



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCAS DE CASTRO SILVA RIBEIRO

**REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA COM FIOS DE ALGODÃO E DE SEDA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

SOBRAL
2025

LUCAS DE CASTRO SILVA RIBEIRO

REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA COM FIOS DE ALGODÃO E DE SEDA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Inflamação e Dor (Metabolismo Ósseo).

Orientadora: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo.

SOBRAL

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

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

R369r Ribeiro, Lucas de Castro Silva.

Reabsorção óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura com fios de algodão e de seda em camundongos fêmeas / Lucas de Castro Silva Ribeiro. – 2025.

54 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2025.

Orientação: Profa. Dra. Iracema Matos de Melo.

1. Reabsorção Óssea Alveolar. 2. Periodontite. 3. Camundongos Fêmeas. I. Título.

CDD 610

LUCAS DE CASTRO SILVA RIBEIRO

REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR NA PERIODONTITE INDUZIDA POR
LIGADURA COM FIOS DE ALGODÃO E DE SEDA EM CAMUNDONGOS FÊMEAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – Campus Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: 26/02/2025.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Iracema Matos de Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Alrieta Henrique Teixeira (Examinadora Interna)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Kátia Linhares Lima Costa (Examinadora Externa)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*O presente trabalho foi realizado com apoio da
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de
Nível Superior - Brasil (CAPES).*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Meiriane de Castro Silva e José Arimateia Marinho, meu amor e gratidão eternos. O apoio incondicional de vocês ao longo de toda a minha vida e, especialmente, durante esse período, foi fundamental para que eu chegasse até aqui. Sem o carinho e a dedicação de vocês, nada disso seria possível.

À Profa. Dra. Iracema Melo, minha eterna gratidão pela orientação acadêmica impecável e pelas conversas que me fortaleceram, não só como profissional, mas também como pessoa. Sua paciência e sabedoria foram essenciais para minha trajetória.

Às professoras da banca examinadora, Profa. Dra. Alrieta Teixeira e Profa. Dra. Kátia Linhares, agradeço profundamente pelo tempo, pelas contribuições valiosas e por cada sugestão que fez esse trabalho crescer de forma significativa.

Aos professores que participaram dos processos metodológicos da pesquisa, Profa. Dra. Alana Godinho, Profa. Dra. Jordânia Marques, Profa. Dra. Luzia Hermínia e Prof. Dr. Anderson Weiny, sou imensamente grata pelo tempo dedicado, pela paciência e pelo apoio diante de todas as dúvidas que surgiram. Cada um de vocês teve um papel fundamental na realização desse projeto.

Às minhas amigas de graduação e mestrado, Katlyn Andrade, Silvana Jéssica e Rebeca Moita, palavras não são suficientes para expressar minha gratidão. Obrigado por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, por me oferecerem sempre apoio, risos e força. Vocês fizeram toda a diferença na minha jornada acadêmica e pessoal.

Aos estudantes de graduação, Débora Thais, Diego Menezes e Vitória Araújo, agradeço do fundo do coração por se dedicarem ao projeto e por serem parte tão importante dessa pesquisa. Sem a ajuda de vocês, o trabalho não teria sido o mesmo.

Aos professores de graduação, Profa. Dra. Adriana Santiago, Profa. Dra. Virgínia Silveira, Profa. Dra. Denise Oliveira, Profa. Dra. Celiane Carneiro e Profa. Dra. Lidiane Costa, sou imensamente grato por me acolherem com tanto carinho durante os estágios de docência. Cada um de vocês foi um pilar para meu crescimento profissional e humano.

A todos os meus amigos, colegas e familiares que não foram especificamente mencionados, mas que estiveram ao meu lado de diversas formas,

meu muito obrigada. Cada palavra de apoio, cada gesto de carinho, cada sorriso e cada incentivo foram essenciais para que eu seguisse em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores. O amor e a amizade de vocês foram minha força.

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa D'Ávila

RESUMO

O modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos tem sido amplamente utilizado para estudar o metabolismo ósseo, especialmente para avaliar a reabsorção óssea resultante de um processo inflamatório. Este estudo teve como objetivo comparar os níveis de reabsorção óssea alveolar (ROA) em diferentes tempos de eutanásia, utilizando fios de algodão e seda na indução de periodontite por ligadura em mandíbulas de camundongos fêmeas. Para isso, foram utilizados 78 camundongos *Swiss* fêmeas. Após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (06/23), a periodontite foi induzida pela inserção de fios de algodão ou seda nos primeiros molares mandibulares, com eutanásia após 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias. Um grupo controle (*Naïve*), sem a doença induzida, foi incluído para comparação. A ROA foi avaliada por macroscopia, e o tecido gengival foi removido para quantificação de TNF- α e IL-1 β via ELISA. Amostras sanguíneas foram coletadas para quantificar os níveis de fosfatase alcalina. O peso dos animais foi registrado antes da ligadura e da eutanásia. Tanto no grupo algodão quanto no grupo seda, observou-se ROA significativa ($p < 0,05$) a partir do 3º dia, com pico máximo no 14º dia, em comparação ao grupo *Naïve*, estabilizando no 21º dia. A comparação entre os tipos de fio revelou ROA mais pronunciada ($p < 0,05$) no 7º e 11º dias no grupo seda, em relação ao grupo algodão. Em relação aos níveis de TNF- α , não houve diferenças significantes em relação ao *Naïve*. No entanto, os níveis de IL-1 β aumentaram significativamente ($p < 0,05$) no 3º e 5º dia em ambos os grupos, indicando aumento dessa citocina no início do processo inflamatório. Em relação à fosfatase alcalina, houve diferença significativa ($p < 0,05$) no grupo algodão nos dias 7, 11, 14 e 21, e no grupo seda, essa diferença ocorreu apenas no 11º dia. Não foram observadas alterações significantes na variação de massa corpórea dos animais com periodontite, em comparação aos animais *Naïve*. Conclui-se que, embora haja diferenças pontuais na ROA alcançada no curso da doença, em ambos os tipos de fio essa ROA alcança pico no 14º dia.

Palavras-chave: Reabsorção óssea alveolar. Periodontite. Camundongos fêmeas.

ABSTRACT

The ligature-induced periodontitis model in mice has been widely used to study bone metabolism, particularly to evaluate bone resorption resulting from an inflammatory process, and is effective for studying alveolar bone resorption (ABR). This study aimed to compare inflammatory levels at different euthanasia times using cotton and silk threads for inducing periodontitis in the mandibles of female mice. A total of 78 female Swiss mice were used, with approval from the Ethics Committee on Animal Use (06/23). Periodontitis was induced by the insertion of silk or cotton threads into the mandibular first molars, with euthanasia performed after 3, 5, 7, 11, 14, and 21 days. A control (Naïve) group, without induced disease, was included for comparison. ABR was assessed by macroscopic analysis, and gingival tissue was collected for quantification of TNF- α and IL-1 β via ELISA. Blood samples were also collected to measure serum alkaline phosphatase levels. The animals' weight was recorded before ligature placement and before euthanasia. Both the cotton and silk groups showed significant ABR ($p < 0.05$) starting from day 3, with a peak on day 14, compared to the Naïve group, stabilizing on day 21. The comparison between groups revealed more pronounced ABR ($p < 0.05$) on days 7 and 11 in the silk group. Regarding TNF- α levels, no significant differences were observed compared to the Naïve group. However, IL-1 β levels significantly increased ($p < 0.05$) on days 3 and 5 in both groups, indicating an increase in this cytokine at the early stage of the inflammatory process. For alkaline phosphatase, significant differences ($p < 0.05$) were observed in the cotton group on days 7, 11, 14, and 21, while in the silk group, this difference occurred only on day 11. No significant changes in body weight were observed in the periodontitis animals compared to the Naïve group. It can be concluded that ABR occurs in both groups, but it is established more rapidly with the use of cotton threads.

Keywords: Alveolar bone resorption. Periodontitis. Female mice.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Reabsorção óssea inflamatória	13
2.2	Modelos de estudo de reabsorção óssea inflamatória	15
2.3	Periodontite	18
3	JUSTIFICATIVA	20
4	HIPÓTESE	21
5	OBJETIVO	22
5.1	Objetivo geral	22
5.2	Objetivos específicos	22
6	METODOLOGIA	23
6.1	Delineamento do estudo e aspectos éticos	23
6.2	Seleção dos animais	23
6.3	Periodontite induzida por ligadura	24
6.4	Análise macroscópica da reabsorção óssea alveolar	25
6.5	ELISA para TNF- α e IL-1 β	26
6.6	Dosagem sérica da fosfatase alcalina	27
6.7	Variação da massa corpórea	28
6.8	Análise estatística	28
7	RESULTADOS	29
7.1	Reabsorção óssea alveolar (ROA)	29
7.2	Dosagem de citocinas inflamatórias	33
7.2.1	<i>Fator de necrose tumoral α (TNF-α)</i>	33
7.2.2	<i>Interleucina 1β (IL-1β)</i>	35
7.3	Dosagem sérica de fosfatase alcalina (FAL)	37
7.4	Variação de massa corpórea	39
8	DISCUSSÃO	42
9	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA SOB PROTOCOLO 06/23	53

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido calcificado composto por água, hidroxiapatita e componentes orgânicos (Ciosek *et al.*, 2021). Esse tecido é formado por diversas células, como osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que desempenham funções na manutenção e reparação óssea durante a homeostase e após lesões (Salhotra *et al.*, 2020). Os osteoblastos são responsáveis pela formação dos componentes orgânicos do osso e sua mineralização, enquanto os osteoclastos facilitam a remodelação óssea através da osteólise (Ciosek; Kot; Rotter, 2023).

A remodelação óssea é um processo pelo qual o osso é constantemente removido e substituído por osso novo (Omi; Mishina, 2022). Esse processo é fundamental para a manutenção da integridade óssea e é rigidamente regulado por um equilíbrio preciso entre a formação e a reabsorção ósseas, sob o controle de fatores locais e sistêmicos, como citocinas inflamatórias, hormônios e estímulos mecânicos (Ciosek; Kot; Rotter, 2023). O equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação óssea é essencial para a manutenção da homeostase tecidual (Kim *et al.*, 2020).

A homeostasia óssea depende de uma atividade equilibrada entre osteoblastos e osteoclastos. Assim, quando há uma atividade excessiva dos osteoclastos, ocorre a desencadeamento de uma reabsorção óssea patológica (Lin *et al.*, 2021). O mecanismo inflamatório que estimula a reabsorção óssea patológica resulta de interações complexas entre monócitos, macrófagos e células da linhagem osteoclástica. Durante a reação inflamatória, os macrófagos passam por um processo de polarização, no qual os macrófagos M1 liberam citocinas pró-inflamatórias que favorecem a diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros, o que, por sua vez, leva à perda óssea (Chen *et al.*, 2023).

Os osteoclastos originam-se de células mononucleares da linhagem hematopoiética, que, após diferenciação e ativação, formam células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea (Daponte; Henke; Drissi, 2024). A reabsorção óssea osteoclástica é regulada por vários mediadores, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) (Omi; Mishina, 2022). Os osteoblastos liberam RANKL, que se liga ao receptor do ativador do fator nuclear kappa B (RANK) na superfície dos osteoclastos, promovendo o aumento da atividade reabsortiva dessas células no tecido ósseo (Choi *et al.*, 2021). O RANK, o RANKL e a OPG pertencem à família do fator de necrose tumoral (TNF),

funcionando como reguladores essenciais da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Jiao *et al.*, 2022). O RANKL é a principal citocina responsável pela diferenciação dos osteoclastos e desempenha um papel crucial na reabsorção óssea (Kittaka *et al.*, 2023). A sinalização RANKL-RANK ativa a diferenciação e as funções dos osteoclastos, além de inibir a morte celular programada desses osteoclastos. Como resultado, esse processo induz a reabsorção óssea. Por outro lado, a OPG, funciona como um chamariz de RANKL, impedindo a ligação RANK-RANKL (Kitaura *et al.*, 2020).

A perda óssea inflamatória refere-se ao aumento da reabsorção óssea e à diminuição da formação óssea, resultantes da interação entre citocinas inflamatórias e células ósseas, na qual a inflamação se torna o principal fator responsável pela perda óssea. A inflamação crônica pode causar danos ao osso, como erosão, reabsorção e inibição adicional da formação óssea, levando, assim, à perda óssea inflamatória. Essa condição é frequentemente observada em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e periodontite (Chen *et al.*, 2023).

A periodontite é uma condição inflamatória resultante da resposta imune do hospedeiro à infecção microbiana, que leva à destruição dos tecidos periodontais, podendo ocasionar a perda dentária (Lee *et al.*, 2023). A doença é mediada pelo sistema imunológico, que desempenha um papel crucial na gravidade e progressão do quadro. No início do processo, ocorre a ativação da resposta inflamatória, com aumento de células polimorfonucleares. Na maioria dos pacientes, o sistema imune consegue controlar a progressão da doença. No entanto, em pacientes suscetíveis, as respostas inatas e adaptativas contribuem para o agravamento da destruição do tecido periodontal (Pavanelli *et al.*, 2022).

Modelos experimentais em animais têm sido amplamente utilizados como estágio pré-clínico para testar novos biomateriais regenerativos e técnicas de tratamento (Wichienrat *et al.*, 2024). Diversos modelos foram empregados para estudar a doença periodontal em camundongos, incluindo a gavagem oral e a indução por ligadura. A periodontite induzida por ligadura em camundongos tem sido amplamente utilizada como modelo animal para o estudo da doença periodontal (Ribeiro *et al.*, 2022).

O modelo de indução de periodontite por ligadura permite investigar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na destruição óssea associada à periodontite. O aumento da carga bacteriana, devido ao acúmulo de bactérias

comensais orais dentro e ao redor do fio, é uma das principais causas da periodontite, levando à perda óssea alveolar (Kittaka *et al.*, 2023). O impacto inflamatório gerado no periodonto resulta em diferenças nos níveis de crescimento epitelial gengival, no perfil de perda óssea e nos níveis de marcadores inflamatórios (Hernández-Martínez *et al.*, 2023).

Embora o modelo animal de periodontite seja amplamente utilizado na literatura para estudar processos reabsortivos ósseos inflamatórios, existe uma grande variedade de protocolos para indução da doença (Rojas *et al.*, 2021). Assim, o presente estudo visou comparar os níveis de reabsorção óssea alveolar mandibular, por meio de uma curva temporal de indução da doença em camundongos fêmeas, utilizando fios de seda e algodão na periodontite induzida por ligadura, em diferentes tempos de eutanásia. O objetivo é, portanto, definir o melhor tempo de eutanásia na periodontite experimental em camundongos fêmeas, avaliar as diferenças resultantes do tipo de fio utilizado e compreender o processo de instalação e progressão da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Reabsorção óssea inflamatória

O tecido ósseo é constantemente remodelado pelos processos de reabsorção e deposição óssea, em resposta a influências mecânicas, nutricionais e hormonais (Ciosek *et al.*, 2021). Esses dois eventos distintos, a reabsorção e a deposição óssea, são coordenados de maneira temporal e espacial para manter a integridade esquelética (Omi; Mishina, 2022), preservar as funções críticas do tecido, prevenir o acúmulo de danos, garantir a resistência mecânica do osso e manter a homeostase mineral (Kim *et al.*, 2020). Em condições fisiológicas, a remodelação óssea depende do equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação óssea, sendo influenciado por fatores locais e orquestrado por osteócitos e células de revestimento ósseo (Gonçalves *et al.*, 2022).

O processo de remodelação do tecido ósseo depende da atividade coordenada dos osteoclastos e osteoblastos (Daponte; Henke; Drissi, 2024). A regulação do equilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos resulta na sincronia estrita entre reabsorção e formação óssea, o que mantém a integridade estrutural e a homeostase do tecido ósseo. Em contrapartida, a desregulação da remodelação óssea pode levar à osteólise patológica, na qual a inflamação desempenha um papel crucial na promoção da destruição óssea (Li; Ling; Jiang, 2021).

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas que se originam de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e são responsáveis pela reabsorção óssea (Yahara *et al.*, 2022). O eixo RANK/RANKL/OPG desempenha um papel fundamental na osteoclastogênese (Li; Ling; Jiang, 2021), pois os precursores de osteoclastos se diferenciam em osteoclastos multinucleados, em dependência de RANKL e do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (Wu *et al.*, 2024). M-CSF e RANKL são mediadores produzidos por vários tipos celulares, como células estromais da medula óssea, osteoblastos, osteócitos e condrócitos, sendo cruciais para a remodelação óssea fisiológica (Omi; Mishina, 2022).

No tecido ósseo, o RANKL é expresso por um grupo variado de células, incluindo osteoblastos, osteócitos e células do sistema imunológico, sendo a expressão de RANKL mais pronunciada em osteoblastos e osteócitos. O RANKL se liga ao seu receptor correspondente, o RANK, induzindo sinais osteoclastogênicos subsequentes (Ono *et al.*, 2020). Por outro lado, a OPG, proteína solúvel que age como receptor para o RANKL, funciona como um inibidor da formação de osteoclastos

(Roldán; Giménez; Illueca, 2020). A produção excessiva de fatores pró-osteoclastogênicos, como RANKL, interleucina (IL) 17 e TNF- α , pode levar à ativação exagerada dos osteoclastos e à perda óssea patológica (Andreev *et al.*, 2020).

O M-CSF promove a formação de unidades formadoras de colônias de macrófagos a partir de HSCs, expandindo assim o reservatório de precursores comuns de osteoclastos e macrófagos (Li; Ling; Jiang, 2021). As atividades funcionais dos macrófagos influenciam a diferenciação dos osteoclastos e a remodelação óssea. Mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos, como interferon (IFN) γ , TNF- α e IL-6, promovem a proliferação de células pré-osteoclásticas e a diferenciação dos osteoclastos (Weivoda; Bradley, 2023).

A remodelação do tecido ósseo alveolar ocorre com maior intensidade do que no osso esquelético. O estresse mecânico da carga mastigatória desempenha um papel importante na alta taxa de rotatividade dos processos de remodelação, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A carga mecânica aumenta a expressão de RANKL e, conseqüentemente, promove a remodelação do osso alveolar. As células do ligamento periodontal desempenham uma função relevante na regulação da remodelação do osso alveolar em resposta às forças mecânicas, sendo capazes de produzir RANKL, TNF- α e IL-1 β para estimular a remodelação do osso alveolar (Omi; Mishina, 2022). O TNF- α e a IL-1 β regulam a formação e a atividade dos osteoclastos e, por conseqüência, desempenham papéis destrutivos na reabsorção óssea inflamatória (Chen *et al.*, 2023).

No contexto do estudo do osso e dos processos de formação e reabsorção ósseas, modelos experimentais em animais são benéficos e amplamente utilizados como um estágio pré-clínico para testar novos biomateriais regenerativos e técnicas de tratamento. Roedores são comumente empregados em vários modelos de doenças, incluindo a periodontite. As principais vantagens do modelo em roedores, em comparação a outros animais, são sua disponibilidade, custo relativamente baixo, facilidade de manuseio, capacidade de realizar modelos de estudo específicos devido à variedade de perfis genéticos e microbianos disponíveis e o rápido desenvolvimento da doença por diferentes métodos (Wichienrat *et al.*, 2024). O modelo de periodontite induzida por ligadura tem sido considerado uma abordagem eficaz para induzir inflamação e reabsorção óssea semelhantes à periodontite humana, além de ser um método valioso para a exploração dos mecanismos moleculares subjacentes à doença (Li *et al.*, 2023).

2.2 Modelos de estudo de reabsorção óssea inflamatória

Modelos experimentais oferecem contribuições significativas para a compreensão e o avanço da medicina moderna (Kaplan *et al.*, 2024). O uso de modelos animais de doenças humanas é fundamental para promover o entendimento dos mecanismos da doença, a descoberta de novos alvos terapêuticos, além de impulsionar o progresso na prevenção e no manejo de doenças humanas (Lange; Inal, 2023). Esses modelos fornecem informações valiosas sobre processos biológicos fundamentais, doenças e respostas a lesões (Landi; Everitt; Berridge, 2021).

A complexidade e diversidade de fatores que contribuem para a patogênese da periodontite, incluindo a combinação de sinergia microbiana, disbiose, desregulação inflamatória crônica e fatores de predisposição genética, tornam a busca por um modelo animal ideal de periodontite uma tarefa difícil e desafiadora (Rojas *et al.*, 2021).

Modelos animais para o estudo da periodontite podem ser estabelecidos em diferentes espécies, como ratos, camundongos, cães, porcos e primatas não-humanos. Em comparação aos animais de grande porte, como cães, porcos e primatas não-humanos, os de pequeno porte, como ratos e camundongos, apresentam vantagens, entre elas: tamanho reduzido, baixo custo, forte adaptabilidade ambiental e alta capacidade reprodutiva. Essas características facilitam a realização de experimentos, reduzindo os custos e permitindo que o estudo seja realizado com um número relativamente grande de animais experimentais (Zhang *et al.*, 2022).

Modelos experimentais em roedores são extremamente benéficos e importantes para examinar diversas hipóteses biológicas relacionadas à patogênese da doença, às interações hospedeiro-bactéria e às abordagens terapêuticas. Esses modelos são capazes de reproduzir, pelo menos em parte, os aspectos clínicos, moleculares e histológicos da periodontite humana. A periodontite experimental em camundongos pode ser induzida de diferentes maneiras, como gavagem oral, inoculação periodontal de bactérias associadas à doença periodontal, periodontite induzida quimicamente e periodontite induzida por ligadura (Rojas *et al.*, 2021). Características dos diferentes modos de indução da periodontite experimental em camundongos estão apresentadas no Quadro 1, adaptado de Rojas *et al.* (2021).

Quadro 1: Modelos experimentais de indução de periodontite em camundongos. O quadro resume características de alguns modelos murinos experimentais de indução da periodontite.

Técnica	Vantagens	Aplicação e plausibilidade biológica	Limitações
Gavagem oral	• Permite a administração entérica precisa de bactérias. • Pode ser realizada sem anestesia.	• Promove inflamação periodontal e reabsorção óssea alveolar progressiva consistente com uma forma crônica de periodontite. • Permite a invasão bacteriana dos tecidos orais de camundongos e bacteremia durante um período de tempo relativamente longo (4-8 semanas). • O desafio microbiano sistêmico sustentado e a inflamação sistêmica de baixo grau se assemelham à cronicidade da periodontite.	• Não é totalmente eficaz para induzir lesões periodontais. • Gera menor perda óssea alveolar em comparação com outros modelos. • Múltiplas inoculações em um longo período de tempo (4-8 semanas) são necessárias até o desenvolvimento da doença. • Aumento do estresse animal e risco de lesões esofágicas. • A eficácia depende da estirpe bacteriana utilizada e da sua virulência.
Inoculação periodontal de bactérias associadas à periodontite	• Administração local semiprecisa de bactérias.	• Promove inflamação periodontal e reabsorção óssea alveolar consistente com uma forma crônica de periodontite. • Possibilita o estudo de interações periodontais específicas hospedeiro-bactéria associadas à infecção. • Útil para o estudo da virulência/diferenças imunogênicas/patogênicas entre bactérias associadas à periodontite.	• Não é totalmente eficaz para induzir lesões periodontais. • Gera menos perda óssea alveolar e resposta inflamatória em comparação com outros modelos, como a ligadura. • Regime de injeção repetitiva (2-3 por semana) e período experimental médio-longo até o desenvolvimento da doença (20-45 dias).
Periodontite induzida quimicamente	• Não necessita de anestesia nem cultura bacteriana. • Compatível com cepas de camundongos imunocomprometidos.	• Promove inflamação periodontal e reabsorção óssea alveolar progressiva consistente com uma forma crônica de periodontite. • Permite o estudo da associação entre a inflamação da mucosa intestinal e da mucosa oral.	• Não emula a interação bactéria-hospedeiro, essencial na periodontite. • Não é totalmente eficaz para induzir lesões periodontais. • Gera menor perda óssea alveolar em comparação com outros modelos, como a ligadura.

Periodontite induzida por ligadura	• Compatível com camundongos imunocomprometidos. • Trauma mínimo na mucosa do camundongo. • Permite a coleta de fluido crevicular gengival de camundongo.	• Promove inflamação periodontal aguda e rápida reabsorção óssea alveolar, assemelhando-se a uma forma aguda/agressiva de periodontite. • Compatível com o atual paradigma da patogênese da periodontite associada à disbiose oral. • Induz inflamação sistêmica de baixo grau, também compatível com a definição de periodontite. • Permite o estudo da resposta imune local contra o desafio bacteriano inespecífico e a regeneração óssea alveolar após a remoção da ligadura. • Quando combinado com gavagem oral ou inoculação periodontal, pode ser útil para o estudo da virulência/diferenças imunogênicas/patogênicas entre bactérias associadas à periodontite.	• Risco de trauma mecânico se não realizado por operador calibrado. • Os animais precisam ser constantemente verificados quanto à posição da ligadura. • Nenhuma perda óssea sustentada após períodos prolongados de tempo, a menos que combinada com inoculação de bactérias ou gavagem; assim, não se assemelhando à cronicidade da periodontite.
------------------------------------	---	---	---

Fonte: Adaptado de Rojas *et al.* (2021).

O modelo animal murino utilizando ligadura é a forma mais comum de induzir a periodontite em animais (Zhang *et al.*, 2022). Durante a indução experimental da periodontite por ligadura em camundongos, a placa bacteriana se acumula ao redor da ligadura, e sua colocação provoca uma infiltração inflamatória contínua, o que leva à destruição do tecido periodontal. O modelo de indução da periodontite por ligadura revela a reabsorção óssea alveolar aguda e a inflamação do tecido mole no período inicial, e o processo de cicatrização da doença pode ser estudado após a remoção da ligadura (Lin *et al.*, 2021).

O modelo de periodontite induzida em roedores parece ser a melhor opção, considerando tempo, custo, resultados e número de animais eutanasiados para estudos de curto prazo (Tomina *et al.*, 2022). Uma importante vantagem desse modelo é que a doença pode ser iniciada em um momento específico, com uma sequência previsível de eventos, culminando em perda óssea alveolar (Abe; Hajishengallis, 2013).

2.3 Periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória que afeta as estruturas de suporte dos dentes, levando à destruição do tecido e à perda dentária (Wang *et al.*, 2023). A etiopatologia da doença é multifatorial e está relacionada a uma sequência de interações complexas entre microrganismos em biofilmes dentários e a resposta imunoinflamatória do hospedeiro (Tomina *et al.*, 2022).

Segundo Richards *et al.* (2014) a periodontite é considerada a sexta condição crônica mais comum em todo o mundo, com uma prevalência global aproximada de 11,2%, o que corresponde a cerca de 734 milhões de pessoas afetadas. A prevalência dessa doença tende a aumentar gradualmente com o avanço da idade, mostrando uma tendência particularmente acentuada entre a terceira e a quarta décadas de vida. Esse aumento é mais significativo na faixa etária dos 38 anos, que representa o pico de incidência da doença periodontal, evidenciando uma maior suscetibilidade à medida que as pessoas envelhecem.

A doença resulta de uma infecção microbiana causada pela presença de biofilme nas superfícies dentárias. Patógenos periodontais específicos, como as bactérias anaeróbias gram-negativas do complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*), encontradas em bolsas periodontais, estimulam a inflamação crônica nos tecidos periodontais (Kwon; Lamster; Levin, 2021). As bactérias patogênicas desempenham um papel inicial, gerando o recrutamento subsequente de células imunes e a liberação de citocinas, fatores de crescimento e moléculas de sinalização, os quais determinam a progressão e a gravidade da periodontite (Li *et al.*, 2023).

Fatores de risco estão associados à progressão da periodontite, incluindo fatores ambientais como tabagismo, patógenos e condições socioeconômicas, fatores sistêmicos relacionados ao histórico médico, como diabetes, outras condições inflamatórias, estresse e obesidade, e fatores genéticos, que desempenham papéis importantes. As taxas de progressão da doença podem variar entre os indivíduos, e acredita-se que a predisposição genética influencie o curso da periodontite, especialmente em formas agressivas e de rápida progressão (Brodzikowska; Górski, 2022).

A fase inicial da periodontite está associada à ativação da resposta inflamatória, caracterizada pelo aumento do fluido gengival crevicular e pelo influxo de células inflamatórias, especialmente os neutrófilos polimorfonucleares, que ajudam a

diminuir o dano causado pelo biofilme disbiótico. A ativação de leucócitos e células T no tecido conjuntivo leva à produção de múltiplos mediadores inflamatórios, à degradação de enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e ao aumento da expressão do RANKL, que é o principal fator de ativação dos osteoclastos (Pavanelli *et al.*, 2022).

Os neutrófilos ativados liberam quimiocinas que mediam o recrutamento quimiotático de células T auxiliares, como as células TH17. As células TH17 aumentam o recrutamento, a ativação e, portanto, a sobrevivência dos neutrófilos por meio da liberação de citocinas, como IFN- γ e TNF. Além das células T, as células B ativadas também são uma fonte de RANKL, resultando na reabsorção óssea na área afetada. Além disso, quando as células B são ativadas, isso resulta na proliferação, diferenciação e maturação das células plasmáticas. As células plasmáticas podem produzir citocinas como TNF- α , fator de crescimento transformador (TGF) β , IL-6 e IL-10. O TNF- α induz a expressão de MMPs, promovendo assim a destruição do tecido periodontal mediada por MMPs (Sadek *et al.*, 2023).

TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ são as citocinas pró-inflamatórias mais ativas na periodontite, desempenhando papéis cruciais nas funções imunomoduladoras das células-tronco e na remodelação óssea subsequente (Kittaka *et al.*, 2023). Esses mediadores pró-inflamatórios ativam osteoclastos e atenuam a atividade dos osteoblastos (Lee *et al.*, 2023). A inflamação periodontal pode ser quantificada por um aumento nos níveis circulantes de IL-6 e TNF- α , visto que ambas as citocinas demonstram atividade na patogênese da periodontite. Os níveis de IL-6 dentro do tecido periodontal aumentam com o início da doença e contribuem para a destruição dos tecidos circundantes por meio da ativação de MMPs e osteoclastos. Os níveis de TNF- α no periodonto aumentam durante a doença periodontal e seus níveis sistêmicos demonstraram estar associados ao aumento da gravidade da doença periodontal (Bertolini; Clark, 2024).

3 JUSTIFICATIVA

Modelos animais experimentais são ferramentas importantes na investigação dos mecanismos de patogênese da periodontite e no teste de novas abordagens terapêuticas. O modelo de periodontite induzida por ligadura tem sido frequentemente utilizado em animais para avaliar a resposta do hospedeiro e seus efeitos nos tecidos de suporte do dente sob condições bem controladas (Abe; Hajishengallis, 2013).

O modelo de periodontite induzida por ligadura apresenta várias vantagens em comparação com outros modelos, incluindo a rápida indução da doença, perda óssea previsível e a capacidade de estudar o tecido periodontal e a regeneração óssea alveolar, uma vez que é estabelecido dentro do aparelho periodontal (Lin *et al.*, 2021).

Embora esse modelo animal de periodontite seja amplamente utilizado na literatura para estudar processos reabsortivos inflamatórios, existe uma grande variedade de protocolos para indução da doença. Desse modo, para investigar o processo de instalação e progressão da periodontite experimental nesses animais, tornou-se relevante comparar protocolos em modelos animais utilizando ligaduras de fios de seda e algodão para a indução da periodontite em mandíbulas de camundongos fêmeas, que foram eutanasiadas em diferentes tempos após a indução da doença. Assim, buscou-se encontrar o momento em que a doença foi estabelecida, bem como o pico de reabsorção óssea, analisando possíveis diferenças conforme o material da ligadura.

Portanto, este estudo mostrou-se importante, pois permitiu uma melhor compreensão desse modelo animal, aprimorando o delineamento de estudos que investigarão abordagens farmacológicas em doenças ósseas inflamatórias, por meio da periodontite experimental em camundongos fêmeas.

4 HIPÓTESE

A periodontite induzida por ligadura com fios de algodão e seda resulta em diferentes picos de reabsorção óssea alveolar em mandíbulas de camundongos fêmeas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Comparar os níveis de reabsorção óssea alveolar em diferentes tempos de eutanásia, utilizando fios de algodão e seda na indução de periodontite por ligadura em mandíbulas de camundongos fêmeas.

5.2 Objetivos específicos

Avaliar diferentes protocolos de indução de periodontite por ligadura em camundongos fêmeas, considerando o tipo de fio utilizado e o tempo de eutanásia.

Analisar a perda óssea alveolar por meio da análise macroscópica do osso alveolar de camundongos fêmeas submetidos à periodontite.

Avaliar a inflamação no tecido gengival por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) para quantificação de TNF- α e de IL-1 β .

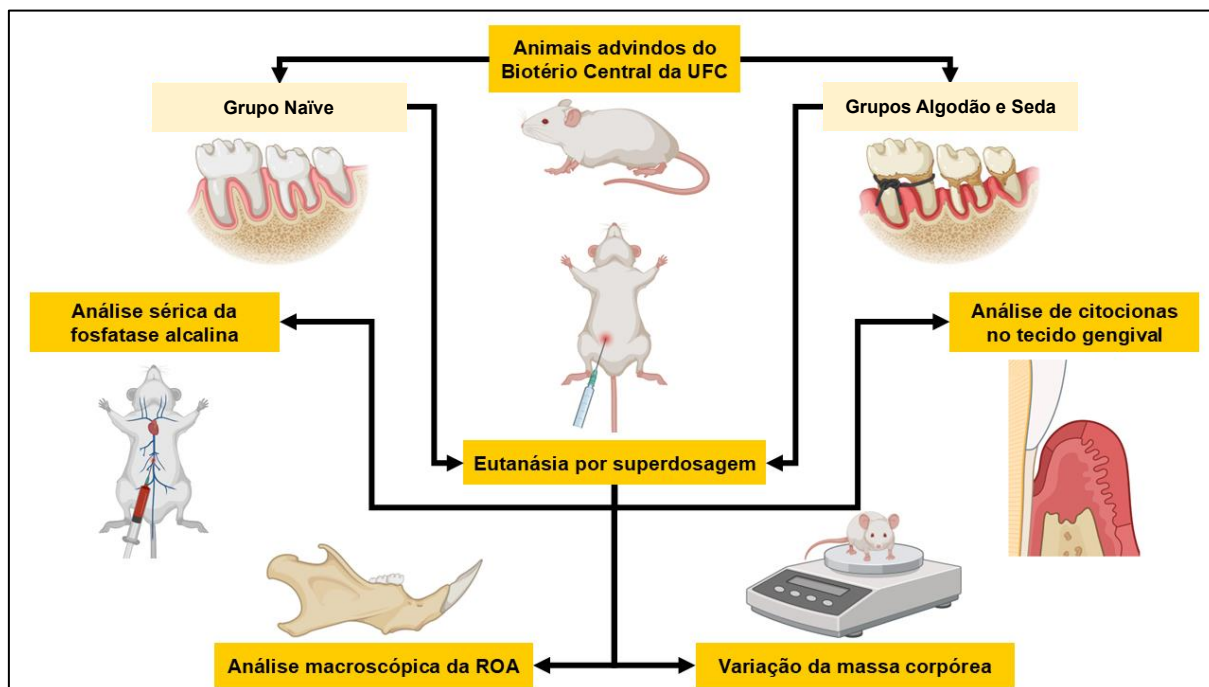
Avaliar indiretamente a atividade osteoblástica através da dosagem sérica de fosfatase alcalina em camundongos fêmeas submetidos à periodontite.

Avaliar os efeitos sistêmicos por meio da variação da massa corporal de camundongos fêmeas submetidos à periodontite.

6 METODOLOGIA

A Figura 1 apresenta um organograma que sintetiza o processo metodológico do presente estudo.

Figura 1: Delineamento experimental do estudo. Sequência metodológica adotada na pesquisa, ilustrando as etapas principais do estudo.



Fonte: Autoria própria.

6.1 Delineamento do estudo e aspectos éticos

Este foi um estudo prospectivo, randomizado, controlado e cego, que utilizou modelos animais. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a adotar todas as medidas necessárias para minimizar o número de animais utilizados e reduzir ao máximo o sofrimento deles, em conformidade com os princípios éticos para o uso de animais em pesquisa. O projeto foi iniciado somente após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, sob o registro de protocolo nº 06/23 (Anexo A). O processo de eutanásia foi realizado por meio de superdosagem dos anestésicos xilazina (30 mg/kg-ip) e cetamina (270 mg/kg-ip), o que resultou na parada cardiorrespiratória imediata dos animais.

6.2 Seleção dos animais

Foram utilizados 78 camundongos fêmeas *Swiss*, com massa corporal variando entre 20 e 30 gramas. Esses animais foram provenientes do Biotério Central

do Campus do Pici – UFC e mantidos em gaiolas adequadas, com 6 animais por gaiola. Durante o experimento, os camundongos receberam ração comercial balanceada, especialmente formulada para suas necessidades nutricionais, e tiveram acesso livre à água, de maneira *ad libitum*. As condições ambientais nas quais os animais foram mantidos eram cuidadosamente controladas, com ciclos de luz e escuridão de 12 horas cada e uma temperatura constante de 22°C, o que foi mantido durante todo o período do experimento.

6.3 Periodontite induzida por ligadura

A periodontite foi induzida pela inserção de uma ligadura com fios de algodão e de seda (4.0) em torno dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo por um único operador. Para iniciar o procedimento, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal, utilizando uma combinação de 10 mg/kg de cloridrato de cetamina associado a 90 mg/kg de cloridrato de xilazina. Após a anestesia, os camundongos fêmeas foram posicionados em decúbito ventral sobre uma mesa especialmente desenhada para roedores. Para facilitar o acesso à região bucal, foram utilizados afastadores orais, que foram colocados na área dos dentes incisivos. O fio de ligadura foi cuidadosamente inserido com o auxílio de espaçadores digitais endodônticos do tipo C, que ajudaram a criar um pequeno espaço entre o primeiro e o segundo molar inferior, tornando mais fácil a passagem do fio. A ligadura foi posicionada no sulco gengival, com seu nó colocado na região mesial dos molares. Após a indução da periodontite, a eutanásia dos animais ocorreu em momentos específicos: 3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias após a indução da doença. O objetivo foi identificar o tempo mais adequado para o pico de reabsorção óssea alveolar (Abe; Hajishengallis, 2013; Bonato *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019, Tavares *et al.*, 2024). Assim, os animais foram divididos nos grupos conforme o quadro 2.

Quadro 2: Grupos experimentais. Distribuição dos grupos experimentais utilizados na pesquisa, detalhando as diferentes condições e intervenções a que cada grupo foi submetido.

Indução da periodontite	Fio utilizado	Tempos de eutanásia (Dias)	Quantidade de animais
Sim	Seda 4.0 (PROCARE®)	3, 5, 7, 11, 14 e 21	36 (6 para cada tempo de eutanásia)
Sim	Algodão 4.0 (BIOLINE®)	3, 5, 7, 11, 14 e 21	36 (6 para cada tempo de eutanásia)
Não (Naïve)	Não se aplica	21	6

Fonte: Autoria própria.

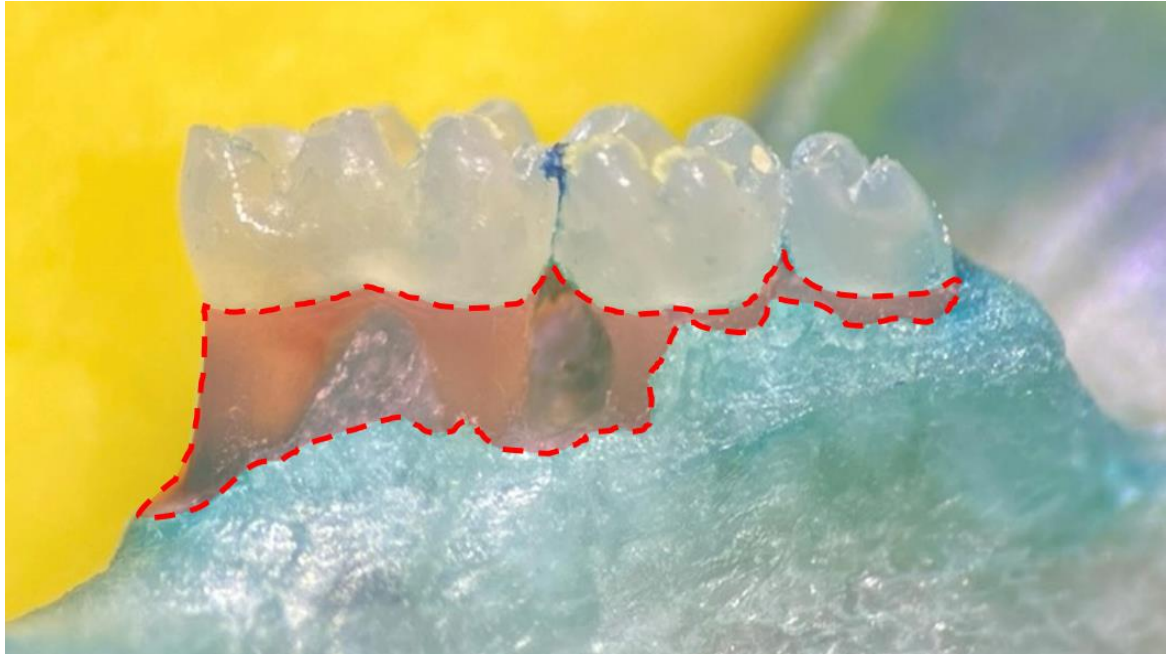
6.4 Análise macroscópica da reabsorção óssea alveolar

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram cuidadosamente removidas e separadas em duas hemiarcadas distintas. Cada hemiarcada foi fixada em uma solução de formol tamponado a 10% por 24 horas. Após a fixação, a hemiarcada esquerda foi dissecada meticulosamente e, em seguida, corada com uma solução de azul de metileno a 1%. Essa coloração foi utilizada para proporcionar uma melhor diferenciação entre o osso e os dentes, uma vez que os dentes se coram de forma menos intensa em comparação com o osso, facilitando a visualização das estruturas envolvidas (Lima *et al.*, 2004).

Para realizar a quantificação da reabsorção óssea, a hemiarcada foi cuidadosamente posicionada sobre uma lâmina coberta com uma camada de massa de modelar, o que possibilitou uma estabilização adequada da amostra para a fotografia. As imagens foram capturadas utilizando um celular Apple® (Modelo iPhone 13), equipado com a câmera de alta resolução, e ampliadas com o auxílio de uma lupa, proporcionando uma visualização detalhada das estruturas dento-periodontais. Após a captura das imagens, elas foram analisadas por meio do software Image J (versão ImageJ 1.44p, desenvolvido pelo National Institute of Health, EUA).

A reabsorção óssea alveolar (ROA) foi avaliada por meio da mensuração da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA), utilizando como referência os três molares mandibulares. Essa distância foi determinada de forma precisa, sendo medida em milímetros quadrados (mm²), com o objetivo de quantificar a extensão da reabsorção óssea presente nas áreas ao redor das raízes dos molares inferiores, assim como representado na Figura 2. A área de reabsorção observada foi, então, comparada com uma área de referência previamente estabelecida, que correspondia a um quadrado de 5 x 5 mm², conforme descrito por Kuhr *et al.* (2004).

Figura 2: Mensuração da área de ROA. Ilustração da medição da JCE-COA nos molares mandibulares, utilizada para avaliar ROA.



Fonte: Autoria própria.

6.5 ELISA para TNF- α e IL-1 β

Para a realização do ensaio imunoenzimático, o tecido gengival das hemiarcadas esquerda e direita foi cuidadosamente coletado de cada um dos animais e imediatamente congelado a uma temperatura de -80°C , a fim de preservar a integridade das amostras para análise posterior. O objetivo foi avaliar a presença e quantificar os níveis de TNF- α e IL-1 β . As amostras gengivais coletadas foram processadas conforme os procedimentos descritos por Safieh-Garabedian *et al.* (1995). A quantificação de TNF- α e IL-1 β foi realizada utilizando o método ELISA, conforme descrito por Cunha *et al.* (1993).

O teste ELISA foi realizado utilizando placas previamente preparadas para capturar TNF- α e IL-1 β nas amostras. O primeiro passo do procedimento envolveu a incubação das placas com anticorpos de captura específicos para TNF- α e IL-1 β a uma concentração de $2\text{ }\mu\text{g/ml}$. Esse processo foi realizado por 12 horas, a 4°C , com o objetivo de garantir que os anticorpos se ligassem de forma eficiente às superfícies das cavidades das placas, criando um ambiente propício para a captura de TNF- α e IL-1 β presentes nas amostras.

Após essa incubação inicial, as placas foram bloqueadas para evitar que

proteínas não específicas se ligassem nas cavidades, o que poderia interferir nos resultados. Em seguida, as amostras biológicas, bem como a curva padrão de TNF- α e de IL-1 β , foram aplicadas nas cavidades das placas em duplicata, utilizando diversas diluições, permitindo uma análise quantitativa precisa da concentração de TNF- α e IL-1 β nas amostras. As placas foram mantidas a 4 °C durante esse processo e incubadas por 2 horas para permitir que o TNF- α e IL-1 β nas amostras se ligassem ao anticorpo de captura previamente presente.

Após a incubação das amostras, as placas foram lavadas três vezes com uma solução tampão adequada para remover qualquer excesso de substâncias não ligadas, garantindo que os resultados fossem específicos e livres de interferências. Em seguida, foi adicionada uma solução contendo um anticorpo de detecção, que se ligou ao TNF- α e IL-1 β , formando um complexo com o anticorpo de captura. Essa incubação durou 2 horas, também a 4 °C.

Após essa etapa de detecção, as placas foram lavadas novamente para remover qualquer anticorpo de detecção não ligado. Em seguida, foi adicionado 50 μ L do complexo HRP-avidina, diluído na proporção de 1:200, que se ligou ao anticorpo de detecção, amplificando ainda mais o sinal de presença de TNF- α e IL-1 β . O complexo HRP-avidina contém peroxidase, que é responsável por gerar a reação colorimétrica que permite a quantificação de TNF- α e IL-1 β .

Após a incubação com o complexo HRP-avidina por 15 minutos, foi adicionado o reagente coranteafenilenodiamina (OPD), que, na presença de peroxidase, sofre uma reação de oxidação, resultando em uma coloração visível. As placas foram mantidas em ambiente escuro a 37 °C por 15 a 20 minutos para garantir a formação adequada da cor.

Por fim, a reação enzimática foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico 2N (H₂SO₄), estabilizando a cor gerada. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando um leitor de microplacas, e os resultados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/ml). Dessa forma, foi possível quantificar a quantidade de TNF- α e IL-1 β presente nas amostras de tecido gengival dos animais, proporcionando uma análise detalhada e precisa da presença dessas substâncias inflamatórias nas amostras analisadas.

6.6 Dosagem sérica da fosfatase alcalina

Para essa análise, foram coletados, de modo cuidadoso e controlado, no

momento da eutanásia, 0,5 mL de sangue da veia abdominal dos camundongos fêmeas. A dosagem da fosfatase alcalina (FAL) foi realizada com base na metodologia de inativação térmica descrita por Moss; Whitby, (1975). O procedimento seguiu rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante do reagente (Labtest®, Lagoa Santa-MG, Brasil), garantindo a correta execução do processo conforme as orientações específicas para obtenção de resultados confiáveis.

6.7 Variação da massa corpórea

Todos os camundongos fêmeas que participaram do estudo tiveram suas massas corpóreas inicialmente medidas antes da realização da cirurgia e no momento prévio à eutanásia. Esse monitoramento visou acompanhar as mudanças no peso corporal ao longo do tempo. Os resultados obtidos foram então expressos como a variação no peso corporal (em gramas), permitindo assim avaliar as possíveis alterações pela indução da periodontite.

6.8 Análise estatística

Os resultados paramétricos, levando em consideração a normalidade dos dados obtidos, foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM), a fim de fornecer uma medida precisa da variabilidade dos dados em relação à média. Para realizar as comparações entre os diferentes grupos experimentais, foram adotados métodos estatísticos apropriados, incluindo o teste One Way ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Bonferroni, o teste t de Student não pareado dependendo das características específicas dos dados e dos objetivos da análise.

A análise dos dados foi conduzida utilizando o software de estatísticas GraphPad Prism® versão 6.0 (La Jolla-CA, EUA), que é amplamente utilizado para realizar esse tipo de análise estatística e gerar gráficos informativos, sendo um dos programas mais confiáveis para a interpretação de dados científicos.

7 RESULTADOS

7.1 Reabsorção óssea alveolar (ROA)

A reabsorção óssea alveolar (ROA) foi avaliada por meio da mensuração da área entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA), utilizando como referência os três molares mandibulares. O estudo demonstrou que a periodontite induzida por ligadura, tanto com fio de algodão quanto com fio de seda, resultou em ROA significativa nos animais em todos os tempos de eutanásia avaliados (3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias), quando comparado ao grupo *Naïve* (Figura 3A e 3B). O aspecto macroscópico dessa ROA nas mandíbulas pode ser visualizado na Figura 4, assim como a exposição das raízes e a lesão de furca.

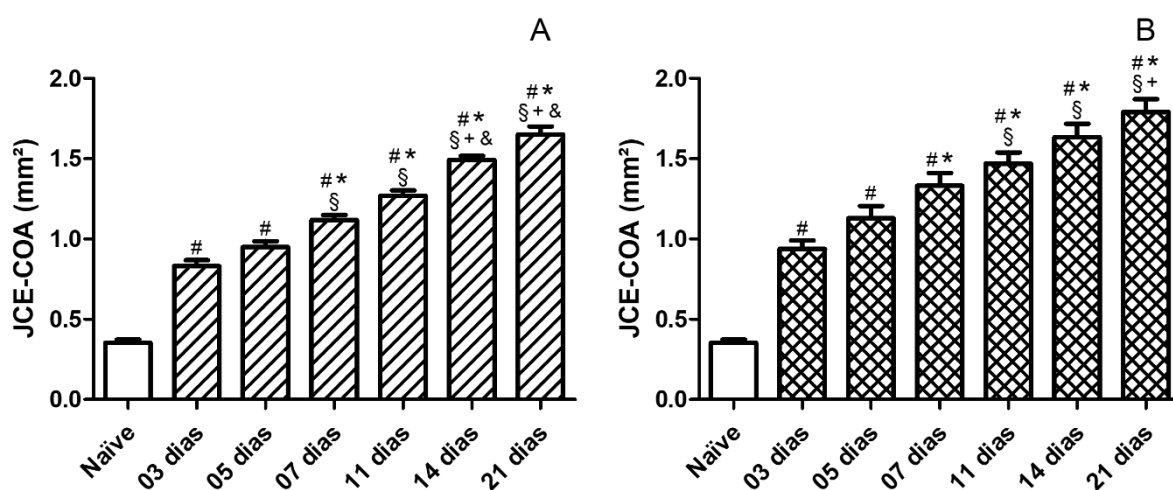


Figura 3: Reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM da reabsorção óssea, de 6 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo *Naïve*; ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo 3 dias; ^{\$} $p < 0,05$ em relação ao grupo 5 dias; ^{*} $p < 0,05$ em relação ao grupo 7 dias; [&] $p < 0,05$ em relação ao grupo 11 dias (Anova, teste de Bonferroni).

Em relação ao fio de algodão, a comparação entre o 3º e o 5º dia não revelou diferenças significantes. No entanto, as comparações entre o 3º dia e os tempos de 7, 11, 14 e 21 dias mostraram diferenças significantes, sugerindo uma progressão clara da periodontite ao longo do tempo. De fato, a ROA apresentou uma curva ascendente ao longo dos dias, com pico no 14º dia, em comparação aos dias 3, 5, 7 e 11 ($p < 0,05$), mantendo os níveis estáveis até o 21º dia (Figura 3A).

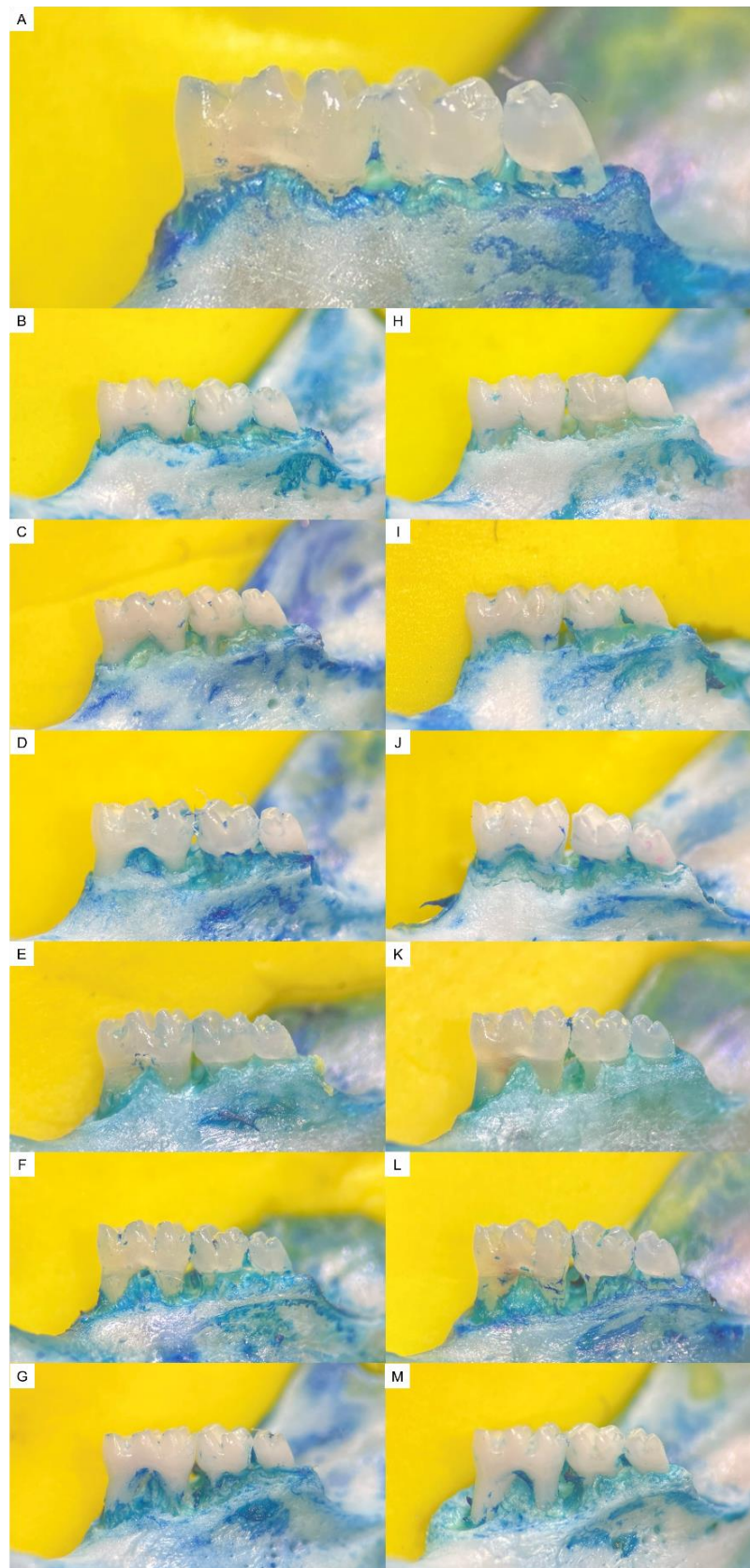


Figura 4: Aspecto macroscópico das mandíbulas. Mandíbulas dissecadas e coradas com azul de

metileno nos grupos experimentais. Grupo *Naïve*(A), grupo algodão com tempo de eutanásia de 3(B), 5(C), 7(D), 11(E), 14(F) e 21(G) dias e grupo seda com tempo de eutanásia de 3(H), 5(I), 7(J), 11(K), 14(L) e 21(M) dias (Autoria própria).

No que se refere à indução da periodontite com fio de seda, a comparação entre o 3º e o 5º dia também não revelou diferenças significantes. De forma semelhante ao observado com o fio de algodão, as comparações entre o 3º dia e os tempos de 7, 11, 14 e 21 dias mostraram diferenças significantes, sugerindo uma progressão clara da periodontite ao longo do tempo. Embora não tenha havido diferença significativa entre os tempos de 7, 11 e 14 dias, a ROA observada no dia 21 foi significativamente maior em relação àquela observada no dia 7 (Figura 3B). No entanto, em relação à comparação entre os dias 14 e 21, tanto no fio de algodão quanto no fio de seda, não houve diferença significativa (Figura 3A e 3B), indicando que, após o 14º dia, a doença atingiu um ponto de estabilização.

Além das comparações realizadas entre os diferentes tempos de eutanásia para um determinado tipo de fio, também foram feitas análises comparativas entre os dois tipos de fio (algodão e seda) em cada um dos tempos de eutanásia (Figura 5).

No 3º (Figura 5A) e no 5º dia (Figura 5B), as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, nos dias 7 (Figura 5C) e 11 (Figura 5D), observou-se uma diferença significativa, com o grupo de seda apresentando maior reabsorção óssea. Por fim, a partir do 14º (Figura 5E) e 21º (Figura 5F) dias, a ROA nos fios de algodão e seda voltou a ser semelhante ($p>0,05$).

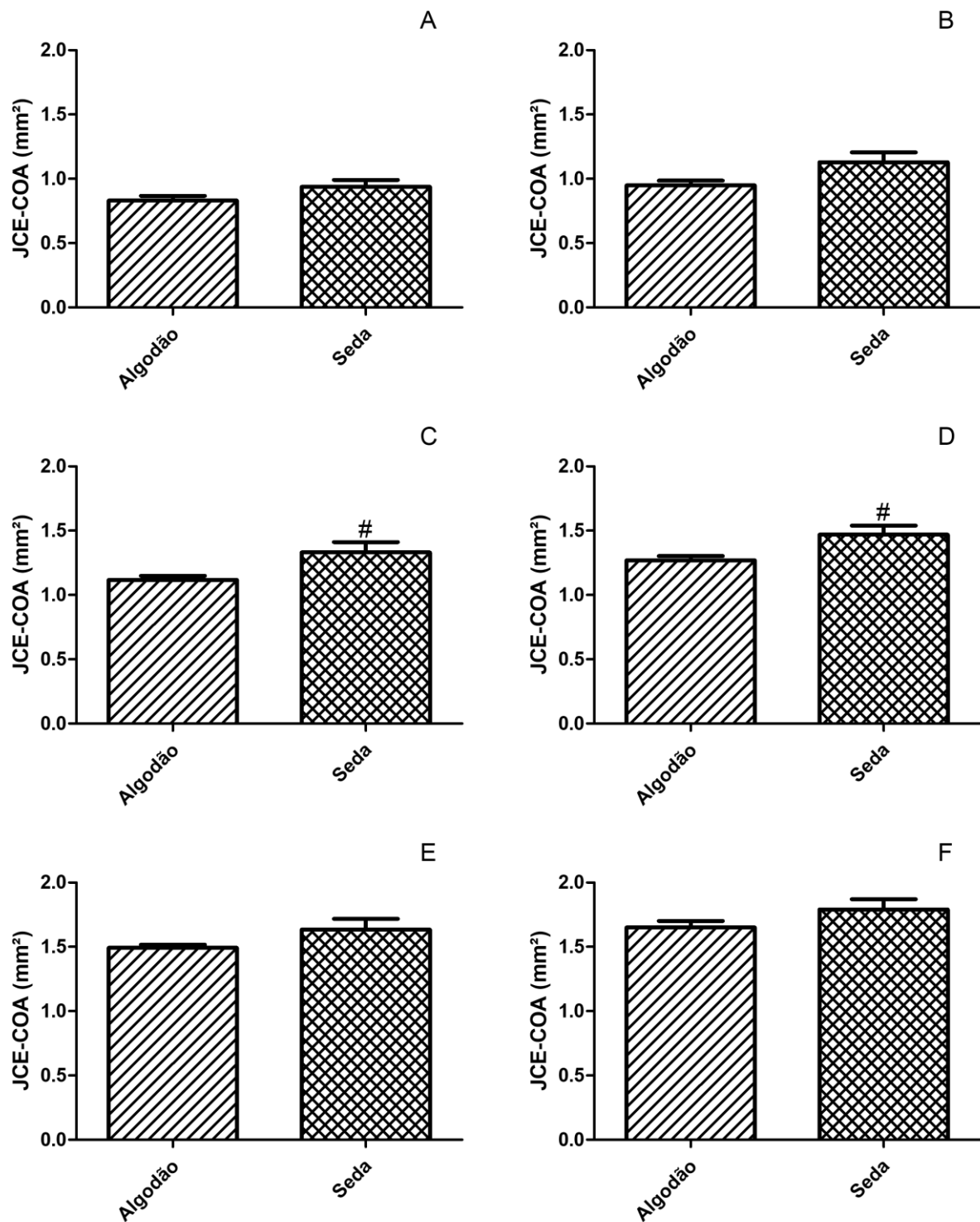


Figura 5: Comparação entre reabsorção óssea (JCE-COA) na mandíbula de camundongos fêmeas submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM da reabsorção óssea alveolar, de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

7.2 Dosagem de citocinas inflamatórias

7.2.1 Fator de necrose tumoral α (TNF- α)

Os resultados do estudo revelaram que a periodontite induzida por ligadura, utilizando tanto fio de algodão quanto fio de seda, não promoveu alterações significantes nos níveis gengivais de TNF- α quando comparada ao grupo Naïve (Figura 6A e 6B).

Nos animais com periodontite induzida por fio de algodão, a comparação entre os grupos de 5 e 14 dias mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com níveis de TNF- α mais elevados no grupo de 14 dias. Além disso, a comparação entre os grupos de 7 e 14 dias também revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$), com os níveis de TNF- α sendo mais altos no grupo de 14 dias em comparação ao grupo de 7 dias. No entanto, nas comparações entre os outros períodos, não foram encontradas diferenças significantes (Figura 6A). Quanto aos animais em que a periodontite foi induzida por fio de seda, especificamente, a comparação entre os grupos de 7 e 11 dias revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nos níveis de TNF- α , com os níveis mais elevados no grupo de 7 dias. Contudo, as demais comparações entre os grupos não mostraram diferenças significantes.

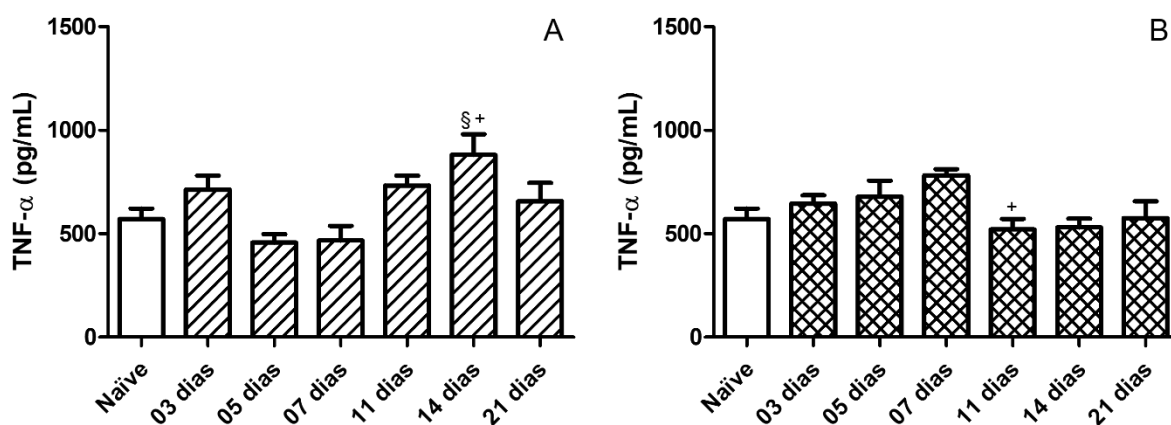


Figura 6: Níveis gengivais de TNF- α em camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis gengivais de TNF- α , de 6 animais por grupo. [§] $p < 0,05$ em relação ao grupo 5 dias; ⁺ $p < 0,05$ em relação ao grupo 7 dias (Anova, teste de Bonferroni).

Foram realizadas, além das comparações entre os diferentes tempos de eutanásia para cada tipo de fio, análises comparativas entre os dois tipos de fios utilizados (algodão e seda), levando em consideração os resultados obtidos em cada ponto específico de eutanásia (Figura 7).

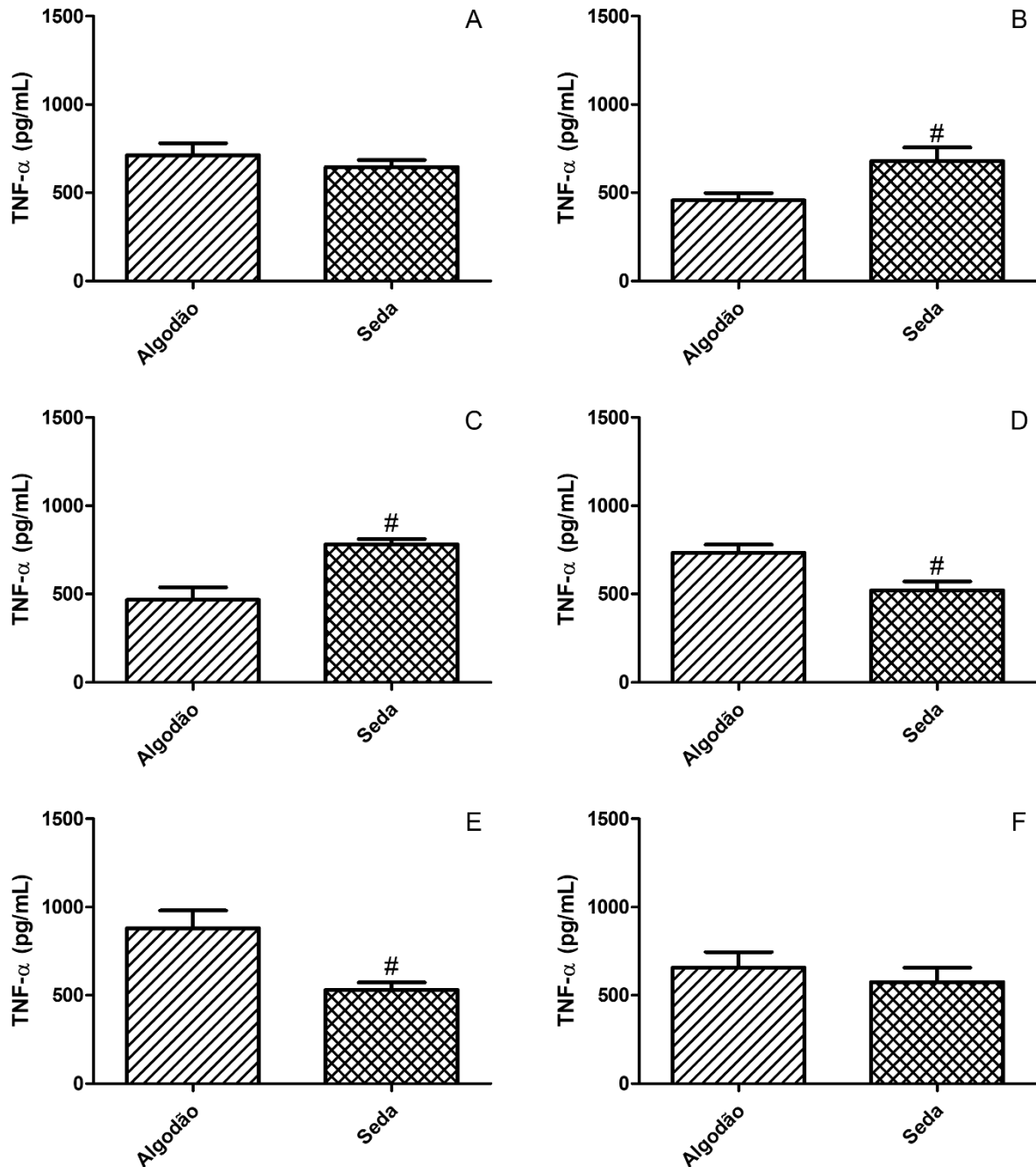


Figura 7: Comparação entre os níveis gengivais de TNF- α em camundongos fêmeas submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis gengivais de TNF- α , de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

Foram observados maiores níveis gengivais de TNF- α nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de seda, em relação ao fio de algodão, nos tempos de eutanásia de 5 e 7 dias (Figura 7B e 7C). Enquanto nos tempos de eutanásia de 11 e 14 dias, os níveis gengivais de TNF- α foram maiores nos animais em que a periodontite foi induzida com fio de algodão, em relação ao fio de seda (Figura 7D e 7E). Contudo, no 3º (Figura 7A) e no 21º (Figura 7F) dias, as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes.

7.2.2 Interleucina 1 β (IL-1 β)

A indução de periodontite por ligadura, utilizando tanto fio de algodão quanto fio de seda, provocou alterações significantes nos níveis de IL-1 β nos tecidos gengivais, quando comparada ao grupo controle *Naïve*, no 3º e no 5º dia (Figuras 8A e 8B).

Nos animais com periodontite induzida por fio de algodão, a comparação entre os grupos de 3 e 5 dias com o grupo de 7 dias revelou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), com níveis de IL-1 β mais elevados com níveis de IL-1 β mais elevados nos dias 3 e 5. No entanto, nas comparações entre os outros períodos, não foram encontradas diferenças significativas (Figura 8A).

No que concerne aos animais em que a doença foi induzida por fio de seda, o 5º dia apresentou níveis mais elevados ($p < 0,05$) de IL-1 β quando comparado aos 3º, 7º, 11º, 14º e 21º dias. Ainda em relação ao fio de seda, o 3º dia apresentou níveis mais elevados ($p < 0,05$) de IL-1 β em relação ao 11º dia (Figura 8B).

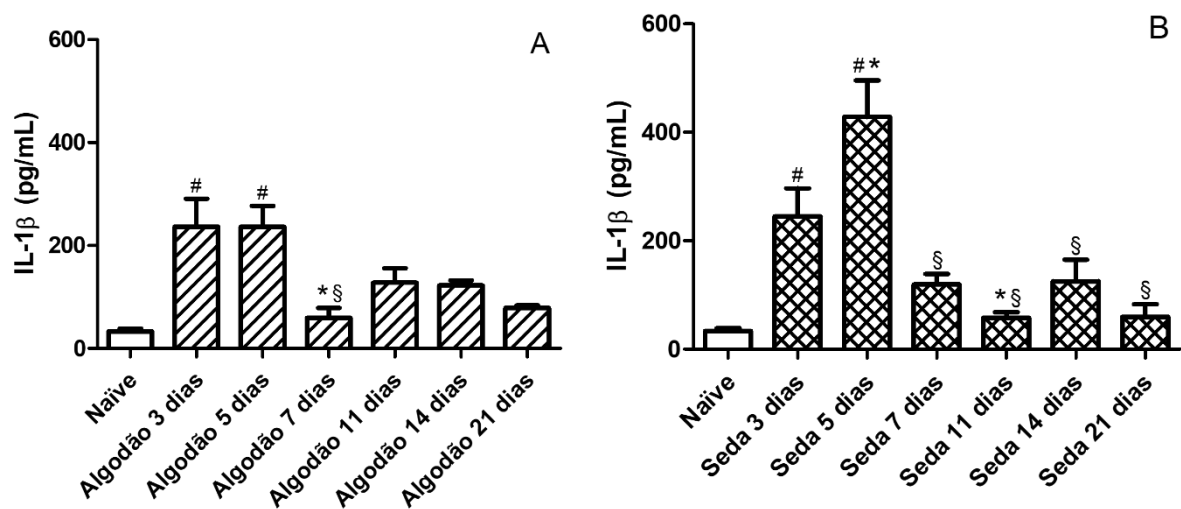


Figura 8: Níveis gengivais de IL-1 β em camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão (A) ou seda (B) no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3, 5, 7, 11, 14 ou 21 dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis gengivais de IL-1 β , de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo *Naïve*; * $p < 0,05$ em relação ao grupo 3 dias; § $p < 0,05$ em relação ao grupo 5 dias (Anova, teste de Bonferroni).

Além das comparações entre os diferentes tempos de eutanásia para cada tipo de fio, também foram realizadas análises comparativas entre os dois tipos de fio (algodão e seda) em cada intervalo de eutanásia. A análise dos dados mostrou resultados distintos, conforme ilustrado na Figura 9.

No 3º (Figura 9A) e no 7º dia (Figura 9C), as diferenças entre os grupos não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, nos dias 5 (Figura 9B) e 11 (Figura 9D), observou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$), com o grupo seda apresentando maiores níveis gengivais de IL-1 β no quinto dia e o grupo de algodão apresentando essa superioridade no 11º dia. Por fim, a partir do 14º (Figura 9E) e 21º (Figura 9F) dias, os níveis gengivais de IL-1 β nos animais em que a doença foi induzida com algodão e seda passaram a ser semelhantes ($p > 0,05$).

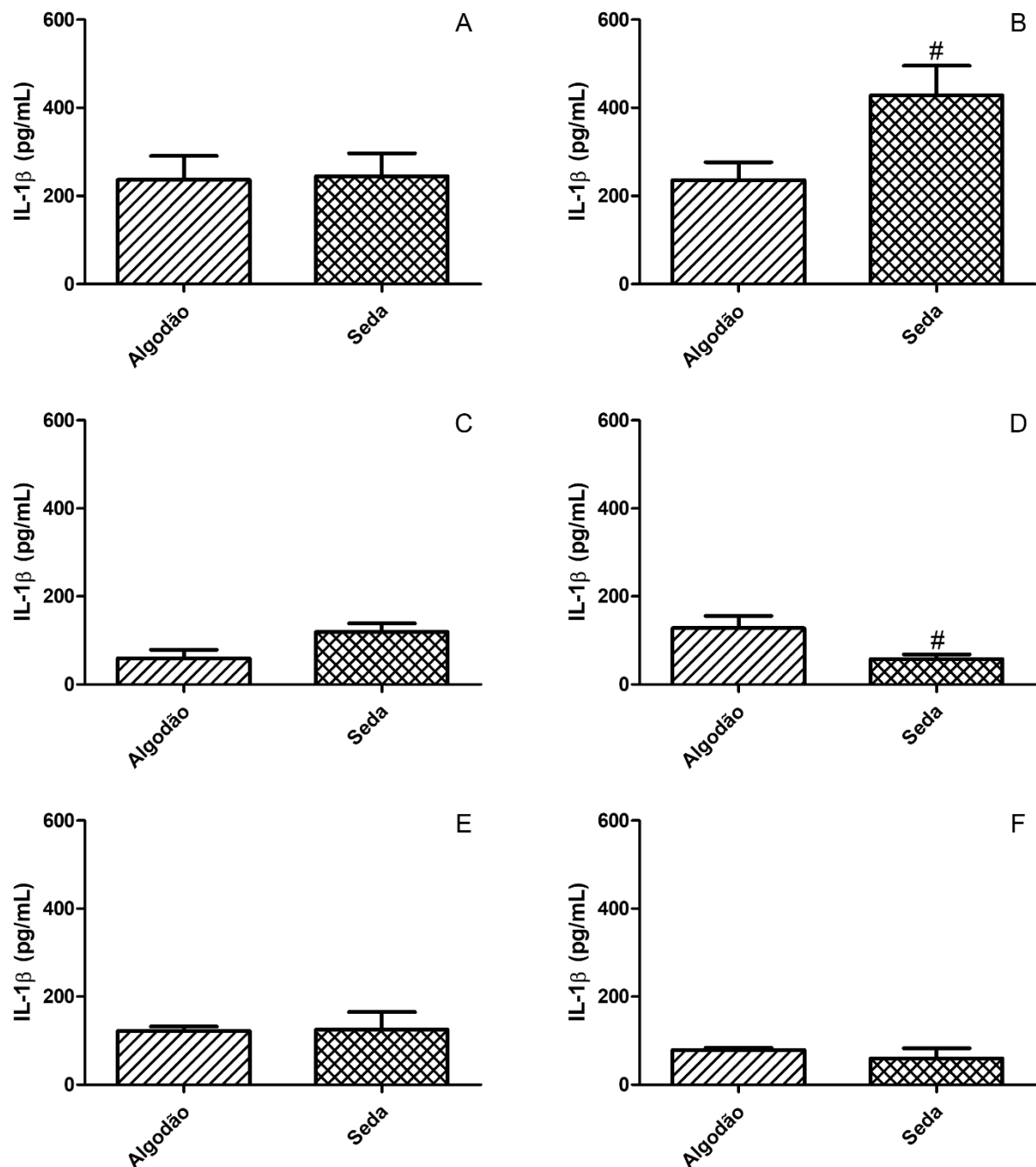


Figura 9: Comparação entre os níveis gengivais de IL-1 β em camundongos fêmeas submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis gengivais de IL-1 β , de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

7.3 Dosagem sérica de fosfatase alcalina (FAL)

Os níveis séricos de FAL foram dosados no momento da eutanásia dos animais. Nos animais em que a periodontite foi induzida com o fio de algodão, observou-se um aumento significativo nos níveis dessa enzima em relação aos

valores do grupo *Naïve*, após 7, 11, 14 e 21 dias da indução da periodontite (Figura 10A). Além disso, ainda nos animais em que a doença foi induzida com ligadura de algodão, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no 7º dia e no 21º dia, quando comparados com o grupo que teve sua eutanásia após 3 dias de indução da periodontite, com maiores níveis séricos da enzima no 7º e no 21º dia em relação ao 3º dia, como indicado na Figura 10A.

Em relação aos grupos com periodontite induzida por fio de seda, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de FAL em relação ao grupo *Naïve*, somente no dia 11 (Figura 10B).

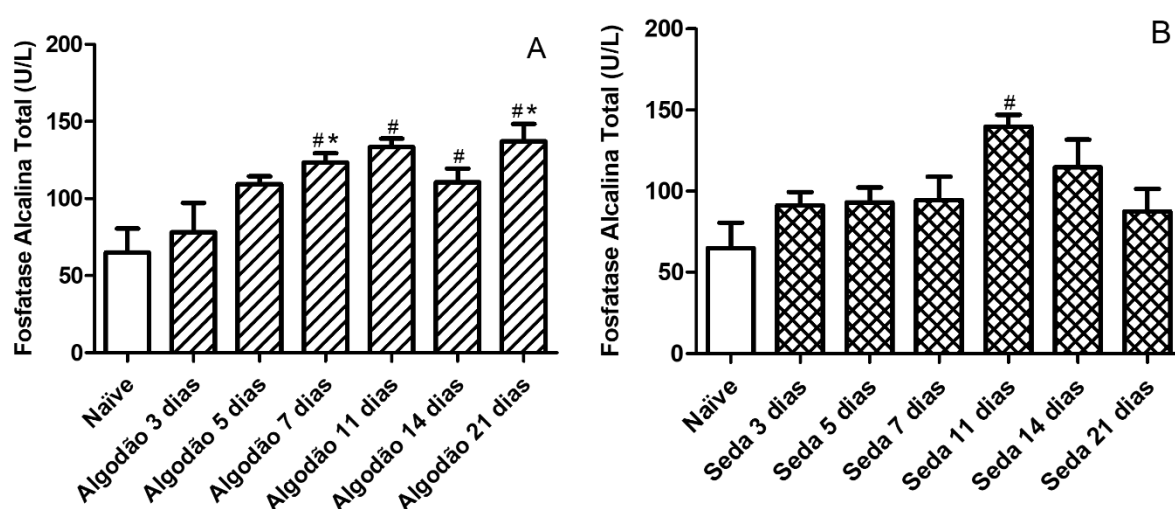


Figura 10: Níveis séricos de FAL em camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis séricos de fosfatase alcalina, de 6 animais por grupo. # $p < 0,05$ em relação ao grupo *Naïve*; * $p < 0,05$ em relação ao grupo 3 dias (Anova, teste de Bonferroni).

A comparação entre os dois tipos de fio (algodão e seda) em cada intervalo de eutanásia mostrou resultados semelhantes ($p > 0,05$) (Figuras 11A, 11B, 11C, 11D e 11E), exceto no 21º dia ($p < 0,05$), em que os animais induzidos com fio de algodão apresentaram uma maior quantidade de FAL quando comparados aos animais induzidos com fio de seda, conforme indicado na Figura 11F.

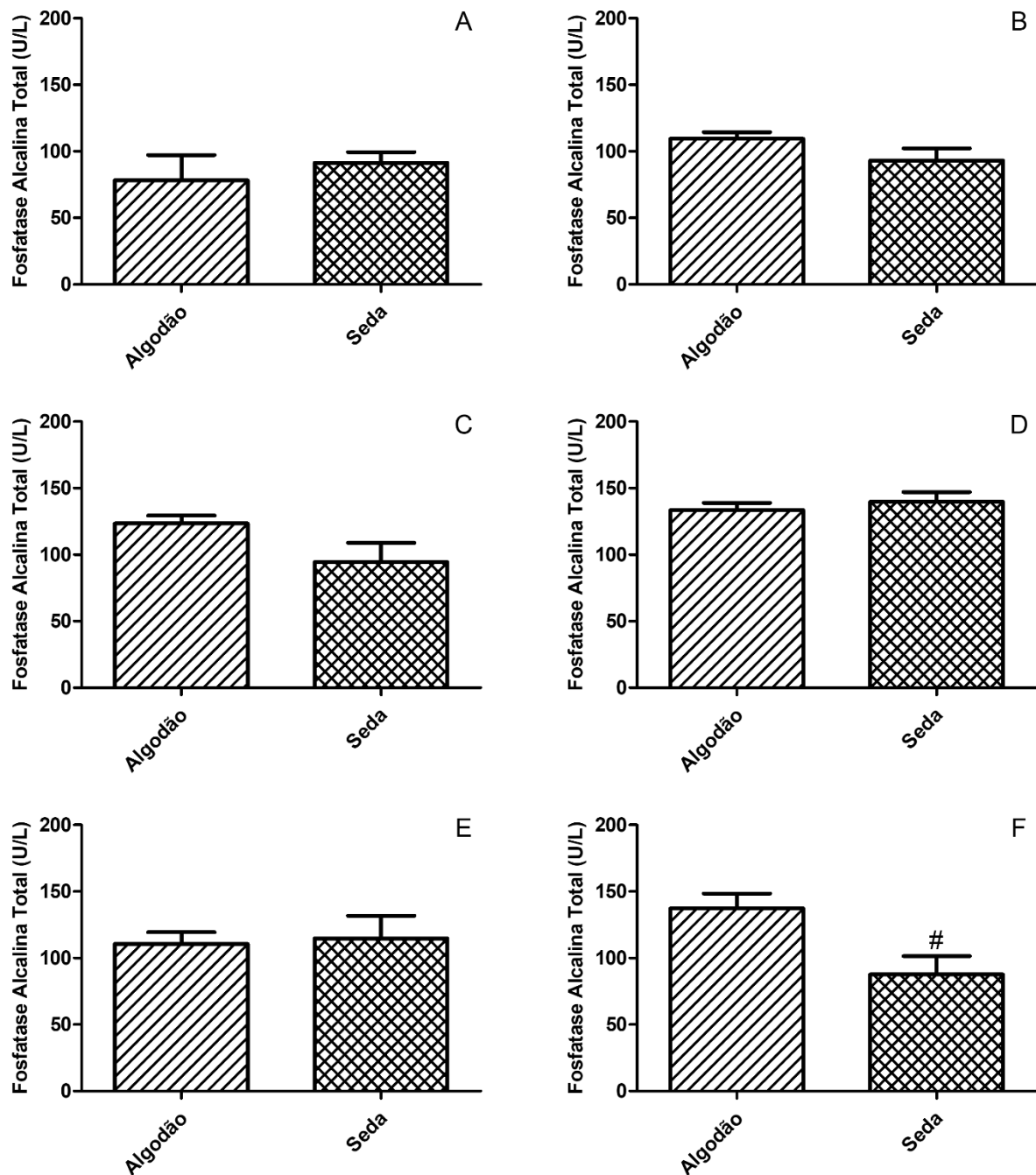


Figura 11: Comparação entre os níveis séricos de FAL em camundongos fêmeas submetidos à periodontite com fios de algodão ou seda. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM dos níveis séricos de fosfatase alcalina, de 6 animais por grupo. [#] $p < 0,05$ em relação ao grupo algodão (Test t de Student).

7.4 Variação da massa corpórea

As massas corporais dos animais foram registradas antes da cirurgia e imediatamente antes da eutanásia. Os resultados foram apresentados como variação

da massa corpórea (g) em comparação à massa inicial (Figura 12). Não foram encontradas alterações significantes na variação de peso dos animais com periodontite induzida por ligadura, independentemente do tipo de fio utilizado, em todos os tempos de eutanásia, quando comparados aos animais do grupo *Naïve*.

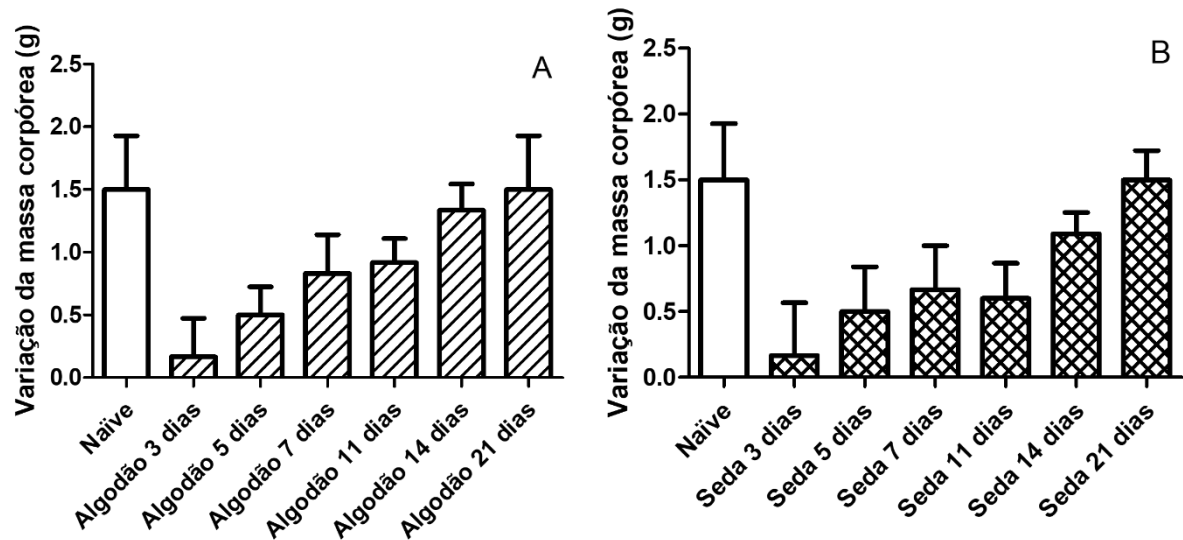


Figura 12: Variação de massa corpórea em camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM da variação de massa corpórea (g), de 6 animais por grupo. (Anova, teste de Bonferroni).

A comparação da variação da massa corporal (g) entre os dois tipos de fio (algodão e seda) em cada intervalo de eutanásia mostrou resultados semelhantes ($p > 0,05$), sem variações significantes entre os grupos comparados, como indicado na Figura 13.

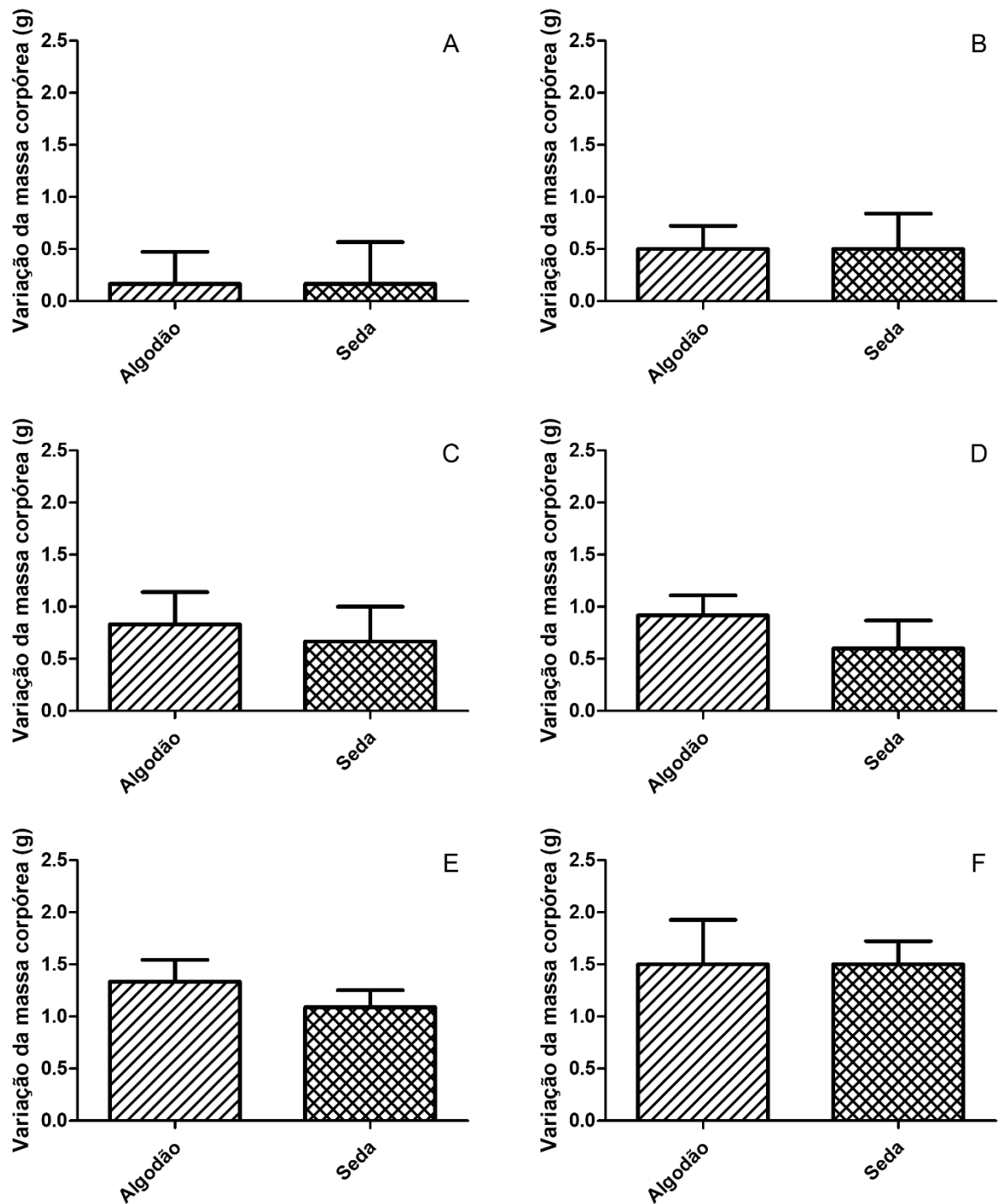


Figura 13: Comparação da variação de massa corpórea em camundongos fêmeas submetidos à periodontite. A periodontite foi induzida pela colocação de fio de algodão ou seda no primeiro molar inferior e os camundongos fêmeas foram eutanasiados após 3 (A), 5 (B), 7 (C), 11 (D), 14 (E) ou 21 (F) dias. Os dados representam a média $\pm$ EPM da variação de massa corpórea (g), de 6 animais por grupo. (Test t de Student).

8 DISCUSSÃO

O progresso na compreensão, prevenção e gestão de doenças humanas foi impulsionado pelo uso de animais como modelos biológicos para doenças humanas (Landi; Everitt; Berridge, 2021). Modelos animais para o estudo de doenças ósseas inflamatórias reabsortivas forneceram informações relevantes acerca da patogênese dessas doenças, bem como possíveis manejos terapêuticos (Usategui-Martín; Pérez-Castrillón, 2023). Nesse contexto, o modelo de periodontite destaca-se por ser de fácil execução e baixo custo (Zhang *et al.*, 2022). No entanto, a literatura relata uma ampla variedade de protocolos desse modelo, variando em relação à espécie animal utilizada, método de indução e tempo de avaliação (Rojas *et al.*, 2021).

Recentemente, foi publicado um estudo avaliando o curso temporal da periodontite induzida por ligadura na maxila de camundongos machos (Yoon *et al.*, 2022). Nesse contexto, objetivamos avaliar o estabelecimento e a progressão da periodontite induzida por ligadura na mandíbula de camundongos fêmeas, devido ao seu baixo custo e à forte adaptação dos animais ao ambiente.

Como os modelos periodontais induzidos por ligadura causam destruição óssea alveolar significativa, eles têm sido usados em muitos estudos para revelar os mecanismos patológicos da periodontite (Lin *et al.*, 2021), bem como para investigar alternativas terapêuticas (Abe; Hajishengallis, 2013). Desse modo, os resultados deste estudo fornecem valiosas informações sobre a periodontite induzida por ligadura em camundongos fêmeas, destacando a ROA e a resposta inflamatória. Foi observado que a ROA foi significativamente maior nos grupos com periodontite, tanto com fio de algodão quanto com fio de seda, em todos os tempos de eutanásia (3, 5, 7, 11, 14 e 21 dias), quando comparados ao grupo *Naïve*. Em ambos os fios, a ROA aumentou de forma progressiva, com pico no 14º dia, mantendo-se estável no 21º dia, embora no fio de seda a ROA tenha sido maior no 21º dia em relação àquela observada no 7º dia. Ademais, ao comparar os dois tipos de fio, apesar de a ROA ter sido maior no grupo de seda nos dias 7 e 11, a partir do 14º dia, foi semelhante nos dois grupos.

De fato, a literatura relata que a ROA é alcançada logo nos primeiros dias após a inserção da ligadura. De forma semelhante ao observado em nossos resultados, a ROA no estudo de Yoon *et al.* (2022) foi significativa a partir do terceiro dia. Tavares *et al.* (2024) também relataram ROA bem estabelecida no sétimo dia de

ligadura com fio de algodão no primeiro molar mandibular. Além disso, Marchesan *et al.* (2018) observaram que a ativação de osteoclastos e a ROA ocorrem principalmente na fase inicial (dias 3 a 9) e são seguidas por uma diminuição na fase posterior, do 9º ao 18º dia. De forma semelhante, Li *et al.* (2024), utilizando fio de seda na mandíbula de camundongos machos, demonstraram que a periodontite foi estabelecida no 7º dia de ligadura, alcançando valores maiores de ROA no 14º dia. Apesar das diferenças de protocolo, nossos achados também mostram uma curva ascendente de ROA, com tendência à estabilização a partir do dia 14.

Netanely *et al.* (2024) comparam a ROA na periodontite induzida por ligadura em 3, 9 e 21 dias, revelando que, no 21º dia, nenhuma perda óssea adicional foi detectada em comparação com o nono dia, embora a ligadura ainda estivesse presente. Em nosso estudo, também observamos ausência de diferença significativa entre o 14º e o 21º dia, indicando uma estabilização da doença. Esses achados sugerem que, para avaliar a progressão máxima da periodontite induzida por ligadura, os grupos de 14 e 21 dias, tanto com fio de algodão quanto com fio de seda, são os mais indicados, oferecendo uma compreensão detalhada da dinâmica da periodontite induzida ao longo do tempo e reforçando a eficácia do modelo experimental.

Segundo Rojas *et al.* (2021), a indução da periodontite por meio da inserção de uma ligadura ao redor dos dentes permite o estudo da resposta imune local contra o desafio bacteriano inespecífico e a regeneração óssea alveolar após a remoção da ligadura, sendo a compreensão desses mecanismos crucial para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da periodontite.

Mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-17 α e TNF- α , conduzem à ação destrutiva dos osteoclastos no tecido ósseo (Place *et al.*, 2021). Os produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , por células imunes, e estimulam a expressão de RANKL em osteoblastos (Omi; Mishina, 2022). A presença de TNF- α e IL-1 β no tecido gengival está associada à perda óssea periodontal, visto que são os principais mediadores da destruição óssea periodontal na patogênese da periodontite (Wang *et al.*, 2023). Nesse contexto, considerando o papel do TNF- α e da IL-1 β na patogênese da periodontite, foi realizada a dosagem dos níveis gengivais dessas citocinas em todos os tempos experimentais.

Ishii *et al.* (2022) indicaram que os níveis gengivais de TNF- α , após 14 dias do curso da doença, são maiores em animais com periodontite induzida por ligadura

com fio de seda, quando comparados a animais controle que não receberam ligadura. No entanto, nossos achados não indicam aumento de TNF- α nos animais em que a periodontite foi induzida pelos fios de algodão e seda.

Por outro lado, nossos resultados mostram o aumento significativo dos níveis gengivais de IL-1 β em relação ao grupo *Naïve*, nos dias 3 e 5, com um pico no 5º dia do processo patológico para o fio de seda. A literatura corrobora tais achados, uma vez que tem sido demonstrado que a periodontite induzida por ligadura em modelos murinos, quando comparada aos animais do grupo controle, estimula uma resposta inflamatória significativa, caracterizada pelo aumento na secreção de mediadores inflamatórios, incluindo a IL-1 β (Tang *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2024). É interessante observar que o aumento da IL-1 β já no terceiro dia indica o estabelecimento de um processo inflamatório que justifica a ROA alcançada nesse mesmo dia. De fato, a literatura mostra que a IL-1 β produzida desempenha um papel importante como fator pró-osteoclastogênico no microambiente periodontal, resultando em ROA (Mo *et al.*, 2024).

A fosfatase alcalina, incluindo sua isoforma óssea, é utilizada como marcador da atividade osteoblástica, aumentando em processos formativos ósseos e diminuindo em processos reabsortivos (Ponzano *et al.*, 2021). No entanto, essa associação deve ser analisada com cautela, pois a literatura também indica que o aumento nos níveis séricos dessa enzima ocorre em doenças reabsortivas, como a osteoporose (Nizet, 2020). Nosso estudo revelou, de fato, que a ROA não foi relacionada à redução dos níveis séricos de fosfatase alcalina.

Por fim, a literatura mostra que o peso corporal de camundongos submetidos a periodontite aumenta gradativamente ao longo do tempo, com um menor ganho em animais com periodontite induzida em comparação ao controle (Mo *et al.*, 2024). Em contraponto, Tomina *et al.* (2022) não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação ao peso em nenhum dos grupos experimentais ou no grupo de controle. Nosso estudo, em concordância com Tomina *et al.* (2022), não denotou alterações significantes na variação de peso dos animais submetidos à periodontite com ambos os fios, em todos os momentos de eutanásia, quando comparado aos animais do grupo *Naïve*.

9 CONCLUSÃO

A indução de periodontite por ligadura, utilizando fios de algodão e seda, demonstrou causar uma reabsorção óssea alveolar significativa nos camundongos fêmeas ao longo do tempo, com picos de perda óssea alveolar observados entre no 14º com estabilização no 21º dia de eutanásia, indicando um padrão semelhante de progressão da periodontite com ambos os fios. O início dessa reabsorção óssea alveolar esteve associado ao aumento do processo inflamatório, demonstrado pela elevação dos níveis gengivais de IL-1 β .

Esses achados oferecem, portanto, uma compreensão mais profunda dos mecanismos envolvidos na periodontite experimental em camundongos e fornecem dados importantes para futuros estudos sobre terapias e tratamentos dessa condição.

REFERÊNCIAS

- ABE, Toshiharu; HAJISHENGALLIS, George. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, [s. l.], v. 394, n. 1–2, p. 49–54, 2013.
- ANDREEV, Darja *et al.* Osteocyte necrosis triggers osteoclast-mediated bone loss through macrophage-inducible C-type lectin. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 130, n. 9, p. 4811–4830, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773408/>.
- BERTOLINI, Martinna; CLARK, Daniel. Periodontal disease as a model to study chronic inflammation in aging. **GeroScience**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 3695–3709, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37285008/>.
- BONATO, C. F. *et al.* Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. **Journal of periodontal research**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 783–792, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22738033/>.
- BRODZIKOWSKA, Aniela; GÓRSKI, Bartłomiej. Polymorphisms in Genes Involved in Inflammation and Periodontitis: A Narrative Review. **Biomolecules**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 552, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9030004/>.
- CHEN, Shuangshuang *et al.* BushenHuoxue decoction suppresses M1 macrophage polarization and prevents LPS induced inflammatory bone loss by activating AMPK pathway. **Heliyon**, [s. l.], v. 9, n. 5, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37153438/>.
- CHEN, Y.; JIANG, Z.; KEOHANE, A.; HU, Y. In vitro and in vivo study of the pathogenic role of PPAR α in experimental periodontitis. **Journal of Applied Oral Science**, [s. l.], v. 30, p. e20220076, 2022. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0076>.
- CHOI, Jung Un Ally *et al.* The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 9, 2021. Disponível em: [/pmc/articles/PMC8900535/](https://pmc/articles/PMC8900535/).
- CIOSEK, Žaneta *et al.* The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33800689/>.

CIOSEK, Żaneta; KOT, Karolina; ROTTER, Iwona. Iron, Zinc, Copper, Cadmium, Mercury, and Bone Tissue. **International journal of environmental research and public health**, [s. l.], v. 20, n. 3, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36767564/>.

CUNHA, Fernando Q. *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **European journal of pharmacology**, [s. l.], v. 238, n. 1, p. 47–52, 1993. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8104802/>.

DAPONTE, Valentina; HENKE, Katrin; DRISSI, Hicham. Current perspectives on the multiple roles of osteoclasts: Mechanisms of osteoclast-osteoblast communication and potential clinical implications. **eLife**, [s. l.], v. 13, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38591777/>.

GONÇALVES, Vinícius de Paiva *et al.* Systemic Dietary Hesperidin Modulation of Osteoclastogenesis, Bone Homeostasis and Periodontal Disease in Mice. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 23, n. 13, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35806105/>.

HERNÁNDEZ MARTÍNEZ, Cristhiam de J. *et al.* Chronological analysis of periodontal bone loss in experimental periodontitis in mice. **Clinical and Experimental Dental Research**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1009–1020, 2023.

ISHII, T. *et al.* Locally secreted Semaphorin 4D is engaged in both pathogenic bone resorption and retarded bone regeneration in a ligature-induced mouse model of periodontitis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 10, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS23105630>.

JIAO, Mengyu *et al.* Osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand are involved in periodontitis-promoted vascular calcification. **Experimental and therapeutic medicine**, [s. l.], v. 24, n. 2, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35813311/>.

KAPLAN, Barbara L.F. *et al.* Protecting Human and Animal Health: The Road from Animal Models to New Approach Methods. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 251–266, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38351072/>.
KIM, Jung Min *et al.* Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells**, [s. l.], v. 9, n. 9, 2020.

KITAURA, Hideki *et al.* Osteocyte-Related Cytokines Regulate Osteoclast Formation and Bone Resorption. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 14, p. 5169, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7404053/>.

KITAKA, Mizuho *et al.* Osteocyte RANKL Drives Bone Resorption in Mouse Ligature-Induced Periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 38, n. 10, p. 1521–1540, 2023.

KUHR, A. *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **Journal of periodontal research**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 101–106, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15009517/>.

KWON, Tae Hyun; LAMSTER, Ira B.; LEVIN, Liran. Current Concepts in the Management of Periodontitis. **International Dental Journal**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 462–476, 2021.

LANDI, Margaret; EVERITT, Jeffrey; BERRIDGE, B. Bioethical, Reproducibility, and Translational Challenges of Animal Models. **ILAR journal**, [s. l.], v. 62, n. 1–2, p. 60–65, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33693624/>.

LANGE, Sigrun; INAL, Jameel M. Animal Models of Human Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 21, 2023. Disponível em: Acesso em: 27 ago. 2024.

LEE, Myung Jin *et al.* Sirt6 Activation Ameliorates Inflammatory Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 13, p. 10714, 2023.

LI, Shiyi *et al.* Evaluation of morphological, histological, and immune-related cellular changes in ligature-induced experimental periodontitis in mice. **Journal of Dental Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 4, p. 1716, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10547956/>.

LI, Y. *et al.* Temporal and spatial expression analysis of periostin in mice periodontitis model. **Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi = Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi = West China Journal of Stomatology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 286–295, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7518/HXKQ.2024.2023336>.

LI, Yang; LING, Junqi; JIANG, Qianzhou. Inflammasomes in Alveolar Bone Loss. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 12, 2021a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34177950/>.

LIMA, Vilma *et al.* Effects of Tumor Necrosis Factor- α Inhibitors Pentoxifylline and Thalidomide on Alveolar Bone Loss in Short-Term Experimental Periodontal Disease in Rats. **Journal of periodontology**, [s. l.], v. 75, n. 1, p. 162–168, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29539102>.

LIN, Peiya *et al.* Application of Ligature-Induced Periodontitis in Mice to Explore the Molecular Mechanism of Periodontal Disease. **International journal of molecular sciences**, [s. l.], v. 22, n. 16, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34445604/>.

MARCHESAN, J. *et al.* An experimental murine model to study periodontitis. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 2247–2267, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41596-018-0035-4>.

MO, C. *et al.* Correlation between gut microbiota composition and serum interleukin 17 (IL-17) in mice with type 2 diabetes and experimental periodontitis. **Cureus**, [s. l.], v. 16, n. 8, e68005, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.7759/CUREUS.68005>.

MO, S. *et al.* Single-cell transcriptome analysis reveals periodontal ligament fibroblast heterogeneity with distinct IL-1 β and RANKL expression in periodontitis. **Molecules and Cells**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 100059, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.MOCELL.2024.100059>.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 63–71, 1975. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1149250/>.

NETANELY, Y. *et al.* Epithelial RANKL limits experimental periodontitis via Langerhans cells. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 103, n. 12, p. 1281, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/00220345241274370>.

NIZET, A. *et al.* Bone alkaline phosphatase: An important biomarker in chronic kidney disease - mineral and bone disorder. **Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry**, [s. l.], v. 501, p. 198–206, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2019.11.012>.

OLIVEIRA, Sandra Helena Penha *et al.* Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease. **Frontiers in pharmacology**, [s. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31333451/>.

OMI, Maiko; MISHINA, Yuji. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. **Genesis (New York, N.Y.: 2000)**, [s. l.], v. 60, n. 8–9, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35757898/>.

ONO, Takehito *et al.* RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond. **Inflammation and regeneration**, [s. l.], v. 40, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047573/>.

PAVANELLI, Angelica Leticia Reis *et al.* Pharmacological Therapies for the Management of Inflammatory Bone Resorption in Periodontal Disease: A Review of Preclinical Studies. **BioMed research international**, [s. l.], v. 2022, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35547360/>.

PEREIRA, Suiane S.C. *et al.* An alternative, easy and reproducible method of stabilization and ligature-induced periodontitis in mouse. **MethodsX**, [s. l.], v. 6, p. 2156–2165, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31667115/>.

PLACE, D. E. *et al.* Osteoclast fusion and bone loss are restricted by interferon inducible guanylate binding proteins. **Nature Communications**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41467-020-20807-8>.

PONZANO, M. *et al.* The use of alkaline phosphatase as a bone turnover marker after spinal cord injury: A scoping review of human and animal studies. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 167, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10790268.2021.1977905>.

RIBEIRO, Apoena Aguiar *et al.* Oral biofilm dysbiosis during experimental periodontitis. **Molecular oral microbiology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 256–265, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36189827/>.

RICHARDS, Derek *et al.* Review finds that severe periodontitis affects 11% of the world population. **Evidence-based dentistry**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 70–71, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25343387/>.

ROJAS, Carolina *et al.* Humanized Mouse Models for the Study of Periodontitis: An Opportunity to Elucidate Unresolved Aspects of Its Immunopathogenesis and Analyze New Immunotherapeutic Strategies. **Frontiers in immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34220811/>.

ROLDÁN, Andrés López; GIMÉNEZ, José Luis García; ILLUECA, Francisco Alpiste. Impact of periodontal treatment on the RANKL/OPG ratio in crevicular fluid. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. e0227757, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6984681/>.

SADEK, Khadiga M. *et al.* Molecular Basis beyond Interrelated Bone Resorption/Regeneration in Periodontal Diseases: A Concise Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 5, p. 4599, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10003253/>.

SAFIEH-GARABEDIAN, Bared *et al.* Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. **British journal of pharmacology**, [s. l.], v. 115, n. 7, p. 1265–1275, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7582555/>.

SALHOTRA, Ankit *et al.* Mechanisms of bone development and repair. *Nature reviews. Molecular cell biology*, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 696–711, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32901139/>.

TAVARES, Samia Jessica Silva *et al.* Umbelliferone reduces inflammation and ligature-induced osteoclastic alveolar bone resorption in mice. **Journal of periodontal research**, [s. l.], v. 59, n. 5, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38742802/>.

TOMINA, Darius C. *et al.* Comparative Testing of Two Ligature-Induced Periodontitis Models in Rats: A Clinical, Histological and Biochemical Study. **Biology**, [s. l.], v. 11, n. 5, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35625362/>.

USATEGUI-MARTÍN, R.; PÉREZ-CASTRILLÓN, J. L. Animal experimental models in bone metabolic disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 9534, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS24119534>.

WANG, R. P. H. *et al.* IL-1 β and TNF- α play an important role in modulating the risk of periodontitis and Alzheimer's disease. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 71, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12974-023-02747-4>.

WANG, Yawei *et al.* Curcumin Attenuates Periodontal Injury via Inhibiting Ferroptosis of Ligature-Induced Periodontitis in Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 9835, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10298010/>.

WEIVODA, Megan M.; BRADLEY, Elizabeth W. Macrophages and Bone Remodeling. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, [s. l.], v. 38, n. 3, p. 359–369, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36651575/>.

WICHIENTRAT, Warintorn *et al.* Alveolar Bone Loss in a Ligature-Induced Periodontitis Model in Rat Using Different Ligature Sizes. **European journal of dentistry**, [s. l.], v. 18, n. 3, 2024. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38442914/>.

WU, Zebin *et al.* Regulation of bone homeostasis: signaling pathways and therapeutic targets. **MedComm**, [s. l.], v. 5, n. 8, 2024. Disponível em: [/pmc/articles/PMC11266958/](https://pmc/articles/PMC11266958/).

YAHARA, Yasuhito *et al.* The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. **Development (Cambridge)**, [s. l.], v. 149, n. 8, 2022.

YOON, H. et al. Temporal changes of periodontal tissue pathology in a periodontitis animal model. **Journal of Periodontal & Implant Science**, [s. l.], v. 53, n. 4, p. 248, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5051/JPIS.2203420171>.

ZHANG, Xuyang *et al.* A modified method for constructing experimental rat periodontitis model. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, [s. l.], v. 10, p. 1098015, 2022. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36714614>.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO CEUA SOB O PROTOCOLO 06/23



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **"Avaliação dos níveis de reabsorção óssea em periodontite induzida por ligadura com fios de seda e algodão em camundongos"**, registrado como **Protocolo CEUA UFC Sobral nº 06/23**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Iracema Matos de Melo**, envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino). O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado *ad referendum* pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Campus da UFC em Sobral, em cumprimento à deliberação registrada na sexta reunião ordinária de 03/10/2023.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/02/2024 até 31/01/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	196 (cento e noventa e seis)
Peso/Idade	25 g / 2 meses
Sexo	Fêmeas (♀)
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 29 de novembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
IGOR LUCO CASTRO DA SILVA
Data: 28/11/2023 07:17:11-4300
Verifique em <https://validar.dl.gov.br>

Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA