



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
DOUTORADO EM FARMACOLOGIA

KÁTIA DO NASCIMENTO GOMES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DOXICICLINA ASSOCIADA OU NÃO À
DEXAMETASONA NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

FORTALEZA
2015

KÁTIA DO NASCIMENTO GOMES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DOXICICLINA ASSOCIADA OU NÃO À
DEXAMETASONA NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

Tese Submetida à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutora em Farmacologia

Orientadora: Prof^a Dr^a Glauce Socorro
Barros Viana

FORTALEZA
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

G614a Gomes, Kátia do Nascimento.
Avaliação do efeito da Doxiciclina associada ou não à Dexametasona no modelo de reparo ósseo alveolar em ratos. / Kátia do Nascimento Gomes. – 2015.
95 f.: il. color.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Área de concentração: Farmacologia.
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana.

1. Alvéolo Dental. 2. Proteínas Wnt. 3. Reabsorção Óssea. I. Título.

CDD 617.632

KÁTIA DO NASCIMENTO GOMES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DOXICICLINA ASSOCIADA OU NÃO À
DEXAMETASONA NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Farmacologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Glauce Socorro Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dr^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dr Fernando André Campos Viana
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^a Dr^a Paula Góes Pinheiro Dutra
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dr^a Karuza Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

*Aos meus filhos : Isabela, Mariana e
Samuel Gomes*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Prof. Dra. Glauce Viana** por todos os conhecimentos e dedicação dispensados ao nosso trabalho. Minha eterna gratidão por sua compreensão diante das dificuldades que enfrentei ao longo desses anos de pesquisa.

À **Prof. Dra. Paula Góes** do Departamento de Patologia e Medicina Legal por todo o esforço e dedicação nas principais etapas deste trabalho, além da motivação nos momentos de maior dificuldade.

À **Prof. Dra. Ana Paula Negreiros** pela importante colaboração nas avaliações histopatológicas e pela cessão do laboratório muito importante para conclusão da pesquisa.

À **Prof. Dra. Gerly Anne** pela disponibilidade do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem (NEMPI).

À **Prof. Dra. Geanne Matos** e à todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia por toda contribuição em minha formação acadêmica.

Ao **Prof. Paulo Goberlânio**, um pesquisador nato que dispensou seus importantes conhecimentos e que tenho muita estima e gratidão.

À **Dra. Gabriela Mariângela** do Biotério Setorial da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

A doutoranda maravilhosa e doce, **Josyane Martins** do NEMPI, por toda colaboração na realização da imunohistoquímica.

Aos colegas do laboratório de Neurofarmacologia e do NEMPI.

RESUMO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DOXICICLINA ASSOCIADA OU NÃO À DEXAMETASONA NO MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS. O modelo de reparo ósseo alveolar através de exérese dentária em ratos permite que parâmetros locais e sistêmicos possam ser estudados longitudinalmente possibilitando o conhecimento da fisiopatogênese no processo de reabsorção óssea inflamatória. O objetivo da pesquisa foi investigar o efeito de doxiciclina associada ou não à dexametasona sobre os eventos que sucedem o processo de remodelamento ósseo em modelo de reparo ósseo alveolar em ratos. Os animais (190-200 g) foram tratados diariamente (v.o.) com solução salina Controle (CTL), doxiciclina (DOX 10mg/kg e 25 mg/kg), Dexametasona (DEXA 1 mg/kg)(i.p.) e sacrificados de acordo com grupo experimental (7, 14 e 21 dias) para remoção de suas maxilas utilizadas na análise qualitativa de parâmetros microestruturais, histomorfometria e imunohistoquímica para Wnt 10b e Dkk-1. Foi observado que DOX (10 e 25 mg/kg) melhoram alguns parâmetros como: aumento do número de osteoblastos, redução no número de osteoblastos e % de tecido ósseo comparados ao grupo CTL. Os resultados também mostraram um aumento na expressão de WNT 10b e redução de Dkk-1 durante o processo de reparo ósseo nos animais que receberam DOX (10 e 25 mg/kg) quando comparados aos grupos CTL. Esses achados sugerem que DOX oferece um efeitos osteoindutor e osteoprotetor do tecido ósseo durante o processo de remodelamento ósseo alveolar. É possível que além dos efeitos antiinflamatórios reconhecidos em DOX, essa Tetraciclina pode influenciar a expressão de WNT 10b, favorecendo a neoformação óssea ou modular a expressão de Dkk-1, inibindo a reabsorção tecidual nos alvéolo dos animais.

Palavras chave: Alvéolo dental; reabsorção óssea; Doxiciclina; Proteínas Wnts.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF EFFECT OF DOXYCYCLINE ASSOCIATED OR NOT WITH DEXAMETHASONE ON ALVEOLAR BONE REPAIR MODEL IN RATS. The alveolar bone repair model, through dental excision in rats, allows the longitudinal study of local and systemic parameters. This allows learning the pathophysiology in inflammatory bone remodeling process. The objective of the research was to investigate the effect of doxycycline associated or not with dexamethasone on the events that follow the bone reabsorption process in alveolar bone repair in rats. The animals (190-200 g) were treated daily (*per os*) with saline solution Control (SSC), doxycycline (DOX 10 and 25 mg/kg), Dexamethasone (DEXA 1 mg/kg) (IP), and sacrificed according to experimental group (7, 14 and 21 days) to remove their jaws, which were used in the qualitative analysis of microstructural parameters, histomorphometry, and immunohistochemistry for Wnt10b and Dkk-1. It was observed that DOX (10 and 25 mg / kg) improve some parameters such as the number of osteoblasts increase, reduction in the number of osteoblasts and % increase in bone tissue compared to the CTL group. The results also showed an increase in the expression of Wnt 10b, and Dkk-1 reduction, during the process of bone repair in animals that received DOX (10 and 25 mg/kg), compared to groups CTL. These findings suggest that DOX offers osteoinductive and osteoprotector effects on bone tissue during the alveolar bone remodeling process. It is possible that, in addition to anti-inflammatory effects recognized in DOX, this Tetracycline can influence the expression of Wnt 10b, favoring bone neoformation, and modulate the expression of Dkk-1, inhibiting tissue resorption in the alveolus of the animals.

Key words: dental alveolus; bone resorption; Doxycycline; Wnts Proteins.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 TECIDO ÓSSEO.....	18
1.1.1 Reabsorção óssea inflamatória.....	21
1.1.2 Cicatrização óssea alveolar	22
1.2 WNT E O METABOLISMO ÓSSEO.....	25
1.3 MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR.....	28
1.4 DOXICICLINA.....	30
1.5 PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDES.....	32
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	33
3.OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 ANIMAIS.....	36
4.2 EXTRAÇÃO DENTAL.....	39
4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	39
4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA.....	39
4.4.1 Análise histológica descritiva (Hematoxilina/ Eosina).....	39
4.4.2 Análise histomorfométrica.....	41
4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE WNT 10b E DKK-1.....	42
4.5.1 Análise imunohistoquímica.....	43
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	45
5.1.1 Análise qualitativa descritiva.....	45
<i>5.1.1.1 Grupo Controle.....</i>	<i>45</i>
<i>5.1.1.2 Grupo Doxíciclina (DOX).....</i>	<i>49</i>
<i>5.1.1.3 Grupo Dexametasona (DEXA).....</i>	<i>52</i>
5.1.2 Análise quantitativa.....	56
<i>5.1.2.1 Infiltrado inflamatório polimorfonuclear.....</i>	<i>56</i>

5.1.2.2 <i>Infiltrado inflamatório mononuclear</i>	58
5.1.2.3 <i>Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar</i>	60
5.1.2.4 <i>Análise imuno-histoquímica para Wnt 10b e Dkk-1</i>	67
6. DISCUSSÃO	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
8. CONCLUSÃO	82
REFERENCIAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação esquemática da via de sinalização Wnt/beta catenina	27
Figura 02	Estrutura química da doxiclina	30
Figura 03	Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD com caracterização dos períodos experimentais para avaliação do reparo ósseo alveolar (HE).	47
Figura 04	Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos tratados com DOX (10 e 25 mg/kg) avaliados aos 7 dias após a cirurgia (HE).	50
Figura 05	Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos tratados com DOX (10 e 25 mg/kg) avaliados aos 14 dias após a cirurgia (HE).	51
Figura 06	Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos CTL, DEXA (1mg/kg), DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 dias após a cirurgia (HE).	54
Figura 07	Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos CTL, DEXA (1mg/kg), DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia (HE).	55
Figura 08	Análise comparativa entre os grupos experimentais do número de osteoblastos presentes nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias.	60

Figura 09	Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 e 14 dias após a cirurgia (HE).	61
Figura 10	Análise comparativa entre os grupos experimentais do número de osteoclastos presentes nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias	63
Figura 11	Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoclastos entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 e 14 dias após a cirurgia (HE).	64
Figura 12	Análise comparativa entre os grupos experimentais do percentual de tecido ósseo nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias	66
Figura 13	Número de células Wnt 10b positivas quantificadas nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias nos grupos CTL, DOX 10, DOX 25 e as associações DOX 10 + DEXA e DOX 25 + DEXA.	68
Figura 14	Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam positividade de marcação para Wnt10b entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 dias após a cirurgia .	69
Figura 15	Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam positividade de marcação para Wnt10b entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia.	69

- Figura 16 Número de células DKK-1 positivas quantificadas nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias nos grupos CTL, DOX 10, DOX 25 e as associações DOX 10 + DEXA e DOX 25 + DEXA. 71
- Figura 17 Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam positividade de marcação para Dkk-1 entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 dias após a cirurgia . 72
- Figura 18 Fotomicrografia da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam positividade de marcação para Dkk-1 entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contigência do número de animais de cada grupo experimental de acordo com período em que foi realizada a análise histológica e imunohistoquímica.	38
Tabela 2	Análise histopatológica da intensidade de infiltrado inflamatório polimorfonuclear nos alvéolos 7 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado	57
Tabela 3	Análise histopatológica da intensidade de infiltrado inflamatório polimorfonuclear nos alvéolos 14 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado	57
Tabela 4	Análise histopatológica da intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear nos alvéolos 7 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado	59
Tabela 5	Análise histopatológica da intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear nos alvéolos 14 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado	59

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido Etileno Diamino Tetracético	EDTA
Ácido Ribonucléico	RNA
Análise de variância	ANOVA
Artrite Reumatóide	AR
Cálcio / calmodulina - dependente proteína quinase II	CaMKII
Cloridrato de Doxiciclina	DOX
Comissão de Ética no Uso de Animais	CEUA
Controle	CTL
Cromógeno 3,3'diaminobenzidine-Peróxido	DAB
Dexametasona	DEXA
Dickkopfs	DKK
Dishevelled	DVL
Erro Padrão da Média	EPM
Esclerostina	Sost
Fator de crescimento derivado de plaquetas	PDGF
Fator de crescimento Insulínico	IGF
Fator de Necrose Tumoral alfa	TNF- α
Fator de transcrição nuclear kappa B	NF- κ B
Fator de transcrição RUNX2	RUNX2
Fator do crescimento fibroblástico	FGF
Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos	FSC-GM

Fator estimulante de colônias de macrófagos	M-CSF
Fator Nuclear de células T ativadas	NFAT
Fator transformador de crescimento beta	TGF- β
Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato	TRAP
Fosfatase Alcalina	FA
Frizzled	FZD
Guanosina monofosfato cíclico	cGMP
Hematoxilina/ Eosina	HE
Horas	Hs
Interleucina	IL
Kilograma	Kg
Ligante do Receptor do Fator Nuclear Kappa beta	RANKL
Metaloproteinase da matriz	MMP
Micrômetro	Mm
Miligrama	Mg
Milímetros	Mm
Molar	M
Molar Superior Direito	MSD
Molar Superior Esquerdo	MSE
Osteocalcina	OCN
Osteonectina	OSN
Osteopontina	OSP

Osteoprotegerina	OPG
Paratormônio	PTH
Polaridade Celular Planar	PCP
Proteína Morfogenética Óssea	BMP
Proteína quinase psC	PKC
Proteína Relacionada ao Receptor de Baixa Densidade 5/6	LRP5/6
Quinase Glicogênio Sintase 3 β	GSK3 β
Receptor do Fator Nuclear Kappa beta	RANK
Retículo Endoplasmático Rugoso	RER
Sialoproteína óssea	BSP
Solução Tamponada de Fosfato	PBS
Tetraciclinas	TCs
Unidades multicelulares básicas	BMUs
Via intraperitoneal	i.p.
Via oral	v.o.
Wint	WNT

1. INTRODUÇÃO

1.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido multifuncional, metabolicamente ativo, que provém suporte e proteção aos órgãos vitais e participa da locomoção. Possui importante função homeostática e metabólica por ser um reservatório mineral de cálcio, fosfato e outros íons possibilitando uma constância na concentração desses íons nos fluidos corporais (HADJIDAKIS & ANDROULAKIS., 2006; FENG & MCDONALD., 2011). É formado por tecido conjuntivo mineralizado altamente complexo, caracterizado por processos de remodelação constante os quais envolve ciclos de reabsorção e formação óssea. As principais células que participam dessa dinâmica de processos de formação e reabsorção são: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (ANDIA, CERRI e SPOLIDORIO., 2006) e subpopulações de células osteogênicas como: células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos até osteócitos maduros (BONEWALD, 2011).

Entre as populações de células que participam do processo de remodelação, o osteoblasto, derivado de células mesenquimais indiferenciadas, é a principal célula envolvida na neoformação óssea. Histologicamente apresentam-se como células mononucleadas, polarizadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo, organizadas como uma pavimentação contínua de células cubóides (camada celular) sobre a superfície óssea que está formando matriz óssea (tecido osteóide) e sua posterior mineralização ou como células de revestimento ósseo (AGAS et al., 2013). Além das células, esta matriz orgânica é constituída de várias proteínas colágenas e não colágenas como: colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas e fosfoproteínas (MACKIE, 2003; CERRI, 2005; SODEK & MCKEE, 2000).

A osteoformação ocorre a partir da ativação de células osteoprogenitoras por fatores específicos, como a proteína morfogenética óssea (BMP), Fator Transformador de crescimento β (TGF- β) e fator de crescimento insulínico (IGF). Todavia, esse fenômeno pode ser influenciado pela via de transdução de sinal Wnt/ β -Catenina (GLASS, et al. 2005; DATTA et al. 2008; YORGAN & SCHINKE, 2014) que entre outras etapas da neoformação óssea atua na diferenciação osteogênica promovendo o aumento da expressão de genes específicos, tais como

fator de transcrição Runx-2 e Osterix, em etapas de diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em pré-osteoblastos e osteoblastos (LIU & LEE, 2012; SINHA & ZHOU, 2013).

Além da importância durante o processo de neoformação óssea, os osteoblastos são essenciais na transmissão de sinais quando o processo de remodelação é influenciado por hormônios como o da tireóide, paratireóide, estrogênios, glicocorticóides, insulina e também pela Vitamina D (RAISZ & RODAN, 1998; ANDIA, CERRI e SPOLIDORIO, 2006).

Os osteócitos constituem o tipo celular mais abundantes no osso (90-95% das células ósseas totais e com vida útil de até 25 anos) (FRANZ-ODENDAAL; HALL & WITTEN, 2006). São caracterizados por se evidenciarem ao final da fase de neoformação como osteoblastos que ficaram aprisionados na matriz óssea (BELLIDO, 2014). Os osteócitos estabelecem uma complexa rede de interconexão, por meio de prolongamentos citoplasmáticos, com os osteoblastos e células de revestimento ósseo durante o processo de remodelamento tecidual. Este tipo celular permite a comunicação frente às algumas alterações sistêmicas, além de responder às modificações na superfície óssea responsáveis pela manutenção da matriz e vitalidade das células ósseas (AMADEI et al., 2006; DATTA et al., 2008; BELLIDO, 2014).

Osteócitos são pobres metabolicamente e exibem menor quantidades de organelas de síntese e de secreção como o retículo endoplasmático rugoso (RER) e o complexo de Golgi. Estas células possuem um formato elíptico e são menores que os osteoblastos, mas apresentam diversos prolongamentos citoplasmáticos situados no interior de pequenos canais denominados canalículos ósseos. Estes processos citoplasmáticos estão ligados à outros processos de osteócitos vizinhos, à osteoblastos e células de revestimento ósseo, facilitando o transporte intercelular de pequenas moléculas de sinalização, como prostaglandinas (PGs) e óxido nítrico (NO) (KATCHBURIAN & CERRI, 2002). Os osteócitos estão correlacionadas especialmente ao fenômeno de mecanotransdução, onde são identificadas sinais de tensão sobre o tecido ósseo e subsequente tradução em resposta biológica de remodelamento ósseo (ROBINSON et al, 2006).

Ao osteócito era atribuída uma função meramente passiva ao serem aprisionadas em lacunas resultando em funções bem limitadas. Entretanto, os osteócitos exercem uma importante função ao detectar e responder à estímulos

mecânicos (tensão e estresse) e hormonais, além de coordenar a função de osteoblastos e osteoclastos por meio da expressão de fatores reguladores que interferem na manutenção da integridade óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2014; BELLIDO, 2014; BONEWALD, 2011). Esse controle é particularmente possível, porque osteócitos maduros aprisionados na matriz óssea podem secretar esclerostina, um produto do Gene SOST (BONEWALD, 2011) e proteína Dickkopf (DKK) na fase reabsortiva do processo de remodelamento ósseo (NARDONE; D'ASTA, BRANDI, 2014). Esses produtos são inibidores da osteoblastogênese, pois antagonizam a via sinalização canônica de Wnt/ β catenina que exerce um papel importante na diferenciação em osteoblastos a partir de células mesenquimais indiferenciadas (DALLAS & BONEWALD, 2010).

O osteoclasto, célula responsável pela reabsorção óssea, é derivado de células progenitoras hematopoiéticas de linhagem monocítica-macrofágica (AESCHLIMANN & EVANS, 2004; ANDIA, CERRI e SPOLIDORIO, 2006). Durante o processo de reabsorção, estas células entram em atividade e apresentam-se como células gigantes, multinucleadas, formadas pela fusão de células mononucleadas da linhagem hematopoiética. Osteoclastos produzem enzimas como: Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), adenosina ácida trifosfatada, isosima anidrase carbônica II, entre outras. Além de degradar e desmineralizar a matriz óssea, há uma função sendo evidenciada por outros estudos mostrando que os osteoclastos podem internalizar osteoblastos e/ou osteócitos que estejam em processo de apoptose (CERRI, BOABAID, KATCHBURIAN, 2003; CERRI, 2005). A ativação, diferenciação e maturação dos osteoclastos ocorre por meio da expressão de citocinas e fatores de crescimento incluindo a IL-1, IL3, IL 6, TNF- α , fator estimulante de colônias granulocítica-macrofágica (GM-CSF) e fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (TSUTSUMIMOTO et al., 1999; SHALHOUB et al, 2000; TAKAYANAGI, 2009).

Além do componente celular, o tecido ósseo possui uma estrutura de matriz óssea composta por duas fases: uma mineral ou inorgânica de hidroxiapatita (cálcio e fosfato) e outra orgânica formada principalmente por colágeno do tipo I, além de proteínas e glicoproteínas que atuam no processo de iniciação da mineralização e na ligação da fase mineral à matriz durante o processo de remodelamento ósseo. A associação entre a fase mineral e as fibrilas de colágeno é

responsável pela dureza e resistência características deste tipo de tecido (CARNEIRO & JUNQUEIRA, 2008).

1.1.1 Reabsorção óssea inflamatória

A remodelação óssea é um processo no qual a integridade estrutural e a eficiência biomecânica do esqueleto é mantida após o grau de maturidade estrutural. Macroscopicamente o esqueleto parece ser um tecido inerte, mas sob ponto de vista microscópico, este tecido apresenta-se de forma altamente dinâmica, mantendo suas propriedades biomecânicas através de contínuo processo de remodelação (AMADEI et al. 2006; LELLO; GUARDIANELLI e MOSCA, 2012).

Unidades multicelulares básicas (BMUs) são estruturas anatômicas temporárias constituída por um conjunto de células osteogênicas (formadoras), osteoclastos (reabsortivas), osteócitos e linhagem de células osteoprogenitoras que viabilizam o processo de remodelação óssea. As BMUs integram informações sob a forma de sinais neuronais e hormonais através dos nervos e vasos sanguíneos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015). Os mecanismos de sinalização sistêmicos incluem o sistema nervoso simpático, os hormônios sexuais (especialmente os estrógenos e andrógenos) (FALONI et al, 2012), corticosteróides (JENSEN, et al., 2012), hormônios da tireóide (incluindo tiroxina e calcitonina), hormônio da paratireóide (PTH), vitamina D (CARVALHO et al., 2002). Além desses sinalizadores, outras moléculas reguladoras importantes adicionais dentro das BMUs incluem as proteases, inibidores de proteases, proteínas de ligação e moléculas da matriz extracelular como glicoaaminoglicanos, glicoproteínas e várias moléculas específica do osso como a osteopontina e osteocalcina (SOUZA et al., 2013).

O ciclo de remodelamento envolve uma grande variedade de componentes e mecanismos imunológicos, atribuindo uma nova perspectiva do papel das citocinas inflamatórias na modulação do tipo e intensidade de fatores osteoclastogênicos (reabsorção) ou osteoblastogênicos (neoformação) (MILLS & SIMPSON, 2012; PIETSCHMANN et al. 2015).

Durante o reparo tecidual, em resposta às citocinas inflamatórias, ocorre a diferenciação osteoclástica controlada principalmente pelo M-CSF e pela expressão de um ligante nos osteoblastos e nas células T, chamado de ligante de receptor ativador NF κ - β (RANKL). RANKL se liga ao RANK, que por sua vez, está expresso

na membrana dos osteoclastos e seus precursores (BOYLE et al., 2003), promovendo diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos ativos (BAR-SHAVIT, 2007).

Osteoblastos também secretam uma outra proteína importante na modulação da reabsorção óssea, a osteoprotegerina (OPG). Esta proteína é um receptor solúvel, da família do receptor TNF α , que age inibindo a ligação de RANKL a RANK, e portanto reduzindo a reabsorção óssea (BOYLE et al., 2003; COCHRAN 2008; HARDY, COPPER 2009).

A descoberta do eixo do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK)/seu ligante (RANKL)/osteoprotegerina (OPG) (RANK-RANKL-OPG) permitiu a melhor compreensão da homeostasia óssea e interrelação entre metabolismo ósseo e imunologia (HARDY, COOPER, 2009). Assim, nesse contexto, dependendo do grau de lesão de injúria tecidual ou de algumas condições sistêmicas como as periodontites, artrites reumatóides doenças osteoporóticas primárias ou secundárias e tumores ósseos, pode haver um desequilíbrio nessa homeostase, favorecendo à perdas ósseas ou atraso em seu reparo (TAKAYANAGI, 2005; URUSHIBARA et al., 2004; MARTINS et al., 2009; ZUPAN et al., 2013).

1.1.2 Cicatrização óssea alveolar

O osso alveolar é constantemente desafiado à desenvolver processos de remodelação em resposta às forças aplicadas ao dentes bem como ao ambiente bucal microbiano em que está inserido. Após exodontias ou avulsão dentária ocorrem alterações (celulares e estruturais) que são peculiares ao processo de remodelamento e cicatrização do osso alveolar em resposta ao trauma ocasionado pela remoção do elemento dentário, repercutindo em modificações dimensionais tanto em espessura quanto em altura do processo alveolar (JAHANGIRI et al., 1998, VIEIRA et al, 2015).

Imediatamente após a perda dentária, inicia-se o processo de cicatrização do alvéolo dentário. Morfologicamente são consideradas quatro estágios da evolução do processo de reparo alveolar: proliferação celular, desenvolvimento do tecido conjuntivo, maturação do tecido conjuntivo e diferenciação óssea ou mineralização (DE CARVALHO & OKAMOTO, 1985).

Em condições homeostáticas, o reparo inicia-se com a deposição de coágulo sanguíneo, incluindo plaquetas e seus fatores de crescimento e com o estabelecimento de infiltrado inflamatório transitório. Diversos mecanismos participam numa sequência de fases (proliferativa de células ósseas e formativa de tecido ósseo) em resposta aos fatores metabólicos e plasmáticos até a completa formação de um trabeculado ósseo maduro (KANCZLER, et al. 2008; VIEIRA et al, 2015).

As plaquetas, que se estabelecem no coágulo neoformado, liberam o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Tal fator é quimiotático para macrófagos e fibroblastos que aumentam a expressão do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e fator do crescimento fibroblástico (FGF). Todos esses fatores exercem funções importantes sobre angiogênese, ativação de osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos e células endoteliais (ABREU et al, 2013).

Nas fases iniciais de cicatrização do alvéolo, os fibroblastos oriundos do ligamento periodontal e das células mesenquimais iniciam o processo de proliferação e há intensa produção de colágeno e substância fundamental amorfa constituindo um tecido conjuntivo imaturo às custas especialmente de fibras colágenas tipo I. À medida que ocorre um aumento das fibras colágenas, há uma redução na população celular e de vasos sanguíneos, concorrendo para o processo de remodelação do tecido conjuntivo. Concomitantemente, há um aumento gradativo de células osteoblásticas e tecido osteóide, completa-se o processo de remodelamento do osso alveolar (DEVLIN et al., 1997)

Durante a fase de neoformação óssea, fatores de crescimento como: BMPs e TGF- β 1 aumentam a transcrição nuclear de reguladores da síntese de osteoblasto (Runx2 e Osterix), favorecendo a diferenciação de células mesenquimais em pré-osteoblastos e depois osteoblasto maduro. Nessa etapa, há intensa atividade da fosfatase alcalina (FA) e produção de colágeno Tipo I. Essa fase tem por finalidade sintetizar matriz orgânica (tecido osteóide), estimular sua remineralização, regular a ativação e diferenciação dos osteoclastos (ERIKSEN, 2010; LELLO; GUARDIANELLI e MOSCA, 2012).

Em tempo, outras proteínas são secretadas durante o processo de remodelação como: osteocalcina (OCN), osteopontina (OSP), osteonectina (OSN), Sialoproteína óssea (BSP). Todas estão envolvidas em fases precoces e tardias do reparo ao longo dos eventos que constituem o processo de diferenciação de células

mesequimais em células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos iniciais e tardios e finalmente osteócitos (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Esse processo de cicatrização óssea é acompanhada pela formação de tecido conjuntivo e por conseguinte, remodelamento tecidual determinado pela modulação dos osteoblastos e osteoclastos coordenada pelo eixo RANK-RANKL-OPG (TEITELBAUM, 2000; TEITELBAUM, 2004; HARDY & COOPER, 2009).

Durante o processo inflamatório que se desenvolve nas fases de remodelamento alveolar, linfócitos T e osteoblastos expressam RANKL que irá induzir a diferenciação de células precursoras de osteoclastos (DONAHUE et al. 1995 in: FLORENCIO-SILVA et al, 2015). Os efeitos biológicos do RANK-L são produzidos quando ele se liga ao RANK na superfície dos pré-osteoclastos, resultando na fusão, diferenciação, ativação e sobrevivência de osteoclastos (ANDRADE et al., 2008, LI et al., 2000; TEITELBAUM, 2000; TEITELBAUM, 2004).

A interação RANK/RANKL estimula a expressão de outros fatores que regulam a atividade osteoclástica como genes de transcrição para TRAP (Fosfatase ácida Tartarato Resistente), catepsina K e metaloproteinases (MMPs) que irão degradar a matriz que compõe o tecido ósseo levando a reabsorção (COXON & TAYLOR, 2008).

Contrariamente à esse evento, os osteoblastos produzem osteoprotegerina (OPG) , um membro da família dos receptores de TNF e que tem como principal função, prevenir a diferenciação osteoclástica devido sua alta afinidade à RANKL nos osteoblastos. OPG bloqueia a interação RANK/RANK-L, inibindo o estágio terminal de diferenciação osteoclástica e, assim resultando na diminuição da reabsorção óssea (BAUD'HUIN et al., 2007).

Adicionalmente, estudos mostram que OPG pode estimular a apoptose de osteoclastos e inibir sua capacidade de reabsorção óssea. Mas a super expressão ou administração desta proteína em camundongos, gera um desequilíbrio no *turnover* ósseo, resultando em um fenômeno osteopetrótico, caracterizado por uma deficiência da atividade dos osteoclastos na reabsorção óssea (KHOSLA, 2001).

A expressão de RANK-L e OPG pode ser modulada por vários hormônios (glicocorticóides, vitamina D, estrógeno), citocinas, TNF- α , interleucinas 1, 4, 6, 11 e 17 entre outros fatores transcripcionais mesenquimais (HOFBAUER & HEUFELDER, 2001, MARUOTTI et al., 2012).

Além da linhagem de osteoblastos e osteoclastos, o ciclo de remodelamento ósseo é completado por ações coordenadas pela célula mais abundante do tecido ósseo, o osteócito. Tem sido postulado que o osteócito tem a capacidade de detectar e responder à estímulos mecânicos e hormonais regulando a atividade de osteoblastos e osteoclastos. Osteócitos expressam Esclerostina (Sost) e Dickkopfs (DKK-1), importantes reguladores negativos da atividade de osteoblastos. Osteócitos também participam do recrutamento de osteoclastos na fase inicial de remodelamento, podendo indiretamente estimular a osteoclastogênese ao induzir as células osteoblásticas a secretarem RANKL ou ainda, produzir e potencializar a secreção de RANKL (BELLIDO, 2014).

1.2 WNT E O METABOLISMO ÓSSEO

As proteínas Wnts compreendem uma grande família de moléculas sinalizadoras que orquestram e influenciam uma infinidade de processos biológicos (WILLERT & NUSSE, 2012) constituindo uma família de glicoproteínas secretadas e lipidiomodificadas nas células mesenquimais osteoprogenitoras (RUDNICKI & WILLIAMS, 2015) e que tem o nome derivado da abreviação dos genes homólogo à via Wingless de *Drosófila* e o gene *int-1* de camundongo. Tais proteínas desempenham papéis críticos no desenvolvimento embrionário, na carcinogênese e metabolismo ósseo (osteoblastogênese e formação óssea) (TAN et al., 2014). São conhecidos 19 genes codificadores de Wnts em humanos que são proteínas ricas em cisteína com aproximadamente 350-400 aminoácidos

Os mecanismos de sinalização de Wnt são divididos nas seguintes vias: a) via não-canônica subdividida em: via de polaridade celular planar (PCP) que exerce função importante na embriogênese e a via de Wnt/cálcio (Wnt/Ca) que regula a concentração de cálcio nas células ósseas e b) via canônica (Wnt/ β -catenina) (LI; CHONG e MAIESE, 2005; WANG et al., 2014).

A via canônica WNT/ β -catenina é mais conhecida e extensivamente estudada. Está relacionada ao processo de diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e sua não diferenciação em adipócitos por meio da regulação intracelular de β -catenina. Nesta via de sinalização, Wnts ligam-se ao domínio extracelular do receptor transmembrana FZD (*Frizzled*) e ao co-receptor LRP5/6 (proteína relacionada ao receptor de baixa densidade 5/6) para promover a

estabilização de β -catenina. Uma vez ativado, FZD interage diretamente por meio de seu domínio citoplasmático com a proteína DVL (*Dishevelled*), ativando-a e recrutando-a para membrana celular. DVL, uma vez acoplada à FZD e a LRP 5/6 promove fosforilação de LRP5/6 e conseqüentemente, há o recrutamento e inibição da quinase glicogênio sintase 3β (GSK3 β) favorecendo a estabilização e translocação nuclear da β -catenina. A β -catenina estabilizada, acumula-se no núcleo e ativa diversos fatores de transcrição que promovem diferenciação de osteoblastos e conseqüente aumento da produção de OPG (KUBOTA, MICHIGAMI, OZONO, 2009).

Na ausência de WNT, β -catenina forma um complexo quaternário com Axina, GSK3 β e APC, levando a um processo de ubiquitinação e posterior degradação proteossômica (NUSSE, 2015). A regulação extracelular desta via é feita por antagonistas do co-receptor LRP5/6 como Dickkopfs (DKKs) e Esclerostina (Sost) ou antagonistas que interferem na ligação de WNT ao receptor FZD denominadas de proteínas secretadas relacionadas ao receptor de WNT (Sfrps) (CADIGAN & LIU, 2006).

A via Wnt/ β -catenina está envolvida em vários estágios de diferenciação dos osteoblastos por aumento na transcrição de Runx-2 e Osterix (HILL et al., 2005) e no incremento da massa óssea, incluindo aumento na replicação de pré-osteoblastos e indução da osteoblastogênese (KATO et al, 2002), inibição de processos apoptóticos de osteoblastos e osteócitos (BODINE, et al, 2004; BODINE, 2008).

A deficiência de β -catenina inibe a osteoblastogênese, causando conseqüentemente uma redução na produção de OPG (GLASS, et al, 2005), promovendo um desequilíbrio do eixo RANK-RANKL-OPG a favor de RANK. Os principais inibidores da via canônica são induzidos por ação de mediadores inflamatórios como TNF- α (KUBOTA, MICHIGAMI, OZONO, 2009).

Além de atuar de forma efetiva na diferenciação osteoblástica, a via Wnt/ β -catenina possui um papel importante na viabilidade (apoptose) e função dos osteócitos, permitindo a comunicação entre constituintes celulares do tecido ósseo, através do estímulo da função e expressão de junções *gap* e de conexinas entre os osteócitos em resposta aos estímulos mecânicos no tecido ósseo (BODINE, 2008; BONEWALD, 2011; BUO & STAINS, 2014). Outros estudos relatam a importância da via Wnt/ β -catenina na regulação da atividade dos osteócitos sobre a expressão de

OPG e portanto na modulação da atividade osteoclastogênica e homeostase óssea (KRAMER et al, 2010).

A inibição ou degradação da β -catenina, em células do tecido ósseo, produz severa osteopenia com aumento de osteoclastos e redução da osteoblastogênese (ALBERS et al., 2013). Osteoblastos produzidos na ausência de β -catenina exibem expressão elevada de RANKL e redução da produção de OPG (CORRADO et al., 2013), mostrando que a β -catenina em osteoblastos maduros regula produção e função dos osteoclastos (HOLMEN et al., 2005). Portanto a via canônica da sinalização WNT/ β -catenina parece estar ligada ao eixo RANK-RANKL-OPG na regulação da homeostasia óssea (SHIN et al., 2005).

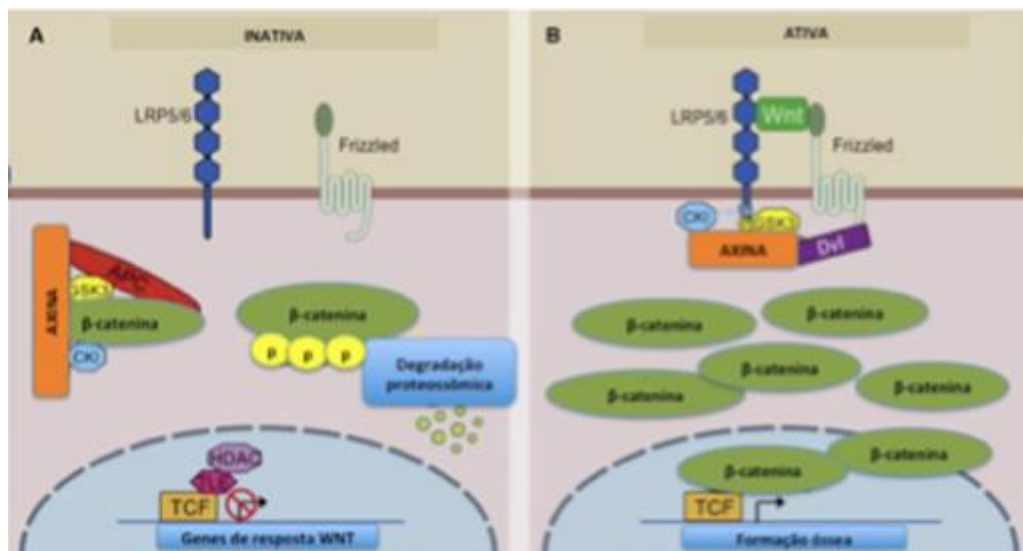


Figura 01: Representação esquemática da via de sinalização Wnt/ β -catenina (A) Na ausência de WNT, a forma citoplasmática de β -catenina forma um complexo com AXINA, GSK-3, APC e CK-1 com subsequente ubiquitinação e degradação proteossômica. (B) em presença de WNT, ocorre a formação de uma complexo com receptor Frizzled e LRP 5/6. Essa ligação promove o recrutamento de DVL e posterior recrutamento e fosforilação da AXINA, levando ao acúmulo de β -catenina no núcleo e posterior ativação de genes de resposta à WNT envolvidos no processo de formação óssea (MACDONALD, TAMAI, HE, 2009)

Relatos da literatura descrevem que proteínas Wnt3a, 7b e 10b são reguladoras endógenas da formação óssea, pois sua expressão está elevada nas fases de diferenciação osteoblástica a partir de células mesenquimais indiferenciadas. A finalidade da ativação da via canônica, mediante a ligação dessas proteínas aos seus receptores, será a indução de fatores de transcrição

osteoblastogênicos importantes no processo de remodelação óssea (HU et al., 2005; LI et al., 2005; MINEAR et al., 2010). Destas, o gene WNT 10b é considerado um fator anabólico ósseo (ROSER-PAGE et al., 2014) e assim, um dos mais importantes na biologia óssea (TAN et al., 2014)

1.3 MODELO DE REPARO ÓSSEO ALVEOLAR

Frente à adversidade do trauma causado pela perda dentária, há uma reação tecidual desenvolvida para promoção do reparo ósseo alveolar. Assim, ocorrem alterações celulares inflamatórias peculiares ao processo de remodelação e reparo do osso alveolar em resposta à remoção do elemento dentário, repercutindo em modificações dimensionais tanto em espessura quanto em altura do osso alveolar remanescente (JAHANGIRI et al., 1998; VIEIRA et al., 2015).

Esses fenômenos que ocorrem nas áreas edêntulas levam à alterações do complexo dentomucoalveolar e possíveis perdas progressivas durante o processo de remodelamento do tecido ósseo, onde dependendo da extensão da área de reabsorção será definida a morfologia do defeito ósseo ou a manutenção da dimensão do alvéolo dental. É essencial a qualidade tecidual dessa área remanescente, pois será utilizada para futuras reabilitações da função mastigatória independente de qual proposta seja oferecida, seja por meio de próteses totais ou removíveis ou na colocação de implantes dentários.

O conhecimento das bases biológicas da regeneração tecidual óssea, especialmente em alvéolo dentário, quando se trata de estudos acerca de propostas preventivas da perda óssea inerente à perda dentária e de suas alterações, tornando importante o desenvolvimento e estudo farmacológico de substâncias químicas que proporcionem condições favoráveis locais e/ou sistêmicas de melhora na qualidade óssea residual.

Após exérese dentária é desencadeada uma reação tecidual local com a intenção de reparar o alvéolo por meio de preenchimento com tecido ósseo culminando com a cicatrização do defeito causado pela ausência dentária no processo alveolar. Muitos fatores podem influenciar positivamente ou negativamente o processo de cicatrização do osso. Pode-se exemplificar fatores locais como: tipo de tecido ósseo, localização e condição de ferida, fornecimento vascular, condição microbiológica e fatores sistêmicos (DEVLIN & SLOAN, 2002) incluindo citocinas,

hormônios, moléculas de adesão e fatores de crescimento que podem regular a proliferação, diferenciação, função e sobrevivência das células ósseas (MANOLAGAS, 2000). A formação e remodelação de estruturas ósseas resulta de acoplamento e subsequente deposição de matriz óssea pelos osteoblastos que equilibra a reabsorção óssea por osteoclastos ativados (LIU et al. 2009).

Há uma heterogeneidade nos modelos de estudo que abordam a análise das perdas e reparos ósseos, bem como das propostas sugeridas considerando técnicas cirúrgicas e biomateriais utilizados na preservação do rebordo ósseo alveolar após a perda dentária (FICKL et al, 2008; GRUNDER, 2011; ARAÚJO, WENNSTRÖM, LINDHE, 2006; DOTTORE, 2014).

A fim de conhecer e melhorar técnicas e propostas farmacológicas foram realizados estudos clínicos prospectivos em humanos verificando alterações dimensionais ou reparadoras teciduais ósseas na estrutura óssea após exodontias (HAMZA et al., 2010; CHAPPUIS et al., 2013; COBO-VÁZQUEZ et al., 2014). Entretanto, para verificar modificações estruturais, eventos celulares e moleculares no tecido ósseo, encontra-se na literatura vários outros estudos sendo estes experimentais. São descritos estudos em macacos (DA SILVA et al., 2012) cães (CARDAROPOLI et al., 2005; GIANE et al., 2007) bem como em camundongos (TSENG, et al., 2015).

Existem na literatura, muitos trabalhos utilizando o modelo de reparo ósseo após exodontia em ratos. SHIMIZU et al (2000) investigaram o processo de cicatrização de feridas ósseas após a extração do molar superior em ratas ovariectomizadas; AMADEI et al., (2006) estudaram a influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea; outros autores verificaram as propriedades de misturas de óleo de alta proporção Ômega- 9: Ômega -6 e baixa relação Ômega- 6: Ômega-3 após a extração molar em ratos (MELO et. al., 2014) ou ainda, desenvolveram modelos de osteonecrose (BASI et al., 2011; ERSAN et al., 2015) e de alveolite dental (GONÇALVES DE ARAÚJO et al, 2012). Foi investigado o grau de cicatrização e de remodelação alveolar após extração de incisivos e molares da mandíbula em ratas (ELSUBEIHI & HEERSCHKE, 2004) e estudos histomorfométricos acompanhado o grau de cicatrização óssea alveolar em ratos alimentados com uma dieta deficiente em boro (GORUSTOVICH et al., 2008) ou dieta rica em sacarose (BARÓ et al, 2013). Neste mesmo ano foi proposta um estudo da influência do paratormônio sobre o processo de

preenchimento ósseo no alvéolo após extração (KUROSHIMA et al., 2013). Mais recentemente foi realizado um estudo histomorfométrico do efeito da DOX e eritromicina sobre a formação óssea no alvéolo dental de ratos (SHAHABOOEI et al. 2015).

O modelo de reparo ósseo alveolar, através de exodontia em ratos permite que parâmetros locais e sistêmicos possam ser estudados longitudinalmente e viabiliza o acompanhamento da fisiopatogênese no processo de cicatrização óssea inflamatória. Assim, é possível avaliar fenômenos da biologia óssea a partir da remoção de um elemento dental em ratos e reproduzir os principais eventos (proliferação celular, desenvolvimento e remodelamento do tecido conjuntivo, diferenciação óssea e mineralização) (NICCOLI FILHO et al, 1993) inerentes ao processo de remodelamento do osso alveolar diante da ausência do apoio dentário.

1.4 DOXICICLINA

Cloridrato de doxiciclina (DOX) é a denominação científica da α -6-deoxi-5-hidroxitetraciclina monohidratada. Trata-se de uma substância química de aspecto em pó amarelo cristalino, solúvel em água e metanol, pouco solúvel em etanol, quase insolúvel em éter. A DOX apresenta alto grau de lipossolubilidade, pouca afinidade ao cálcio e bem estável no soro humano. É um antibiótico semi sintético de amplo espectro, bacteriostático e bem absorvido por via oral (MOREJON et al., 2003).

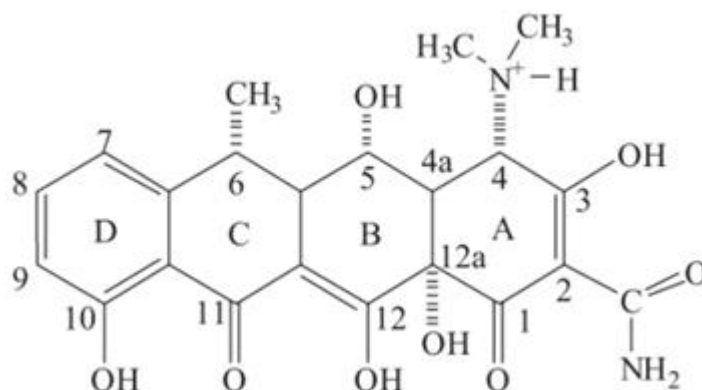


Figura 02. Estrutura química da doxiciclina (PEREIRA-MAIA et al., 2010)

O mecanismo de ação antimicrobiana de DOX ocorre pela inibição da

síntese protéica bacteriana. Entretanto, vários estudos tem demonstrado outras propriedades desse análogo das Tetraciclinas (TCs) que independem de sua atividade antibiótica, incluindo efeitos sobre o sistema imunológico, na angiogênese e na apoptose (MOREJON et al., 2003).

Nesse contexto, tem sido postulado a aplicabilidade terapêutica de DOX em diversas doenças como: Artrite reumatóide (AR) (O'DELL et al., 2006; PAYNE et al., 2015), doença periodontal (BEZERRA et al., 2002), osteoporose (PAYNE & GOLUB, 2011), metástase tumoral (LOKESHWAR et al., 2011), aneurisma de aorta abdominal (MARANDNI et al., 2013), doença inflamatória de pele como rosácea (DEL ROSSO, 2015) e inflamações sistêmicas associada à problemas cardiovasculares (RAFFETTO & KHALIL, 2008).

Entre os efeitos pleiotrópicos de DOX, provavelmente o efeito que melhor está caracterizado é a capacidade de inibição de metaloproteinases (GRIFFIN et al., 2010) através da quelação estrutural e catalítica do zinco nesta enzima (GOLUB et al., 1991). Estudos demonstram uma ação de DOX como um potente fármaco inibidor de colagenase MMP-8 (FARHAD et al, 2013) e de gelatinases como MMP-2 e MMP-9 (GU et al.,2010; ROOMI et al., 2014, KUDALKAR et al. 2015).

Outras atividades que conferem uma versatilidade às propriedades não microbianas de DOX são: inibidor de apoptose e da angiogênese, além de efeito antioxidante e antiinflamatório por meio da inibição de interleucinas e citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α e Óxido Nítrico Sintase (NOS) (KRAKAUER & BUCKLEY, 2003; BASTOS et al. 2007; SAPADIN & FLEISCHMAJER, 2006; GRIFFIN et al., 2010; GU et al., 2010, DI CAPRIO et al. 2015). Todas essas ações podem justificar sua aplicabilidade no manejo da doença periodontal, diabetes, dislipidemias e doenças cardiovasculares (AMIN et al., 1996; SOORY, 2008).

Recentemente foi proposta uma atividade positiva de DOX acentuando a neoformação óssea durante o processo de reparo de alvéolo dental em ratos submetidos à exodontia (SHAHABOOEI et al., 2015). Todavia, estudos anteriores verificaram a atividade de DOX na redução da perda óssea em modelo de periodontite experimental (BEZERRA et al., 2002; FOLWARCZNA, PYTLIK, JANIEC, 2003 ; METZGER et al. em 2008) e na movimentação ortodôntica experimental (MAVRAGANI et al., 2005).

Essa proteção da perda óssea pode estar associada à atividade da DOX sobre o número e promoção da apoptose de osteoclastos (BETTANY et al., 2000;

SANDLER et al., 2005) e seus marcadores de atividade como Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) (MAVRAGANI et al., 2005) ou na atividade supressora da osteoclastogênese induzida pelo ligante ativador do receptor do fator nuclear kappa β (RANKL) (FRANCO et al., 2011; KINUGAWA et al., 2012; SHAHABOOEI et al., 2015)

1.5 PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR GLICOCORTICÓIDES

Glicocorticóides (GCs) são frequentemente usados em uma variedade de doenças devido seus efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores (SILVERMAN & STERNBERG, 2012). Em função de sua atividade, GCs são eficazes na terapia de doenças inflamatórias (asma, dermatites, artrite reumatoide) e autoimunes, câncer e transplantes de tecidos. Clinicamente, os principais glicocorticóides que podem ser administrados sistemicamente são a hidrocortisona, prednisolona, metilprednisolona e dexametasona. (DE BOSSCHER et al., 2010).

A maior parte dos efeitos terapêuticos são exercidos via mecanismo de ação através da ligação do GC aos seus receptores citosólicos (cGCRs). A ligação GC-cGCR forma um complexo que se transloca para o núcleo, com subsequente ligação à fatores de transcrição específicos levando a indução (transativação) ou inibição (transrepressão) da transcrição de certos genes envolvidos especialmente na resposta inflamatória e imunológica (MCKAY & CIDLOWSKI, 1998; VAYSSIERE et al., 1997).

A administração GCs desenvolve considerável número de efeitos adversos metabólicos que limitam sobremaneira o tratamento com GC, tais como resistência a insulina, hipertensão, glaucoma e osteoporose, sendo este último o efeito mais devastante por ser irreversível (DEN UYL et al., 2011).

A osteoporose induzida por GCs se desenvolve devido a redução da formação óssea associada ou não a elevação da reabsorção óssea (WEINSTEIN et al., 1998). A literatura destaca vários efeitos dos GCs que concorrem para o desenvolvimento de osteoporose, pois GCs induzem apoptose de osteócitos (YAO et al., 2013), além de promover apoptose e/ou redução da diferenciação de osteoblastos (LANNA; MONTENEGRO JR; PAULA, 2003; ESMAIL et al., 2012).

Estudos têm investigado os mecanismos pelos quais GCs podem interferir na homeostase óssea e especulou-se um possível papel da via de sinalização WNT

neste processo (ALMEIDA et al., 2011). GCs parecem ativar GSK3 β , molécula que degrada β -catenina, que por sua vez induz osteoblastogênese, ou ainda aumentar a produção de inibidores da via WNT, tais como o DKK-1. Além disso, o tratamento com GCs promovem um aumento na apoptose de osteoblastos e osteócitos e redução da apoptose de osteoclastos, devido a regulação positiva de RANKL e supressão da OPG, a qual também parecer ser mediada pela via de sinalização WNT (DEN UYL et al., 2011).

Entre os fármacos utilizados no tratamento da osteoporose induzida por GCs, os bisfosfonatos têm sido os de primeira escolha, o qual pode ter sua ação potencializada pela adição de suplemento de vitamina D. No entanto, tem sido descrito que os bisfosfonatos exercem sua função de forma muito mais antirreabsortiva ao induzir a apoptose de osteoclastos do que no processo de neoformação óssea (GOES et al., 2012). Além disso, os bisfosfonatos apresentam uma série de efeitos adversos relacionados à eficácia e segurança a longo prazo. Quando administrados por via oral, podem causar irritação gástrica ou quando administrados por via endovenosa podem causar toxicidade renal (KHAJURIA et al., 2011).

Assim, outras abordagens terapêuticas que promovam o anabolismo ósseo podem ser interessantes considerando a patogênese da osteoporose induzida por GCs. Neste contexto, destaca-se a DOX, um agente antimicrobiano que apresenta importantes efeitos pleiotrópicos, anti-inflamatório e anabólico ósseos (WALKER et al., 2007; PAYNE & GOLUB, 2011).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Extrações dentais, implantes dentais e enxertos ósseos, são alguns dos procedimentos odontológicos que muito dependem de um bom reparo ósseo, e que são bastante frequentes na atualidade. Perdas progressivas de constituintes da matriz óssea levam à reabsorção em condições osteoporóticas ou que é parte essencial na patogênese de doenças inflamatórias ósseas como artrite reumatoide periodontites ou ser agravada em condições osteoporóticas.

Nesse contexto, fármacos que possam minimizar a perda tecidual no processo de reparo ósseo após exodontias são importantes ferramentas que podem controlar ou prevenir o avanço de tal processo.

Além do efeito antimicrobiano, estudos mostram que a DOX parece exercer efeitos diretos no microambiente ósseo que, aparentemente, se traduzem por um efeito benéfico nos processos de regeneração tecidual. A caracterização destes efeitos ao nível celular reveste-se de particular interesse, pois algumas das ações farmacológicas resultantes podem modular favoravelmente a resposta do hospedeiro, contribuindo para o sucesso do processo de regeneração óssea.

Aliado ao conhecimento de que a DOX isoladamente e em doses subantimicrobianas, exerce atividade antiinflamatória (GU et al. 2010, DI CAPRIO et al. 2015) e efeito protetor ósseo alveolar e antirreabsortivo (BEZERRA et al. 2002, METZGER et al., 2008, SHAHABOOEI et al., 2015) torna-se importante avaliar o efeito de DOX na prevenção da perda óssea alveolar após exodontia em ratos e envolvimento da via de sinalização de WNT/ β -catenina nesse processo ainda não investigado.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da DOX associada ou não à dexametasona sobre o processo de cicatrização óssea dos alvéolos dentários após exodontia do 1º molar superior direito em ratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a evolução do processo de reparo ósseo alveolar dos animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito tratados com solução salina fisiológica analisando por meio da observação de parâmetros microestruturais aos 7, 14 e 21 dias de acompanhamento em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H.E.);
- Comparar qualitativamente a evolução do processo de reparo ósseo alveolar dos animais tratados com DOX em doses diárias 10 mg/kg e 25 mg/kg, analisando por meio da observação de parâmetros microestruturais aos 7, 14 dias de acompanhamento em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H.E.);
- Analisar qualitativamente e quantitativamente, por meio de análise histológica e histomorfométrica, a evolução do processo de reparo ósseo alveolar dos animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito, tratados com doses diárias de DOX 10 mg/kg e 25 mg/kg e comparar sua eficácia sobre os efeitos pró-reabsortivos da administração concomitante de dexametasona (A) 1mg/kg aos 7 e 14 dias de acompanhamento em cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina (H.E.).
- Quantificar a imunomarcagem de WNT10b e DKK-1 dos osteoblastos nos alvéolos dos animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito, tratados com doses diárias de DEXA 1 mg/kg , solução salina fisiológica, DOX 10 mg/kg e 25 mg/kg, por meio de detecção imunohistoquímica de cortes histológicos dos alvéolos aos 7 e 14 dias;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 65 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus*), machos (150-200g) idade aproximada de 8 semanas do biotério Universidade Federal do Ceará (UFC), mantidos à temperatura de 25°C com um ciclo de 12h de claro-escuro. Todos os animais receberam água e alimentação sólida *ad libitum*. Todavia, durante a primeira semana do pós-cirúrgico, os animais foram alimentados com ração moída e soro glicosado para reduzir o trauma pós-operatório. Durante os experimentos, os animais eram manipulados cuidadosamente, de forma a reduzir o estresse comportamental. Todos os experimentos para avaliação do efeito de fármacos sobre a resposta no reparo ósseo alveolar após a exodontia foram realizados de acordo com as recomendações para experimentação em animais. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFC e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) com o protocolo n°44/2015 (anexo A).

Os animais foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo Controle (CTL)

Esse grupo foi constituído por ratos submetidos à exodontia do 1º Molar superior direito (1º MSD) no primeiro dia do experimento. Os animais receberam solução salina a 0,9% (0,5 ml- v.o), durante 3 semanas quando então foram eutanasiados ao final da 1ª, 2ª e 3ª semanas.

- Grupo tratado com Dexametasona (DEXA)

Esse grupo foi constituído por ratos submetidos à exodontia do 1º Molar superior direito (1º MSD) no primeiro dia do experimento. Os animais receberam dexametasona (Aché, Guarulhos – São Paulo, Brasil) na dose de 1mg/kg via intraperitoneal (i.p), durante 3 semanas quando então foram eutanasiados ao final da 1ª e 2ª semanas.

- Grupo tratado com Doxiciclina (DOX)

Esse grupo foi constituído por ratos submetidos à exodontia do 1º Molar superior direito (1º MSD) no primeiro dia do experimento. Os animais foram tratados com Cloridrato de doxiciclina (EMS, Hortolândia – São Paulo, Brasil) via oral (v.o.) nas doses de 10 e 25 mg/kg durante 2 semanas quando então foram eutanasiados ao final da 1ª e 2ª semanas.

- Grupo tratados com Doxiciclina e Dexametasona (DOX+DEXA)

Esse grupo foi constituído por ratos submetidos à exodontia do 1º Molar superior direito (1º MSD) no primeiro dia do experimento. Os animais foram tratados com Cloridrato de doxiciclina (v.o) nas doses de 10 e 25 mg/kg e com Dexametasona (1mg/kg, i.p) durante 2 semanas quando então foram eutanasiados ao final da 1ª e 2ª semanas.

Os fármacos foram administradas inicialmente antes (1 hora) do procedimento cirúrgico e diariamente até o final do experimento, nas mesmas dosagens descritas anteriormente de acordo com cada grupo experimental (Tabela 1).

Tabela 1. Contingência do número de animais de cada grupo experimental de acordo com período em que foi realizada a análise histológica e imunohistoquímica.

Grupos experimentais						
Período	CTL (solução salina fisiológica 0.5 ml)	DOX (10 e 25 mg/Kg)		DEXA (1 mg/Kg)	DOX (10 e 25 mg/kg) + DEXA (1mg/kg)	
7 dias	5	5	5	5	5	5
14 dias	5	5	5	5	5	5
21 dias	5	-	-	-	-	-
Total de cada grupo	15	10	10	10	10	10
Total de animais = 65						

4.2 EXTRAÇÃO DENTAL

Inicialmente cada rato recebeu medicação anestésica (i.p.) através da associação dos fármacos: cloridrato de xilazina 2% (10mg/kg – Kensol Konig do Brasil Ltda) e cloridrato de quetamina 5% (80mg/kg – Ketamina 50 Holliday – Scott SA). Após a verificação dos sinais de sedação e anestesia do animal, efetuou-se a sindesmotomia (sonda exploradora) e luxação do 1º molar superior direito com uso de espátula de Holleback 3s e em seguida com o mesmo instrumento posicionado, foi realizado movimento de alavanca na distal do elemento dentário, com força no sentido mesial-lingual, com posterior movimento de extrusão e apreensão do elemento dental (pinça). Após a exérese do elemento efetuou-se manobra hemostática local através de compressão com gaze, tendo o cuidado para remoção dos resíduos de coágulos formados pelo extravasamento de sangue para a faringe (Técnica adaptada de SHIMIZU et al. 1998; MAAHS et al., 2011)

4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Após a eutanásia (por decaptação) dos animais de acordo com cada grupo (7, 14 e 21 dias), as maxilas foram removidas e devidamente fixadas em formol tamponado (fosfato de sódio pH 7,2) (Reagen, Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brasil) a 10% por 48 horas em recipientes individuais identificados. Em seguida, as hemi-maxilas foram separadas com lâmina de micrótomo e descalcificadas com ácido etileno diamino tetracético (EDTA, Dinâmica Química Contemporânea, Diadema – São Paulo, Brasil) a 10% por 30 dias tamponados com sulfato de sódio. Posteriormente, as hemi-maxilas foram processadas pela técnica de rotina para inclusão e obtenção de cortes histológicos (3µm).

4.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

4.4.1 Análise histológica descritiva (Hematoxilina /Eosina)

Para análise histológica descritiva (qualitativa) foi utilizado um microscópio óptico binocular com objetivas em aumento de 10x, 20x e 40x. Inicialmente, procedeu-se a análise morfológica por meio de uma descrição qualitativa dos terços

do alvéolo (coronal, médio e apical) nos diferentes períodos (7,14 ou 21 dias) de acordo com cada grupo experimental.

De cada animal dos diferentes períodos experimentais, foram analisada pelo menos uma lâmina correspondente às diferentes regiões do alvéolo (coronal, média e apical) após a exérese dentária do 1º molar superior direito (1º MSD). Além disso, para orientação da região da exérese dentária executada, foram realizados cortes histológicos da hemimaxila esquerda (sem exodontia) referente à região do 1º Molar Superior Esquerdo (1º MSE).

A análise descritiva foi constituída pelas características dos fenômenos teciduais ocorridos no interior dos alvéolos dentais representativos de cada grupo experimental (Adaptado de RODRIGUES et al., 2011; LISBOA et al., 2015). Assim foram observados os seguintes parâmetros: infiltrado inflamatório polimorfonuclear e mononuclear; formação de tecido conjuntivo em remodelação; presença de osteoclastos e osteoblastos, tecido osteóide, sequestros ósseos, colônias bacterianas e úlceras no tecido epitelial gengival

4.4.2 Análise histomorfométrica

Para a análise quantitativa, em cada lâmina foram considerados aleatoriamente pelo menos dois cortes histológicos e em cada um deles foi analisado toda a região do alvéolo, por meio de câmera digitalizada acoplada ao microscópio. Foram realizadas imagens no formato TIFF e objetiva com aumento de 40X, obtendo 10 campos (40X) distintos seguindo um padrão de zig zag, sendo o primeiro campo localizado abaixo do epitélio gengival e o último próximo ao ápice da raiz. As imagens foram mensuradas para quantificação do número de células osteoblásticas e osteoclásticas através do comando de marcação de célula *Particle Analysis – Cell counter* do programa *Image Pro Plus* (Software Image J, National Institute of Health; EUA). A média aritmética das medidas dos campos de cada lâmina foi considerado como unidade amostral para avaliação quantitativa do número de osteoblastos e osteoclastos presentes no alvéolo dos animais após a perda dentária (adaptado de BARÓ et al., 2013).

O percentual de tecido ósseo presente nos alvéolos foi obtido por meio de fotomicrografia (20 X) de 5 campos distintos do alvéolo de todos os animais de cada grupo seguindo um padrão de zig-zag, sendo o primeiro campo localizado abaixo do epitélio gengival e o último próximo ao ápice da raiz ou completando o número de campos estabelecido (n=5). As imagens foram avaliadas mensurando o valor absoluto da quantidade de tecido ósseo presente (mm²) em cada imagem através do comando de seleção de área livre (*Freehand selections*) do programa *Image Pro Plus* (Software Image J, National Institute of health; EUA). A partir da média aritmética das medidas dos campos de cada lâmina foi calculado o valor médio percentual de cada alvéolo, sendo considerado como unidade amostral para avaliação quantitativa do percentual de tecido ósseo presente nos alvéolos dos animais de cada grupo (adaptado de BARÓ et al., 2013; DE BARROS SILVA et al., 2015).

4.5 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DE WNT 10b E DKK-1

As imunohistoquímicas para Wnt 10b (Abcam, Inc. Cambridge, MA) e Dkk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas) foram realizadas utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU et al., 1981). Para tanto, os tecidos foram desidratados em álcool sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 3µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de poli-L-lisina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e desidratado com álcool e imersos em tampão citrato 0,1M (pH 6), sob aquecimento em banho maria, por 20 minutos para a recuperação antigênica a 65 °C. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente durante 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (20 minutos). Em seguida foi feito bloqueio de proteína com BSA 5% (albumina bovina) por 40 minutos. Os cortes foram incubados *overnight* com anticorpo primário de cabra Wn10 b anti-coelho (Abcam, Inc. Cambridge, MA) diluído 1:100 e Dkk-1 anti-coelho policlonal diluído 1:200 ambos diluído em *antibody* diluente. Após a lavagem em PBS, foi feita a incubação com anticorpo secundário (de detecção) biotilado IgG de coelho diluído 1:400 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas) por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase conjugada (complexo ABC Santa Cruz) por 30 minutos, lavados novamente com PBS, depois corados usando o cromógeno 3,3'diaminobenzidine-peróxido (DAB). Após este procedimento, foi executada contra coloração com hematoxilina de Mayer, desidratação final dos cortes e montagem das lâminas. Os CTLs negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, sendo que o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA (5%).

4.5.1 Análise imunohistoquímica

Para a análise quantitativa do número de osteoblastos que exibiam positividade para os marcadores investigados, em cada lâmina foram considerados aleatoriamente pelo menos dois cortes e em cada um deles foi analisado toda a região do alvéolo, por meio de câmera digitalizada acoplada ao microscópio. Foram realizados 10 imagens de campos, em objetiva de 40X, distintos seguindo um padrão de zig zag, sendo o primeiro campo localizado abaixo do epitélio gengival e o último próximo ao ápice da raiz. As imagens foram avaliadas mensurando em triplicata o número de células osteoblásticas imunomarcadas através do comando de marcação de célula *Particle Analysis – Cell conter* do programa *Image Pro Plus* (Software Image J, National Institute of health; EUA) (adaptado de BARÓ et al., 2013). Considerou-se os valores encontrados em cada um campos de cada lâmina como unidade amostral para a análise quantitativa.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros qualitativos em que foi atribuído escores, foram submetidos ao teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunn* para comparar individualmente a relação entre os grupos. Os dados foram apresentados na forma de mediana e valores extremos.

Os resultados de análise histomorfométrica e as variáveis quantitativas (dados paramétricos) foram submetidos à análise de variância ANOVA (Two-way ou One-way) seguido do pós teste de Bonferroni (Média \pm EPM) e teste *t de Student*.

Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad prism 5.0 considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA E HISTOMORFOMÉTRICA

5.1.1 Análise qualitativa descritiva

5.1.1.1 Grupo Controle

- Grupo Controle (7 dias)

No grupo CTL, o alvéolo observado exibe área de exodontia sem cicatrização, preenchida completamente por tecido conjuntivo com vasos sanguíneos distribuídos ao longo de todo o alvéolo em processo de reparo. O tecido conjuntivo apresentou intenso infiltrado inflamatório leucocitário misto com predominante infiltrado de granulócitos polimorfonucleares neutrofilicos (Tabela 02; Tabela 04). Nesse período, foram encontrados achados condizentes com proliferação fibroblástica e em alguns trechos do alvéolo, especialmente no terço apical, foram encontradas áreas de proliferação de células fusiformes com pouca ou nenhuma matriz osteóide formada. Foram evidenciadas áreas de sequestros ósseos e numerosos osteoclastos principalmente na região da crista óssea em regiões próximas ao osso trabecular e colônias bacterianas consistentes com *Actinomyces* (Figura 02).

- Grupo Controle (14 Dias)

O grupo CTL nesse período, mostra áreas de exodontia com neoformação óssea, tecido conjuntivo fibroso denso na superfície do alvéolo, ausência de infiltrado inflamatório e reepitelização da superfície da ferida (Tabela 03). No terço médio e apical observa-se projeções de osso neoformado avançando para o centro do alvéolo e ocasionalmente foram encontrados alguns osteoclastos (Figura 02).

- Grupo Controle (21 dias)

Amostras evidenciaram na região mais apical do alvéolo, osso neoformado apresentando na periferia da trabécula ou acima dela, osteoclastos dispersos e tecido conjuntivo fibroso denso exibindo moderado infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 02).

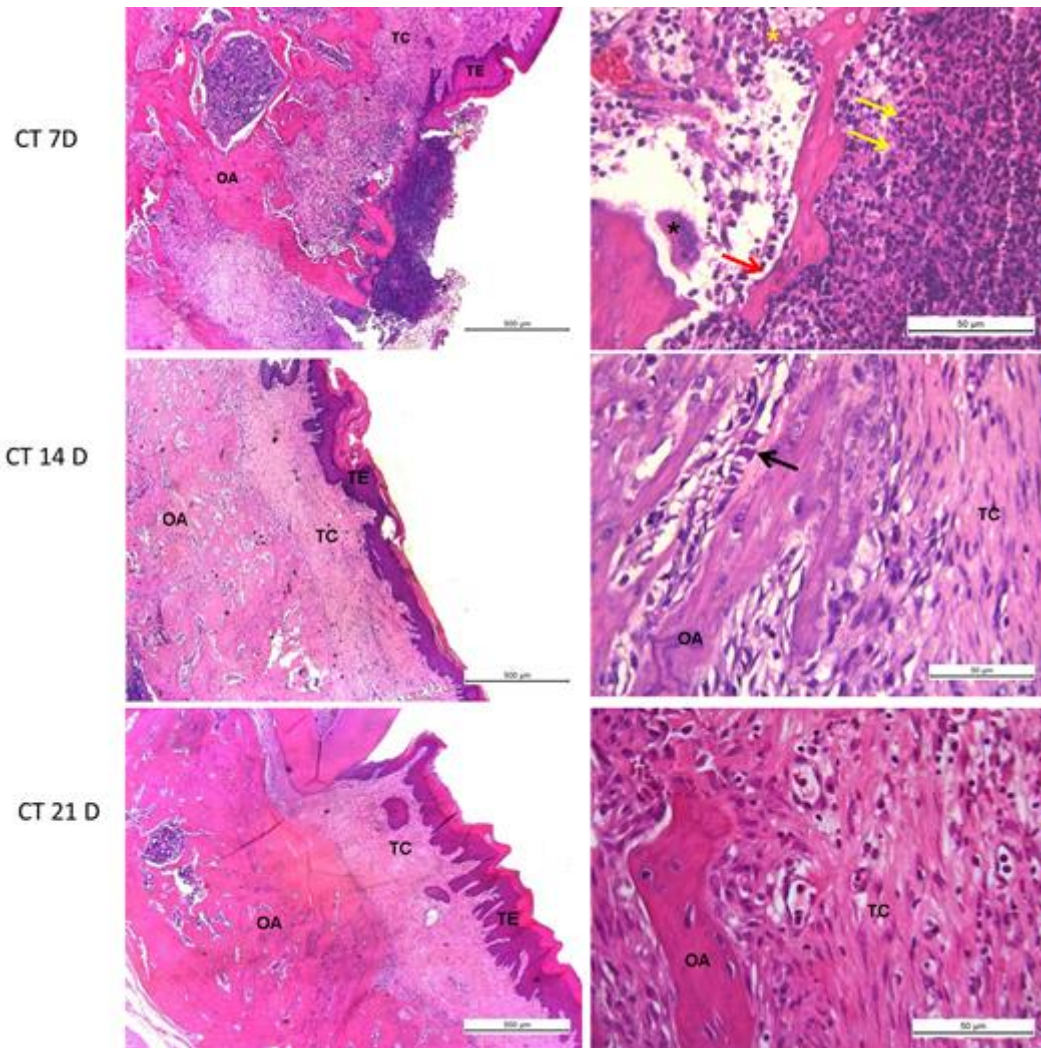


Figura 03. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito com caracterização dos períodos experimentais para avaliação do reparo ósseo alveolar (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD. Os ratos receberam solução salina diariamente (v.o.) e foram sacrificados aos 7, 14 e 21 dias. As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina- Eosina (HE). Aumento de 40x e 400x. **OA**= Osso alveolar; **TC**= Tecido conjuntivo; **TE**=Tecido epitelial ; **seta amarela** = infiltrado inflamatório, **seta preta**: Osteoblasto; ***preto**= Osteoclasto; *** amarelo**: sequestro ósseo

5.1.1.2 Grupo Doxiciclina (DOX)

- DOX 10 mg/kg (7 dias)

O alvéolo dos animais desse grupo mostraram ausência ou discreto infiltrado inflamatório leucocitário na maioria dos animais e apenas um animal apresentou esta alteração na região mais superficial do alvéolo em pequena região de exocitose do epitélio. (Tabela 02; Tabela 04). O tecido conjuntivo apresentou sinais iniciais de organização com moderada a discreta remodelação do tecido conjuntivo e presença de tecido osteóide em todos os alvéolos, mas infiltrado inflamatório mononuclear intenso e numerosos osteoclastos na maioria dos animais deste grupo. Os alvéolos apresentaram epitelização sobre o tecido conjuntivo e ausência de úlceras ou colônias bacterianas (Figura 03).

- DOX 25 mg/kg (7 dias)

Os alvéolos do grupo tratado com DOX na dose de 25 mg/kg evidenciaram infiltrado inflamatório leucocitário discreto a moderado, mas exibiu menor intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear quando comparado aos alvéolos dos animais tratados com DOX 10 mg/kg (Tabela 02; Tabela 04). Foram observados também numerosos vasos sanguíneos e discreta remodelação do tecido conjuntivo, numerosos osteoclastos. Presença de tecido osteóide com áreas de hialinização na maioria dos alvéolos examinados e sequestros ósseos (Figura 03).

- DOX 10 mg/Kg (14 dias)

O grupo tratado com DOX 10 mg/kg examinado nesse período exibiu reepitelização completa, avançado grau de remodelação do tecido conjuntivo com intensa formação de tecido osteóide e áreas do alvéolo, em sua maioria, com pavimentação osteoblástica e discreto ou ausente infiltrado inflamatório (tabela 03; tabela 05) e presença de osteoclastos ocasionais, ausência de úlcera ou colônias bacterianas (Figura 03).

- DOX 25 mg/kg (14 dias)

O grupo tratado com DOX 25 mg/kg exibiu reepitelização completa da ferida com moderada à intensa remodelação do tecido conjuntivo com maior presença de osso trabecular do que tecido osteóide. As áreas dos alvéolos, em sua maioria, mostraram pavimentação osteoblástica, discreto ou ausente infiltrado inflamatório (Tabela 03; Tabela 05). Além disso, foram observados osteoclastos ocasionais, ausência de úlcera ou colônias bacterianas (Figura 04).

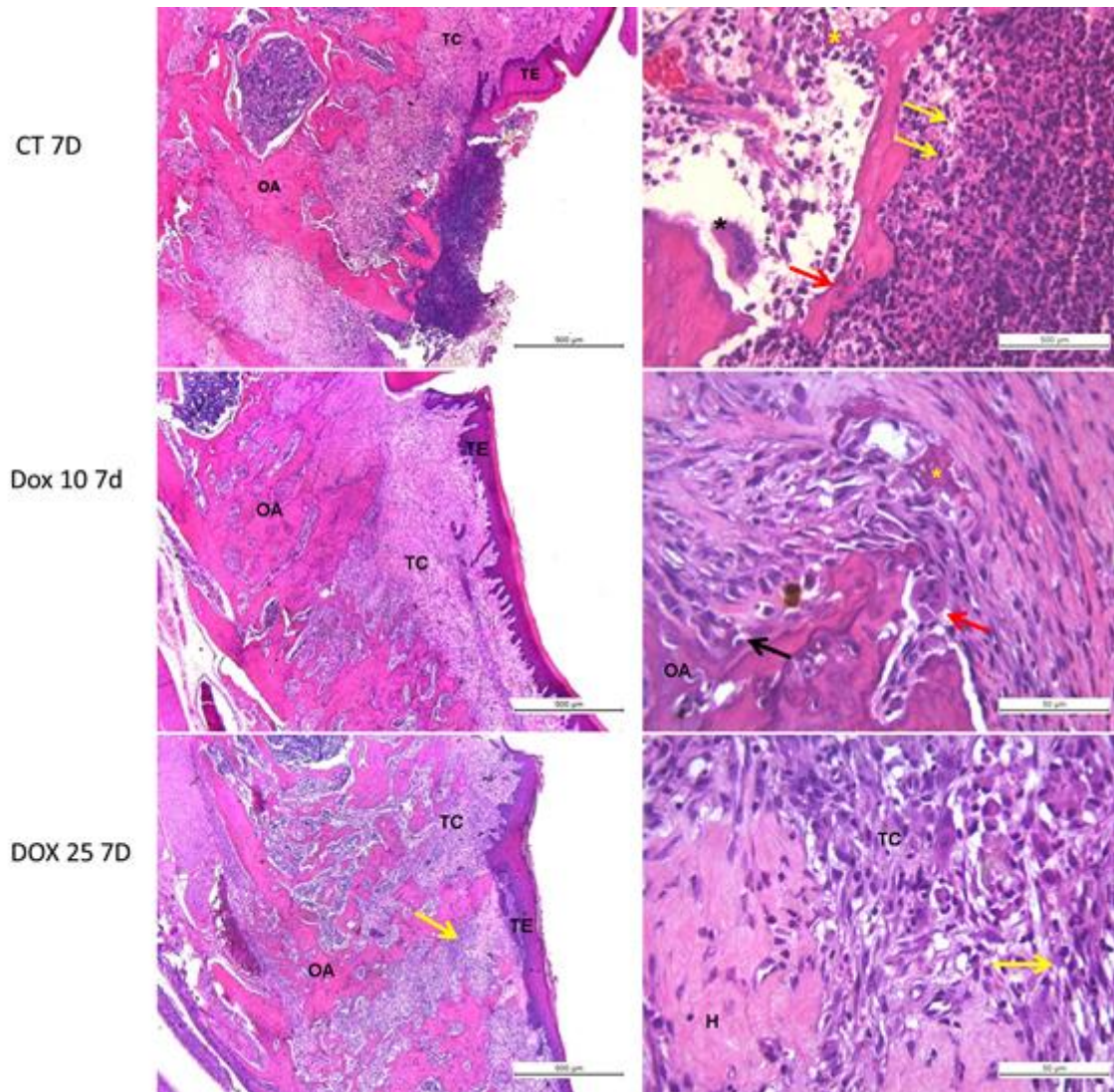


Figura 04. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1^o MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos tratados com DOX (10 e 25 mg/kg) avaliados aos 7 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1^o MSD. Os ratos receberam solução salina, DOX 10 e 25 mg/kg diariamente (v.o.) e foram sacrificados aos 7 dias. As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina- Eosina (HE). Grupo CTL; DOX 10mg/kg; DOX 25mgk/kg. Aumento de 40x e 400x. **OA**= Osso alveolar; **TC**= Tecido conjuntivo; **TE**= Tecido epitelial; **seta amarela** = infiltrado inflamatório; **seta preta**= Osteoblasto; **seta vermelha** = osteoclasto e área de reabsorção

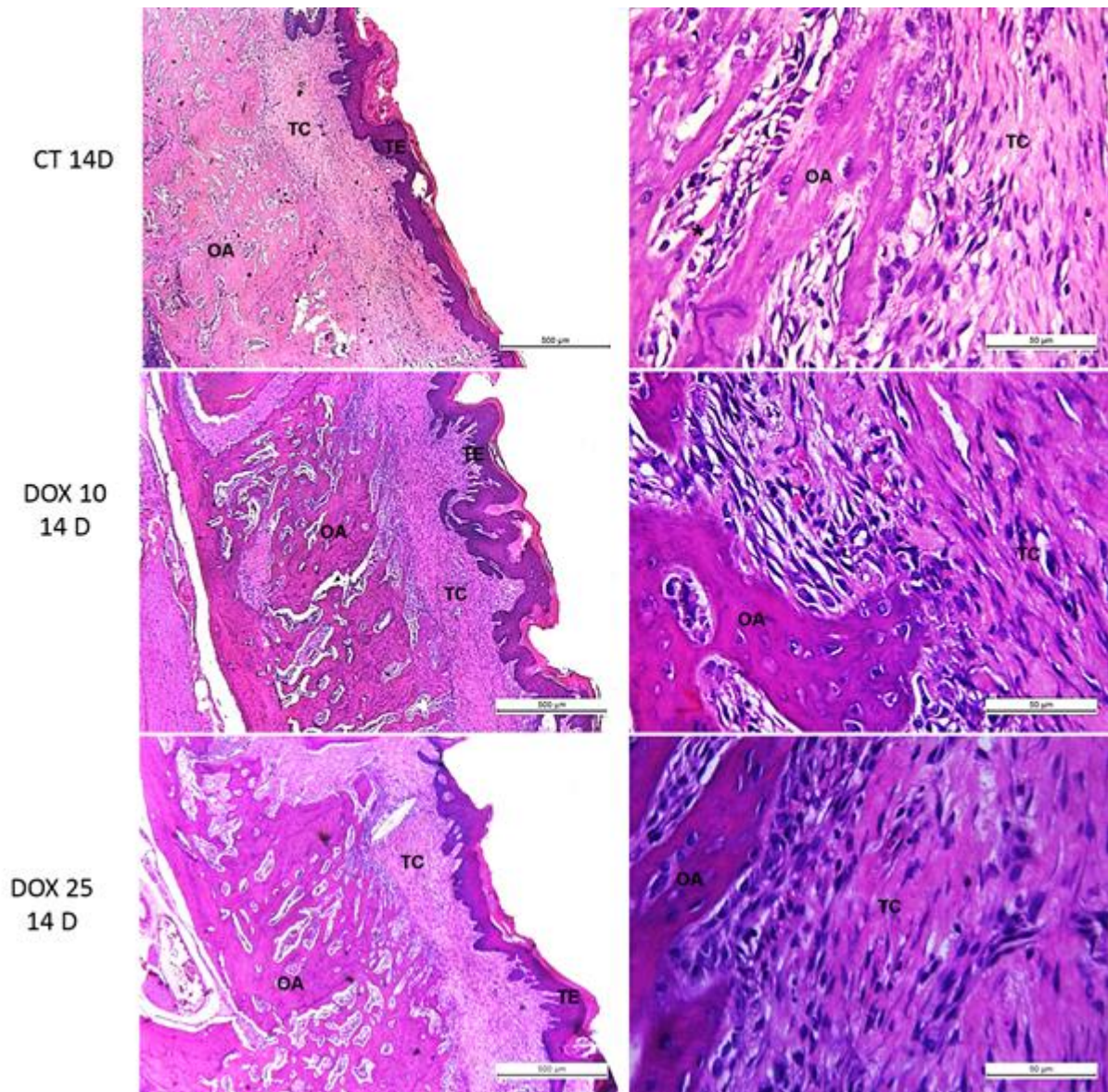


Figura 05. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos tratados com DOX (10 e 25 mg/kg) avaliados aos 14 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD. Os ratos receberam solução salina, DOX 10 e 25 mg/kg diariamente (v.o.) e foram sacrificados aos 14 dias. As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina- Eosina (HE). Grupo CTI; DOX 10mg/kg; DOX 25 mg/kg. Aumento de 40x e 400x. **OA**= Osso alveolar; **TC**= Tecido conjuntivo; **TE**= Tecido epitelial

5.1.1.3 Grupo Dexametasona (DEXA)

- Grupo DEXA 1 mg/kg (7 dias)

O alveólo apresentou área de exodontia sem evidência de cicatrização, mas preenchido por tecido conjuntivo fibroso com intenso infiltrado inflamatório leucocitário misto exibindo granulócitos polimorfonucleares neutrofílicos e na profundidade infiltrado inflamatório mononuclear intenso. O tecido conjuntivo apresentou-se fibroso com intenso infiltrado de células mononucleares. Foram encontradas também numerosas áreas de sequestros ósseos e numerosos osteoclastos em toda região do alvéolo. Foram observadas colônias bacterianas consistentes com *Actinomyces* (Figura 05).

- DEXA 1 mg/kg associada à DOX 10 mg/kg (7dias)

O tecido conjuntivo que ocupou o alvéolo desses animais, apresentou moderado à intenso infiltrado inflamatório leucocitário com granulócitos polimorfonucleares na região mais superficial e, em continuidade infiltrado inflamatório mononuclear associado à discreta remodelação do estroma. Foram observadas presença de tecido osteóide e ocasional área de hialinização. Visualizou-se ainda sequestros ósseos, numerosos osteoclastos. Em todos os casos avaliados, a ferida não sofreu epitelização, permanecendo a úlcera (Figura 05).

- DEXA 1 mg/kg associada à DOX 25 mg/kg (7dias)

Neste grupo foram encontrados achados condizentes com intenso infiltrado inflamatório leucocitário misto com polimorfonucleares na superfície e em seguida, tecido conjuntivo em remodelação com infiltrado mononuclear. Foram observados também presença de tecido osteóide, sequestros ósseos e numerosos osteoclastos e colônias bacterianas (*Actinomyces*). Em todos os animais foram observadas úlceras na superfície (Figura 05).

- DEXA 1 mg/kg (14 dias)

O alvéolo observado exibe área de exodontia com presença de úlcera em metade dos animais. O alvéolo apresentou-se preenchido por tecido conjuntivo, intenso infiltrado inflamatório leucocitário misto com granulócitos polimorfonucleares neutrofílicos e vasos sanguíneos distribuídos ao longo de todo o alvéolo. O tecido conjuntivo apresentou-se fibroso com intenso infiltrado de células mononucleares. São encontrada numerosas áreas de sequestros ósseos e numerosos osteoclastos em toda região do alvéolo. Foram encontradas colônias bacterianas consistentes com *Actinomyces* em todos os alvéolos (Figura 06).

- DEXA 1 mg/kg associada à DOX 10 mg/kg (14dias)

Foram observadas áreas de epitelização da ferida na maioria dos animais. Esse período foi caracterizado por alvéolos preenchidos por tecido conjuntivo fibroso e numerosos vasos ectásicos, com intenso infiltrado inflamatório misto, composto principalmente de granulócitos polimorfonucleares neutrofílicos. Observou-se discreta remodelação do tecido conjuntivo, presença de tecido osteóide, ausência de sequestro ósseos em todos os animais, número variado de osteoclastos e colônias bacterianas (*Actinomyces*) em alguns animais (3) (Figura 06).

- DEXA 1 mg/kg associada à DOX 25 mg/kg (14 dias)

Neste grupo observou-se discreto infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, tecido conjuntivo mais celularizado com células inflamatórias dispersas ou em foco e remodelação do tecido conjuntivo e presença de tecido osteóide e de osso trabecular. A maioria dos alvéolos analisados, apresentou discreto número de osteoclastos, colônias bacterianas (*Actinomyces*) ou úlceras no epitélio (1) (Figura 06).

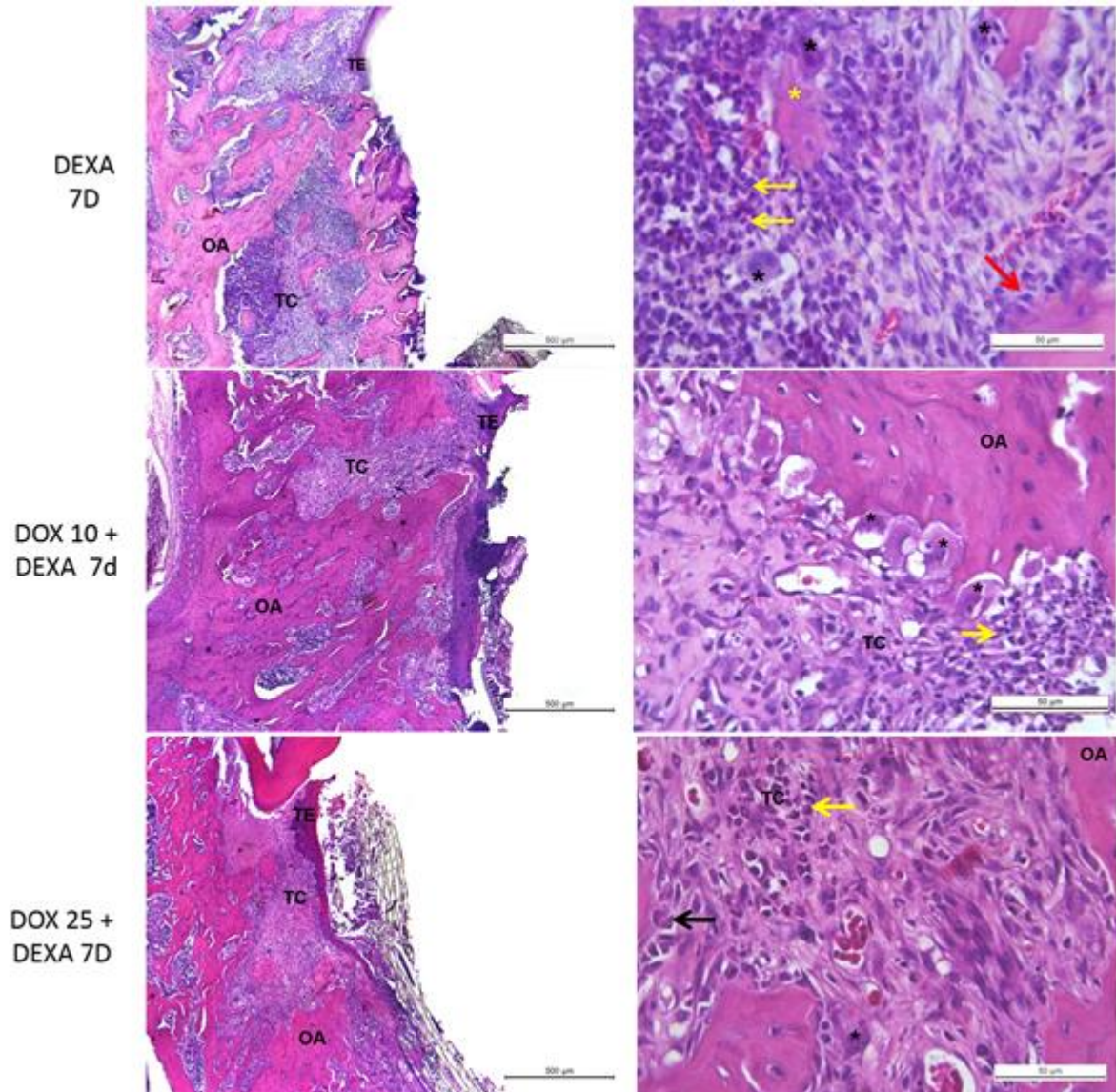


Figura 06. Fotomicrografias da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos: CTL, DEXA (1 mg/kg), DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1o MSD. Os ratos receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (i.p.). As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE). DOX 25mg/kg +DEXA 1mg/kg. Aumento de 40x e 400x. OA= Osso alveolar; TC= Tecido conjuntivo; TE= Tecido epitelial; **seta amarela** = infiltrado inflamatório; **seta preta**= Osteoblasto; **seta vermelha** = área de reabsorção * **preto**: osteoclastos , * **amarelo** : sequestro ósseo

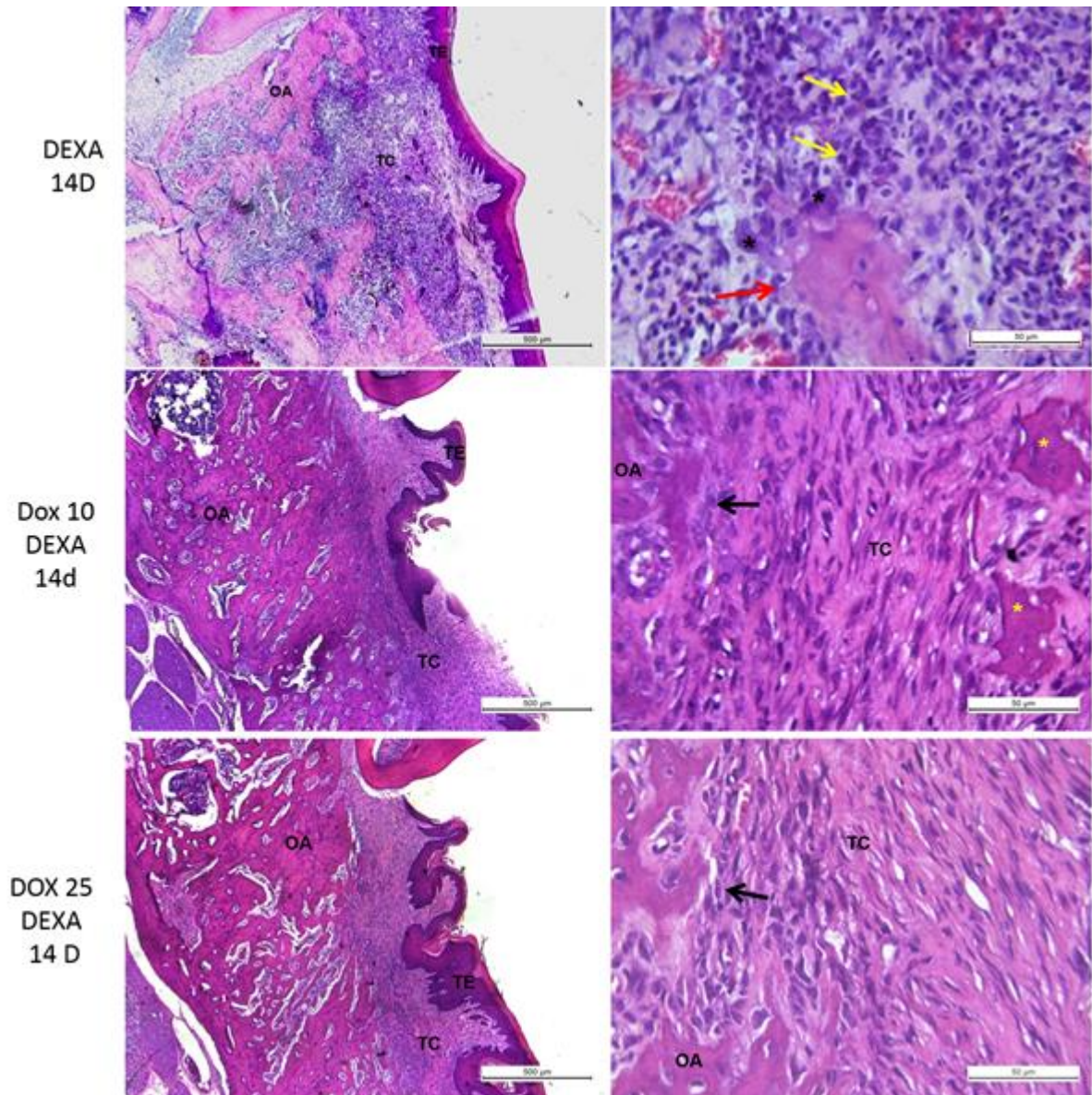


Figura 07. Fotomicrografias das regiões dos alvéolos de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para comparação de parâmetros qualitativos entre os grupos: CTL, DEXA (1 mg/kg), DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD. Os ratos receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (i.p.). As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE).. Aumento de 40X e 400X .**OA**= Osso alveolar; **TC**= Tecido conjuntivo; **seta amarela** = infiltrado inflamatório; **seta preta**= Osteoblasto; **seta vermelha** = osteoclasto

5.1.2 Análise quantitativa

Os parâmetros histológicos encontrados nos grupos experimentais caracterizados aos 7 e 14 dias após a exodontia e submetidos ao tratamento farmacológico com DOX (10 e 25 mg/kg) e DEXA (1mg/kg) foram quantificados, analisados estatisticamente, sendo apresentados de acordo com parâmetros histológicos apresentados nas tabelas a seguir:

5.1.2.1 *Infiltrado inflamatório polimorfonuclear*

Aos 7 dias após a exodontia, os alvéolos dos animais tratados com solução salina (grupo CTL) apresentaram um intenso infiltrado inflamatório (mediana 3 =3-3). Esse efeito foi significativamente ($p < 0,05$) menor nos alvéolos dos animais tratados com DOX 10mg (mediana = 1: 0-1) e 25 mg/kg (mediana = 1:0-2).

Aos 14 dias de tratamento após a exodontia, os alvéolos dos grupos de animais tratados com DOX 10mg (mediana = 0:0-0), 25 mg/kg (mediana = 0:0-1), DOX 10mg/kg associada à DEXA (mediana = 3: 0-3) e DOX 25mg/kg associada à DEXA (mediana = 1:1-3) não apresentaram diferença significativa comparado aos grupo CTL (Tabela 03).

Tabela 2. Análise histopatológica da intensidade de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) nos alvéolos 7 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado

Grupos experimentais (n= 5 animal /escore)						
Escores (0-3) parâmetro (PMN)	CTL	DOX 10mg/kg	DOX 25mg/kg	DEXA 1mg/kg	DOX 10mg/kg + DEXA 1mg/kg	DOX 25mg/kg + DEXA 1mg/kg
(0) Ausência	0	3	2	0	0	0
(1) Discreta	0	2	1	0	0	0
(2) Moderada	0	0	2	0	1	0
(3) Intensa	5	0	0	5	4	5
Mediana	3 (3-3)	1(0-1) ^a	1(0-2) ^b	3 (3-3)	3(2-3)	3(3-3)

(a,b) comparado ao grupo CTL salina; (Kruskal-Wallis/ teste de Dunn *p< 0,05)

Tabela 3. Análise histopatológica da intensidade de infiltrado inflamatório polimorfonuclear (PMN) nos alvéolos 14 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado

Grupos experimentais (n= 5 animal /escore)						
Escores (0-3) parâmetro (PMN)	CT	DOX 10mg/kg	DOX 25mg/kg	DEXA 1mg/kg	DOX 10mg/kg + DEXA 1mg/kg	DOX 25mg/kg + DEXA 1mg/kg
(0) Ausência	2	5	4	0	1	0
(1) Discreta	0	0	1	0	1	3
(2) Moderada	1	0	0	0	0	1
(3) Intensa	2	0	0	5	3	1
Mediana	2 (0-3)	0 (0-0)	0 (0-1)	3(3-3)	3 (0-3)	1(1-3)

(Kruskal-Wallis/teste de Dunn *p <0,05)

5.1.2.2 *Infiltrado inflamatório mononuclear*

Os alvéolos dos animais tratados com DOX 10 mg/kg (mediana = 3:1-3) e DOX 25 mg/kg (mediana = 2:1-3) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) sobre a intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear quando comparado aos grupos CTL (mediana = 3:3-3). Todavia, a associação de DOX 10mg/kg com DEXA 1 mg/kg (mediana = 1:0-1) e 25 mg/kg com DEXA 1mg/kg (mediana = 1:0-1) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) sobre a intensidade de infiltrado inflamatório mononuclear quando comparada aos grupos CTL (mediana = 3:3-3) e grupo DEXA (mediana = 3:3-3) (tabela 4). Aos 14 dias de tratamento após a exodontia não houve diferença significativa entre os grupos tratados com DOX (tabela 05).

Tabela 4. Análise histopatológica da intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear (IIM) nos alvéolos 7 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado

Escores (0-3) parâmetros (IIM)	Grupos experimentais (n= 5 animal /escore)					
	CT	DOX 10mg/kg	DOX 25mg/kg	DEXA 1mg/kg	DOX 10mg/kg + DEXA 1mg/kg	DOX 25mg/kg + DEXA 1mg/kg
(0) Ausência	0	0	0	0	2	1
(1) Discreta	0	1	2	0	3	4
(2) Moderada	0	0	2	0	0	0
(3) Intensa	5	4	1	5	0	0
Mediana	3 (3-3)	3 (1-3)	2 (1-3)	3(3-3)	1 (0-1) ^a	1 (0-1) ^b

(a,b) comparado ao grupo DEXA (Kruskal-Wallis/teste de Dunn *p <0,05)

Tabela 5. Análise histopatológica da intensidade do infiltrado inflamatório mononuclear (IIM) nos alvéolos 14 dias após exodontia: mediana de escores por grupo e distribuição de animais por escore avaliado

Escores (0-3) parâmetros (IIM)	Grupos experimentais (n= 5 animal /escore)					
	CT	DOX 10mg/kg	DOX 25mg/kg	DEXA 1mg/kg	DOX 10mg/kg + DEXA 1mg/kg	DOX 25mg/kg + DEXA 1mg/kg
(0) Ausência	5	5	5	0	3	0
(1) Discreta	0	0	0	0	1	3
(2) Moderada	0	0	0	5	0	1
(3) Intensa	0	0	0	0	1	1
Mediana	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	3 (3-3)	0 (0-3)	1 (1-3)

(Kruskal-Wallis/teste de Dunn *p < 0,05)

5.1.2.3 Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar

A análise quantitativa do número de osteoblastos presentes nos alvéolos dentários demonstra que há um efeito de DOX 10 mg/kg (836.3 ± 34.25) e 25 mg/kg (949.8 ± 55.1) ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo CTL (497.8 ± 61.43) e ao grupo tratado com DEXA (107 ± 47.55) durante 7 dias. É observado também que o número de osteoblastos nos alvéolos dos grupos de animais tratados com DOX 10 mg/kg associada à DEXA (628 ± 39.38) e 25 mg/kg associada à DEXA (551.8 ± 47.83) apresentaram um significativo incremento ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com DEXA (Figura 7A e 08).

A análise quantitativa do número de osteoblastos presentes nos alvéolos dentários de todos os grupos experimentais, incluindo os grupos CTL (611.5 ± 48.01) e tratados com DOX 10 mg/kg (690.8 ± 47.63), 25 mg/kg (712.5 ± 20.45), DOX 10mg/kg + DEXA (709 ± 76.72), DOX 25mg/kg + DEXA (541 ± 67.46) demonstra que houve um significativo aumento do número de osteoblastos ($p < 0,0001$) em todos os grupos quando comparados ao grupo tratado com DEXA (152 ± 40.03) durante 14 dias (Figura 7B e 08).

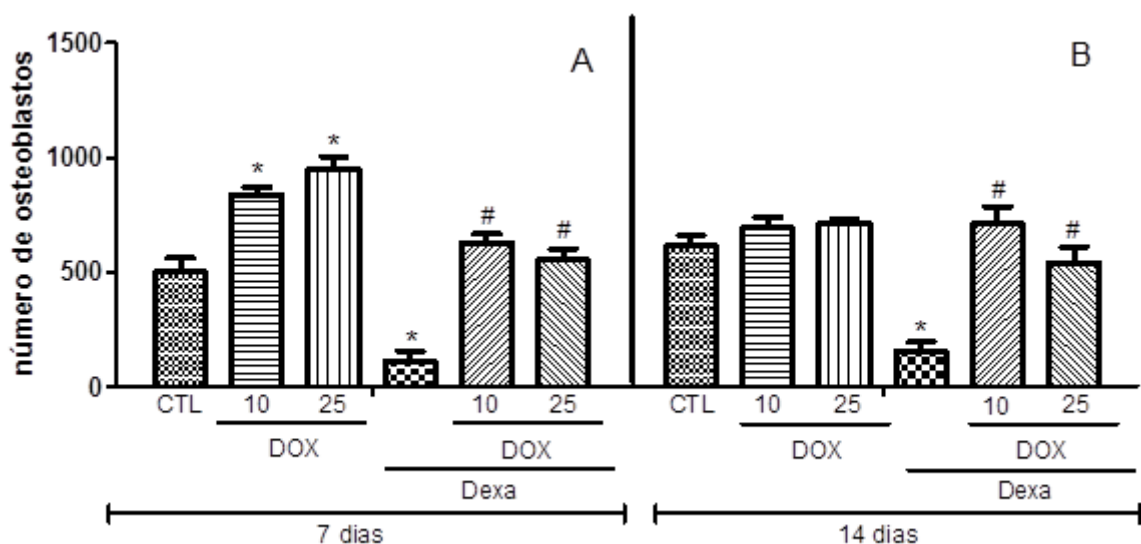


Figura 08. Análise comparativa entre os grupos experimentais do número de osteoblastos presentes nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias (*) diferença significativa quando comparado ao grupo CTL ; (#) diferença significativa quando comparado ao grupo DEXA (ANOVA/Boferroni/ teste t de student $p < 0,05$).

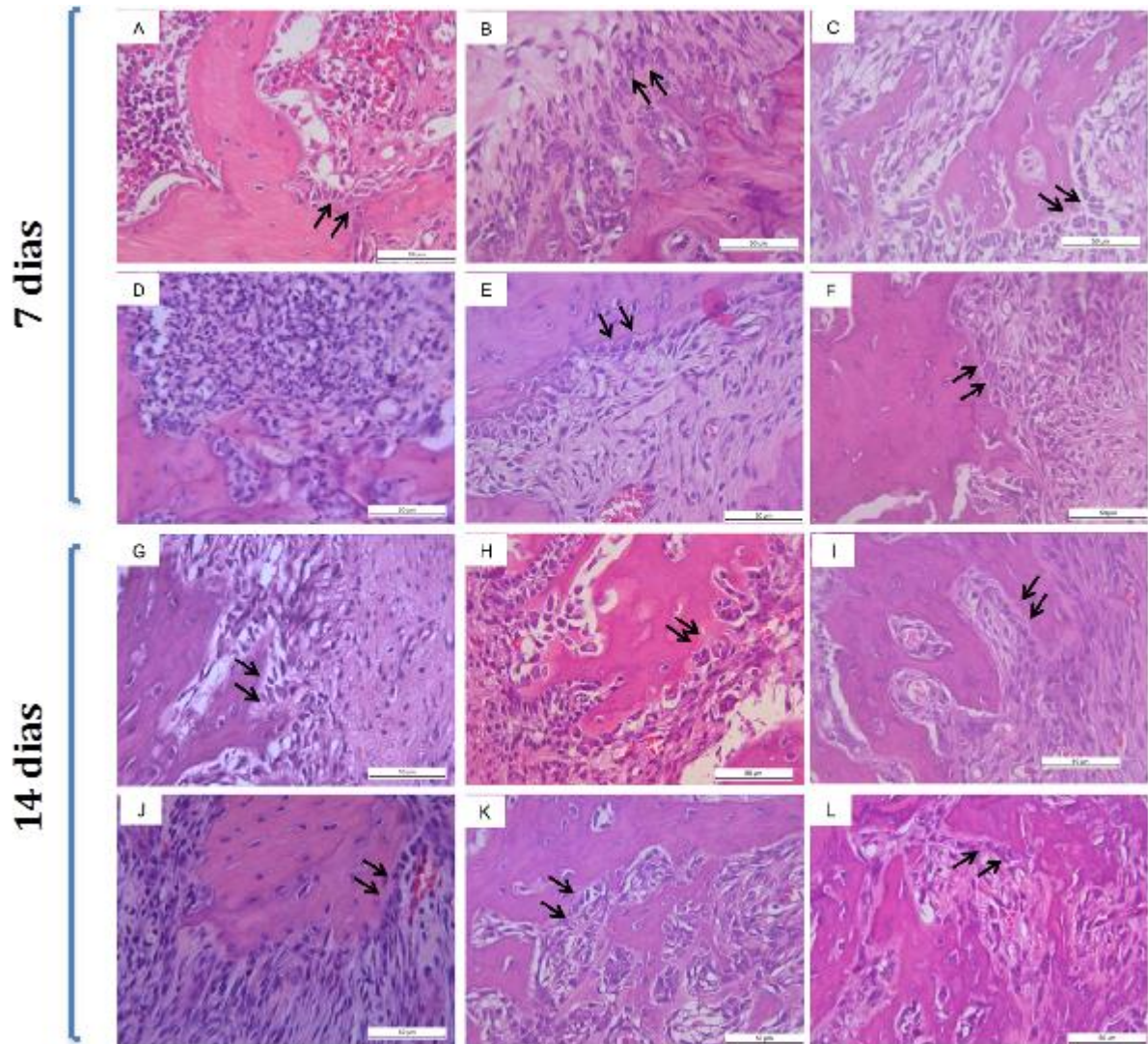


Figura 09. Fotomicrografias representativas da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º MSD para quantificação do número de osteoblastos entre os grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 e 14 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD. Os ratos receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (i.p.). As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE). **A.G.** Grupo CTL; **B.H.** DOX 10 mg/kg; **C.I.** DOX 25 mg/kg; **D.J.** DEXA; **E.K.** DOX 10 mg/kg +DEXA 1mg/kg; **F.L.** DOX 25 mg/kg +DEXA 1 mg/kg. Aumento de 400x. **setas pretas** = Osteoblasto.

A quantificação do número de osteoclastos presentes aos 7 dias nos alvéolos dos animais tratados com DOX 10 mg/kg (26.75 ± 7.21) e DOX 25 mg/kg (8.25 ± 1.25) mostrou que o número de osteoclastos encontrado foi significativamente menor ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo CTL (48.5 ± 9.7) e ao grupo tratado com DEXA (63.25 ± 12.26). É observado também atividade de DOX em apresentar efeito protetor sobre a atividade osteoclástica, pois os grupos tratados com DOX 10 mg/kg (25.25 ± 4.83) e 25 mg/kg (18 ± 8.42) (associada à administração com DEXA) apresentaram uma significativa ($p < 0,01$) redução do número de osteoclastos quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com DEXA (63.25 ± 12.26) (Figura 9A; Figura 10).

A análise quantitativa do número de osteoclastos presentes nos alvéolos dentários demonstra que DOX 10 mg/kg (10.75 ± 3.11) e DOX 25 mg/kg (7.5 ± 1.65) apresentam um significativo ($p < 0,0001$) efeito sobre o número de osteoclastos presentes tanto em relação ao grupo CTL (32.5 ± 4.17) quanto em relação ao grupo tratado com DEXA (72.75 ± 12.17) durante 14 dias. DEXA (72.75 ± 12.17) apresentou um número de osteoclastos significativamente maior ($p < 0,001$) quando comparado ao número de osteoclastos quantificados no grupo CTL (32.5 ± 4.17). Foi observado também uma atividade de DOX sobre a atividade osteoclástica, pois os grupos tratados com DOX 10 mg/kg (11 ± 1.0) e 25 mg/kg (22.25 ± 6.34) associado ao tratamento com DEXA apresentaram uma significativa ($p < 0,001$) redução do número de osteoclastos quando comparado ao grupo tratado exclusivamente com DEXA durante esse período (Figura 9B; Figura 10).

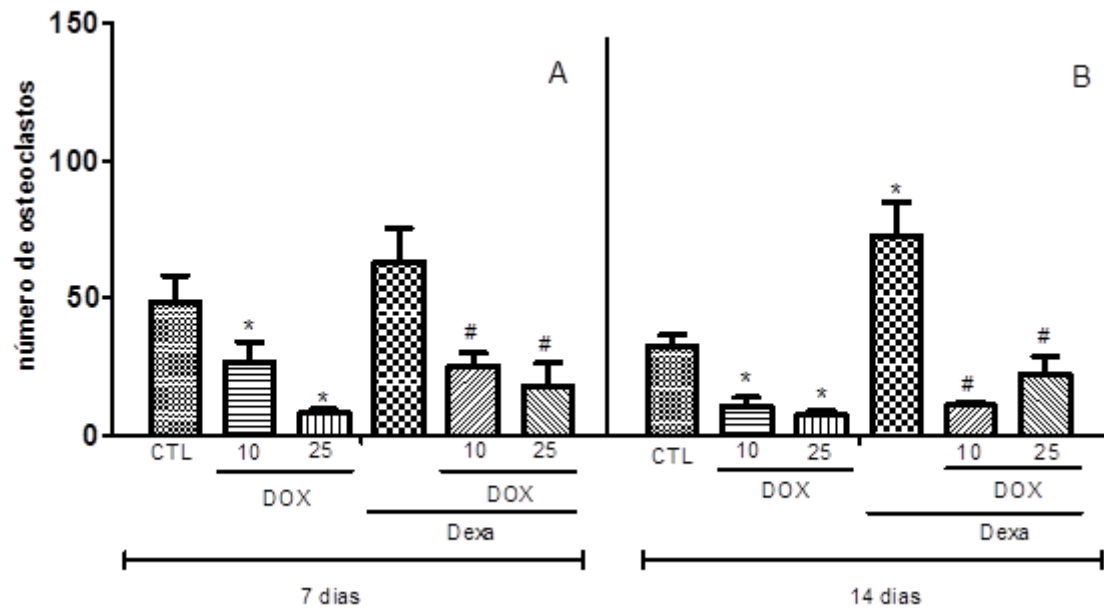


Figura 10. Análise comparativa entre os grupos experimentais do número de osteoclastos presentes nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias (*) diferença significativa quando comparado ao grupo CTL ; (#) diferença significativa quando comparado ao grupo DEXA (ANOVA/Boferroni/ teste t de student $p < 0,05$).

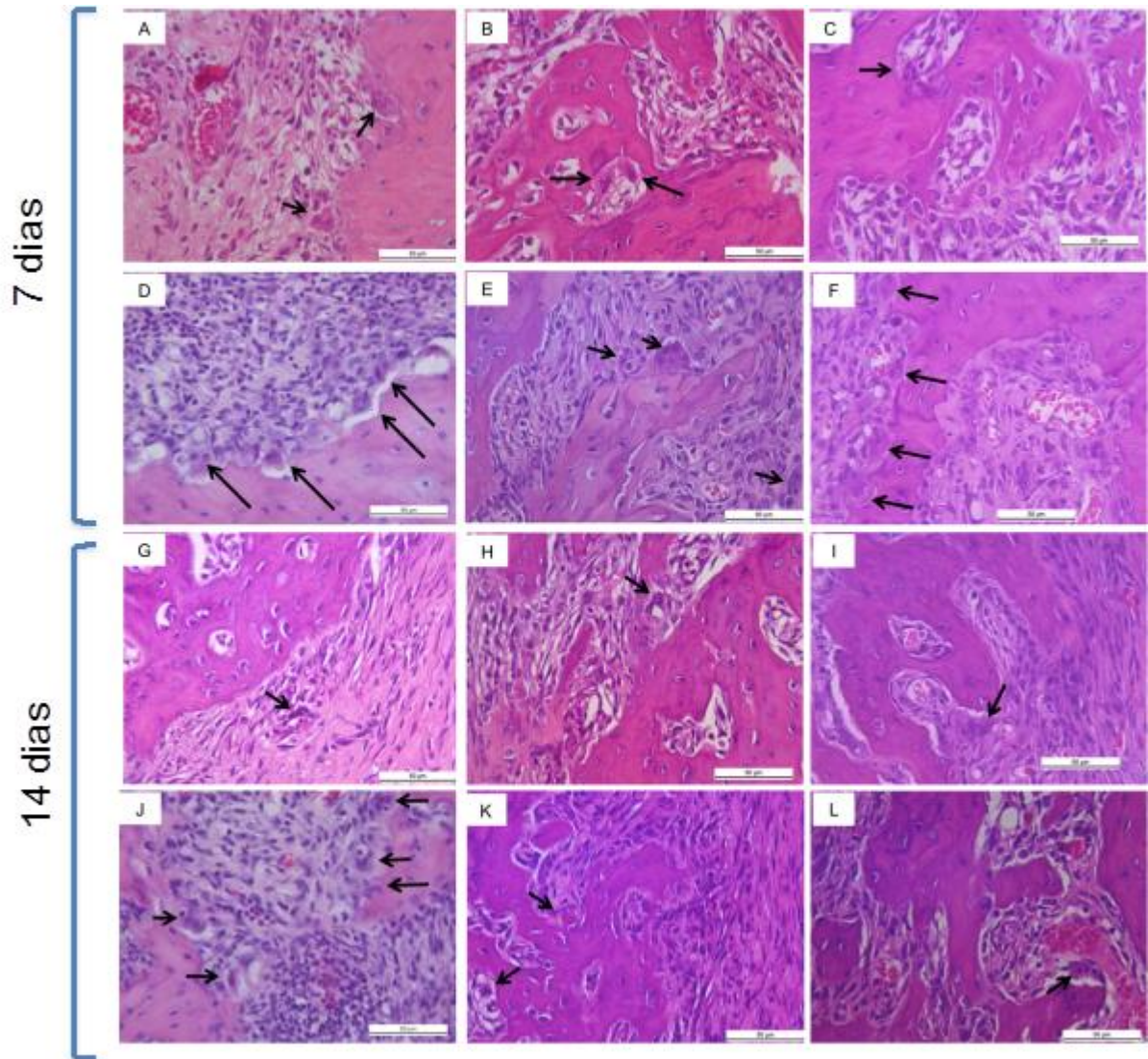


Figura 11. Fotomicrografias representativas da região do alvéolo de animais submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoclastos entre os grupo CT , DEXA (1 mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 e 14 dias após a cirurgia (HE). Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD. Os ratos receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (i.p.). As maxilas foram removidas e processadas para coloração pelo método Hematoxilina-Eosina (HE). **A.G.** Grupo CT; **B.H.** DOX 10mg/kg; **C.I.** DOX 25mg/kg; **D.H.** DEXA; **E.K.** DOX 10mg/kg +DEXA 1mg/kg; **F.L.** DOX 25mg/kg +DEXA 1mg/kg. Aumento de 400X. **setas pretas**= Osteoclastos

A quantificação percentual de tecido ósseo realizada nos alvéolos dos animais aos 7 dias demonstra que houve uma significativa ($p < 0,0001$) diferença entre os grupos CTL e DEXA, pois o grupo CTL (0.40 ± 0.01) apresentou valor superior no percentual médio de tecido ósseo em seus alvéolos quando comparado aos valores encontrados no grupo DEXA (0.26 ± 0.03). Os grupos DOX 10 mg/kg (0.50 ± 0.01) e DOX 25 mg/kg (0.50 ± 0.02) apresentaram um valor significativamente maior no percentual de tecido ósseo ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo CTL (0.40 ± 0.01). Os grupos DOX 10 mg/kg (0.50 ± 0.01), DOX 25 mg/kg (0.50 ± 0.02), DOX 10mg/kg associada à DEXA (0.51 ± 0.046) e DOX 25mg/kg associada à DEXA (0.52 ± 0.02) apresentaram um percentual de tecido ósseo significativamente superior à quantidade de tecido ósseo encontrada nos alvéolos dos animais no grupo DEXA (0.26 ± 0.03) (Figura 11A).

Aos 14 dias de tratamento, quantificação percentual de tecido ósseo realizada nos alvéolos dos animais encontrada apresentou uma significativa diferença ($p < 0,0001$) do grupo CTL (0.36 ± 0.02) quando comparado ao grupo DEXA (0.05 ± 0.004). Os grupos DOX 10 mg/kg (0.59 ± 0.03) e DOX 25 mg/kg (0.50 ± 0.02) apresentaram um valor significativamente maior ($p < 0,0001$) no percentual de tecido ósseo em seus alvéolos quando comparado ao grupo CTL (0.36 ± 0.02). Os grupos DOX 10 mg/kg (0.59 ± 0.03), DOX 25 mg/kg (0.50 ± 0.02), DOX 10 mg/kg associada à DEXA (0.59 ± 0.02), DOX 25 mg/kg associada à DEXA (0.58 ± 0.02) apresentaram um percentual de tecido ósseo significativamente superior ao grupo DEXA (0.05 ± 0.004) e ao (Figura 11B).

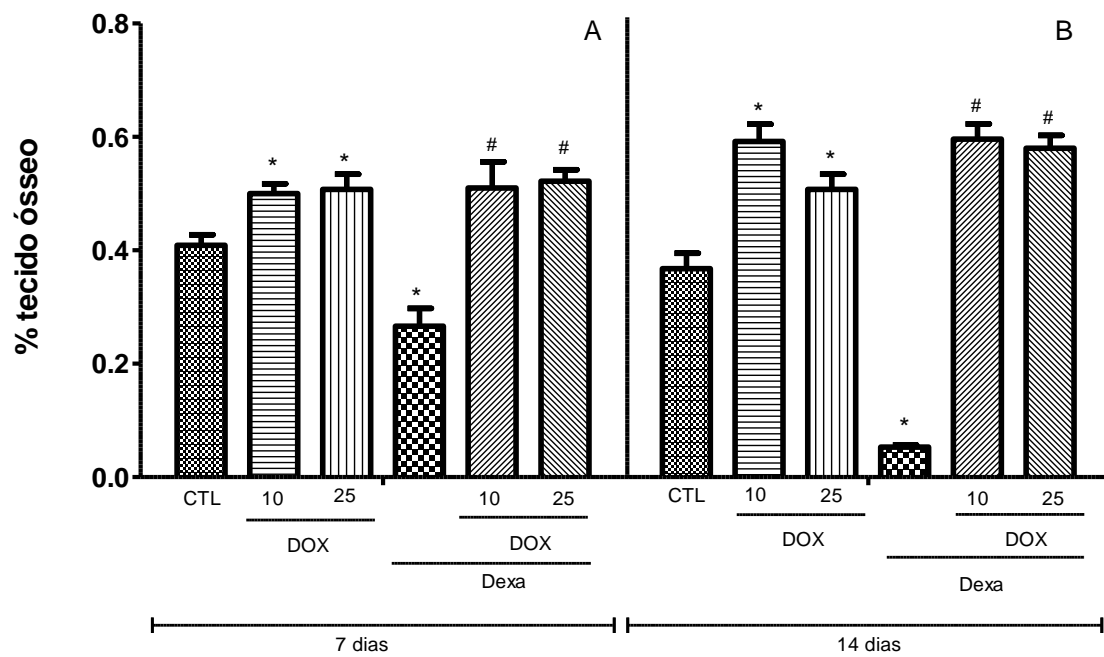


Figura 12. Análise comparativa entre os grupos experimentais do percentual de tecido ósseo nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias (*) diferença significativa quando comparado ao grupo CTL; (#) diferença significativa quando comparado ao grupo DEXA (ANOVA/Boferroni, $p < 0,05$).

5.1.2.4 Análise imuno-histoquímica para Wnt 10b e Dkk-1

Através de técnica imuno-histoquímica foi possível quantificar o número de células imunomarcadas para Wnt 10b e DKK-1 aos 7 e 14 dias em todos os grupos experimentais. Inicialmente, aos 7 dias, observa-se que DOX 10 mg/kg (52.09 ± 4.25), 25 mg/kg (47.19 ± 5.08) apresentaram um significativo ($p < 0,0001$) aumento na imunomarcção de células Wnt 10b quando comparados ao grupo tratado ao grupo CTL (34.56 ± 2.50). DOX 10 mg/kg associada à DEXA (40.04 ± 3.62) e DOX 25mg/kg associada à DEXA (56.44 ± 5.37) apresentaram um significativo ($p < 0.0001$) aumento na imunomarcção de células Wnt 10b quando comparados ao grupo tratado com DEXA (15.6 ± 2.04). Neste mesmo período, houve uma redução significativa do número de células imunomarcadas para Wnt 10b no Grupo DEXA (15.6 ± 2.04) quando comparado ao grupo CTL (34.56 ± 2.50). A expressão das células Wnt 10b foi significativamente superior nos grupos em que foi administrada DOX 25 mg/kg associada à DEXA (56.4 ± 5.37) comparada ao grupo em que foi administrada DOX 10 mg/kg associada à DEXA (40 ± 3.62) ($p < 0,0001$) (figura 14A; Figura 15).

Aos 14 dias após a exodontia, nos tratamentos com DOX 10 mg/kg (35.7 ± 1.4) e 25 mg/kg (31.75 ± 2.0), DOX 25mg/kg associada à DEXA (21 ± 2.3) e 10mg/kg associada à DEXA (43.8 ± 4.6), verifica-se que apenas a dose de 10mg/kg associada à DEXA (43.8 ± 4.6) apresentou um significativo ($p = 0.0002$) efeito sobre a quantidade de células positivas para Wnt 10b comparado ao grupo DEXA (21 ± 2.77). Houve uma redução significativa ($p < 0,01$) do número de células imunomarcadas para Wnt 10b nos alvéolos dos animais do grupo DEXA (21 ± 2.77) quando comparado ao grupo CTL (36 ± 3.02). Os alvéolos dos animais tratados com DOX 25mg/kg associada à DEXA (21 ± 2.3) apresentaram uma significativa redução de células Wnt 10b positivas comparado ao grupo DOX 10 mg/kg associada à DEXA (43.8 ± 4.6) ($p < 0,0001$) (figura 14B; Figura 16).

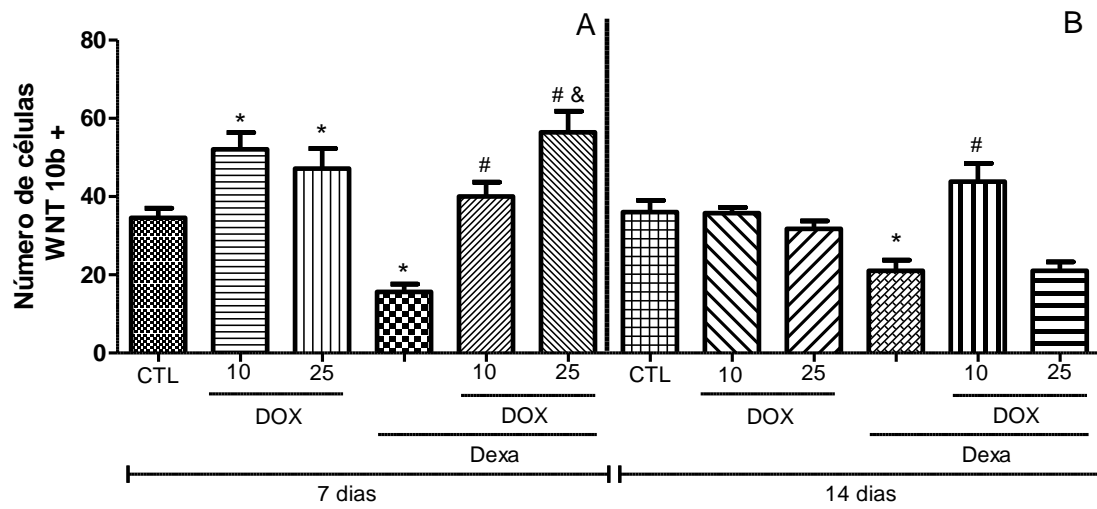


Figura 13. Número de células Wnt 10b positivas quantificadas nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias nos grupos CTL, DOX 10, DOX 25 e as associações DOX 10 + DEXA e DOX 25 + DEXA. (*) diferença significativa quando comparado ao grupo CTL ; (#) diferença significativa quando comparado ao grupo DEXA; (&) diferença significativa entre as doses de DOX (ANOVA/Boferroni/ teste t de student $p < 0,05$).

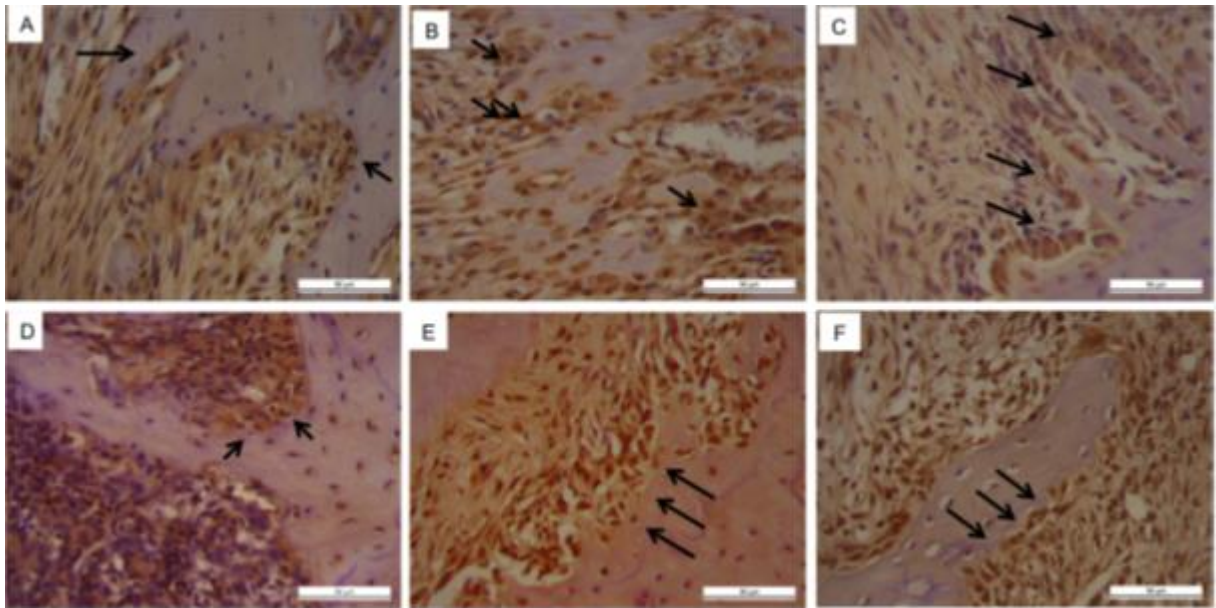


Figura 14. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de ratos submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam imunomarcagem para Wnt 10b nos grupos CTL, DEXA (1 mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 07 dias após a cirurgia. Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD e receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (v.o.). As maxilas foram removidas e processadas pelo método de imunohistoquímica. **A.** Grupo CTL; **B.** DOX 10 mg/kg; **C.** DOX 25 mg/kg; **D.** DEXA; **E.** DOX 10 mg/kg +DEXA 1 mg/kg; **F.** DOX 25 mg/kg +DEXA 1 mg/kg. Aumento de 400X. **setas**= Osteoblastos positivos para Wnt 10b.

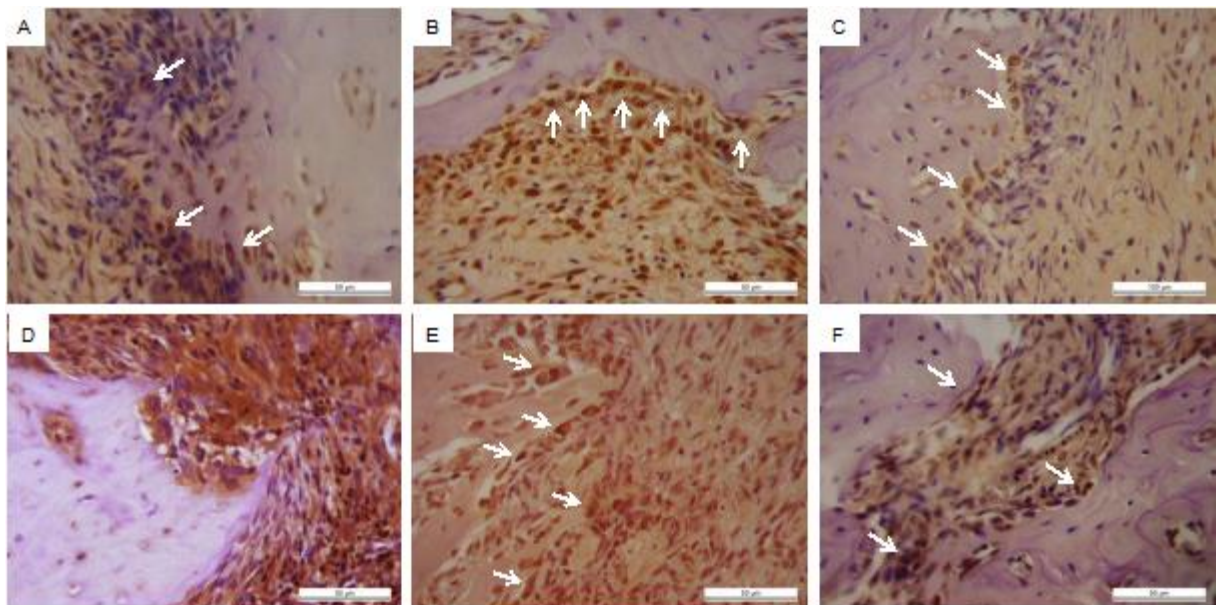


Figura 15. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de ratos submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam imunomarcagem para Wnt 10b nos grupos CTL, DEXA (1 mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia. Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD e receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (v.o.). As maxilas foram removidas e processadas pelo método de imunohistoquímica. **A.** Grupo CTL; **B.** DOX 10 mg/kg; **C.** DOX 25 mg/kg; **D.** DEXA; **E.** DOX 10 mg/kg +DEXA 1 mg/kg; **F.** DOX 25 mg/kg +DEXA 1 mg/kg. Aumento de 400X. **setas**= Osteoblastos positivos para Wnt 10b.

Quanto a expressão de células Dkk-1 positivas quantificada nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 dias, verifica-se que houve uma significativa ($p < 0,0001$) redução da expressão de células imunomarcadas nos alvéolos de ratos tratados DOX 25 mg/kg (10.33 ± 0.66) quando comparado ao grupo DEXA (19.6 ± 1.66) e ao grupo CTL (42.6 ± 2.89). Os grupos DOX 10 mg/kg (22.48 ± 2.15), DOX 10 mg/kg associada à DEXA (20.6 ± 1.96) e DOX 25 mg/kg associada à DEXA (25.75 ± 2.68) também evidenciaram redução significativa em relação ao número de células positivas para Dkk-1 quando comparada ao alvéolo do grupo CTL (42.67 ± 2.89), mas não em relação ao grupo tratado apenas com DEXA (19.6 ± 1.66) ($p < 0,0001$) (figura 17A; Figura 18).

No período de 14 dias, observa-se que houve uma redução significativa ($p < 0,0001$) no número de células dos grupos DOX 10 mg/kg (17.24 ± 1.0), DOX 25 mg/kg (19.29 ± 2.14), DOX 10 mg/kg associada à DEXA (18.36 ± 1.76) e DEXA (25.91 ± 2.55) quando comparado ao grupo CTL (38.82 ± 4.12). Além disso, de modo significativo ($p < 0.01$) o grupo DOX 10 mg/kg (17.24 ± 1.0) reduziu a expressão de DKK-1 quando comparado à expressão de Dkk-1 nos grupo tratados com DEXA (25.91 ± 2.55). O grupo tratado com DOX 10 mg/kg associada à DEXA (18.36 ± 1.76) apresentou um significativo ($p < 0.01$) efeito, reduzindo a expressão de células imunomarcadas para Dkk-1 quando comparada ao grupo de animais tratados com DEXA (25.91 ± 2.55). Todavia, DOX 25 mg/kg associada à DEXA (25 ± 2.51) não apresentou diferença significante ($p < 0,01$) quando comparada ao grupo tratado exclusivamente com DEXA (25.91 ± 2.55) ($p < 0,0001$) (figura 17B; Figura 19).

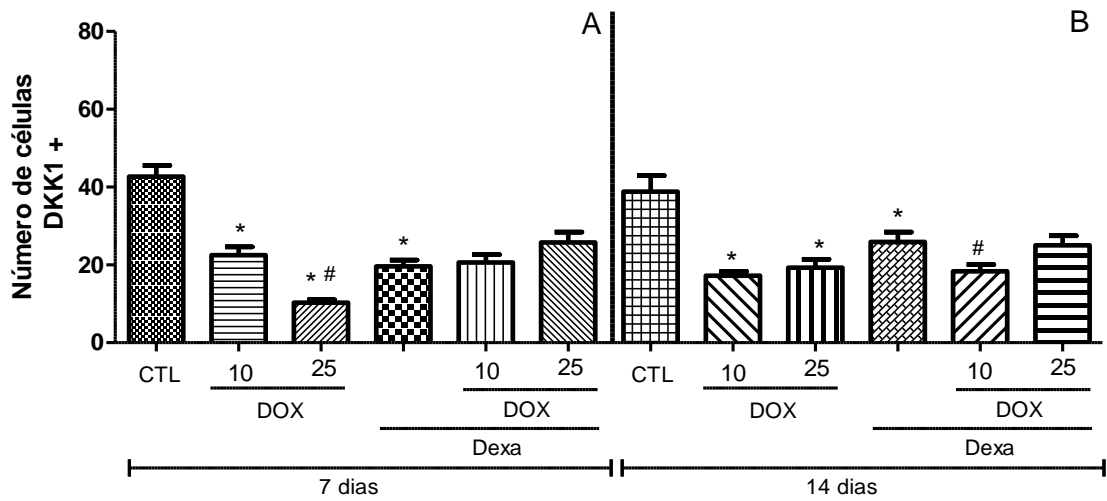


Figura 16. Número de células Dkk-1 positivas quantificadas nos alvéolos de ratos durante o processo de reparo ósseo após exodontia no período de 7 e 14 dias nos grupos CTL, DOX 10, DOX 25 e as associações DOX 10 + DEXA e DOX 25 + DEXA. (*) diferença significativa quando comparado ao grupo CTL; (#) diferença significativa quando comparado ao grupo DEXA (ANOVA/Boferroni/ teste t de student $p < 0,05$).

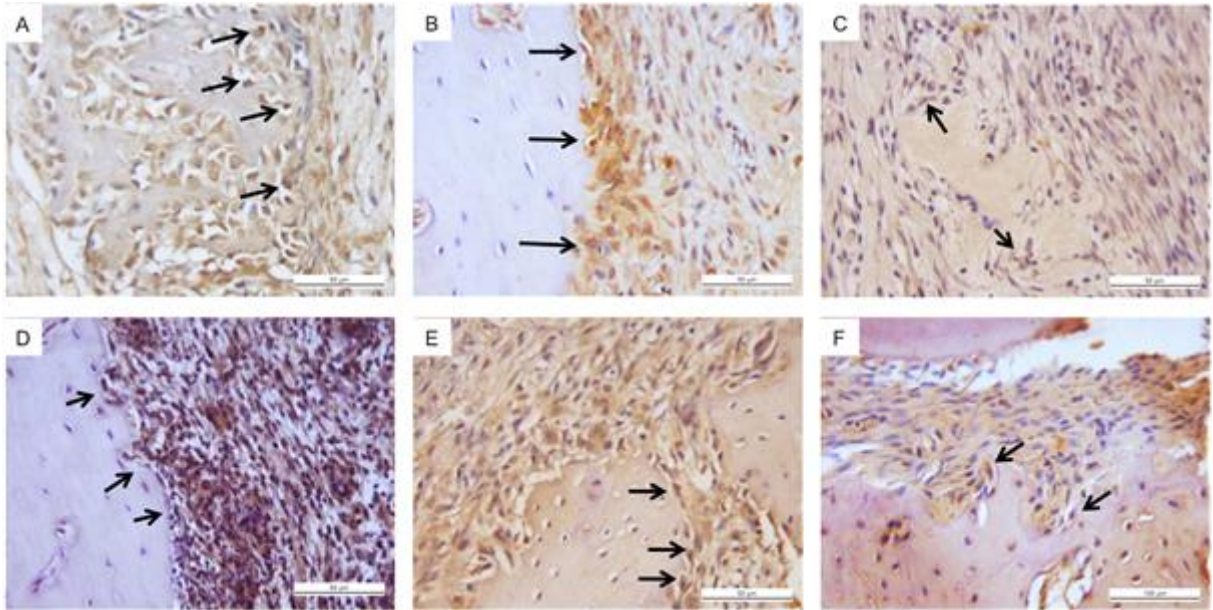


Figura 17. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de ratos submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam células imunomarcadas para Dkk-1 nos grupo CTL, DEXA (1 mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 7 dias após a cirurgia. Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD e receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (v.o.). As maxilas foram removidas e processadas pelo método de imunohistoquímica. **A.** Grupo CTL; **B.** DOX 10 mg/kg; **C.** DOX 25 mg/kg; **D.** DEXA; **E.** DOX 10 mg/kg +DEXA 1mg/kg; **F.** DOX 25 mg/kg +DEXA 1mg/kg. Aumento de 400X. **setas=** Osteoblastos positivos para Dkk-1.

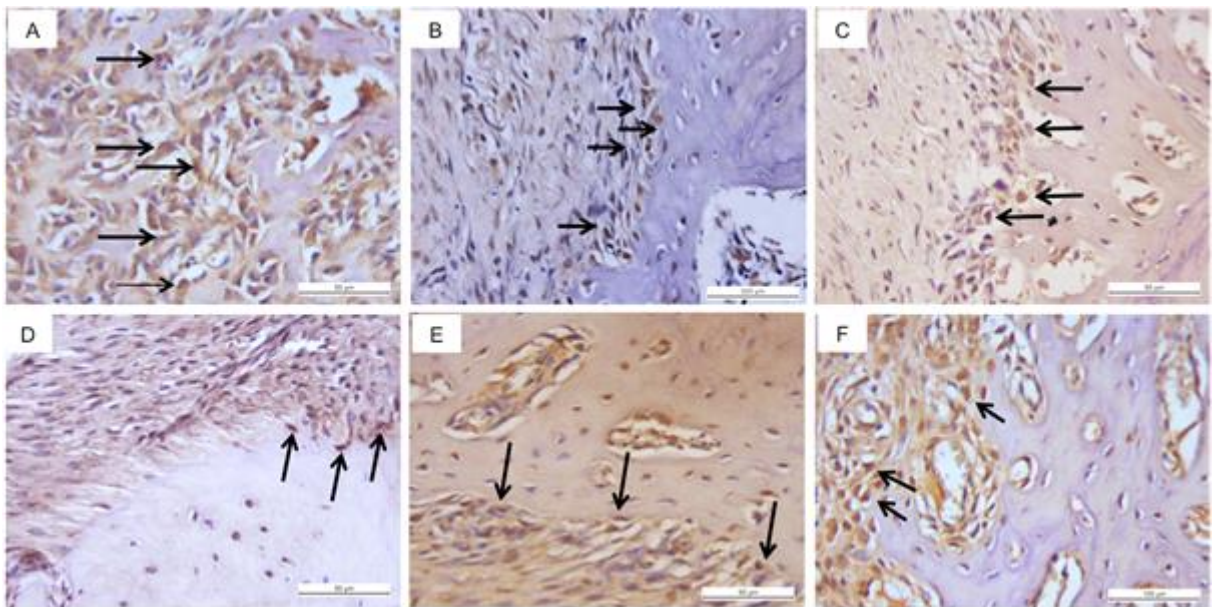


Figura 18. Fotomicrografias representativas das regiões dos alvéolos de ratos submetidos à exodontia do 1º molar superior direito para quantificação do número de osteoblastos que apresentam imunomarcagem para Dkk-1 nos grupo CTL, DEXA (1mg/kg) e DOX (10 e 25 mg/kg) e DOX (10 ou 25 mg/kg) associada à DEXA avaliado aos 14 dias após a cirurgia. Os animais foram submetidos à exodontia do 1º MSD e receberam solução salina e DEXA, DOX 10, 25 mg/kg e DOX 10 e 25 mg/kg associada à DEXA diariamente (v.o.). As maxilas foram removidas e processadas pelo método de imunohistoquímica. **A.** Grupo CTL; **B.** DOX 10 mg/kg; **C.** DOX 25 mg/kg; **D.** DEXA; **E.** DOX 10 mg/kg +DEXA 1mg/kg; **F.** DOX 25 mg/kg +DEXA 1mg/kg. Aumento de 400X. **Setas pretas=** Osteoblastos positivos para Dkk-1

6. DISCUSSÃO

O processo de reparo ósseo e o efeito de fármacos que modulam os fenômenos constituintes desse evento tem sido extensivamente estudados. Estas pesquisas proporcionaram alternativas medicamentosas no favorecimento do processo de reparo ósseo tecidual após a perda dentária. As ações anti-inflamatórias (GRIFFIN et al., 2010), anticolagenolíticas (GU et al., 2010; FARHAD et al., 2013; KUDALKAR et al., 2014) e neoformadora óssea (SHAHABOOEI et al., 2015) já são reconhecidas em DOX. Todavia, ainda não estão bem caracterizadas possíveis interferências desses efeitos sobre uma importante via de sinalização responsável pela manutenção da homeostase óssea, denominada de via de sinalização canônica de WNT/ β catenina, especialmente em condições osteoporóticas primárias ou secundárias, como em caso de pacientes que utilizam esse medicamento para tratamento de doenças inflamatórias ou auto imunes.

- Caracterização temporal do modelo de reparo ósseo alveolar após exodontia do 1º MSD

Para caracterização e padronização deste modelo, inicialmente foi realizado um estudo piloto observando-se parâmetros histológicos dos alvéolos em ratos tratados apenas com solução salina fisiológica nos períodos de 7, 14, 21 dias. O critério para delineamento dos períodos foi baseado nos trabalhos realizados por Carvalho e Okamoto (1985) entre outros (GORUSTOVICH et al., 2008; BARÓ et al., 2013; KUROSHIMA et al., 2013; ABREU et al., 2013). Esses autores descreveram que o processo de reparo do alvéolo inicia-se imediatamente após a exodontia através do preenchimento do alvéolo por coágulo sanguíneo. Esta etapa é essencial no reparo tecidual, uma vez que o coágulo formado por plaquetas, transporta um série de fatores de crescimento necessários aos eventos de remodelamento. Nas fases seguintes, morfologicamente são consideradas quatro etapas principais: a fase de proliferação celular, fase de desenvolvimento e maturação do tecido conjuntivo, encerrando o processo com a fase de maturação óssea (VIEIRA et al., 2015).

Ao 7º dia após a exodontia em ratos, foram evidenciadas as fases iniciais do processo de remodelagem do alvéolo e neoformação óssea mais significativas. Nossas observações mostram a presença de infiltrado inflamatório misto intenso, presença de áreas de sequestros ósseos com numerosos osteoclastos e

proliferação fibroblástica em alguns trechos do alvéolo. Esses resultados corroboram estudos descrevendo que nesta etapa, o coágulo sanguíneo que preenche o alvéolo é paulatinamente invadido por fibroblastos produzidos a partir dos fibroblastos residentes do processo alveolar e/ou a partir da diferenciação de células adventícias, ambos presentes nos remanescentes do ligamento periodontal. (DEVLIN et al., 1997; VIEIRA et al., 2015).

Nossas observações mostram que o 14^o dia após a cirurgia é caracterizado por apresentar áreas com neoformação óssea, tecido conjuntivo fibroso denso sem infiltrado inflamatório e reepitelização da superfície da ferida. Visualizou-se também alguns osteoclastos ocasionais e ausência de úlcera ou colônias bacterianas. Ao 21^o dia foi observado alvéolo com osso neoformado e ocasionalmente foram encontrados alguns osteoclastos dispersos no tecido conjuntivo fibroso denso.

Assim, com intuito de investigar o efeitos de DOX na formação e no reparo ósseo em animais tratados com DEXA, desconsiderou-se os período de 21 dias, pois ao 7^o dia inicia-se o processo de reparo e no 14^o dia parece ocorrer a fase inicial de maturação do tecido fibroso. A literatura mostra que, na segunda semana do reparo ósseo em ratos pode-se encontrar osso maduro no terço apical e osso imaturo preenchendo o alvéolo na porção coronal sem a influência de infiltrado inflamatório (YONEDA et al., 2014; GHALAYANI et al., 2014). O processo de reparo ósseo alveolar após exodontia em ratos é considerado completo quando o alvéolo está preenchido por osso trabecular e canais medulares bem definidos, sendo a expressão de marcadores de tecido ósseo maduros prevalente no 21^o dia (KIKUIRI et al, 2010).

Outros pesquisadores estudaram os períodos desde a exodontia até a completa formação do tecido ósseo e verificaram que entre a segunda e terceira semana nenhuma diferença significativa no percentual de neoformação óssea (SHAHABOOEI et al., 2015).

Após a caracterização dos períodos experimentais mais representativos para investigação do efeitos de fármacos que favoreçam a neoformação óssea, foram observados os principais eventos que compõem o reparo do alvéolo dos animais submetidos à exodontia do 1^o MSD e tratados diariamente com DOX 10 e 25 mg/kg (v.o.) (BEZERRA et al., 2002; FRANCO et al., 2011).

Além de comparar a influência de DOX sobre os eventos que precedem e

concorrem para o reparo ósseo alveolar, foi investigada também essa atividade em um contexto pró reabsortivo desencadeado pela administração de DEXA (ALI-ERDEM et al., 2011) concomitantemente ao tratamento com DOX 10 e 25 mg/kg nos períodos de 7 e 14 dias após a remoção do elemento dentário.

Dexametasona é uma droga com potente atividade antiinflamatória e imunossupressora e seu uso prolongado é acompanhado por perda da massa óssea, contribuindo para o desenvolvimento de osteoporose (DIVYA et al., 2015; FREIDOUNI et al., 2015). Entre vários mecanismos descritos na literatura, estudos mostram que esse efeito pode ser explicado por sua atividade sobre o prolongamento do tempo de vida útil de osteoclastos e redução na geração de osteoblastos e osteócitos (CANALIS & DELANY, 2010) incluindo o efeito sobre a indução ao processo de autofagia de osteócitos promovida por esse fármaco (XIA et al. 2010) e inibição da absorção de cálcio no trato gastrintestinal (LEE et al, 2006).

- Infiltrado inflamatório e neoformação óssea

O processo de reparo ósseo alveolar ocorre por primeira intenção e é caracterizado por uma resposta fibroproliferativa onde ocorre a expressão de diversos fatores de crescimento envolvendo a proliferação e diferenciação de fibroblastos, osteoblastos e células endoteliais. Do ponto de vista molecular, nessa etapa, ocorre ativação dos macrófagos linfócitos e células endoteliais, via estímulo de INF- γ , nas fases iniciais (7^o dia após a exodontia) desse processo, levando a uma acentuação na expressão de citocinas pró inflamatórias. Entre elas, TNF- α é uma clássica citocina responsável pela indução da transmigração de células inflamatórias, justificando o influxo de leucócitos para o tecido de granulação desencadeado pelo trauma tecidual (LIEBERMAN et al., 2002; SCHMIDT-BLEEK et al, 2012; VIEIRA et al., 2015). Esse fenômeno orchestra o processo de reparo em todas as suas etapas de angiogênese (LIENAU et al., 2009), remoção de tecido de granulação e formação óssea (JAHANGIRI et al., 1998; VIEIRA et al, 2015).

Estudos mostram que, para ocorrer as fases de transição e substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo, deverá ocorrer a redução dos processo inflamatório e sua persistência acarreta um atraso nesse processo (CARDOSO et al., 2011; KIM et al., 2012). A resolução do processo inflamatório é compreendida e necessária para o avanço do reparo e posterior neoformação óssea

no alvéolo dental (MAAHS et al., 2011). Estudos clínicos e experimentais mostram que a reação inflamatória produz efeitos deletérios sobre o remodelamento ósseo, induzindo a um incremento na reabsorção e decréscimo da formação (BRIOT & ROUX, 2015).

De acordo com Rubin e Gorstein (2006) a fase de reparação óssea inicia-se na primeira semana e é caracterizada por redução na expressão de células de inflamação aguda e diferenciação de células pluripotentes em fibroblastos e osteoblastos. Foi verificado nos alvéolos dos ratos tratados, uma atividade da DOX na sequência de eventos que concorrem para o processo de reparo do alvéolo dentário submetido à exodontia. Ao considerar a presença, tipo e intensidade de infiltrado inflamatório, foi observado (7^o dia) no grupo CTL, presença de infiltrado leucocitário misto, enquanto que o tratamento com DOX reduziu significativamente o infiltrado inflamatório leucocitário. É possível que o tratamento com DOX colabore no processo de reparo ósseo, pois a modulação do processo inflamatório, acelera a remodelação óssea após perda dentária (YONEDA et al., 2014).

- Número de osteoclastos, osteoblastos e percentual de tecido ósseo

A remodelação óssea é iniciada pelo aparecimento de osteoclastos na superfície óssea, desenvolvendo áreas de reabsorção que precedem a neoformação às custas da produção de matriz osteóide e posterior maturação desse tecido. Entretanto, quando há um desequilíbrio entre a fase de reabsorção e neoformação, poderão ocorrer perdas teciduais por um preenchimento incompleto dessas áreas nos alvéolos dentários e a prevenção desse desequilíbrio requer modulação da atividade osteoclástica e adequada disponibilidade de células osteoblásticas, conseqüentemente ocorrerá formação de matriz óssea em resposta aos eventos reabsortivos que ocorrem na fase inicial do processo de remodelamento (GRAVES & COCHRAN, 2011). Embora, no processo inicial do remodelamento ósseo alveolar, a formação óssea seja discreta, fatores osteogênicos como BMPs estão aumentados. Estes fatores, progressivamente possibilitam a resposta inicial no desenvolvimento da mineralização do tecido ósseo. Aos 14 dias do processo de remodelamento ósseo alveolar ocorre o pico na expressão de RUNX-2, o principal fator de diferenciação osteoblástica em resposta ao estímulo local promovido pelas BMPs (VIEIRA et al., 2015).

Há na literatura, diversas referências às propriedades da DOX sobre a expressão de muitos dos fatores que interferem na evolução do processo de reparo ósseo alveolar. Moutsatsos et al., (2001) mostraram que a DOX é capaz de controlar a expressão de BMP-2, regular o processo de angiogênese e a diferenciação osteogênica tanto *in vitro* como *in vivo*, sugerindo que esse análogo de tetraciclina possui atividade sobre a formação e regeneração óssea.

Franco et al., (2011) confirmaram em modelo de calvária em ratos, a eficácia de DOX sobre osteoclastogênese sinalizada por RANKL, inibindo a ação enzimática da MMP-9. Neste mesmo estudo, foi observada *in vitro* que DOX modula a expressão de mRNA de marcadores funcionais dos osteoclastos, incluindo fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e catepsina K.

Em cultura de células com células mesenquimais, Baniwal et al., (2012) concluíram que DOX favorece e controla a diferenciação dos osteoblastos e indiretamente a diferenciação de osteoclastos, por aumentar a expressão de RUNX-2 em pré-osteoblastos.

Folwarczna et al., (2003) investigaram o efeito deletérios causados pela deficiência de estrogênio (ovariectomia bilateral) e o possível efeito de DOX sobre parâmetros ósseos em tíbia de ratas. Os autores descrevem uma inabilidade de DOX em prevenir a osteopenia e a perda óssea (SHIMIZU et al., 1998 e 2000). Alkan et al., (2002) concordam com esses achados, quando estudaram o efeito de DOX em ratos diabéticos. Entretanto, Duivenvoorden et al., (2002) estudaram a histomorfometria óssea em modelo de tumor ósseo e mostraram que DOX aumentou significativamente vários parâmetros de formação óssea nos ossos longos incluindo o volume de tecido osteóide e número de osteoblastos.

No presente trabalho, a análise realizada nos alvéolos dos animais estudados após exodontia, demonstra que o tratamento com DOX foi capaz de reduzir o número de osteoclastos e aumentar o número de osteoblastos, além de ter aumentado o percentual total de tecido ósseo nos alvéolos em todos os grupos tratados, incluído o grupo de animais desafiados aos efeitos pró-reabsortivos de DEXA, concordando com o trabalho de Limirio et al (2015) também observaram diminuição de osteoclastos quando compararam o efeito de DOX aos 7 e 15 dias no modelo de reparo ósseo no fêmur de ratos.

Além disso, os ratos tratados com DOX apresentaram maior produção de tecido osteóide e menor ocorrência de sequestros ósseos. Isso sugere que DOX

além de estimular a neoformação óssea, provém a integridade do tecido ósseo remanescente diante da lesão tecidual causada pelo trauma durante a exodontia ou pela atividade de DEXA sobre a perda óssea.

Estes resultados corroboram aqueles apresentados por Shahabooei et al., (2015) demonstrando por meio de análise histomorfométrica em alvéolos de ratos que houve um incremento na formação tecidual óssea durante o processo de reparo em animais tratados com DOX e Eritromicina.

- Via de sinalização canônica no reparo ósseo alveolar

A via canônica Wnt/ β -catenina é descrita como uma importante via de sinalização para regulação do metabolismo ósseo, pois sua ativação regula níveis intracitoplasmáticos de β -catenina. Intracelularmente, β -catenina ativa e expressa vários genes da linhagem óssea como: Dlx5, Osx e Runx2, além da expressão de OPG HILL et al., 2005). A β -catenina promove um aumento na replicação de pré-osteoblastos (KATO et al, 2002) e contribui para a inibição de processos apoptóticos de osteoblastos e osteócitos (BODINE, 2008) e participa da supressão da osteoclastogênese (RAHMAN et al, 2015).

A inibição ou perda da β -catenina, em células do tecido ósseo, produz severa osteopenia com aumento de osteoclastos e redução da osteoblastogênese (Albers et al., 2013). Osteoblastos produzidos na ausência de β -catenina exibem expressão elevada da RANKL e redução da produção de OPG (CORRADO et al., 2013), mostrando que a β -catenina em osteoblastos maduros regula produção e função dos osteoclastos (HOLMEN et al., 2005). Portanto a via canônica da sinalização WNT/ β -catenina parece estar ligada ao eixo RANK-RANKL-OPG na regulação da homeostasia óssea (SHIN et al., 2005).

Entre várias WNTs que atuam no metabolismo ósseo, WNT10b é descrita como uma das mais importantes na regulação da osteoblastogênese e manutenção da massa óssea. A WNT10b é expressa em células da medula óssea e participa da regulação do metabolismo ósseo e portanto, da massa trabecular e densidade mineral óssea, além dos níveis séricos de osteocalcina (BENNETT et al. 2005).

No presente estudo, a quantificação da imunexpressão de WNT10b nos alvéolos tratados com DOX mostrou significativa superioridade comparada aos grupos CTL tratado com salina e DEXA, justificando a preservação do tecido ósseo

e o estímulo à neoformação encontrada na maioria dos parâmetros avaliados que colaboram para pleno reparo alveolar após a perda do suporte dentário, sugerindo um possível mecanismo de DOX no favorecimento à neoformação tecidual, além de seus reconhecidos efeitos antiinflamatórios e inibidor de metaloproteinases (BEZERRA et al., 2002; GOLUB et al., 1990).

Ressalta-se também, um possível efeito indireto de DOX no aumento da expressão de células positivas para Wnt 10b, pois estudos mostram que há uma interrelação entre o desenvolvimento de reações inflamatórias derivadas de resposta de células do sistema imune e expressão de Wnts, influenciando o processo de reparo ósseo. Sabe-se que mediadores inflamatórios inibem a atividade osteoblástica, estimulam a atividade osteoclástica e a presença de inflamação parece alterar essa via de sinalização (GARLET et al., 2005; GRAVES & COCHRAN, 2011).

O processo inflamatório em doenças como Artrite Reumatóide têm sido intensamente estudado e está diretamente relacionado à destruição do tecido ósseo. Estudos têm identificado que o desenvolvimento de osteoclastos é modulado pela presença de RANKL, OPG e RANK. A ação pró-inflamatória se dá pela ativação do fator de necrose tumoral (TNF) e seu ativador de receptor NF- κ B (RANKL) que interferem na expressão desses moduladores, mediando a sinalização para a reabsorção óssea sobre a formação de células osteoclastos e a ativação de fibroblastos sinoviais (CHOI et al, 2009)

Pesquisas realizada por Almeida et al., (2011) afirmam que a administração de glicocorticóides exerce um papel importante na supressão da via WNT. Essa ação ocorre pela inibição do modulador de GSK-3 e pela *up-regulation* do inibidor de DKK1, resultando em atenuação da sinalização de Wnt em células osteoblásticas. Em nossa pesquisa, os alvéolos dos animais tratados com DOX associada à DEXA, apresentaram um significativo aumento do número de células imunomarcadas comparado ao grupo tratado somente com DEXA, evidenciando o efeito de DOX em suprimir a atividade inibitória dos GCs sobre a via de sinalização de Wnt (DEN UYL et al., 2011).

Finalmente, a via canônica pode ser regulada negativamente por antagonista dos receptores da via de sinalização WNT/ β -catenina. Algumas proteínas secretadas, tais como Dkk (Dickkopf), Sost (esclerostina), e Sfrp (segregada relacionada com proteínas frizzled), podem interagir com Lrp5 / 6 ou

receptor de FZD e atuar como antagonistas, inibindo a via canônica de sinalização Wnt (KUBOTA, MICHIGAMI, OZONO, 2009; NUSSE , 2015).

A quantificação de Dkk-1 nos alvéolos dos animais demonstra que houve uma significativa atividade de DOX em reprimir a expressão dessa proteína, destacando um importante efeito dessa tetraciclina sobre um dos principais reguladores da via canônica WNT/ β -catenina durante a fase de remodelação e reparo alveolar. Sugere que esse efeito é direto, por modular a expressão desse inibidor e também devido a atividade antiinflamatória de DOX. Assim, estudos mostram que os inibidores da via canônica são induzidos por ação de mediadores inflamatórios, como por exemplo, TNF- α (KUBOTA, MICHIGAMI, OZONO, 2009; RAUNER et al., 2013). Embora, os resultados apresentados, não demonstrem um efeito tão expressivo sobre a inibição de Dkk-1 em todos grupos, deve-se considerar que DOX aumentou de forma significativa e em todos os grupos, os níveis de WNT10b que competitivamente poderá suplantará a presença de Dkk-1, favorecendo à neoformação, especialmente na primeira semana de reparo ósseo.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, o modelo de exodontia utilizado no presente trabalho, permitiu investigar parâmetros histológicos e analisar os efeitos de DOX sobre os eventos do processo de reabsorção óssea na terapia com DEXA. DOX reduziu a intensidade de células inflamatórias, principalmente as células polimorfonucleares nos alvéolos nas fases iniciais do processo de remodelamento. Além disso, DOX aumentou a intensidade no grau de remodelamento do tecido conjuntivo, bem como aumentou a produção de tecido osteóide e reduziu o aparecimento de sequestros ósseos. Foi observado também uma importante atividade de DOX na redução do número de osteoclastos, no aumento do número de osteoblastos e percentual de tecido ósseo. Esses efeitos, foram acompanhados por uma aumento na expressão de células osteoblásticas imunomarcadas por Wnt 10b e uma redução na expressão de DKK-1 nos alvéolos dos animais tratados com DOX, sugerindo que DOX exerceu um considerável efeito sobre o microambiente ósseo durante o processo de remodelamento ósseo após a exodontia do 1º MSD em ratos normais e em condições onde há perda da densidade mineral no tecido ósseo.

O presente trabalho sugere uma atividade benéfica de DOX sobre o tecido alveolar, melhorando o reparo tecidual e reduzindo a perda óssea, especialmente sobre os parâmetros estudados nos grupos de animais tratados com DEXA.

Estes resultados corroborados por outros oriundos de nosso laboratório e desenvolvidos com minociclina (tetraciclina de 2ª geração, análogo da DOX) juntamente com outros estudos em modelo de periodontite, mostraram o potencial dessa droga, tendo em vista sua atividade anti-inflamatória e anti reabsortiva no tratamento da doença periodontal.

Por último, é importante ressaltar a necessidade de estudos translacionais enfatizando a possibilidade de utilização da DOX na clínica em patologias como artrite reumatoide e mesmo no diabetes tipo II nas quais a presença de processos inflamatórios é uma constante.

8. CONCLUSÃO

Esta pesquisa verificando os efeitos de DOX no modelo de reparo ósseo alveolar após exodontia do 1º molar superior direito em ratos nos permitiu:

1- Confirmar a natureza da cicatrização óssea intramembranosa do modelo utilizado, observando-se que a 1ª e 2ª semana pós operatória correspondem as fases de reparo mais importantes dentre os períodos de avaliação do processo de neoformação óssea. Tal modelo ofereceu uma cinética semelhante às investigadas em humanos, reforçando a adequação do modelo para estudos de remodelamento ósseo após a perda dentária;

2- Observar que DOX nas doses de 10 mg/kg e 25 mg/kg oferecem um efeito anti-inflamatório e indutor de remodelamento ósseo verificado pelo aumento do número de osteoblastos, redução do número de osteoclastos, bem como no padrão de remodelamento do tecido conjuntivo com produção aumentada de tecido osteóide e redução de áreas de sequestros ósseos;

3- O impacto pró absorptivo desenvolvido pela administração de DEXA foi revertido pelo tratamento com DOX nas doses de 10mg/kg e 25 mg/kg, sugerindo que essa tetraciclina pode oferecer um efeito osteoprotetor sobre os efeitos negativos de DEXA sobre o tecido ósseo;

4- Nos grupos de animais tratados com DOX houve um aumento na imunomarcagem de Wnt 10b e uma redução de Dkk-1, sugerindo um possível papel de DOX na via canônica do reparo ósseo.

Os efeitos de DOX sobre Wnt 10b e Dkk-1 foram demonstrados de maneira inédita. É possível que a potente atividade anti-inflamatória de DOX , já previamente estudada em nosso laboratório possa justificar, pelo menos em parte, os resultados observados no presente trabalho.

São necessários estudos adicionais que reforcem os principais efeitos modulatórios de DOX sobre a expressão de outros fatores que participam do processo de reabsorção óssea diante de estímulos inflamatórios, incluindo a perda dentária.

REFERENCIAS

- ABREU. F. A. M. et al. Effect of PDGF-BB. IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. **Brazilian dental journal**, v. 24, n. 4, p. 299-307, 2013.
- AESCHLIMANN. D.: EVANS. B. A. J. The vital osteoclast: how is it regulated?. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, p. S5-S7, 2004.
- AGAS. D. et al. The dual face of parathyroid hormone and prostaglandins in the osteoimmune system. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 10, p. E1185-E1194, 2013.
- ALBERS J., et al.,. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. **J Cell Biol.** v. 200, n. 4, p. 537-549, 2013.
- ALI-ERDEM. M. et al. Extraction socket healing in rats treated with bisphosphonate: animal model for bisphosphonate related osteonecrosis of jaws in multiple myeloma patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 7, p. e879-83, 2011.
- ALKAN. A. et al. Histomorphometric evaluation of the effect of doxycycline on the healing of bone defects in experimental diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 60, n. 8, p. 898-904, 2002.
- ALMEIDA. M. et al. Glucocorticoids and tumor necrosis factor α increase oxidative stress and suppress Wnt protein signaling in osteoblasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 52, p. 44326-44335, 2011.
- AMADEI. S. U. et al. A influência da deficiência estroadiénica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol méd lab**, v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.
- ANDIA. D. C.: CERRI. P. S.: SPOLIDORIO. L. C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006
- ANDRADE. F. R. et al. Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. **Oral Surg. Oral Medicine. Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 106, n. 4, p. 548-555, 2008.
- ARAÚJO. M. G.: WENNSTRÖM. J. L.: LINDHE. J. Modeling of the buccal and lingual bone walls of fresh extraction sites following implant installation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, n. 6, p. 606-614, 2006.
- BANIWAL. S. K. et al. Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 4, p. 1399-1413, 2012.
- BARÓ. M. A. et al. Alveolar wound healing in rats fed on high sucrose diet. **Acta Odontológica Latinoamericana**, v. 26, n. 2, p. 97-103, 2013
- BAR-SHAVIT, Z. The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. **J Cell Biochem.** v. 102, p. 1130-1139, 2007.
- BASI. D. L. et al. Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Alveolar Extraction Sockets of Zoledronic Acid-Treated Rats. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 11, p. 2698-2707, 2011.

BASTOS, L. F. S. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of DOXycycline and minocycline in different experimental models. **European journal of pharmacology**, v. 576, n. 1, p. 171-179, 2007.

BAUD'HUIN, M. et al. RANKL, RANK, osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 18, p. 2334-2350, 2007.

BELLIDO, T. Osteocyte-driven bone remodeling. **Calcified tissue international**, v. 94, n. 1, p. 25-34, 2014.

BENNETT, C. N. et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 9, p. 3324-3329, 2005.

BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 75-80, 2000.

BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 35, n. 5, p. 613-616, 2002.

BODINE, P. V. N. et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. **Molecular Endocrinology**, v. 18, n. 5, p. 1222-1237, 2004.

BODINE, P. V. N. Wnt signaling control of bone cell apoptosis. **Cell research**, v. 18, n. 2, p. 248-253, 2008.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229-238, 2011.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

BUO, A. M.; STAINS, J. P. Gap junctional regulation of signal transduction in bone cells. **FEBS letters**, v. 588, n. 8, p. 1315-1321, 2014.

BRIOT, K.; ROUX, C. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **RMD Open**, v. 1, n. 1, p. e000014, 2015.

CADIGAN, K. M.; LIU, Y. I. Wnt signaling: complexity at the surface. **Journal of cell science**, v. 119, n. 3, p. 395-402, 2006.

CANALIS, E.; DELANY, A. M. Mechanisms of glucocorticoid action in bone. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 966, n. 1, p. 73-81, 2002. In: XIA, X. et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. **Journal of bone and mineral research**, v. 25, n. 11, p. 2479-2488, 2010.

CARDAROPOLI, G. et al. Healing of extraction sockets and surgically produced-augmented and non-augmented-defects in the alveolar ridge. An experimental study in the dog. **Journal of clinical periodontology**, v. 32, n. 5, p. 435-440, 2005.

CARDOSO, C. L. et al. Experimental dry socket: Microscopic and molecular evaluation of two treatment modalities. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 26, n. 5, p. 365-372, 2011.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia Básica (Texto & Atlas)**. Guanabara-Koogan, 2008.

CARVALHO, D. C. L. et al. Tratamentos não farmacológicos na estimulação da osteogênese. **Rev Saúde Pública**, v. 36, n. 5, p. 647-54, 2002.

CERRI, P. S.; BOABAID, F.; KATCHBURIAN, E. Combined TUNEL and TRAP methods suggest that apoptotic bone cells are inside vacuoles of alveolar bone osteoclasts in young rats. **Journal of periodontal research**, v. 38, n. 2, p. 223-226, 2003.

CERRI, P. S. Osteoblasts engulf apoptotic bodies during alveolar bone formation in the rat maxilla. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v. 286, n. 1, p. 833-840, 2005.

CHAPPUIS, V. et al. Ridge Alterations Post-extraction in the Esthetic Zone A 3D Analysis with CBCT. **Journal of dental research**, v. 92, n. 12 suppl, p. 195S-201S, 2013.

CHOI, Y.; ARRON, J. R.; TOWNSEND, M. J. Promising one-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 10, p. 543-548, 2009.

COBO-VÁZQUEZ, C. et al. Effects of local melatonin application on post-extraction sockets after third molar surgery. A pilot study. **Medicina oral, patologia oral y cirugía bucal**, v. 19, n. 6, p. e628, 2014.

COCHRAN DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J Periodontol**. v. 79, (8 Suppl), p. 1569-1576, 2008.

CORRADO A. et al. RANKL/OPG Ratio and DKK-1 Expression in Primary Osteoblastic Cultures from Osteoarthritic and Osteoporotic Subjects. **J Rheumatol**. v. 40, n. 5, p. 684-694, 2013.

COXON, F. P.; TAYLOR, A. Vesicular trafficking in osteoclasts. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2008. p. 424-433.

DALLAS, S. L.; BONEWALD, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 437-443, 2010.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 5, p. 577-587, 2008.

DE BOSSCHER, K.; BECK, I. M.; HAEGEMAN, G. Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system?. **Brain, behavior, and immunity**, v. 24, n. 7, p. 1035-1042, 2010.

DE BARROS SILVA, P. G. et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 9, p. 1237-1245, 2015.

DE CARVALHO, A. C. P.; OKAMOTO, T. Interferências sistêmicas sobre o processo de reparo em feridas de extração dental. **Rev Odont UNESP**, v. 14, p. 27-33, 1985.
DEL ROSSO, J. Q. Oral Doxycycline in the Management of Acne Vulgaris: Current Perspectives on Clinical Use and Recent Findings with a New Double-scored Small Tablet Formulation. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 8, n. 5, p. 19, 2015.

DEN UYL D, BULTINK IE, LEMS WF. Glucocorticoid-induced osteoporosis. **Clin Exp Rheumatol**. v. 29, (5 Suppl 68), p. S93-98, 2011.

DEVLIN, H. et al. Trabecular bone formation in the healing of the rodent molar tooth extraction socket. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 12, p. 2061-2067, 1997.

DEVLIN, H.: SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 31, n. 6, p. 641-645, 2002.

DI CAPRIO, R. et al. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. **Mediators of inflammation**, v. 2015, 2015.

DIVYA, S. et al. Multiple Adverse Effects of Systemic Corticosteroids: A Case Report. 2015.

DOTTORE, A. M. et al. Stability of Implants Placed in Augmented Posterior Mandible after Alveolar Osteotomy Using Resorbable Nonceramic Hydroxyapatite or Intraoral Autogenous Bone: 12-Month Follow-Up. **Clinical implant dentistry and related research**, v. 16, n. 3, p. 330-336, 2014.

DUIVENVOORDEN, W. C. M. et al. Doxycycline decreases tumor burden in a bone metastasis model of human breast cancer. **Cancer research**, v. 62, n. 6, p. 1588-1591, 2002.

ELSUBEIH, E. S.: HEERSCH, J. N. M. Quantitative assessment of post-extraction healing and alveolar ridge remodelling of the mandible in female rats. **Archives of oral biology**, v. 49, n. 5, p. 401-412, 2004.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219-227, 2010.

ERSAN, N. et al. Teriparatide and the treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: a rat model. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 43, n. 1, p. 20130144, 2013.

ESMAIL, M. Y. et al. Effects of PEMF and glucocorticoids on proliferation and differentiation of osteoblasts. **Electromagn Biol Med**. v. 31, n. 4, p. 375-381, 2012.

FALONI, A. P. de S. et al. Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. **Journal of anatomy**, v. 220, n. 1, p. 77-85, 2012.

FARHAD, S. Z. et al. The effect of adjunctive low-dose DOXycycline and licorice therapy on gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels in chronic periodontitis. **Dental research journal**, v. 10, n. 5, p. 624, 2013.

FENG, X: MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 121, 2011.

FICKL, S. et al. Dimensional changes of the alveolar ridge contour after different socket preservation techniques. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, n. 10, p. 906-913, 2008.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FOLWARCZNA, J.: PYTLIK, M.: JANIEC, W. Effects of doxycycline on development of changes in histomorphometric parameters of bones induced by bilateral ovariectomy in rats. **Polish journal of pharmacology**, v. 55, n. 3, p. 433-442, 2003.

FRANCO, G. C. N et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental cell research**, v. 317, n. 10, p. 1454-1464, 2011.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.: HALL, B. K.: WITTEN, P. Eckhard. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 176-190, 2006.

FREIDOUNI, M. et al. Evaluating Glucocorticoid Administration on Biomechanical Properties of Rats' Tibial Diaphysis. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 17, n. 3, 2015.

GARLET, G. P. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 4, p. 738-747, 2005.

GHALAYANI, P. et al. Effects of diclofenac and celecoxib on osteoclastogenesis during alveolar bone healing, in vivo. **Dental research journal**, v. 11, n. 3, p. 357, 2014.

GIANE, G. K. A. V. S. IV et al. Osso bovino esponioso inorgânico liofilizado em bloco no reparo de fístula oronasal induzida em cães. **Ciência Rural**, v. 37, n. 1, 2007.

GLASS, D. A. et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. **Developmental cell**, v. 8, n. 5, p. 751-764, 2005.

GOES P et al. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol**. v. 57, n. 11, p. 1537-1544, 2012.

GOLUB, L. M. et al. Low-dose DOXycycline therapy: Effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. **Journal of periodontal research**, v. 25, n. 6, p. 321-330, 1990.

GOLUB, L. M. et al. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown: new therapeutic implications for an old family of drugs. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 2, n. 3, p. 297-321, 1991.

GONCALVES DE ARAÚJO, F. R. et al. Perialveolar bacterial microbiota and bacteraemia after dental alveolitis in adult rats that had been subjected to neonatal malnutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 07, p. 996-1005, 2012.

GORUSTOVICH, A. A. et al. Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. **The Anatomical Record**, v. 291, n. 4, p. 441-447, 2008.

GRAVES, D. T.: LI, J.: COCHRAN, D. L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. **Journal of dental research**, v. 90, n. 2, p. 143-153, 2011.

GRIFFIN, M. O. et al. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 299, n. 3, p. C539-C548, 2010.

GRUNDER. U. Crestal ridge width changes when placing implants at the time of tooth extraction with and without soft tissue augmentation after a healing period of 6 months: report of 24 consecutive cases. **International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v. 31, n. 1, p. 9, 2011.

GU. Y. et al. Doxycycline inhibits mononuclear cell-mediated connective tissue breakdown. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 218-225, 2010.

HADJIDAKIS. D. J.: ANDROULAKIS. I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, n. 1, p. 385-396, 2006.

HAMZA. M. et al. Nitric oxide is negatively correlated to pain during acute inflammation. **Mol Pain**, v. 6, p. 55, 2010.

HARDY R, C. M. S. Bone loss in inflammatory disorders. **J Endocrinol**. v. 201, n. 3, p. 309-320, 2009.

HILL. T. P. et al. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. **Developmental cell**, v. 8, n. 5, p. 727-738, 2005.

HOFBAUER. L. C.: HEUFELDER. A. E. Role of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. **Journal of Molecular Medicine**, v. 79, n. 5-6, p. 243-253, 2001.

HOLMEN S. L., et al. Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition. **J Biol Chem**. v. 280, p. 21162–21168, 2005.

HSU. S.. RAINE. L.: FANGER. H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HU H., et al., Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. **Development**. v.132, p. 49–60, 2005.

JAHANGIRI. L. et al. Current perspectives in residual ridge remodeling and its clinical implications: a review. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 80, n. 2, p. 224-237, 1998.

JENSEN. P. R. et al. Premature loss of bone remodeling compartment canopies is associated with deficient bone formation: a study of healthy individuals and patients with Cushing's syndrome. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 4, p. 770-780, 2012.

KATCHBURIAN. E.: CERRI. P. Formação e destruição óssea. **Cardoso RJA. Goncalves EAN. Cirurgia para implantes. São Paulo: Artes Médicas**, p. 437-45, 2002.

KATO, M. et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. **The Journal of cell biology**, v. 157, n. 2, p. 303-314, 2002.

KHAJURIA. D.K. et al. Drugs for the management of osteoporosis: a review. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 51, n. 4, p. 372-382, 2011.

KHOSLA. S. Minireview: The opg/rankl/rank system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, 2001.

KIKUIRI. T. et al. Cell-based immunotherapy with mesenchymal stem cells cures bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1668-1679, 2010.

KIM. D. et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. **Journal of periodontal & implant science**, v. 42, n. 5, p. 158-165, 2012.

KINUGAWA. S. et al. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1772-1781, 2012.

KRAKAUER. T.: BUCKLEY. M. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3630-3633, 2003.

KRAMER. I. et al. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 12, p. 3071-3085, 2010.

KUBOTA.T.: MICHIGAMI. T.: OZONO. K. Wnt signaling in bone metabolism. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 27, n. 3, p. 265-271, 2009.

KUDALKAR. M. D. et al. Effect of Azadirachta indica (Neem) and Aloe vera as compared to subantimicrobial dose DOXycycline on matrix metalloproteinases (MMP)-2 and MMP-9: An in-vitro study. **Ayu**, v. 35, n. 1, p. 85, 2014.

KUROSHIMA. S. et al. Intra-oral PTH administration promotes tooth extraction socket healing. **Journal of dental research**, v. 92, n. 6, p. 553-559, 2013.

LANNA. C. M. M et al. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.

LEE. G. et al. Glucocorticoids differentially regulate expression of duodenal and renal calbindin-D9k through glucocorticoid receptor-mediated pathway in mouse model. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 290, n. 2, p. E299-E307, 2006.

LELLO. S: GUARDIANELLI. F.: MOSCA. L. Bone tissue: hormonal regulating systems, growth factors and remodeling as a target for therapeutic agents in osteoporosis. **Multidisciplinary Journal of Women's Health (MJWH)**, v. 1, n. 1, p. 14-18, 2012.

LI. F: CHONG. Z. Z.: MAIESE. K. Vital elements of the Wnt-frizzled signaling pathway in the nervous system. **Current neurovascular research**, v. 2, n. 4, p. 331, 2005.

LI, Ji et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 4, p. 1566-1571, 2000.

LIEBERMAN. J. R.: DALUISKI. A.: EINHORN. T. A. The role of growth factors in the repair of bone. **The Journal of bone & joint surgery**, v. 84, n. 6, p. 1032-1044, 2002.

LIENAU. J. et al. Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, n. 9, p. 1133-1140, 2009.

LIMIRIO. P. H. J. O. et al. The Effect of Local Delivery Doxycycline and Alendronate on Bone Repair. **AAPS PharmSciTech**, p. 1-6, 2015.

LISBOA. M. R. P et al. Effects of Electroacupuncture on Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of periodontology**, v. 86, n. 6, p. 801-811, 2015.

LIU. C: WU. Z: SUN. H. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor- β 1. bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. **Int J Oral Sci**, v. 1, n. 2, p. 90-98, 2009.

LIU. T. M: LEE. E. H. Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 19, n. 3, p. 254-263, 2012.

LIZUKA et al.. (1992) in: SHAHABOOEI. M. et al. A histomorphometric study of the effect of DOXycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. **Advanced biomedical research**, v. 4, 2015.

LOKESHWAR. B. L. Chemically modified non-antimicrobial tetracyclines are multifunctional drugs against advanced cancers. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 146-150, 2011.

MAAHS. M. P. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head & neck**, v. 33, n. 2, p. 199-207, 2011.

MACDONALD. B. T.: TAMAI. K: HE. X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Developmental cell**, v. 17, n. 1, p. 9-26, 2009.

MACKIE. E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 9, p. 1301-1305, 2003.

MCKAY LI, CIDLOWSKI JA. Cross-talk between nuclear factor- κ B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. **Mol Endocrinol**. v. 12, p. 45-56, 1998.

MANOLAGAS. S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis 1. **Endocrine reviews**, v. 21, n. 2, p. 115-137, 2000.

MARTINS. M. A. T. et al. Osteonecrose dos maxilares associada ao uso de bisfosfonatos: importante complicação do tratamento oncológico. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 1, p. 41-6, 2009.

MARUOTTI. N. et al. Why TNF- α inhibition is not sufficient to avoid iuxta-articular erosions in chronic arthritis?. **Internal and emergency medicine**, v. 7, n. 1, p. 15-20, 2012.

MAVRAGANI, M; BRUDVIK, P; SELVIG, K. A. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic DOXycycline administration in rats. **European journal of orthodontics**, v. 27, n. 3, p. 215-225, 2005.

MELO. R. B. et al. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and low ratio Omega-6: Omega-3 after molar extraction in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 371-375, 2014.

- METZGER. Z. et al. Low-dose DOXycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis. **International endodontic journal**, v. 41, n. 4, p. 303-309, 2008.
- MILLS. L. A.: SIMPSON. A. H. R. W. In vivo models of bone repair. **Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume**, v. 94, n. 7, p. 865-874, 2012.
- MINEAR. S. et al. Wnt proteins promote bone regeneration. **Science translational medicine**, v. 2, n. 29, p. 29ra30-29ra30, 2010.
- MOREJÓN GARCÍA. M.: SALUP DÍAZ. R: CUÉ BRUGUERAS. M. Actualización en tetraciclinas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 37, n. 3, p. 1-1, 2003.
- MOUATSATSOS. I. K. et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. **Molecular Therapy**, v. 3, n. 4, p. 449-461, 2001.
- NARDONE. V.: D'ASTA. F: BRANDI. M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, v. 69, n. 6, p. 438-446, 2014.
- NICCOLI FILHO. W. D. et al. Efeitos da radiação Laser do tipo Hélio-Neônio verde (550 nm) no processo de reparo em feridas de extração dental: estudo histológico em ratos. **Rev Odontol UNESP**, v. 22, p. 213-221, 1993.
- NUSSE. R. "Wnt Signaling." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 4.5 (2012): a011163. **PMC**. Web. 3 Sept. 2015.
- O'DELL. J. R. et al. Treatment of early seropositive rheumatoid arthritis: doxycycline plus methotrexate versus methotrexate alone. **Arthritis & Rheumatism**, v. 54, n. 2, p. 621-627, 2006.
- PAYNE. J. B. et al. The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist's Perspective. **Current oral health reports**, v. 2, n. 1, p. 20-29, 2015.
- PAYNE. J. B.: GOLUB. Lorne M. Using tetracyclines to treat osteoporotic/osteopenic bone loss: from the basic science laboratory to the clinic. **Pharmacological research**, v. 63, n. 2, p. 121-129, 2011.
- PEREIRA-MAIA. E. C. et al. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.
- PIETSCHMANN, P. et al. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. **Gerontology**, 2015.
- RAFFETTO. J. D.: KHALIL. R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 346-359, 2008.
- RAHMAN. M. S. et al. TGF- β /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. **Bone Research**, v. 3, 2015.
- RAISZ. L. G.: RODAN. G. A. Embryology and cellular biology of bone. **Metabolic bone disease and clinically related disorders, 3rd ed. New York: Academic Press**. p, p. 1-22, 1998.
- RAUNER M. et al Advances in osteoimmunology: pathophysiologic concepts and treatment opportunities. **Int Arch Allergy Immunol**. v. 160, n. 2, p. 114-125, 2013.

ROBINSON. J. A. et al. Wnt/ β -catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 42, p. 31720-31728, 2006.

RODRIGUES, M. T. V. et al. Experimental alveolitis in rats: microbiological, acute phase response and histometric characterization of delayed alveolar healing. **Journal of Applied Oral Science**, v. 19, n. 3, p. 260-268, 2011.

ROOMI, M. W. et al. In vitro modulation of MMP-2 and MMP-9 in pediatric human sarcoma cell lines by cytokines, inducers and inhibitors. **International journal of oncology**, v. 44, n. 1, p. 27-34, 2014.

ROSER-PAGE, S. et al. CTLA-4 α -Induced T Cell Anergv Promotes Wnt-10b Production and Bone Formation in a Mouse Model. **Arthritis & rheumatology**, v. 66, n. 4, p. 990-999, 2014.

RUBIN et al.(Ed.). **Rubin patologia: bases clinicopatológicas da medicina**. Guanabara Koogan/GEN, 2006.

RUDNICKI, M. A.; WILLIAMS, B. O. Wnt signaling in bone and muscle. **Bone**, v. 80, p. 60-66, 2015.

SANDLER, C. et al. Chemically modified tetracyclines induce apoptosis in cultured mast cells. **International immunopharmacology**, v. 5, n. 11, p. 1611-1621, 2005.

SAPADIN, A. N.; FLEISCHMAJER, R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 2, p. 258-265, 2006.

SCHMIDT-BLEEK, K. et al. Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. **Cell and tissue research**, v. 347, n. 3, p. 567-573, 2012.

SHAHABOOEI, M. et al. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. **Advanced biomedical research**, v. 4, 2015.

SHALHOUB, V. et al. Characterization of osteoclast precursors in human blood. **British journal of haematology**, v. 111, n. 2, p. 501-512, 2000.

SHIMIZU, M. et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **Journal of electron microscopy**, v. 47, n. 5, p. 517-526, 1998.

SHIMIZU, M. et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. **The Anatomical Record**, v. 259, n. 1, p. 76-85, 2000.

SHIN C. S. et al. Dominant negative N-cadherin inhibits osteoclast differentiation by interfering with beta-catenin regulation of RANKL, independent of cell-cell adhesion. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 12, p. 2200-2212, 2005.

SILVERMAN MN, STERNBERG EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1261, p. 55-63, 2012.

SINHA, K. M.; ZHOU, X. Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 114, n. 5, p. 975-984, 2013.

SODEK. J: MCKEE. M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology** **2000**, v. 24, n. 1, p. 99-126, 2000.

SOORY. M. A role for non-antimicrobial actions of tetracyclines in combating oxidative stress in periodontal and metabolic diseases: a literature review. **The open dentistry journal**, v. 2, p. 5, 2008.

SOUZA. V. C. et al. Osteopontin in bone mineral density of very old Brazilians. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 31, n. 4, p. 449-454, 2013.

TAKAYANAGI. H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **Journal of periodontal research**, v. 40, n. 4, p. 287-293, 2005.

TAKAYANAGI. H. Osteoimmunology and the effects of the immune system on bone. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, n. 12, p. 667-676, 2009.

TAN. S. H. et al. Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 49, p. E5262-E5271, 2014.

TEITELBAUM. S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, 2000.

TEITELBAUM. S. L. RANKing c-Jun in osteoclast development. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 4, p. 463, 2004.

TSENG. H. et al. Bisphosphonate-induced differential modulation of immune cell function in gingiva and bone marrow in vivo; Role in osteoclast-mediated NK cell activation. **Oncotarget**, v. 5, 2015.

TSUTSUMIMOTO. T. et al. TNF- α and IL-1 β Suppress N-Cadherin Expression in MC3T3-E1 Cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 10, p. 1751-1760, 1999.

URUSHIBARA. M. et al. The antirheumatic drug leflunomide inhibits osteoclastogenesis by interfering with receptor activator of NF- κ B ligand-stimulated induction of nuclear factor of activated T cells c1. **Arthritis & Rheumatism**, v. 50, n. 3, p. 794-804, 2004.

VAYSSIERE B. M. et al. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. **Mol Endocrinol**. v. 11, p. 1245-1255, 1997.

VIEIRA. A. E. et al. Intramembranous Bone Healing Process Subsequent to Tooth Extraction in Mice: Micro-Computed Tomography, Histomorphometric and Molecular Characterization. **PLoS one**, v. 10, n. 5, 2015.

WALKER. C. et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on osteopenic bone loss: microbiologic results. **Journal of periodontology**, v. 78, n. 8, p. 1590-1601, 2007.

WANG. Y. et al. Wnt and the Wnt signaling pathway in bone development and disease. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 19, p. 379, 2014.

WEINSTEIN R. S. et al. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. **J Clin Invest**. v. 102, p. 274-282, 1998.

WILLERT. K..NUSSE. R. Wnt proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 9, p. a007864, 2012.

XIA. X. et al. Glucocorticoid-induced autophagy in osteocytes. **Journal of bone and mineral research**, v. 25, n. 11, p. 2479-2488, 2010.

YAO W. et al. Glucocorticoids and osteocyte autophagy. **Bone**. v. 54, n. 2, p. 279-284, 2013.

YONEDA. T. et al. Application of Coenzyme Q10 for Accelerating Soft Tissue Wound Healing after Tooth Extraction in Rats. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5756-5769, 2014.

YORGAN. T. A.: SCHINKE. T. Relevance of Wnt signaling for osteoanabolic therapy. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 1, p. 22, 2014.

ZUPAN J, JERAS M, MARC J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. **Biochem Med (Zagreb)**. v. 23, n. 1, p. 43-63, 2013.