UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MILENI DA SILVA FERNANDES

*Avaliação da influência do fluoreto no reparo
ósseo em alvéolos de ratos. Estudo dos processos
de reabsorção e neoformação óssea*

BAURU
2010

MILENI DA SILVA FERNANDES

Avaliação da influência do fluoreto no reparo ósseo em alvéolos de ratos. Estudo dos processos de reabsorção e neoformação óssea.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia e Biologia Oral (opção Biologia Oral).

Orientador: Prof.Dr.Rodrigo Cardoso de Oliveira

BAURU
2010

F236a Fernandes, Mileni da Silva
Avaliação da influência do fluoreto no reparo
ósseo em alvéolos de ratos. Estudo dos processos
de reabsorção e neoformação óssea/ Mileni da Silva
Fernandes. - Bauru, 2010
236 p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de
Oliveira

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 020/2006
Data: 15 de dezembro de 2006

DEDICATÓRIA

Obrigado, amado Deus, por tua mão sempre protetora e pelo teu amor e orientação constante em minha vida. Agradeço pelas maravilhas que cobrem a terra. Louvo-te por Jesus, que nos traz à vida e nos leva a agir para o bem. Que possamos dar bons frutos de amor e serviço.

Aos meus pais Carlos Roberto e Lúcia, os quais sempre abriram mão de seus sonhos para a realização dos nossos. Meus exemplos de honestidade, força, dedicação e superação. Por terem me proporcionado o alicerce necessário para a minha formação intelectual e espiritual e pelo amor incondicional. Amo vocês.

Ao meu irmão Luiz Henrique pelo apoio, carinho e compreensão, por ter me incentivado a seguir a carreira acadêmica. Amo-te.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus, para que continue concedendo-me: **tranquilidade** necessária para aceitar as coisas que não posso modificar, **coragem** para alterar aquelas que posso e **sabedoria** para distinguir umas das outras. Obrigado, Senhor, pelo teu grande amor e pelo teu auxílio nos momentos de dificuldade.

Aos meus tios Stephan Strandman e Leni, por me acolher da maneira mais amável possível, obrigada por me tornar parte desta família tão especial. Tia Leni você soube nos momentos difíceis me apoiar da melhor maneira, muito obrigada. Amo vocês.

A minha avó querida Izabel Fernandes pelo apoio e torcida representando toda a família Fernandes.

Ao meu orientador Prof.Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, pela confiança, paciência, generosidade, pelos seus ensinamentos, apoio e liberdade de trabalho. Agradeço todo o empenho e carinho dedicados a mim, durante esta jornada. Meu eterno agradecimento e admiração.

À Aline (Loni) minha amiga, que sempre fez o possível para me ajudar nessa caminhada. Se não fosse você com certeza eu não chegaria até aqui. Obrigada pelo apoio, paciência, tolerância (zero), cumplicidade e amizade.

As minhas amigas, “irmãs” Juliana (Tatá) e Flávia (Fló), pela amizade sincera e por estarem sempre dispostas a me ouvir e ajudar nas diversas dificuldades e alegrias da minha vida, pela presença (mesmo longe) em todas as etapas da minha vida. Fló obrigada pelos 21 anos de amizade. Ju obrigada pela nova alegria que você trouxe para as nossas vidas, a “zapinha” mais linda da tia, Izabela Mayu!

As minhas amadas primas Eliana, Mariann Thaís e Stephanie pelas palavras de conforto e incentivo, pela amizade e infinita torcida.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS

Aos demais professores da disciplina de Bioquímica Profa. Dra. Ana Carolina Magalhães pelo convívio. Em especial à Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf pela colaboração, carinhoso convívio e torcida durante toda esta jornada.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas disciplina de Histologia, Prof. Dr. Rumio Taga, Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis e Prof. Dr. Gustavo Garlet pela disponibilidade do laboratório de Histologia.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas disciplina de Anatomia, Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues e Prof. Dr. Jesus Carlos Andreo pela disponibilidade do laboratório de Anatomia e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria, por quem tenho profunda admiração pela paciência, humildade e dedicação à bela arte de ensinar.

Aos funcionários da Bioquímica Thelma, Ovídio e Larissa pelo auxílio e amizade.

À Vera Lúcia, secretária do departamento de Ciências Biológicas e do Curso de pós-graduação de Estomatologia e Biologia Oral, pela ajuda em diversos momentos, pela disposição e constante torcida.

À Tania Mary Cestari e Danielle Santi Ceolin, técnicas da Histologia, pela imensa colaboração, pela orientação, pela amizade e paciência. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Thiago Dionísio, técnico do laboratório de Farmacologia, pela ajuda e disposição com que sempre me atendeu.

As amigas Flávia Iano e Marcela Yanai, que sempre estiveram presentes para colaborar com meu trabalho. Obrigada pela dedicação e pela amizade.

Aos alunos Bruno, Gisele, Letícia, Lucas, Marcela, que muito fizeram para que este trabalho desse certo, obrigada pela dedicação e amizade.

Aos meus amigos da Bioquímica (FOB-USP): Juliane, Flávia Levy, Taísa, Juliano, Senda, Cláudinha, Helô, Flávia Italiani, Tatiana Furlani, Thiemi, Maria Cecília, Sandra, Kéllen, Bruna, Lívia, Adriana, Cíntia, pela colaboração, carinhoso convívio e torcida durante toda esta jornada.

A todos os amigos que freqüentam o laboratório de Bioquímica e que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

Aos meus colegas de Pós-graduação, cada qual com características e qualidades inconfundíveis, por tornarem os momentos muito mais agradáveis. Em especial os amigos Cadú, Erivan, Geraldo (G), Izabel (Bel), Luis (Rick), Leslie, Roberta (Betinha) e Mônica. Adoro vocês.

Aos Professores, Funcionários, Pós-graduandos e Estagiários dos Departamentos de Ciências Biológicas pela convivência agradável e auxílio na realização das atividades do curso de pós-graduação; aos funcionários da Seção de Pós-graduação, do Biotério Central e da Biblioteca pela atenção e disponibilidade.

MUITO OBRIGADA!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. 2006/06430-3, 2007/00494-2, 2008/099265);

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa de seu excelentíssimo Diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro;

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa do Presidente, Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira Machado;

Ao Departamento Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru.

Aos meus amigos....

Para aquelas pessoas que fazem meu coração sorrir...

Para a galera que sempre esteve junto até mesmo quando eu não estava disposta... Para a pessoa que eu esperava que me chutasse quando caí, e que foi uma das primeiras que me ajudou a levantar... Para as pessoas que fizeram a diferença em minha vida... Para as pessoas que quando olho para trás, sinto muitas saudades... Para as pessoas que me aconselhara quando me senti sozinha, e me ajudaram a entender que não importa em quantos pedaços meu coração tenha se partido, pois o mundo não irá parar para que eu o conserte... Para as pessoas que me deram um força quando eu não estava muito animada. Para as pessoas que amei... Para as pessoas que abracei... Para as pessoas que encontro apenas em meus sonhos... Para as pessoas que encontro todos os dias e não tenho a chance de dizer tudo o que sinto olhando nos olhos... Para mim... O que importa não é O QUE eu tenho na vida, mas QUEM eu tenho na vida... Por isso... Guardo todas as pessoas importantes da minha vida em uma caixinha dentro do meu coração...

Resumo

O processo de reparo do tecido ósseo tem sido alvo de estudos com o intuito de promover uma melhora na qualidade e tempo de reparo. Um elemento que tem sido estudado por alguns grupos é o fluoreto, pois tem sido proposto como terapêutico para osteoporose (Europa). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente o efeito do fluoreto administrado na água de beber sobre o reparo ósseo alveolar de ratos. Neste estudo foram utilizados 4 grupos com ratos *Wistar* de 80 dias de vida (n=200), os quais receberam água de beber contendo 5, 15 e 50 ppm de fluoreto e água deionizada (controle) durante todo experimento. Esses animais tiveram o incisivo superior direito extraído. Os animais foram eutanasiados 0 hora, 7, 14, 21 e 30 e 60 dias após a extração. Amostras de plasma sanguíneo foram obtidas para análise de concentração de flúor, e a região do alvéolo dental foi coletada para as análises de microscopia (Hematoxilina Eosina e imunoistoquímica) e zimografia (metaloproteinases de matriz 2 e 9 – MMP-2 e 9). A análise de concentração de flúor no plasma sanguíneo mostrou maior presença desse elemento no grupo tratado com 50 ppm de F nos períodos de 21 e 30 dias. Na análise histológica foi detectado osso neoformado em todos os animais até 60 dias, porém o grupo de 50 ppm de F apresentou menor formação óssea nos períodos de 14, 21 e 30 dias. A análise morfométrica confirmou um aumento na densidade de volume de osso neoformado, entre 7 e 60 dias, nos grupos controle, 5 ppm, 15 ppm e 50 ppm de F, com concomitante diminuição na densidade de volume de coágulo sanguíneo. A expressão de RANK-L e OPG não foi alterada pela exposição crônica ao fluoreto na água de beber durante os períodos estudados ($p < 0,05$). A atividade da MMP-2 foi mais acentuada no período inicial, enquanto a MMP-9 teve maior atividade no período final. Concluiu-se que o F, em altas concentrações pode alterar a dinâmica do reparo ósseo alveolar diminuindo a formação de novo tecido ósseo, associado a um atraso na remissão do coágulo sanguíneo. Proteínas como RANK-L, OPG, MMP-2 e MMP-9 também podem ter sua expressão alterada no tecido ósseo em reparo.

Palavras-chave: Reparo ósseo. Flúor. Metaloproteinases de matriz.

ABSTRACT

Evaluation of the influence of fluoride in bone repair in dental alveoli in rats. Analysis of the reabsorption and neoformation of the bone

The repair of bone has been investigated with the aim of promoting an improvement in the quality and time of the repair process. One element that has been studied by some groups is fluoride, it has been proposed as a treatment for osteoporosis (Europe). Thus, the objective was to comparatively evaluate the effect of fluoride administered in drinking water on alveolar bone repair in rats. This study used 4 groups of rats of 80 days (n=200), which received drinking water containing 5, 15, and 50 ppm of fluoride, and deionized water (control) throughout the experiment. These animals had their upper right incisor extracted. The animals were euthanized 0 hours, 7, 14, 21 and 30 and 60 days after extraction. Samples of blood plasma were obtained for analysis of fluoride concentration, and the region of the alveolus was collected for microscopic analysis (Hematoxylin eosin and Immunohistochemistry) and zymography (metalloproteinases 2 and 9 – MMP-2 and 9). Analysis of fluoride concentration in blood plasma showed a greater presence of this element in the group treated with 50 ppm of F in periods of 21 and 30 days. Histological analysis detected a new bone formed in all animals up to 60 days, but the group of 50 ppm F showed lower bone formation at 14, 21 and 30 days. Morphometric analysis confirmed an increase in the volume density of newly formed bone, between 7 and 60 days in control groups, 5 ppm, 15 ppm and 50 ppm F, with a concomitant decrease in the volume density of blood clot. The expression of RANK-L and OPG was not altered by chronic exposure to fluoride in drinking water during the study period ($p < 0.05$). The activity of MMP-2 was more pronounced in the early period, while MMP-9 had higher activity in the final period. It was concluded that the F, in high concentrations change the dynamics of the alveolar bone repair by decreasing the formation of new bone, associated with a delay in treating the blood clot. Proteins as RANK-L, OPG, MMP-2 and MMP-9 may also have changed in their expression in bone tissue repair.

Keywords: *Bone repair. Fluoride. Matrix metalloproteinases*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Cronograma de utilização dos animais.....	75
Figura 2-	Procedimentos cirúrgicos para a exodontia do incisivo superior direito dos animais.....	81
Figura 3-	Extração do incisivo.....	83
Figura 4-	Análise de flúor.....	85
Figura 5-	Imagens radiográficas de maxilas direitas, mostrando diferentes graus de desmineralização.....	89
Figura 6-	A) Diferentes concentrações de álcool etílico e xilol utilizados nos processos de desidratação e diafanização das peças. B- E) Etapas de inclusão da maxila direita superior em parafina.....	91
Figura 7-	A) Micrótomo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) utilizado para fazer os cortes de 4 µm de espessura nas amostras da maxila superior direita.B) Lâminas identificadas com cortes	93
Figura 8-	A) Bateria e desparafinização e hidratação dos cortes; B) peróxido de hidrogênio a 3%, utilizado para inibir a peroxidase endógena; C) incubação dos cortes teciduais em PBS na cuba de vidro; D) câmara úmida utilizada para incubação dos cortes; E) alíquota de pepsina; F) lavagem com PBS sobre o corte para retirada do excesso de solução; G) incubação dos cortes teciduais em uma solução de leite desnatado Molico®, para o bloqueio das proteínas sorológicas; H) anticorpos primários utilizados.....	97
Figura 9-	A) diluente de anticorpo; B) diluição do anticorpo primário em diluente de anticorpo; C) anticorpo secundário biotinilado coelho anti-cabra; D) streptavidina conjugada com HRP; E) Kit do cromógeno DAB; F) contra-coloração com hematoxilina de Harris.....	99
Figura 10-	Kit Sigma 387-A leukocyte acid phosphatase; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO,USA.....	103
Figura 11-	Sistema de aplicação da amostra nos “poços” e corrida eletroforética sob voltagem constante de 120V.....	107
Figura 12-	Imagem do programa Kodak Molecular Imaging Software® utilizado para análise dos géis de zimografia.....	107

- Figura 13- Grupos Controle- Período de 0 hora: alvéolo de rato, tratado com água deionizada. O alvéolo dental foi dividido em Terço Apical (TA), Terço Médio (TM) e Terço Cervical (TC). Podemos observar todos os terços praticamente preenchidos por coágulo sangüíneo. Aumento de 4X. Coloração H.E..... 117
- Figura 14- Controle 7 dias: A) Região do terço médio do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (CS) e tecido conjuntivo (TC), além de ilhas de osso neoformado (ON) ao centro e osso da parede do alvéolo (O). B) Região do terço cervical do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (CS) e tecido conjuntivo (TC). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 119
- Figura 15- 5 ppm 7 dias: A) Terço apical com presença de coágulo (CS), tecido conjuntivo (TC) e vasos (V). Podemos notar osso da parede do alvéolo (O). B) Região do terço médio do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (CS) e tecido conjuntivo (TC), além de neoformação óssea (ON) e vasos (V). Aumento de 40x (A) e 10x (B). Coloração H.E..... 121
- Figura 16- 15 ppm 7 dias: A) Notamos, no terço médio, a presença do coágulo sangüíneo (CS) no centro e neoformação óssea (ON) próximo as paredes do alvéolo (O), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON) sob a parede do alvéolo (O). Podemos notar osteoblastos (seta) em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (TC) e vaso (V) ao centro. Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 123
- Figura 17- 50 ppm 7 dias: A) Terço médio do alvéolo com presença do coágulo sangüíneo (CS) e áreas de neoformação óssea (ON). Aumento de 10x (A). Coloração H.E..... 125
- Figura 18- Controle 14 dias: A) Notamos no terço apical a presença do coágulo sangüíneo (CS) e neoformação óssea (ON), próximo as paredes do ápice do alvéolo. B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (TC), resquício do coágulo sangüíneo (CS) e vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 127
- Figura 19- 5 ppm 14 dias: A) Terço médio com neoformação óssea (ON) próximo as paredes do alvéolo (O). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar ainda vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 129
- Figura 20- 15 ppm 14 dias: A) Notamos, no terço apical, a presença de tecido conjuntivo (TC), parte do coágulo sangüíneo (CS) e neoformação óssea (ON). B) Terço cervical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de coágulo sangüíneo (CS) e vaso (V). C) Notamos no terço apical, a presença de osteoclastos (seta). Aumento de 10x (A) e 40x (B e C). Coloração H.E..... 132

- Figura 21- 50 ppm 14 dias: A) Terço apical apresentando neoformação óssea (ON), no entanto, ainda havia resquícios do coágulo sangüíneo (CS). B) Podemos notar no terço cervical, osso neoformado (ON), coágulo sangüíneo (CS) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 133
- Figura 22- Controle 21 dias: A) Notamos, no terço médio, a presença do coágulo sangüíneo (CS) e tecido conjuntivo (TC) e vasos (V) ao centro. Notar a presença de osso neoformado (ON). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON) sob a parede do alvéolo (O). Podemos notar a presença de alguns vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 137
- Figura 23- 5 ppm 21 dias: A) O terço cervical preenchido por tecido ósseo neoformado (ON) e coágulo sangüíneo (CS). B) Podemos notar no terço cervical, o novo osso neoformado (ON), além de tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 139
- Figura 24- Período 21 dias: A) grupo III-15 ppm: Terço médio com presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). B) grupo IV -50 ppm: Notamos no terço apical, a presença de osteoclastos (setas), osso neoformado (ON) e vasos (V). Aumento de 40x (A e B). Coloração H.E..... 141
- Figura 25- 50 ppm 21 dias: A) Notamos, no terço apical, a presença do coágulo sangüíneo (CS), neoformação óssea (ON) e tecido conjuntivo (TC). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de coágulo sangüíneo (CS), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 143
- Figura 26- Controle 30 dias: A) Terço apical com abundante osso neoformado (ON) e uma pequena região ocupada por tecido conjuntivo (TC). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (TC) e vaso (V) ao centro. Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 147
- Figura 27- 5 ppm 30 dias: A) Notamos, no terço médio, osso neoformado (ON) e resquícios do coágulo sangüíneo (CS). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoclastos (seta), além de vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 149
- Figura 28- A) Terço médio caracterizado por osso neoformado (ON) e presença de tecido conjuntivo (TC). B) Terço médio com presença de osso neoformado (ON), além de resquícios do coágulo sangüíneo ainda presente (CS). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 151
- Figura 29- A) Notamos, no terço médio, a presença do coágulo sangüíneo (CS), tecido conjuntivo (TC) e osso neoformado (ON). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC) e coágulo sangüíneo (CS) ao centro. Notamos ainda osteoblasto em síntese (seta). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E..... 153

Figura 30-	Grupo controle (A) e 50 ppm (B).A) Terço apical com abundante osso neoformado (ON), e tecido conjuntivo (TC). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Aumento de 10x (A) e (B). Coloração H.E.....	155
Figura 31-	7 dias: Grupo I (0 ppm). A) Controle negativo (ausência de anticorpo primário). B) Presença de células expressando RANK-L (seta), osso neoformado (ON) e tecido conjuntivo (TC). Aumento de 40x (A) e (B).....	169
Figura 32-	30 dias: A) Grupo III (15 ppm) presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (V) e células expressando RANK-L (seta). B) Grupo IV (50 ppm) presença de células expressando RANK-L (seta), osso neoformado (ON) e tecido conjuntivo (TC). Aumento de 40x (A) e (B).....	171
Figura 33-	7 dias: Grupo deionizada. A) Controle negativo (sem anticorpo primário), região do alvéolo dental demonstrando ausência de marcação imunoistoquímica. B) Presença de coágulo sanguíneo (CS) e células expressando OPG (seta). Aumento de 40X (A) e (B).....	177
Figura 34-	30 dias:. A) Grupo II (5 ppm), células imunomarcadas, osso neoformado (ON) e vasos (V). B) Grupo IV (50 ppm) com presença de maior volume de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC), remissão do coágulo sanguíneo e células expressando OPG (seta). Aumento de 40x (A) e (B).....	179
Figura 35-	7 dias: A) Grupo I (0 ppm), região do terço médio do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, tecido conjuntivo (TC), coágulo sanguíneo (CS). Diversos macrófagos marcados (seta). B) Grupo IV (50 ppm), células expressando MMP-9, notamos formação óssea (ON) e presença de osteoclastos imunomarcados (seta). Aumento de 40x (A) e (B).....	185
Figura 36-	A) 14 dias: Grupo II (15 ppm), região do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, osteoclasto (seta) e osso neoformado (ON). B) 21 dias: Grupo III (5 ppm), células imunomarcadas (seta) osso neoformado (ON) e vaso (V). Aumento de 40x (A) e (B).....	187
Figura 37-	30 dias: A) Grupo I (0 ppm), região do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, macrófago (seta) e osso neoformado (ON). B) Grupo IV (50 ppm), células imunomarcadas (seta) osso neoformado (ON). Aumento de 40x (A) e (B).....	189
Figura 38-	TRAP: A) Região do alvéolo do grupo de 5ppm, período de 30 dias. Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (seta). Osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). Aumento de 40x (A). Imunomarcção para TRAP.....	195
Figura 39-	TRAP: A) Grupo de 15 ppm, período de 30 dias, marcado com coloração para TRAP. Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (seta). Osso neoformado (ON) e vaso (V). B) Detalhe para um osteoclasto (seta). Aumento de 40x (A) e (B). Imunomarcção para TRAP.....	197

- Figura 40- Grupo IV-50ppm - 30 dias: A) Alvéolo de rato do grupo de 50ppm, período de 30 dias. Notamos a presença de osteoclastos imunomarcados (seta) para TRAP, além da presença de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido conjuntivo (TC) na região do terço médio. B) Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (seta). Osso neoformado (ON) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Imunomarcação para TRAP..... 199
- Figura 41- A) Imagem digitalizada do gel de zimografia depois de processado. B) Imagem sendo analisada no programa Kodak Molecular Imaging Software ®. Notar as bandas correspondentes as pro-MMPs e MMPs 2 e 9. Colunas: 1 - padrão MMP-2, 2 - padrão MMP-9, 3 - grupo 5 ppm 7 dias, 4 - grupo 15 ppm 7 dias, 5 - grupo 50 ppm 7 dias, 6 -controle 30 dias, 7 - grupo 5 ppm 30 dias, 8 - grupo 15 ppm 30 dias e 9 – grupo 50 ppm 30 dias..... 203

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de flúor na água de beber fornecida aos animais dos grupos experimentais.....	77
Tabela 2 - Composição das dietas (g/100g) utilizadas no ensaio biológico.....	77
Tabela 3 - Composição da mistura salina.....	78
Tabela 4 - Composição da mistura vitamínica.....	78
Tabela 5 - Concentração média e desvio padrão ($\pm$ DP) de flúor (μ g/mL) encontrado no plasma nos diferentes períodos experimentais.....	114
Tabela 6 - Densidade por volume (%) de tecido ósseo, tecido conjuntivo, coágulo sangüíneo e vasos sanguíneos formados no terço apical de alvéolos dos grupos experimentais.....	159
Tabela 7 - Densidade por volume (%) de tecido ósseo, tecido conjuntivo, coágulo sangüíneo e vasos sanguíneos formado no terço médio de alvéolos dos grupos experimentais.....	164
Tabela 8 - Número de células/mm ² que expressaram RANK-L, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais.....	173
Tabela 9 - Número de células/mm ² que expressaram OPG, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais.....	181
Tabela 10 - Número de células/mm ² que expressaram MMP-9, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais.....	191
Tabela 11 - Número de células/mm ² que expressaram TRAP no terço apical e médio, nos diversos períodos analisados.....	193

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Concentração média e desvio padrão ($\pm$ DP) de flúor (μ g/mL) encontrado no plasma nos diferentes períodos experimentais.....	115
Gráfico 2-	Densidade por volume (%) de tecido ósseo formado no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	160
Gráfico 3-	Densidade por volume (%) de tecido conjuntivo formado no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	160
Gráfico 4-	Densidade por volume (%) de coágulo sangüíneo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	161
Gráfico 5-	Densidade por volume (%) de vasos sangüíneos formados no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	161
Gráfico 6-	Densidade por volume (%) de tecido ósseo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	165
Gráfico 7-	Densidade por volume (%) de tecido conjuntivo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	165
Gráfico 8-	Densidade por volume (%) de coágulo sanguíneo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	166
Gráfico 9-	Densidade por volume (%) de vasos sanguíneos formados no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	166
Gráfico 10-	Expressão de RANK-L no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	174
Gráfico 11-	Expressão de RANK-L no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	174
Gráfico 12-	Expressão de OPG no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	182

Gráfico 13- Expressão de OPG no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	182
Gráfico 14- Expressão de MMP-9 no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	192
Gráfico 15- Expressão de MMP-9 no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	192
Gráfico 16- Expressão de TRAP no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	194
Gráfico 17- Expressão de TRAP no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.....	195
Gráfico 18- Representação da atividade das pró-MMP-9 (A) e MMP-9 (B) em áreas das bandas no gel de zimografia, dos grupos controle, 5, 15 e 50 ppm de F.....	205
Gráfico 19- Representação da atividade das pro-MMP-2 (A) e MMP-2 (B) em áreas das bandas no gel de zimografia, dos grupos controle, 5, 15 e 50 ppm de F.....	206

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A	área examinada
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
(P)	pontos
BMP	proteína morfogenética óssea
BSA	Soro fetal bovino
Ca ⁺²	íon cálcio
CaF ₂	fluorita
cm	centímetro
CO ₂	Gás carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CS	Coágulo sangüíneo
DAB	Diaminobenzidina
DP	Desvio padrão
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Fluoreto
G	grama
HCl	ácido clorídrico
HE	hematoxilina/eosina
HMDS	hexametildisiloxano/Hexametil-disilazano ou hexametil-disiloxano
IGF	fator de crescimento insulina-like
KDa	Quilodaltons
Kodak MI	Kodak Molecular Imaging Software
KV	kilovoltagem
L	Litro
M	Molar
mAs	Miliamperagens
M-CSF	fator estimulante de colônia de macrófagos
MEC	Matrix extra celular
Mg	miligrama
ml	mililitro

Mm	milímetro
MMP	metaloproteinases de matriz
mV	milivoltagem
MWM	padrão de peso molecular
NaF	fluoreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
NF-κB	fator nuclear kappaB
nm	nanômetro
O	osso
OCs	Osteoclastos
ON	osso neoformado
OPG	Osteoprotegerina
p	Nível de significância
PBS	tampão sódio fosfato
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	potencial hidrogênico
Pi	números de pontos
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppm	parte por milhão
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappaB
RANKL	RANK ligante
rpm	rotação por minuto
TC	tecido conjuntivo
TGF-β	fator de crescimento transformador – β
TIMPs	inibidores teciduais de metaloproteases
TNF	fator de necrose tumoral
TO	tecido ósseo
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato
Tris	hidroximetilaminometano
UMBs	unidades multicelulares básicas
V	voltagem
VEGF	fator de crescimento de endotélio de vasos
VS	vasos sanguíneos
Vvi	densidade de volume
Zn ⁺²	íon zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	45
2 REVISÃO DE LITERATURA	49
2.1 TECIDO ÓSSEO	51
2.2 REPARO ALVEOLAR	54
2.3 CITOCINAS: RANK, RANKL E OPG	57
2.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS)	59
2.5 FLÚOR	61
2.5.1 Considerações gerais	61
2.5.2 Fluoreto e tecidos mineralizados	62
3 PROPOSIÇÃO	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS	73
4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS	79
4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS (HEME - MAXILA)	81
4.4 DOSAGEM DE FLUORETO NO PLASMA	83
4.4.1 Procedimento da análise	83
4.4.2 Validação da análise	87
4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	89
4.5.1 Preparo e obtenção dos cortes	89
4.5.2 Análise microscópica e morfométrica das lâminas coradas em HE	93
4.5.3 Reação de Imunomarcação via indireta pelo método SABC peroxidase	95
4.5.3.1 Procedimentos laboratoriais para imunomarcação	95
4.5.4 Imunocoloração com o kit TRAP	101
4.5.5 Análise das lâminas imunomarcadas e imunocoradas	103
4.6 ANÁLISES ZIMOGRÁFICA	103
4.6.1 Preparação das proteínas	105
4.6.2 Dosagem de proteínas das amostras	105
4.6.3 Protocolo de preparação do gel de zimografia	105
4.7 Análise estatística	109
5 RESULTADOS	111
5.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR NO PLASMA	113
5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA RESPOSTA TECIDUAL NO PROCESSO DE REPARO	115
5.2.1 Período de 7 dias	117
5.2.2 Período de 14 dias	125
5.2.3 Período de 21 dias	135

5.2.4 Período de 30 dias	145
5.2.5 Período de 60 dias	155
5.3 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS	157
5.3.1 Terço apical	157
5.3.2 Terço médio	162
5.4 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS	167
5.4.1 Marcação de RANK-L	167
5.4.2 Marcação de OPG (Osteoprotegerina)	175
5.4.3 Marcação de MMP-9	183
5.5 ANÁLISE DAS LÂMINAS MARCADAS COM TRAP	193
5.5.1 Terço apical	193
5.5.2 Terço médio	194
5.6 Avaliação das atividades das MMP-2 e 9 e suas pro enzimas	201
6 DISCUSSÃO	207
7 CONCLUSÃO	216
REFERÊNCIAS	221
ANEXOS	237

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado e com capacidade de reparo. O processo de reparo tecidual segue etapas semelhantes nos tecidos de mamíferos. No entanto, a capacidade de reparo tecidual pode variar de acordo com alguns fatores como: tipo (origem) de tecido lesionado, extensão da agressão, contaminação da área lesionada, e outros. Sabe-se que a reparação óssea segue caminhos ou etapas muito semelhantes à formação embriogênica dos ossos, sugerindo que mecanismos moleculares e celulares sejam semelhantes nos dois processos (ROSEN & THIES 1992; HING, 2004; BAHAR et al., 2007). O reparo ósseo é um processo de múltiplo estágio envolvendo migração, proliferação, diferenciação e ativação de inúmeros tipos celulares (MANDRACCHIA; NELSON; BARP, 2001). Enlow e Hans (1998) reforçam que o tecido ósseo neoformado adquire características idênticas ao destruído devido ao processo fisiológico de remodelamento e adaptação funcional do osso.

A atividade de síntese do tecido ósseo é mediada pelos osteoblastos (ROODMAN, 2007), células que derivam das células-tronco do tecido conjuntivo. Estas são responsáveis pela síntese dos constituintes orgânicos (colágeno e proteínas não-colagênicas: proteínas morfogenéticas ósseas, sialoproteína óssea, osteonectina, etc) e também pela mineralização da matriz osteóide. Estas células, *in vivo*, encontram-se emparelhadas nas superfícies ósseas, em um arranjo que lembra um epitélio simples. Quando em intensa atividade sintética, apresentam-se cubóides e em baixa atividade, tornam-se achatadas (HARADA & RODAN, 2003; NANJI, 2008; JUKES et al., 2008).

O processo de reabsorção óssea é realizado pelos osteoclastos (células gigantes multinucleadas da linhagem dos macrófagos - derivadas de monócitos circulantes) em “acordo” (comunicação) com os osteoblastos (TEITELBAUM, 2000; HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006). O sistema de sinalização que permite a interação de osteoclastos e osteoblastos é formado por uma tríade de proteínas: osteoprotegerina OPG, ativador do receptor do fator kappa B nuclear, RANK e seu ligante RANKL (SOLTANOFF et al., 2009; KOBAYASHI, UDAGAWA, & TAKAHASHI, 2009).

A formação e a reabsorção óssea são eventos dinâmicos e dependentes da ação de alguns moduladores como: hormônios (paratormônio, calcitonina e vitamina D3) (ALLORI, SAILON, & WARREN, 2008a; SOLTANOFF et al., 2009), fatores de

crescimento (como as proteínas morfogenéticas ósseas, BMPs) (MARTIN, GOOI, & SIMS, 2009), citocinas (ativador do receptor do fator kappa B nuclear, RANK, e seu ligante RANKL, osteoprotegerina OPG) (KOBAYASHI, UDAGAWA, & TAKAHASHI, 2009), metaloproteinases de matriz (MMPs) (ALLORI, SAILON, & WARREN, 2008b), fosfatase alcalina e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (SOLTANOFF et al., 2009), entre outros. Estas proteínas têm sido estudadas principalmente com a finalidade de se analisar a dinâmica da neoformação/reabsorção que ocorre dentro da homeostasia óssea.

Esses eventos, de formação e reabsorção óssea, podem ser influenciados ou modulados por diversos agentes. O fluoreto se destaca como um elemento que parece alterar sobremaneira a atividade de osteoblastos (LAU, & BAYLINK, 1993), seja por influência sistêmica (OHMI et al., 2005) ou pela sua presença em cristais de apatita (fluorapatita) (QU & WEI, 2006; COOPER et al., 2006) (KÜRKÇÜ et al., 2008). O mesmo fluoreto parece alterar a quantidade de massa óssea em ratos de maneira dose-dependente (OHMI et al., 2005), além de ser usado em protocolos de tratamentos de osteoporose mostrando diminuir a incidência de fraturas ósseas e aumentar a densidade de massa óssea em humanos (HAGUENAUER et al., 2000). Entretanto, outros dados da literatura mostram que o fluoreto, em altas concentrações na água de abastecimento, pode promover algumas alterações de ordem patológica nos tecidos ósseos como: osteopetrose adquirida (alteração caracterizada pelo aumento de densidade óssea em virtude de defeito na atividade de osteoclastos) (HALLANGER-JOHNSON et al., 2007; TAMER et al., 2007) e fluorose esquelética (ORUC, 2008). É sabido que o F^- interage com os tecidos mineralizados, e em concentrações elevadas pode prejudicar o processo de mineralização (AOBA e FEJERSKOV, 2002).

Sabe-se que a cronologia e o desenvolvimento natural do processo de reparo alveolar dependem de muitas variáveis (PELISSARO et al., 2007). Assim, fica evidente a importância da determinação de por quais mecanismos o fluoreto altera ou norteia nessas células (osteoblasto-osteoclasto) responsáveis pela homeostasia óssea.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, metabolicamente ativo, constituído por uma fase mineral e orgânica, perfeitamente organizado para desempenhar o papel de sustentação do corpo, proteção da medula óssea e órgãos vitais, inserção muscular, suporte aos tecidos moles e homeostase mineral (MEGHJI, 1992).

Além dessas funções o tecido ósseo (especialmente os ossos longos) tem em seu interior a medula óssea responsável pela geração de células hematopoiéticas (MARX & GARG, 1998; DEMPSTER, 1999). Possui alto poder de regeneração (habilidade das células de restaurarem um órgão ou tecido danificado ou perdido) quando comparado a outros tecidos dos mamíferos, uma vez que o processo de reparo se faz com tecido semelhante ao original (novo osso) (BAHAR et al., 2007). Esse processo de reparo segue etapas semelhantes ao processo de desenvolvimento embrionário do osso (BEHONICK et al., 2007). Durante o processo de regeneração/reparo são mimetizados os passos que ocorrem durante o desenvolvimento ósseo normal, incluindo migração e proliferação de células mesenquimais, diferenciação destas em células condrogênicas/osteogênicas, subsequente deposição de tecido cartilaginoso/ósseo e ainda, sua remodelação sem deixar cicatriz, sendo esse processo semelhante ao da ossificação intramembranosa ou endocondral (BOSTROM, 1998; JUNQUEIRA, et al., 2002). Portanto, o osso de origem endocondral tem a sua formação posterior a formação de um molde de cartilagem hialina depois sendo substituído por tecido ósseo, com concomitante apoptose dos condroblastos. O osso de origem intramembranosa tem sua formação diretamente dentro de uma membrana de tecido conjuntivo, sem passar pela etapa de cartilagem (BEHONICK et al., 2007).

Macroscopicamente o tecido ósseo pode ser dividido em osso esponjoso (ou trabecular) e cortical (denso). Quanto à disposição o osso cortical se apresenta geralmente na porção externa do osso, enquanto o esponjoso se encontra na porção interna. Histologicamente o dois tipos de ossos (cortical e medular) apresentam subunidades formadoras chamadas de osteon. O osteon é uma subunidade concêntrica, formada por tecido ósseo e osteócitos com a presença de vasos,

osteoblastos e tecido nervoso num canal central chamado de canal de Havers. Os canais de Havers se comunicam por meio de outros canais chamados de canais de Volkmann (anastomoses) (NANCI, 2008).

Em nível molecular, o osso é constituído, basicamente, de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixa massa molecular e proteínas não colágenas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral (principalmente hidroxiapatita) correspondente a 65% e água (10%) (NANCI, 2008). Assim, além de suas funções esqueléticas de suporte, proteção e locomoção, o osso constitui um reservatório importante de minerais (NANCI, 2008). Apesar da sua forma rígida, conferida pela porção inorgânica de hidroxiapatita, o osso é um tecido com alta taxa de remodelamento.

O tecido ósseo possui uma população celular constituída de osteoblastos (responsáveis pelo processo de síntese de osso), osteócitos (responsáveis pela manutenção do osso maduro) e osteoclastos (células originárias de monócitos do sangue) responsáveis pela reabsorção de osso (NANCI, 2008). Os osteoblastos são células cubóides organizadas em uma camada contínua (semelhante a um epitélio) sobre o osteóide, ou seja, a camada não mineralizada de matriz, que recobre a superfície óssea mineralizada. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz. Responsáveis pela osteogênese, isto é, processos de síntese e secreção da matriz orgânica, sua maturação e mineralização. O osteoblasto além de sintetizar e secretar o colágeno tipo I, que corresponde a 90% da matriz orgânica, também produz outras proteínas não colagênicas encontradas na matriz, como: sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, BMPs, proteoglicanas e outras (MARX & GARG, 1998; NANCI, 2008).

Os osteócitos são osteoblastos incorporados à matriz óssea mineralizada, durante a osteogênese. Apresentam longas projeções citoplasmáticas que ocupam canalículos intercomunicantes constituindo uma rede de comunicação entre as células e a superfície óssea (MARX & GARG, 1998; NANCI, 2008).

Segundo Elmardi et al (1990), a atividade funcional e a morfologia dos osteócitos variam de acordo com a "idade" da célula. Os osteócitos jovens possuem a maioria das características estruturais dos osteoblastos, mas diminuição do volume celular e capacidade de síntese protéica. Já os maduros, estão localizados incorporados no osso calcificado e apresentam diminuição do volume celular e

acúmulo de glicogênio no citoplasma. Os osteócitos, durante a reabsorção óssea, são fagocitados e digeridos.

Outro tipo celular envolvido com o metabolismo ósseo são os osteoclastos. Caracterizados como células gigantes, multinucleadas formadas pela fusão de células de origem hematopoiéticas (precursores da linhagem monócito-macrófago) (TEITELBAUM, 2000; HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006). O fenômeno de maturação das células precursoras em osteoclastos maduros ocorre na presença dos osteoblastos, que expressam duas moléculas que são essenciais para promover a osteoclastogênese: ativador do receptor da NF- κ B ligante (RANKL) e do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (SOLTANOFF et al., 2009; KOBAYASHI, UDAGAWA, & TAKAHASHI, 2009). TAKAHASHI e colaboradores (1988) associaram a atividade osteoclástica com o contato com osteoblastos ao observarem, em seu experimento, que mais de 90% das células marcadas para TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato, enzima considerada um biomarcador para osteoclastos) estavam localizadas próximas a células mononucleadas marcadas positivamente para fosfatase alcalina (enzima considerada um marcador para osteoblastos). Assim os autores sugeriram que os osteoblastos estavam envolvidos na ativação ou controle de osteoclastos. No processo de reabsorção óssea por osteoclastos as células migram para o sítio de reabsorção e se aderem firmemente à matriz óssea. Formando uma área vedada na zona de periferia da célula, que delimita a zona reabsorvente da célula. A região celular em contato com osso reabsorvido adquire um formato especial denominado “borda em escova” ou “borda franjada”. Os osteoclastos então secretam ácido (HCl), com a ajuda de uma enzima citoplasmática chamada anidrase carbônica II e uma bomba de prótons, na lacuna de reabsorção. Este fenômeno culmina com uma queda no pH no microambiente selado (osteoclasto – superfície óssea) em torno de 2,5 – 3,0 (SUNDQUIST et al., 1990; MARSHALL et al., 1997). Além do ácido, os osteoclastos secretam ainda proteases (catepsina K e metaloproteinase de matriz 9) na lacuna de reabsorção (LI et al., 1999), também chamada de lacuna de Howship (HADJIDAKIS & ANDROULAKIS, 2006). Os produtos de degradação são endocitados pela célula e liberados na sua superfície oposta a superfície de reabsorção. Ao final do processo de reabsorção do osso, a célula migra para outro sítio e inicia o processo novamente (GRANOT-ATTAS, KNOBLER & ELSON, 2007).

A interação de osteoblasto-osteoclasto é responsável pelo controle da remodelação óssea, ou seja, a reabsorção e a neoformação óssea que ocorre em todos os ossos (RODAN & MARTIN, 1981). Deste modo, os osteoblastos produzem fatores que vão influenciar a diferenciação e função dos osteoclastos, alguns destes são depositados e armazenados na matriz e outros secretados localmente em resposta a hormônios ou fatores locais. Segundo RODAN & MARTIN, (1981) os receptores para a maioria dos fatores osteolíticos são encontrados nos osteoblastos e não nos osteoclastos. Em cultura, os osteoclastos reabsorvem osso em resposta a fatores liberados por osteoblastos estimulados (MCSHEEHY & CHAMBERS, 1986). Por outro lado, a reabsorção óssea libera fatores que recrutam e ativam os osteoblastos. A remodelação óssea ocorre em pequenos conjuntos de células chamados de unidades multicelulares básicas – UMBs, (COMPSTON et al., 2007; GALLO et al., 2008; COOPER et al., 2006; SEEMAN, 2008).

A resistência e integridade do tecido ósseo dependem da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção pelos osteoclastos e a formação pelos osteoblastos. Com o envelhecimento ou como resultado de alguma alteração metabólica, este equilíbrio pode ser deslocado a favor dos osteoclastos de forma que a reabsorção excede a formação óssea, tornando os ossos frágeis e predispostos a fraturas (RODAN & MARTIN, 2000). Em adultos normais, há um equilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formada pelos osteoblastos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2008; NANCE, 2008; BRUZZANITI e BARON, 2006; ASAGIRI e TAKAYANAGI, 2007). O desequilíbrio entre o processo de reabsorção e aposição óssea pode resultar em diversas doenças como osteoporose (MACLEAN et al, 2008), osteopetrose (ASKMYR et al, 2008) e osteomalácia (MANKIN e MANKIN, 2008).

2.2 REPARO ALVEOLAR

O processo de reparo em feridas de extração dental é definido como um conjunto de reações teciduais desencadeadas no interior do alvéolo logo após a exodontia. O organismo tem como objetivo, frente ao traumatismo após a extração dental, preencher com tecido ósseo o espaço deixado no alvéolo (CARVALHO e OKAMOTO, 1987). Diversos estudos têm descrito os eventos teciduais de reparo no alvéolo dental pós-extração em: ratos (OKAMOTO et al., 1994; SATO & TAKEDA,

2007), cães (CARDAROPOLI, ARAÚJO & LINDHE, 2003) e humanos (DEVLIN, 2000; DEVLIN & SLOAN, 2002).

Nesse sentido o reparo ósseo em alvéolo após a extração dental tem sido adotado como um modelo muito interessante para o estudo das etapas do processo de reparo ósseo, desde eventos iniciais (horas) até períodos tardios (meses) para identificação e quantificação de proteínas especiais. Cronologicamente podemos considerar quatro fases fundamentais na evolução do processo de reparo alveolar (PERRI de CARVALHO e OKAMOTO 1998; SATO & TAKEDA, 2007):

1) Estágio Exsudativo: caracterizado pelo preenchimento do alvéolo dental por coágulo sangüíneo (1 a 7 dias após a extração dental, em alvéolo de ratos);

2) Estágio Proliferativo: marcado pela intensa proliferação celular, desenvolvimento do tecido conjuntivo e maturação do tecido conjuntivo (7 a 14 dias após a extração dental, em alvéolo de ratos);

3) Estágio Reparativo: nesta etapa existe a gradual reposição do tecido de granulação por trabéculas ósseas (14 a 21 dias após a extração dental, em alvéolo de ratos) e

4) Estágio de Remodelamento: caracterizado pelo processo de substituição do tecido ósseo primário por tecido ósseo secundário (a partir de 21 dias após a extração dental, em alvéolo de ratos) (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008).

A formação do coágulo sangüíneo é uma etapa fundamental para o prosseguimento do reparo tecidual. A rede de fibrina irá permitir a invasão e proliferação de células (células endoteliais de vasos, fibroblastos e macrófagos) os quais estão presentes nos tecidos adjacentes ao alvéolo dental (YUGOSHI et al., 2002). Fatores presentes no coágulo sangüíneo como citocinas, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento insulina-like (IGF) e fator de crescimento transformante beta ($TGF-\beta$) irão nortear os eventos celulares posteriores (migração e diferenciação) e por meio do efeito quimiotático (BAHAR et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). Assim, o coágulo sangüíneo será gradualmente destruído e invadido por fibroblastos, provenientes da mitose dos fibroblastos pré-existentes e por diferenciação de células adventícias localizados nos tecidos adjacentes. Ocorre também à proliferação e invasão de células endoteliais que originarão novos capilares. OKAMOTO et al em 1994, observaram que a remoção do coágulo em feridas de extração dental promove profundo atraso do

reparo alveolar em ratos. Em 1999, AMLER concluiu que a alveolite pode ser instalada com a desorganização desse coágulo sanguíneo.

Num segundo momento existe o desenvolvimento do tecido conjuntivo, iniciando a formação do tecido com presença de fibroblastos e novos capilares, juntamente com a síntese de fibras e substância fundamental amorfa pelos fibroblastos. Posteriormente acontece à maturação desse tecido (também chamado de tecido de granulação), caracterizado pelo aumento do número de fibras colágenas, diminuição no número de células e vasos sanguíneos (YUGOSHI et al., 2002).

O processo de reparo terá ainda o fenômeno de diferenciação óssea. Nesta etapa existe a síntese de matriz orgânica formando tecido osteóide pelos osteoblastos (originados de células osteoprogenitoras dos tecidos adjacentes) e, posteriormente, começando a mineralização da matriz orgânica pela deposição de cristais de hidroxiapatita contidos nas vesículas de matriz (SCHINDELER et al., 2008). Esse osso em última análise será remodelado, ou seja, o tecido ósseo primário (“desorganizado”) sintetizado “às pressas” será substituído por tecido ósseo secundário (organizado em lamelas) paulatinamente (SCHINDELER et al., 2008). Nesta etapa temos a atividade indispensável de uma célula responsável pela reabsorção do osso primário: o osteoclasto (SCHINDELER et al., 2008).

Todas essas etapas descritas no processo de reparo alveolar e mesmo do reparo ósseo em geral, acontecem com eventos em sobreposição, ou seja, enquanto temos uma gradual diminuição de um tecido (ou grupo celular) paralelamente teremos o aumento de outro tecido. Por exemplo: a degradação do coágulo sanguíneo acontece nas primeiras semanas enquanto existe a invasão de tecido conjuntivo nos lugares antes ocupados pelo coágulo sanguíneo (BAHAR et al., 2007; SCHINDELER et al., 2008). Especificamente em relação ao reparo do alvéolo dental de incisivos, esse reparo acontece em momentos diferentes nas regiões do alvéolo (terço).

A neoformação óssea inicia-se no homem por volta do 7º dia pós-operatório (TROMBELLI et al., 2008), em pacientes jovens há cerca de 2/3 de alvéolo preenchido por trabéculas ósseas por volta do 40º dia.

Tanto o processo de mineralização quanto a formação do tecido de granulação no alvéolo dental são concêntricos, ou seja, a partir do fundo e das proximidades das paredes alveolares (OKAMOTO; RUSSO, 1973; CARVALHO e

OKAMOTO, 1987), e essencialmente semelhantes ao que ocorre nos demais tecidos calcificados normais ou patológicos do organismo (SELA; BAB, 1979).

O processo de reparo alveolar pode ser considerado concluído ou adequado no momento que houver o preenchimento de tecido ósseo em todo o alvéolo. Em humanos esse processo se finaliza em aproximadamente 64 dias (AMLER, 1969, RODRIGUES & CARVALHO, 1983), 27 dias em ratos (HADDAD, et. al., 1965, OKAMOTO & RUSSO, 1973) e 48 dias em cães (SANTOS PINTO, 1964).

Vale ressaltar que existe um dado na literatura pouco discutido, mas de fundamental importância de ser citado: o tempo de reparo ósseo em diferentes alvéolos dentais. Considerado em alguns trabalhos como o reparo do alvéolo de incisivos (OKAMOTO et al., 1994; YUGOSHI et al., 2002; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008), enquanto outros autores descrevem o processo de reparo em alvéolos de molares (DEVLIN et al., 1996; KANYAMA et al., 2003; SATO & TAKEDA, 2007). No trabalho de CARDAROPOLI, ARAÚJO & LINDHE (2003), os autores utilizam o modelo de alvéolo de pré-molares de cães. Devido às diferenças anatômicas (formato e diâmetro da raiz, volume de inserção no osso alveolar), funcionais e mesmo ao fato de que o incisivo de roedores tem crescimento contínuo durante toda sua vida, devemos ponderar que uma diferença clara na questão do tempo de reparo irá acontecer (OKAMOTO et al., 1994; SATO & TAKEDA, 2007) entre os diferentes modelos adotados.

2.3 CITOCINAS: RANK, RANKL E OPG

Diversas moléculas estão envolvidas na diferenciação dos osteoclastos a partir das células-tronco hematopoiéticas: fator estimulador de colônia dos macrófagos (M-CSF), ativador do receptor do fator kappa B nuclear (RANK) e seu ligante (RANK-L), dentre outros (BOYCE & XING, 2008). A interação RANK-RANKL exerce um papel crucial neste processo, estimulando a maturação dos osteoclastos (SUZUKI et al., 2008). A osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibidor de osteoclastogênese, é uma proteína com semelhança com os membros da família de receptor para TNF (fator de necrose tumoral) (MARTIN, GOOI & SIMS, 2009). OPG, RANK e RANK-L são produzidas por inúmeros tipos celulares e por uma variedade de tecidos (THEOLEYRE et al., 2004), sendo mais estudado durante a osteoclastogênese. A osteoprotegerina (OPG), uma proteína expressa pelos osteoblastos, células estromais da medula e outros tipos celulares, inibe a formação

e atividade dos osteoclastos se ligando ao RANK-L, impedindo sua ligação com o RANK (CHAMBERS, 2000; BOYCE & XING, 2007).

A OPG funciona como um receptor solúvel para RANK, competindo com RANK-L, uma molécula da família do TNF (BOYLE, SIMONET & LACEY, 2003). Ambos são elementos importantes na remodelação óssea e regulam as interações entre linfócitos T e células dendríticas. RANK e RANK-L são essenciais no desenvolvimento e ativação de osteoclastos e perda óssea em relação a todos os estímulos conhecidos (MARTIN, GOOI, & SIMS, 2009). A inibição da função de RANK-L via OPG previne perda óssea em articulações inflamadas e tem benefícios parciais na injúria da cartilagem articular. Camundongos deficientes em OPG apresentam osteoporose severa e alta incidência de fraturas, mostrando que a massa óssea correlaciona-se com os níveis de OPG nas células. A expressão de OPG em células da medula óssea é influenciada negativamente por fatores como a vitamina D3, prostaglandinas, corticóides, positivamente por cálcio e fator de transformação beta (KHOSLA, 2001).

A interação entre o fator ativador (RANK) e o seu ligante RANK-L mostrou ser crítica para que ocorra a formação de osteoclastos (SHARMA et al., 2008). Além disso, a identificação da osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel, se tornou importante, ligando-se ao RANK-L impedindo a conexão RANK/RANKL, e conseqüentemente a formação de osteoclastos e reabsorção óssea (BOYLE, SIMONET & LACEY, 2003). Em condições fisiológicas, a OPG mantém o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (HOFBAUER, NEUBAUER & HEUFELDER, 2001). Portanto o metabolismo ósseo é caracterizado por duas atividades opostas, a formação óssea e reabsorção óssea. Em pacientes com osteoporose, artrite reumatóide e metástase ocorre um desequilíbrio na tríade OPG/RANK-L/RANK, sendo atualmente alvo de estudos para possíveis aplicações terapêuticas (WADA, et al., 2006). Camundongos knockout para RANK-L desenvolvem osteopetrose severa e têm defeitos na erupção dentária (KONG et al., 1999).

THEOLEYRE et al., 2004 demonstraram que OPG/RANK/RANK-L constitui uma ponte molecular abrangendo a homeostase óssea e imunidade, chamada por “osteimunologia” (WALSH e CHOI, 2003).

2.4 METALOPROTEINASES DE MATRIZ (MMPS)

Outro fator envolvido tanto no desenvolvimento como no reparo ósseo são as chamadas metaloproteinases de matriz (MMPs) (ORTEGA et al., 2003). As MMPs constituem uma importante família de endopeptidases metalo dependentes e representam a maior classe de enzimas responsáveis pela degradação ou reabsorção de todos os componentes da matriz extracelular (MEC) (SOUZA & LINE, 2002). Todas as MMPs contêm o íon zinco (Zn^{+2}) no seu sítio catalítico e requerem o cálcio (Ca^{+2}) para sua estabilidade e atividade. Os seus alvos incluem outras proteinases, inibidores de proteinases, fatores de coagulação, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento latentes, proteínas de ligação a fatores de crescimento, receptores de superfície celular, moléculas de adesão célula-célula (PAGE-MCCAW, EWALD & WERB, 2007). MMPs podem ser classificadas de acordo com sua estrutura (forma) ou seus substratos específicos, são conhecidos 25 tipos de MMPs até o presente momento (GHAJAR, GEORGE & PUTNAM, 2008). Então as MMPs são subdivididas de acordo com sua principal característica, a atividade de degradação e a lista de substratos conhecidas é crescente (PASTERNAK e ASPENBERG, 2009).

As MMPs regulam muitos processos biológicos e são intimamente regulados por eles. Essas enzimas regulam a maior parte dos processos de desenvolvimento, homeostase e doença (STERNLICHT and WERB, 2001). Inicialmente as MMPs são sintetizadas como zimogênios (inativos) que requerem ativação (HARPER, BLOCH, & GROSS, 1971). Outro nível de regulação das metaloproteinases é constituído pelos inibidores teciduais de MMPs, as TIMPS (BAUER et al., 1975; PAGE-MCCAW, EWALD & WERB, 2007).

O reparo tecidual envolve muitos processos incluindo migração celular, deposição de matriz e remodelação. Membros da família de MMP são mediadores fisiológicos da matriz extracelular (ALLORI, SAILON, & WARREN, 2008b). Muitas das respostas cruciais nos estágios iniciais do reparo, tais como infiltrado inflamatório, angiogênese (degradação da membrana basal, invasão, proliferação e formação do capilar) (GHAJAR, GEORGE & PUTNAM, 2008), re-epitelização são iniciados pelas MMPs e essas moléculas poderiam ser importantes marcadores da reparação tecidual, sendo as estromelisininas mais expressas durante o processo de reparo (KINANE, 2000).

Estudos recentes sugerem que as MMPs também podem ter um espectro mais amplo de funções, incluindo a regulação da resposta inflamatória, por exemplo, através dos efeitos sobre a sinalização das quimiocinas e citocinas e pela liberação de neoepítomos da MEC. Leucócitos, principalmente macrófagos, são fontes importantes de MMPs, cujo papel vital permite que essas células extravasem e penetrem nos tecidos, um evento chave do processo inflamatório. OPDENAKKER & VAN DAMME (1992) sugeriram que a ação de MMPs não só permite a migração de leucócitos como também causa a destruição tecidual, gerando fragmentos imunogênicos a partir de proteínas normais que podem favorecer doenças autoimunes. De modo semelhante, células metastáticas de câncer usam MMPs para romper a lâmina basal dos tecidos e chegar até a corrente sanguínea (OPDENAKKER & VAN DAMME, 1992). Indústrias farmacêuticas têm sintetizado inibidores de MMPs de baixo peso molecular que têm mostrado eficiência em modelos testes de algumas doenças, reforçando seu papel central nessas patologias (BECKETT, et al. 1996; BAKER, EDWARDS & MURPHY, 2002).

Evidências também indicam o papel da MMP-9 na remoção de fragmentos de colágenos desnaturados, seguido da ação de outras MMPs e proteinases contendo cisteína durante a fase inicial da reabsorção óssea (RICE, KIM & THESLEF, 1997). As MMPs apresentam propriedades estruturais funcionais diferentes, porém todas exibem capacidade de degradar uma ou mais moléculas constituintes da matriz extracelular. Normalmente, estas moléculas encontram-se desativadas por inibidores específicos e são secretadas como zimogênios (NAGASE & WOESNER 1999).

As collagenases tipo IV ou gelatinases (MMP-2 e MMP-9) estão envolvidas na proteólise e ruptura de membranas basais, colágenos e colágenos desnaturados (gelatinas), fibronectina, elastina, assim como na degradação de outros componentes da MEC (STERNLICHT e WERB 2001).

A gelatinase B, ou MMP-9 expressa principalmente por clastos, participa da reabsorção óssea, no compartimento subclástico e em sítios de neoformação (PAGE-MCCAW, EWALD & WERB, 2007). A MMP-9 apresenta capacidade de degradar fibrilas de colágeno do osso em conjunto com MMP-1 e proteinases cisteínicas, como as catepsinas B, G, L e N (OKADA et al., 1995). A expressão dessa enzima foi confirmada em cultura de macrófagos alveolares, neutrófilos, trofoblastos, queratinócitos, células tumorais e linfócitos T humanos (REPONEN et al., 1994). A síntese desta enzima pela maioria das células tem como objetivo

degradar a matriz extracelular, às vezes, até a membrana basal, para permitir a migração das células no tecido, além de ser uma das responsáveis pelo turnover do colágeno (REPONEN et al., 1994).

Osteoclastos expressando gelatinase B geralmente apresentam marcação positiva também para TRAP (REPONEN et al., 1994). Entretanto, RICE, KIM & THESLEF, em 1997, identificaram nos clastos a transição de gelatinase B predominantemente nas áreas em neoformação de tecido ósseo e de crescimento rápido, enquanto a marcação por TRAP revela-se em maior proporção na remodelação de osso maduro.

Os estágios finais da ossificação dependem da ação de MMPs as quais degradam a matriz cartilaginosa e permitem a invasão de vasos sanguíneos (VU et al., 1998). Antes da formação da cavidade medular, a MMP-9 é altamente expressa em células do mesênquima ao redor dos rudimentos ósseos. Com o desenvolvimento da medula óssea, a expressão de MMP-9 é detectada em osteoclastos no centro da diáfise (REPONEN et al., 1994; BLAVIER & DELAISSÉ, 1995; JEMTLAND, LEE, & SEGRE, 1998).

COLNOT et al. (2003), descreveram a primeira evidência genética mostrando que a MMP-9 regula eventos cruciais durante o reparo de fraturas em adultos, atuando na invasão vascular do calo de cartilagem hipertrófica, e que camundongos sem esse gene tem uma fenda e atraso na união de suas fraturas causadas pela cartilagem persistente no local da injúria.

ACCORSI-MENDONÇA e colaboradores (2008) descreveram o envolvimento das MMPs 2 e 9 no processo de reparo alveolar de ratos. Os autores descreveram diferenças na expressão das MMPs nas diferentes regiões do alvéolo (terço apical, terzo médio e terzo cervical) bem como nos tempos de reparo (1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, e 42 dias pós-operatório), demonstrando a importância dessas metaloproteases nos processos de substituição do coágulo sanguíneo pelo tecido conjuntivo e na formação, maturação e remodelamento do novo osso.

2.5 FLÚOR

2.5.1 Considerações gerais

O flúor tem seu nome originado do latim *fluere*, que significa fluir. Em temperatura ambiente, um elemento gasoso e não metálico, extremamente reativo,

de cor amarelo-pálido, odor característico e propriedades tóxicas. Pertence ao grupo VIIa ou 17 da tabela periódica, também chamado de halogênios. Seu símbolo é F, número atômico 9 e peso atômico 19. Por ser muito pequeno, as eletrosferas dos dois átomos na molécula de F_2 (F - F) ficam muito perto, enfraquecendo sua ligação, o que torna esta molécula muito instável. O pequeno raio do átomo de flúor faz ainda com que seu núcleo seja menos blindado, o que o torna o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica. Estas características fazem com que o íon se ligue facilmente a qualquer outro elemento, e estas ligações são mais estáveis que a de uma molécula de F_2 . Reage prontamente com seu ambiente, comportando-se como íon flúor ou fluoreto, sendo a fluorita (CaF_2), a criolita (Na_3AlF_6) e a fluorapatita [$Ca_5F(PO_4)_3$] os minerais mais importantes no qual está presente.

O F^- distribui-se rapidamente pelo organismo. Do ponto de vista farmacocinético, o plasma é considerado o compartimento central de distribuição do F^- pois ele é o fluido no qual e pelo qual o F^- deve passar para sua subsequente redistribuição e eliminação (WHITFORD, 1996).

2.5.2 Fluoreto e tecidos mineralizados

Aproximadamente 99% do F^- retido no organismo está associado aos tecidos mineralizados, principalmente ao osso, mas também ao esmalte e à dentina. A concentração de fluoreto presente no osso é geralmente proporcional à ingestão ao longo do tempo (WHITFORD, 1994; WHITFORD, 1999). Portanto, ávido por tecidos calcificados, o fluoreto tem grande habilidade em estimular a formação de novo osso, assim como reverter, a formação de lesões iniciais de cárie (WHITFORD, 1996).

A utilização do fluoreto no tratamento de doenças ósseas vem sendo sugerida há muito tempo, como no caso da osteoporose, que começou a ser tratada com fluoreto em 1964 (REID et al., 2007). Entretanto, após muitos anos de pesquisa, esse tratamento continua controverso, já que o fluoreto possui um efeito duplo nos osteoblastos. Por um lado, ele aumenta o número de osteoblastos no tecido, devido a seu efeito mitogênico nos precursores dos osteoblastos; por outro, possui um efeito tóxico considerando-se a célula individualmente, prejudicando a mineralização e reduzindo a taxa de aposição mineral (DEQUEKER & DECLERCK, 1993). Em adição, o fluoreto se acumula no tecido ósseo, que pode ser considerado um

biomarcador para exposição crônica (DUNIPACE et al., 1995) e aguda ao fluoreto (BEZERRA de MENEZES et al., 2003; BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2005).

Em um estudo conduzido por RAFFI e colaboradores (1997), foi verificado aumento da espessura do osso cortical, assim como também de sua porosidade, na presença do fluoreto. Dados histomorfométricos mostraram que o fluoreto aumenta o volume de osso trabecular através do aumento do número de osteoblastos (FARLEY et al., 1983; LAU e BAYLINK 1998; DURE-SMITH, 1991; CHAE et al., 1999). A espessura das trabéculas do osso medular também aumentou com o tratamento com fluoreto, porém, em doses altas ou muito prolongadas, foi verificada uma redução da espessura trabecular, decorrente da ação tóxica do fluoreto nos osteoblastos (BOIVIN et al., 1987). DAIJEI (1984) e KRISHNAMACHARI (1986), em humanos, e COUTELIER et al. (1978) em bovinos, encontraram lesões de osteomalácia e osteoporose em consequência da ingestão de altas doses de fluoreto durante um longo período de tempo. Essa osteoporose seria consequência de intoxicações graves que causariam osteonecrose e lesões nos osteoblastos (KROOK & MAYLIN, 1979). Um estudo descrito por HALLANGER JOHNSON et al. (2007), em humanos, obteve resultados parecidos em pacientes que apresentavam osteomalácia e outras desordens ósseas (esclerose óssea) associadas à ingestão crônica de fluoreto em bebidas como chá. No entanto, outros autores evidenciaram osteoporose sem osteonecrose, provavelmente em consequência de uma lesão, sobre os osteoblastos, mais grave que a lesão sobre os osteócitos (RIET-CORREA et al., 1983).

Em 2007, VESTERGAARD e colaboradores, em um estudo de meta-análise, concluíram que os protocolos de uso do fluoreto na forma de monofluorofosfato têm aumentado substancialmente a densidade mineral óssea, no entanto, a dose a ser utilizada deveria ser mais estudada para evitar efeitos tóxicos e inibitórios ao processo de mineralização.

Segundo QU e colaboradores (2008) doses de 10^{-8} a 10^{-5} M de NaF podem estimular os processos de proliferação e atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos caprinos. Entretanto doses de 10^{-4} a 10^{-3} M de NaF promovem diminuição da atividade de fosfatase alcalina, proliferação celular e habilidade de mineralização ao passo que aumenta a taxa de apoptose celular.

ORUC (2008) descreveu vários trabalhos relacionando a alta concentração de fluoreto na água local (rios e fontes de água da região) com problemas de crescimento e desenvolvimento ósseo de humanos e animais de criação como cabras e vacas, além da fluorose dentária.

Segundo Kragstrup e colaboradores (1984) as alterações ósseas induzidas pelo fluoreto não são decorrentes da ação deste em apenas um tipo celular ósseo. Os autores sugerem que o fluoreto afeta todas as células envolvidas, direta ou indiretamente, no mecanismo de remodelação óssea. LAGIER (1978) e BOIVIN et al. (1987) consideram que a fluorose esquelética está associada com um aumento das superfícies de remodelação; porém, ocorre um desequilíbrio em favor da formação óssea, com freqüentes defeitos de mineralização, devidos provavelmente ao duplo efeito sobre os osteoblastos, que causa um aumento no número de osteoblastos, mas também ocasiona um efeito tóxico sobre essa célula.

Fica evidente que o fluoreto, além de sua interação com a hidroxiapatita, também possui um efeito sobre as células do tecido ósseo, causando estímulos e alterações na morfologia e no metabolismo das células (MOHR, 1990; CHENG et al., 2005; QU & WEI, 2006; COOPER et al., 2006; WANG et al., 2007). No entanto, o mecanismo de efeito do fluoreto no tecido ósseo e seus principais alvos não foram esclarecidos (KEBSCH et al., 2007; WANG et al., 2007). Recentemente SHARMA e colaboradores (2008) demonstraram o estresse no retículo endoplasmático de ameloblastos e nos processos de síntese e secreção de proteínas provocada pelo fluoreto. Esses autores mostraram que camundongos com ingestão crônica de fluoreto (água de beber) em doses acima de 50 ppm têm uma proteína, fator-2 de iniciação eucariótica subunidade alfa (eIF2 α) fosforilada, alterada em seus ameloblastos. Essa fosforilação aumentada, nos ameloblastos dos animais tratados com altas doses de fluoreto, tem como última consequência a diminuição de produção de proteínas pelo retículo endoplasmático.

MOUSNY e colaboradores (2008) relacionaram os efeitos do fluoreto, nos processos de formação óssea e mineralização, com fatores genéticos. Os pesquisadores submeteram diferentes espécies de camundongos A/J, SWR/J e 129P3/J às doses de 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, e 100 ppm de fluoreto. Esses animais foram inicialmente classificados em diferentes grupos de susceptibilidade ao fluoreto devido a um trabalho pioneiro de EVERETT e colaboradores (2002) sobre susceptibilidade a fluorose dental. Ao final do trabalho, MOUSNY e colaboradores

(2008) demonstraram que essas espécies também apresentavam diferentes respostas, nos tecidos ósseos, aos efeitos do flúor. YAN, et al. (2007) demonstraram que o elemento fluoreto pode interferir diretamente no processo de osteoclastogênese, aumentando o número de unidades formadoras de colônias (monócitos/macrófagos).

A literatura sobre a influência do fluoreto na homeostasia óssea é incisiva em concluir que esse elemento interfere diretamente na modulação da atividade de células ósseas (HARINARAYAN et al., 2006). No entanto, esses resultados ainda são controversos e poucos são aqueles capazes de dar detalhes mais sólidos sobre os mecanismos moleculares modificados ou atingidos pelo fluoreto. Outro detalhe que ainda merece destaque é a faixa de concentração adequada e segura para conseguir os efeitos positivos desse elemento. Desse modo, a descoberta de quais proteínas e fenômenos são alterados no reparo ósseo, após a ingestão crônica de fluoreto, poderia contribuir sobremaneira para o entendimento do reparo ósseo modulado pelo fluoreto.

Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito do fluoreto sobre o reparo ósseo alveolar de ratos.

Os objetivos específicos foram:

1- avaliar e quantificar a presença de fluoreto no plasma sangüíneo dos ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto na água de beber (0-controle, 5, 15 e 50 ppm);

2- avaliar os processos de formação e substituição do coágulo sangüíneo, neoformação óssea e reabsorção óssea nos alvéolos de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto na água de beber (0-controle, 5, 15 e 50 ppm);

3- avaliar o processo de remodelação de matriz extracelular através da identificação de: RANKL, OPG e MMP- 9, e através da atividade de: MMP-2 e 9, na presença e ausência de fluoreto e

4- avaliar o processo de reabsorção óssea por meio de marcação de osteoclastos TRAP - positivos nos alvéolos de ratos tratados com diferentes concentrações de fluoreto na água de beber (0-controle, 5, 15 e 50 ppm).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais deste estudo foram obtidos do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo - FOB-USP, após aprovação do projeto no Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (Processo número 020/2006) (Anexo 1). A pesquisa foi realizada segundo as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), que permaneceram em caixas plásticas em grupos de 5 durante todo o período experimental, tratados com ingestão de fluoreto controlada (água de beber e ração) durante sessenta dias logo após o desmame (20 dias de vida). Os animais (n=200) foram divididos em 4 grupos experimentais (I, II, III e IV) (Figura 1).

Figura 1. Cronograma de utilização dos animais

A água foi preparada com diferentes concentrações de flúor de acordo com a divisão entre grupos, descrito na **tabela 1**.

Tabela 1. Concentração de flúor na água de beber fornecida aos animais dos grupos experimentais

Grupos:	Água de beber fornecida aos animais após o desmame
I	água deionizada
II	água com 5 ppm de flúor
III	água com 15 ppm de flúor
IV	água com 50 ppm de flúor

Foi utilizada uma ração com baixo conteúdo de flúor (AIN-93, REEVES et al., 1993) (Tabelas 2, 3 e 4), preparada em nosso laboratório, pois estudos prévios têm relatado que os níveis de flúor presentes nas rações comerciais são superiores a 20 ppm de flúor (BUZALAF et al., 2004, BUZALAF et al., 2005), podendo interferir nos resultados.

Tabela 2. Composição das dietas (g/100g) utilizadas no ensaio biológico (CRUZ & JOKL, 1986)

Componentes	g/100g
Caseína (*)	20
Óleo de soja	7
Mistura salina	3,5
Mistura vitamínica	1
Amido de milho	39,75
Dextrina	13,2
Sacarose	10
Celulose	5
Cistina	0,3
Colina	0,25

(*) % de proteína = % N x 6,25.

Tabela 3. Composição da mistura salina (ROGERS & HARPER, 1965)

Componentes	%
Molibdato de amônio - $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{29} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,003
Carbonato de cálcio - CaCO_3	29,29
Fosfato de cálcio - CaHPO_4	0,43
Sulfato cúprico - CuSO_4^{+3}	0,156
Citrato férrico - $\text{Fe} + (\text{C}_6\text{H}_8)_7 \cdot \text{H}_2\text{O}_n$	0,62
Sulfato de magnésio - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9,98
Sulfato de manganês - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,121
Iodeto de potássio - KI	0,0005
Fosfato de potássio - K_2HPO_4	34,31
Cloreto de sódio - NaCl	25,06
Selenito de sódio - Na_2SeO_3	0,002
Cloreto de zinco - ZnCl_2	0,02

Tabela 4. Composição da mistura vitamínica (NBC, 1977 e 1978)

Componentes	mg (*)
Vitamina A	90
Vitamina D	10
Biotina	2
Vitamina E	500
Vitamina K	225
Vitamina B6	100
Vitamina B12	0,13
Inositol	500
Niacina	450
Riboflavina	100
Cloridrato de tiamina	100
Ácido Fólico	9
Pantotenato de Cálcio	300
Ácido p-aminobenzoico	500
Cloridrato de colina	7.500,00
Ácido ascórbico	4.500,00
Dextrose para 100 g	85.113,87

(*) Exceto para vitaminas A e D, que estão em unidades internacionais.

Após o período de tratamento com fluoreto (80 dias de idade: 20 dias desmame + 60 dias de tratamento), os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos. Em seguida foram eutanasiados nos períodos de 0 hora, 7, 14, 21, 30 e 60 dias de pós operatório. Sendo que nos períodos entre os procedimentos cirúrgicos e a eutanásia dos animais, aos mesmos foram fornecidas ração AIN 93 e água de beber com as mesmas concentrações de fluoreto do período anterior à exodontia.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

A exodontia do incisivo superior direito foi realizada com os animais sob anestesia geral obtida por meio da administração de Dopalen (cloridato de ketamina) e Anasedan (cloridato de xilazina) (1:1) dosado de acordo com a massa corporal do animal na proporção de 0,14 mL/100g de peso (Figura 2), por via intramuscular (ZAMBUZZI et al., 2005). Após a anti-sepsia com Listerine® foi realizada, com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15, a dissecação da mucosa gengival. Em seguida, com uso de um cinzel, deslocou-se cuidadosamente a crista alveolar e com um porta-agulha adaptado como fórceps, foi realizada a luxação do incisivo dental superior direito através de movimentos firmes e curtos, perpendiculares ao posicionamento do dente. A extração foi executada com um movimento circular da vestibular para a lingual e a sutura da mucosa gengival realizada com fio de seda preta, 4.0 da Ethicon (Johnson-Johnson) (Figura 3 A, C e D), conforme descrito por OKAMOTO & RUSSO (1973).

Figura 2. Procedimentos cirúrgicos para a exodontia do incisivo superior direito dos animais.

4.3 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS E OBTENÇÃO DAS PEÇAS (HEME - MAXILA)

Ao término dos períodos experimentais de 0 hora, 7, 14, 21, 30 e 60 dias, os animais foram eutanasiados por dose excessiva de anestésico. A partir do momento em que perderam os reflexos, foi realizada uma punção cardíaca sendo o sangue coletado, centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos (centrífuga Jouan, modelo A 14) para obtenção do plasma sangüíneo e posteriormente analisado para o flúor.

Imediatamente, a maxila direita foi separada da esquerda através de uma incisão com utilização de bisturi com lâmina número 10 ao nível do plano sagital mediano, acompanhando a sutura intermaxilar. Com auxílio de uma tesoura reta foi feito um corte tangencial à face distal do último molar, obtendo-se a peça com alvéolo dental direito (Figura 3E). Das peças coletadas de cada grupo, 5 foram destinadas à análise microscópica (fixadas em formol 10% tamponado) e 5 à extração de proteínas por meio de fragmentação do alvéolo (pesadas e congeladas a -80 °C).

Em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por dose excessiva de anestésico, seguindo as normas do COBEA.

Figura 3. Extração do incisivo: **A)** Extração executada com movimento circular da vestibular para a lingual. **B)** Incisivo central superior extraído (seta). **C)** Região do alvéolo após a extração do incisivo superior (seta). **D)** Detalhe do alvéolo dental depois de realizada a sutura com fio de seda preta, 4.0 da Ethicon (Johnson-Johnson) (seta). **E)** Peça coletada (maxila direita) para fixação e posterior inclusão em parafina.

4.4 DOSAGEM DE FLUORETO NO PLASMA

4.4.1 Procedimento da análise

As amostras de plasma foram congeladas a -20°C e depois foram analisadas pelo método de TAVES (1968) modificado por WHITFORD (1996). Para a análise do flúor (F) no plasma, foi feita uma pré-difusão, pois por se tratar de um fluído biológico, o plasma contém CO_2 , que deve ser eliminado. As amostras foram colocadas em placa de Petri (Falcon 1007) e sobre elas foi colocado o ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que corresponde a 20% do volume da amostra (Figura 4A). Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume foi reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do

gás carbônico (CO_2), o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu como descrito por TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996). Na tampa destas placas, foi colocado 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas (Figura 4A). As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametildisiloxano - HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M) (Figura 4B). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante 3 horas. Após esse período, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota (Figura 4C). O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada, usando uma pipeta. A gota, contendo todo o flúor foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figura 4D).

Figura 4. Análise de flúor: **A)** Placa de petri vaselinada, com o orifício na tampa e a adição das amostras de plasma. O volume final (2,0 mL) foi completado com água deionizada, NaOH 0,05M distribuídos em 5 gotas na tampa (seta) **B)** Fechamento da placa de petri e adição de 2,0 mL de HMDS. **C)** Gota (seta) contendo todo flúor que será analisado. **D)** Eletrodo 94-09 e o micro-eletrodo de referência calomelano para fazer a leitura de flúor.

4.4.2 Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 µmol/L (0,0095-0,019 µg/mL), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,0095-0,019 µg, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo.

As soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma que foram analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras foi lida e a terceira após o término da leitura das amostras. As leituras obtidas em milivoltagem (mV) foram convertidas para µg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma [F] que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado. Foi feita também uma sequência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido de maneira que as amostras e as leituras de mV deveriam ser as mesmas tanto para os padrões que não sofreram adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofreram, assim como também para os que não sofreram difusão.

4.5 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS E METODOLOGIA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

4.5.1 Preparo e obtenção dos cortes

Após a obtenção das peças para microscopia (n=5), estas foram submetidas ao processo de fixação em formol 10% em tampão fosfato, durante 48 horas e em seguida foram radiografadas e desmineralizadas em solução de EDTA, contendo 4,13% de Tritriplex III (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 0,44% de Hidróxido de sódio (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), por um período de 60 a 70 dias com trocas semanais da solução desmineralizadora. Durante esse processo foram feitas análises radiográficas para controle e certificação da desmineralização das peças a cada 15 dias (Figura 5 A e B). As imagens radiográficas foram obtidas no Departamento de Estomatologia, Disciplina de Radiologia, da Faculdade de Odontologia de Bauru- Universidade de São Paulo, com filme oclusal para radiografia dental Kodak Insight IO-41 (Eastman Kodak Company – EUA) e o aparelho de raio – X, modelo X – 707 (Yoshida Dental MFC Co., Tóquio, Japão) regulado em 70 KVp e 7mA, sendo a distância foco-filme de 40 cm e o tempo de exposição de 0,17s.

Figura 5. A-B) Imagens radiográficas de maxilas direitas, mostrando diferentes graus de desmineralização.

Após esse processo as peças foram desidratadas em soluções crescentes de etanol e diafanizadas em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (Figura 6A) para inclusão em Histosec® (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) (Figura 6B-E) fundida na estufa a 60°C.

Cortes semi-seriados de 4µm de espessura, foram obtidos em um micrótomo (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) (Figura 7), colocados sobre lâminas convencionais e lâminas silanizadas Super-frost Plus (Erviegas), os quais foram respectivamente corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE) e imunomarcados contra antígenos específicos.

Figura 6. A) Diferentes concentrações de álcool etílico e xilol utilizados nos processos de desidratação e diafanização das peças. **B- E)** Etapas de inclusão da maxila direita superior em parafina.

Figura 7. A) Micróto (Microm, modelo HM 340 E, Alemanha) utilizado para fazer os cortes de 4 μm de espessura nas amostras da maxila superior direita. **B)** Lâminas identificadas com cortes.

4.5.2 Análise microscópica e morfométrica das lâminas coradas em HE

Para maior facilidade o alvéolo dental foi dividido e avaliado em terços: apical, médio e oclusal. A resposta biológica foi analisada em função das alterações inflamatórias (presença de infiltrado inflamatório) e dos processos de reparo (presença do coágulo sangüíneo, proliferação fibroblástica, angiogênese e neoformação óssea).

Foi feito ainda, a análise morfométrica para determinação da densidade de volume ou fração de volume do alvéolo ocupado pelo tecido ósseo neoformado, tecido de conjuntivo, coágulo sangüíneo e vaso sangüíneo. A densidade de volume por unidade de área ocupada pelas estruturas citadas foi determinada usando uma objetiva de 40x e um graticulo de integração II Zeiss, composto de 10 linhas paralelas e 100 pontos numa área quadrangular, colocado em uma ocular Kpl 8X. A imagem do graticulo foi superposta sucessivamente a cinco cortes histológicos de cada animal do experimento. Foram anotados os números de pontos (P_i) que caíram sobre cada estrutura em particular (i). Tendo esses dados e conhecendo-se previamente a quantidade total de pontos (P) da área examinada (A), calculou-se a densidade de volume (V_{vi}) pela relação $V_{vi} = P_i/P$, que foi expressa em porcentagem por unidade de área (Weibel, 1969).

4.5.3 Reação de Imunomarcação via indireta pelo método SABC peroxidase

Para a detecção e localização das proteínas RANKL, OPG e MMP-9, secções semi-seriadas de 4 µm foram colocadas sobre lâminas silanizadas Super-frost Plus (Erviegas) e submetidas à imunomarcação via indireta pelo método SABC peroxidase.

Para cada animal foram preparadas 3 lâminas e em cada lâmina dez campos de 6300 mm² para determinar a contagem de células imunomarcadas para cada anticorpo específico. A padronização da reação de imunomarcação foi feita através de tentativas de diluição dos anticorpos (que varia de tecido para tecido) e tempo de cada parte da reação.

4.5.3.1 Procedimentos laboratoriais para imunomarcação

Foi utilizado o seguinte protocolo básico para as imunomarcações:

1-Diafanização (Figura 8A) dos cortes teciduais em 3 banhos de 5 min. em xilol cada e re-hidratação (Figura 8A) em concentrações decrescentes de etanol com banhos de 5 minutos em etanol 100%, 95%, 70% e subsequentemente em água destilada pura.

2- Inativação da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Figura 8B), dois banhos de 10 minutos cada e um banho de 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, lavagem rápida dos cortes em PBS seguida de 2 banhos de PBS em cubas de vidro (Figura 8C) por 5 minutos cada.

3-Exposição dos antígenos por digestão enzimática em pepsina (cod. S3002, Dakocytomation Carpinteria CA, USA) (Figura 8 E) por 20 minutos a temperatura ambiente em câmara umidificadora. Em seguida, lavagem dos cortes teciduais em 3 banhos de PBS em cubas de vidro.

4- Secagem das lâminas ao redor dos cortes histológicos com papel filtro. Em seguida realizar o bloqueio das proteínas sorológicas que podem se ligar inespecificamente com anticorpo, incubando-as em uma solução de leite desnatado

Molico® (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo – Brasil) a 10% em PBS por 40 minutos em cuba de vidro (Figura 8 G).

5- Incubação com o anticorpo primário (Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, USA) (Figura 8 H) contra **RANKL** (cabra anti- camundongo RANKL (N-19): sc 7628); **OPG** (cabra anti-humano OPG (N-20): sc 8468); **MMP-9** (cabra anti- humano MMP-9 (C-20): sc 6840); diluídos em diluente de anticorpo (cod. S3022 Dakocytomation Carpinteira, CA, USA) (Figura 9 A e B), nas proporções de 1:300 (RANKL e OPG) e 1:100 (MMP-9), por 1 hora e 30 minutos em câmara umidificadora. Para controle negativo os cortes foram incubados com solução de PBS. Após o período de incubação, os cortes teciduais foram lavados com solução de PBS e submetidos a 3 banhos do mesmo em cuba de vidro.

6-Incubação com anticorpo secundário, imunoglobulinas biotiniladas de coelho anti-cabra (cod. E0466 - Dakocytomation Carpinteira, CA, USA) (Figura 9 C) diluído 1:500 para os anticorpos primários de cabra por 45 minutos (RANKL e OPG) e 1 hora (MMP-9) em câmara umidificadora. Após o período de incubação, o excesso de anticorpo secundário foi retirado e os cortes teciduais foram submetidos a 3 banhos de PBS em cuba de vidro.

7- Detecção do complexo anticorpo primário-secundário pela incubação dos cortes com conjugado streptavidina-HRP StrptABComplex/HRP® (kit LSAB2 – cod. X0909 ou cod. K0675 – DakoCytomation Carpinteria, CA, USA) (Figura 9 D) por 30 minutos. Em seguida, o excesso do reagente foi retirado e os cortes teciduais submetidos a 3 banhos de PBS em cuba de vidro.

8-Visualização da reação antígeno-anticorpo usando diaminobenzidina 3-3'DAB+(cod. K3468- DakoCytomation Carpinteria, CA, USA) por 45 segundos (Figura 9 E). Lavagem rápida em PBS seguida de 3 banhos de 5 minutos em água destilada.

9- Contra-coloração pela hematoxilina por 45 segundos (Figura 9 F), seguida pela lavagem por 10 minutos em água destilada, desidratação em concentrações

crescentes de etanol, diafanização em xilol e adesão da lâminula nos cortes com a resina Enterlan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt – Germany).

FIGURA 8 A-H: A) Bateria e desparafinação e hidratação dos cortes; B) peróxido de hidrogênio a 3%, utilizado para inibir a peroxidase endógena; C) incubação dos cortes teciduais em PBS na cuba de vidro; D) câmara úmida utilizada para incubação dos cortes; E) alíquota de pepsina; F) lavagem com PBS sobre o corte para retirada do excesso de solução; G) incubação dos cortes teciduais em uma solução de leite desnatado Molico®, para o bloqueio das proteínas sorológicas; H) anticorpos primários utilizados.

FIGURA 9 A-F: A) diluente de anticorpo; B) diluição do anticorpo primário em diluente de anticorpo; C) anticorpo secundário biotilado coelho anti-cabra; D) streptavidina conjugada com HRP; E) Kit do cromógeno DAB; F) contra-coloração com hematoxilina de Harris.

4.5.4 Imunocoloração com o kit TRAP

Para a detecção e localização da proteína TRAP, secções semi-seriadas de 4 µm foram colocadas sobre lâminas silanizadas Super-frost Plus (Erviagas). A padronização da reação de imunocoloração foi feita seguindo o protocolo do próprio kit TRAP (Kit Sigma 387-A leukocyte acid phosphatase; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA) (Figura 10) utilizado.

As lâminas foram imersas em solução de fixação (solução de citrato com acetona e formaldeído 37%) por 30 segundos, depois foram lavadas com água deionizada. Em uma jarra de coplin foi adicionada uma solução de granada permanente GBC com nitrito de sódico, solução de Naftol AS-Bi fosfato, acetato e depois as lâminas foram mantidas nessa jarra por um período de 30 minutos em banho maria (37°C). Ao término do tempo as lâminas foram transferidas para outra jarra contendo uma solução de uma solução de granada permanente GBC com nitrito de sódico, solução de Naftol AS-Bi fosfato, solução de acetato e solução de tartarato e mantidas por mais 30 minutos, sendo que as jarras foram mantidas ao abrigo da luz, e as soluções foram previamente aquecidas à 37°C. Depois as lâminas foram lavadas com água deionizada e foi realizada uma contra coloração durante 2 minutos em solução de hematoxilina nº3 de Gill. Ao final do tempo, os cortes teciduais foram lavados com água destilada por 10 minutos, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e por fim a adesão da lamínula nos cortes, com resina Enterlan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt – Germany).

Figura 10: Kit Sigma 387-A leukocyte acid phosphatase; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA

4.5.5 Análise das lâminas imunomarcadas e imunocoradas

As lâminas foram imunomarcadas para as proteínas RANK-L, OPG e MMP-9, e imunocoradas para TRAP, com o intuito de checar a expressão destas proteínas. As células imunomarcadas e imunocoradas foram analisadas, em objetiva de 100x, com auxílio de um retículo de integração acoplada em uma ocular Kpl de 8x. Os resultados obtidos foram em número de células/mm². As medianas obtidas foram utilizadas para uma interpretação paramétrica (Análise de Variância) utilizando o programa Graph InStat®, definindo diferenças significantes se $p < 0,05$.

4.6 Análises Zimográfica

É uma técnica de eletroforese, em que o substrato protéico, frequentemente gelatina, é “co”- polimerizado com Acrilamida, durante a fundição do gel de corrida. Esta técnica se baseia na associação entre digestão do substrato e verificação da massa molecular das proteases. É utilizada para identificar a atividade proteolítica das enzimas separadas (bandas) no gel de poliacrilamida, sob condições não redutoras.

Os géis são corados com Coomassie blue e a atividade enzimática é demonstrada pela ausência de coloração (faixas brancas) nas áreas onde o substrato (gelatina) foi degradado.

4.6.1 Preparação das proteínas

As amostras (n=5) foram trituradas e homogeneizadas em baixa temperatura (-170°C) utilizando um moinho criogênico (6770 Freezer/Mill, SPEX CERTIPREP). Após isso, 1g de osso alveolar foi homogeneizado em triton X100 à 25% e agitado vagarosamente. Depois, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 15000 rpm à +4°C. Ao término, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado ao precipitado 200µL de tampão de extração Tris 50mM e CaCl₂ 100 mM, pH 7,4 e 1µL de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) que age como inibidor da enzima serina. As amostras foram deixadas em banho maria à 50°C por um período de 2 horas, sendo que, a cada 10 minutos foi feita uma leve agitação.

Ao término do tempo, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 15000 rpm. Depois foi coletado o sobrenadante e armazenado em freezer (-20°C) para posterior quantificação de proteínas e zimografia.

4.6.2 Dosagem de proteínas das amostras

A quantificação das proteínas nas amostras após a extração foi realizada utilizando o método de LOWRY (1951). As amostras foram diluídas 100 vezes devido a grande quantidade de proteínas, utilizando 2µL de amostra e foi completado o volume para 200 µL, adicionou-se 2 mL do reagente C. Após 10 minutos, adicionaram-se 200 µL do reagente de Folin. Após 30 minutos, foi feita a leitura da absorbância a 660 nm em espectro (Ultrospec 2000 – Pharmacia Biotech).

Em seguida foi realizada uma curva de calibração em triplicata, utilizando BSA 1% (Bovine Serum Albumin) com diferentes concentrações de proteína. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r^2 \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.6.3 Protocolo de preparação do gel de zimografia

O gel de separação à 11% foi preparado inicialmente, utilizando solução de acrilamida 30% e bisacrilamida 0,8%, tampão do gel de separação (Tris Cl, pH 8,8), SDS 10%, gelatina, APS 10% e TEMED. Após completa polimerização do gel de

separação na placa de zimografia, foi preparado o gel de largada 4%, utilizando as mesmas soluções do gel de separação, somente substituindo o tampão do gel de separação pelo tampão do gel de largada (Tris Cl, pH 6,8). Este foi colocado sobre o gel de separação e em seguida colocado o pente para que ao final da polimerização do mesmo, fossem formados os “pocinhos” onde foram colocadas as amostras (Figura 11).

Após a extração e quantificação das amostras, as mesmas foram preparadas para serem aplicadas no gel. O volume de amostra correspondente a 60 µg de proteínas foi misturado com um tampão não redutor na proporção de 1:1 (v/v) e aplicada no “poço” correspondente do gel. No primeiro poço foi aplicado o padrão MWM (padrão de peso molecular). No segundo poço, foi aplicado 5 µL (0,07114 µg) do padrão de MMP-2 (Calbiochem). No terceiro, foi aplicado 7 µL (0,084 µg) do padrão de MMP-9 (Calbiochem).

Nos poços subseqüentes foram aplicadas às amostras dos grupos de 5, 15 e 50 PPM de flúor do período experimental de 7 dias, e deionizada, 5, 15 e 50 PPM de flúor do período experimental de 30 dias, respectivamente. Ao término da aplicação de todas as amostras, o sistema de placas que suporta o gel foi mantido a uma temperatura de 4°C, ajustando para toda a corrida a voltagem (120 V). Esta teve a duração de 2 horas.

Ao final da “corrida” o gel foi colocado em recipiente plástico e adicionado tampão 50mM Tris HCl, 2,5% Twenn 80, 0,02% NaN₃, pH 7,5, e deixado sob agitação por meia hora, sendo depois substituído pelo tampão 50mM Tris HCl, 2,5% Twenn 80, 0,02% NaN₃, 1 µm ZnCl₂, 5mM CaCl₂. e deixado por mais meia hora. Depois foi substituído pelo tampão 50mM Tris HCl, 5mM CaCl₂, 0,02% NaN₃, 1 µm ZnCl₂, pH 7,5, onde o gel ficou por 18 horas à 37°C. Terminado o período de incubação a solução de Tampão Tris HCl foi substituído pelo Corante de Coomassie Blue G-250 (0,5%), onde o gel ficou durante 30 minutos. Após, a solução corante foi substituída por uma solução descorante (metanol 10%, ácido acético 5%), o qual foi trocado a cada 30 minutos por 2 vezes. Para confirmação dos resultados a corrida do gel de zimografia foi realizada em duplicata e a análise dos géis foi feita utilizando software Kodak Molecular Imaging Software® (Rochester, New York, USA) (Figura 12), posteriormente ao escaneamento dos géis (extensão tif).

O gel foi analisado utilizando como referência a quantidade de pixels da banda das amostras.

Figura 11. Sistema de aplicação da amostra nos “poços” e corrida eletroforética sob voltagem constante de 120V.

Figura 12. Imagem do programa Kodak Molecular Imaging Software® utilizado para análise dos géis de zimografia.

4.7 Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad InStat versão 3.0 para Windows e GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, EUA). Inicialmente foi checada a normalidade (teste de Kolmogorov and Smirnov) e a homogeneidade (teste de Bartlett) dos dados.

Para a morfometria e atividade de MMPs os dados tiveram distribuição normal e homogeneidade, sendo então analisados por ANOVA. O teste de Tukey foi usado como post hoc para a ANOVA. O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%.

Resultados

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR NO PLASMA

Os níveis de flúor no plasma sanguíneo dos animais apresentaram, de modo geral, um aumento com o decorrer dos períodos experimentais chegando a um pico no período de 21 dias. Os grupos que apresentaram os maiores níveis de flúor foram os de 15 e 50 ppm, com níveis de $0,266 \pm 0,089$ e $0,546 \pm 0,113$ ($\mu\text{g/mL}$) no período de 21 dias, respectivamente (Tabela 5).

A Tabela 5 mostra os valores médios e desvios-padrão da concentração de F encontrada no plasma dos grupos I (deionizada), II (5 ppm), III (15 ppm) e IV (50 ppm) nos diferentes períodos experimentais (0 hora, 7, 14, 21, 30 e 60 dias). Observa-se que a variação da concentração de flúor no plasma é diretamente proporcional à concentração de flúor na água de beber, quanto maior a concentração de flúor na água, maior a concentração no plasma. O GraphPad Prism detectou diferença significativa entre os tempos experimentais ($F=56,52$), entre as diferentes concentrações de flúor ($F=246,4$) bem como para a interação entre estes critérios ($F=33,88$). Quando comparamos as diferentes concentrações de flúor em relação aos tempos experimentais, para o grupo de deionizada (I) comparado com o de 5 ppm (II), houve diferença estatisticamente significativa somente para o período de 14 dias ($p<0,01$) (Tabela 5). Entre o grupo de deionizada (I) comparado com o de 15 ppm (III), houve diferença significativa entre os períodos de 0 hora ($p<0,05$) e 21 dias ($p<0,001$). Já o grupo de deionizada (I) comparado com o de 50 ppm (IV), com exceção do período de 7 dias, houve diferença significativa para todos os períodos ($p<0,001$) (Tabela 5). Para o grupo de 5 ppm (II) comparado com o de 15ppm (III), somente houve diferença significativa para o período de 21 dias ($p<0,001$). Já para a comparação entre os grupos de 5 ppm (II) e 50 ppm (III), houve diferença significativa entre os períodos de 0 hora ($p<0,001$), 14 ($p<0,05$), 21 ($p<0,001$), 30 dias ($p<0,001$) e 60 dias ($p<0,001$) (Tabela 5). Entre os grupos de 15 ppm (III) e 50 ppm (IV), houve diferença significativa entre os períodos de 0 hora ($p<0,05$), 14, 21 e 30, e 60 dias ($p<0,001$).

Quando foram comparados os diferentes períodos experimentais em relação a concentração de flúor, o GraphPad Prism, não encontrou diferenças significativas quando foram comparados os períodos de 0 hora com o de 7 dias e de 0 hora com 14 dias (Tabela 5). Já quando a comparação foi entre os períodos de 0 hora e 21 dias,

houve diferença significativa nos grupos de 15 (III) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$). Entre os períodos de 0 hora e 30 dias, só houve diferença significativa para o grupo de 50 ppm (IV) ($p < 0,001$). E entre 7 e 14 dias ($p < 0,05$), houve diferença significativa para o grupo de 0 ppm (I) e 50 ppm (IV) ($p < 0,05$). Em relação aos períodos de 7 e 21 dias, houve diferença significativa nos grupos de 15 (III) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$). Já entre os períodos de 7 e 30 dias, só houve diferença para o grupo de 50 ppm (IV) ($p < 0,001$) (Tabela 5). Para os períodos de 7 e 60 dias houve diferença nos grupos de 0 ppm (I) e 50 ppm (IV) ($p < 0,05$). Entre os períodos de 14 e 21 dias, houve diferença significativa nos grupos de 5 (II) ($p < 0,01$), 15 (III) ($p < 0,001$) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$). Entre os períodos de 14 e 30 dias, observou-se diferença significativa para os grupos de 0 ppm (I) ($p < 0,05$), 5 (II) ($p < 0,01$) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$). Entre os períodos de 14 e 60 dias, só houve diferença significativa no grupo de 5 ppm (II) ($p < 0,01$). Já entre os períodos de 21 e 30, assim como os períodos de 21 e 60 dias houve diferença significativa para os grupos de 15 (III) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$) (Tabela 5). Entre os períodos de 30 e 60 dias houve diferença significativa para os grupos de 0 ppm (I) ($p < 0,05$) e 50 ppm (IV) ($p < 0,001$).

Tabela 5. Concentração média e desvio padrão ($\pm$ DP) de flúor ($\mu\text{g/mL}$) encontrado no plasma nos diferentes períodos experimentais

Períodos Experimentais						
Grupos	0 hora	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias	60 dias
I	0,032 ^{*Aab} ($\pm 0,009$)	0,073 ^{Aa} ($\pm 0,019$)	0,015 ^{Ab} ($\pm 0,003$)	0,034 ^{Aab} ($\pm 0,019$)	0,072 ^{Aa} ($\pm 0,023$)	0,014 ^{Ab} ($\pm 0,002$)
II	0,048 ^{ABab} ($\pm 0,012$)	0,056 ^{Aab} ($\pm 0,013$)	0,101 ^{Ba} ($\pm 0,011$)	0,026 ^{Ab} ($\pm 0,003$)	0,0250 ^{Ab} ($\pm 0,005$)	0,030 ^{Ab} ($\pm 0,002$)
III	0,095 ^{Ba} ($\pm 0,014$)	0,064 ^{Aa} ($\pm 0,018$)	0,050 ^{ABa} ($\pm 0,011$)	0,266 ^{Bb} ($\pm 0,089$)	0,061 ^{Aa} ($\pm 0,011$)	0,055 ^{Aa} ($\pm 0,006$)
IV	0,156 ^{Cae} ($\pm 0,015$)	0,105 ^{Aa} ($\pm 0,021$)	0,168 ^{Ce} ($\pm 0,015$)	0,546 ^{Cb} ($\pm 0,113$)	0,361 ^{Bc} ($\pm 0,054$)	0,172 ^{Bde} ($\pm 0,033$)

* Média do grupo

()Desvio Padrão

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 1. Concentração média e desvio padrão ($\pm$ DP) de flúor ($\mu\text{g/mL}$) encontrado no plasma nos diferentes períodos experimentais.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA DA RESPOSTA TECIDUAL NO PROCESSO DE REPARO

Em todos os grupos estudados, I (deionizada), II (5 ppm), III (15 ppm) e IV (50 ppm), notamos o processo de reparo ósseo de acordo com o decorrer dos períodos experimentais (7, 14, 21, 30 e 60 dias). Notamos que em todos os grupos houve uma diminuição gradual do coágulo sangüíneo, alteração no tecido conjuntivo de granulação composto por fibroblastos, macrófagos e algumas células inflamatórias para tecido conjuntivo composto por fibroblastos e fibrócitos, paralelamente à substituição por tecido ósseo jovem (primário), crescendo no sentido das paredes do alvéolo para o centro. Essa formação de tecido ósseo foi mais visível no terço apical e médio do alvéolo dental. O alvéolo dental foi dividido em três regiões (cervical, médio e apical) para facilitar a análise e descrição (Figura 13).

Figura 13 - Grupos Controle- Período de 0 hora: alvéolo de rato, tratado com água deionizada. O alvéolo dental foi dividido em Terço Apical (TA), Terço Médio (TM) e Terço Cervical (TC). Podemos observar todos os terços praticamente preenchidos por coágulo sangüíneo. Aumento de 4X. Coloração H.E.

5.2.1 Período de 7 dias:

Neste período, para todos os grupos, o panorama mais comumente observado foi a presença do coágulo sangüíneo, tecido conjuntivo e infiltrado celular ocupando grande extensão da região alveolar (terços médio e apical) (Figura 14A). O terço apical apresentava uma pequena neoformação óssea adjacente às paredes do alvéolo, caracterizada por tecido ósseo e camada de osteoblastos em intensa atividade de síntese (célula bem polarizada) (Figura 16B). Neste período foram observados um número maior de clastos nos grupos controle e 5 ppm. Sinais de angiogênese foram notados em todos os grupos.

Figura 14 - Controle 7 dias: A) Região do terço médio do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (**CS**) e tecido conjuntivo (**TC**), além de ilhas de osso neoformado (**ON**) ao centro e osso da parede do alvéolo (**O**). **B)** Região do terço cervical do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (**CS**) e tecido conjuntivo (**TC**). Aumento de 10x (**A**) e 40x (**B**). Coloração H.E.

Figura 15- 5 ppm 7 dias: **A)** Terço apical com presença de coágulo (**CS**), tecido conjuntivo (**TC**) e vasos (**V**). Podemos notar osso da parede do alvéolo (**O**). **B)** Região do terço médio do alvéolo dental. Notamos a presença do coágulo sangüíneo (**CS**) e tecido conjuntivo (**TC**), além de neoformação óssea (**ON**) e vasos (**V**). Aumento de 40x (**A**) e 10x (**B**). Coloração H.E.

Figura 16 - 15 ppm 7 dias: **A)** Notamos, no terço médio, a presença do coágulo sangüíneo (**CS**) no centro e neoformação óssea (**ON**) próximo as paredes do alvéolo (**O**), tecido conjuntivo (**TC**) e vaso (**V**). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (**ON**) sob a parede do alvéolo (**O**). Podemos notar osteoblastos (**seta**) em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (**TC**) e vaso (**V**) ao centro. Aumento de 10x (**A**) e 40x (**B**). Coloração H.E.

Figura 17 – 50 ppm 7 dias: Terço médio do alvéolo com presença do coágulo sangüíneo (CS) e áreas de neoformação óssea (ON). Aumento de 10x. Coloração H.E.

5.2.2 Período de 14 dias:

Neste período notamos o aumento do processo de neoformação óssea substituindo gradualmente o lugar antes ocupado pelo coágulo sangüíneo, por osso primário em todos os grupos estudados (Figura 18A). O crescimento do tecido ósseo acompanhou as paredes do alvéolo em direção ao centro. Esse processo de formação de osso foi bem visível na região apical do alvéolo, com a presença de osteoblastos polarizados, indicando atividade de síntese. Ainda havia a presença de coágulo sangüíneo e tecido conjuntivo ocupando a região alveolar (Figura 18B). Também foi notada a presença de osteoclastos nas regiões apical e média (Figura 20C). O processo de angiogênese foi bem visível nesse período.

Figura 18 - Controle 14 dias: **A)** Notamos no terço apical a presença do coágulo sangüíneo (CS) e neoformação óssea (ON), próximo as paredes do ápice do alvéolo. **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (TC), resquício do coágulo sangüíneo (CS) e vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 19 - 5 ppm 14 dias: A) Terço médio com neoformação óssea (ON) próximo as paredes do alvéolo (O). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar ainda vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 20 - 15 ppm 14 dias: **A)** Notamos, no terço apical, a presença de tecido conjuntivo (TC), parte do coágulo sangüíneo (CS) e neoformação óssea (ON). **B)** Terço cervical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de coágulo sangüíneo (CS) e vaso (V). **C)** Notamos no terço apical, a presença de osteoclastos (seta). Aumento de 10x (A) e 40x (B e C). Coloração H.E.

Figura 21 - 50 ppm 14 dias: **A)** Terço apical apresentando neoformação óssea (**ON**), no entanto, ainda havia resquícios do coágulo sanguíneo (**CS**). **B)** Podemos notar no terço cervical, osso neoformado (**ON**), coágulo sanguíneo (**CS**) e vaso (**V**). Aumento de 10x (**A**) e 40x (**B**). Coloração H.E.

5.2.3 Período de 21 dias:

Notamos a presença de tecido ósseo primário, osteoblastos em processo de síntese, ocupando todas as regiões do alvéolo dental, em especial o terço apical (Figura 22B). Foi encontrado grande número de vasos e tecido conjuntivo (terço cervical) na região alveolar de todos os grupos (Figura 23A e B). Notamos a presença de osteoclastos (Figura 24 A) nas regiões apical e média dos grupos controle, 15 ppm, 50 ppm e em menor número no grupo de 5 ppm. Havia a presença de coágulo sangüíneo (terço apical e médio, principalmente no grupo de 50 ppm) (Figura 25A).

Figura 22 - Controle 21 dias: A) Notamos no terço médio a presença do coágulo sanguíneo (CS), tecido conjuntivo (TC) e vasos (V) ao centro. Notar a presença de osso neoformado (ON). B) Terço apical com presença de osso neoformado (ON) sob a parede do alvéolo (O). Podemos notar a presença de alguns vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 23 - 5 ppm 21 dias: **A)** O terço cervical preenchido por tecido ósseo neoformado (ON) e coágulo sangüíneo (CS). **B)** Podemos notar no terço cervical, o novo osso neoformado (ON), além de tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 24 – Período 21 dias: A) grupo III-15 ppm: Terço médio com presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). B) grupo IV -50 ppm: Notamos no terço apical, a presença de osteoclastos (setas), osso neoformado (ON) e vasos (V). Aumento de 40x (A e B). Coloração H.E.

Figura 25 – 50 ppm 21 dias: **A)** Notamos, no terço apical, a presença do coágulo sangüíneo (CS), neoformação óssea (ON) e tecido conjuntivo (TC). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de coágulo sangüíneo (CS), tecido conjuntivo (TC) e vaso (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

5.2.4 Período de 30 dias:

O processo de neoformação óssea estava bastante avançado no grupo controle, onde pudemos observar osso primário e espaços medulares ocupando praticamente as 3 regiões do alvéolo dental (terços apical, médio e cervical) (Figura 26A). O tecido conjuntivo, mais fibrosado nesse período, ocupava parte considerável do alvéolo dental. (Figura 26B). Encontramos osteoclastos presentes em toda a região alveolar em todos os grupos, com maior destaque no grupo de 5 ppm (Figura 27B). A presença de resquícios de coágulo sangüíneo (terços apical e médio) na região alveolar foi notada, estando presente no grupo de 50 ppm (Figura 29B).

Figura 26 - Controle 30 dias: **A)** Terço apical com abundante osso neoformado (ON) e uma pequena região ocupada por tecido conjuntivo (TC). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoblastos (seta), em processo de síntese, além de tecido conjuntivo (TC) e vaso (V) ao centro. Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 27 - 5 ppm 30 dias: **A)** Notamos, no terço médio, osso neoformado (ON) e resquícios do coágulo sanguíneo (CS). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Podemos notar osteoclastos (seta), além de vasos (V). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 28 - 15 ppm 30 dias: **A)** Terço médio caracterizado por osso neoformado (ON) e presença de tecido conjuntivo (TC). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON), além de resquícios do coágulo sanguíneo ainda presente (CS), tecido conjuntivo (TC) e osteoclasto (seta). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

Figura 29 - 50 ppm 30 dias: **A)** Notamos, no terço médio, a presença do coágulo sangüíneo (CS), tecido conjuntivo (TC) e osso neoformado (ON). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC) e coágulo sangüíneo (CS) ao centro. Notamos ainda osteoblastos (seta). Aumento de 10x (A) e 40x (B). Coloração H.E.

5.2.5 Período de 60 dias:

Nesse período observamos o alvéolo quase que todo preenchido por tecido ósseo neoformado em todos os terços (apical, médio e cervical) e presença de tecido conjuntivo, correspondente ao tecido de preenchimento das lamelas ósseas (Figura 30A). Foram encontrados apenas resquícios de coágulo sanguíneo e poucos osteoclastos.

Figura 30 - 60 dias: Grupo controle (A) e 50 ppm (B). **A)** Terço apical com abundante osso neoformado (ON), e tecido conjuntivo (TC). **B)** Terço apical com presença de osso neoformado (ON). Aumento de 10x (A) e (B). Coloração H.E.

5.3 RESULTADOS MORFOMÉTRICOS

As médias calculadas foram baseadas em pelo menos 3 animais de cada grupo experimental. O alvéolo dental foi dividido e analisado em terços apical e médio. O terço cervical não foi avaliado devido à invaginação de tecido conjuntivo e epitelial. A partir da contagem de áreas de neoformação óssea, tecido conjuntivo, coágulo sangüíneo e vasos sanguíneos conseguimos obter um panorama do fenômeno de reparo alveolar durante os períodos estudados, sob influência do flúor. Todos dados citados no texto a seguir se encontram dispostos na Tabela 6 e 7.

5.3.1 Terço apical

Pode-se constatar, de maneira geral, um aumento (em densidade por volume) de tecido ósseo neoformado entre 7 e 60 dias em todos os grupos experimentais (Gráfico 2).

O GraphPad Prism detectou diferença significativa entre os tempos experimentais ($F=29,76$), entre as diferentes concentrações de flúor ($F=2,766$) bem como para a interação entre estes critérios ($F=1,241$). No período de 60 dias, notamos que houve uma diminuição significativa de tecido ósseo entre os grupos II - 5 ppm e III- 15 ppm ($p<0,01$).

Foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre alguns períodos: 7 e 21 dias nos grupos I - 0ppm ($p<0,01$), grupo III- 15 ppm ($p<0,05$) e grupo IV - 50 ppm ($p<0,05$); período de 7 e 30 dias em todos os grupos, I - 0 ppm ($p<0,001$), II – 5 ppm ($p<0,001$), III – 15 ppm ($p<0,001$) e IV - 50 ppm ($p<0,05$); período de 7 e 60 dias em todos os grupos, I- 0 ppm ($p<0,001$), II – 5 ppm ($p<0,001$), III – 15 ppm ($p<0,05$) e IV - 50 ppm ($p<0,001$); período de 14 e 30 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,05$) e grupo III – 15 ppm ($p<0,01$); período de 14 e 60 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,05$) e II – 5 ppm ($p<0,001$) e no período de 21 e 60 dias no grupo II – 5 ppm ($p<0,001$).

Em relação a densidade por volume (%) do tecido conjuntivo (Gráfico 3), o GraphPad Prism detectou diferença significativa entre as diferentes concentrações de flúor ($F=4,910$) bem como para a interação entre estes critérios ($F=0,6776$). Análise estatística demonstrou diferença significativa no período de 60 dias entre os grupos II – 5 ppm e III – 15 ppm ($p<0,05$).

Concomitantemente, foi detectada diferença significativa entre os tempos experimentais ($F= 24,23$), bem como para a interação entre estes critérios ($F=0,8186$). Constatou-se diminuição do coágulo sangüíneo (densidade por volume (%)) entre alguns períodos (Gráfico 4). Encontramos diferenças significativas entre os períodos de 7 e 30 dias nos grupos I- 0 ppm ($p<0,05$), grupo II – 5 ppm ($p<0,01$) e grupo III – 15 ppm ($p<0,001$), 7 e 60 dias nos grupos I- 0 ppm ($p<0,01$) II – 5 ppm ($p<0,001$), III – 15 ppm ($p<0,001$) e IV – 50 ppm ($p<0,001$); de 14 a 30 dias no grupo I - 0 ppm ($p<0,05$) e III - 15 ppm ($p<0,05$); de 14 e 60 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,01$), II - 5 ppm ($p<0,01$), III – 15 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,01$); de 21 e 30 dias no grupo II – 5 ppm ($p<0,05$); de 21 e 60 dias para o grupo II – 5 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,01$) e entre 30 e 60 dias no grupo IV – 50 ppm ($p<0,05$).

Foram encontrados vasos sangüíneos em todos os grupos, porém não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos e períodos experimentais (Gráfico 5).

Tabela 6 – Densidade por volume (%) de tecido ósseo, tecido conjuntivo, coágulo sangüíneo e vasos sanguíneos formados no terço apical de alvéolos dos grupos experimentais

Período Exp. (dias)	GRUPOS EXPERIMENTAIS (ppm)															
	0				5				15				50			
	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS
7	12,98* (7,92) Aa	52,74 (9,61) Aab	27,15 (9,95) Aa	5,92 (3,99) Aa	16,90 (1,29) Aa	42,18 (15,68) Aa	36,24 (17,43) Aa	4,62 (1,48) Aa	9,75 (7,81) Aa	47,45 (6,84) Ab	37,21 (3,91) Aa	5,48 (1,33) Aa	15,88 (9,63) Aa	38,67 (4,15) Aab	38,66 (13,67) Aa	6,36 (4,39) Aa
14	27,59 (6,22) ABa	39,00 (10,95) Aa	26,95 (13,58) Aa	6,47 (5,11) Aa	28,52 (9,52) ACa	35,71 (6,98) Aa	28,89 (2,90) ABa	6,88 (3,84) ABa	22,60 (7,57) ABa	49,52 (13,39) Aa	22,65 (15,85) Aa	3,81 (1,97) Aa	25,59 (7,15) ABa	39,65 (11,18) Aa	26,86 (8,70) Aa	7,90 (5,35) Aa
21	35,04 (9,92) BCa	46,79 (17,77) Aa	13,00 (11,77) ABa	5,16 (2,74) ABa	26,49 (6,81) ACa	33,48 (20,70) Aa	32,71 (20,33) Aa	7,32 (3,77) Aa	28,73 (7,23) BCa	44,16 (13,42) Aa	20,13 (16,02) ABa	6,99 (5,22) ABa	35,65 (5,60) Ba	31,33 (4,76) Aa	28,11 (6,83) Aa	4,90 (1,91) Aa
30	46,22 (6,42) Ca	43,50 (4,51) Aa	7,29 (2,44) Ba	3,02 (1,51) Ba	44,81 (8,52) CBa	36,08 (5,12) Aa	10,99 (2,93) BCa	7,57 (1,87) BCa	43,95 (13,19) Ca	42,37 (15,44) Aa	6,17 (4,80) Ba	6,95 (2,80) Ba	36,74 (22,79) Ba	33,53 (5,65) Aa	26,33 (20,18) Aa	3,40 (0,92) Aa
60	48,98 (6,42) Cab	47,62 (6,65) Aa	0,18 (0,17) Ba	2,83 (1,71) Ba	59,86 (3,49) Ba	37,74 (4,02) Aa	0,11 (0,19) Ca	2,22 (0,26) Ca	30,99 (6,41) BCb	62,47 (8,44) Aa	0,19 (0,32) Ba	6,36 (2,91) Ba	43,92 (17,59) Bab	50,92 (15,35) Aa	0,15 (0,22) Ba	5,01 (2,46) Ba

* Média do grupo

() Desvio Padrão

TO: Tecido Ósseo, TC: Tecido Conjuntivo, CS: Coágulo Sangüíneo, VS: Vasos Sanguíneos

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 2. Densidade por volume (%) de tecido ósseo formado no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 3. Densidade por volume (%) de tecido conjuntivo formado no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 4. Densidade por volume (%) de coágulo sanguíneo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 5. Densidade por volume (%) de vasos sanguíneos formados no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

5.3.2 Terço médio

Pode-se notar um aumento (em densidade por volume-%) de tecido ósseo neoformado entre 7 e 60 dias em todos os grupos experimentais (Gráfico 6). O GraphPad Prism detectou diferença significativa entre os tempos experimentais ($F=47,47$), bem como para a interação entre estes critérios ($F=0,7390$). Sendo as diferenças entre os períodos: 7 e 21 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,01$), II – 5 ppm ($p<0,05$), III – 15 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,01$); 7 e 30 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,001$), grupo III – 15 ppm ($p<0,001$) e grupo IV – 50 ppm ($p<0,001$); 7 e 60 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,001$), II – 5 ppm ($p<0,001$), III – 15 ppm ($p<0,001$) e IV – 50 ppm ($p<0,001$); 14 e 30 dias no grupo III – 15 ppm ($p<0,05$); 14 e 60 dias no grupo I – 0 ppm ($p<0,001$), II – 5 ppm ($p<0,001$), III – 15 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,001$); 21 e 60 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,001$), II – 5 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,01$) e entre os períodos de 30 e 60 dias nos grupos I – 0 ppm ($p<0,05$) e II – 5 ppm ($p<0,001$).

Em geral houve uma diminuição da densidade por volume do tecido conjuntivo, nos períodos de 7 a 60 dias (Gráfico 7). Foi detectado diferença significativa entre os tempos experimentais ($F= 3,922$), entre as diferentes concentrações de flúor ($F=0,3726$) bem como para a interação entre estes critérios ($F=2,185$). No período experimental de 7 dias entre os grupos I- 0 ppm e III -15 ppm ($p<0,01$) e entre os grupos III – 15 ppm e IV- 50 ppm ($p<0,05$). Em relação as diferenças significantes entre os períodos, foram demonstradas entre os seguintes períodos: 7 e 14 dias no grupo I- 0 ppm ($p<0,05$); 7 e 60 dias nos grupos I - 0 ppm ($p<0,01$) e IV – 50 ppm ($p<0,05$) e entre os períodos de 21 e 60 dias no grupo I – 0 ppm ($p<0,01$).

Constatou-se diminuição do coágulo sangüíneo (densidade por volume) entre os períodos de 7 e 60 dias em todos os grupos (Gráfico 8). Detectou-se diferença significativa entre os tempos experimentais ($F= 16,74$), entre as diferentes concentrações de flúor ($F=1,726$) bem como para a interação entre estes critérios ($F=2,181$). Sendo encontrado um aumento significativo no período experimental de 7 dias entre os grupos I – 0 ppm e III- 15 ppm ($p<0,001$) e uma queda neste mesmo períodos entre os grupos III – 15 ppm e IV – 50 ppm ($p<0,01$). Em relação a diferenças significantes entre os períodos, encontramos nos seguintes períodos: 7 e 14 dias no grupo III – 15 ppm ($p<0,001$); 7 e 21 dias no grupo III – 15 ppm ($p<0,001$); 7 e 30 dias nos grupos II – 5 ppm ($p<0,05$) e III- 15 ppm ($p<0,001$); 7 e 60 dias nos

grupos II – 5 ppm ($p < 0,01$), III – 15 ppm ($p < 0,001$) e IV- 50 ppm ($p < 0,05$); 14 e 60 dias no grupo IV- 50 ppm ($p < 0,05$) e 21 e 60 dias no grupo II – 5 ppm ($p < 0,05$).

Nos vasos sanguíneos notamos uma diminuição (densidade por volume-%). Foi detectado diferença significativa entre os tempos experimentais ($F = 4,440$), entre as diferentes concentrações de flúor ($F = 1,774$) bem como para a interação entre estes critérios ($F = 1,439$). Com diferenças significantes no período experimental de 14 dias entre os grupos II- 5 ppm e IV- 15 ppm ($p < 0,01$) e grupos II- 5 ppm e IV- 50 ppm ($p < 0,01$). Assim como entre os períodos de 14 e 60 dias nos grupos I- 0 ppm ($p < 0,05$) e II – 5 ppm ($p < 0,01$).

Tabela 7 – Densidade por volume (%) de tecido ósseo, tecido conjuntivo, coágulo sangüíneo e vasos sanguíneos formado no terço médio de alvéolos dos grupos experimentais

GRUPOS EXPERIMENTAIS (ppm)																
Período Exp. (dias)	0				5				15				50			
	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS	TO	TC	CS	VS
7	15,48*	55,75	20,64	7,50	14,56	41,69	34,17	9,58	11,91	29,65	53,94	4,49	17,44	51,42	25,04	6,10
	(4,64)	(11,84)	(11,08)	(3,57)	(2,71)	(17,24)	(19,30)	(2,44)	(6,81)	(6,98)	(6,96)	(1,63)	(8,76)	(20,71)	(23,08)	(2,77)
	Aa	Aa	Aa	ABa	Aa	Aab	Aab	Aa	Aa	Ab	Ab	ABa	Aa	Aa	Aa	Aa
14	32,77	34,50	19,61	13,12	28,75	39,03	14,84	17,38	29,40	46,35	16,12	5,01	29,04	34,97	29,60	6,38
	(11,13)	(13,54)	(22,13)	(9,05)	(18,25)	(13,30)	(12,04)	(13,53)	(11,39)	(15,71)	(22,43)	(1,12)	(5,66)	(4,39)	(5,26)	(3,23)
	ABa	Ba	Aa	Aab	ABa	Aa	ABCa	Aa	ABa	Aa	Ba	Ab	ABa	ABa	Aa	Ab
21	39,96	52,48	2,47	5,58	38,39	33,35	29,68	8,46	41,05	43,68	6,33	8,94	41,34	36,85	13,85	7,96
	(14,88)	(15,33)	(2,63)	(1,84)	(18,03)	(15,02)	(16,16)	(4,89)	(6,44)	(7,25)	(9,73)	(7,44)	(12,20)	(13,81)	(8,90)	(3,57)
	Ba	ABa	Aa	ABa	Ba	Aa	ABa	Aa	BCa	Aa	Ba	ABa	BCa	ABa	ABa	Aa
30	52,42	39,17	4,21	8,52	34,66	46,12	10,21	9,00	52,24	30,64	7,95	9,07	48,47	38,61	7,26	5,12
	(14,28)	(7,69)	(3,83)	(6,74)	(6,49)	(6,48)	(4,65)	(5,39)	(19,91)	(9,38)	(11,39)	(1,81)	(12,09)	(8,30)	(10,77)	(2,47)
	Ba	ABa	Aa	ABa	ABa	Aa	BCa	Aa	Ca	Aa	Ba	ABa	BCa	ABa	ABa	Aa
60	75,36	21,78	0,00	2,58	72,70	25,50	0,09	1,56	59,32	37,49	0,10	2,94	70,55	25,83	0,00	3,61
	(11,00)	(10,69)	(0,00)	(1,97)	(10,23)	(10,36)	(0,09)	(0,59)	(8,41)	(8,05)	(0,09)	(0,61)	(8,88)	(9,27)	(0,00)	(0,60)
	Ca	BCa	Aa	Ba	Ca	Aa	Ca	Aa	Ca	Aa	Ba	Ba	Ca	Ba	Ba	Aa

* Média do grupo

() Desvio Padrão

TO: Tecido Ósseo, TC: Tecido Conjuntivo, CS: Coágulo Sangüíneo, VS: Vasos Sanguíneos

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 6. Densidade por volume (%) de tecido ósseo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 7. Densidade por volume (%) de tecido conjuntivo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 8. Densidade por volume (%) de coágulo sanguíneo formado no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 9. Densidade por volume (%) de vasos sanguíneos formados no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

5.4 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

As análises foram feitas com 4 animais por grupo. O alvéolo foi dividido para facilitar a contagem das células marcadas e observar a expressão das proteínas no alvéolo. O terço cervical foi excluído dos resultados, pois apresentava invaginação de epitélio gengival. De maneira geral não se constatou diferenças significativas entre os grupos experimentais, somente entre os períodos.

5.4.1 Marcação de RANK-L

De modo geral a expressão da RANK-L foi semelhante para todos os grupos e teve uma tendência de diminuição com o decorrer dos períodos experimentais.

Período de 7 dias: presença de coágulo sangüíneo, início da neoformação óssea, tecido conjuntivo e células expressando RANK-L foi observado em todos os grupos experimentais (Figura 31B).

Período de 14 dias: nesse período houve um aumento de células expressando RANK-L para todos os grupos experimentais. Começa a remissão do coágulo sangüíneo, predominância de tecido conjuntivo e neoformação de tecido ósseo.

Período de 21 dias: remissão de quase todo o coágulo sangüíneo, formação de osso primário na forma de ilhas de osso, reduzindo a quantidade de células presentes no alvéolo, por isso começa a ter menor número de células marcadas para RANK-L.

Período de 30 dias: processo de reparo ósseo já se encontra bem mais avançado, ainda persiste áreas com tecido conjuntivo, osteoblastos de superfície expressam RANK-L (Figura 32).

Figura 31 – 7 dias: Grupo I (0 ppm). **A)** Controle negativo (ausência de anticorpo primário). **B)** Presença de células expressando RANK-L (**seta**), osso neoformado (**ON**) e tecido conjuntivo (**TC**). Aumento de 40x (**A**) e (**B**).

Figura 32 – 30 dias: **A)** Grupo III (15 ppm) presença de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC), vasos sanguíneos (V) e células expressando RANK-L (seta). **B)** Grupo IV (50 ppm) presença de células expressando RANK-L (seta), osso neoformado (ON) e tecido conjuntivo (TC). Aumento de 40x (A) e (B).

A expressão de RANK-L, no terço apical, diminuiu conforme o aumento dos períodos (7 a 30 dias) nos grupos: 0 ppm (277 ± 84 a 111 ± 34 células/mm²), 5 ppm (212 ± 75 a 194 ± 68 células/mm²) e 15 ppm (247 ± 83 a 174 ± 23 células/mm²) e aumentou no grupo de 50 ppm (152 ± 9 a 165 ± 10 células/mm²). Com diferenças estatísticas significantes para o grupo I- 0 ppm entre os períodos de 7 e 14 dias (277 ± 84 e 133 ± 64) e de 7 e 30 dias (277 ± 84 e 111 ± 34), com queda de expressão entre esses períodos.

O terço médio, em geral, mostrou maior expressão das proteínas em relação ao terço apical. A expressão de RANK-L diminuiu conforme o aumento dos períodos (7 a 30 dias) nos grupos: 0 ppm (247 ± 36 a 196 ± 62 células/mm²) e 15 ppm (199 ± 94 a 177 ± 9 células/mm²). Apresentando diferenças significantes no grupo I (0 ppm) entre os períodos experimentais de 7 e 14 dias (247 ± 36 e 129 ± 32). Houve um aumento da expressão entre os períodos de 7 e 30 dias nos grupos: 5 ppm (198 ± 62 a 210 ± 56 células/mm²) e 50 ppm (198 ± 6 a 229 ± 33 células/mm²) (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de células/mm² que expressaram RANK-L, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais

Período Exp. (dias)	Grupos experimentais							
	0ppm		5ppm		15ppm		50ppm	
	apical	médio	apical	médio	apical	médio	apical	médio
7	277 ^{*Aa} (84)	247 ^{*Aa} (36)	212 ^{Aa} (75)	198 ^{Aa} (62)	247 ^{Aa} (83)	199 ^{Aa} (94)	152 ^{Aa} (9)	198 ^{Aa} (6)
14	133 ^{Ba} (64)	129 ^{Ba} (32)	169 ^{Aa} (130)	161 ^{Aa} (79)	174 ^{Aa} (54)	144 ^{Aa} (31)	213 ^{Aa} (38)	195 ^{Aa} (63)
21	182 ^{ABa} (93)	160 ^{ABa} (78)	276 ^{Aa} (22)	205 ^{Aa} (24)	104 ^{Aa} (49)	139 ^{Aa} (64)	170 ^{Aa} (64)	160 ^{Aa} (42)
30	111 ^{Ba} (34)	196 ^{ABa} (62)	194 ^{Aa} (68)	210 ^{Aa} (56)	174 ^{Aa} (23)	177 ^{Aa} (9)	165 ^{Aa} (10)	229 ^{Aa} (33)

*Média do número de células marcadas

() Desvio padrão

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 10 – Expressão de RANK-L no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 11 – Expressão de RANK-L no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

5.4.2 Marcação de OPG (Osteoprotegerina)

De modo geral a expressão da OPG foi semelhante para todos os grupos e teve uma tendência de diminuição com o decorrer dos períodos experimentais.

Período de 7 dias: nesse período foi observado, para todos os grupos experimentais, a presença de coágulo sangüíneo e algumas células expressando OPG (Figura 33B), provavelmente fibroblastos, pré-osteoblastos e osteoblastos. Houve também o início da neoformação óssea e presença de tecido conjuntivo.

Período de 14 dias: nesse período, para todos os grupos experimentais, já se pôde notar maior expressão das proteínas nesse período nos terços apical, médio e cervical, presença de tecido conjuntivo (em maior densidade quando comparado aos demais períodos) e neoformação óssea.

Período de 21 dias: houve a expressão de proteínas pelas células, porém, a partir desse período, houve uma diminuição da quantidade de células marcadas com essas proteínas. Nessa fase, o reparo ósseo já está numa fase mais avançada, há menor densidade de tecido conjuntivo e ainda há a presença de focos de coágulo sangüíneo.

Período de 30 dias: grande densidade de tecido ósseo neoformado foi observada em todos os grupos experimentais. Houve uma grande redução de células expressando OPG, devido à redução de volume celular e aumento de tecido ósseo (Figura 34B).

Figura 33 – 7 dias: Grupo deionizada. A) Controle negativo (sem anticorpo primário), região do alvéolo dental demonstrando ausência de marcação imunoistoquímica. **B)** Presença de coágulo sanguíneo (**CS**) e células expressando OPG (**seta**). Aumento de 40X (A) e (B)

Figura 34 – 30 dias:. **A)** Grupo II (5 ppm), células imunomarcadas, osso neoformado (ON) e vasos (V). **B)** Grupo IV (50 ppm) com presença de maior volume de osso neoformado (ON), tecido conjuntivo (TC), remissão do coágulo sanguíneo e células expressando OPG (seta). Aumento de 40x (A) e (B).

No terço apical, a expressão de OPG por células estromais, osteoblastos e fibroblastos, diminuiu, com exceção do grupo II-5 ppm (166 ± 173 a 176 ± 13 células/mm²), conforme foi aumentando os períodos experimentais (7 a 30 dias): grupo controle (223 ± 66 a 147 ± 14 células/mm²), 15 ppm (255 ± 88 a 185 ± 8 células/mm²) e 50 ppm (238 ± 77 a 157 ± 29 células/mm²). Sendo o grupo IV- 50 ppm o único a apresentar diferença significativa entre os períodos de 21 e 30 dias (281 ± 26 e 157 ± 29) (Tabela 9).

Em relação à expressão de OPG no terço médio, por fibroblastos e osteoblastos houve um aumento com o passar dos períodos (7 a 30 dias) nos grupos: 0 ppm (257 ± 97 a 270 ± 22 células/mm²), 5 ppm (211 ± 40 a 218 ± 11 células/mm²) e diminuiu com o passar dos períodos (7 a 30 dias) nos grupos 15 ppm (255 ± 86 a 204 ± 20 células/mm²) e 50 ppm (269 ± 68 a 208 ± 39 células/mm²) (Tabela 9).

Tabela 9 – Número de células/mm² que expressaram OPG, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais

Grupos experimentais								
Período Exp. (dias)	0ppm		5ppm		15ppm		50ppm	
	apical	médio	apical	médio	apical	médio	apical	médio
7	223 ^{*Aa} (66)	257 ^{Aa} (97)	166 ^{Aa} (73)	211 ^{Aa} (40)	255 ^{Aa} (88)	255 ^{Aa} (86)	238 ^{AB} (77)	269 ^{Aa} (68)
14	231 ^{Aa} (82)	288 ^{Aa} (60)	292 ^{Aa} (88)	280 ^{Aa} (90)	291 ^{Aa} (108)	218 ^{Aa} (72)	237 ^{AB} (35)	245 ^{Aa} (22)
21	206 ^{Aa} (8)	209 ^{Aa} (23)	205 ^{Aa} (42)	212 ^{Aa} (29)	163 ^{Aa} (58)	208 ^{Aa} (70)	281 ^A (26)	283 ^{Aa} (65)
30	147 ^{Aa} (14)	270 ^{Aa} (22)	176 ^{Aa} (13)	218 ^{Aa} (11)	185 ^{Aa} (8)	204 ^{Aa} (20)	157 ^B (29)	208 ^{Aa} (39)

*Média do número de células marcadas

() Desvio padrão

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 12 – Expressão de OPG no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 13 – Expressão de OPG no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

5.4.3 Marcação de MMP-9

De maneira geral a expressão de MMP-9 foi semelhante para todos os grupos, tendo uma tendência de aumentar no grupo I (0 ppm) e diminuir no grupo IV (50 ppm).

Período de 7 dias: nesse período houve a presença intensa de coágulo sangüíneo, início da neoformação óssea, tecido conjuntivo e células expressando MMP-9 (Figura 35). Observado em todos os grupos experimentais.

Período de 14 dias: nesse período houve a remissão do coágulo sangüíneo, predominância de tecido conjuntivo e neoformação de tecido ósseo (Figura 36A). Sendo, em geral, a expressão de MMP-9, semelhante entre os grupos.

Período de 21 dias: remissão de quase todo o coágulo sangüíneo e formação de osso primário. Houve a expressão de proteínas pelas células (osteoblastos, macrófagos e osteoclastos). Em geral um aumento da quantidade de células marcadas conforme o aumento da concentração de F (Figura 36B).

Período de 30 dias: o processo de reparo ósseo já se encontra bem mais avançado, ainda persiste áreas com tecido conjuntivo, células expressando MMP-9 (Figura 37), semelhante entre os grupos experimentais.

Figura 35 – 7 dias: **A)** Grupo I (0 ppm), região do terço médio do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, tecido conjuntivo (TC), coágulo sanguíneo (CS). Diversos macrófagos marcados (seta). **B)** Grupo IV (50 ppm), células expressando MMP-9, notamos formação óssea (ON) e presença de osteoclastos imunomarcados (seta). Aumento de 40x (A) e (B).

Figura 36: A) 14 dias: Grupo II (15 ppm), região do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, osteoclasto (**seta**) e osso neoformado (**ON**). **B) 21 dias:** Grupo III (5 ppm), células imunomarcadas (**seta**) osso neoformado (**ON**) e vaso (**V**). Aumento de 40x (**A**) e (**B**).

Figura 37 - 30 dias: **A)** Grupo I (0 ppm), região do alvéolo dental mostrando células imunomarcadas por MMP-9, macrófago (**seta**) e osso neoformado (**ON**). **B)** Grupo IV (50 ppm), células imunomarcadas (**seta**) osso neoformado (**ON**). Aumento de 40x (**A**) e (**B**).

A expressão da MMP-9, no terço apical, aumentou nos grupos I-0 ppm (114 ± 34 a 134 ± 35) e III-15 ppm (111 ± 41 a 140 ± 65), conforme o aumento dos períodos (7 a 30 dias). Já nos grupos II-5 ppm (193 ± 73 a 136 ± 57) e IV-50 ppm (195 ± 53 a 145 ± 11) houve uma diminuição de células expressando MMP-9. Não foram constatadas diferenças significativas na expressão de MMP-9 entre os grupos experimentais (Tabela 10).

Já no terço médio, a expressão da MMP-9 aumentou com o passar dos períodos (7 a 30 dias), nos grupos: I-0 ppm (93 ± 16 a 180 ± 45 células/mm²), II-5 ppm (158 ± 44 a 179 ± 83 células/mm²) e III-15 ppm (118 ± 29 a 125 ± 19 células/mm²). No grupo IV-50 ppm (247 ± 66 a 186 ± 38 células/mm²) a expressão diminuiu. No período experimental de 7 dias, foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os grupos: 0 ppm e 50 ppm (93 ± 16 e 247 ± 66 células/mm²) e 15 ppm e 50 ppm (118 ± 29 e 247 ± 66 células/mm²) (Tabela 10).

Tabela 10 – Número de células/mm² que expressaram MMP-9, nos terços apical e médio, nos diversos períodos experimentais

Grupos experimentais								
Período Exp. (dias)	0ppm		5ppm		15ppm		50ppm	
	apical	médio	apical	médio	apical	médio	apical	médio
7	114 ^{*Aa} (34)	93 ^{Aa} (16)	193 ^{Aa} (73)	158 ^{Aab} (44)	111 ^{Aa} (41)	118 ^{Aa} (29)	195 ^{Aa} (53)	247 ^{Ab} (66)
14	149 ^{Aa} (51)	172 ^{Aa} (35)	185 ^{Aa} (122)	206 ^{Aa} (141)	142 ^{Aa} (37)	160 ^{Aa} (30)	165 ^{Aa} (17)	180 ^{Aa} (53)
21	170 ^{Aa} (42)	139 ^{Aa} (46)	182 ^{Aa} (51)	170 ^{Aa} (43)	159 ^{Aa} (40)	181 ^{Aa} (51)	166 ^{Aa} (31)	217 ^{Aa} (48)
30	134 ^{Aa} (35)	180 ^{Aa} (45)	136 ^{Aa} (57)	179 ^{Aa} (83)	140 ^{Aa} (65)	125 ^{Aa} (19)	145 ^{Aa} (11)	186 ^{Aa} (38)

*Média do número de células marcadas

() Desvio padrão

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Gráfico 14 – Expressão de MMP-9 no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Gráfico 15 – Expressão de MMP-9 no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

5.5 ANÁLISE DAS LÂMINAS MARCADAS COM TRAP

Observamos a presença de osteoclastos marcados para TRAP em todos os grupos (deionizada (controle), 5, 15 e 50 ppm de flúor) em todos os períodos experimentais (7, 14, 21 e 30 dias) (Tabela 11 e figuras 38, 39 e 40).

Tabela 11 – Número de células/mm² que expressaram TRAP no terço apical e médio, nos diversos períodos analisados

Grupos experimentais								
Período Exp. (dias)	0ppm		5ppm		15ppm		50ppm	
	apical	médio	apical	médio	apical	médio	apical	médio
7	24 ^{*Aa} (7)	22 ^{Aab} (5)	18 ^{Aa} (11)	29 ^{Aa} (9)	17 ^{Aa} (15)	14 ^{Ab} (7)	13 ^{Aa} (14)	10 ^{Ab} (7)
14	8 ^{Ba} (2)	8 ^{Ba} (4)	16 ^{Aa} (13)	11 ^{Ba} (5)	6 ^{Aa} (3)	8 ^{Aa} (4)	10 ^{Aa} (8)	8 ^{Aa} (5)
21	18 ^{BAa} (6)	10 ^{Ba} (7)	32 ^{Aa} (14)	15 ^{BCa} (4)	15 ^{Aa} (7)	16 ^{ABa} (5)	30 ^{Aa} (10)	21 ^{Ba} (10)
30	23 ^{Aa} (4)	19 ^{ABa} (4)	23 ^{Aa} (3)	25 ^{ACa} (6)	19 ^{Aa} (5)	20 ^{Ba} (9)	16 ^{ABa} (10)	22 ^{Ba} (10)

*Média do número de células marcadas

() Desvio padrão

Letras minúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os grupos

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças significativas entre os períodos experimentais

Terço apical

O grupo controle (0ppm) apresentou queda significativa na expressão de TRAP entre os períodos de 7 e 14 dias (24 ± 7 e 8 ± 2 células/mm²) e um aumento significativo entre os períodos de 14 e 30 dias (8 ± 2 e 23 ± 4 células/mm²). Já para o grupo IV (50 ppm) houve um aumento significativo dos períodos de 7 e 14 dias (13 ± 14 e 10 ± 8 células/mm²) para o período de 21 dias (30 ± 10 células/mm²) (Tabela 11).

Gráfico 16 – Expressão de TRAP no terço apical do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Terço médio

Em relação aos grupos, a expressão de TRAP pelos osteoclastos, notamos que no período experimental de 7 dias, diminuiu conforme o aumento da concentração de F entre os grupos: I- 0ppm e IV-50 ppm (22 ± 5 e 10 ± 7), II- 5 ppm e III- 15 ppm (29 ± 9 e 14 ± 7) e II-5 ppm e IV- 50 ppm (29 ± 9 e 10 ± 7). Foram encontradas diferenças entre os seguintes períodos: 7 e 14 dias, nos grupos I-0 ppm (22 ± 5 e 8 ± 4) e II -5 ppm (29 ± 9 e 11 ± 5); 7 e 21 dias, nos grupos I-0 ppm (22 ± 5 e 10 ± 7), II- 5 ppm (29 ± 9 e 15 ± 4) e IV-50 ppm (10 ± 7 e 21 ± 10); 7 e 30 dias no grupo IV-50 ppm (10 ± 7 e 22 ± 10); 14 e 21 dias no grupo IV-50 ppm (8 ± 5 e 21 ± 10) e 14 e 30 dias nos grupos II-5 ppm (11 ± 5 e 25 ± 6), III-15 ppm (8 ± 4 e 20 ± 9) e IV- 50 ppm (8 ± 5 e 22 ± 10) (Tabela 11).

Gráfico 17 – Expressão de TRAP no terço médio do alvéolo dental dos animais tratados com água deionizada, fluoretada com concentrações de 5, 15 e 50 ppm de flúor.

Figura 38 – TRAP: **A)** Região do alvéolo do grupo de 5ppm, período de 30 dias. Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (**seta**). Osso neoformado (**ON**), tecido conjuntivo (**TC**) e vaso (**V**). Aumento de 40x (**A**). Imunomarcação para TRAP.

Figura 39 - TRAP: A) Grupo de 15 ppm, período de 30 dias, marcado com coloração para TRAP. Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (**seta**). Osso neoformado (**ON**) e vaso (**V**). **B)** Detalhe para um osteoclasto (**seta**). Aumento de 40x (**A**) e (**B**). Imunomarcação para TRAP.

Figura 40 – Grupo IV-50ppm - 30 dias: **A)** Alvéolo de rato do grupo de 50ppm, período de 30 dias. Notamos a presença de osteoclastos imunomarcados (*seta*) para TRAP, além da presença de tecido ósseo neoformado (ON) e tecido conjuntivo (TC) na região do terço médio. **B)** Notamos a marcação TRAP-positiva em osteoclastos (*seta*). Osso neoformado (ON) e vaso (V). Aumento de 10x (**A**) e 40x (**B**). Imunomarcagem para TRAP.

5.6 Avaliação das atividades das MMP-2 e 9 e suas pró-enzimas

As atividades das metaloproteinases 2 e 9 (Figura 41) e suas respectivas pró-enzimas foram expressas em função da área obtida no zimograma (número de pixels por mm²) e estão representadas nos gráficos 18 e 19.

De acordo com os resultados dos gráficos 18 e 19, as atividades da pró-MMP-9 e MMP-9 foram maiores no grupos tratados com flúor no período de 30 dias em relação ao controle e ao período de 7 dias. No período de 7 dias, o grupo com maior atividade registrada da pró-MMP-9 foi o grupo de 15 ppm (4867 pixels/mm²) enquanto os grupos de 5 e 50 ppm obtiveram 3483 pixels/mm² e 3617 pixels/mm² respectivamente (Gráfico 18A). A pró-MMP-9 do grupo de 5 ppm obteve maior atividade no período de 30 dias (6872 pixels/mm²) enquanto os outros grupos apresentaram uma atividade em torno de 3500-4100 pixels/mm², no mesmo período (Gráfico 18A).

A MMP-9 (gráfico 18B) teve maior atividade registrada no período de 30 dias para o grupo de 5 ppm (8078 pixels/mm²). No período de 7 dias, a atividade da MMP-9 para o grupo de 15 ppm (7413 pixels/mm²) superou os outros grupos: 5 ppm (5024 pixels/mm²) e 50 ppm (3349 pixels/mm²). Entretanto, no período de 30 dias, a atividade do grupo de 5 ppm (8078 pixels/mm²) foi maior que nos grupos controle (5654 pixels/mm²), 15 ppm (5513 pixels/mm²) e 50 ppm (4354 pixels/mm²) (Gráfico 18B).

A atividade da pró-MMP-2 e da MMP-2 foi muito próxima entre os períodos de 7 e 30 dias para os grupos tratados (gráficos 19A e 19B). No período de 7 dias, o grupo com atividade da pró-MMP-2 ligeiramente maior que os outros foi o grupo de 15 ppm (4775 pixels/mm²), enquanto os grupos de 5 e 50 ppm obtiveram 4341 pixels/mm² e 4403 pixels/mm², respectivamente (Gráfico 19A). A pró-MMP-2 do grupo de 5 ppm obteve maior atividade no período de 30 dias (4713 pixels/mm²) enquanto os grupos controle, de 15 e 50 ppm apresentaram atividades de 3282 pixels/mm², 3721 pixels/mm² e 4155 pixels/mm² respectivamente (Gráfico 19A).

A MMP-2 (Gráfico 19B) teve maior atividade registrada no período de 30 dias, para o grupo de 5 ppm (6388 pixels/mm²). No período de 7 dias, a atividade da MMP-2 foi muito próxima para todos os grupos, entretanto a atividade para o grupo de 15 ppm (6383 pixels/mm²) superou a dos outros grupos: 5 ppm (6217 pixels/mm²) e 50 ppm (5877 pixels/mm²). No período de 30 dias, a atividade do

grupo de 5 ppm (6388 pixels/mm²) foi maior que nos grupos controle (5158 pixels/mm²), 15 ppm (3989 pixels/mm²) e 50 ppm (5629 pixels/mm²) (Gráfico 19B).

Figura 41. A) Imagem digitalizada do gel de zimografia depois de processado. B) Imagem sendo analisada no programa Kodak Molecular Imaging Software®. Notar as bandas correspondentes as pro-MMPs e MMPs 2 e 9. Colunas: 1 - padrão MMP-2, 2 - padrão MMP-9, 3 - grupo 5 ppm 7 dias, 4 - grupo 15 ppm 7 dias, 5 - grupo 50 ppm 7 dias, 6 - controle 30 dias, 7 - grupo 5 ppm 30 dias, 8 - grupo 15 ppm 30 dias e 9 - grupo 50 ppm 30 dias.

Gráfico 18: Representação da atividade das pró-MMP-9 (A) e MMP-9 (B) em áreas das bandas no gel de zimografia, dos grupos controle, 5, 15 e 50 ppm de F.

Gráfico 19: Representação da atividade das pro-MMP-2 (A) e MMP-2 (B) em áreas das bandas no gel de zimografia, dos grupos controle, 5, 15 e 50 ppm de F.

Discussão

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo foi realizado em ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) considerando tratar-se de modelo experimental na linha de pesquisa de “estudo do processo de reparo alveolar”. Diversos e importantes trabalhos foram e continuam sendo desenvolvidos usando esse modelo experimental (SAAD NETO et al., 1982; CARVALHO; OKAMOTO, 1987; GARBIN JÚNIOR, 2001; VERONESE, 2004; BARION, 2005; ACCORSI-MENDONÇA et al, 2008), consagrando também a quantidade de espécimes por grupo de experimentação dessa linha de pesquisa ao longo do tempo.

Concordamos com a opinião de pesquisadores considerados “expertises” no assunto (AMLER, 1969; SIMPSON, 1969; CARVALHO et al., 1976; CARVALHO E OKAMOTO, 1987; SAAD NETO et al., 1985; LIN et al., 1994), que o processo de reparação alveolar em ratos exhibe, microscopicamente, a mesma sequência cronológica do reparo ósseo alveolar em humanos. Fato esse que permite a transposição (guardando algumas exceções) destes eventos para o ser humano, sempre levando em consideração que a cronologia reparacional do rato ocorre aproximadamente duas vezes mais rápida. Agregado a isso, o rato é um animal de fácil obtenção e manuseio, além de existir o domínio da execução da técnica cirúrgica, proposta por OKAMOTO E RUSSO (1973).

Sabemos que o processo de reparo alveolar pode ser analisado através de diferentes métodos. Também acreditamos que a avaliação microscópica permite o conhecimento da sucessão dos eventos celulares e teciduais permitindo a avaliação de seus aspectos mais significativos (SANTOS PINTO, 1964; CARVALHO et al., 1976; CARVALHO E OKAMOTO, 1987; GARBIN JÚNIOR, 2001; ALMEIDA JÚNIOR, 2004). Deste modo, esses detalhes contribuíram significativamente para escolha deste modelo experimental neste estudo.

Cronologicamente podemos considerar três a quatro fases fundamentais na evolução do processo de reparo alveolar (PERRI de CARVALHO & OKAMOTO, 1998, SATO & TAKEDA, 2007). Pudemos observar nos grupos analisados as fases distintas da reparação alveolar em ratos. O primeiro estágio é exsudativo, caracterizado pelo preenchimento do alvéolo dental pelo coágulo sanguíneo (1 a 7 dias após a extração dental, em alvéolo de ratos) (PERRI de CARVALHO & OKAMOTO, 1998). Nossos resultados de descrição microscópica do tecido reacional

e morfometria são congruentes com esses relatos da literatura (PERRI de CARVALHO & OKAMOTO, 1998), uma vez que observamos em todos os grupos a presença do coágulo no período experimental de 7 dias. Através da técnica de imunoistoquímica detectamos ainda a expressão de RANK-L e OPG em células com citoarquitetura de linhagem osteoblástica e osteócitos em todos os grupos nesse período. Dados esses semelhantes ao descritos por SOUZA (2006), no início do reparo ósseo ao redor de implantes em coelhos, e LUVIZUTO et al (2010) em alvéolos de ratos.

Na segunda fase, o processo de reparo alveolar passa para um estágio proliferativo, marcado pela intensa proliferação celular, desenvolvimento do tecido conjuntivo e maturação do tecido conjuntivo (7 a 14) (SATO & TAKEDA, 2007). Apesar do aparecimento de tecido conjuntivo e áreas de neoformação óssea próxima as paredes do alvéolo, os resultados do período experimental de 14 dias, ainda mostravam a presença de coágulo sanguíneo em todos os grupos, tanto no terço apical como médio. Tais achados seguem a linha dos resultados apresentados anteriormente por YUGOSHI e colaboradores (2002) que também usaram o modelo de reparo em alvéolo de incisivo superior de ratos. Ainda em relação ao período experimental de 14 dias, alguns autores demonstraram a expressão de RANK-L e OPG em osteoblastos em alvéolos de ratos (COUTINHO, 2005; DIAS, 2007; LUVIZUTO et al., 2010). Verificamos a atividade das proteínas RANK-L e OPG, porém a diferença encontrada não foi estatisticamente significativa para os grupos experimentais, neste período. Houve apenas uma discreta diminuição na expressão dessas proteínas em relação ao período anterior.

Num terceiro momento, na fase reparativa, existe a gradual reposição de coágulo sanguíneo e tecido conjuntivo por trabéculas ósseas ou osso primário (21 a 30 dias) (PERRI de CARVALHO & OKAMOTO, 1998). Essas características são similares aquelas encontradas para o grupo controle, nos períodos de 21 e 30 dias pós-operatório. No entanto, os grupos tratados com flúor (15 ppm e 50 ppm) estavam com presença considerável de coágulo sanguíneo ainda nesses períodos. Através da imunoistoquímica, em nosso estudo, observou-se nestes períodos, a presença de células da linhagem osteoblástica imunomarcadas para OPG e RANK-L, assim como foi descrito por KHOSLA, 2001; COUTINHO, 2005; DIAS, 2007 E LUVIZUTO et al., 2010.

Na última fase, de remodelamento, o osso primário vai sendo 'modificado', ocorrendo a organização em formas de lamelas e a formação dos canais de Havers e Volkman (NANCI,2008), o que foi verificado no presente trabalho quando se observou o grupo de 60 dias. Esse processo ocorre com a reabsorção de tecido ósseo pelos osteoclastos seguida de deposição de matriz mineralizada pelos osteoblastos, como descrito por Trombelli et al. (2008), cujo trabalho avaliou o processo de reparo alveolar em humanos nesse mesmo estágio de remodelação. Estes resultados são semelhantes aqueles encontrados em nosso estudo, quando avaliou-se o período de 30 dias, onde pode-se observar a presença de osteoclastos através da marcação para TRAP em todos os grupos deste período.

TROMBELLI e colaboradores (2008) demonstraram ainda que o processo de reparo alveolar em humanos pode variar bastante entre os indivíduos em períodos semelhantes. Tal descrição também foi encontrada, no presente trabalho, no processo de reparo ósseo em animais do mesmo grupo (tratados com a mesma concentração de flúor e eutanasiados no mesmo período).

O uso do fluoreto como agente terapêutico para osteoporose têm alavancado alguns questionamentos quanto a seu real efeito além da dose ideal a ser usada (RAFFI et al., 1997; KRAGSTRUP et al., 1984). Alguns autores sugerem que a incorporação do fluoreto nos tecidos mineralizados (especialmente osso), modifica a dinâmica desse tecido em diversos aspectos como resistência a tração (MOUSNY et al., 2006) e no processo de síntese e reabsorção (MOUSNY et al., 2008). Oruc, (2008) descreveu vários trabalhos relacionando a alta concentração de fluoreto na água local (rios e fontes de água da região) com problemas de crescimento e desenvolvimento ósseo de humanos e animais de criação como cabras e vacas, além da fluorose dentária. Recentes relatos da literatura mostraram os efeitos do fluoreto em tecidos mineralizados (tecido ósseo especialmente) em populações residentes em áreas onde o fluoreto está presente na água natural, sendo os principais efeitos adversos, alterações e deformações denominadas fluorose esquelética (SHASHI et al., 2008). Por outro lado, alguns estudos mostraram o efeito do fluoreto sobre o aumento da densidade do tecido ósseo (VON TIRPITZ et al., 2003; GROBLER et al., 2009). Esses estudos foram confirmados no presente estudo, uma vez que encontramos algumas diferenças na cronologia do processo de reparo ósseo (neoformação óssea, reabsorção de coágulo sanguíneo e formação de tecido conjuntivo) nos diferentes grupos experimentais.

Em nosso trabalho, foi observado um pequeno atraso do processo de reparo ósseo, por parte do grupo experimental tratado com 50 ppm de F, quando analisado no período de 30 dias (presença de coágulo sanguíneo $\pm 20\%$ no terço apical). Em relação ao processo de neoformação óssea influenciado pelo fluoreto, um trabalho recente da literatura (CARVALHO et al., 2008) descreveu que doses de 15 e 50 ppm de flúor na água de beber podem reduzir a formação óssea ectópica em músculos de ratos. Nesse trabalho os autores implantaram uma matriz óssea desmineralizada de origem alógena em tecido muscular de ratos, segundo o protocolo descrito anteriormente por URIST (1965), submetidos a diferentes doses de fluoreto na água de beber (0, 5, 15 e 50 ppm de flúor). Semelhantemente aos nossos achados, os autores encontraram uma menor neoformação óssea, após um período de 28 dias de implantação, nos animais tratados com maiores doses de fluoreto: 15 e 50 ppm.

Nossos dados de concentrações de flúor no plasma ainda estão de acordo com o relato de Whitford (1996), no qual o autor observou um maior pico de fluoreto no plasma de animais (cães) jovens em comparação com animais mais velhos. Lembrando que os maiores picos foram nos períodos de 21 dias e diminuíram para os períodos de 30 e 60 dias. Whitford (1996) sugere que a menor concentração de fluoreto no plasma dos animais jovens possa ser justificada pela incorporação no tecido ósseo desses animais, uma vez que apresentam um maior turnover ósseo e consequentemente maior capacidade de captação desse elemento. Isso pode explicar a queda no nível de fluoreto no plasma dos animais no período de 30 e 60 dias, descritos em nossos estudos.

Outro dado importante é a presença das MMPs 2 e 9 no processo de reparo do defeito ósseo em alvéolo de ratos, tendo sido descrito na literatura (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008), levando em consideração que existe a necessidade da expressão dessas moléculas para permitir a invasão e migração celular (OPDENAKKER & VAN DAMME, 1992), auxiliando o fenômeno de angiogênese (REICH et al., 2005; GHAJAR, GEORGE & PUTNAM, 2008) que traz o aporte sanguíneo suficiente para a demanda nutricional do processo de regeneração (HING et al., 2004). Além da invasão e migração celular as MMPs estariam presentes na etapa seguinte para dar continuidade ao processo de degradação e remodelação de matriz na área do enxerto ósseo (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008).

Encontramos, na zimografia, atividade proteolítica das metaloproteinases nos períodos de 7 e 30 dias e diferença de atividades das enzimas nos grupos que

receberam maior dose de flúor na água de beber. Esses resultados, mostrando diferença nas atividades de MMPs-2 e 9 nos diferentes períodos, parecem estar de acordo com o recente trabalho de ACCORSI-MENDONÇA e colaboradores (2008) que descreveram diferenças na expressão das MMPs 2 e 9 nas diferentes regiões do alvéolo (terço apical, terzo médio e terzo cervical) bem como nos tempos de reparo (1, 3, 7, 10, 14, 21, 28, e 42 dias pós-operatório), demonstrando a importância dessas metaloproteases nos processos de substituição do coágulo sanguíneo pelo tecido conjuntivo, na formação, maturação e remodelamento do novo osso. Outro detalhe é que o período de maior pico de atividade da MMP 2 (7 dias) foi similar aos maiores índices de angiogênese nos grupos testados, confirmando relatos da literatura (OPDENAKKER & VAN DAMME, 1992; HING et al., 2004; REICH et al., 2005; OLIVEIRA, 2005). O trabalho de OLIVEIRA (2005) descreveu maior atividade da MMP-2 em reparo ósseo em defeitos críticos em ratos, resultado interessante já que nossos achados de atividade da MMP-2 também foram maiores no período de 7 dias no reparo de alvéolos.

A gelatinase B, ou MMP-9 expressa principalmente por clastos, participa da reabsorção óssea, no compartimento subclástico e em sítios de neoformação (PAGE-MCCAW, EWALD & WERB, 2007). A MMP-9 apresenta capacidade de degradar fibrilas de colágeno do osso em conjunto com MMP-1 e proteinases cisteínicas, como as catepsinas B, G, L e N (OKADA et al., 1995). REPONEN e colaboradores (1994) chegam a sugerir a MMP-9 como um marcador para clastos, sendo que outros autores (RICE, KIM & THESLEF, 1997) confirmam a sua expressão em osteoclastos ativamente participando da reabsorção óssea. No presente trabalho confirmamos essa suspeita, descrita primeiramente por REPONEN et al. (1994), encontrando osteoclastos imunomarcados para MMP-9.

A expressão dessa enzima (MMP-9) foi confirmada em cultura de macrófagos alveolares, neutrófilos, trofoblastos, queratinócitos, células tumorais e linfócitos T humanos (REPONEN et al., 1994). Através da imunoistoquímica, na presente pesquisa, foram identificados em todos os grupos células semelhantes a macrófagos expressando essa enzima. ORTEGA e colaboradores (2003) chamaram a atenção para a importância da MMP-9, expressa por células endoteliais e outras células da medula óssea nas etapas finais de reparo ósseo ou ossificação (em conjunto com a MMP-13 e o VEGF). Descrição essa que vem ao encontro de nossos achados de zimografia, sobre a maior atividade da MMP-9 nos grupos de 30 dias. Os

osteoclastos expressando gelatinase B geralmente apresentam marcação positiva também para TRAP (REPONEN et al., 1994). Entretanto, RICE, KIM & THESLEF, em 1997, identificaram nos clastos a transição de gelatinase B predominantemente nas áreas em neoformação de tecido ósseo e de crescimento rápido, enquanto a marcação por TRAP revela-se em maior proporção na remodelação de osso maduro. Nossos resultados mostraram uma maior marcação de células TRAP-positivas nos períodos de 21 e 30 dias para todos os grupos, fato esse provavelmente relacionado ao remodelamento ósseo.

O sistema RANK-L/OPG parece ser afetado direta e/ou indiretamente pela fluorose (VON TIRPITZ et al., 2003), modulando o processo de osteoclastogênese (YAN et al., 2007). Alguns autores descreveram diferenças na resposta do tecido ósseo em diferentes linhagens de camundongos (YAN et al., 2007) demonstrando uma influência genética sobre a resposta do mesmo ao fluoreto (YAN et al., 2007). Além do mais, Yan et al. (2009) descreveram apoptose dos osteoblastos (in vitro) e aumento da expressão de caspase 3 e 9 quando submetidos a altas doses de NaF. Nossos resultados parecem complementar os relatos da literatura, já que encontramos alterações na expressão de RANK-L e OPG entre os animais tratados e não tratados com altas doses de fluoreto.

Num estudo de CARDOSO et al. (2007) os autores descrevem a interferência do fluoreto no sistema OPG-RANK-L na região do esmalte de ratos Wistar. Esse relato pode nos dar um indício da interferência do fluoreto no processo de ativação de osteoclastos, uma vez que nossos resultados mostraram um perfil diferente de atividade osteoclástica nos diferentes grupos para os diferentes períodos.

Sabemos que a identificação da osteoprotegerina (OPG), um receptor solúvel, se tornou importante devido a sua ligação ao RANK-L impedindo a conexão RANK/RANK-L, e consequentemente a formação de osteoclastos e reabsorção óssea. No presente estudo, houve um aumento na expressão de RANK-L entre os períodos de 7 e 30 dias nos grupos experimentais de 50 ppm de flúor, e concomitantemente uma queda na expressão de OPG no mesmo período para os grupos de 15 e 50 ppm de fluoreto. A interação entre o fator ativador (RANK) e o seu ligante RANK-L mostrou ser crítica para que ocorra a formação de osteoclastos (SHARMA et al., 2006), que foi observado no presente estudo através dos resultados de TRAP (marcador bioquímico para osteoclastos). Esta (TRAP)

apresentou-se aumentada entre o período de 7 a 30 dias, sugerindo uma possível interferência do fluoreto no processo de ativação de osteoclastos.

Conclusão

7 CONCLUSÃO

Mediante os resultados obtidos no modelo de reparo alveolar em ratos, concluímos que o fluoreto de sódio, administrado em altas concentrações na água de beber:

- 1) altera a cronologia do processo de reparo ósseo alveolar.
- 2) retarda a formação de novo tecido ósseo no processo de reparo ósseo alveolar
- 3) promove um atraso na remissão do coágulo sanguíneo.
- 4) altera a expressão das proteínas ativadoras de osteoclastos RANK-L e OPG.
- 5) altera a expressão e atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9.

Referências

REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. **J. Mol. Histol.**, v. 39, n. 2, p. 201-8, Apr. 2008.
- ALLORI A, A.C.; SAILON, A.M.; WARREN, S.M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair—part I: biochemical signaling molecules. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 14, n. 3, p. 258-73, Sep. 2008.
- ALLORI B, A.C.; SAILON, A.M.; WARREN, S.M. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. **Tissue Eng Part B Rev.**, v. 14, n. 3, p. 275-83, Sep. 2008.
- AMLER, M.H. The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** v. 27, n. 3, p. 309-18, 1999.
- AOBA, T.; FEJERSKOV, O. Dental fluorosis: chemistry and biology. **Crit Ver Oral Biol Med**, v.13, n.2, p. 155-70. 2002.
- ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone.** v.40, p.251-264, 2007.
- ASKMYR, M. K. et al. Towards a better understanding and new therapeutics of osteopetrosis. **Br J Haematol** v.140, n.6, p. 597-609, 2008.
- BAHAR, H. et al. Molecular signaling in bone regeneration. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** v.17, n. 2, p. 87-101, 2007.
- BAKER, A.H.; EDWARDS, D.R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **J Cell Sci.** v.115, n. 19, p. 3719-27, 2002.
- BAUER, E.A. et al. Collagenase production by human skin fibroblasts. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 64, n. 1, p. 232-340, 1975.
- BEHONICK, D.J. et al. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration. **PLOS ONE.** v. 2, n. 11, p. e1150, 2007.
- BEZERRA de MENEZES, L.M. et al. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. **Forensic Sci Int.** v. 137, n. 3, p. 209-14, 2003.
- BLAVIER, L.; DELAISSE, J.M. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. **J Cell Sci.** v. 108 n. 12, p. 3649-59, Dec. 1995.

BOIVIN, G. et al. Skeletal fluorosis: Iliac bone histomorphometry and bone fluoride content. **J Bone and Mineral Res.** Abstract. Trabalho apresentado no 9 th Annu. Scient. Meet. Am. Soc. Bone and Mineral Res. v. 2, Suppl. I, 1987.

BOSTROM, M.P. Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin Orthop.** v. 355, n. S116, p. 23, 1998.

BOYCE, B.F.; XING, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. **Arch Biochem Biophys.** v. 473, n. 2, p. 139-46, 2008.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** v. 423, p. 337-42, 2003.

BRUZZANITI, A.; BARON, R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Rev Endocr Metab Disord.** v. 7, n. 1-2, p. 123-39, 2006.

BRUZZANITI, A.; BARON, R. Molecular regulation of osteoclast activity. **Rev Endocr Metab Disord.** v.7, p.123-139, 2006.

BUZALAF, M.A.R. et al. Bone surface and whole bone as biomarkers for acute fluoride exposure. **J Anal Toxicol.** v. 29, n. 8, p. 810-13, 2005.

BUZALAF, M.A.R. et al. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. **J Anal Toxicol.** v. 28, n. 4, p. 249-52, 2004.

CARDAROPOLI, G.; ARAUJO, M.; LINDHE, J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. An experimental study in dogs. **J Clin Periodontol.** v. 30, n. 9, p. 809-18, 2003.

CARVALHO, A.C.P.; OKAMOTO, T. Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clínica. São Paulo: Panamericana, 1987.

CHAE, H. J. et al. Mechanism of mitogenic effect of fluoride on fetal rat osteoblastic cells: evidence for Shc, Grb2 and p-CREB-dependent pathways. **Res Commun Mol Pathol and Pharm,** v. 105, n.3 p.185-199, 1999

CHAMBERS, T.J. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. **J Pathol.** v. 192, n. 1, p. 4-13, 2000.

CHENG, C.K.; PANESAR, N.S.; HAINES, C.; MASAREI, J.; SWAMINATHAN, R. Immunoassay of a tartrate-resistant acid phosphatase in serum. **Clin Chem.** v. 41, n. 5, p. 679-86, May.1995.

CHENG, K. et al. In vitro behavior of osteoblast-like cells on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Biomaterials** v. 26, n. 32, p. 6288-95, 2005.

CHOI, M.G. et al. Effects of titanium particle size on osteoblast functions in vitro and in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 102, n. 12, p. 4578-83. 2005.

COLNOT, C. et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9. **Development**. v. 130, n. 17, p. 4123-33. Sep, 2003.

COMPSTON, J.E. et al. Bone remodeling rate and remodeling balance are not co-regulated in adulthood: implications for the use of activation frequency as an index of remodeling rate. **J Bone Miner Res**. v. 22, n. 7, p. 1031-6, 2007.

COOPER, L.F. et al. Fluoride modification effects on osteoblast behavior and bone formation at TiO₂ grit-blasted c.p. titanium endosseous implants. **Biomaterials**. v. 27, n. 6, p. 926-36, Feb, 2006.

COUTELIER, L.; NOEL, H.; MALDAGUE, B. Bone remodeling alterations induced by fluor poisoning in the bovine. Abstract. Trabalho apresentado no **Symposium CEMO** p:189-93. 1978.

DAIJEI, H. Further observations on radiological changes of endemic foodborne skeletal fluorosis. **Fluoride**. v. 17, n.1, p. 9-14, 1984.

DEMPSTER, D.W. New concepts in bone remodeling. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S.P.; BILEZIKIAN, J.P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego: Academic Press, cap. 18, p. 261-73, 1999.

DEQUEKER, J.; DECLERCK, K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. **Schweiz Med Wochenschr**. v. 123, n. 47, p. 2228-34, 1993.

DEVLIN, H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. **Cells Tissues Organs**. v. 167, n. 1, p. 33-7, 2000.

DEVLIN, H.; GARLAND, H.; SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg**. v. 54, n. 9, p. 1087-91, 1996.

DEVLIN, H.; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **Int J Oral Maxillofac Surg**. v. 31, n. 6, p. 641-5, 2002.

DUNIPACE, A.J.; BRIZENDINE, E.J.; ZHANG, W.; WILSON, M.E.; MILLER, L.L.; KATZ, B.P.; WARRICK, J.M.; STOOKEY, G.K. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. **J Dent Res**. v. 74, n. 1, p. 358-68, 1995.

DURE-SMITH, B.A. et al. Fluoride therapy for osteoporosis: A review of dose response, duration of treatment, and skeletal sites of action. **Calcif Tissue Int**, v.49 suppl, p. S64-7, 1991.

Eastell R. Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. In: Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. **6th ed. American Society for Bone and Mineral Research**. p. 259-262, 2006.

ELMARDI, A.S.; KATCHBURIAN, M.V.; KATCHBURIAN E. Electron microscopy of developing calvaria reveals images that suggest that osteoclasts engulf and destroy osteocytes during bone resorption. **Calcif. Tissue Int.** v. 46, p. 239–245. 1990.

ENLOW DH, HANS MG. Noções Básicas sobre crescimento facial. São Paulo, Brazil: Editora. Santos; 1998.

EVERETT, E.T. et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. **J Dent Res.** v. 81, n. 11, p. 794-8, Nov. 2002.

FARLEY, J. R.; WERGEDAL, J. R.; BAYLINK, D. J. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. **Science**, v.222, p. 330-2, 1983.

GALLO, J. et al. Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis. **Physiol Res.** v. 57, n. 3, p. 339-49, 2008.

GARBIN JÚNIOR, E. A. Influência de solução anestésica local contendo articaína no processo de reparo em feridas de extração dental: análise histológica em ratos / The influence of local anaesthetic solution containing articaine on the repair process in wounds local extraction: histological analyzis in rats. Araçatuba; s.n; 151p. tese, 2001.

GHAJAR, C.M.; GEORGE, S.C.; PUTNAM, A.J. Matrix Metalloproteinase Control of Capillary Morphogenesis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, v. 18, n. 3, p 251-78, 2008.

GRANOT-ATTAS, S.; KNOBLER, H.; ELSON, A. Protein tyrosine phosphatases in osteoclasts. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**. v. 17, n. 1, p. 49-71, 2007.

HADDAD, A.; HETEM, S.; BRANDÃO, H.J.S.; SANTOS PINTO, R. A tetraciclina no processo de reparo de feridas de extração dental de ratos. **Rev Fac Odontol Araçatuba**, v.1, p.33-42, 1965.

HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. **Ann NY Acad Sci.** v.1092, p. 385-96, Dec. 2006.

HAGUENAUER, D. et al Fluoride for the treatment of postmenopausal osteoporotic fractures: a meta-analysis. **Osteoporosos Int.** v. 11, n. 9, p. 727-38, 2000.

HALLANGER JOHNSON, J.E. et al. Fluoride-related bone disease associated with habitual tea consumption. **Mayo Clin Proc.** v. 82, n. 6, p. 719-24, Jun, 2007.

HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature.** v. 423, n. 6937, p. 349-55, 2003.

HARINARAYAN C.V. et al. Fluorotoxic metabolic bone disease: an osteo-renal syndrome caused by excess fluoride ingestion in the tropics. **Bone**. v. 39, n. 4, p. 907-14, 2006.

HARPER, E.; BLOCH, K.J.; GROSS, J. The zymogen of tadpole collagenase. **Biochemistry**, v. 10, n. 16, p. 3035-41, 1971.

HING, K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact A Math Phys Eng Sci**. v. 362, n. 1825, p. 2821-50, 2004.

HING, K.A. et al. Mediation of bone ingrowth in porous hydroxyapatite bone graft substitutes. **J Biomed Mater Res A**. v. 68, n. 1, p. 187-200, 2004.

HOFBAUER, L.C.; NEUBAUER, A.; HEUFELDER, A.E. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. **Cancer** v. 92, n. 3, p. 460-70, 2001.

JEMTLAND, R.; LEE, K.; SEGRE, G.V. Heterogeneity among cells that express osteoclast-associated genes in developing bone. **Endocrinology**. v. 139, p. 340-49, 1998.

JUKES, J.M.; BOTH, S.K.; VAN BLITTERSWIJK, C.A.; de BOER, J. Potential of embryonic stem cells for in vivo bone regeneration. **Regen Med**. v. 3, n. 6, p. 783-5, 2008.

JUNQUEIRA, JC. et al. Effects of simvastatin on bone regeneration in the mandibles of ovariectomized rats and on blood cholesterol levels. **J Oral Sci**. v.44, n.117-24, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KANYAMA, M. et. al. Connective tissue growth factor expressed in rat alveolar bone regeneration sites after tooth extraction. **Arch Oral Biol**. v. 48, n. 10, p. 723-30, 2003.

KEBSCH, M.; WILKINSON, M.; PETOCZ, P.; DARENDELILER, M.A. The effect of fluoride administration on rat serum osteocalcin expression during orthodontic movement. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**. v. 131, n. 4, p. 515-24, 2007.

KHOSLA, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinology** v. 142, p. 5050-55, 2001.

KINANE, D.F. Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. **Periodontology**. v. 24, p. 215-25, 2000.

KOBAYASHI, Y.; UDAGAWA, N.; TAKAHASHI, N. Action of RANKL and OPG for Osteoclastogenesis. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** v.19, n. 1, p. 61–72, 2009.

KONG, Y.Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, p. 315–23, 1999.

KRAGSTRUP J.; RICHARDS A.; FEJERSKOV O. Experimental osteo-fluorosis in the domestic pig: a histomorphometric study of vertebral trabecular bone. **J Dent Res.** v. 63, n. 6, p. 885-9, Jun, 1984.

KRAGSTRUP, J.; RICHARDS, A.; FEJERSKOV, O. Experimental osteo-fluorosis in the domestic pig: a histomorphometric study of vertebral trabecular bone. **J Dental Res.** v. 63, n. 6, p. 885-9, Jun, 1984.

KRISHNAMACHARI K.A. Skeletal fluorosis in humans: a review of recent progress in the understanding of the disease. **Progr Food Nut. Sci.** v.10, n. 3-4, p. 279-314, 1986.

KROOK, L.; MAYLIN, G.A. Industrial fluoride pollution. Chronic fluoride poisoning in Cornwall Island cattle. **Cornell Vet.** v. 69, Suppl. 8, p. 1-70, Apr, 1979.

KÜRKÇÜ, M. et al. Histomorphometric evaluation of implants coated with enamel or dentine derived fluoride-substituted apatite. **J Mater Sci Mater Med.** v. 9, n. 1, p. 59-65, 2008.

LAGIER, R. Effects of fluorine on bone morphology. In: COURVOISIER, B.; DONATH, A.; BAUD, C.A. **Fluoride and bone : second Symposium CEMO (Centre d'étude des maladies ostéo-articulaires de Genève)**. Geneva: Médecine at Hygiène. p. 32-41, 1978.

LAU, K.H.; BAYLINK, D.J. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells. **J Bone Miner Res.** v. 13, n. 11, p. 1660-7, Nov. 1998.

LAU, K.H.; BAYLINK, D.J. Phosphotyrosyl protein phosphatases: potential regulators of cell proliferation and differentiation. **Crit Rev Oncog.** v. 4, n. 4, p. 451-71, 1993.

LI, Y.P.; CHEN, W.; LIANG, Y.; LI, E.; STASHENKO, P. Atp6l-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. **Nat Genet.** v. 23, n. 4, p. 4447–51, 1999.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUVIZUTO E,R. et. al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. **Arch Oral Biol.** v. 55, n. 1, p. 52-9. Nov 2010.

MACLEAN, C. *et al.* Systematic review: comparative effectiveness of treatments to prevent fractures in men and women with low bone density or osteoporosis. **Ann Inter Med.** v.148, n.3, p.197-213, 2008.

MANDRACCHIA, V.J.; NELSON, S.C; BARP EA. Current concepts of bone healing. **Clin Podiatr Med Surg.** v.18, n.1, p. 55, 2001.

MANKIN, H.J.; MANKIN, C.J. Metabolic bone disease: a review and update. **Instr. Course Lect.** v. 57, p. 575-593, 2008.

MARSHALL, K.; *et al.* Recombinant human and mouse purple acid phosphatases: expression and characterisation. **Arch Biochem Biophys.** v. 345, n. 2, p. 230–6, 1997.

MARTIN, T.; GOOI, J.H.; SIMS, N.A. Molecular Mechanisms in Coupling of Bone Formation to Resorption. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** v. 19, n. 1, p. 73–88, 2009.

MARX, R.E.; GARG, A.K. Bone structure, metabolism and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent.** v. 7, n. 4, p. 267-76, 1998.

MCSHEEHY, P.M.; CHAMBERS, T.J. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factors that simulates osteoclastic bone resorption. **Endocrinology**, v.119, n. 4, p.1654-9, 1986.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br Dent J.**v.172, p.235-242, 1992.

MOHR H. Fluoride effect on bone formation--an overview. **Tandlaegebladet**, v. 94, n.18, p. 761-3, Dec. 1990.

MOUSNY, M. *et al.* Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. **Bone.** v. 43, n. 6, p. 1067–74, 2008.

NAGASE, H.; WOESSNER Jr, J.F. Matrix metalloproteinases. **J Biol Chem.** v. 274, n. 31, p. 21491-4, 1999.

NANCI, A. **Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function.** Philadelphia,USA: Elsevier. 411p. 2008.

OHMI, K.; NAKAGAKI, H.; TSUBOI, S.; OKUMURA, A.; SUGIYAMA, T.; THUY, T.T.; ROBINSON, C. The effect of fluoridation and its discontinuation on fluoride profiles in the alveolar bone of rat. **Calcif Tissue Int.** v. 77, n. 4, p. 226-32, 2005.

OKADA, Y. *et al.* Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. **Lab Invest.** v. 72, n. 3, p. 311-22, Mar. 1995.

OKAMOTO, T. et al. Interference of the blood clot on granulation tissue formation after tooth extraction. Histomorphological study in rats. **Braz Dent J.** v. 5, n. 2, p. 85-92, 1994.

OKAMOTO, T.; RUSSO, M.C. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev Fac Odontol Araçatuba**, v. 2, n. 2, p. 153-69, 1973.

OPDENAKKER, G.; VAN DAMME, J. Chemotactic factors, passive invasion and metastasis of cancer cells. **Immunol Today.** v. 13, n. 11, p. 463-4, Nov. 1992.

ORTEGA, N.; BEHONICK, D.; STICKENS, D.; WERB, Z. How proteases regulate bone morphogenesis. **Ann NY Acad Sci.** v. 995, p. 109-16, 2003.

ORUC, N. Occurrence and problems of high fluoride waters in Turkey: an overview. **Environ Geochem Health.** v. 30, n. 4, p. 315–23, Aug, 2008.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 8, n. 3, p. 221-33, 2007.

PELISSARO, G.S. et al. Avaliação histológica comparativa dos efeitos de dois métodos de utilização da solução anestésica articaine 100® sobre o processo de reparo alveolar em ratos. *Revista Odontológica de Araçatuba*, v.28, n.2, p. 09-18, Maio/Agosto, 2007.

PERRI de CARVALHO, A.C.; OKAMOTO, T.; GARCIA Jr, I.R. Empregos de membranas de teflon para a reparação guiada em exodontia. **Rev Gaúcha Odont.** v. 46, n. 3, p. 127-31, Jul/Ago/Set. 1998.

QU, H.; WEI, M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behavior. **Acta Biomater.** v. 2, n. 1, p. 113–9, 2006.

QU, W.J. et al. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. **J Bone Miner Metab.** v. 26, n. 4, p. 328–34, 2008.

RAFFI, M.B.; MÉNDEZ, M.C.; RIET-CORREA, F. Estudos histomorfométrico e histológico das lesões ósseas causadas por flúor em aves. **Pesq Vet Bras.** v. 17, n. 2, p. 69-76, 1997.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.** v. 123, n. 11, p. 1939 – 51, Nov. 1993.

REICH, A. et al. Weight loading young chicks inhibits bone elongation and promotes growth plate ossification and vascularization. **J Appl Physiol.** v.98, n. 6, p. 2381-9, Jun. 2005.

- REID, I.R. et al. Addition of monofluorophosphate to estrogen therapy in postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 92, n. 7, p. 2446-52, 2007.
- REPONEN, P. et al. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. **J Cell Biol.**, v. 124, n. 6, p. 1091-1102, Mar. 1994.
- RICE, D.P.; KIM, H.J.; THESLEFF, I. Detection of gelatinase B expression reveals osteoclastic bone resorption as a feature of early calvarial bone development. **Bone**, v. 21, n. 6, p. 479-86, 1997.
- RIET-CORREA F. et al. Poluição industrial como causa de intoxicação por flúor no município de Rio Grande, RS. **Pesq Vet Bras.** v.3, n. 4, p. 107-14, 1983.
- RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption: a hypothesis. **Calcif Tiss Int.** v.33, n.4, p.349-51, 1981.
- RODAN, G.A.; MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, v. 289, p. 1508-14, 2000.
- RODRIGUES, S.O.; CARVALHO, A.C. "Bone Wax" implantation into dental sockets. Clinical and histological evaluation in patients. **J Nihon Univ Sch Dent.** v. 25, n. 4, p. 284-92, 1983.
- ROODMAN, G.D. Treatment strategies for bone disease. **Bone Marrow Transplant.** v. 40, n. 12, p. 1139-46, Dec. 2007.
- ROSEN, V.; THIES, R.S. The BMP proteins in bone formation and repair. **Trends Genet.** v. 8, n. 3, p. 97-102, 1992.
- SANTOS PINTO, R. **Mineralização no processo de reparo em feridas de extração dental em cães: Estudos histológicos, radiográficos e microscópicos.** Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, 73p. Araçatuba, 1964.
- SATO, H.; TAKEDA, Y. Proliferative activity, apoptosis, and histogenesis in the early stages of rat tooth extraction wound healing. **Cells Tissues Organs.** v.186, n. 2, p. 104-11, 2007.
- SCHINDELER, A. et al. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Semin Cell Dev Biol.** v. 19, n. 5, p. 459-66, 2008.
- SEEMAN E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. **Rheumatology (Oxford).** v. 47, n. Suppl 4:, p. iv2-8, 2008.

SELA, J.;BAB, I.A. Correlative transmission and scanning electron microscopy of the initial numeralization of healing alveolar bone in rats. **Araçatuba Anat.** v.105, p.401-8, 1979.

SHARMA, R.; TSUCHIYA, M.; BARTLETT, J.D. Fluoride Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Inhibits Protein Synthesis and Secretion. **Environ Health Perspect.** v. 116, n. 9, p. 1142-6, Sep. 2008.

SIMPSON, H.E. The healing of extraction wounds. **Br Dent J.** v. 126, n. 12, p. 550-7, 1969.

SIMS, N.A.; GOOI, J.H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Semin Cell Dev Biol.** v. 19, n. 5, p. 444-51, 2008.

SOLTANOFF, C.S.; YANG, S.; CHEN, W.; LI, Y.P. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr.** v. 19, n. 1, p. 1-46, 2009.

SOUZA, A.P.; LINE, S.R.P. The biology of matrix metalloproteinases. **Rev FOB,** v.10, n. 1, p. 1-6, 2002.

STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol.** v. 17, p. 463-516, 2001.

SUNDQUIST, K.; LAKKAKORPI, P.; WALLMARK, B.; VÄÄNÄNEN, K.L. Inhibition of osteoclast proton transport by bafilomycin A1 abolishes bone resorption. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 168, n. 1, p. 309–13, 1990.

SUZUKI, A. et al. Pharmacological topics of bone metabolism: recent advances in pharmacological management of osteoporosis. **J Pharmacol Sci.** v. 106, n. 4, p. 530-5, 2008.

TAKAHASHI, N. et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. **Endocrinology.** v. 122, n. 4, p. 1373-82, 1988.

TAMER, M.N. et al. Osteosclerosis due to endemic fluorosis. **Sci Total Environ.** v. 373, n. 1, p. 43-8, 2007.

TAVES, D.R. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. **Talanta,** v. 15, n. 10, p. 1015-23, 1968.

TEITELBAUM, S.L. Bone resorption by osteoclasts. **Science.** v. 289, n. 5484, p. 1504-8, Sep. 2000.

- THEOLEYRE, S. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 15, n. 6, p.457-75, 2004.
- TROMBELLI, L. et al. Modeling and remodeling of human extraction sockets. **J Clin Periodontol.** v. 35, n. 7, p. 630-9, 2008.
- URIST, M.R. Bone: Formation by Autoinduction. **Science**, v. 150, n. 698, p. 893-9, 1965.
- VESTERGAARD, P. et al. Effects of treatment with fluoride on bone mineral density and fracture risk--a meta-analysis. **Osteoporos Int.** v. 19, n. 3, p. 257-68, 2008.
- VU, T.H. et al. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. **Cell.** v.93, n. 3, p. 411-22, 1998.
- WADA, T. et al. RANKL- RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends Mol Med.**12(1). p.17-25, 2006..
- WALSH, M.C.; CHOI, Y. Biology of the TRANCE axis. **Cytokine Growth Factor Rev** v. 14, n. 3-4, p. 251-63, 2003.
- WANG, Y. et al. Osteoblastic cell response on fluoridated hydroxyapatite coatings. **Acta Biomaterialia.** v. 3, n. 2, p. 191-7, 2007.
- WHITFORD, G. M. The metabolism and toxicity of fluoride. **Monogr Oral Sci Rev 2 ed**, p.1-153. 1996.
- WHITFORD, G.M. Acute fluoride toxicity. In: Whitford, G.M. **The Metabolism and Toxicity of Fluoride**. 2nd ed. London: Karger Basel, cap. VII, p. 112-36, 1996.
- YAN, D. et al. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. **Bone.** v. 41, n. 6, p. 1036-44, Dec. 2007.
- YUGOSHI, L.I. et al. Histometric study of socket healing after tooth extraction in rats treated with diclofenac. **Braz Dent J.** v. 13, n. 2, p. 92-6, 2002.
- ZAMBUZZI, W.F. et al. Microscopic analisys of porous microgranular bovine anorganic bone implanted in rat subcutaneous tissue. **J Appl Oral Sci.** v. 13, n. 4, p. 382-6, 2005.

Anexos

Anexo I

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. N° 20/2006

Bauru 15 de dezembro de 2006.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado "**Avaliação da influência do flúor no reparo ósseo em alvéolos de ratos**", de autoria de Tatiana de Almeida Furlani e Marcela Mitsuko Yanai, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator aprovando o projeto foi aceito "*ad referendum*" desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no
Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO II **Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Of.CEEPA-FOB/USP N° 010/2008

Proc. N° 020/2006

Bauru, 13 de junho de 2008.

Senhor Professor,

Aprovamos "ad referendum" desta Comissão, a solicitação de Vossa Senhoria para a substituição da pesquisadora Tatiana de Almeida Furlani pelos alunos C.D. Mileni da Silva Fernandes e Ac. Lucas Shimohara, no projeto de pesquisa "Avaliação da influência do flúor no reparo ósseo em alvéolos de ratos" sendo desenvolvido sob sua orientação.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas