progesterona, em aproximadamente 70% dos casos de câncer de mama (HOWLANDER *et al.*, 2014). Nesse contexto, a manipulação hormonal é a pedra angular do tratamento dessas neoplasias positivas para tais receptores (SINI *et al.*, 2016), de forma que a modulação dos receptores de estrógeno por fármacos como o tamoxifeno, ou a inibição da biossíntese desse hormônio por fármacos como o anastrozol são as principais abordagens terapêuticas do câncer de mama (LUMACHI; SANTEUFEMIA; BASSO, 2015). Além disso, as possíveis repercussões ósseas decorrentes da deficiência ovariana podem ser moduladas por esses fármacos.

Os efeitos do tamoxifeno (TMX) têm sido investigados tanto em situações de hipoestrogenia, em mulheres pós-menopausa e em ratas ovariectomizadas, como em situações em que os níveis circulantes de estrógeno estão dentro da normalidade, em mulheres pré-menopausa e ratas cujos ovários não foram removidos (COLE *et al.*, 1971; PARK; JORDAN, 2002; CHEN *et al.*, 2011; PERRY *et al.*, 2005; SUGIYAMA *et al.*, 2010). Particularmente, no presente estudo foram avaliados os efeitos do TMX em ratas ovariectomizadas. Foi observado que o TMX não interferiu nos níveis séricos de estradiol, o que condiz com seu mecanismo de ação que consiste na modulação dos receptores de estrógeno, sem alterar a síntese desse hormônio (LEWIS; JORDAN, 2005). A literatura relata que o TMX apresenta ação mista nos receptores de estrógeno (RE) no útero (LEWIS; JORDAN, 2005, AN *et al.*, 2016), o que está relacionado a alterações endometriais, como hiperplasia e risco aumentado de desenvolvimento de câncer invasivo em mulheres sob tratamento (FISHER *et al.*, 1998; PEREZ-MEDINA *et al.*, 2011; RUNOWICZ *et al.*, 2011). Tais alterações também foram observadas em estudos com animais que receberam TMX por um período de 3 a 4 meses, refletidas pela hipertrofia do epitélio uterino e proliferação glandular endometrial, com consequente aumento no peso desse órgão (SIKOSKI *et al.*, 2007; GOSS; QI; HU, 2009; HAMID; KHURSHID; BUTT, 2015). Outros autores, utilizando doses excessivamente elevadas, como 20 e 200 mg/kg, demonstraram

microscopicamente alterações uterinas com 3 dias de tratamento, mas não em nível de peso do órgão (SCHWEIKART *et al.*, 2014). No presente estudo, utilizando dose máxima diária de 9 mg/kg, durante 28 dias, não foram constatadas alterações no peso úmido do útero murino dos animais OVX/TMX em relação ao de animais OVX, sugerindo que o tempo de tratamento não foi suficiente para que alterações em nível macroscópico fossem observadas.

Além do efeito misto que o TMX apresenta nos RE do útero, favorecendo sua hipertrofia, tem sido descrito que esse fármaco também apresenta ação agonista quando ligado nos RE do osso (LEWIS; JORDAN, 2005). Assim, foi observado que o tratamento com TMX nas diferentes doses preveniu, de forma significativa, a ROA em relação à reabsorção óssea em animais F-OVX ou OVX avaliada macroscopicamente, sendo corroborada pela menor ROA na área de furca e na região interproximal vistas nas análises histométrica e histológica, respectivamente.

Considerando a patogênese da periodontite, reproduzida pelo modelo utilizado no presente trabalho, acredita-se que o TMX apresentou efeito protetor ósseo, inicialmente, por reduzir o processo inflamatório, demonstrado por redução da atividade de MPO, do infiltrado leucocitário e da imunomarcação para TNF- α . Em seguida, esse efeito anti-inflamatório resultou em menor atividade osteoclástica, demonstrada pela redução da imunomarcação para TRAP, assim como o favorecimento da atividade osteoblástica, demonstrado pelo aumento de FAO, devido à redução de RANKL e à manutenção de OPG nos níveis normais, com consequente redução da razão RANKL/OPG.

Os efeitos protetores do TMX no tecido ósseo são explicados pela sua ação semelhante à do estrógeno nesse tecido (LEWIS; JORDAN, 2005), demonstrado tanto em ensaios clínicos (LOVE *et al.*, 1992; FISHER *et al.*, 2005; KALDER, *et al.*, 2014), como em animais. Especificamente, os estudos pré-clínicos mostram prevenção dos efeitos deletérios no osso decorrentes da ovariectomia (JORDAN; PHELPS; LINDGREN, 1987; TURNER *et al.*, 1987; CZERNY *et al.*, 2003), como aumento da DMO, do conteúdo mineral ósseo, da resistência biomecânica e do volume de osso trabecular em animais OVX (CHEN *et al.*, 2011; NUNEZ *et al.*, 2004; SUGIYAMA *et al.*, 2010), assim como pela formação de osso esponjoso em animais não OVX (PERRY *et al.*, 2005), o que sugere que o TMX protege o tecido ósseo não apenas

por reduzir os mecanismos reabsortivos, mas também por favorecer os anabólicos ósseos.

Apesar da literatura não explicar completamente como os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (MSRE) apresentam efeitos distintos de acordo com os tipos de tecido e células nos quais estão ligados, têm sido relatadas diferenças de ação do TMX, conforme esteja ligado no RE α ou RE β (SMITH; NAWAZ; MALLEY, 1997; WEBB *et al.*, 2003; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). Isso indica que a expressão diferenciada de determinado subtipo de RE em um dado tecido corresponde às diferentes respostas agonista, antagonista ou mista do TMX. Além disso, tem sido descrito que o TMX apresenta preferência por RE α , enquanto que seu efeito farmacológico em nível de RE β ainda carece de maiores investigações (LEWIS; JORDAN, 2005; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). Sabe-se que as ações do estrógeno no tecido ósseo são mediadas, sobretudo, via RE α (NELSON; WARDELL; MCDONNELL 2013; WANG *et al.*, 2016), enquanto a ligação ao RE β possivelmente resulte em supressão da sinalização osteogênica promovida pelo estrógeno em osteoblastos (WANG *et al.*, 2016). Portanto, sugere-se que o efeito agonista relevante do TMX no osso seja via RE α , justificando, assim, seu perfil protetor encontrado no presente estudo, de diminuição da ROA em animais OVX.

Vale ressaltar que, como explicitados anteriormente, os efeitos do TMX são ditos tecido-dependentes (LEWIS; JORDAN, 2005), e são raros os estudos que avaliaram seus efeitos em tecidos periodontais. Lewko e Anderson (1986) relataram que o TMX apresentou ação semelhante à do estrógeno quando cultivado com células do ligamento periodontal, sobretudo fibroblasto-*like*, inibindo o crescimento destas. Em contrapartida, em culturas com fibroblastos gengivais tem sido demonstrado que este fármaco apresenta efeitos antagonistas (TILAKARATNE; SOORY, 1999; SOORY; TILAKARATNE, 2003). No entanto, não há relatos de efeitos do TMX sobre as células inflamatórias de tecidos periodontais. Porém, considerando outros tecidos, a literatura mostra que enquanto o TMX aumenta a atividade fagocítica de neutrófilos isolados de sangue venoso de humanos (CORRIDEN *et al.*, 2015), também reduz a atividade de MPO e, portanto, o infiltrado neutrofílico em um modelo de injúria da medula espinhal (WEI; MA, 2014), o que corrobora os nossos dados, os quais mostram que o TMX reduziu a presença dessas células no tecido gengival, demonstrada pela redução da atividade de MPO.

Em relação à expressão dos RE nos tecidos moles periodontais, apesar do RE α ser encontrado na gengiva e nas células do ligamento periodontal, o RE β é o subtipo predominante nesses sítios (JONSSON *et al.*, 2004; TANG *et al.*, 2008; NEBEL *et al.*, 2011), o que pode indicar menor ação do TMX nesses tecidos (LEWIS; JORDAN, 2005; THOMAS; GUSTAFSSON, 2011). De fato, apesar da imunomarcção para TNF- α ter sido diminuída no periodonto dos animais OVX tratados com TMX, os níveis gengivais dessa citocina não foram reduzidos em relação aos de animais, também submetidos à periodontite, OVX ou F-OVX. Nesse contexto, enquanto o tecido gengival e as células do ligamento periodontal expressem principalmente RE β , o fato do ligamento periodontal estar em íntimo contato com o osso alveolar, cujos efeitos ocorrem predominantemente via RE α (NELSON; WARDELL; MCDONNELL 2013; WANG *et al.*, 2016), pode justificar a redução de TNF- α no ligamento periodontal e a não redução na gengiva.

Não existem relatos na literatura sobre os efeitos do TMX nos níveis de TNF- α nos tecidos periodontais, no entanto, assim como observado no presente estudo, tais efeitos diferem conforme a célula considerada para avaliação. Assim, enquanto Yazgan *et al.* (2016) demonstraram que os níveis séricos dessa citocina não foram reduzidos com o tratamento subcutâneo de ratas OVX com 1 mg/kg de TMX, em modelo de peroxidação lipídica em eritrócitos, Lamas *et al.* (2016) relataram que o mesmo tempo de tratamento de ratas OVX com mesma dose de TMX administrado por gavagem esteve associado à redução de TNF- α no modelo de disfunção endotelial vascular.

Em conjunto, os dados do presente estudo indicam que o TMX apresentou efeito anti-inflamatório, reduzindo infiltrado neutrofílico e TNF- α , possivelmente via RE α . Essas alterações inflamatórias, por conseguinte, afetam indiretamente o processo de reabsorção óssea subjacente à periodontite, por diminuírem a expressão de RANKL. De fato, nossos resultados sugerem que o TMX reduziu a atividade de osteoclastos, corroborada pela redução da imunomarcção para TRAP, provavelmente em decorrência da diminuição de RANKL, mediador responsável pela diferenciação e ativação dessas células. O efeito protetor do TMX no osso alveolar, no entanto, não ocorreu somente por inibição da reabsorção, mas também pelo favorecimento da formação óssea, demonstrado pela manutenção dos níveis normais de OPG e pelo aumento da FAO. Esses dados estão de acordo com o estudo de

Michael *et al.* (2007), que mostrou que o TMX reduziu a ativação de osteoclastos, tanto diretamente, quanto indiretamente via osteoblastos, aumentando a produção de OPG, e com o estudo de Shevde *et al.* (2000), que mostrou que o TMX apresentou atividade semelhante ao estrógeno, reduzindo a diferenciação de osteoclastos positivos para TRAP devido à redução de RANKL.

Os efeitos do TMX também foram avaliados no fêmur, não mostrando alteração significativa em relação ao fêmur de animais OVX. Considerando que não foram observadas diferenças significantes entre os animais cujos ovários foram removidos e aqueles Normais ou F-OVX, compreende-se por quê o fêmur de animais OVX tratados com TMX apresentou características normais.

Em suma, os presentes dados indicam que o TMX, ao modular seletivamente os receptores de estrógeno, reduziu a ROA por diminuir a resposta inflamatória, resultando em menor diferenciação e ativação osteoclásticas, e favorecendo da formação óssea.

Nesse sentido, percebendo-se que a modulação dos receptores de estrógenos em animais com hipoestrogenia causou alterações importantes no sentido de minimizar os efeitos ósseos deletérios vistos na maxila submetida à periodontite, buscou-se, então, saber quais seriam os efeitos ósseos não apenas da modulação de receptores, mas sim, da inibição maior possível de estrógenos. Daí, portanto, a escolha por se utilizar o anastrozol (ANA), um inibidor da aromatase, cuja redução dos níveis de estrógenos em mulheres pós-menopausa é de aproximadamente 97% (GEISLER *et al.*, 1996 e 2002). Considerando o mecanismo de ação do ANA, que diferente do TMX, não age por modulação dos receptores de estrógeno, mas por inibição da biossíntese desse hormônio, foi decidido avaliar os efeitos desse fármaco não, somente, em animais OVX mas também em animais F-OVX, a fim de se investigar se a inibição da aromatase nesses animais resultaria em hipoestrogenia capaz de promover alterações ósseas significativas.

O anastrozol (ANA), diferentemente do TMX, promoveu redução significativa dos níveis circulantes de estradiol em animais ovariectomizados (OVX) ou não (F-OVX), corroborada pela redução do índice uterino desses animais. Embora esse fármaco não seja indicado para pacientes pré-menopausa (SMITH; DOWSETT,

2003), a literatura tem mostrado que sua utilização em animais cujos ovários não foram removidos está relacionada à redução dos níveis séricos de estradiol (KUMRU *et al.*, 2007) e do índice uterino (VEKARYA; KAUR; TIKOO, 2013), sugerindo, assim, que somente a inibição farmacológica da síntese de estradiol já é suficiente para o estabelecimento de um estado de hipoestrogenia, com valores circulantes desse hormônio inferiores aos obtidos pela ovariectomia. A aromatase, enzima alvo do anastrozol e responsável pela biossíntese do estrógeno, não é encontrada somente nos ovários, mas em uma variedade de tecidos e órgãos (ANTONIO-RUBIO *et al.*, 2011; BULUN; SIMPSON, 1994; KELLIS; VICKERY, 1987; HARADA *et al.*, 1999; NAWATA *et al.*, 1995; O'NEILL; ELTON; MILLER, 1988; BALTHAZART *et al.*, 2003; CASTAGNETTA *et al.*, 2003; BERKOVITZ; BROWN; FUJIMOTO, 1987), de forma que a sua supressão pelo ANA nesses sítios extraovarianos é importante no tratamento de mulheres pós-menopausa com câncer de mama positivo para receptores hormonais. De fato, foi observado nesta pesquisa que a combinação entre inibição da síntese de estradiol por ovariectomia e por inibição química pelo ANA promoveu redução aquém dos níveis circulantes desse hormônio em animais somente OVX, tal como um efeito de adição.

Também diferente do TMX, o ANA, nas duas maiores doses de 0,1 e 0,5 mg/kg, aumentou a ROA macroscópica em animais OVX, quando comparados aos animais não tratados OVX ou não (F-OVX) e também em relação a animais tratados com ANA, sem OVX (F-OVX/ANA). Isso, possivelmente, foi devido à inibição adicional da síntese de estradiol promovida pela combinação da OVX com a supressão química da produção desse hormônio pelo ANA que, assim, resultou em níveis mais baixos ainda de estradiol. A repercussão desses achados foi notada no osso alveolar submetido à periodontite. De fato, os baixos níveis deste hormônio observados pela inibição da sua síntese, seja somente pela ovariectomia ou apenas pelo tratamento com ANA, tais abordagens isoladamente não foram capazes de aumentar a ROA. Tem sido descrito que a deficiência estrogênica favorece a reabsorção óssea, via interferência no eixo RANK/RANKL/OPG (D'AMELIO *et al.*, 2008), sendo este o mecanismo mais importante que relaciona o tratamento com IA e o aumento de processos reabsortivos (GEISLER; LONNING, 2010). Assim, a ROA aumentada no grupo de animais OVX tratados com ANA pode ser explicada pelo favorecimento da osteoclastogênese, devido tanto pela redução da síntese de OPG, como também pelo

aumento da síntese de RANKL (D'AMELIO *et al.*, 2008), em decorrência do aumento da produção da citocina pró-reabsortiva TNF- α (ROGGIA *et al.*, 2001), que ocorrem em resposta à supressão estrogênica (ROGGIA *et al.*, 2001; D'AMELIO *et al.*, 2008; GEISLER; LONNING, 2010).

Entretanto, esse aumento de ROA conferido pela combinação OVX e ANA não foi acompanhado por incrementos de seus respectivos valores encontrados na histometria ou nos aspectos histológicos. Tal falta de aumentos, além dos seus valores quando separados pode explicar o porquê de não ter se percebido incrementos nas atividades de MPO, como também nos níveis já elevados de TNF- α em tecidos gengivais.

De fato, os animais OVX tratados com ANA apresentaram maior imunomarcagem para RANKL e menor imunomarcagem para OPG, quando comparados a animais com periodontite que receberam apenas ANA (F-OVX), submetidos a OVX ou apenas F-OVX. Como explicitado anteriormente, aumento de RANKL somada à redução de OPG indicam aumento de atividade reabsortiva, coerente com o conseqüente aumento da razão RANKL/OPG e da tendência ao aumento da imunomarcagem para TRAP, indicando aumento da atividade osteoclástica. Corroborando, os animais OVX tratados com ANA demonstraram menores níveis séricos do marcador de formação óssea, FAO, indicando possível favorecimento da atividade osteoclástica em detrimento da atividade osteoblástica, o que justifica a maior destruição óssea alveolar demonstrada pela análise macroscópica.

Os dados do presente trabalho estão de acordo, portanto, com os efeitos da hipoestrogenia no metabolismo ósseo (GEISLER; LONNING, 2010), e com o aumento de TRAP, demonstrado por Vekarya, Kaur, Tikoo (2013). Considerando, no entanto, a avaliação acerca dos efeitos do ANA no eixo RANK/RANKL/OPG, a literatura é escassa e não relata a quantificação dessas moléculas diretamente no tecido ósseo. Ren *et al.* (2012) demonstraram a não alteração dos níveis de RANKL e OPG quando do tratamento de osteoblastos humanos com ANA na concentração de 100 $\mu\text{mol/L}$ por até 48 h, associado também a não alteração de FAO. De forma geral, tem sido descrito o aumento de marcadores tanto de reabsorção, quanto de formação ósseas durante a terapia com ANA, o que justifica o aumento do *turnover*

ósseo, incluindo o aumento dos níveis séricos de FAO (EASTELL *et al.*, 2006) e de OPG, esta última, particularmente em pacientes com metástase óssea (MARTINETTI *et al.*, 2004), embora também seja relatada a redução de FAT e FAO após o tratamento com ANA (TAXEL *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 2014).

Interessantemente, os efeitos da hipoestrogenia promovida pelo ANA associado ou não à ovariectomia ocorreram mais precocemente no fêmur em relação à maxila, uma vez que os baixos níveis de estradiol observados no grupo F-OVX/ANA, os quais foram menores que aqueles dos animais somente OVX, promoveram alterações nesse osso, sem causar aumento da ROA. Corroborando, a literatura sugere sobre os efeitos diferentes da redução de estrógeno nos maxilares dos demais ossos do organismo, serem devidos à proteção promovida pela função mastigatória sobre o sistema estomatognático (TANAKA *et al.*, 2000; VON WOWERN; HJORTING-HSANSEN; STOLTZE, 1979; SHIMARA *et al.*, 1991), bem como devido às diferenças embrionárias entre osso alveolar e o fêmur (YANG; PHAM; CRABBE, 2003). A redução adicional da síntese de estradiol promovida pela remoção dos ovários, associada à redução farmacológica promovida pelo ANA, por sua vez, resultou em maiores alterações no fêmur, com espaços medulares mais amplos e inflamação no periósteo, em relação às observadas no grupo F-OVX/ANA.

A literatura apresenta poucos estudos em animais avaliando o efeito do ANA no tecido ósseo, e estes apresentam resultados distintos entre si. Além disso, não existe nenhum relato considerando o osso alveolar. Assim, particularmente sobre os estudos em animais cujos ovários não foram removidos, enquanto Kumru *et al.* (2007) não tenham demonstrado alteração da DMO em vértebras e fêmur após o uso de ANA por 16 semanas, nas doses de 0,1 e 0,2 mg/kg, Vekariya, Kaur e Tikoo (2013) mostraram que o tratamento por 4 semanas com ANA na dose de 0,2 mg/kg promoveu redução da densidade óssea no fêmur associada ao aumento dos níveis séricos de TRAP, indicando o aumento da reabsorção óssea, o que corrobora os nossos achados. Vale ressaltar que Kumru *et al.* (2007) sugeriram que a ausência de efeitos deletérios no osso tenha sido devido ao aumento de androstenioda, um andrógeno que possui efeito protetor ósseo. Considerando animais OVX, nossos dados corroboram com os de Lea e Fanagam (1998), que mostraram que a administração de ANA na dose de 0,1 mg/kg por 90 dias foi associada à maior redução do volume ósseo da tíbia em relação à observada nos animais OVX que não receberam ANA.

Por outro lado, existem diversos ensaios clínicos mostrando o aumento da taxa de fraturas em pacientes pós-menopausa com câncer mama positivo para receptores hormonais (BAUM *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; ATAC, 2008; CUZICK *et al.*, 2010), associado à diminuição da DMO, em diferentes ossos, tais como trocânter, vértebras lombares e quadril, já a partir do primeiro ano (SERGI *et al.*, 2012; KALDER *et al.*, 2013; TAKEUCHI *et al.*, 2014) e, mesmo mais precocemente, aos 6 meses, no fêmur (RASTELLI *et al.*, 2011). Especificamente sobre o osso alveolar, a literatura recente traz um único ensaio clínico, longitudinal, que avalia o estado periodontal de pacientes em tratamento com IA, incluindo exemestano, anastrozol e letrozol, comparadas a mulheres pós-menopausa sem câncer de mama. De acordo com o presente trabalho, esse estudo relata que os IA aumentam a profundidade de sondagem e a perda de inserção clínica, diminuindo os níveis ósseos radiográficos nos diferentes tempos avaliados (EAGLE *et al.*, 2016).

Diante do exposto, embora o fêmur seja um osso relacionado à resistência e capaz de suportar grandes pressões, pode ser sugerido que o ANA tenha promovido reabsorção óssea mais precocemente no fêmur, quando comparado aos maxilares, pelo fato desses últimos encontrarem-se sob constantes estímulos mastigatórios. De fato, tem sido relacionado que a estimulação física como um todo, durante exercícios físicos, pode render menores perdas ósseas em condições cujo processo reabsortivo está aumentado (MISHRA; MISHRA; DEVANSHI, 2015; TEJERO *et al.*, 2016), bem como favorecer o aumento da DMO em atletas (CREIGHTON *et al.*, 2001).

Sistemicamente, foi observado que a indução da periodontite promoveu leucocitose, à custa de neutrofilia e linfomonocitose comparados aos valores basais, tal como já relatado por Guimarães *et al.* (2016). Entretanto, vale salientar que a leucocitose vista nos animais OVX com periodontite foi maior que a dos F-OVX, com predomínio de leucócitos mononucleares apenas aos 28 dias. Esses achados estão de acordo com resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, em que foi mostrado que a ovariectomia esteve relacionada ao aumento do número de linfócitos circulantes (MELO, 2012). Este aumento no número de células mononucleares pode ser entendido pelo efeito da hipoestrogenia na produção de linfócitos, uma vez que a ovariectomia aumenta o número de linfócitos T e B na medula óssea e em órgãos linfoides secundários, como o baço (GARCIA-PEREZ *et al.*, 2006; TYAGI *et al.*, 2011).

Além disso, Ligeiro de Oliveira *et al.* (2004), utilizando um modelo de inflamação pulmonar alérgica em animais, relataram que a ovariectomia aumenta o número de células mononucleadas não somente na medula óssea, mas também no sangue periférico. Por outro lado, o tratamento com TMX, considerando seu efeito modulador de receptores de estrógenos, preveniu o aumento de leucocitose promovido pela ovariectomia, enquanto que o ANA, inibindo a aromatase, e, por conseguinte, reduzindo a produção de estradiol, não promoveu aumento adicional no número de leucócitos circulantes.

Por fim, os procedimentos cirúrgicos para remoção ou exposição dos ovários causaram uma perda inicial significativa de massa corpórea, retomando os níveis basais com o passar dos dias, tal como já constatado em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (MELO, 2012), possivelmente relacionado com o trauma cirúrgico sob anestesia geral. Seguido esse momento, outra leve redução de massa corpórea ocorreu após o procedimento de colocação da ligadura no 2º molar, como também já descrito (LIMA *et al.*, 2000 e 2004), novamente, sob anestesia geral. Além disso, a hipoestrogenia, promovida pela ovariectomia associada ou não ao ANA, esteve associada ao maior ganho de massa corpórea, o que está de acordo com os de Anbinder *et al.* (2007) e Amadei *et al.* (2011). Paradoxalmente, esse aumento não foi observado no grupo F-OVX/ANA, embora a literatura também relate que a redução de estrógeno promovida somente pelo ANA possa aumentar a massa corpórea de animais (VEKARYA; KAUR; TIKOO, 2013), o que não possui confirmação na clínica, visto que o ANA não é indicado para o tratamento de câncer de mama em mulheres com função ovariana normal (SMITH; DOWSETT, 2003). Em contrapartida, o TMX reduziu essa variação de massa corpórea. De fato, Lampert *et al.* (2013) demonstraram que o TMX reduziu o ganho de massa corpórea e o acúmulo retroperitoneal de tecido adiposo em ratas OVX, devido à menor ingestão de ração padronizada e a menor eficiência calórica. Ainda, Liu *et al.* (2015) justificam a redução de massa gorda em camundongos tratados com TMX pela produção de espécies reativas de oxigênio que promovem o aumento de apoptose, autofagia e desdiferenciação de adipócitos.

Em suma, os mecanismos pelos quais o TMX e o ANA afetam o processo reabsortivo ósseo na periodontite sob hipoestrogenia podem ser observados na figura 32.

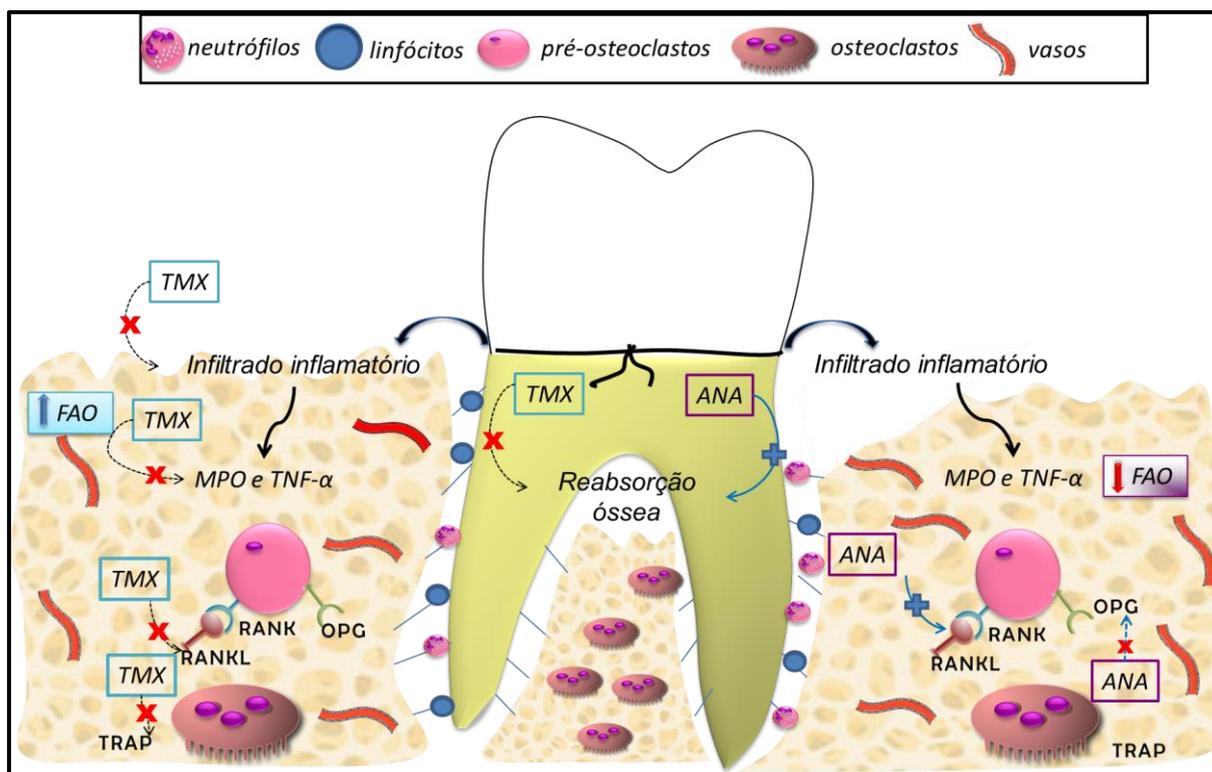


Figura 32: Mecanismos de ação propostos para os efeitos do tamoxifeno (TMX) e o anastrozol (ANA) no tecido ósseo. A reabsorção óssea que ocorre na periodontite caracteriza-se por ser uma reabsorção óssea induzida pelo processo inflamatório, em que mediadores inflamatórios, como TNF- α , induzem a ativação osteoclástica via RANKL. O TMX promoveu proteção óssea por reduzir a atividade de mieloperoxidase (MPO), o que indica redução do número de neutrófilos teciduais, e a liberação de TNF- α , resultando em menor ativação osteoclástica e favorecimento do processo formativo ósseo, visto pelo aumento de fosfatase alcalina óssea (FAO). O ANA por não reduzir citocinas osteoclastogênicas, como TNF- α e RANKL, ao contrário, por aumentar RANKL e diminuir OPG, promoveu maior destruição óssea e reduziu os mecanismos formadores ósseos, observado pela redução de FAO.

8 CONCLUSÃO

A ovariectomia, embora tenha induzido o estado de hipoestrogenia, não aumentou a reabsorção óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em animais em até 4 semanas.

O tamoxifeno apresentou um perfil protetor no osso maxilar, reduzindo a reabsorção e favorecendo a formação ósseas, provavelmente, dependente do processo inflamatório via modulação de citocinas osteoclastogênicas. Por outro lado, o anastrozol apresentou um perfil deletério no osso maxilar, aumentando a reabsorção e reduzindo a formação ósseas, por inibir a síntese de estrógeno, não prevenindo, assim, o processo inflamatório.

Sistemicamente, o fêmur foi mais suscetível aos efeitos da inibição da síntese de estrógeno em sítios extragonadais, por ANA, quando comparado aos maxilares. A hipoestrogenia aumentou a linfomonocitose e o ganho de massa corpórea dos animais, não sendo alterados pelo ANA, porém, prevenidos por TMX.

REFERÊNCIAS

- ADAMOPOULOS, I. E.; BOWMAN, E. P. Immune regulation of bone loss by Th17 cells. **Arthritis Res. Ther.**, v. 10, n. 5, Oct. 2008.
- ADAMOPOULOS, I. E.; CHAO, C. C.; GEISLER, R.; LAFACE, D.; BLUMENSCHNEIN, W.; IWAKURA, Y.; MCCLANAHAN, T.; BOWMAN, E. EP. Interleukin-17A upregulates receptor activator of NF-kappaB on osteoclast precursors. **Arthritis Res. Ther.**, v. 12, n. 1, Feb. 2010.
- AGUIRRE, J. I.; PLOTKIN, L. I.; GORTAZAR, A. R.; MILAN, M. M.; O'BRIEN, C. A.; MANOLAGAS, S. C.; BELLIDO, T. A novel ligand-independent function of the estrogen receptor is essential for osteocyte and osteoblast mechanotransduction. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 35, p. 25502-25508, Aug. 2007.
- ALBAYRAK, A.; UYANIK, M. H.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; UYANIK, A.; BAYIR, Y.; ALBAYRAK, F.; ALBAYRAK, Y.; POLAT, B.; SULEYMAN, H. The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. **J. Surg. Res.**, v. 169, n. 1, p. 67-75, Jul. 2011.
- ALBRIGHT, F.; BLOOBERG, E.; SMITH, P. H. Postmenopausal osteoporosis. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, 1940.
- ALMEIDA, M.; LAURENT, M. R.; DUBOIS, V.; CLAESSENS, F.; O'BRIEN C. A.; BOUILON, R.; VANDERSCHUEREN, D.; MANOLAGAS, S. C. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology. **Physiol. Rev.**, v. 97, n. 1, p. 135-187, Jan. 2017.
- AMADEI, S. U.; SOUZA, D. M.; BRANDÃO, A. A.; ROCHA, R. F. Influence of diferente durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. **Braz. Oral Res.**, v. 25, n. 6, p. 538-543, Nov-Dec. 2011.
- AN, K. C. Selective estrogen receptor modulators. **Asian Spine J.**, v. 10, n. 4, p. 787-791, Aug. 2016.
- ANBINDER, A. L.; PRADO, F. A.; PRADO, M. A.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R. F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. **Braz. Oral Res.**, v. 21, n. 3, p. 247-252, Jul./Sep. 2007.
- ANTONIO-RUBIO, N. R.; GUERRERO-ESTEVEZ, S. M.; LIRA-ROMERO, E.; MORENO-MENDOZA, N. Expression of 3 β -HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. **J. Mol. Histol.**, v. 42, n. 6, p. 535-543, Dec. 2011.
- AMIR, E.; SERUGA, B.; NIRAULA, S.; CARLSSON, L.; OCAÑA, A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 103, n. 17, p. 1299-1309, Sep. 2011.
- ARIMIDEX, TAMOXIFEN, ALONE OR IN COMBINATION (ATAC) TRIALIST' GROUP; FORBES, J. F.; CUZICK, J.; BUZDAR, A.; HOWELL, A.; TOBIAS, J. S.; BAUM, M. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. **Lancet Oncol.**, v. 9, n. 1, p. 45-53, Jan. 2008.

- BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; CHARLIER, T. D.; CORNIL, C.A.; BALL, G. F. Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 86, n. 3/5, p. 367-379, Sep. 2003.
- BAUM, M.; BUZDAR, A.; CUZICK, J.; FORBES, J.; HOUGHTON, J. H.; KLIJN, J. G.; SAHMOUD, T.; ATAC TRIALIST' GROUP. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2131-2139, Jun. 2002.
- BAUM, M.; BUZDAR, A.; CUZICK, J.; FORBES, J.; HOUGHTON, J.; HOWELL, A.; SAHMOUD, T.; ATAC (ARIMIDEX, TAMOXIFEN ALONE OU IN COMBINATION) TRIALIST' GROUP. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. **Cancer**, v. 98, n. 9, p. 1802-1810, Nov. 2003.
- BEATSON, G. T. On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. **Lancet**, v. 148, n. 3803, p. 162-165, Jul. 1896.
- BERKOVITZ, G. D.; BROWN, T. R.; FUJIMOTO, M. Aromatase activity in human skin fibroblast grown in cell culture. **Steroids**, v. 50, n 1-3, p; 281-295, Jul-Sep. 1987.
- BERTULUCCI, L de A.; PEREIRA, F. M.; de OLIVEIRA, A. E.; BRITO, L. M.; LOPES, F. F. Doença periodontal em mulheres na pós-menopausa e sua relação com a osteoporose. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 34, n. 12, p. 563-567, Dec. 2012.
- BEZERRA, M. M.; DE LIMA, V.; ALENCAR, V. B.; VIEIRA, I. B.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, G. A.; ROCHA, F. A. Selective cyclooxygenase-2 inhibition alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, Jun. 2000.
- BEZERRA, J. P.; de SIQUEIRA, A.; PIRES, A. G.; MARQUES, M. R.; DUARTE, P. M.; BASTOS, M. F. Effects of estrogen deficiency and/or caffeine intake on alveolar bone loss, density, and healing: a study in rats. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 6, p. 839-849, Jun. 2013.
- BORGNA, J. L.; ROCHEFORT, H. Hydroxylated metabolites of tamoxifen are formed in vivo and bound to estrogen receptor in target tissues. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 2, p. 859-868, Jan. 1981.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R.D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n. 3, p. 618-622, Sep. 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003 - resultados principais. Brasília, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010. Pesquisa nacional de saúde bucal resultados principais. Brasília, 2010.
- BRAUN, T. SCHETT, G. Pathways for bone loss in inflammatory disease. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v. 10, n. 2, p. 101-108, Jun. 2012.

- BREMER, E. Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy. **ISRN Oncol.**, Jun. 2013.
- BRESIN, A.; KILIARIDIS, S.; STRID, K. G. Effect of masticatory function on the internal bone structure in the mandible of the growing rat. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 107, n. 1, p. 35-44, Feb, 1999.
- BRITTON, R. A.; IRWIN, R.; QUACH, D.; SCHAEFER, L.; ZHANG, J.; LEE, T.; PARAMESWARAN, N.; MCCABE, L. R. Probiotic *L. reuteri* treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model. **J. Cell. Physiol.**, v. 229, n. 11, p. 1822-1830, Nov. 2014.
- BRYANT, H. U. Selective estrogen receptor modulators. **Reviews in Endocrine & Metabolic disorders.**, v. 3, n. 3, p. 231-241, Sep, 2002.
- BULUN, S. E.; SIMPSON, E. R. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis indicates that levels of aromatase cytochrome P450 transcripts in adipose tissue of buttocks, thighs, and abdomen of increase with advancing age. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, n. 2, p. 428-432, Feb. 1994.
- BURT, B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 8, p. 1406-1419, Aug. 2005.
- BURSTONE, M. S. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 7, n. 1, p. 39-41, Jan. 1959.
- CAO, M.; SHU, L.; LI, J.; SU, J.; ZHANG, W.; WANG, Q.; GUO, T.; DING, Y. The expression of estrogen receptors and the effects of estrogen on human periodontal ligament cells. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 29, n. 5, p. 329-335, Jun. 2007.
- CASTAGNETTA, L. A.; AGOSTARA, B.; MONTALTO, G.; POLITO, L.; CAMPISI, I.; SAETTA, A.; ITOH, T.; YU, B.; CHEN, S.; CARRUBA, G. Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells. **Cancer Res.**, v. 63, n. 16, p. 5041-5045, Aug. 2003.
- CHEN, L.; WEI, B.; LI, J.; LIU, F.; XUAN, D.; XIE, B.; ZHANG, J. Association of periodontal parameters with metabolic level and systemic inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. **J. Periodontol.**, v. 81, n. 3, p. 364-371, Mar. 2010.
- CHEN, J.; SAGGAR, J. K.; WARD, W. E.; THOMPSON, L. U. Effects of flaxseed lignan and oil on bone health of breast-tumor-bearing mice treated with or without tamoxifen. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v. 74, n. 12, p. 757-768, Jan. 2011.
- CHETRITTE, G. S.; CORTES-PRIETO, J.; PHILIPPE, J. C.; WRIGHT, F.; PASQUALINI, J. R. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 72, n. 1-2, p. 23-27, Jan-Feb. 2000.
- CHEUNG, J.; MAK, Y. T.; PAPAIOANNOU, S.; EVANS, B. A.; FOGELMAN, I.; HAMPSON, G. Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. **J. Endocrinol.**, v. 177, n. 3, p. 423-433, Jun. 2003.

CHOI, H. S.; PARK, S. Y.; KIM, Y. M.; KIM, S. H.; KIM, K. M.; CHUNG, Y. Medical treatment of severe osteoporosis including new concept of advanced severe osteoporosis. **Osteoporosis and Sarcopenia**, v. 2, n. 1, p. 13-19, Mar. 2016.

COATES, A. S.; KESHAVIAH, A.; THÜRLIMANN, B.; MOURIDSEN, H.; MAURIAC, L.; FORBES, J. F.; PARIDAENS, R.; CASTIGLIONE-GERTSCH, M.; GELBER, R. D.; COLLEONI, M.; LÁNG, I.; DEL MASTRO, L.; SMITH, I.; CHIRGWIN, J.; NOGARET, J. M.; PIENKOWSKI, T.; WARDLEY, A.; JAKOBSEN, E. H.; PRICE, K. N.; GOLDHIRSCH, A. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 5, p. 486-492, Feb. 2007.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 8, p. 1569-1576, Aug. 2008.

COEZY, E.; BORGNA, J. L.; ROCHEFORT, H. Tamoxifen and metabolites in MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth. **Cancer Res.**, v. 42, n. 1, p. 317-323, Jan. 1982.

COLE, M. P., JONES, C. T., TODD, I. D. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. **Br. J. Cancer.**, v. 25, n. 2, p.270-275, Jun. 1971.

COLEMAN, R.; BROWN, J.; TERPOS, E.; LIPTON, A.; SMITH, M. R.; COOK, R.; MAJOR, P. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, n. 7, p. 629-639, Nov. 2008.

COOMBES, R. C.; KILBURN, L. S.; SNOWDON, C. F.; PARIDAENS, R.; COLEMAN, R. E.; JONES, S. E.; JASSEM, J.; VAN DE VELDE, C. J.; DELOZIER, T.; ALVAREZ, I.; DEL MASTRO, L.; ORTMANN, O.; DIEDRICH, K.; COATES, A. S.; BAJETTA, E.; HOLMBERG, S. B.; DOWELL, D.; MICKIEWICZ, E.; ANDERSEN, J.; LONNING, P. E.; COCCONI, G.; FORBES, J.; CASTIGLIONE, M.; STUART, N.; STEWART, A.; FALLOWFIELD, L.J.; BERTELLI, G.; HALL, E.; BOGLE, R. G.; CARPENTIERI, M.; COLAJORI, E.; SUBAR, M.; IRELAND, E.; BLISS, J. M., INTERGROUP EXEMESTANE STUDY. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. **Lancet**, v. 369, n. 9561, p. 559-570, 2007.

CORRIDEN, R.; HOLLANDS, A.; OLSON, J.; DERIEUX, J.; LOPEZ, J.; CHANG, J. T.; GONZALES, D. J.; NIZET, V. Tamoxifen augments the innate immune function of neutrophils modulation of intracellular ceramide. **Nat. Commun.**, v. 6, Oct. 2015.

COSKUN, A.; ARIKAN, D. C.; COBAN, Y. K.; SAYAR, H.; KILINC, M.; OZBAG, D. The effect of ovariectomy in the skin flap viability and myeloperoxidase levels. **Bratisl. Lek. Listy.**, v. 115, n. 12, p. 766-770, 2014.

CROTTI, T.; SMITH, M. D.; HIRSCH, R.; SOUKOULIS, S.; WEEDON, H.; CAPONE, M.; AHERN, M. J.; HAYNES, D. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **J. Periodontal Res.**, v. 38, n. 4, p. 380-387, Aug. 2003.

CUNHA, F. Q.; BOUKILI, M. A.; MOTTA, J. I. B.; VARGAFTIG, B. B.; FERREIRA, S. H. Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 47-52, Jul. 1993.

CUZICK, J.; SESTAK, I.; BAUM, M.; BUZDAR, A.; HOWELL, A.; DOWSETT, M.; FORBES, J. F.; ATAC/LATTE INVESTIGATORS. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 12, p. 1135-1141, Dec. 2010.

CZAIKOSK, P. G.; MOTA, J. M.; NASCIMENTO, D. C.; SÔNEGO, F.; CASTANHEIRA, F. V.; MELO, P. H.; SCORTEGAGNA, G. T.; SILVA, R. L.; BARROSO-SOUSA, R.; SOUTO, F. O.; PAZIN-FILHO, A.; FIGUEIREDO, F.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q. Neutrophil extracellular traps induce organ damage during experimental and clinical sepsis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, Feb. 2016.

CZAJKA-ORANIEC, I.; SIMPSON, E. R. Aromatase research and its clinical significance. **Endokrynol. Pol.**, v. 61, n. 1, p. 126-134, Jan-Feb. 2010.

CZERNY, B.; PAWLIK, A.; JUZYSZYN, Z.; MYSLIWIEC, Z. Effect of tamoxifen on bone mineral density and blood lipids in ovariectomized rats. **Pol. J. Pharmacol.**, v. 55, n. 6, p. 1137-1142, Nov./Dec. 2003.

D'AMELIO, P.; GRIMALDI, A.; DI BELLA, S.; BRIANZA, S. Z.; CRISTOFARO, M. A.; TAMONE, C.; GIRIBALDI, G.; ULLIERS, D.; PESCARMONA, G. P.; ISAIA, G. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. **Bone**, v. 43, n. 1, p.92-100, Jul. 2008.

DAVIES, C.; PAN, H.; GODWIN, J.; GRAY, R.; ARRIAGADA, R.; RAINA, V.; ABRAHAM, M.; MEDEIROS ALENCAR, V. H.; BADRAN, A.; BONFILL, X.; BRADBURY, J.; CLARKE, M.; COLLINS, R.; DAVIS, S. R.; DELMESTRI, A.; FORBES, J. F.; HADDAD, P.; HOU, M. F.; INBAR, M.; KHALED, H.; KIELANOWSKA, J.; KWAN, W. H.; MATHEW, B. S.; MITTRA, I.; MÜLLER, B.; NICOLUCCI, A.; PERALTA, O.; PERNAS, F.; PETRUZELKA, L.; PIENKOWSKI, T.; RADHIKA, R.; RAJAN, B.; RUBACH, M. T.; TORT, S.; URRUTIA, G.; VALENTINI, M.; WANG, Y.; PETO, R.; ADJUVANT TAMOXIFEN: LONGER AGAINST SHORTER (ATLAS) COLLABORATIVE GROUP. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomized trial. **Lancet.**, v. 381, n. 9869, p. 805-816, Mar. 2013.

DESTA, Z.; WARD, B. A.; SOUKHOVA, N. V.; FLOCKHART, D. A. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2 D6. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 310, n. 3, p. 1062-1075, Sep. 2004.

DOWSETT, M.; CUZICK, J.; INGLE, J.; COATES, A.; FORBES, J.; BLISS, J.; BUYSE, M.; BAUM, M.; BUZDAR, A.; COLLEONI, M.; COOMBES, C.; SNOWDON, C.; GNANT, M.; JAKESZ, R.; KAUFMANN, M.; BOCCARDO, F.; GODWIN, J.; DAVIES, C.; PETO, R. Meta-analysis of breast cancer outcomes in adjuvant trials of aromatase inhibitors versus tamoxifen. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, n. 3, p. 509-518, Jan. 2010.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-

year survival: an overview of the randomized trials. **Lancet.**, v. 365, n. 9472, p. 1687-1717, May. 2005.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomized trials. **Lancet.**, v. 378, n. 9793, p. 771-784, Aug. 2011.

EASTELL, R.; HANNON, R. A.; CUZICK, J.; DOWSETT, M.; CLACK, G.; ADAMS, J. E.; ATAC TRIALIST' GROUP. Effect of an aromatase inhibitor on bmd and bone turnover markers: 2-year results of the Anastrozole, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial (18233230). **J. Bone Miner. Res.**, v. 21, n. 8, p. 1215-1223, Aug. 2006.

EGHBALI-FATOURECHI, G.; KHOSLA, S.; SANYVAL, A.; BOYLE, W. J.; LACEY, D. L.; RIGGS, B. L. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **J. Clin. Invest.**, v. 111, n. 8, p. 1221-1230, Apr. 2003.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 11, n. 4, p.219-227, Dec. 2010.

FERRETTI, M.; BERTONI, L.; CAVANI, F.; ZAVATTI, M.; RESCA, E.; CARNEVALE, G.; BENELLI, A.; ZANOLI, P.; PALUMBO, C. Influence of ferutinin on bone metabolism in ovariectomized rats. II: role in recovering osteoporosis. **J. Anat.**, v. 217, n. 1, p. 48-56, Jul. 2010.

FISHER, B. CONSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; REDMOND, C. K.; KAYANAH, M.; CRONIN, W. M.; VOGEL, V.; ROBIDOUX, A.; DIMITROV, N.; ATKINS, J.; DALY, M.; WIEAND, S.; TAN-CHIU, E.; FORD, L.; WOLMARK, N. Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 18, p. 1371-1388, Sep. 1998.

FISHER, B.; COSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; CECCHINI, R. S.; CRONIN, W. M.; ROBIDOUX, A.; BEVERS, T. B.; KAVANAH, M. T.; ATKINS, J. N.; MARGOLESE, R. G.; RUNOWICZ, C. D.; JAMES, J. M.; FORD, L. G.; WOLMARK, N. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 97, n. 22, p.1652- 1662, Nov. 2005.

FROST, H. M.; JEE, W. S. On the rat model of human osteopenias and osteoporosis. **Bone Miner.**, v. 18, n. 3, p. 227-236, Sep. 1992.

GARCIA, V. G.; GUALBERTO JÚNIOR, E. C.; FERNANDES, L. A.; BOSCO, A F.; HITOMI NAGATA, M. J.; CASATTI, C. A.; ERVOLINO, E.; THEODORO, L. H. Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 4, p. 556-565, Apr. 2013.

GARCIA-PEREZ, M. A.; NOGUEA, I.; HERMENEGILDO, C.; MARTÍNEZ-ROMERO, A.; TARÍN, J.J.; CANO, A. Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. **Hum. Reprod.**, v. 21, n. 4, p.880-887, Apr. 2006.

GEISLER, J.; KING, N.; DOWSETT, M.; OTTESTAD, L.; LUNDGREN, S.; WALTON, P.; KORMESET, P. O.; LONNING, P. E. Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 74, n. 8, p. 1286-1291, Oct. 1996.

GEISLER, J.; HAYNES, B.; ANKER, G.; DOWSETT, M.; LONNING, P. E. Influence of letrozole and anastrozol on total body aromatization and plasma estrogen levels in postmenopausal breast cancer patients evaluated in a randomized, cross-over study. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 3, p. 751-757, Feb, 2002.

GEISLER, J.; LONNING, P. E.; Impact of aromatase inhibitors on bone health in breast cancer patients. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 118, n. 4-5, p. 294-299, Feb. 2010.

GLÜCK, S. Consequences of the convergence of multiple alternate pathways on the estrogen receptor in the treatment of the metastatic breast cancer. **Clin. Breast Cancer**, Aug. 2016.

GOES, P.; MELO, I. M.; SILVA, L. M.; BENEVIDES, N. M.; ALENCAR, N. M.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **J. Periodontal. Res.**, v. 49, n. 1, p. 45-54, Feb. 2014.

GOSS, P. E.; QI, S.; HU, H. Comparing the effects of atamestane, toremifene and tamoxifen alone and in combination, on bone, serum lipids and uterus in ovariectomized rats. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 113, n. 3-5, p. 233-240, Feb. 2009.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 3, p. 391-401, Feb. 2003.

GREESNPAN, S. L.; VUJEVICH, K.T.; BRUFISKY, A.; LEMBERSKY, B. C.; VAN LONDEN, G. J.; JANKOWITZ, R. C.; PUHALLA, S. L.; RASTOGI, P.; PERERA, S. Prevention of bone loss with risedronate in breast cancer survivors: a randomized, controlled clinical trial. **Osteoporos. Int.**, v. 26, n. 6, p. 1857-1864, Jun. 2015.

GUIMARÃES, M. V.; MELO, I. M.; ADRIANO ARAÚJO, V. M.; TANAZOA WONG, D. V.; RORIZ FONTELES, C. S.; MOREIRA LEAL, KL. K.; RIBEIRO, R. A.; LIMA, V. Dry extract of *Matricaria recutita* L. (chamomile) prevents ligature-induced alveolar bone resorption in rats via inhibition of tumor necrosis factor- α and Interleukin- β . **J. Periodontol.**, v. 87, n. 6, p. 706-715, pg. xx-xx, Jan. 2016.

HAAS, A. N.; ROSING, C.; OPPERMANN, R. V.; ALBANDAR, J. M.; SUSIN, C. Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 9, p. 1380-1387, Sep. 2009.

HALL, J. M.; MCDONNELL, D. P. The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5566-5578, Oct. 1999.

- HAMID, S.; KHURSHID, A.; BUTT, S. A. Histological changes induced by tamoxifen versus tamoxifen plus 13-cis-retinoic on rabbit uterine glands. **J. Pak. Med. Associ.**, v. 65, n. 5, p. 491-495, May. 2015.
- HARADA, N.; SASANO, H.; MURAKAMI, H.; OHKUMA, T.; NAGURA, H.; TAKAGI, Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. **Circ. Res.**, v. 84, n. 1, p. 1285-1291, Jun. 1999.
- HAYMAN, A. R.; BUNE, A. J.; COX, T. M. Widespread expression of tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) in the mouse embryo. **J. Anat.**, v. 196, p. 433-441, Apr. 2000.
- HAYMAN, A. R.; COX, T. M. Tartrate-resistant acid phosphatase knockout mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 10, p. 1905-1907, Oct. 2003.
- HERNLUND, E.; SVEDBOM, A.; IVERGARD, M.; COMPSTON, J.; COOPER, C.; STENMARK, J.; McCLOSKEY, E. V.; JONSSON, B.; KANIS, J. A. Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepares in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). **Arch. Osteoporos.**, v. 8, n. 136, Oct. 2013.
- HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C R.; LACEY, D. L.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4367-4370, Sep. 1999.
- HOWELL, A.; CUZICK, J.; BAUM, J.; BUZDAR, A.; DOWSETT, M.; FORBES, J. F.; HOCTIN-BOES, G.; HOUGHTON, J.; LOCKER, G. Y.; TOBIAS, J. S.; ATAC TRIALIST' GROUP. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. **Lancet**, v. 365, n. 9453, p. 60-62, Jan. 2005.
- HOWLADER, N.; ALTEKRUSE, S. F.; LI, C. I.; CHEN, V. W.; CLARKE, C. A.; RIES, L. A. G.; CRONIN, K. A. US incidence of breast cancer subtypes defined by joint hormone receptor and HER2 status. **J. Natl. Cancer. Inst.**, v. 106, n. 5, Apr. 2014.
- HOZUMI, Y.; HAKAMATA, Y.; SASANUMA, H.; OGURA, S.; NAGAI, H. Effects of anastrozole on lipid metabolism compared with tamoxifen in rats. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 76, n. 2, p. 131-136, Nov. 2002.
- INGLE, J. N.; BUZDAR, A. U.; SCHAID, D. J.; GOETZ, M.P.; BATZLER, A.; ROBSON, M. E.; NORTHFELT, D. W.; OLSON, J. E.; PEREZ, E. A.; DESTA, Z.; WEINTRAUB, R. A.; WILLIARD, C. V.; FLOCKHART, D. A.; WEINSHILBOUM, R. M. Variation in anastrozole metabolism and pharmacodynamics in women with early breast cancer. **Cancer Res.**, v. 70, n. 8, p. 3278-3286, Apr. 2010.
- INOUE, H.; HIRANO, A.; OQURA, K.; HATTORI, A.; KAMIMURA, M.; OKUBO, F.; TAGAWA, H.; SAKAGUCHI, S.; KINOSHITA, J.; SHIMIZU, T. The effect of anastrozol on bone mineral density during the first 5 years of adjuvant treatment in postmenopausal women with early breast cancer. **SpringerPlus**, v. 4, n. 303, Jul, 2015.

JEFFCOAT, M; K.; LEWIS, C. E.; REDDY, M. S.; WANG, C. Y.; REDFORD, M. Postmenopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. **Periodontol.** **2000**, v. 23, p. 94-102, Jun. 2000.

JOHNSON, M. D.; ZUO, H.; LEE, K. H.; TREBLEY, J. P.; RAE, J. M.; WEATHERMAN, R. V.; DESTA, Z.; FLOCKHART, D. A.; SKAAR, T. C. Pharmacological characterization of 4-hydroxy-N-desmethyl tamoxifen, a novel active metabolite of tamoxifen. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 85, n. 2, p. 151-159, May. 2004.

JONSSON, D.; ANDERSSON, G.; ANDERSSON, G.; EKBLAD, E.; LIANG, M.; BRATTHALL, G.; NILSSON, B.O. Immunocytochemical demonstration of estrogen receptor beta in human periodontal ligament cells. **Arch. Oral Biol.**, v. 49, n. 1, p. 85-88, Jan. 2004.

JORDAN, V. C.; PHELPS, E.; LINDGREN, J. U. Effects of anti-estrogens on bone in castrated and intact female rats. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 10, n. 1, p. 31-35, Oct. 1987.

JOVANOVIC, D. V.; DI BATTISTA, J. A.; MARTEL-PELLETIER, J.; JOLICOEUR, F. C.; HE, Y.; ZHANG, M.; MINEAU, F.; PELLETIER, J. P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **J. Immunol.**, v. 160, n. 7, p. 3513-3521, Apr. 1998.

KALDER, M.; ZILER, V.; KYVERNITAKIS, I.; KNÖLL, D.; HARS, O.; HADJI, P. Influence of compliance on bone mineral density changes in postmenopausal women with early breast cancer on Anastrozole. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 139, n. 6, p. 915-923, Jun. 2013.

KALDER, M.; HANS, D.; KYVERNITAKIS, I.; LAMY, O.; BAUER, M.; HADJI, P. Effects of exemestane and tamoxifen treatment on bone texture analysis assessed by TBS in comparison with bone mineral density assessed by DXA in women with breast cancer. **J. Clin. Densitom.**, v. 17, n. 1, p. 66-71, Jan-Mar. 2014.

KAMDEM, L. K.; LIU, Y.; STEARNS, V.; KADLUBAR, S. A.; RAMIREZ, J.; JETER, S.; SHAHVERDI, K.; WARD, B. A.; OGBURN, E.; RATAIN, M. J.; FLOCKHART, D. A.; DESTA, Z. In vitro and in vivo oxidative metabolism and glucuronidation of anastrozole. **Br. J. Clin. Pharmacol.**, v. 70, n. 6, p. 854-869, Dec. 2010.

KANIS, J. A.; MELTON, L. J. 3rd, CHRISTIANSEN, C.; JOHNSTON, C. C.; KHALTAEV, N. The diagnosis of osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, Aug. 1994.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONÇALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; LI, Y. P.; MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. **Am. J. Pathol.**, v. 169, n. 3, p. 987-998, Sep. 2006.

KAZANKI, H.; MAKIHIRA, S.; SUZUKI, M.; ISHII, T.; MOVILA, A.; HIRSCHFELD, J.; MAWARDI, H.; LIN, X.; HAN, X.; TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. Soluble RANKL cleaved form activated lymphocytes by TNF- α -converting enzyme contributes to osteoclastogenesis in periodontitis. **J. Immunol.**, v. 197, n. 10, p. 3871-3883, Oct. 2016.

- KELLIS, J. T.; VICKERY, L. E. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 9, p. 4413-4420, Mar. 1987.
- KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology.**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, Dec. 2001.
- KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, Suppl. 11, p. 44-48, Mar. 2011.
- KOUSTENI, S.; BELLIDO, T.; PLOTKIN, L. I.; O'BRIEN, C. A.; BODENNER, D. L.; HAN, L.; HAN, K.; DIGREGORIO, G. B.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; KATZENELLENBOGEN, B. S.; ROBERSON, P. K.; WEINSTEIN, R. S.; JILKA, R. L.; MANOLAGAS, S. C. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell**, v. 104, n. 5, p. 719-730, Mar. 2001.
- KUIPER, G. G.; CARLSSON, B.; GRANDIEN, K.; ENMARK, E.; HÄGGBLAD, J.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. **Endocrinology**, v. 138, n. 3, p. 863-870, Mar. 1997.
- KUMRU, S.; YILDIZ, A. A.; YILMAZ, B.; SANDAL, S.; GURATES, B. Effects of aromatase inhibitors letrozole and anastrozole on bone metabolism and steroid hormone levels in intact female rats. **Gynecol. Endocrinol.**, v. 23, n. 10, p. 556-561, Oct. 2007.
- KURODA, S.; MUKOHYAMA, H.; KONDO, H.; AOKI, K.; OHYA, K.; OHYAMA, T.; KASUGAI, S. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. **Oral Dis.**, v. 9, n. 1, Jan. 2003.
- LAMPERT, C.; ARCEGO, D. M.; LAUREANO, D. P.; DIEHL, L. A.; DA COSTA LIMA, I. F.; KROLOW, R.; PETTENUZZO, L. F.; DALMAZ, C.; VENDITE, D. Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats. **Physiol. Behav.**, v. 119, p. 17-24, Jul. 2013.
- LAMAS, A. Z.; CALIMAN, I. F.; DALPIAZ, P. L.; de MELO, A. F. Jr; ABREU, G. R.; GOUVEA, S. A.; BISSOLI, N. S. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life Sci.**, v. 124, p. 101-109, Mar. 2015.
- LAMONTE, M. J.; HOVEY, K. M.; GENCO, R. J.; MILEN, A. E.; TREVISAN, M.; WACTAWSKI-WENDE, J. Five-year changes in periodontal disease measures among postmenopausal females: the Buffalo OsteoPerio study. **J. Periodontol.**, v. 84, n. 5, p. 572-84, May, 2013.
- LEA, C. K.; FLANAGAN, A. M. Physiological plasma levels of androgens reduce bone loss in the ovariectomized rat. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 2, p. 328-335, Feb. 1998.
- LEE, Y. The role of interleukin-17 in bone metabolism and inflammatory skeletal diseases. **BMB Rep.**, v. 46, n.10, p. 479-483, Oct. 2013.

LEWKO, W. M.; ANDERSON, A. Estrogen receptor and growth response in cultered human periodontal ligament cells. **Life Sci.**, v. 39, n. 13, p. 1201-1206, Sep. 1986.

LEWIS, J. S., JORDAN, V. C. Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. **Mutat. Res.**, v. 591, n. 1-2, p.247-263, Dec. 2005.

LI, X.; QIN, L.; BERGENSTOCK, M.; BEVELOCK, L. M.; NOVACK, D. V.; PARTRIDGE, N. C. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclast. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 45, p. 33098-33106, Nov. 2007.

LIANG, L.; YU, J. F.; WANG, Y.; DING, Y. Estrogen regulates expression of osteoprotegerin and RANKL in human periodontal ligament cells through estrogen receptor beta. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 9, p. 1745-1751, Sep. 2008.

LIEM, E. A.; SOLHEIM, E.; LEA, O. A.; LUNDGREN, S.; KVINNSLAND, S.; UELAND, P. M. Distribution of 4-hydroxy-N-desmethyltamoxifen and other tamoxifen metabolites in human biological fluids during tamoxifen treatment. **Cancer Res.**, v. 49, n. 8, p. 2175-2183, Apr. 1989.

LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; DA SILVA, Z. L.; BORELLI, P.; TAVARES DE LIMA, W. Regulation of allergic inflammation in rats: interaction between estradiol and corticosterone. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 1, p. 20-27, 2004.

LIM, Y. C.; DESTA, Z.; FLOCHART, D. A.; SKAAR, T. C. Endoxifen (4-hydroxy-N-desmethyl-tamoxifen) has anti-estrogenic effects in breast câncer cells with potency similar to 4-hydroxy-tamoxifen. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 55, n. 5, p. 471-478, May, 2005.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F.; A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 108, n. 2, p. 123-129, Apr. 2000.

LIMA, V.; VIDAL, F. D.; ROCHA, F. D.; BRITO, G. A.; RIBEIRO, R. A. Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 1, p. 162-168, Jan. 2004.

LIMA, V.; BRITO, G. A.; CUNHA, F. Q.; REBOUÇAS, C. G.; FALCÃO, B. A. A.; AUGUSTO, R. F.; SOUZA, M. L. P.; LEITÃO, B. T.; RIBEIRO, R. A. Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 113, n. 3, p. 210-217, Jun. 2005.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; DA ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel de moduladores farmacológicos. **R. Periodontia**, v. 18, n. 3, p. 7-19, Set. 2008.

LIU, S.; CHENG, Y.; FAN, M.; CHEN, D.; BIAN, Z. FSH aggravates periodontitis related bone loss in ovariectomized rats. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 4, p. 366-371, Apr. 2010.

LIU, M.; GOSS, P. E.; INGLE, J. N.; KUBO, M.; FURUKAWA, Y.; BATZLER, A.; JENKINS, G. D.; CARLSON, E. E.; NAKAMURA, Y.; SCHAID, D. J.; CHAPMAN, J. A.; SHEPHERD, L. E.; ELLIS, M. J.; KHOSLA, S.; WANG, L.; WEINSHILBOUM, R. M. Aromatase inhibitor-associates bone fractures: a case-cohort GWAS and functional genomics. **Mol. Endocrinol.**, v. 28, n. 10, p. 1740-1751, Oct. 2014.

LIU, L.; ZOU, P.; ZHENG, L.; LINARELLI, L. E.; AMARELL, S.; PASSARO, A.; LIU, D.; CHENG, Z. Tamoxifen reduces fat mass by boosting reactive oxygen species. **Cell Death Dis.**, v. 6, Jan. 2015.

LOVE, R. R.; MAZESS, R. B.; BARDEN, H. S.; EPSTEIN, S.; NEWCOMB, P. A.; JORDAN, V. C.; CARBONE, P. P.; DEMETS, D. L. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 326, n. 13, p. 852-856, Mar. 1992.

LUMACHI, F.; SANTEUFEMIA, D. A.; BASSO, S. M. M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. **World J. Biol. Chem.**, v. 6, n. 3, p. 231-239, Aug. 2015.

LUO, K.; MA, S.; GUO, J.; HUANG, Y.; YAN, F.; XIAO, Y. Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. **Biomed. Res. Int.**, Feb. 2014.

MARTELLI-PALOMINO, G.; PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B.; CRISPIM, J. C.; RASSI, D. M.; OLIVEIRA, R. D.; LOUZADA, P.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; DONADI, E. A. DNA damage increase in peripheral neutrophils from patients with rheumatoid arthritis is associated with the disease activity and the presence of shared epitope. **Clin. Exp. Rheumatol.**, Nov. 2016.

MARTINS, C. S.; LEITÃO, R. F.; COSTA, D. V.; MELO, I. M.; SANTOS, G. S.; LIMA, V.; BALDIM, V.; WONG, D. V.; BONFIM, L. E.; MELO, C. B.; G. de OLIVEIRA, M.; BRITO, G. A. Topical HPMC/S-Nitrosoglutathione solution decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontal disease in rats. **PLoS One**, v. 11, n. 4, Apr. 2016.

MARTIN-MILLAN, M.; ALMEIDA, M.; AMBROGINI, E.; HAN, L.; ZHAO, H.; WEINSTEIN, R. S.; JILKA, R. L.; O'BRIEN, C. A.; MANOLAGAS, S. C. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. **Mol. Endocrinol.**, v. 24, n. 2, p.323-334, Feb. 2010.

MARTINETTI, A.; BAJETTA, E.; FERRARI, L.; ZILEMBO, N.; SEREGNI, E.; DEL VECCHIO, M.; LONGARINI, R.; LA TORRE, I.; TOFFOLATTI, L.; PALEARIM D.; BOMBARDIERI, E. Osteoprotegerin and osteopotin serum values in postmenopausal advanced breast cancer patients treated with anastrozole. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 11, n. 4, p. 771-779, Dec. 2004.

MARQUES, M. R.; DA SILVA, M. A.; MANZI, F. R.; CESAR-NETO, J. B.; NOCITI, F. H.; BARROS, S. P. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **Arch. Oral Biol.**, v. 50, n. 4, p. 421-429, Apr. 2005.

MELO, I. M. Efeitos do anastrozol na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade

de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.

MICHAEL, H.; HÄNKÖNEN, P. L.; KANGAS L.; VÄÄNÄNEN, H. K.; HENTUNEN, T. A. Differential effects of selective osetrogen receptor modulators (SERMS) tamoxifen, ospemifene and raloxifene on human on osteoclast in vitro. **Br. J. Pharmacol.**, v. 151, n. 3, p. 384-395, Jun, 2007.

MIKAMI, Y.; ASANO, M.; HONDA, M. J.; TAKAGI, M. Bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone synergistically increase alkaline phosphatase levels through JAK/STAT signaling in C3H10T1/ cells. **J. Cell Physiol.**, v. 223, n. 1, p. 123-133, Apr. 2010.

MIKIN, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcif. Tissue Int.**, v. 34, n. 3, p. 285-290, May. 1982.

MIRRIELEES, J.; CROFFORD, L. J.; LIN, Y.; KRYSCIO, R. J.; DAWSON, D. R.; EBERSOLE, J. L.; MILLER, C. S. Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, n. 12, p. 1068-1074, Jun. 2010.

MIYAURA, C.; ONOE, Y.; INADA, M.; MAKI, K.; IKUTA, K.; ITO, M.; SUDA, T. Increased B-lymphopoiesis by interleukin 7 induces bone loss in mice with intact ovarian function: similarity to estrogen deficiency. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 19, n. 94, p. 9360-9365, Aug. 1997.

MOCELLIN S.; PILATI, P.; BRIARAVA, M.; NITTI, D. Breast cancer chemoprevention: a network meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 108, n. 2, Nov. 2015.

MOSEKILDE, L. Assessing bone quality – animal models in preclinical osteoporosis research. **Bone**, v. 17, Oct. 1995.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clin. Chim. Acta.**, v. 61, n. 1, p. 63-71, May. 1975.

MÜRDTER, T. E.; SCHROTH, W.; BACCHUS-GERYBADZE, L.; WINTER, S.; HEINKELE, G.; SIMON, W.; FASCHING, P. A.; FEHM, T.; GERMAN TAMOXIFEN AND AI CLINICIANS GROUP; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M.; BRAUCH, H. Activity levels of tamoxifen metabolites at the estrogen receptor and the impact of genetic polymorphisms of phase I e II enzymes oh their concentration levels in plasma. **Clin. Pharmacolo. Ther.**, v. 89, n. 5, pg. 708-717, May, 2011.

NAKAMURA, T.; IMAI, Y.; MATSUMOTO, T.; SATO, S.; TAKEUCHI, K.; IGARASHI, K.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; KRUST, A.; YAMAMOTO, Y.; NISHINA, H.; TAKEDA, S.; TAKAYANAGI, H.; METZGER, D.; KANNO, J.; TAKAOKA, K.; MARTIN, T. J.; CHAMBON, P.; KATO, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811-823, Sep. 2007.

NAKASHIMA, T.; KOBAYASHI, Y.; YAMASAKI, S.; KAWAKAMI, A.; EGUCHI, K.; SASAKI, H.; SAKAI, H. Protein expression and functional difference of membrane e-bound and soluble receptor of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 275, n. 3, p. 768-775, Sep. 2000.

- NAKASHIMA, T.; HAYASHI, M.; FUKUNAGA, T.; KURATA, K.; OH-HORA, M.; FENG, J. Q.; BONEWALD, L. F.; KODAMA, T.; WUTZ, A.; WAGNER, E. F.; PENNINGER, J. M.; TAKAYANAGI, H. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. **Nat. Med.**, v. 17, n. 10, p. 1231-1234, Sep. 2011.
- NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, n. 3, p. 173-182, Mar. 2006.
- NAWATA, H.; TANAKA, S.; TANAKA, S.; TAKAYANAGI, R.; SAKAI, Y.; YANASE, T.; IKUYAMA, S.; HAJI, M. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 53, n. 1/6, p. 165-174, Jun. 1995.
- NEBEL, D.; BRATTHALL, G.; EKBLAD, E.; NORDERYD, O.; NILSSON, B. O. Estrogen regulates DNA synthesis in human gingival epithelial cells displaying strong estrogen receptor β immunoreactivity. **J. Periodontal. Res.**, v. 46, n. 5, p. 622-628, Oct. 2011.
- NELSON, L. R.; BULUN, S. E. Estrogen production and action. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 45, n. 3, p. S116-S124, Sep. 2001.
- NELSON, E. R.; WARDELL, S. E.; MCDONNELL, D. P. The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs, and oxysterols: implications for the treatment and prevention of osteoporosis. **Bone**, v. 53, n. 1, p. 42-50, Mar. 2013.
- NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.-A. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 89, n. 1, p. 44-55, 2010.
- NUNEZ, N. P.; JELOVAC, D.; MACEDO, L.; BERRIGAN, D.; PERKINS, S. N.; HURSTING, S. D.; BARRETT, J. C.; BRODIE, A. Effects of the antiestrogen tamoxifen and the aromatase inhibitor letrozole on serum hormones and bone characteristics in a preclinical tumor model for breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 16, p. 5375-5380, Aug. 2004.
- ONAL, M.; XIONG, J.; CHEN, X.; THOSTENSON, J. D.; ALMEIDA, M.; MANOLAGAS, S. C.; O'BRIEN, C. A. Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) protein expression by B lymphocytes contributes to ovariectomy-induced bone loss. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 34, p. 29851-29860, Aug. 2012.
- O'NEILL, J. S.; ELTON, R. A.; MILLER, W. R. Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. **Br. Med. J. (Clin Res Ed)**, v. 296, n. 6624, p. 741-743, Mar. 1988.
- ORRICO, S. R.; GONÇALVES, D.; GALEAZZI, S. T.; GIRO, G.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R. M. The influence of loss of bone mass on induced periodontal disease: a radiographic and densitometric study of female rats. **J. Periodontol.**, v. 76, v. 9, p. 1436-1442, Sep. 2005.
- OSBORNE, C.; TRIPATHY, D. Aromatase inhibitors: rationale and use in breast cancer. **Annu. Rev. Med.**, v. 56, p. 103-116, 2005.
- OTTANELLI, S. Prevention and treatment of bone fragility in cancer patient. **Clin. Cases Miner. Bone Metab.**, v. 12, n. 2, p. 116-129, May-Aug. 2015.

PACIFICI, R. The immune system and bone. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 503, n. 1, p. 41-53, Nov. 2010.

PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol.** **2000**, v. 14, p. 9-11, Jun. 1997.

PANAGOPOULOS, V.; LIAPIS, V.; ZINONOS, I.; HAY, S.; LEACH, D. A.; INGMAN, W.; DENICHILO, M. O.; ATKINS, G. J.; FINDLAY, D. M.; ZANNETTINO, A. C.; EVDOKOIU, A. Peroxidase enzymes inhibit osteoclast differentiation and bone resorption. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 440, p. 8-15, Nov. 2016.

PARK, W. C.; JORDAN, V. C. Selective estrogen receptor modulators (SERMS) and their roles in breast cancer prevention. **Trends Mol. Med.**, v. 8, n. 2, p. 82-88, Feb. 2002.

PATERNI, I.; GRANCHI, C.; KATZENELLENBOGEN, J. A.; MINUTOLO, F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): Subtype-selective ligands and clinical potential. **Steroids**, v. 90, p. 13-29, Nov. 2014.

PEREZ-MEDINA, T.; SALAZAR, F. J.; SAN-FRUTOS, L.; RIOS, M.; JIMENEZ, J. S.; TROYANO, J.; CAYUELA, E.; IGLESIAS, E. Hysteroscopic dynamic assessment of the endometrium in patients treated with long-term tamoxifen. **J. Minim. Invasive Gynecol.**, v. 18, n. 3, p. 349-354, May-Jun. 2011.

PERRY, M. J.; GUJRA, T.; WHITWORTH, T.; TOBIAS, J. H. Tamoxifen stimulates cancellous bone formation in long bones of female mice. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1060-1065, Mar. 2005.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, p. 60-84, Mar. 2011.

RASTELLI, A. L.; TAYLOR, M. E.; GAO, F.; ARMAMENTO-VILLAREAL, R.; JAMALABADI-MAJIDI, S.; NAPOLI, N.; ELLIS, M. J. Vitamin D and aromatase inhibitor-induced musculoskeletal symptoms (AIMSS): a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 129, n. 1, p. 107-116, Aug. 2011.

RECKER, R.; LAPPE, J.; DAVIES, K.; HEANEY, R. Characterization of perimenopausal bone loss: a prospective study. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, n. 10, Oct. 2000.

REDDI, D.; BROWN, S. J.; BELIBASAKIS, G. N. Porphyromonas gingivalis induces RANKL in bone marrow stromal cells: involvement of the p38 MAPK. **Microb. Pathog.**, v. 51, n. 6, p. 415-420, Dec. 2011.

REID, D. M.; DOUGHTY, J.; EASTELL, R.; HEYS, S. D.; HOWELL, A.; McCLOSKEY, E. V.; POWLES, T.; SELBY, P.; COLEMAN, R. E. Guidance for the management of breast cancer treatment-induced bone loss: a consensus position statement from a UK Expert Group. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, Suppl. 1, p. S3-18, Jun. 2008.

RICHARD, A. C.; FERDINAND, J. R.; MEYLAN, F.; HAYES, E. T.; GABAY, O.; SIEGEL, R. M. The TNF-family cytokine TL1A: from lymphocyte costimulator to disease co-conspirator. **J. Leukoc. Biol.**, v. 98, n. 3, p. 333-345, Sep. 2015.

RIGGS, B. L.; WAHNER, H. W.; MELTON, L. G. 3rd; RICHELSON, L. S.; JUDD, H. L.; OFFORD, K. P. Rates of bone loss in the appendicular and axial skeletons of women. Evidence of substantial vertebral bone loss before menopause. **J. Clin. Invest.**, v. 77, n. 5, p. 1487-1491, May. 1986.

RIGGS, B. L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. G. 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocr. Rev.**, v. 23, n. 3, p. 279-302, Jun. 2002.

ROGGIA, C.; GAO, Y.; CENCI, S.; WEITZMANN, M. N.; TORALDO, G.; ISAIA, G.; PACIFICI, R. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 24, p. 13960-13965, Nov. 2001.

ROSSI, L.; PAGANI, O. The modern landscape of endocrine therapy for premenopausal women with breast cancer. **Breast Care**, v. 10, n. 5, p. 312-315, Oct. 2015.

RUNOWICZ, C. D.; COSTANTINO, J. P.; WICKERHAM, D. L.; CECCHINI, R. S.; CRONIN, W. M.; FORD, L. G.; VOGEL, V. G.; WOLMARK, N. Gynecologic conditions in participants in the NSABP breast cancer prevention study of tamoxifen and raloxifene (STAR). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 205, n. 6, p. 535 e531-535, Dec. 2011.

RUSSO, L. A. T. Osteoporose pós-menopausa: opções terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol. Metabol.**, v. 45, n. 4, p. 401-406, 2001.

RYDEN, L.; HEIBERT ARNLIND, M.; VITOLS, S.; HÖISTAD, M.; AHLGREN, J. Aromatase inhibitors alone or sequentially combined with tamoxifen in postmenopausal early breast cancer compared with tamoxifen or placebo – meta-analyses on efficacy and adverse events based on randomized clinical trials. **Breast**, v. 26, p. 106-114, Apr. 2016.

SAAD, E. D.; BROMBERG, S.; KATZ, A.; SIMON, S. D. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 4, p. 555-567, 2012.

SANZ, M.; VAN WIKELHOFF, A. J. Periodontal infections: understanding the complexity – Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. **J. Clin. Periodontol.**, v. 28, n. 11, p. 3-6, Mar. 2011.

SAPIR-KOREN, R.; LIVSHITS, G. Rheumatoid arthritis onset result postmenopausal women: does the ACPA seropositive subset result from genetic effects, estrogen deficiency, skewed profile of CD(+) T-cells, and their interactions? **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 431, Aug. 2016.

SCARDINA, G. A.; MESSINA, P. Oral microcirculation in post-menopause: a possible correlation with periodontitis. **Gerodontology.**, v. 29, n. 2, p. e1045-51, Jun. 2012.

SCHWEIKART, K. M.; ELDRIDGE, S. R.; SAFGREN, S. L.; PARMAN, T.; REID, J. M.; AMES, M. M.; GOETZ, M. P.; DAVIS, M. A. Comparative uterotrophic effects of

endoxifen and tamoxifen in ovariectomized Sprague-Dawley rats. **Toxicol. Pathol.**, v. 42, n. 8, p. 1188-1196, Dec. 2014.

SERGI, G.; PINTORE, G.; FALCI, C.; VERONESE, N.; BERTON, L.; PERISSINOTTO, E.; BASSO, U.; BRUNELLO, A.; MONFARDINI, S.; MANZATO, E.; COIN, A. Preventive effect of risedronate on bone loss and frailty fractures in elderly women treated with anastrozole for early breast cancer. **J. Bone Miner. Metab.**, v. 30, n. 4, p. 461-467, Jul. 2012.

SESTAK, I.; SINGH, S.; CUZICK, J.; BLAKE, G. M.; PATEL, R.; GOSSIEL, F.; COLEMAN, R.; DOWSETT, M.; FORBES, J. F.; HOWELL, A.; EASTELL, R. Changes in bone mineral density at 3 years in postmenopausal women receiving anastrozole and risedronate in the IBIS-II bone substudy: an international, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Lancet Oncol.**, v. 15, n. 3, p. 1460-1468, Dec. 2014.

SHEVDE, N. K.; BENDIXEN, A. C.; DIENGER, K. M.; PIKE, J. W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, n. 14, p. 7829-7834, Jul. 2000.

SHIMAHARA, M.; ONO, K.; HASHIGUCHI, N.; YOSHIDA, Y.; KONO, K.; DOTE, T. Na experimental study on mandibular movement and osteoporosis. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 74, n. 3, p. 287-297, Dec. 1991.

SHIN, Y. H.; CHO, D. C.; YU, S. H.; KIM, K. T.; CHO, H. J.; SUNG, J. K. Histomorphometric analysis of the spine and femur in ovariectomized rats using micro-computed tomographic scan. **J. Korean Neurosurg. Soc.**, v. 52, n. 1, p. 1-6, Jul. 2012.

SIKOSKI, P.; REGISTER, T. C.; LESS, C. J.; LUNDEEN, S.; HUTCHISON, J.; BROWN, K. H.; CLINE, J. M. Effects of two novel selective estrogen receptor modulators, raloxifene, tamoxifen, and ethinyl estradiol on the uterus, vagina and breast in ovariectomized cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 196, n. 1, p. 75e.1-17, Jan. 2007.

SILVA, L. M. C. M.; LIMA, V.; HOLANDA, M. L.; PINHEIRO, P. G.; RODRIGUES, J. A. G.; LIMA, M. E. P.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 33, n. 5, p. 830-835, May. 2010.

SINI, V.; CINIEMI, S.; CONTE, P.; DE LAURENTIIS, M.; DI LEO, A.; TONDINI, C.; MARCHETTI, P. Endocrine therapy in post-menopausal women with metastatic breast cancer: from literature and guidelines to clinical practice. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.** v. 100, p. 57-68, Apr. 2016.

SMITH, C. L.; NAWAZ, Z.; O'MALLEY, B. W. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. **Mol. Endocrinol.**, v. 11, n. 6, p. 657-666, Jun. 1997.

SMITH, E. L.; DOWSETT, M. Aromatase inhibitors in breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, n. 24, p. 2431-2442, Jun. 2003.

SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W.; HINSHELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; ITO, Y.; FISHER,

- C. R.; MICHAEL, M. D.; MENDELSON, C. M.; BULUN, S. E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocr. Rev.**, v. 15, n. 3, p.342-355, Jun. 1994.
- SOORY, M. TILAKARATNE, A. Modulation of androgen metabolism by phenytoin, oestradiol and tamoxifen in human gingival fibroblasts. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, n. 6, p. 556-561, Jun, 2003.
- SOUTHARD, K. A.; SOUTHARD, T. E.; SCHLECHTE, J. A.; MEIS, P. A. The relationship between the density of the alveolar processes and that post-cranial bone. **J. Dental. Res.**, v. 79, n. 4, p. 964-969. 2000.
- SUGIYAMA, T.; GALEA, G. L.; LANYON, L. E.; PRICE, J. S. Mechanical loading-related bone gain is enhanced by tamoxifen but unaffected by fulvestrant in female mice. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5582- 5590, Dec. 2010.
- SZABO, K. A.; WEBBER, C. E.; ADACHI, J. D.; TOZER, R.; GORDON, C.; PAPAIONNOU, A. Cortical and trabecular bone at the radius and tibia in postmenopausal breast cancer patients: a Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) study. **Bone**, v. 48, n. 2, p. 218-224, Feb. 2011.
- TAKAYANAGI, H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7; n. 4; p. 292-304; Apr. 2007.
- TAKEUCHI, H.; TAKEI, H.; FUTSUHARA, K.; YOSHIDA, T.; KOJIMA, M.; KAI, T.; Tabei, T. A multicenter prospective study to evaluate bone fracture related to adjuvant anastrozole in Japanese postmenopausal women with breast cancer: two-year interim analysis of Saitama Breast Cancer Clinical Study Group (SBCCSG-06). **Int. J. Clin. Oncol.**, v. 19, n. 1, p. 68-73, Feb, 2014.
- TANAKA, M.; EJIRI, S.; KOHNO, S.; OZAWA; H. Region-specific bone mass changes in rat mandibular condyle following ovariectomy. **J. Dent. Res.**, v. 79, v. 11, p. 1907-1913, Nov. 2000.
- TANG, X.; MENG, H.; HAN, J.; ZHANG, L.; HOU, J.; ZHANG, F. Up-regulation of estrogen receptor-beta expression during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. **J. Periodontal Res.**, v. 43, n. 3, p. 311-32, Jun. 2008.
- TARKKILA, L.; KARI, K.; FURUHOLM, J.; TIITINEN, A.; MEURMAN, J. H. Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and post-menopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. **BMC Oral Health.**, v. 10, Apr. 2010.
- TAXEL, P.; KENNEDY, D. G.; FALL, P. M. WILLARD, A. K.; CLIVE, J. M.; RAISZ, L. G. The effect of aromatase inhibition on sex steroids, gonadotropins, and markers of bone turnover in older men.
- TENG, Y. T.; NGUYEN, H.; GAO, X.; KONG, Y. Y.; GORCZYNSKI, R. M.; SINGH, B.; ELLEN, R. P.; PENNINGER, J. M.; Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. **J. Cli. Invest.**, v. 106, n. 6, p. R59-67, Sep. 2000.
- TENG, Y. T. Mixed periodontal Th1-Th2 cytokine profile in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific osteoprotegerin ligand (or RANK-L)-mediated

alveolar bone destruction *in vivo*. **Infec. Immun.**, v. 70, n. 9, p. 5269-5273, Sep. 2002.

TEZAL, M.; WACTAWSKI-WENDE, J.; GROSSI, S. G.; HO, A. W.; DUNFORD, R.; GENCO, R. J. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 9, p. 1492-8, Sep. 2000.

THOMAS, C.; GUSTAFSSON, J. A. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 11, n. 8, p. 597-608, Jul. 2011.

TILAKARATNE, A.; SOORY, M. Androgen metabolism in response to oestradiol-17-beta in human gingival fibroblast (HGF) in culture. **J. Clin. Periodontol.**, v. 26, n. 11, p. 723-731, Nov. 1999.

TURNER, R. T.; WAKLEY, G. K.; HANNON, K. S.; BELL, N. H. Tamoxifen prevents the skeletal effects of ovarian hormone deficiency in rats. **J. Bone Miner. Res.**, v. 2, n. 5, p. 449-456, Oct. 1987.

TYAGI, A. M.; SRIVASTAVA, K.; SHARAN, K.; YADAV, D.; MAURYA, R.; SINGH, D. Daidzein prevents the increase in CD4+CD28 null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p.e21216, Jun. 2011.

VAM DAM, P. A.; VAM DAM, V. C.; ALTINTAS, S.; PAPADIMITRIOU, K.; ROLFO, C.; TRINH, X. B. Neoadjuvant endocrine treatment in breast cancer: an overlooked alternative? **Eur. J. Surg. Oncol.**, v. 42, n. 3, p. 333-342, Marc. 2016.

VAN BEZOOIJEN, R. L.; FARIH-SIPS, H. C.; PAPAPOULOS, S. E.; LÖWIK, C. W. Interleukin-17: a new bone acting cytokine *in vitro*. **J. Bone Miner. Res.**, v. 14, n. 9, p. 1513-1521, Sep. 1999.

VAZIRI, H.; NASERHOJJATI-ROODSARI, R.; TASILI-FAHADAN, N.; KHOJASTEH, A.; MASHHADI-ABBAS, F.; ESLAMI, B.; DEHPOUR, A. R. Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 8, p.1561-1567, Aug. 2007.

VEKARYIA, K. K.; KAUR, J.; TIKOO, K. Alleviating anastrozole induced bone toxicity by selenium nanoparticles in SD rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 268, n. 2, p. 212-220, Apr. 2013.

VERDU, E. F.; DENG, Y.; BERCIK, P.; COLLINS, S. M. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 283, n. 1, p. 27-36, Jul. 2002.

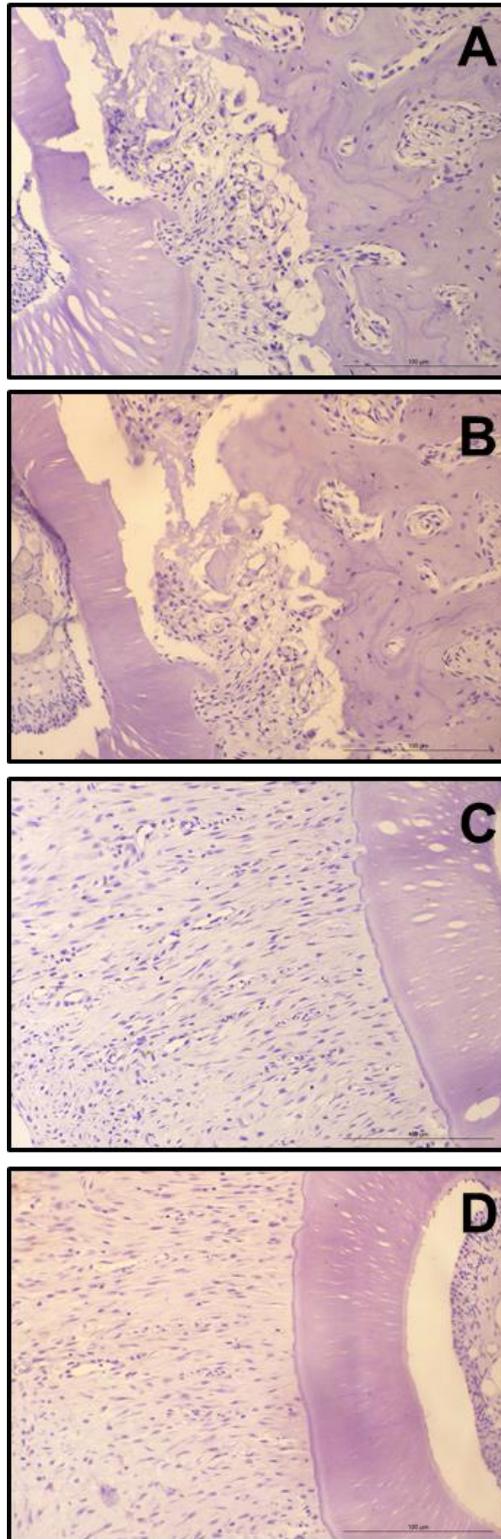
VON WOWERN, N.; HJORTING-HANSEN, E.; STOLTZE, K. Changes in bone mass in rat mandibles after tooth extraction. **Int. J. Oral Surg.**, v. 8, n. 3, p. 229-233, Jun. 1979.

WANG, Y. X.; LI, M.; ZHANG, H. Q.; TANG, M. X.; GUO, C. F.; DENG, A.; CHEN, Y.; XIAO, L. G. Opposite function of ER α and ER β in controlling 17 β -estradiol-mediate osteogenesis in osteoblasts. **Arch. Med. Res.**, v. 47, n. 4, p. 255-261, May, 2016.

WARA-ASWAPATI, N.; SURARIT, R.; CHAYASADOM, A.; BOCH, J. A.; PITIPHAT, W. RANK-L upregulation associated with periodontitis and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 6, p. 1062-1069, Jun. 2007.

- WARD, H. W. C. Anti-oestrogen therapy for breast cancer: a trial of tamoxifen at two dose levels. **Br. Med. J.**, v. 1, n. 5844, p.13-14, Jan.1973.
- WEBB, P.; VALENTINE, C.; NGUYEN, P.; PRICE, R. H. Jr; MARIMUTHU, A.; WEST, B. L.; BAXTER, J. D.; KUSHNER, P. J. ERbeta binds N-CoR in the presence of estrogens via an LXXLL-like motif in the N-CoR C-terminus. **Nucl. Recept.**, v. 28, n. 1, p. 4, Jun. 2003.
- WEI, H. Y.; MA, X. Tamoxifen reduces infiltration of inflammatory cells, apoptosis and inhibits IKK/NK-kB pathway after spinal cord injury in rats. **Neurol. Sci.**, v. 35, n. 11, p. 1763-1768, Nov. 2014.
- WINDAHL, S. H.; SAXON, L.; BÖRJESSON, A. E.; LAGERGUIST M. K.; FRENKEL, B.; HENNING, P.; LERNER, U. H.; GALEA, G. L.; MEAKIN, L. B.; ENGDAHL, C.; SJÖGREN, K.; ANTAL, M. C.; KRUST, A.; CHAMBON, P.; LANYON, L. E.; PRICE, J. S.; OHLSSON, C. Estrogen receptor- α is required for the osteogenic response to mechanical loading in a ligand-independent manner involving its activation function 1 but not 2. **J. Bone Miner. Res.**, v. 28, n. 2, p. 291-301, Feb. 2013.
- WRONSKI, T.J.; DANN, L. M.; SCOTT, K. S.; CINTRÓN, M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcif. Tissue Int.**, v. 45, n. 6, p. 360-366, Dec. 1989.
- YAMANAKA, Y.; ABU-AMER, Y.; FACCIO, R.; CLOHISY, J. C. Map-kinase c-Jun N-terminal kinase mediates PMMA induction of osteoclasts. **J. Orthop. Res.**, v. 24, n. 7, p. 1349-1357, Jul. 2006.
- YANG, J.; PHAM, S. M.; CRABBE, D. L. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. **Dentomaxillofac. Radiol.**, v. 32, n. 4, p. 247-251, Jul. 2003.
- YAZGAN, B.; YAZGAN, Y.; OVEY, I. S.; NAZIROGLU, M. Raloxifene and tamoxifen reduce PARP activity, cytokine and oxidative stress levels in the brain and blood in ovariectomized rats. **J. Mol. Neurosci.**, v. 60, n. 2, p. 214-22, Oct. 2016.
- YUCEL-LINDBERG, T.; BÅGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert. Rev. Mol. Med.**, Aug. 2013.
- ZHAO, L.; HUANG, L.; ZHANG, X. Osteoimmunology: memorandum for rheumatologists. **Sci. China Life Sci.**, Sep. 2016.
- ZINS, J. E.; WHITAKER, L. A. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg.** v. 72, p. 778, 1983.

**APÊNDICE A – CONTROLES NEGATIVOS NAS ANÁLISES
IMUNOHISTOQUÍMICAS PARA TNF- α , RANKL, OPG, TRA**



Controles negativos de imunohistquímica para TNF- α (A); RANKL (B), OPG (C) e TRAP (D).
Magnificação de 200x.

ANEXO A – APROVAÇÃO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL

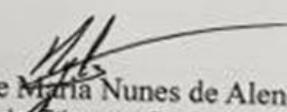
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 84/2013, sobre o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO TAMOXIFERO E DO ANASTROZOL NA PERDA ÓSSEA EM RATAS OVARIETOMIZADAS", de responsabilidade do Profa. Dra. Vilma de Lima e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 18 de março de 2013.

Fortaleza, 19 de março de 2013


Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

Prof. Dra. Nylane M. Nunes de Alencar
Coordenadora da CEPAD/FAMED/UFCE
MAT. SIAPE 2166369