

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

**IRACEMA MATOS DE MELO**

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

**FORTALEZA**

**2012**

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

---

M485e      Melo, Iracema Matos de  
              Efeitos do anastrozol na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas  
              / Iracema Matos de Melo. – 2012.  
              66 f. : il.

              Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia  
              e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2012.  
              Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima

1. Periodontite 2. Ovariectomia 2. Estrogênios 3. Inflamação I. Título.

---

CDD 617.632

**IRACEMA MATOS DE MELO**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra Vilma de Lima

**FORTALEZA**

**2012**

**IRACEMA MATOS DE MELO**

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Odontologia.

Aprovada em 16/02/2012

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vilma de Lima (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Ferreira Carvalho Leitão

Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Prof Dr Sérgio Luis da Silva Pereira

Universidade de Fortaleza - UNIFOR

*A Deus, por seu imenso amor com o qual me  
amou desde a eternidade,*

*Aos meus pais e irmão, pelo amor, apoio e  
compreensão sem os quais não teria conseguido  
alcançar meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

*À minha orientadora, prof<sup>a</sup> Dra Vilma de Lima, por todos esses anos de dedicação, disponibilidade, atenção e paciência. Pela imensa contribuição na minha formação científica e profissional,*

*A todos os professores do Programa e Pós-graduação em Odontologia e do Programa de Pós-graduação em Farmacologia que contribuíram em minha formação científica,*

*Aos professores Gerly Anne de Castro Brito e Ronaldo de Albuquerque Ribeiro pela pronta cessão de seus espaços laboratoriais para realização de algumas fases desse estudo,*

*Aos professores Renata Ferreira Carvalho Leitão, Sérgio Luis da Silva Pereira e Rodrigo Otávio Cito César Rego, por terem aceitado participar da comissão avaliadora desse estudo,*

*A todos os meus colegas do Laboratório de Farmacologia Oral, Ana Patrícia Lima, Paula Goes, Larice Monteiro, Aline Dantas, Ana Cristina Fiallos e Karinn Soares pela contribuição em vários experimentos e companheirismo,*

*Aos alunos de iniciação científica, Mariana Guimarães, Pedro Henrique Acioly, Luciana Cândido, Vilana Araújo, Thayanne Brasil, Camila Carvalho pela participação em diversas fases desse estudo,*

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

*À minha turma de Pós-graduação, pelos bons momentos que passamos juntos,*

*Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará, pelos serviços prestados,*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo suporte financeiro a esse estudo,*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através do Programa de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), pela concessão da bolsa de estudo.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*A Deus, a razão da minha existência e a fonte da minha maior alegria, pela força e capacitação para o desenvolvimento deste estudo,*

*Aos meus pais, Ducelino Gomes de Melo e Dorotéa M<sup>a</sup> Santos Matos de Melo, que mesmo distantes, estão sempre presentes na minha vida, apoiando-me nas minhas decisões e alegrando-se com minhas conquistas,*

*Ao meu irmão, Ivens Matos de Melo, pelo carinho e pelos momentos de descontração que me proporciona,*

*À minha tia, Dalila M<sup>a</sup> dos Santos Matos, e às minhas primas, Diana Alves dos Santos e Aryane Santos de Oliveira, pela pronta disposição a ajudarem-me,*

*A toda à minha família, pela compreensão, amor e ajuda dispensados a mim,*

*A todos os meus amigos, que compreendem a minha ausência em momentos dos quais queria participar, e por toda alegria que me proporcionam.*

“O temor do Senhor é o princípio da ciência; os loucos desprezam a sabedoria e a instrução.”

Provérbios 1.7



## RESUMO

A deficiência de estrógeno tem mostrado aumentar a remodelação óssea, podendo afetar algumas doenças ósseas como a periodontite. A biossíntese desse hormônio é catalisada pela enzima aromatase e sua inibição é importante para terapia do câncer de mama. Os pacientes que usam inibidores da aromatase como o Anastrozol (ANA) mostram maior número de fraturas e menor densidade óssea. Considerando, então, o papel do estrógeno na resposta inflamatória e no metabolismo ósseo, além dos efeitos adversos do ANA e da periodontite ser caracterizada por um processo inflamatório que resulta em perda óssea alveolar, o objetivo desse estudo foi de investigar se o ANA afeta a periodontite em ratas ovariectomizadas. Para isto, o ANA (0,02, 0,1 e 0,5 mg/kg-v.o.) foi avaliado em um modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos durante 11 dias. A periodontite foi analisada através de macroscopia, de histologia e da atividade de mieloperoxidase (MPO). As dosagens séricas de estrógeno, o leucograma, a variação de massa corpórea e as funções hepática, renal e esplênica também foram consideradas. A ovariectomia reduziu os níveis séricos de estrógeno após 14 dias, mas não exacerbou a periodontite ou aumentou a atividade de mieloperoxidase (MPO) quando comparada aos animais falso ovariectomizados (F-OVX). Embora o ANA não tenha aumentado a perda óssea alveolar (POA), a administração deste fármaco por 11 dias aumentou a atividade de MPO. A ovariectomia combinada ou não ao ANA não promoveu nenhuma mudança nas funções hepática, renal ou esplênica, mas causou uma leucocitose promovida por células mononucleares no 11º dia. Os animais ovariectomizados que receberam salina (SAL) também mostraram maior ganho de massa corpórea e a curva de peso do ANA foi similar à curva do SAL. Em conclusão, embora a redução de estrógeno por 25 dias e a administração de ANA por 11 dias não tenha aumentado a POA, o ANA aumentou a atividade de MPO.

**Palavras-chave:** Ovariectomia. Anastrozol. Estrógeno. Inflamação. Periodontite. Ratos.

## ABSTRACT

Estrogen deficiency was shown to increase bone remodeling, may affect some bone diseases as periodontitis. Biosynthesis of this hormone is catalyzed by aromatase enzyme and her inhibition is important for breast cancer therapy. The patients who use aromatase inhibitors as Anastrozole (ANA) show greater number of fractures and lower bone density. Since estrogen role in the inflammatory response and the bone metabolism, besides those adverse effects of ANA and periodontitis is characterized by an inflammatory process that results in alveolar bone loss, the aim of this study was to investigate whether ANA affects the periodontitis in ovariectomized rats. For this, ANA (0.02, 0.1 and 0.5 mg/kg-v.o.) was evaluated in ligature-induced periodontitis for 11 days in ovariectomized rats. Periodontitis was analyzed through macroscopy, histology and by myeloperoxidase (MPO) activity. Serum dosage of estrogen, leukogram, corporal mass variation and liver, renal and spleen functions were also analyzed. The ovariectomy reduced the serum levels of estrogen after 14 days, but did not worsen the periodontitis nor increased MPO activity when compared to sham ovariectomized (S-OVX) animals. Although, ANA did not increase alveolar bone loss (ABL), administration of this drug for 11 days increased the MPO activity. The ovariectomy combined or not with ANA no promoted any changes in liver, renal or spleen functions, but caused leukocytosis promoted by mononuclear cells at 11<sup>th</sup> day. Ovariectomized animals that received saline (SAL) also showed more gain of corporal mass and ANA weight curve were similar to SAL curve. In conclusion, although the estrogen reduction for 25 days and the administration of anastrozole for 11 days did not increase the ABL, the ANA increased the MPO activity.

**Keywords** Ovariectomy. Anastrozole. Estrogen. Inflammation. Periodontitis. Rats.

## LISTA DE ABREVIATURAS

MPO	Mieloperoxidase
TNF	Fator de Necrose Tumoral
IL-	Interleucina
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
PG	Prostaglandina
RANK	Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B
RANKL	Ligante do Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B
OPG	Osteoprotegerina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
ATAC	The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination
ANA	Anastrozol ou Anastrozole
S-OVX	Sham ovariectomized
OVX	Ovariectomizado ou Ovariectomized
SAL	Saline ou Salina
ABL	Alveolar Bone Loss
ANOVA	Análise de Variância
POA	Perda Óssea Alveolar
IgG	Imunoglobulina G
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanino aminotransferase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b>	<b>20</b>
<b>3 CAPÍTULO</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Capítulo 1</b>	<b>21</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>44</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>47</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>55</b>
<b>Apêndice A - Metodologia</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>65</b>
<b>Anexo A – Declaração do Comitê de Ética</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## Periodontite

A periodontite crônica é uma doença oral prevalente (BURT, 2005), onde a porcentagem de brasileiros adultos entre 35 e 44 anos que apresentaram algum problema periodontal, tais como sangramento ou presença de bolsas periodontais, foi de 78,1% no ano de 2003 (SB Brasil, 2004). É uma condição caracterizada pela destruição dos tecidos de sustentação do dente, tais como o ligamento periodontal e o osso alveolar (PAGE; KORNMAN, 1997), sendo o desenvolvimento da gengivite o primeiro passo para a instalação desta doença (LORENCINI *et al.*, 2009). Durante as décadas de 1970 e 1980 grandes avanços foram feitos para elucidar a natureza infecciosa da periodontite, no entanto, na década de 1990 percebeu-se que embora as bactérias sejam essenciais, elas são insuficientes para que a doença ocorra. Assim, os diversos fatores de defesa do hospedeiro, tais como recrutamento de neutrófilos e liberação de citocinas, ativados devido a esse desafio microbiano são responsáveis pela maior destruição observada na periodontite (PAGE; KORNMAN, 1997; KINANE *et al.*, 2011).

Com o objetivo de destruir os patógenos periodontais e em decorrência da interação micro-organismo-hospedeiro, um processo inflamatório é instalado e consiste inicialmente pelo recrutamento de células inflamatórias (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011) com conseqüente aumento dos níveis de mieloperoxidase (MPO) (MENEZES *et al.*, 2005). Tal evento está associado ao aumento da síntese e liberação de diversos mediadores inflamatórios, tais como o de diferentes citocinas como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (ASSUMA *et al.*, 1998; GRAVES; COCHRAN, 2003), IL-6 (JOHANNSEN *et al.*, 2007), IL-18 (OROZCO *et al.*, 2006), bem como da produção de prostaglandinas (PGs) (AIRILAMANSSON *et al.*, 2006) e de óxido nítrico (LEITÃO *et al.*, 2005).

Na periodontite, as citocinas e produtos liberados pelas células inflamatórias, como espécies reativas de oxigênio liberadas por neutrófilos, influenciam a diferenciação e função osteoclásticas, provando a relação entre o estabelecimento de uma resposta inflamatória e o processo de destruição óssea observado na periodontite (NUSSBAUM; SHAPIRA, 2011). A regulação do metabolismo ósseo nesta doença envolve o eixo RANK-RANKL-OPG, sendo RANK o Receptor Ativador

de Fator Nuclear kappa B, RANKL, o seu ligante (Ligante de Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa B) e OPG, osteoprotegerina (COCHRAN, 2008). A literatura relata que algumas citocinas, incluindo aquelas envolvidas na progressão da periodontite como IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$  aumentam a expressão de RANKL e diminuem a expressão de OPG, o que resultaria, então, em reabsorção aumentada do tecido ósseo (NAKASHIMA *et al.*, 2000). De fato, os níveis de RANKL estão aumentados em pacientes com doença periodontal (CROTTI *et al.*, 2003; KAWAI *et al.*, 2006; WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007), enquanto os níveis de OPG encontram-se reduzidos nesses pacientes (CROTTI *et al.*, 2003). Foi demonstrado também que a expressão de RANKL pode ser diretamente aumentada pela presença do patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* (REDDI *et al.*, 2011).

### **Estrógeno e periodontite**

Tem sido relatado que algumas doenças ou condições sistêmicas específicas podem afetar o início, a progressão e a gravidade da doença periodontal, tais como diabetes (CHEN *et al.*, 2010), artrite reumatoide (MIRRIELEES *et al.*, 2010) e menopausa (HAAS *et al.*, 2009). Os efeitos prejudiciais da menopausa na saúde periodontal estão associados às mudanças hormonais típicas desse período, sobretudo à deficiência estrogênica, já que esta se relaciona com o aumento da remodelação óssea (AMES *et al.*, 2010), bem como afeta as respostas inflamatória (KOH *et al.*, 2001) e imune (TYAGI *et al.*, 2011). Especificamente sobre o metabolismo ósseo, a redução nos níveis de estrógeno aumenta o processo de reabsorção óssea pelo o aumento numérico da formação osteoclástica e o tempo de vida dessas células (NAKAMURA *et al.*, 2007; MARTIN-MILLAN *et al.*, 2010). Uma importante citocina relacionada ao aumento da osteoclastogênese durante a deficiência estrogênica é o TNF, principalmente pelo aumento do número de células T produtoras de TNF promovido por esta condição (ROGGIA *et al.*, 2001).

Além do TNF, outras citocinas pró-reabsortivas também podem ser influenciadas pelos níveis de estrógeno. Cheung *et al.* (2003) mostraram uma redução significativa na produção de IL-6, IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  após o tratamento de osteoblastos com estradiol. Ainda, o estrógeno está relacionado com o aumento da expressão e síntese de OPG nos osteoblastos (HOFBAUER *et al.*, 1999) e com a

supressão de RANKL (SHEVDE *et al.*, 2000), de forma que durante a supressão estrogênica, a síntese de OPG encontra-se diminuída e a de RANKL aumentada, o que favorece a diferenciação osteoclástica (D'AMELIO *et al.*, 2008). Especificamente sobre a expressão de OPG e RANKL nos tecidos periodontais, Liang *et al.* (2008) mostraram que quando células do ligamento periodontal são tratadas com estradiol há um aumento de OPG e diminuição de RANKL, indicando que esse hormônio possui propriedade antirreabsortiva no osso alveolar, pela regulação do eixo RANKL/OPG nas células do ligamento periodontal.

Considerando tais efeitos do estrógeno e a etiopatogenia da periodontite crônica compreende-se a relação que é sugerida entre ambas. Justificando ainda essa relação, a presença de receptores de estrógeno nos tecidos periodontais sugere algum efeito desse hormônio no periodonto. Existem dois tipos de receptores de estrógeno, tipo  $\alpha$  e tipo  $\beta$ , codificados por genes dos cromossomos 6 e 14, respectivamente, podendo ser expressados em níveis semelhantes ou com predominância de um subtipo em diferentes tecidos e órgãos (NILSSON; GUSTAFSSON, 2011). Jonsson *et al.* (2004) demonstraram que células do ligamento periodontal possuem receptores de estrógeno, mais especificamente o receptor tipo  $\beta$ . Embora o tratamento dessas células com estradiol não tenha causado aumento na síntese de colágeno ou de DNA por essas células, isto é, não tenha interferido na proliferação das células do ligamento periodontal (JONSSON *et al.*, 2005), tal condição esteve relacionada com a formação aumentada de nódulos mineralizados e com o consequente aumento nos níveis de fosfatase alcalina, um marcador de formação óssea (MORISHITA *et al.*, 1999). Resultados semelhantes também foram observados por Tang *et al.* (2008), em que apesar de detectarem a presença de RNAm do receptor de estrógeno tipo  $\alpha$ , o receptor tipo  $\beta$  foi o subtipo predominante nas células do ligamento periodontal e o único cujos níveis de expressão aumentaram diante de um estímulo osteogênico. Além disso, esses autores também mostraram a formação de nódulos mineralizados após o tratamento combinado das células do ligamento periodontal com um estímulo osteogênico e com estradiol, acompanhada por uma marcação significativa para fosfatase alcalina nessas células (TANG *et al.*, 2008). Receptores de estrógeno do tipo  $\beta$  também são encontrados nas células do tecido ósseo alveolar, tanto em osteoblastos e osteócitos como em osteoclastos, correlacionando-se positivamente com o número

de osteoclastos em apoptose no grupo de células tratadas com estradiol, sugerindo que o estrógeno pode afetar diretamente na homeostase do osso alveolar, incluindo o processo de reabsorção óssea (CRUZOÉ-SOUZA *et al.*, 2009).

De fato, tem sido sugerido que mulheres pós-menopáusicas que não fazem reposição hormonal possuem risco aproximadamente 2 vezes maior de apresentarem periodontite, possuindo um estado periodontal pior que mulheres pré-menopáusicas (HAAS *et al.*, 2009), como também mulheres sob terapia de reposição hormonal parecem ter algum benefício no controle da infecção por periodontopatógenos, tais como *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* (TARKKILA *et al.*, 2010). O efeito da redução de estrógeno na periodontite também tem sido extensamente pesquisado em animais, cuja condição correspondente à menopausa em humanos é obtida por modelos de ovariectomia. Alguns desses estudos mostram maior perda óssea alveolar nos animais ovariectomizados submetidos à periodontite (DUARTE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2010).

### **Inibidores da aromatase**

A síntese do estrógeno é catalisada pela aromatase, uma enzima da superfamília do citocromo P450, que catalisa a conversão dos andrógenos, testosterona e androstenediona, nos estrógenos, estradiol e estrona, respectivamente (SIMPSON *et al.*, 1994). Essa enzima é encontrada em uma variedade de tecidos e órgãos, tais como o ovário (ANTONIO-RUBIO *et al.*, 2011), placenta (KELLIS; VICKERY, 1987), tecido vascular (HARADA *et al.*, 1999), osso (NAWATA *et al.*, 1995), células mesenquimais do tecido adiposo mamário (O'NEILL *et al.*, 1988), cérebro (BALTHAZART *et al.*, 2003) e fígado (CASTAGNETTA *et al.*, 2003), sendo que em mulheres pós-menopáusicas a principal fonte de estrógeno é proveniente de sítios extragonadais (CZAJKA-ORANIEC; SIMPSON, 2010). A expressão e atividade da aromatase estão aumentadas no tecido adiposo mamário maligno em comparação ao tecido normal (CHETRITTE *et al.*, 2000), assim, a inibição dessa enzima configura-se em um importante manejo para o tratamento do câncer de mama positivo para receptores hormonais.

Existem duas modalidades de tratamento farmacológico para prevenir os efeitos do estrógeno, fármacos que têm como alvo os receptores de estrógeno



atuando como antagonistas destes, como o tamoxifeno, e fármacos conhecidos como inibidores da aromatase, que inibem a biossíntese do hormônio (MILLER *et al.*, 2008). Os inibidores da aromatase podem ser classificados em duas categorias: esteróides ou tipo I e não-esteróides ou tipo II. Os compostos esteróides são análogos dos substratos naturais da aromatase, a androstenediona e a testosterona, e ligam-se à enzima através de uma ligação covalente irreversível o que resulta em sua inativação permanente, enquanto os compostos não-esteróides interagem de forma reversível com a aromatase e a inativação sustentada da enzima depende da presença constante do fármaco (OSBORNE; TRIPATHY, 2005). Ainda, de acordo com a cronologia do seu aparecimento os inibidores da aromatase designam-se como de 1ª, 2ª e 3ª geração.

O desenvolvimento dos inibidores da aromatase proporcionou uma alternativa para terapia endócrina adjuvante de mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama e resultou no delineamento de pesquisas clínicas com o propósito de avaliar a eficácia e segurança deste grupo de fármacos em comparação ao tamoxifeno, fármaco padrão para o tratamento adjuvante desta neoplasia (BAUM *et al.*, 2002). Em relação à eficácia, uma meta-análise delineada por DOWSETT *et al.*, (2010) demonstrou que a utilização de inibidores da aromatase como monoterapia ou em combinação com o tamoxifeno está associada à redução das taxas de recorrência do câncer de mama em comparação à monoterapia com tamoxifeno, além da redução da mortalidade devido à doença quando da combinação de inibidores da aromatase com o tamoxifeno. No que concerne à segurança, Amir *et al.* (2011) a partir de uma revisão sistemática com meta-análise concluíram que, comparado ao tamoxifeno, o uso de inibidores da aromatase em mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama em estágio inicial aumenta a probabilidade do desenvolvimento de problemas cardiovasculares e fraturas ósseas, assim como diminui o risco de trombose venosa e carcinoma endometrial.

A partir dessa meta-análise (AMIR *et al.*, 2011) percebe-se, portanto, que os inibidores da aromatase interferem no metabolismo ósseo, aumentando a taxa de fraturas nas pacientes em uso desses medicamentos. Os achados concernentes a esse assunto podem ser encontrados em estudos longitudinais que comparam fármacos inibidores da aromatase específicos ao tamoxifeno, delineados por grandes grupos de pesquisa. O letrozol, por exemplo, é avaliado por um grupo de

pesquisa denominada “Breast International Group (BIG) 1-98” (COATES *et al.*, 2007), o exemestano por “Intergroup Exemestane Study (IES)” (COOMBES *et al.*, 2007) e o anastrozol por um grupo denominado “The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination (ATAC)” (BAUM *et al.*, 2002).

## **Anastrozol**

O anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>), que está no mercado desde 1995, é um potente inibidor da aromatase administrado por via oral. É classificado como inibidor da aromatase não-esteróide de terceira geração e reduz substancialmente a concentração de estrógeno em mulheres pós-menopáusicas com câncer de mama positivo para receptores hormonais (GEISLER *et al.*, 1996). A eficácia e a segurança do anastrozol em comparação ao tamoxifeno têm sido amplamente avaliadas por um grupo de pesquisa denominada grupo ATAC (The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination), tendo sido sua primeira publicação no ano de 2002 (BAUM *et al.*, 2002). No primeiro momento deste ensaio clínico, concluiu-se que o anastrozol era uma opção efetiva e bem tolerada para o tratamento farmacológico endócrino de pacientes com câncer de mama com receptores positivos para hormônio, uma vez que em comparação ao tamoxifeno aumentava a sobrevida livre de doença e diminuía a incidência de câncer de mama contralateral, além de reduzir a incidência de efeitos colaterais, tais como câncer endometrial, sangramento vaginal, eventos cerebrovasculares e tromboembólicos (BAUM *et al.*, 2002). No entanto, já com estes primeiros resultados foi demonstrado que o tratamento com anastrozol aumentava desordens musculoesqueléticas e fraturas, principalmente na coluna (BAUM *et al.*, 2002). Rastelli *et al.* (2011) também relataram tais desordens musculoesqueléticas, incluindo dores musculares, em pacientes que estavam utilizando o anastrozol.

As publicações seguintes do estudo desenvolvido pelo grupo ATAC mostraram resultados semelhantes à primeira no que concerne à eficácia e à segurança do anastrozol quando utilizado como tratamento adjuvante do câncer de mama em mulheres pós-menopáusicas (BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; FORBES *et al.*, 2008; CUZICK *et al.*, 2010). É interessante ressaltar que apesar do anastrozol promover maior sobrevida livre de doença, aumentar o tempo de recorrência e reduzir os casos de câncer de mama contralateral, bem como os de

metástases, a taxa de mortalidade total mostrou-se semelhante a do grupo de pacientes tratadas com tamoxifeno durante 10 anos de estudo (CUZICK *et al.*, 2010). No entanto, o conjunto de dados demonstram a eficácia e segurança superiores do anastrozol em longo-prazo quando comparado ao tamoxifeno. É importante ressaltar ainda que a literatura relata três casos clínicos em que a utilização de anastrozol promoveu alterações hepáticas significantes, como hepatite (ZAPTA *et al.*, 2006; DE LA CRUZ *et al.*, 2007; INNO *et al.*, 2011). Entretanto, efeitos adversos decorrentes do uso do anastrozol nas funções renal e esplênica não foram ainda descritos. De fato, a terapia com anastrozol mostrou-se segura em um paciente que fazia hemodiálise (LANGENEGGER *et al.*, 2006).

Especificamente sobre o efeito do anastrozol no osso, em todas as publicações do grupo ATAC foi relatada a ocorrência aumentada de fraturas devido ao tratamento com anastrozol (BAUM *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; FORBES *et al.*, 2008; CUZICK *et al.*, 2010), que pode ser explicada pela importância do estrogênio no metabolismo ósseo (EASTELL *et al.*, 2006). Desde o início deste ensaio clínico, os pesquisadores envolvidos sugeriram que a menor taxa de fraturas em pacientes tratadas com tamoxifeno devia-se ao efeito protetor deste fármaco no osso (BAUM *et al.*, 2002). Além disso, durante 10 anos deste estudo observou-se que o número de fraturas no quadril foi semelhante entre ambos os grupos de tratamento (BAUM *et al.*, 2002; BAUM *et al.*, 2003; HOWELL *et al.*, 2005; FORBES *et al.*, 2008; CUZICK *et al.*, 2010), sugerindo que o efeito do anastrozol pode ser maior em determinados ossos. Ainda, a ocorrência aumentada de fraturas não perdura após o término do tratamento com anastrozol (CUZICK *et al.*, 2010). No entanto, tais achados clínicos durante a terapia endócrina com anastrozol são importantes, de forma que protocolos sugerem o uso de bisfosfonatos por mulheres com baixa densidade mineral óssea que estão em tratamento com inibidores da aromatase, incluindo o anastrozol (REID *et al.*, 2008).

No ano de 2006, também foram publicados pelo grupo ATAC resultados a respeito do efeito do anastrozol e do tamoxifeno, bem como da associação destes dois medicamentos, na densidade mineral óssea e em marcadores do *turnover* ósseo, indicando que o tratamento com anastrozol diminui a densidade mineral óssea no decorrer de 1 e 2 anos, enquanto o tamoxifeno aumenta esta densidade (EASTELL *et al.*, 2006). Ainda, a densidade mineral óssea de pacientes que

receberam anastrozol apresentou-se menor que em pacientes tratadas com tamoxifeno ou com ambos os fármacos, nos dois momentos avaliados. Essa redução de densidade mineral óssea no grupo tratado com anastrozol foi acompanhada pelo aumento de marcadores do *turnover* ósseo, aumentando alguns marcadores de reabsorção e de formação óssea (EASTELL *et al.*, 2006). Outros estudos também têm demonstrado a redução da densidade mineral óssea em mulheres com câncer de mama e em uso do anastrozol (RASTELLI *et al.*, 2011), justificando os efeitos deste fármaco na integridade óssea e no risco aumentado de fraturas não, somente, por este achado, mas também por ele estar relacionado com a redução da quantidade de osso cortical (SZABO *et al.*, 2011).

Assim, considerando que a deficiência de estrógeno afeta a resposta inflamatória e o metabolismo ósseo, associado ao fato que o anastrozol aumenta o número de fraturas em mulheres pós-menopáusicas, e que a periodontite é caracterizada por um processo inflamatório, a qual resulta em perda óssea alveolar, objetivou-se avaliar se o anastrozol afeta a perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratas ovariectomizadas.

## 2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o efeito do anastrozol na perda óssea alveolar na periodontite induzida em ratas ovariectomizadas. Sendo assim, os objetivos específicos foram:

- Avaliar o efeito do anastrozol (ANA) no periodonto através de análise macroscópica do osso alveolar;
- Avaliar o efeito do ANA no periodonto através de análises histológicas do periodonto;
- Avaliar o efeito ANA no periodonto através de análise da atividade de mieloperoxidase;
- Avaliar o efeito sistêmico do ANA através da análise bioquímica da função hepática;
- Avaliar o efeito sistêmico do ANA através da análise macroscópica do fígado, rim e baço;
- Avaliar o efeito sistêmico do ANA através da análise hematológica e variação de massa corpórea.

### **3 CAPÍTULO**

#### **3.1 Capítulo 1**

**Effects of anastrozole on ligature-induced periodontitis in ovariectomized rats.**

**Iracema Matos Melo, Vilma Lima.**

**Artigo a ser submetido para *Calcified Tissue International*.**

**Original Article****Effects of anastrozole on ligature-induced periodontitis in ovariectomized rats.**

Iracema Matos Melo, Vilma Lima.

Iracema Matos Melo

Department of Clinical Dentistry, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil.

Vilma Lima (corresponding author - ✉)

Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brazil.

Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 - Rodolfo Teófilo – CEP: 60.420-270, Fortaleza – Ceará – Brasil - Tele/fax: +55-85-3366.83.33 – E-mail address: [villima@yahoo.com.br](mailto:villima@yahoo.com.br) and [vilma@ufc.br](mailto:vilma@ufc.br).

**Abstract (150 a 250 palavras)**

Estrogen has an important role in the inflammatory response and bone metabolism may affect some bone diseases as periodontitis which is characterized by an inflammatory process that results in alveolar bone loss. Besides some drugs that inhibit the biosynthesis of estrogen as aromatase inhibitors cause a greater number of fractures and lower bone density. Thus, the aim of this study was to investigate whether anastrozole (ANA), a non-steroidal and third-generation aromatase inhibitor, affects the periodontitis in ovariectomized rats. For this, ANA (0.02, 0.1 and 0.5 mg/kg-v.o.) was evaluated in ligature-induced periodontitis for 11 days in ovariectomized rats. Periodontitis was analyzed through macroscopy, histology and by myeloperoxidase (MPO) activity. Serum dosage of estrogen, leukogram, corporal mass variation and liver, renal and spleen functions were also analyzed. The ovariectomy reduced the serum levels of estrogen after 14 days, but did not worsen the periodontitis nor increase MPO activity when compared to sham ovariectomized (S-OVX) animals. ANA did not increase alveolar bone loss (ABL), but increased the MPO activity. The ovariectomy combined or not with ANA did not promote any changes in liver, renal or spleen functions, but caused leukocytosis promoted by mononuclear cells on the 11<sup>th</sup> day. Ovariectomized animals that received saline (SAL) also showed more gain of corporal mass and ANA weight curve was similar to SAL curve. In conclusion, although the estrogen reduction for 25 days and the administration of anastrozole for 11 days did not increase the ABL, the ANA increased the MPO activity.

**Keywords** Ovariectomy, anastrozole, estrogen, inflammation, periodontitis, rats.



## INTRODUCTION

Estrogen deficiency was shown to increase bone remodeling [1] and to affect immune [2] and inflammatory [3] responses. In animals, the acute effects of estrogen deprivation are modeled by ovariectomy (OVX) that, like menopause in humans, stimulates bone resorption by increasing osteoclast formation [4] and life-span of this cell [4, 5]. It has been reported that the cytokine responsible for augmented osteoclastogenesis during estrogen deficiency is the Tumor Necrosis Factor (TNF), since the OVX upregulates T cell TNF production primarily by increasing the number of TNF-producing T cells [6]. Besides, it has been shown that estrogens stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin (OPG) in osteoblasts [7], and suppress RANK-ligand (RANKL) induced osteoclast differentiation [8]. Thus, during estrogen deficiency, OPG synthesis will be down-regulated and RANKL, which was increased, will cause osteoclast activation [9]. Biosynthesis of estrogen is catalyzed by the cytochrome P450 aromatase enzyme, which catalyzes a complex reaction sequence that results in the conversion of androgens, namely testosterone and androstenedione, into estrogens, estradiol, and estrone, respectively [10]. This enzyme is expressed in a variety of tissues, such as ovary [11], placenta [12], vascular tissue [13], bone [14], mesenchymal cells of the mammary adipose tissue [15], brain [16], and liver [17], and in postmenopausal women, the major source of estrogen is extragonadal sites [18]. On the other hand, expression and activity of aromatase are greatly increased in malignant as compared to normal breast tissue. Besides, intratumoral concentrations of estrogens are also significantly higher than in surrounding normal tissues in breast cancer specimens [19]. Thus, inhibition of aromatase is an appealing target for breast cancer therapy. In fact, aromatase inhibitors are drugs that inhibit the peripheral conversion of androgens to estrogens in postmenopausal women [20]. Anastrozole (Arimidex™), which became available in 1995, is a potent orally active, highly selective, non-steroidal and third-generation aromatase inhibitor that substantially reduces estrogen concentration in postmenopausal women with breast cancer [20]. The efficacy and safety of this drug have been extensively evaluated by a research group called ATAC (The Anastrozole or Tamoxifen Alone or in Combination). The results of this trial have shown that the use of anastrozole is associated with a greater number of fractures [21-25]. Patients treated with anastrozole also show lower bone density [26], which can be important, specially for patients with some bone diseases, as periodontitis and others.

Periodontitis is a prevalent oral disease characterized by destruction of connective tissue and alveolar bone loss [27, 28]. The immune and inflammatory responses are critical to the pathogenesis of periodontitis and are shaped by a number of host-related factors such as neutrophil and cytokines activities [28, 29]. It has been reported that some diseases or systemic conditions may influence the progression and severity of periodontal disease, as diabetes [30], rheumatoid arthritis [31] and menopause [32]. In relation to menopause, estrogen causes an increase in OPG expression and decreased RANKL expression in periodontal ligament cells via estrogen receptor beta, suggesting that estrogen may play an important role in exerting antiresorptive effects on alveolar bone [33]. Considering that estrogen deficiency may affect the inflammatory response and bone metabolism associated to the information that the anastrozole increases the number of fractures in postmenopausal women, and that periodontitis is characterized by an immune-inflammatory process that results in alveolar bone loss, we decided to investigate whether anastrozole affects the ligature-induced periodontitis in ovariectomized rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Forty two female *Wistar* rats (180 to 220 g) from the Federal University of Ceará breeding facility were used throughout the experiments. The animals were maintained on specific cages in temperature-controlled rooms and received water and food ad libitum. All procedures and animal treatment were previously approved by Institutional Ethics Committee of Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil (Protocol number 69/11).

### **Experimental protocol**

Initially, on the day -14, the animals had their ovaries removed or only exposed for the simulation of surgical stress. The ovariectomy surgery was performed as Anbinder *et al.* (2007) [34] with some modification, since a portion of the uterus was not removed. After anesthesia with chloral hydrated (300 mg/kg, i.p.), and trichotomy of the abdominal region, the skin and musculature were incised longitudinally below the last rib, and the ovary was identified and exposed. In the ovariectomized animals, after hemostasis through ligation of uterine tubes, ovaries were excised together surrounding fatty tissue. In the sham ovariectomized animals, the ovaries were replaced. After 14 days of ovariectomy [35], on day 0, the periodontitis was induced as described by Lima *et al.* (2000) [36]. A nylon (000) thread ligature was placed around the cervix of the second left and right upper molar of rats anesthetized with chloral hydrated (300 mg/kg, i.p.). The ligature was then knotted on the vestibular side of the tooth, resulting in a subgingival position on the palatal side and supragingival on the buccal side. The animals were sacrificed after 11 days of periodontitis induction or 25 days of ovariectomy by offset cervical, on day 11.

### **Experimental groups**

Initially, animals were divided into three groups, Normal, S-OVX and OVX. The Normal (n = 7) group did not undergo ovariectomy; S-OVX (n = 7) and OVX (n = 28) were submitted to sham surgery and to bilateral ovariectomy, respectively. Briefly the periodontitis induction, the OVX group was divided into four groups with seven animals each: saline (SAL), that received by gavage sterile saline solution 0.9% (2 ml/kg) 30 minutes before the ligature, and daily for ten days following; anastrozole 0.02 mg/kg (ANA 0.02), anastrozole 0.1 mg/kg (ANA 0.1) and anastrozole 0.5 mg/kg (ANA 0.5), which received by gavage anastrozole (Arimidex<sup>TM</sup>, Astrazeneca, Newark, DE, USA) dissolved in 0.9% saline solution at doses of 0.02, 0.1 and 0.5 mg/kg [37, 38], respectively, 30 minutes before the ligature, and daily for 10 days following, always at the same time. The animals of S-OVX group also received by gavage sterile saline solution 0.9% (2 ml/kg) 30 minutes before the ligature, and daily for 10 days following. The Normal group did not receive any treatment or saline.

### **Serum dosage of estradiol**

On days -14, 0 and 11 blood samples were collected from orbital plexus of ovariectomized animals that received saline by heparinized microcapillary tubes, centrifuged (1,800 g x 10 min), and the supernatants were stocked at -80 °C until dosage of estradiol. Estradiol serum concentration was quantitated by automated chemiluminescence assay (Advia Centaur XP Siemens) with a sensitivity of 7.0 pg/ml.

### Macroscopic study of bone tissue

The animals were sacrificed after 11 days of periodontitis induction by offset cervical, and maxillae removed and fixed in 10% neutral formalin for 24 h. The left maxillary half of all groups was then dissected, and stained with aqueous methylene blue (1%) in order to differentiate bone from teeth. In order to quantify alveolar bone loss (ABL), hemimaxillae were suitably placed in microscope slides to be photographed with a digital camera Nikon™ (Nikon D40, Melville, NY, USA). The acquired image was sent to the computer program Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA) for alveolar bone loss analysis, which was measured using a modified method described by Goes *et al.* (2010) [39]. For this, measurements were made along the region between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest by an experienced and calibrated examiner in a single-blind fashion. All obtained images were compared to millimeter well-known area (0.5x0.5 mm<sup>2</sup>).

### Histological procedures

The animals were sacrificed after 11 days of periodontitis induction by offset cervical, and maxillae removed and fixed in 10% neutral formalin for 24 h. The right maxillary half of Normal, S-OVX, SAL and ANA 0.5 were demineralized in 7% formic acid (Merck®, Jacarepaguá, RJ, Brazil) for 10 days. Following this, the specimens were dehydrated, embedded in paraffin, and sectioned (sections of 4 µm thickness) along the molars in a mesio-distal plane for Hematoxylin and Eosin stain.

### Histometric analysis

The furcation area of the second molars was evaluated by light microscopy (x40) and an image was taken of this region. The acquired image was sent to the computer program Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA) for alveolar bone loss analysis. For this, three linear measurements were made between the bone crest and the tooth surface. All obtained images were compared to millimeter well-known measurement (1 mm).

### Histological analysis

The histological analysis was made as previously described [36, 40]. The area between the first and second molars, where a ligature had been placed, was evaluated by light microscopy (x40 and x400). Parameters such as inflammatory cell influx, osteoclast number, and alveolar bone and cementum integrity were analyzed by an experienced and calibrated histologist in a single-blind fashion and graded using a well described score system as follows: **Score 0:** absence of or only discrete cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration is sparse and restricted to the region of the marginal gingiva), few or absence of osteoclasts, preserved alveolar process and cementum; **Score 1:** moderate cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present all over the insert gingiva), presence of some osteoclasts, minor alveolar process resorption and intact cementum; **Score 2:** accentuated cellular infiltration (inflammatory cellular infiltration present in both gingival and periodontal ligament), presence of osteoclasts, accentuated degradation of the alveolar process, and partial destruction of cementum; **Score 3:** accentuated cellular infiltration and total destruction of alveolar process and cementum. The data were expressed as the median value followed by range (smaller-larger) of scores [36, 40].

### **Myeloperoxidase (MPO) activity**

MPO activity, a marker for neutrophil presence in inflamed tissue, was also evaluated in sample of gingival tissue, using methodology described by Lima et al. (2005) [41]. At sacrifice, Normal, S-OVX, SAL and ANA 0.5 groups of animals had a sample of their challenged gingival of left maxillary half removed for analysis of MPO activity. The specimens were stored at -80 °C until required for assay. For this, the gingival was weighed and triturated using a polytron Ultraturax in ice-cold buffer solution [50 mM NaPO<sub>4</sub>, 0.5% (w/v) hexadecyltrimethylammonium bromide (H-TAB) solid] homogenized, frozen and thawed, and centrifuged at 4 °C for 20 min (2,717 g). After that, the aliquot was centrifuged (2,717 g) for 10 minutes at 4 °C and held the determination of the MPO activity following the kinetics of the reaction front to hydrogen peroxide. In a 96-channels 7 µl of supernatant from each sample and 200 µl of coloring reagent were added and prepared just before use and composed of ortho-dianisidine hydrochloride (0.167 mg/ml) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0.0005% (w/v) in phosphate buffer (50 mM, pH 6.0). Then, the MPO activity was determined by reading absorbance at 450 nm and values were expressed as amount of MPO activity per gram of tissue.

### **Systemic parameters**

#### *Serum dosage of Transaminases (AST and ALT)*

On day 11 of the assay, blood samples were collected from orbital plexus of Normal, S-OVX, SAL and ANA 0.5 groups of animals by heparinized microcapillary tubes, centrifuged (1,800 g x 10 min), and the supernatants were stocked at -80 °C until biochemical analysis. Liver function was evaluated through serum dosage of Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT). Specific kits were used, and methodology followed manufacturer orientations (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, MG, Brazil).

#### *Liver, renal and spleen indexes*

At sacrifice, the liver, left kidney and spleen of Normal, S-OVX, SAL and ANA 0.5 groups of animals were removed and weighed. Values were expressed as the index of the respective organ (wet weight of each organ divided by the weight of the animal on the day of sacrifice) [42].

#### *Leukogram*

On days -14, 0 and 11 the leukogram of Normal, S-OVX and OVX (SAL and ANA 0.5) groups of animals were made. The method used for the analysis of white blood cell counts, as well as its subpopulation (neutrophil and mononuclear cells) was as follows: 20 µl of blood, taken from the rat tail, was added to 380 µl Turk solution. Total white blood cell counts were performed using a Neubauer chamber and the differential counts were made using smears stained by rapid Instant Prov Stain Set<sup>®</sup> (Newprov Produtos para Laboratório; Pinhais, PR, Brazil).

#### *Corporal mass variation*

Animals of Normal, S-OVX, OVX (SAL and ANA 0.5) groups had their body mass measured throughout the experimental period. Values were expressed as corporal mass variation with respect to its initial mass or the mass prior to induction of periodontitis, as appropriated

**Statistical analysis**

The data were presented as mean±standard error of the mean (SEM) or median (and range), where appropriate. Analysis of variance (Anova) followed by Bonferroni's test were used to compare means, and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare medians. A  $P < 0.05$  value was considered as indicating significant differences. All calculations were performed using GraphPad Prism 5 software (GraphPad Prism™, Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS

The removal of the ovaries significantly reduced ( $P < 0.05$ ) the amount of circulating estrogen after 14 days of ovariectomy by 31.2%, when compared to baseline levels, and that lasted until the 11<sup>th</sup> day after the induction of periodontitis by 33.2% (Fig. 1). Macroscopically, the experimental periodontitis induced by ligature around the cervix of second upper molars of rats during 11 days caused a significant ( $P < 0.05$ ) alveolar bone loss in Sham ovariectomized (S-OVX) animals when compared to Normal group (Table 1) inducing root exposition and furcation lesion (Fig. 2a and d). The reduction of seric estrogen promoted by ovariectomy did not increase alveolar bone loss in ovariectomized animals that received saline (SAL), when compared to S-OVX group (Table 1), with macroscopic aspect similar to that observed in S-OVX group (Fig 2d and g). To corroborate these data, the second molar furcation area was evaluated by histometry, and it was observed that the ligature induced a significant ( $P < 0.05$ ) alveolar bone loss in S-OVX animals by 287.5%, when compared to normal group (Table 1). Besides, ovariectomy did not increase bone loss in the furcation area compared to S-OVX (Table 1). Histological analysis (Table 1) also showed significant ( $P < 0.05$ ) differences in the area between the first and second molars of rats submitted to periodontitis and Normal animals. The ligature caused an important cell infiltration and intense destruction of alveolar bone, cementum and periodontal ligament after 11 days of periodontitis in S-OVX (Fig. 2e and f) and SAL (Fig. 2h and i) animals, receiving median scores of 3 (1-3) and 2 (1-3), respectively, compared to Normal maxillae (Table 1), which presented minimal cell infiltration and alveolar bone, cementum and periodontal ligament preservation (Fig. 2 b and c), receiving a median score of 0 (0-1). There were no significant histological differences between groups S-OVX and SAL (Table 1). In addition, the 11 days of experimental periodontitis showed an increase ( $P < 0.05$ ) of myeloperoxidase (MPO) activity in gingival tissues in both S-OVX and SAL groups, when compared to normal rats (Fig. 3), by 409.2% and 411.8%, respectively. The reduction in seric estrogen induced by ovariectomy seemed in SAL group did not increase MPO activity when compared to S-OVX group, even under periodontitis (Fig. 3).

Systemically, the analysis of serum levels of transaminase aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) showed no change after 25 days of experiment when compared to Normal group, which was not submitted to ovariectomy nor to periodontitis (Table 2). In accordance to these findings S-OVX and SAL groups showed no significant changes in liver index (Table 2). The renal and spleen indexes of the S-OVX and SAL animals also showed no change in these organs (Table 2). The sham ovariectomy and ovariectomy surgeries caused an important ( $P < 0.05$ ) leukocytosis observed from day 0, day of periodontitis induction, until day 11 compared to day -14 and to normal group on the 11<sup>th</sup> day (Fig. 4a). The leukocytosis in S-OVX group was due to neutrophilia on days 0 and 11 (Fig. 4c), whereas in ovariectomized animals (SAL) on day 11 lymphomonocytosis was also observed (Fig. 4e). The experimental periodontitis did not increase the number of total leukocytes (Fig. 4a and b), neutrophils (Fig. 4c and d) or mononuclear cells (Fig. 4e and f) on day 11 when compared to the time before the ligature (day 0). After sham ovariectomy and ovariectomy surgeries, the animals showed reduction of corporal mass, following the normal curve of weight in the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> days after this procedure for SAL and S-OVX animals, respectively (Fig. 5a). Besides, SAL group gained more weight ( $P < 0.05$ ) than S-OVX group, showing a tendency ( $P > 0.05$ ) to gain more weight than the animals in normal group (Fig. 5a). The animals submitted to periodontitis (SAL and S-OVX) also presented reduction of body weight

after placement of the ligature, but while the S-OVX animals only followed the normal curve on the 3<sup>rd</sup> day after ligature, SAL animals remained with the weight similar to the normal group (Fig. 5a).

### **Effect of anastrozole (ANA)**

Table 1 shows the macroscopic aspect of the effect of anastrozole (ANA 0.02, 0.1 or 0.5 mg/kg-v.o.) in ovariectomized animals submitted to 11 days of experimental periodontitis. It was observed that anastrozole did not increase alveolar bone loss compared to ovariectomized animals that received saline (SAL) only, showing root exposition and furcation lesion similar to that observed in SAL group (Fig. 2g and j). Complementarily to these analyses, the histometric study confirmed that the reduction of seric estrogen promoted by ovariectomy combined with anastrozole did not increase bone loss in the furcation area compared to SAL (Table 1). This table also shows that the highest dose of anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) in the periodontium did not increase the cell infiltration, destruction of the alveolar bone, the cementum or the periodontal ligament in interproximal region on the 11<sup>th</sup> day, when compared to SAL group. However, the daily administration of ANA 0.5 mg/kg-v.o. by the same time demonstrated an important ( $P < 0.05$ ) increase in myeloperoxidase (MPO) activity in gingival tissues, when compared to SAL animals (Fig. 3), by 269.3%.

Systemically, anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) did not show significant changes in serum levels of AST and ALT (Table 2) compared to SAL or Normal levels. To confirm the liver function, its respective index was assessed and this analysis showed no important alteration (Table 2) when compared to SAL or Normal groups. The highest dose of anastrozole also did not cause any changes in renal and spleen indexes compared to the respective indexes of SAL or Normal groups (Table 2). According to these findings, anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) caused no significant changes in the number of total leukocytes (Fig. 4b), neutrophils (Fig. 4d) or mononuclear cells (Fig. 4f) when compared to the non treated group (SAL) or immediately before the beginning of this treatment (day 0). Besides, the group of rats treated with anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) showed an initial corporal mass loss ( $P < 0.05$ ) after placement of the ligature compared to Normal body weight curve, but did not cause any alteration in mass corporal variation compared to SAL (Fig. 5b).

## DISCUSSION

In this study, we have shown that 14 days after ovariectomy, the serum levels of estradiol decreased significantly and remained low for the next 11 days. These data are in accordance with a previous study demonstrating that one week after removal of the ovaries, the serum levels of estradiol dropped rapidly and remained stable for 3 weeks following [35]. Biosynthesis of this hormone is catalyzed by aromatase enzyme [10], which is expressed in a variety of tissues, not only in the ovaries [18]. Thus, the use of anastrozole (Arimidex™), a potent orally active, highly selective, non-steroidal and third-generation aromatase inhibitor promotes a further reduction in the concentration of estrogen in postmenopausal women [20]. Considering that the estrogen deficiency affects the bone metabolism, improving the process of bone resorption by increased osteoclast formation and life-span of this cell [4, 5], we decided to evaluate the effects of anastrozole in a short-term ligature-induced periodontitis in ovariectomized rats. The periodontitis was induced by ligature two weeks after ovariectomy as previously reported by Liu *et al.* (2010) [35] and coinciding with low levels of estrogen, but the reduction of the serum estrogen promoted only by ovariectomy did not increase the alveolar bone loss, nor cementum and periodontal ligament destruction or inflammatory infiltration in rats submitted to 11 days of periodontitis. Although studies show that estrogen deficiency in ovariectomized rats is associated with increased alveolar bone loss [35, 43], other studies did not find significant differences between ovariectomized and sham ovariectomized rats under periodontitis with respect to the alveolar bone loss, even with 30 days of ligature [44, 45]. Besides, it was found that the reduction in the synthesis of estrogen promoted by ovariectomy associated to anastrozole did not increase bone loss, cell infiltration, destruction of cementum and periodontal ligament. The effect of anastrozole had not yet been evaluated in a periodontitis model, then these data are important because although clinical studies show that this drug is associated to a greater number of fractures [21-25] and lower bone density [26], its use did not affect a short-term of experimental periodontitis. Additionally, in contradiction with the clinical results this drug and letrozole applied in intact female rats for 16 weeks did not change femoral and vertebral bone mineral density [38]. Besides, in ovariectomized rats, the anastrozole did not abrogate androstenedione-induced bone protective effect [46]. Thus, the clinical and experimental findings to anastrozole are apparently different. Since there was no difference between doses of anastrozole in the macroscopic study of alveolar bone loss, the highest dose tested of this drug was chosen for remaining analyzes, including for systemic evaluation.

The myeloperoxidase (MPO) activity in gingival tissue was performed to confirm the findings about the inflammatory process underlying periodontitis since this enzyme is used as a marker for neutrophil presence in inflamed tissue [41]. In accordance to histological results that revealed an intense inflammatory infiltrate in animals submitted to periodontitis, the ligature of the second molar for 11 days increased MPO activity compared to Normal animals. Although the histological pattern of the animals that received anastrozole has been similar to no treated animals (S-OVX and SAL), the MPO activity in gingival tissue was significantly higher in those animals, suggesting that ovariectomy associated with anastrozole administration were able to increase the activity of this enzyme. In fact, the literature shows the role of estrogen in the inflammatory process, including the reduction in MPO activity by supraphysiological doses of  $17\beta$ -estradiol in mice with colitis induced by dinitrobenzene sulfonic acid [47] and the increase in MPO levels aggravated by ovariectomy in sepsis model [48]. This is an important finding, because although the alveolar bone loss had not been affected by 11 days



anastrozole administration, this drug increased MPO activity in this period, suggesting that anastrozole increased neutrophil presence in gingival tissue. Besides, this cell participates in the process of bone destruction that is hallmark of periodontitis through release of oxygen radicals, which are considered responsible for osteoclast activation [49]. Therefore, the short-time administration of anastrozole in spite of not having caused greater alveolar bone loss, increased the inflammatory response underlying to resorptive bone process of periodontitis.

Systemically, although the literature reports three cases of hepatotoxicity due to anastrozole [50-52] the low levels of estrogen induced by ovariectomy alone or combined with anastrozole did not cause any alteration in liver function, demonstrated by the respective index and by liver transaminases levels. The ovariectomy alone or combined with anastrozole also did not induce any changes in renal and splenic functions, showed by their indexes. The surgical procedures of sham ovariectomy and ovariectomy promoted an important leukocytosis due to an increase in neutrophils, suggesting that surgical manipulation of the animals caused these changes. However, on day 11, the amount of mononuclear cells in ovariectomized animals was significantly higher when compared with normal animals or with their baseline values. This increase in the number of mononuclear cells can be explained by the estrogen deficiency effect in the production of lymphocytes. Although our results did not show changes in spleen index, studies have shown that ovariectomy increases the frequency of T and B cells in the bone marrow and in the secondary lymphoid organ as spleen [2, 53]. Besides, the periodontitis induction and combination of anastrozole with ovariectomy did not promote any alteration in the number of leukocytes, thus the data indicate that the administration of anastrozole for 11 days did not increase the effect of estrogen reduction on leukogram of animals. The sham ovariectomy and ovariectomy surgeries even as periodontitis induction induced an initial corporal mass loss. In fact surgical procedures can induce corporal mass loss in animals, in accordance to this Lima *et al.* (2004) [40] observed that periodontitis induction caused weight loss. However, ovariectomized rats showed a tendency to gain more corporal mass than normal animals and gained more weight than S-OVX rats. Moreover, anastrozole group presented similar body weight curve to ovariectomized animals that received saline. Other experimental studies show that low levels of estrogen are associated with more gain corporal mass and obesity in female and male animals [54, 55]. Stubbins *et al.* (2011) [56] also show that ovariectomized mice had a higher propensity of gaining weight and adipocyte diameter even as estrogen supplementation caused minimal change in body weight, similar to non ovariectomized mice, and decreased adipocyte diameter.

In conclusion, although 25 days of ovariectomy alone or combined with the administration of anastrozole for 11 days did not increase the alveolar bone loss in a short-term ligature-induced periodontitis in rats, the ovariectomy combined with anastrozole increased the myeloperoxidase activity, which indicates an increase in the inflammatory response underlying to resorptive bone process of periodontitis.

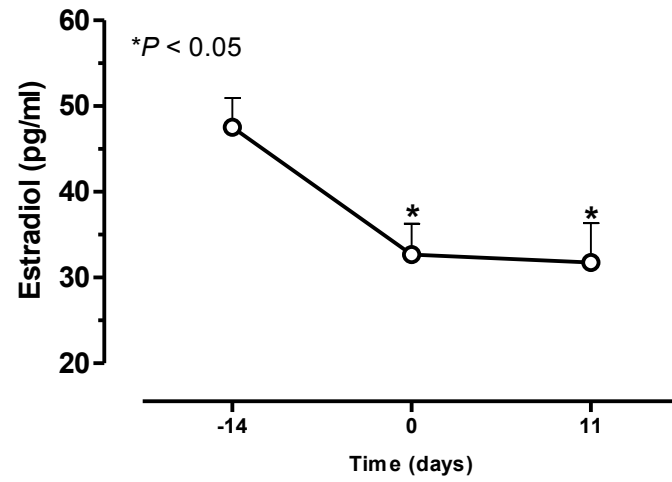
## REFERENCES

1. Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim DG (2010) Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol* 55(8):599-605
2. Tyagi AM, Srivastava K, Sharan K, Yadav D, Maurya R, Singh D (2011) Daidzein prevents the increase in CD4+CD28null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect. *PLoS One* 6(6):e21216
3. Koh KK, Soh JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK (2001) Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *Int J Cardiol* 81(1):43-50
4. Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, Jilka RL, O'Brien CA, Manolagas SC (2010) The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol* 24(2): 323-334
5. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, Harada Y, Azuma Y, Krust A, Yamamoto Y, Nishina H, Takeda S, Takayanagi H, Metzger D, Kanno J, Takaoka K, Martin TJ, Chambon P, Kato S (2007) Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 130(5):811-823
6. Roggia C, Gao H, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R (2001) Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):13960-13965
7. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology* 140(9): p. 4367-4370
8. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW (2000) Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7829-7834
9. D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza SZ, Cristofaro MA, Tamone C, Gribaldi G, Ulliers D, Pescarmona GP, Isaia G (2008) Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. *Bone* 43(1):92-100
10. Simpson ER, Mahendroo MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Graham-Lorence S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CM, Bulun SE (1994) Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15(3):342-355
11. Antonio-Rubio NR, Guerrero-Estévez SM, Lira-Romero E, Moreno-Mendoza N (2011) Expression of 3beta-HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. *J Mol Histol* 42(6): 535-543
12. Kellis JTJ, Vickery LE (1987) Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. *J Biol Chem* 262(9): 4413-4420
13. Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H, Takagi Y (1999) Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res* 84(11):1285-1291

14. Nawata H, Tanaka S, Tanaka S, Takayanagi R, Sakai Y, Yanase T, Ikuyama S, Haji M (1995) Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6):165-174
15. O'Neill JS, Elton RA, Miller WR (1988) Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296(6624): p. 741-743
16. Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Cornil CA, Ball GF(2003) Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5):367-379
17. Castagnetta LA, Agostara B, Montalto G, Polito L, Campisi I, Saetta A, Itoh T, Yu B, Chen S, Carruba G (2003) Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells. *Cancer Res* 63(16):5041-5045
18. Czajka-Oraniec I, Simpson ER (2010) Aromatase research and its clinical significance. *Endokrynol Pol* 61(1):126-134
19. Chetrite GS, Cortes-Pietro J, Philippe JC, Wright F, Pasqualini JR (2000) Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 72(1-2):23-27
20. Geisler J, King N, Dowsett M, Ottestad L, Lundgren S, Walton P, Kormeset PO, Lonning PE (1996) Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer. *Br J Cancer* 74(8):1286-1291
21. Baum M, ATAC Trialist' Group (2002) Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet* 359(9324):2131-2139
22. Baum M, ATAC Trialist' Group (2003) Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer* 98(9):1802-1810
23. Howell A, ATAC Trialist' Group (2005) Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 365(9453):60-62
24. Forbes JF, ATAC Trialist' Group (2008) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 9(1):45-53
25. Cuzick J, ATAC Trialist' Group (2010) Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. *Lancet Oncol* 11(12):1135-1141
26. Rastelli AL, Taylor ME, Gao F, Armamento-Villarreal R, Jamalabadi-Majidi S, Napoli N, Ellis MJ (2011) Vitamin D and aromatase inhibitor-induced musculoskeletal symptoms (AIMSS): a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Breast Cancer Res Treat* 129(1):107-116
27. Burt B (2005) Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol* 76(8):1406-1419
28. Page RC, Kornman KS (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol* 2000 14: 9-11

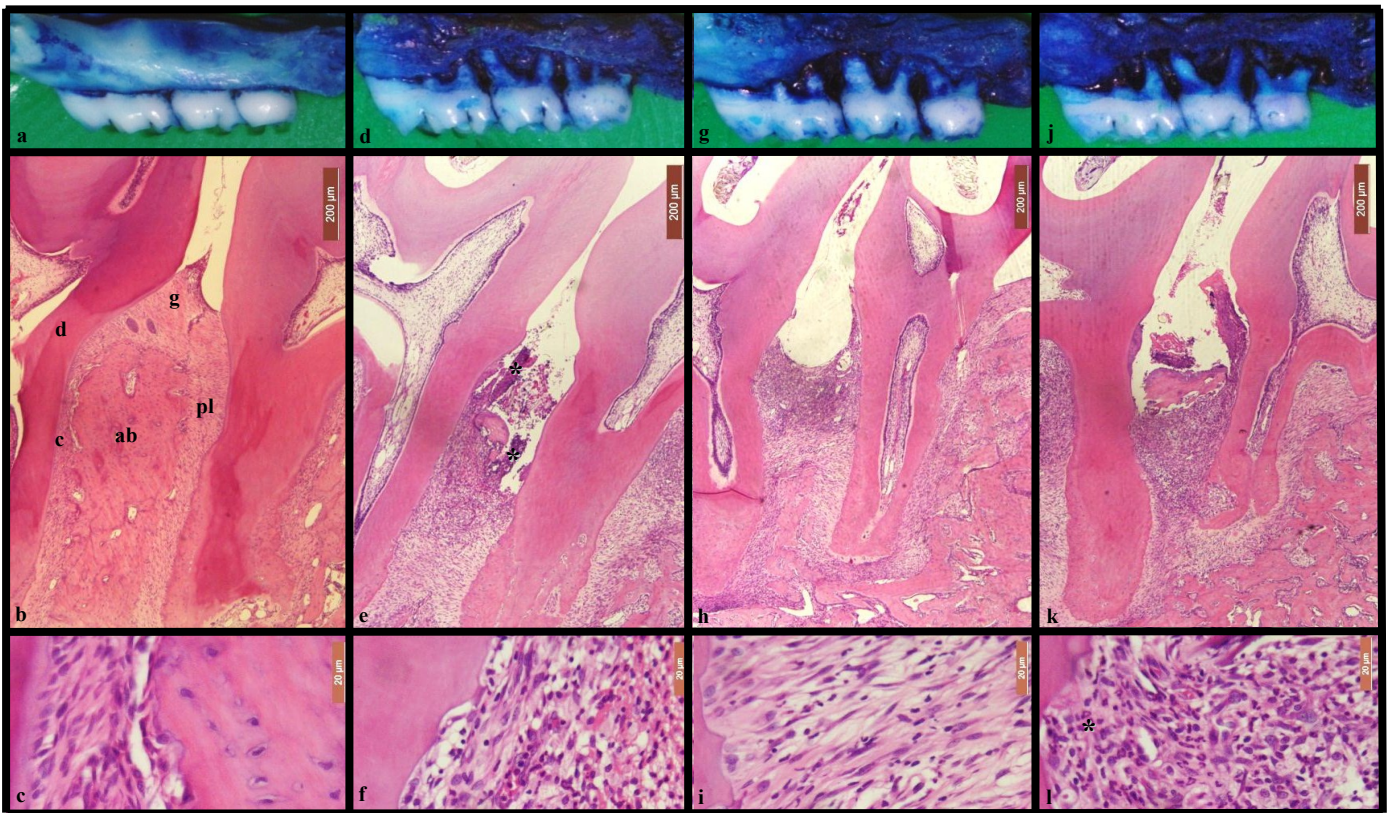
29. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG (2011) Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions - consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38(Suppl 11):44-48
30. Chen L, Wei B, Li J, Liu F, Xuan D, Xie B, Zhang J (2010) Association of Periodontal Parameters With Metabolic Level and Systemic Inflammatory Markers in Patients With Type 2 Diabetes. *J Periodontol* 81(3):364-371
31. Mirrieeles J, Crofford LJ, Lin Y, Kryscio RJ, Dawson DR, Ebersole JL, Miller CS (2010) Rheumatoid arthritis and salivary biomarkers of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 37(12):1068-1074
32. Haas AN, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C (2009) Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. *J Periodontol* 80(9):1380-1387
33. Liang L, Yu JF, Wang Y, Ding Y (2008) Estrogen Regulates Expression of Osteoprotegerin and RANKL in Human Periodontal Ligament Cells Through Estrogen Receptor Beta. *J Periodontol* 79(9):1745-1751
34. Anbinder AL, Prado F de A, Prado M de A, Balducci I, Rocha F (2007) The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. *Braz Oral Res* 21(3):247-252
35. Liu S, Cheng Y, Fan M, Chen D, Bian Z (2010) FSH aggravates periodontitis-related bone loss in ovariectomized rats. *J Dent Res* 89(4):366-371
36. Lima V, Bezerra MM, Alencar VBM, Vidal FDP, Rocha FAC, Brito GAC, Ribeiro RA (2000) Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. *Eur J Oral Sci* 108(2):123-129
37. Hozumi Y, Hakamata Y, Sasanuma H, Ogura S, Nagai H (2002) Effects of anastrozole on lipid metabolism compared with tamoxifen in rats. *Breast Cancer Res Treat* 76(2):131-136
38. Kumru S, Yildiz AA, Yilmaz B, Sandal S, Gurates B (2007) Effects of aromatase inhibitors letrozole and anastrozole on bone metabolism and steroid hormone levels in intact female rats. *Gynecol Endocrinol* 23(10):556-561
39. Goes P, Lima APS, Melo IM, Rêgo ROCC, Lima V (2010) Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. *Braz Dent J* 21(3):193-198
40. Lima V, Vidal FD, Rocha FA, Brito GA, Ribeiro RA (2004) Effects of tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in short-term experimental periodontal disease in rats. *J Periodontol* 75(1):162-168
41. Lima V, Brito GAC, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BAA, Augusto RF, Souza MLP, Leitão BT, Ribeiro RA (2005) Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci* 113(3):210-217
42. Silva LMCM, Lima V, Holanda ML, Pinheiro PG, Rodrigues JAG, Lima MEP, Benevides NMB (2010) Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from marine red alga *Pterocladia capillacea*. *Biol Pharm Bull* 33(5):830-835
43. Duarte PM, Assis DR, Casati MZ, Sallun AW, Sallun EA, Nociti FH Jr (2004) Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *J Periodontol* 75(9):1196-1202

44. Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP (2005) Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol* 50(4):421-429
45. Vaziri H, Naserhojjati-Roodsari R, Tasili-Fahadan N, Khojasteh A, Mashhadi-Abbas F, Eslami B, Dehpour AR (2007) Effect of simvastatin administration on periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *J Periodontol* 78(8):1561-1567
46. Lea CK, Flanagan AM (1998) Physiological plasma levels of androgens reduce bone loss in the ovariectomized rat. *Am J Physiol* 274(2 Pt 1):E328-335
47. Verdu EF, Deng Y, Bercik P, Collins SM (2002) Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283(1):G27-36
48. Albayrak A, Uyanik MH, Odabasoglu F, Halici Z, Uyanik Z, Bayir Y, Albayrak F, Albayrak Y, Polat B, Suleyman H (2011) The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. *J Surg Res* 169(1): 67-75
49. Nussbaum G, Shapira L (2011) How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? *J Clin Periodontol* 38(Suppl 11):49-59
50. Inno A, Basso M, Vecchio FM, Marsico VA, Cerchiaro E, D'Argento E, Bagalà C, Barone C (2011) Anastrozole-related acute hepatitis with autoimmune features: a case report. *BMC Gastroenterol* 11:32
51. Zapata E, Zubiaurre L, Bujanda L, Piérola A (2006) Anastrozole-induced hepatotoxicity. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 18(11):1233-1234
52. de La Cruz L, Romero-Vazquez J, Jiménez-Sáenz M, Padron JR, Herrerias-Gutierrez JM (2007) Severe acute hepatitis in a patient treated with anastrozole. *Lancet* 369(9555):23-24
53. Garcia-Perez MA, Noguera I, Hermenegildo C, Martínez-Romero A, Tarín JJ, Cano A (2006) Alterations in the phenotype and function of immune cells in ovariectomy-induced osteopenic mice. *Hum Reprod* 21(4):880-887
54. Chen Y, Heiman ML (2001) Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280(2): E315-22
55. Christoffersen BO, Gade LP, Golozoubova V, Svendsen O, Raun K (2010) Influence of castration-induced testosterone and estradiol deficiency on obesity and glucose metabolism in male Gottingen minipigs. *Steroids* 75(10):676-684
56. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Nunez MP (2011) Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 14(1):58-66

**Figure 1**

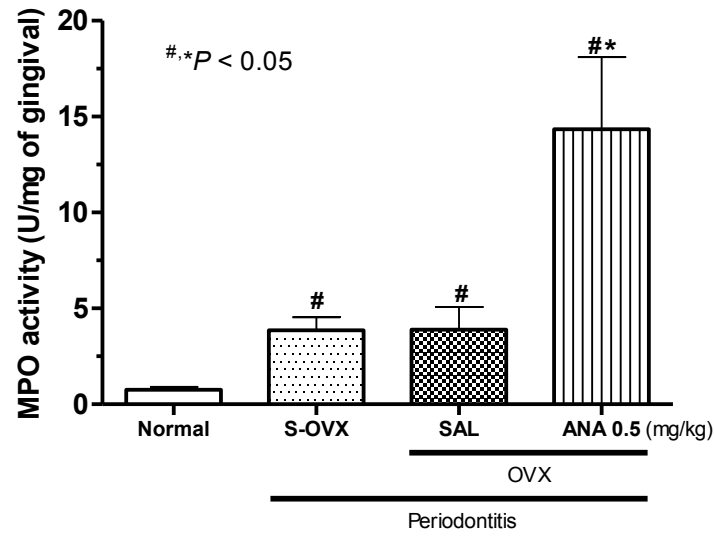
**Fig. 1** Effect of ovariectomy on serum levels of estradiol. Ovariectomized animals that received saline (Saline group) were examined at days -14, 0 and 11. Data represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of estradiol x pg/ml of 4 animals. \* $P < 0.05$  compared to day -14 [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

Figure 2



**Fig. 2** Macroscopic and Histological aspects of Normal rat maxilla (a, b and c) or periodontium of Sham ovariectomized (d, e and f) animals submitted to ligature-induced periodontitis or Ovariectomized animals also submitted to ligature-induced periodontitis, receiving by gavage (v.o.) Saline (g, h and i), or Anastrozole 0.5 mg/kg (ANA) (j, k and l), respectively. Animals received Saline or ANA, 30 min before periodontitis induction, and daily for 11 d. After the animals were killed, the left maxillary half were then processed for macroscopic analysis comparing the area between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest to a well known area ( $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ ). For histological analyses, the right maxillary half maxillae were processed for Hematoxylin and Eosin staining (40 x and 400 x magnification). g, pl, c, d and ab mean gingivae, periodontal ligament, cementum and alveolar bone, respectively. Asterisks indicate leukocyte infiltration.

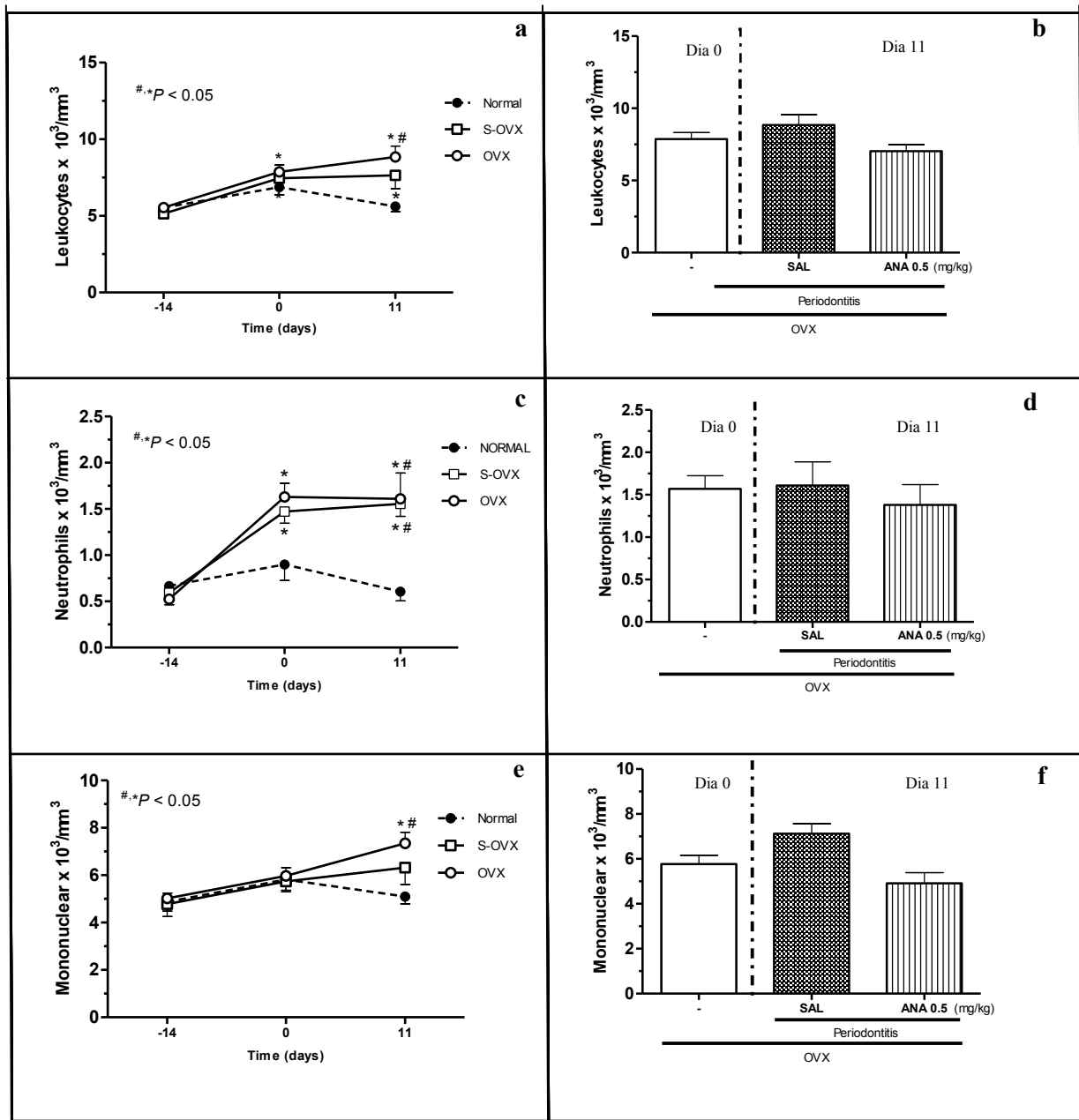
Figure 3



**Fig. 3** Effects of ovariectomy (OVX) and of anastrozole (ANA) on mieloperoxidase (MPO) activity per gram of gingival. The groups of animals Normal, Sham ovariectomized (S-OVX), Saline (SAL) and Anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) were examined at day 11. Bars represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of Myeloperoxidase (MPO) activity per gram of tissue of 7 animals per group. # $P < 0.05$  compared to Normal group and \* $P < 0.05$  compared to Saline (SAL). [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

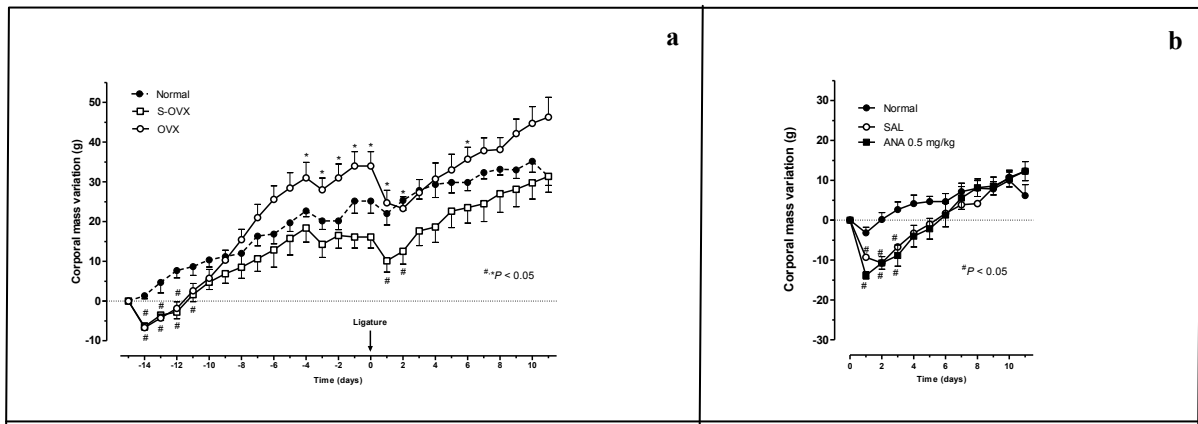


Figure 4



**Fig. 4** Effects of ovariectomy (OVX) (a, c and e) and of anastrozole (ANA) (b, d and f) on leukocyte counts of rats. The groups of animals Normal, Sham ovariectomized (S-OVX) and Ovariectomized rats that received saline (OVX) were examined at days -14, 0 and 11 (a, c and e). The groups of ovariectomized animals that received Saline (SAL) and Anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) were examined at days 0 and 11. SAL and ANA 0.5 mg/kg-v.o. were compared with values of all ovariectomized rats at day 0 (-) (b, d and f). Points or bars represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of total leukocytes (a and b), neutrophils (c and d) and mononuclear cells (e and f)  $\times 10^3/\text{mm}^3$ . # $P < 0.05$  compared to Normal and \* $P < 0.05$  compared to day -14. [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

Figure 5:



**Fig. 5** Effects of ovariectomy (OVX) (a) and of anastrozole (ANA) (b) on corporal mass variation. The body weight of groups of animals Normal, Sham ovariectomized (S-OVX) and Ovariectomized rats that received saline (OVX) was measured daily for 25 days (a). The body weight of groups of ovariectomized animals that received Saline (SAL) and Anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) was measured daily for 11 days (b). Points represent the mean value  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of corporal mass variation (g) with respect to its initial mass. # $P < 0.05$  compared to Normal group and \* $P < 0.05$  compared to S-OVX. [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

Table 1

Table 1: Macroscopic, Histometric and Histopathological Analysis of Rat Maxillae submitted to Periodontitis.

Analysis	Groups					
	Normal	S-OVX	SAL	ANA 0.02 mg/kg-v.o.	ANA 0.1 mg/kg-v.o.	ANA 0.5 mg/kg-v.o.
Macroscopic (mm <sup>2</sup> )	-	5.28 ± 0.44 <sup>#</sup>	4.68 ± 0.37 <sup>#</sup>	5.15 ± 0.19 <sup>#</sup>	5.40 ± 0.38 <sup>#</sup>	5.08 ± 0.39 <sup>#</sup>
Histometric (mm)	0.08 ± 0.01	0.31 ± 0.05 <sup>#</sup>	0.28 ± 0.03 <sup>#</sup>	-	-	0.29 ± 0.03 <sup>#</sup>
Histological (scores)	0 (0-1)	3 (1-3) <sup>#</sup>	2 (1-3) <sup>#</sup>	-	-	2 (1-3) <sup>#</sup>

Ovariectomy was performed and ligature-periodontitis was induced in rats. The groups of animals Normal, Sham ovariectomized (S-OVX), Saline (SAL) and Anastrozole (ANA 0.02, 0.1 and 0.5 mg/kg-v.o.) were examined at day 11. Macroscopic and histometric data represent the mean value ± standard error of the mean (SEM) of alveolar bone loss on vestibular side and on the furcation area, respectively, of 7 rats per group [Analysis of variance (anova) and Bonferroni tests]. For histological analysis, region between the first and second molars of right maxillary half in seven animals was considered. The data are expressed as the median value followed by range (smaller-larger) of scores [Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests]. <sup>#</sup>*P* < 0.05 compared to Normal group.

Table 2

**Table 2: Effects of ovariectomy and of anastrozole (ANA) on systemic parameters of ovariectomized rats submitted to a periodontitis.**

Analysis	Groups			
	Normal	S-OVX	SAL	ANA 0.5 mg/kg-v.o.
AST (U/l)	161.7 ± 10.9	147.8 ± 7.5	133.4 ± 7.1	133.8 ± 10.7
ALT (U/l)	95.0 ± 4.0	93.7 ± 8.5	98.6 ± 6.8	97.1 ± 9.5
Liver index	0.035 ± 0.002	0.039 ± 0.002	0.033 ± 0.002	0.032 ± 0.001
Renal index	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.00009	0.003 ± 0.00005
Spleen index	0.003 ± 0.0004	0.003 ± 0.0004	0.003 ± 0.0001	0.003 ± 0.0002

Ovariectomy was performed and ligature-periodontitis was induced in rats. The groups of animals Normal, Sham ovariectomized (S-OVX), Saline (SAL) and Anastrozole (ANA 0.5 mg/kg-v.o.) were examined at day 11. Data represent the mean value ± standard error of the mean (SEM) of serum total transaminases aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) x U/l and of liver, renal and spleen indexes, calculated as ratio between the wet weight of organ and corporal mass of animal, of 7 rats per group. [Analysis of variance (anova) and Bonferroni's test].

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A deficiência de estrógeno aumenta o processo de reabsorção óssea, potencialmente alterando doenças que afetam o metabolismo ósseo, como a periodontite, de forma que estudos experimentais em animais mostram que a remoção dos ovários está associada com o agravamento da periodontite induzida (DUARTE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2010). Buscou-se, portanto, demonstrar que a redução nos níveis séricos promovida pela ovariectomia em ratas resultaria em maior perda óssea alveolar em modelo de periodontite induzida por ligadura. No entanto, o grupo de animais ovariectomizados apresentou perda óssea alveolar semelhante à do grupo de animais em que os ovários foram somente expostos e reposicionados na cavidade abdominal. Este resultado corrobora alguns estudos que também mostram que a indução da periodontite em ratas ovariectomizadas não aumenta a perda óssea alveolar (MARQUES *et al.*, 2005; VAZIRI *et al.*, 2007). Assim, sugerimos que em curto prazo, a redução estrogênica não afeta a perda óssea alveolar na periodontite induzida por ligadura em ratas.

A respeito do efeito do anastrozol na periodontite, embora o seu uso na clínica para o tratamento do câncer de mama esteja associado a um número elevado de fraturas (BAUM *et al.*, 2002) e a uma menor densidade mineral óssea (RASTELLI *et al.*, 2011), a administração deste fármaco por 11 dias em ratas ovariectomizadas não aumentou a perda óssea alveolar na periodontite experimental. Apesar dos achados clínicos relatados, alguns estudos em animais também mostram que o tratamento com o anastrozol não esteve associado à redução da densidade mineral óssea (LEA; FLANAGAN, 1998; KUMRU *et al.*, 2007). Acreditamos, portanto, que os achados clínicos e experimentais são conflitantes, pelo menos em parte, no que concerne ao efeito deste fármaco no metabolismo ósseo, o que pode ser explicado, no entanto, pelo maior tempo de utilização do anastrozol nos ensaios clínicos. Considerando que os achados clínicos mostram o risco de fratura mais elevado em determinados ossos (BAUM *et al.*, 2002) e dada à escassez de estudos em animais que analisem o efeito do anastrozol no tecido ósseo, pareceu-nos importante a avaliação do efeito do anastrozol no osso alveolar. Assim, os resultados deste estudo são relevantes, pois demonstram que a utilização do anastrozol por 11 dias não esteve associada ao aumento da perda óssea alveolar. É interessante ressaltar os dados encontrados para atividade de

mieloperoxidase (MPO) nos animais tratados com anastrozol, embora a redução de estrógeno promovida pela ovariectomia não tenha aumentado a atividade dessa enzima, quando esta redução foi somada à administração do anastrozol, houve um aumento significativo da atividade de MPO, indicando o papel do estrógeno no processo inflamatório inclusive naquele subjacente à periodontite.

## **5 CONCLUSÃO**

A ovariectomia por 25 dias, combinada com a administração de anastrozol por 11 dias, apesar de não ter causado perda óssea alveolar significativa na periodontite induzida por ligadura em ratas em um curto período de tempo, aumentou a atividade de MPO, o que denota aumento da resposta inflamatória presente.

## REFERÊNCIAS

- AIRILA-MANSSON, S.; SODER, B.; KARI, K.; MEURMAN, J. H. Influence of combinations of bacteria on the levels of prostaglandin E<sub>2</sub>, interleukin-1beta, and granulocyte elastase in gingival crevicular fluid and on the severity of periodontal disease. J. Periodontol., v.77, n.6, p.1025-1031, 2006.
- ALBAYRAK, A.; UYANIK, M. H.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; UYANIK, A.; BAYIR, Y.; ALBAYRAK, F.; ALBAYRAK, Y.; POLAT, B.; SULEYMAN, H. The effects of diabetes and/or polymicrobial sepsis on the status of antioxidant enzymes and pro-inflammatory cytokines on heart, liver, and lung of ovariectomized rats. J. Surg. Res., v.169, n.1, p. 67-75, 2011.
- AMES, M. S.; HONG, S.; LEE, H. R.; FIELDS, H. W.; JONHSTON, W. M.; KIM, D.G. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. Arch. Oral Biol., v.55, n.8, p.599-605, 2010.
- AMIR, E.; SERUGA, B.; NIRLAULA, S.; CARLSSON, L.; OCAÑA, A. Toxicity of adjuvant endocrine therapy in postmenopausal breast cancer patients: a systematic review and meta-analysis. J. Natl. Cancer Inst., v.103, n.17, p.1299-1309, 2011.
- ANBINDER, A. L.; PRADO, F. A.; PRADO, M. A.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R. F. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. Braz. Oral Res., v.21, n.3, p.247-252, 2007.
- ANTONIO-RUBIO, N. R.; GUERRERO-ESTEVEZ, S. M.; LIRA-ROMERO, E.; MORENO-MENDOZA, N. Expression of 3 $\beta$ -HSD1 and P450 Aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. J. Mol. Histol., v.42, n.6, p.535-543, 2011.
- ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. J. Immunol., v.160, n.1, p.403-409, 1998.
- BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; CHARLIER, T. D.; CORNIL, C.A.; BALL, G. F. Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., v.86, n.3/5, p.367-379, 2003.
- BAUM, M. ATAC Trialist' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. Lancet, v.359, n.9324, p.2131-2139, 2002.
- BAUM, M. ATAC Trialist' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. Cancer, v.98, n.9, p.1802-1810, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003 - resultados principais. Brasília, 2004.



BURT, B. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. J. Periodontol., v.76, n.8, p.1406-1419, 2005.

CASTAGNETTA, L. A.; AGOSTARA, B.; MONTALTO, G.; POLITO, L.; CAMPISI, I.; SAETTA, A.; ITOH, T.; YU, B.; CHEN, S.; CARRUBA, G. Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells. Cancer Res., v.63, n.16, p.5041-5045, 2003.

CHEN, Y.; HEIMAN, M. L. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., v.280, n.2, p.E315-322, 2001.

CHEN, L.; WEI, B.; LI, J.; LIU, F.; XUAN, D.; XIE, B.; ZHANG, J. Association of periodontal parameters with metabolic level and systemic inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. J. Periodontol., v.81, n.3, p.364-371, 2010.

CHETRITE, G. S.; CORTES-PRIETO, J.; PHILIPPE, J. C.; WRIGHT, F.; PASQUALINI, J. R. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., v.72, n.1/2, p.23-27, 2000.

CHEUNG, J.; MAK, Y. T.; PAPAIONNOU, S.; EVANS, B. A. J.; FOGELMAN, I.; HAMPSON, G. Interleukin-6 (IL-6), IL-1, receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin production by human osteoblastic cells: comparison of the effects of 17-beta oestradiol and raloxifene. J. Endocrinol., v.177, n.3, p.423-433, 2003.

CHRISTOFFERSEN, B.O.; GADE, L. P.; GOLOZOUBOVA, V.; SVENDSEN, O.; RAUN, K. Influence of castration-induced testosterone and estradiol deficiency on obesity and glucose metabolism in male Gottingen minipigs. Steroids, v.75, n.10, p.676-684, 2010.

COATES, A. S. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. J. Clin. Oncol., v.25, n.5, p.486-492, 2007.

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

COOMBES, R. C. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomised controlled trial. Lancet, v.369, n.9561, p.559-570, 2007.

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

CRUZOÉ-SOUZA, M.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. J. Anat., v.215, n.6, p.673-681, 2009.

CUZICK, J. ATAC Trialist' Group. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol., v.11, n.12, p.1135-1141, 2010.

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

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

DE LA CRUZ, L.; ROMERO-VAZQUEZ, J.; JIMÉNEZ-SÁENZ, M.; PADRON, J. R.; HERRERIAS-GUTIERREZ, J. M. Severe acute hepatitis in a patient treated with anastrozole. Lancet, v.369, n. 9555, p.23-24, 2007.

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

DUARTE, P. M.; DE ASSIS, D. R.; CASATI, M. Z.; SALLUN, A. W.; SALLUN, E. A.; NOCITI, F. H. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. J. Periodontol., v.75, n.9, p.1196-1202, 2004.

EASTELL, R. ATAC Trialist' Group. Effect of an aromatase inhibitor on bmd and bone turnover markers: 2-year results of the Anastrozole, Tamoxifen, Alone or in Combination (ATAC) trial (18233230). J. Bone Miner. Res., v.21, n.8, p.1215-1223, 2006.

FORBES, J. F. ATAC Trialist' Group. Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial. Lancet Oncol., v.9, n.1, p.45-53, 2008.

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

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

GOES, P.; LIMA, A. P.; MELO, I. M.; RÊGO, R. O. C. C.; LIMA, V. Effect of Atorvastatin in radiographic density on alveolar bone loss in wistar rats. Braz. Dent. J., v.21, n.3, p.193-198, 2010.

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

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

HARADA, N.; SASANO, H.; MURAKAMI, H.; OHKUMA, T.; NAGURA, H.; TAKAGI, Y. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. Circ. Res., v.84, n.11, p.1285-1291, 1999.

HOFBAUER, L. C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C R.; LACEY, D. L.; SPELSBERG, T. C.; RIGGS, B. L. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. Endocrinology, v.140, n.9, p.4367-4370, 1999.

HOWELL, A. ATAC Trialist' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. Lancet, v.365, n.9453, p.60-62, 2005.

HOZUMI, Y.; HAKAMATA, Y.; SASANUMA, H.; OGURA, S.; NAGAI, H. Effects of anastrozole on lipid metabolism compared with tamoxifen in rats. Breast Cancer Res. Treat., v.76, n.2, p.131-136, 2002.

INNO, A.; BASSO, M.; VECCHIO, F. M.; MARSICO, V. A.; CERCHIARO, E.; D'ARGENTO, E.; BAGALÀ, C.; BARONE, C. Anastrozole-related acute hepatitis with autoimmune features: a case report. BMC Gastroenterol., v. 11, p.32, 2011.

JOHANNSEN, A.; RYDMARK, I.; SODER, B.; ASBERG, M. Gingival inflammation, increased periodontal pocket depth and elevated interleukin-6 in gingival crevicular fluid of depressed women on long-term sick leave. J. Periodontal Res., v.42, n.6, p.546-552, 2007.

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

JONSSON, D.; WAHLIN, A.; IDVALL, I.; JOHNSON, I.; BRATTHALL, G.; NILSSON, B. O. Differential effects of estrogen on DNA synthesis in human periodontal ligament and breast cancer cells. J. Periodontal Res., v.40, n.5, p.401-406, 2005.

KAWAI, T.; MATSUYAMA, T.; HOSOKAWA, Y.; MAKIHIRA, S.; SEKI, M.; KARIMBUX, N. Y.; GONÇALVES, R. B.; VALVERDE, P.; DIBART, S.; LI, Y. P.;

MIRANDA, L. A.; ERNST, C. W.; IZUMI, Y.; TAUBMAN, M. A. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. Am. J. Pathol., v.169, n.3, p.987-998, 2006.

KELLIS, J. T.; VICKERY, L. E. Purification and characterization of human placental aromatase cytochrome P-450. J. Biol. Chem., v.262, n.9, p.4413-4420, 1987.

KINANE, D. F.; PRESHAW, P. M.; LOOS, B. G. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. J. Clin. Periodontol., v.38, Suppl. 11, p.44-48, 2011.

KOH, K. K.; SON, J. W.; AHN, J. Y.; LEE, S. K.; HWANG, H. Y.; KIM, D. S.; JIN, D. K.; AHN, T, H.; SHIN, E. K. Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. Int. J. Cardiol., v.81, n.1, p.43-50, 2001.

KUMRU, S.; YILDIZ, A. A.; YILMAZ, B.; SANDAL, S.; GURATES, B. Effects of aromatase inhibitors letrozole and anastrozole on bone metabolism and steroid hormone levels in intact female rats. Gynecol. Endocrinol., v.23, n.10, p.556-561, 2007.

LANGENEGGER, T.; WAHL, P.; SCHIESSER, D.; THÜRLIMANN, B. Plasma levels of tamoxifen, N-desmethyl tamxifen and anastrozole in a patient with metastatic breast cancer and chronic hemodialysis. Breast Cancer Res. Treat., v.100, n.2, p.177-181, 2006.

LEA, C. K.; FLANAGAN, A. M. Physiological plasma levels of androgens reduce bone loss in the ovariectomized rat. Am. J. Physiol., v.274, n.2, p. E328-335, 1998.

LEITAO, R. F.; RIBEIRO, R. A.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A. C.; LIMA, V.; BRITO, G. C. B. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J. Periodontol., v.76, n.6, p.956-963, 2005.

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

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

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

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

LORENCINI, M.; SILVA, J. A.; ALMEIDA, C. A.; BRUNI-CARDOSO, A.; CARVALHO, H. F.; STACH-MACHADO, D. R. A new paradigm in the periodontal disease progression: gingival connective tissue remodeling with simultaneous collagen degradation and fibers thickening. Tissue Cell, v.41, n.1, p.43-50, 2009.

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

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

MENEZES, A. M.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V.; CARVALHO, C. B. M.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. J. Periodontol., v.76, n.11, p.1901-1909, 2005.

MILLER, W. R.; BARTLETT, J.; BRODIE, A. M.; BRUEGGEMEIER, R. W.; DI SALLE, E.; LONNING, P. E.; LIOMBART, A.; MAASS, N.; MAUDELONDE, T.; SASANO, H.; GOSS, P. E. Aromatase inhibitors: are there differences between steroidal and nonsteroidal aromatase inhibitors and do they matter? Oncologist, v.13, n.8, p.829-837, 2008.

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

MORISHITA, M.; YAMAMURA, T.; SHIMAZU, A.; BACHCHU, A. F.; IWAMOTO, Y. Estradiol enhances the production of mineralized nodules by human periodontal ligament cells. J. Clin. Periodontol., v.26, n.11, p.748-751, 1999.

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

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

NAWATA, H.; TANAKA, S.; TANAKA, S.; TAKAYANAGI, R.; SAKAI, Y.; YANASE, T.; IKUYAMA, S.; HAJI, M. Aromatase in bone cell: association with osteoporosis in

postmenopausal women. J. Steroid Biochem. Mol. Biol., v.53, n.1/6, p.165-174, 1995.

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.-A. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. Clin. Pharmacol. Ther., v. 89, n. 1, p. 44-55, 2010.

NUSSBAUM, G.; SHAPIRA, L. How has neutrophil research improved our understanding of periodontal pathogenesis? J. Clin. Periodontol., v.38, Suppl. 11, p.49-59, 2011.

O'NEILL, J. S.; ELTON, R. A.; MILLER, W. R. Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site. Br. Med. J. (Clin Res Ed), v.296, n.6624, p.741-743, 1988.

OROZCO, A.; GEMMELL, E.; BICKEL, M.; SEYMOUR, G. J. Interleukin-1beta, interleukin-12 and interleukin-18 levels in gingival fluid and serum of patients with gingivitis and periodontitis. Oral Microbiol. Immunol., v.21, n.4, p.256-260, 2006.

OSBORNE, C.; TRIPATHY, D. Aromatase inhibitors: rationale and use in breast cancer. Annu. Rev. Med., v.56, p.103-116, 2005.

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

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

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

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

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

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

SIMPSON, E. R.; MAHENDROO, M. S.; MEANS, G. D.; KILGORE, M. W.; HINSHELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; ITO, Y.; FISHER, C. R.; MICHAEL, M. D.; MENDELSON, C. M.; BULUN, S. E. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. Endocr. Rev., v.15, n.3, p.342-355, 1994.

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

STUBBINS, R. E.; NAJJAR, K.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NUNEZ, M. P. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. Diabetes Obes. Metab., v.14, n.1, p.58-66, 2011.

SZABO, K. A.; WEBBER, C. E.; ADACHI, J. D.; TOZER, R.; GORDON, C.; PAPAIONNOU, A. Cortical and trabecular bone at the radius and tibia in postmenopausal breast cancer patients: a Peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) study. Bone, v.48, n.2, p.218-224, 2011.

TANG, X.; MENG, H.; HAN, J.; ZHANG, L.; HOU, J.; ZHANG, F. Up-regulation of estrogen receptor-beta expression during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells. J. Periodontol Res., v.43, n.3, p.311-321, 2008.

TARKKILA, L.; KARI, K.; FURUHOLM, J.; TIITINEN, A.; MEURMAN, J. H. Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and post-menopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. BMC Oral Health, v.10, p.10, 2010.

TYAGI, A. M.; SRIVASTAVA, K.; SHARAN, K.; YADAV, D.; MAURYA, R.; SINGH, D. Daidzein prevents the increase in CD4+CD28null T cells and B lymphopoiesis in ovariectomized mice: a key mechanism for anti-osteoclastogenic effect. PLoS One, v.6, n.6, p.e21216, 2011.

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

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

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

ZAPTA, E.; ZUBIAURRE, L.; BUJANDA, L.; PIÉROLA, A. Anastrozole-induced hepatotoxicity. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol., v.18, n.11, p.1233-1234, 2006.

**APÊNDICES**  
**APÊNDICE A**  
**METODOLOGIA**

**Animais**

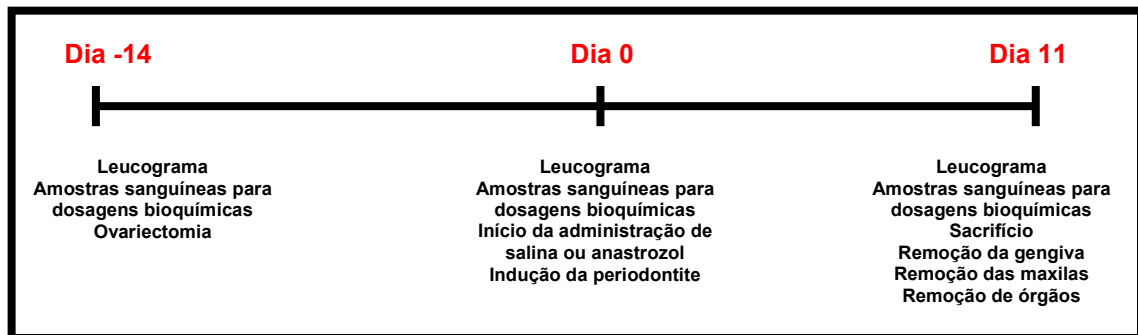
Foram utilizados 42 ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* fêmeas, com massa corpórea entre 180 e 220 gramas. Esses animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC, transferidos para o Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (FaMed, UFC-Fortaleza), e mantidos em gaiolas apropriadas, com o máximo de 6 animais em cada uma delas. Os ratos receberam ração comercial balanceada própria e água à vontade, e permaneceram nas mesmas condições ambientais durante os experimentos. Todos os esforços foram realizados no sentido de diminuir o número de animais e seu sofrimento, com base nas orientações para pesquisas com animais e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal do Ceará-CE, Brasil (número de protocolo 69/11).

**Protocolo Experimental**

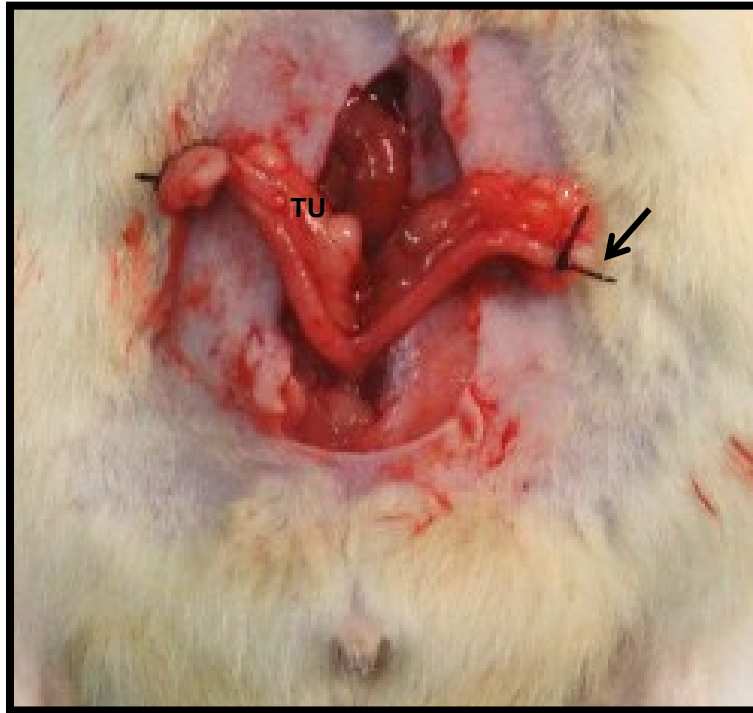
A Figura 1 resume as atividades desenvolvidas durante todo o período experimental. Inicialmente, no momento denominado dia -14, os animais tiveram seus ovários removidos ou somente expostos para simulação do estresse cirúrgico. A cirurgia foi realizada com um método modificado de Anbinder *et al.* (2007), pois não foi retirada uma porção do útero. Após anestesia com hidrato de cloral (300 mg/kg-i.p.) e tricotomia da região abdominal, a pele e o músculo foram incisados longitudinalmente abaixo da última costela. Os ovários foram, então, identificados e expostos. Nos animais ovariectomizados, após a hemostasia, através de ligadura das tubas uterinas, os ovários foram removidos juntamente com o tecido adiposo circunvizinho (Figura 2). Nos animais falso ovariectomizados, os ovários foram expostos e reposicionados na cavidade abdominal. A camada de músculo e, posteriormente, a pele foram suturadas com fio de náilon (4.0). Após 14 dias da cirurgia de ovariectomia (LIU *et al.*, 2010), no dia 0, a periodontite foi induzida como



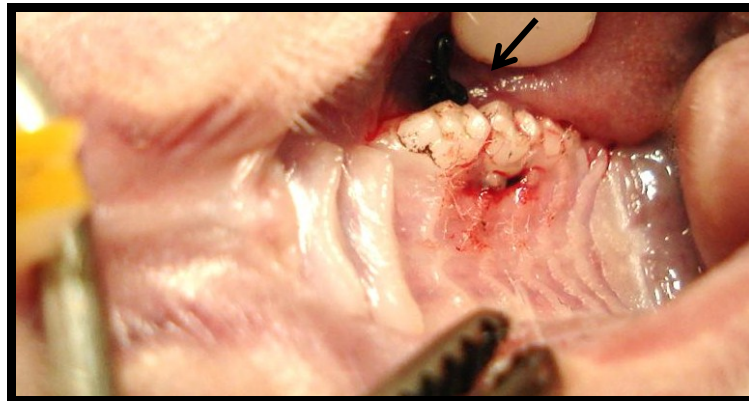
descrito por Lima *et al.* (2000), através da inserção de um fio de náilon (3.0) em torno dos segundos molares superiores esquerdo e direito de uma rata sob anestesia com Hidrato de cloral (300 mg/kg-i.p.). Previamente à passagem do fio, uma guia foi utilizada nos espaços interproximais mesial e distal dos dentes citados. Logo em seguida, o fio foi passado, de forma que o nó cirúrgico ficou voltado para a face vestibular da cavidade oral do animal, resultando em uma posição sub-gengival no lado palatino e supra-gengival no lado vestibular (Figura 3). Antes da indução da periodontite, foi iniciada a administração diária de solução salina ou de anastrozol. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 11 dias após a indução da periodontite e 25 dias após a ovariectomia, no momento denominado dia 11.



**Figura 1: Esquema do protocolo experimental.** No dia -14 a ovariectomia foi realizada nos animais sob anestesia com hidrato de cloral e 14 dias após este procedimento, no dia 0, a periodontite foi induzida por ligadura, bem como iniciada a administração de solução salina ou anastrozol. No dia 11, os animais foram sacrificados e a gengiva, maxila, fígado, rim e baço foram removidos para posteriores análises. Em todos os momentos foi realizado o leucograma e coletado amostras sanguíneas para dosagens bioquímicas.



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



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

## Grupos Experimentais

Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos, Normal, Falso ovariectomizado (F-OVX) e Ovariectomizado (OVX). O grupo Normal (n = 7) não foi submetido à cirurgia de ovariectomia; os grupos F-OVX (n = 7) e OVX (n = 28) foram submetidos às cirurgias de falso ovariectomia e ovariectomia bilateral, respectivamente. Anteriormente à indução da periodontite, o grupo OVX foi dividido de forma aleatória em 4 grupos com 7 animais em cada: Salina (SAL), que recebeu por gavagem solução salina 0,9% (2 ml/kg) 30 min antes da colocação da ligadura e diariamente pelos 10 dias seguintes; Anastrozol 0,02 mg/kg (ANA 0,02), Anastrozol 0,1 mg/kg (ANA 0,1) e Anastrozol 0,5 mg/kg (ANA 0,5), que receberam por gavagem anastrozol (Arimidex<sup>TM</sup>, Astrazeneca, Newark, DE, USA), dissolvido em solução salina 0,9% nas doses de 0,02, 0,1 e 0,5 mg/kg (HOZUMI *et al.*, 2002; KUMRU *et al.*, 2007), respectivamente, 30 min antes da colocação da ligadura e diariamente pelos 10 dias seguintes, sempre no mesmo horário. Os animais do grupo F-OVX também receberam por gavagem solução salina 0,9% (2 ml/kg) 30 min antes da colocação da ligadura e diariamente pelos 10 dias seguintes. O grupo Normal não recebeu nenhum tratamento ou solução salina.

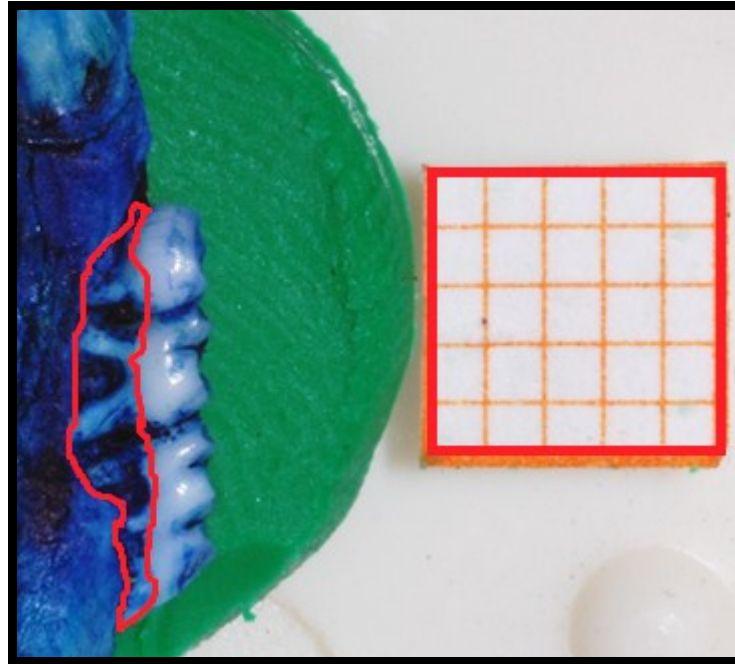
## Dosagem sérica de estradiol

Nos dias -14, 0 e 11 amostras sanguíneas foram coletadas do plexo orbital dos animais ovariectomizados que receberam solução salina, com micro-capilares heparinizados, centrifugadas (1.800 g x 10 min) e o sobrenadante congelado a -80 °C até o momento da dosagem de estradiol. A concentração sérica do estradiol foi quantificada por um imunoensaio competitivo automatizado (Advia Centaur XP Siemens) que utiliza tecnologia quimioluminescente direta, com sensibilidade de 7,0 pg/ml. O sistema automaticamente coloca 75 µl da amostra e 50 µl de reagente anticorpo que contém anticorpo anti-estradiol de coelho e um agente liberador de estreóide em uma cubeta e incuba durante 30 min a 37 °C. Em seguida, coloca 50 µl de reagente Lite e 250 µl de uma fase sólida, que consistem em um derivado de estradiol marcado com éster de acridina e anticorpo IgG anti-coelho monoclonal de

rato ligado a partículas paramagnéticas, respectivamente, e incubada durante 19 min a 37 °C. Após esse passo, separa, aspira e lava as cubetas com água reagentes e coloca 300 µl de reagente ácido e a mesma quantidade de reagente básico para iniciar a reação quimioluminescente, responsável pela leitura da quantidade de estradiol presente na amostra, expressa em pg/ml.

### **Estudo macroscópico do tecido ósseo**

Os animais foram sacrificados 11 dias após a indução da periodontite por deslocamento cervical e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A hemiarcada esquerda foi dissecada e corada com azul de metileno a 1%, com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade. Para quantificação da perda óssea alveolar (POA), as hemimaxilas foram acomodadas em massa de modelar colocada sobre lâminas de microscópio e fotografadas em câmera digital Nikon™ (Nikon D40, Melville, NY, USA). As imagens foram lançadas em um programa de computador Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA) para análise da POA, que foi medida usando uma modificação do método descrito por GOES *et al.*, (2010). Assim, a medida foi realizada de forma cega por um único examinador calibrado considerando a área entre a junção cimento-esmalte e a borda óssea remanescente, sendo esta comparada com uma área conhecida (0,5x0,5 mm<sup>2</sup>) (Figura 4).



**Figura 4: Desenho esquemático da mensuração da perda óssea alveolar na análise macroscópica.** Linha vermelha demarcando a área entre a junção cimento-esmalte e a borda óssea remanescente da hemiarcada esquerda. Esta área obtida em pixels é comparada com a área conhecida do quadrado milimetrado, fotografado junto com a hemiarcada.

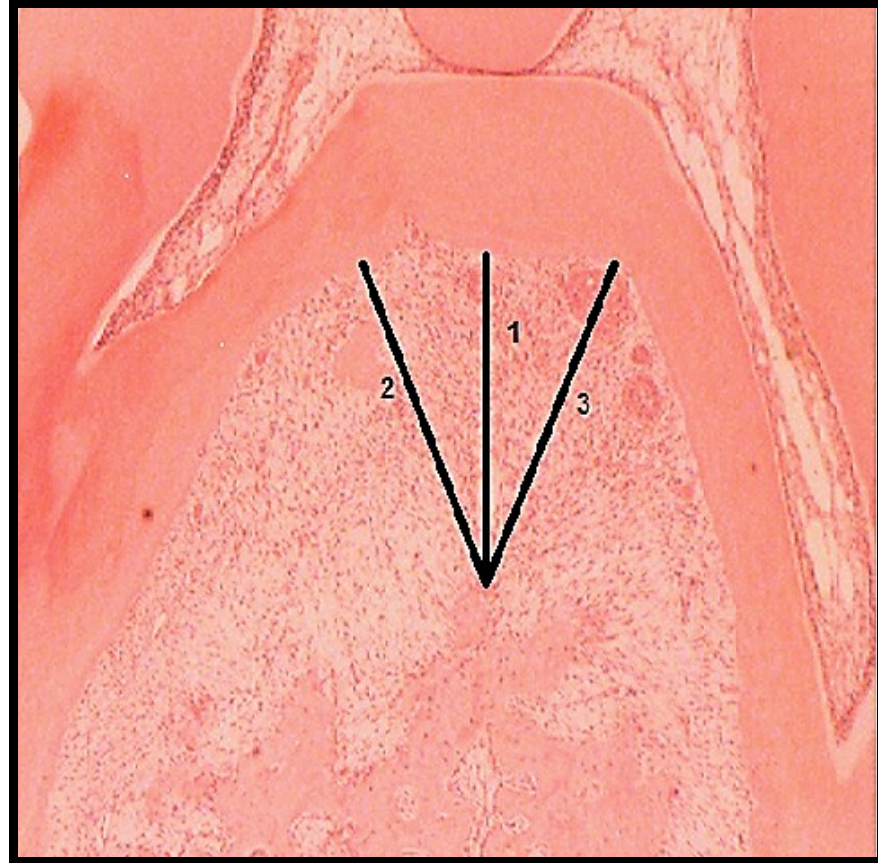
### **Procedimentos histológicos**

Os animais foram sacrificados 11 dias após a indução da periodontite por deslocamento cervical e suas maxilas removidas e fixadas em formol a 10%, durante 24 horas. A hemiarcada direita dos grupos Normal, F-OVX, SAL e ANA 0,5 foram desmineralizadas com ácido fórmico 7% (Merck®, Jacarepaguá, RJ, Brasil) por 10 dias. Em seguida, foram desidratadas, incluídas em parafina e cortes seriados de 4  $\mu$ m foram realizados em micrótomo apropriado no plano méso-distal dos molares. Por fim, as lâminas obtidas foram coradas pelo método hematoxilina e eosina.

#### *Análise histométrica*

A área de furca do segundo molar foi considerada para avaliação histométrica. Para tal, imagens foram obtidas dessa região em microscópio (x40) e lançadas em um programa de computador Image J (ImageJ 1.44p, National Institute of Health; EUA) para análise da POA. A quantificação da POA na área de furca foi obtida a partir da média de 3 medidas lineares realizadas entre a crista óssea e a

superfície do dente (Figura 5), sendo esta comparada com uma medida conhecida em milímetros (1 mm).



**Figura 5: Desenho esquemático da mensuração da perda óssea alveolar na análise histométrica.** Realização da primeira medida linear (1), mais medial, entre a crista óssea e a superfície do dente. As demais medidas (2 e 3) são realizadas a partir do primeiro ponto na crista óssea e à superfície do dente em direção mesial e distal. Obtenção da média dessas 3 medidas e comparação com uma medida conhecida em milímetros.

### *Análise histológica*

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

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

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

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

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

### **Atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A atividade de MPO, um marcador da presença de neutrófilos em tecidos inflamados, foi avaliada em amostras de tecido gengival, seguindo a metodologia descrita por Lima *et al.*, (2005). No sacrifício, amostras do tecido gengival subjacente à área desafiada na hemiarcada esquerda foram delicadamente removidas dos grupos de animais F-OVX, SAL e ANA 0,5, bem como da área correspondente do grupo Normal e mantidas a -80 °C até o momento do ensaio. Para tanto, cada 50 mg de tecido gengival foram colocados num tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadecitrimetilamônio (H-TAB - pH 6,0; 50 mg de tecido por ml) e posteriormente homogeneizados em tubos tipo Eppendorf sob refrigeração. O homogenato foi, então, centrifugado a 2,717 g por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi colhido e centrifugado novamente a 2,717 g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, 7 µl do sobrenadante de cada amostra foi colocada em uma placa de 96 poços com 200 µl de um reagente, preparado imediatamente antes da leitura (450 nm) no Leitor Automático de Placas (tipo ELISA) e composto por cloridrato de orto-dianisidina (0,167 mg/ml) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 0,0005% em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0). Os valores encontrados foram expressos como atividade de MPO/g de tecido.

## **Parâmetros sistêmicos**

### *Índices hepático, renal e esplênico*

No sacrifício, o fígado, o rim esquerdo e o baço dos animais dos grupos Normal, F-OVX, SAL e ANA 0,5 foram removidos e pesados. Os valores foram expressos como o índice do respectivo órgão (peso úmido de cada órgão dividido pelo peso do animal no dia do sacrifício) (SILVA *et al.*, 2010).

### *Dosagem sérica das Transaminases hepáticas (AST e ALT)*

No dia 11 do experimento, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital dos animais do grupo Normal, F-OVX, SAL e ANA 0,5 com micro-capilares heparinizados, centrifugadas (1.800 g x 10 min) e o sobrenadante congelado a -80 °C até o momento da análise bioquímica. A função hepática foi avaliada pela dosagem dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST) e alanino aminotransferase (ALT), utilizando quites específicos e seguindo a metodologia do fabricante (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, MG, Brasil). Alíquotas de 50 µl da amostra foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 60 minutos para AST e 30 minutos para ALT, em seguida foram adicionados 250 µl do reagente de cor e 2,5 ml de solução NaOH. Posteriormente, foi determinada diretamente em espectrofotômetro a leitura das absorbâncias utilizando comprimento de onda de 505 nm.

### *Leucograma*

Nos dias -14, 0 e 11 foi realizado o leucograma dos animais dos grupos Normal, F-OVX, OVX (SAL e ANA 0,5). Para essa análise, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/kg-i.p.). Em seguida, a ponta da cauda do animal foi seccionada com uma tesoura. A primeira gota de sangue foi desprezada e 20 µl de sangue foram diluídos em 380 µl de Líquido de Turk, para a realização da contagem do número total de leucócitos, utilizando câmara de Neubauer. Adicionalmente, outra gota de sangue foi colhida para a confecção do esfregaço corado pelo método HE usando o quite de coloração Instant Prov Stain



Set<sup>®</sup> (Newprov Produtos para Laboratório; Pinhais, PR, Brasil) para as contagens diferenciais.

#### *Variação de massa corpórea*

Os animais dos grupos Normal, F-OVX e OVX (SAL) tiveram suas massas corpóreas medidas durante todo o período experimental. Os valores foram expressos como variação de massa corpórea em relação a sua massa inicial. Para os dados de variação de massa corpórea de animais submetidos à periodontite ou controle, os valores dos grupos de animais Normal e OVX (SAL e ANA 0,5) também foram expressos como variação de massa corpórea, porém em relação à massa anterior à indução da periodontite.

#### **Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou mediana seguida de seus valores extremos, quando apropriado. Para comparação das médias foram usados os testes de Análise de variância (Anova) e de Bonferroni e para comparação das medianas foram usados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Em todas as ocasiões foi adotado o nível de significância  $p < 0,05$  e o programa utilizado foi o GraphPad Prism 5 software (GraphPad Prism<sup>™</sup>, Inc., San Diego, CA, USA).

## ANEXOS

### ANEXO A

## DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 69/2011, sobre o projeto intitulado: **“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ANASTROZOL NA PERIODONTITE INDUZIDA EM RATOS”**, de responsabilidade de Vilma de Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 29 de agosto de 2011.

Fortaleza, 30 de agosto de 2011.

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