

MARCO ANTÔNIO DIAS DA SILVA

***INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE
DE HORMÔNIO PARATIREÓIDEO NA TAXA DE
ERUPÇÃO EM INCISIVOS E NA EVOLUÇÃO DA
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM MOLARES
DE RATOS***

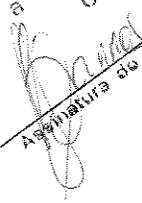
Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Histologia e Embriologia.

PIRACICABA
2003

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

MARCO ANTÔNIO DIAS DA SILVA

***INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE
DE HORMÔNIO PARATIREÓIDEO NA TAXA DE
ERUPÇÃO EM INCISIVOS E NA EVOLUÇÃO DA
DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM MOLARES
DE RATOS.***

Este exemplar foi devidamente homologado,
de acordo com a Resolução CPG-036/03,
CPG. 24/03/03.

Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Buco-Dental, área de Histologia e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Pereira Barros
Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silvana Pereira Barros
Prof. Dr. Miguel Angel Castillo Salgado
Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.
Suplente
Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

PIRACICABA
2003

DE	Be
MADAT/UNICAMP	
	Si 38i
EX	
BCI	54272
	124103
<input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
	R\$ 11,00
	14/06/03

00185234-3

0 293077

Ficha Catalográfica

Si38i

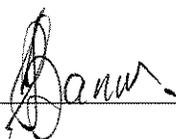
Silva, Marco Antônio Dias da.
 Influência da administração intermitente de hormônio paratireóideo na taxa de erupção em incisivos e na evolução da doença periodontal induzida em molares de ratos. / Marco Antônio Dias da Silva. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 x, 53f. : il.

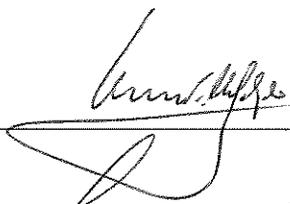
Orientadora: Profª Drª Silvana Pereira Barros.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

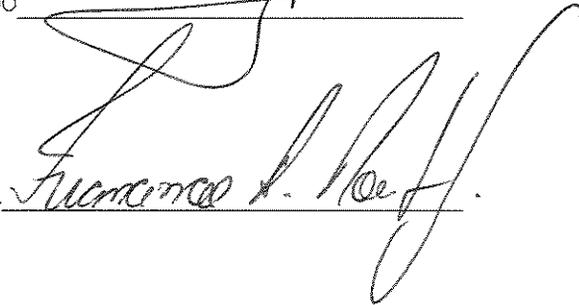
1. Periodontite. 2. Ossos – Crescimento. I. Barros, Silvana Pereira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 31 de Janeiro de 2003, considerou o candidato MARCO ANTÔNIO DIAS DA SILVA aprovado.

1. Profa. Dra. SILVANA PEREIRA BARROS 

2. Prof. Dr. MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO 

3. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR 

109073002

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **MARCO ANTONIO FREIRE DA SILVA** e **SANDRA LÚCIA GONÇALVES DIAS DA SILVA**, pelo exemplo de conduta que são, por toda dedicação que têm e por todo o tipo de incentivo que me deram ao longo de toda minha vida;

Ao meu irmão **JÚLIO LOURENÇO DIAS DA SILVA** e a todos os meus familiares pela confiança e incentivo;

À minha noiva **ANDRESA COSTA PEREIRA** pela paciência, companhia, palavras de estímulo e amor tão importantes e necessários;

Ao **PROFESSOR DOUTOR MIGUEL ANGEL CASTILLO SALGADO** por sua importante presença e amizade desde a época da minha primeira monitoria.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa de seu diretor Professor Doutor **THALES ROCHA DE MATTOS FILHO**.

Ao coordenador dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Professor Doutor **LOURENÇO CORRER SOBRINHO**.

À coordenadora do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Professora Doutora **SILVANA PEREIRA BARROS**, minha orientadora e exemplo, que muito tem me ensinado.

Aos Professores Doutor **JOSÉ MERZEL**, Doutor **SERGIO ROBERTO PERES LINE**, Doutora **DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO** e Doutor **PEDRO DUARTE NOVAES**, do departamento de morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, exemplos de dedicação ao ensino e principalmente à pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de estudo para a realização deste trabalho;

Aos professores Doutor **LUIZ ANDRÉ FREIRE PIMENTA** e Doutor **FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR.** pelas sugestões e auxílios que enriqueceram, grandemente as pesquisas elaboradas, mas especialmente a minha formação científica;

Às funcionárias do departamento de Morfologia **MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA**, **ELIENE APARECIDA O. N. ROMANI** e **SUZETE REGINA T. NEDER** pelo apoio, pela atenção e por tentarem me tornar cada vez mais organizado;

À Doutora **PAULA CRISTINA TREVILATTO**, ao amigo **RUI BARBOSA DE BRITO JR.**, à Doutora **ANA PAULA DE SOUZA** e todos os outros que tão bem me receberam tornando estes anos de trabalho conjunto mais agradáveis.

Ao aluno **MARCELO ROCHA MARQUES**, meu amigo particular e parceiro laboratorial e "etílico";

Aos alunos de graduação, **DANIEL FERNANDEZ PEREIRA VASCONCELOS**, **RODRIGO GONÇALVES** e **CRISTIANE GIBILINE**, que tanto me auxiliaram nas empreitadas, diurnas e noturnas, pelos biotérios e laboratórios da Faculdade de Odontologia de Piracicaba;

Aos alunos de Pós-Graduação **JOÃO BATISTA CÉSAR NETO, FLÁVIO RICARDO MANZI, PATRÍCIA FURTADO GONÇALVES** e **BRUNO CÉSAR DE VASCONCELOS GURGEL**, pela colaboração e sugestões de grande utilidade;

À **ÉERICA ALESSANDRA PINHO** e **SÔNIA MARIA LORDELLO**, secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pelo profissionalismo e ajuda prestada;

A todos os meus amigos que, de uma forma ou de outra, sempre fizeram o possível para passar algum tempo comigo.

O acaso encontra sempre quem saiba tirar proveito d

Romain Rolla

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Remodelação óssea	6
2.2 Erupção Dental	11
2.3 Hormônio Paratireóideo	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Animais	19
3.2 Indução da periodontite	20
3.3 Obtenção da taxa de erupção	21
3.4 Obtenção e preparo do material	23
3.5 Quantificação das células inflamatórias	25
3.6 Análises morfométricas	25
3.7 Análises estatísticas	25
4 RESULTADOS	26
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO	53

RESUMO

O hormônio paratireóideo é reconhecido por ser um agente catabólico ósseo, entretanto, quando administrado intermitentemente apresenta-se como fator anabólico ósseo. O objetivo deste trabalho foi avaliar histologicamente a influência da administração intermitente do hormônio paratireóideo (PTH) fragmento (1-34) na progressão da periodontite induzida em molares de ratos. A análise morfométrica mostrou que a administração intermitente de PTH (40µg/Kg) foi inibiu a perda óssea alveolar decorrente da indução da periodontite. Juntamente a isso foi observado um menor número de células inflamatórias na área da gengiva livre dos espécimes tratados com PTH quando comparada aos do grupo controle. Estes resultados demonstram que as injeções intermitentes de PTH promovem proteção contra a perda óssea alveolar associada a periodontite induzida em ratos. Foi analisada também a influência deste anabolismo ósseo no processo de erupção dental. Foi observada uma redução nas taxas de erupção dos incisivos inferiores dos animais tratados com PTH em diferentes condições funcionais, foi também evidenciado, por microscopia de fluorescência, um maior crescimento ósseo do osso alveolar dos animais deste grupo quando comparados ao controle. Esses resultados sugerem que o anabolismo ósseo promovido pelo PTH, administrado intermitentemente, interfere no processo de erupção dos dentes de crescimento contínuo.

ABSTRACT

Parathyroid hormone (PTH) functions as a major mediator of bone remodeling and as an essential regulator of calcium homeostasis. Intermittent PTH administration increases bone mass, and has been shown to be effective for the treatment of osteoporosis. The present study investigated the effect of intermittent doses of PTH (1-34) on ligature-induced periodontitis in rats. Morphometrical analysis showed that intermittent PTH administration (40µg/kg) was able to protect the tooth site from periodontitis-induced bone loss. In addition, there was a significant reduction in the number of inflammatory cells in the marginal gingival area in sections obtained from animals receiving PTH compared to control animals. These findings demonstrated that intermittent PTH administration was able to protect against periodontitis-associated bone loss in a rodent model. It was also analyzed such anabolic effect on the eruption rate in the rat incisors and observed a rate reduction in PTH treated animals in different functional conditions, data reinforced by fluorescence alveolar bone analysis using alizarin, suggesting that the osseous anabolism interfered in the process.

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo encontra-se sob um processo contínuo que envolve sua reabsorção e formação. Este processo acontece em cerca de um a dois milhões de locais ao longo de todo o esqueleto adulto. Os osteoclastos são células de origem hematopoiética responsáveis pela reabsorção do tecido, num processo que dura cerca de três semanas por local, enquanto que os osteoblastos derivados do mesênquima respondem pelo processo de formação óssea que leva cerca de três a quatro meses (RODAN & MARTIN, 2000). Normalmente, em adultos, os tecidos são mantidos num estado onde não existe predomínio da reabsorção ou da formação (RODAN, 1997).

A existência de numerosas doenças que resultam do desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea reforçam a importância da homeostase óssea na manutenção dos processos fisiológicos (DUCY *et al.*, 2000). Dentre as diversas doenças que afetam tecido ósseo, uma atenção especial tem sido dada na odontologia, à doença periodontal, processo inflamatório crônico associado ao desenvolvimento de certas espécies de bactérias anaeróbias facultativas localizadas subgengivalmente, que levam a perda das estruturas de suporte dos dentes, incluindo os processos alveolares (BROWN & LOE, 1993, PILOT & MIYAZAKI, 1991; BAKER, 2000). A periodontite apresenta-se como a mais prevalente doença óssea humana podendo resultar na perda dos dentes em 10 a 15% dos casos (BROWN & LOE, 1993, PILOT & MIYAZAKI, 1991). É aceito o fato de que a perda óssea, importante

conseqüência da doença periodontal, resulta da resposta imune do hospedeiro à agressão bacteriana (BAKER, 2000).

Atualmente muitas pesquisas são realizadas com o objetivo de determinar drogas que realmente controlem o processo de remodelação óssea, sobretudo quando este se encontra em desequilíbrio por conseqüência de processos patológicos como a osteoporose ou a doença periodontal entre outras (RODAN & MARTIN, 2000). Dentre as diversas drogas estudadas as derivadas do hormônio paratireóideo (PTH) têm merecido uma atenção especial, não só por se apresentarem como excelentes inibidoras da reabsorção óssea como também por proporcionarem um potente efeito anabólico tanto em ossos corticais como trabeculares, quando administradas de forma intermitente (TAM *et al.*, 1982; PODBESK *et al.*, 1983 e HOCK & GERA, 1992; MORLEY *et al.*, 1997; BIKLE *et al.*, 2002; DEMIRALP *et al.*, 2002; RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

Também dependente do balanço reabsorção/neoformação óssea está o processo de erupção dental.

A erupção dentária (fase intra-óssea) corresponde a um processo fisiológico dependente da relação entre formação e reabsorção óssea no qual osteoclastos, formados a partir de um influxo de monócitos, irão reabsorver o osso peridental formando um caminho para erupção do elemento dental em formação (CIELINSKI & MARKS, 1994; WISE & FAN, 1989). Recentemente foi demonstrado que dentes incisivos de ratos, que apresentam crescimento contínuo mostram, na fase intra-oral, predominância de reabsorção na crista óssea adjacente ao periodonto relacionado ao esmalte e de formação óssea na área

adjacente ao ligamento periodontal (GERLACH *et al.*, 2002), sugerindo que as diferentes taxas de formação/reabsorção poderiam influenciar e até supostamente guiar o processo de erupção dentária.

Considerando o potencial anabólico do PTH e a influência dos fatores pró-inflamatórios envolvidos no processo de perda óssea alveolar, característico da doença periodontal, neste estudo nos propusemos a avaliar a influência da administração intermitente de PTH (1-34) na taxa de erupção de dentes incisivos de crescimento contínuo e na progressão da doença periodontal induzida, em molares de ratos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Remodelação óssea

O tecido ósseo normal, incluindo o osso alveolar, é continuamente remodelado por meio de um processo baseado no equilíbrio entre a reabsorção osteoclastica e a deposição osteoblástica (BAKER, 2000). Na remodelação óssea, os osteoclastos atuam reabsorvendo o osso antigo e os osteoblastos depositando componentes da matriz óssea (colágeno I, proteoglicanas e glicoproteínas), conhecida como osteóide, que ao se calcificar dá origem a um novo osso (RAISZ, 1988; MARIE, 1995). Durante este processo osteoclastos e osteoblastos se diferenciam a partir de precursores menos maduros, os quais se encontram na superfície dos ossos em estado inativo (BROWN, 1993; NAIR, 1996), no caso dos osteoblastos, ou possuem origem sanguínea, no caso dos osteoclastos (HALL & CHAMBERS, 1996; WIEBE *et et al.*, 1996; HOFBAUER & HEUFELDER, 1998; ROODMAN, 1999; YASUDA, *et al.*, 1999). Entretanto a atividade osteoclastica encontra-se sob controle dos osteoblastos (MARTIN & NG, 1994), sendo que fatores como a 1,25 dihidroxivitamina D₃, prostaglandina E₂ e o PTH, que podem induzir reabsorção óssea, atuam sobre os osteoblastos e células mesenquimais, fazendo com que estas células expressem na superfície celular, moléculas conhecidas como receptor ativador do ligante NF- κ (RANK). Uma vez expressado o ligante RANK (RANKL) se liga ao RANK, um receptor de membrana existente nas células precursoras de osteoclastos, estabelecendo contato célula-célula (HOFBAUER & HEUFELDER, 1998; ROODMAN, 1999). Este

processo desencadeia a diferenciação e união das células precursoras em células gigantes multinucleadas, os osteoclastos (WIEBE *et al.*, 1996). PTH também estimula a diferenciação de células mesenquimais em pré-osteoblastos, e por meio de um processo indireto, dos pré-osteoclastos em osteoclastos (BROWN, 1993).

Os osteoclastos diferenciados embora prontos para efetuar a reabsorção óssea necessitam que os osteoblastos, liberem colagenase, removam da matriz osteóide, que recobre os ossos (NAIR, 1996). Este processo é quimiotático para os osteoclastos, e a exposição dos cristais de hidroxiapatita permite que os osteoclastos, agora ativados, se fixem e formem suas características bordas em escova ao longo da superfície de adesão. Assim que se aderem à superfície óssea os osteoclastos passam a produzir uma enzima conhecida como anidrase carbônica tipo II, esta enzima promove a geração de prótons, os quais são transportados através da membrana da borda em escova por uma bomba próton/ATPica. O aumento da concentração destes prótons no microambiente gerado pelo osteoclasto promove uma diminuição do pH local, o que resulta na dissolução da hidroxiapatita que se encontra recobrindo superfícies (MUNDY, 1991). A remoção da matriz orgânica dos ossos é dada pelas enzimas lisosomais secretadas pelos osteoclastos (HALL & CHAMBERS, 1996).

A fase de reabsorção dura cerca de dez dias, e a ela se seguem muitos meses de formação óssea. Ao término de sua função os osteoclastos são rapidamente substituídos por osteoblastos. Acredita-se atualmente que a presença da reabsorção óssea de uma determinada região seja inibida pela liberação de mediadores químicos e fatores de

crescimento presentes na matriz (MARTIN & NG, 1994). Os pré-osteoblastos são atraídos por mediadores químicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformador β (TGF β), proteína morfogenética óssea (BMP), fator de crescimento fibroblástico (FGF) e fatores de crescimento ligados à insulina (IGF) I e II, dentre outros, que também induzem sua proliferação e diferenciação em osteoblastos. Os pré-osteoblastos, mais tarde, então se diferenciam em osteoblastos. Os osteoblastos depositam uma matriz protéica, conhecida como osteóide, composta de colágeno tipo I e substâncias não colágenas dentre as quais PDGF, TGF β , BMP, FGF e IGF, já citados anteriormente, além de proteoglicanas, osteocalcina e osteopontina. Por serem componentes da matriz óssea são liberados no meio quando da reabsorção deste tecido pelos osteoclastos, fazendo com que o próprio processo de reabsorção óssea determine automaticamente a reposição do tecido (MUNDY, 1991).

Ao longo do processo de deposição e calcificação da matriz óssea os osteoblastos podem enterrar-se na matriz óssea, tornando-se osteócitos, reverter-se em uma célula inativa e recobrir as superfícies dos ossos como osteoblastos de superfície (osteoblastos inativos) ou ainda se manter como osteoblastos (RAISZ & KREAM, 1983). Estes osteoblastos ao receberem estímulos, intra ou extracelulares, liberam RANKL que acabam por ativar as células precursoras de osteoclastos, fazendo assim com que esse processo torne-se cíclico e dependente da atuação destes dois tipos celulares (MARTIN & NG, 1994).

Outros fatores reguladores da remodelação óssea são as citocinas (ação local) (CANALIS *et al.*, 1988). As citocinas inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), bem como as endotoxinas e lipopolissacarídeos (LPS), ambos de origem bacteriana, têm demonstrado exercer efeitos complexos na regulação do processo de remodelação óssea (KONDO *et al.*, 2001). LPS foi o primeiro componente bacteriano identificado como capaz de induzir reabsorção óssea *in vitro* além disso tem sido demonstrada também sua capacidade de estimular osteoblastos a secretar IL-1, IL-6 e prostaglandina E₂ (KONDO *et al.*, 2001; ZOU & BAR-SHAVIT, 2002). Um processo patológico que é fortemente influenciado pela ação não só das citocinas como também dos produtos bacterianos é a doença periodontal. É caracterizada como um processo crônico inflamatório, associado com o crescimento subgengival de certas espécies de bactérias anaeróbias facultativas, que levam a eventual perda das estruturas de suporte dos dentes, incluindo os processos alveolares, se apresenta como a mais prevalente doença óssea humana e apresenta gravidade tão alta que 10 a 15% resultam em perda dentes (BROWN & LOE, 1993, PILOT & MIYAZAKI, 1991).

Sabe-se que a maioria das bactérias não invade os tecidos periodontais, sendo assim aceito o paradigma de que a periodontite se dá pela liberação de fatores de virulência bacterianos solúveis (WILSON *et al.*, 1996). Embora existam algumas evidências da ação direta das bactérias periodontais nas células ósseas existem muitas mais apontando seus efeitos indiretos. A infecção leva a diversas respostas imunes do hospedeiro, provocando a liberação de uma série de citocinas pelas células imunes, as quais atuarão sobre as células ósseas regulando o metabolismo tecidual (BAKER, 2000). As bactérias subgengivais

também ativam linfócitos T específicos (GEMMELL *et al.*, 1997) e estes quando ativados podem promover osteoclastogênese (KONG *et al.*, 1999; HORWOOD *et al.*, 1999). Sendo assim é atribuído à resposta imune do hospedeiro, à agressão bacteriana, a perda óssea uma das conseqüências da doença periodontal (BAKER, 2000).

Os produtos de origem bacteriana trabalhando sinergisticamente com as citocinas liberadas das células imunes e do tecidos promovem uma ampliação do quadro inflamatório. Um exemplo deste mecanismo está descrito num estudo onde foi observado que a presença do LPS aumentou a expressão de PGE₂ e interleucina 1-β pelos fibroblastos gengivais, acarretando numa maior destruição do ligamento periodontal bem como do osso alveolar (OKAMURA *et al.*, 1999). Outros estudos afirmam que as LPS estimulam outras células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliais a produzir citocinas (MANTHEY & VOGEL, 1994) capazes de induzir osteoblastos a secretar uma série de fatores osteolíticos, como IL-1 (HANAZAWA *et al.*, 1987; KEETING *et al.*, 1991), IL-6 (ISHIMI *et al.*, 1990; LITTLEWOOD *et al.*, 1991), fator estimulante de colônia (HOROWITZ *et al.*, 1989), prostaglandina E₂ (ISHIHARA *et al.*, 1991) e óxido nítrico (BRANDI *et al.*, 1995; RIANCHO *et al.*, 1995).

Contudo, independentemente de sua origem, a grande maioria dos fatores de modulação óssea atua sobre os osteoblastos, e estes por sua vez acabam por exercer controle sobre os osteoclastos (MARTIN & NG, 1994).

2.2 Erupção Dental

A erupção dental é um complexo processo que, apesar de já ter sido exaustivamente estudado, permanece pobremente explicado. É aceito atualmente como um processo multifatorial, no qual qualquer mudança em um ou mais destes fatores resulta em mudanças em todo o processo.

Para que um dente erupcione deve existir não só um mecanismo que seja responsável pela geração das forças de extrusão como também um processo através do qual estas forças promovam um movimento do elemento dental através dos tecidos circunjacentes. Ocorrem diversas mudanças tanto nos tecidos peridentais quanto no elemento dental em erupção antes de seu aparecimento na cavidade oral (TEN CATE, 1971; CAHILL & MARKS, 1980, 1982; GORSKI *et al.*, 1988), e a dinâmica deste processo pode ser afetada por fatores ligados à resistência dos tecidos circundantes (BURN-MURDOCH, 1990b). Acredita-se também que deva existir um processo através do qual os movimentos eruptivos suportem o dente em sua nova posição além de uma remodelação dos tecidos periodontais para que seja mantida a integridade funcional de todo o sistema.

No início dos anos 90 Irie e Ozawa (1990) demonstraram que existe uma reabsorção óssea contínua na face labial (periodonto relacionado ao esmalte) e uma formação óssea muito ativa na face lingual (ligamento periodontal) em incisivos de ratos. Recentes estudos, em tecidos peridentais de dentes de crescimento contínuo, demonstraram que lesões localizadas no periodonto relacionado ao esmalte causam um variável período de retardo no

processo de erupção e em alguns casos até a cessação temporária do movimento eruptivo, enquanto que lesões similares no ligamento periodontal não surtiram efeito algum (MERZEL, *et al.*, 2000). Estas observações levaram a conclusão de que o folículo dental (incluindo o órgão do esmalte) representa um papel essencial no processo de erupção, não só na fase intra-óssea (GORSK & MARKS, 1993) mas também na fase supra-óssea, que se apresenta contínua em incisivos de roedores devido à presença contínua de um órgão odontogênico (GERLACH *et al.*, 2002).

A importância da resistência dos tecidos se comprova à medida que estudos demonstram que drogas anti-reabsorção ou deficiências nos osteoclastos reduzem fortemente as taxas de erupção (COTTON & GAINES, 1974; IIZUKA *et al.*, 1992; GRIER & WISE, 1998). A presença da reabsorção do osso alveolar é indispensável para o processo de erupção dental (GRIER & WISE, 1998) e a resistência dos tecidos peridentais é um fator fundamental no controle de todo o processo (BURN-MURDOCH, 1990b).

Além disso a diferenciação e ativação de osteoclastos, influenciada dentre outros fatores pelo PTH, também vêm sendo relacionadas com a erupção dental (CIELINSKI & MARKS, 1994; WISE & FAN, 1989). Estes processos dependem da diferenciação e fusão das células mononucleares (precursoras de osteoclastos), que são devidas à ligação dos seus receptores de membrana (RANK) ao fator de diferenciação osteoclástica (RANKL), liberado pelos osteoblastos (YASUDA *et al.*, 1998; LACEY *et al.*, 1998). O “osteoprotegerin”, uma glicoproteína, também conhecida como fator de inibição osteoclástica, atua como um receptor para RANKL (SIMONET *et al.*, 1997; TSUDA *et al.*,

1997; YASUDA *et al.*, 1998) e é liberado constantemente pelas células do folículo dental (WISE *et al.*, 2000). Entretanto, seu nível de expressão é reduzido em momentos críticos da erupção, como durante o influxo de monócitos e formação de osteoclastos que irão determinar o caminho para a erupção (CIELINSKI & MARKS, 1994; WISE *et al.*, 1989).

2.3 Hormônio Paratireóideo

Muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de encontrar drogas que realmente controlassem a estabilidade estrutural óssea, porém a maioria dos estudos (sobretudo no que diz respeito à osteoporose) é baseada em agentes inibidores de reabsorção óssea relacionados ao estrogênio, a calcitonina e aos bifosfonatos (MORLEY *et al.*, 1997). Todavia o que se busca, realmente, é uma substância que atue não só inibindo a reabsorção mas promovendo também a formação óssea. Dentre os efeitos apontados como características dos agentes anabólicos ósseos estão produção aposição periosteal e endosteal, redução das porosidades intracorticais, aumento da quantidade e espessura de tecido trabecular e manutenção destas mudanças depois de parada à administração da droga (SEEMAN & DELMAS, 2001). A partir da segunda metade da década passada ocorreu um grande aumento no número de estudos baseados na busca de drogas com as características citadas acima, dos quais a metade é baseada em agentes derivados do fator de crescimento ligado à insulina (IGF-I) e principalmente, ao hormônio paratireóideo (PTH) (GRUBER *et al.*, 1995; STANISLAUS, 2000; MIYAKOSHI, *et al.*, 2001; BIKLE, *et al.*, 2002; MEUNIER, 2001).

O hormônio paratireóideo (PTH), o maior controlador do metabolismo orgânico do cálcio e do fósforo (STREWLER, 1987), organiza, por meio da remodelação óssea, o fluxo destes minerais nos ossos e rins (HABENER *et al.*, 1984; SWARTHOUT, 2001). Nestes tecidos PTH interage com um receptor de superfície celular específico, o PTH/PTHrP receptor (ou PTHR1) (CALVI *et al.*, 2001; WHITFIELD *et al.*, 2002), que pertence à família dos receptores de superfície associados à membrana que possui sete receptores transmembrana associados a proteínas G (JÜPPNER *et al.*, 1991). O PTH um hormônio peptídico sintetizado pelas quatro glândulas paratireóides (BROWN, 1993) é originado de um pré-hormônio (prepro-PTH), constituído de 115 aminoácidos (aa) com peso molecular de ~9.5 kDa, que após duas clivagens (encontra-se com 90 aa) é transportado para o complexo de Golgi, onde será mais uma vez clivado, adquirindo sua forma final (84 aa) (STREWLER *et al.*, 1987; SPIEGEL & MARX 1983; GENUTH, 1998; MARTIN & GONZALEZ, 2001; SWARTHOUT *et al.*, 2002). As moléculas deste hormônio são guardadas e maturadas em vesículas de exocitose e, uma vez lançadas na circulação, atingem um nível plasmático normal de 30 pg/ml (GENUTH, 1998), sendo inativadas nos rins e fígado.

O nível normal de cálcio no plasma é de 8,6 a 12,6 mg/dL, (metade deste se encontra livre, ou ionizado e a outra metade ligado à albumina). Nesta condição existe uma pequena secreção de PTH. Do aumento dos níveis plasmáticos de cálcio resulta a diminuição da síntese de prepro-PTH, o aumento da degradação do PTH e redução das taxas de proliferação das células da paratireóide. Por outro lado uma diminuição provoca

aumento dos níveis de adenosina mono fosfato cíclica (cAMP) gerando liberação das vesículas de excreção, estas mudanças ocorrem segundos após as alterações dos níveis de cálcio livre. Além do dos níveis de cálcio a secreção de PTH é também controlada diretamente pela vitamina D e pelo magnésio e, indiretamente, pelo fosfato. Embora todos os efeitos do PTH dependam da presença da vitamina D (1,25-(OH)₂-D₃) quando aumentada inibe a transcrição do gene para prepro-PTH, diminui a secreção de PTH e a proliferação das células da paratireóide. Embora com menor efetividade, o magnésio mimetiza os efeitos do cálcio, níveis elevados deste mineral inibem a secreção do PTH. Entretanto a presença crônica de níveis baixos de magnésio inibem tanto a síntese quanto a resposta do PTH nos tecidos alvos. Aumentos nos níveis de fosfato diminuem os níveis de cálcio livre e também a produção de vitamina D, reduzindo a estimulação da liberação de PTH, mas, o fosfato não influencia diretamente a secreção de PTH. Outro fator que deve ser considerado é que qualquer sinal de elevação dos níveis de cAMP, epinefrina (através dos receptores β) ou inibidores de fosfodiesterase (caféina), irá aumentar a secreção de PTH, inversamente a esses fatos sinais de diminuição, norepinefrina (através dos receptores α), funcionaram de maneira contrária.

PTH circula livre no plasma e possui um tempo curto de vida média (10 a 20 min) (GENUTH, 1998), o que provoca mudanças rápidas nos níveis plasmáticos. O PTH atua através de dois diferentes receptores plasmáticos de membrana, ambos com aumento dos níveis de cAMP nas células alvo, sendo assim os efeitos do PTH podem ser mimetizados pelo aumento dos níveis de cAMP causados por outras fontes. Independentemente dos

níveis de cAMP, a união do PTH aos receptores provoca um influxo de cálcio nas células alvo, que paradoxalmente diminui os níveis plasmáticos de cálcio.

Os ossos e os rins são considerados locais de atuação primária do PTH (BROWN, 1993) e pequenas diminuições nos níveis plasmáticos de cálcio induzem sua secreção, gerando uma rápida resposta que resulta no aumento dos níveis séricos de cálcio por ação direta dos rins e ossos e indireta do intestino através da vitamina D que facilita absorção de cálcio (POTTS *et al.*, 1997; SILVERBERG *et al.*, 1999). Os efeitos iniciais do PTH nos ossos são remoção do cálcio da matriz óssea recém depositada pelos osteoblastos. Este processo não destrói a matriz óssea e não remove muito fósforo, mas, possui uma pequena capacidade de estabilizar os níveis de cálcio desta região. Com o decorrer do processo modifica tanto a função quanto o fenótipo dos osteoblastos, transformando-os de células promotoras de aposição para promotoras de reabsorção óssea (PARTRIDGE *et al.*, 1994). Os efeitos mais lentos do PTH são adesão aos receptores dos osteoblastos, que liberam de maneira parácrina fatores que irão estimular osteoclastos a degradar o osso existente, estimulando o aumento dos níveis plasmáticos de cálcio e fósforo e liberação de hidroxiprolina e hidroxilisina (aminoácidos hidroxilados encontrados somente no colágeno) no plasma e urina. Em último estágio o PTH estimula indiretamente a proliferação de osteoclastos, aumenta a liberação de cálcio dos ossos gerando uma diminuição da massa e para que ocorram todos os efeitos biológicos são necessários somente os resíduos 1-34, sendo que os resíduos 1-7 respondem pelos domínios da adenil ciclase e 28-34 pelo domínio da atividade PKC/mitogênica (DEMPSTER *et al.*, 1993).

Descobriu-se, na década de 30, que injeções intermitentes de extratos da glândula paratireóide produziam ossos mais fortes em ratos (SELYE, 1932). Apesar disto, em virtude da única via de administração ser a injetável, associada às dificuldades econômicas na obtenção de grandes quantidades deste peptídeo além da incapacidade das companhias farmacêuticas em patenteá-los, existiu um grande atraso no aparecimento de estudos que buscassem ampliar os conhecimentos e as utilizações das características anabólicas do PTH (KIMMEL *et al.*, 1994).

Atualmente superados estes obstáculos, o PTH tem se tornado o foco da atenção de diversas pesquisas farmacêuticas e acadêmicas envolvendo drogas anabólicas (BIKLE *et al.*, 2002; DEMIRALP *et al.*, 2002; RUBIN *et al.*, 2002). Novas substâncias patenteáveis foram desenvolvidas, diversas delas compostas por fragmentos análogos ao PTH. Estes fragmentos apresentam-se mais efetivos, oferecem menores efeitos colaterais e podem também ser administrados por outras vias que não a injetável (MORLEY *et al.*, 1997) além de prevenir, suspender ou parcialmente reverter o processo de perda óssea em animais de laboratório e seres humanos (DEMPSTER *et al.*, 1993).

Dos diversos análogos do PTH o fragmento hPTH (1-34) se apresenta como o mais efetivo no aumento da densidade óssea, da força mecânica e diminuição da circunferência endosteal (MORLEY *et al.*, 1997, MOHAN *et al.*, 2000). O fragmento PTH (1-34) compreende os primeiros 34 aminoácidos do hormônio produzem seus principais efeitos biológicos (NEER *et al.*, 2001). Também é considerado também o mais efetivo quando comparados com outros inibidores de reabsorção óssea como alendronato, residronato,

etidronato e raloxifeno (NEER *et al.*, 2001). Foi relatado, ainda, que o PTH (1-34) não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (MORLEY *et al.*, 1997; MOHAN *et al.*, 2000; NEER *et al.*, 2001) ou qualquer outro efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes, tratados com PTH (1-34) por 3 anos (HORWITZ *et al.*, 2000).

Entende-se que o PTH regula a formação e reabsorção óssea, podendo aumentar ou diminuir a massa óssea dependendo do modo como é administrado, onde a infusão contínua que aumenta a concentração sérica do PTH, provoca uma grande reabsorção óssea, difere da intermitente, que provoca apenas um aumento temporário da concentração de PTH no soro e resulta no aumento da massa óssea (TAM *et al.*, 1982; PODBESK *et al.*, 1983 e HOCK & GERA, 1992, KROLL, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, inicialmente com três semanas de idade, adquiridos junto ao CEMIB-UNICAMP, que permaneceram no biotério central da Faculdade de Odontologia de Piracicaba durante uma semana, em gaiolas plásticas (5 animais/gaiola) (fig. 1) para ambientação. Os animais receberam ração (Nuvital[®], Paraná/Br) e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

Os procedimentos realizados neste experimento foram avaliados e considerados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP (Protocolo nº 334-2) (Anexo).



Fig. 1-Ratos Wistar - Biotério - FOP-UNICAMP

3.2 Indução da Periodontite

No início do período experimental os animais receberam injeções intramusculares do anestésico Ketamina[®] (1ml/Kg) e do relaxante muscular Virbaxil[®] (0,7mg/Kg).

Em seguida, para a indução da doença periodontal, ligaduras de algodão (fig. 2) foram posicionadas intrasulcularmente, ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, sendo os dentes homólogos deixados sem ligadura como controle interno do experimento (grupo N).

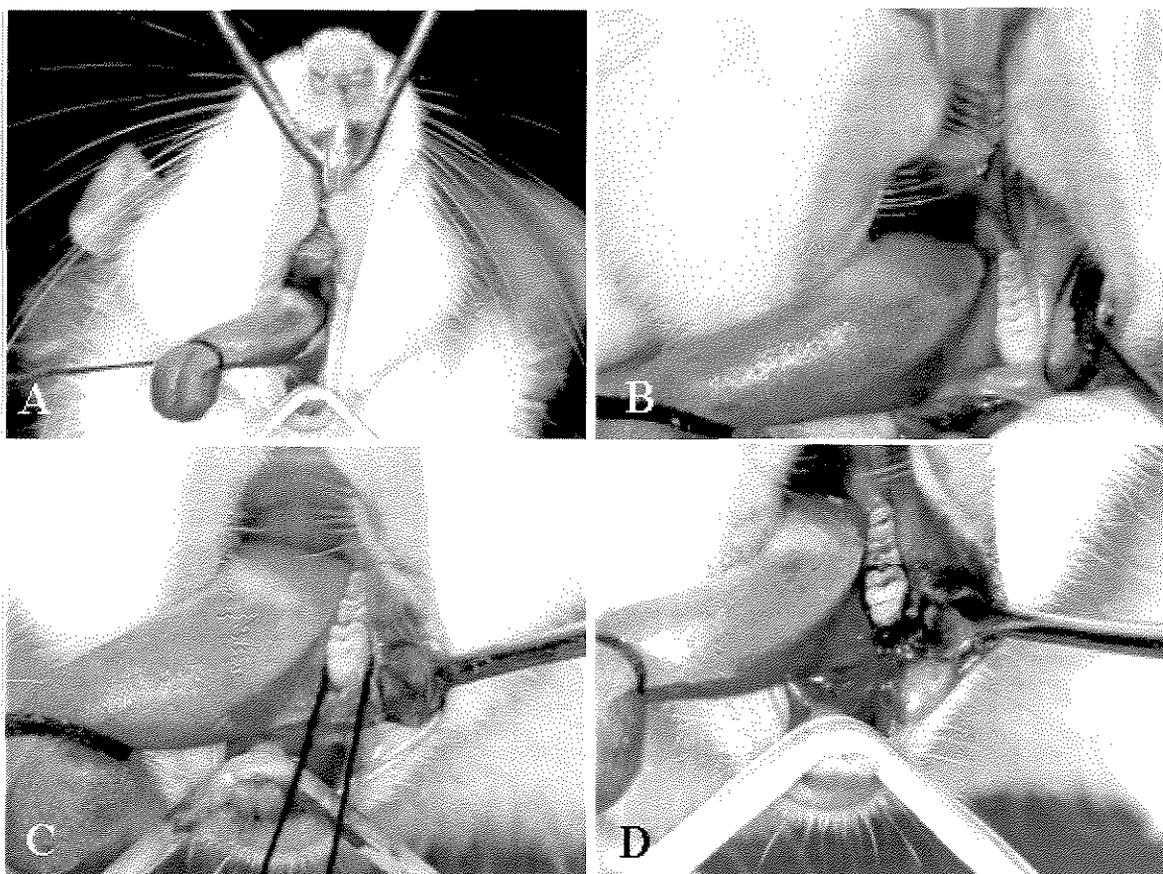


Fig.2 – A - Animal anestesiado, preparado para colocação da ligadura com fio de algodão; B - Visualização do campo; C - posicionamento do fio de algodão; D - Fio de algodão posicionado ao redor do primeiro molar inferior esquerdo.

Após 3 dias da indução da periodontite os animais foram separados, aleatoriamente, em grupos controle (C) e tratado (T) sendo que ao grupo T foi administrados 40µg/Kg de solução hormônio paratireóideo humano (hPTH) fragmento (1-34) (Sigma-Aldrich CO., St. Louis, MO, USA) e ao grupo C a mesma dose de solução de ácido acético 1% (veículo), subcutaneamente, 3 vezes por semana (Nakajima *et al.*, 2000; Iwaniec *et al.*, 2001; Hagino *et al.*, 2001), durante 4 semanas.

3.3 Obtenção da taxa de erupção

Para verificação das taxas de erupção, dez animais de cada um dos grupos tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados na altura da papila gengival, com auxílio de broca diamantada em caneta de alta rotação, a cada dois dias (fig. 3) de modo que fossem mantidos livres de contato oclusal, sendo considerados desimpedidos ou hipofuncionais. Nos incisivos inferiores direitos foram realizadas, apenas como referência, marcas superficiais na face coronária, com o mesmo instrumento, também na altura da papila gengival (fig. 3B) e, devido à manutenção do contato oclusal foram considerados como dentes impedidos ou hiperfuncionais (Steigman *et al.*, 1989). Em outros cinco animais de cada um dos grupos foram realizadas apenas as marcas superficiais, na face coronária, de ambos incisivos, também na altura da papila gengival e, por isso, considerados normofuncionais.

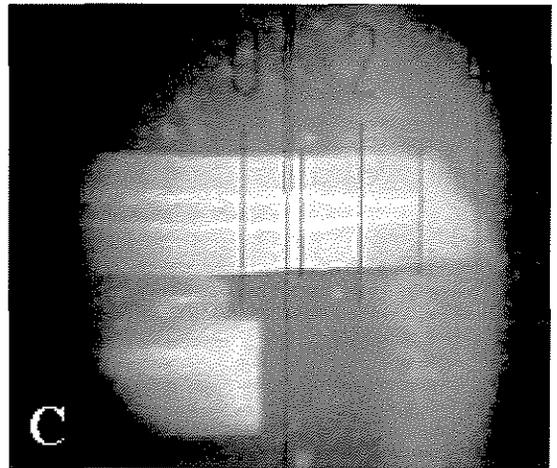


Fig. 3 - A - Registro e desocclusão dos incisivos;

B - Desocclusão na altura da papila interdental; C - Marca na altura da papila imagem observada em lente graduada estereoscópica, ampliação 10x (área clara indicada na seta).

Uma lente graduada, posicionada em lupa estereoscópica (fig. 4A) foi utilizada para as medições sob um aumento de 10x. O crescimento dos incisivos era aferido três vezes por semana, durante todo o período do experimento. Nos dentes hipofuncionais foi medida a distância existente entre a borda mais incisal do dente e a borda da papila interdental e nos

hiper e normofuncionais, da marca realizada na face coronária do dente à borda da papila interdental, de modo que fosse possível verificar o crescimento dental de cada grupo.

Para permitir a verificação do crescimento do tecido ósseo adjacente ao elemento dental os animais recebiam injeções intraperitoneais de 30 mg/Kg de alizarina (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA), em três momentos diferentes: nos dias 3, 16 e 29 a partir do início do período experimental e as amostras do material foi examinada através de microscopia de fluorescência (Leica DM/LP[®], Alemanha). A solução de alizarina foi preparada diluindo-se

3.4 Obtenção e preparo do material

Completadas as 4 semanas de tratamento os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas mandíbulas removidas. O material foi, então, fixado em formol 4%, pH 7,4 durante 24 horas. Em seguida a região incisal foi seccionada com disco de diamante para análise em microscópio de fluorescência a região correspondente aos dentes molares foi descalcificada em EDTA 5% por 72 dias, com troca diárias da solução. Esquematicamente as hemimandíbulas foram então separadas em cinco regiões R1, e R2 consideradas porção incisal e regiões R3, R4 e R5 (fig. 4B). A região R1 foi incluída em resina e desgastada, para obtenção de cortes semifinos de 30 a 50µm e análise sob luz fluorescente.

As regiões de molares passaram por desidratação em soluções crescentes de álcool etílico (50, 70, 80, 90, 95 e absoluto), diafanização em xilol (três banhos de 20 min) e infiltração e inclusão em paraplast. Após o preparo dos blocos foram realizados cortes semi-seriados de aproximadamente 6µm de espessura em micrótomo Leica RM 2155, Alemanha.

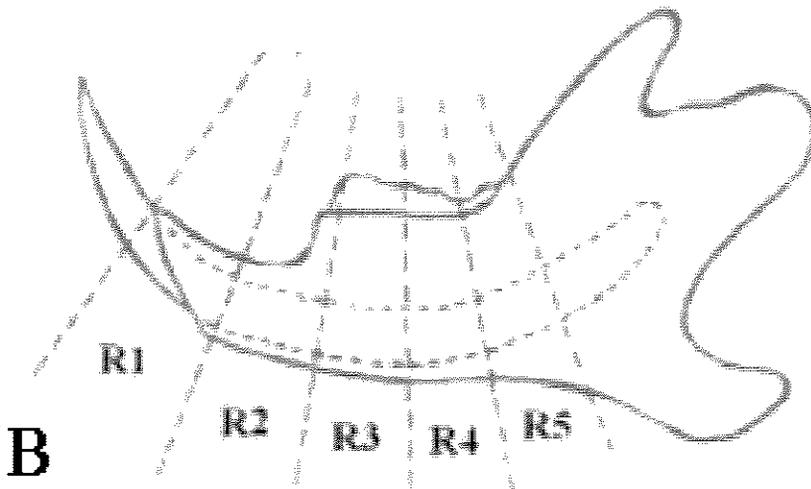
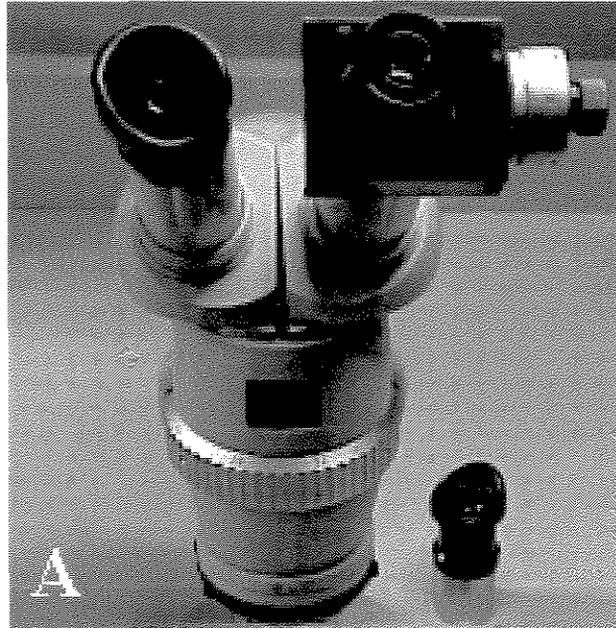


Fig. 4 – A - Lente estereoscópica e lente graduada; B - Desenho esquemático de uma hemi-mandíbula, de rato,

mostrando as regiões de corte (R1, R2, R3, R4 e R5).

3.5 Quantificação de células inflamatórias

A porcentagem de células inflamatórias foi calculada usando o sistema de análises de imagem Zeiss e o programa KS 400 (Kontron Elektron GmbH, Eching, Alemanha). Para contar o número de células inflamatórias entre o total de células presentes na gengiva livre foram escolhidas aleatoriamente áreas próximas do epitélio do sulco gengival, nas quais foram contados 100 núcleos sob uma ampliação de 400x.

3.6 Análises Morfométricas

As amostras de R3, região do primeiro molar inferior, foram coradas com H.E. e analisadas sob microscopia de luz, sendo que a área existente entre a dentina e o osso alveolar, na região de furca, foi aferida por meio de um software analisador de imagens (Image-Pro[®]; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Já as amostras desgastadas de R1 foram digitalizadas com uma câmera Samsung SCC-131 instalada num microscópio de luz fluorescente e analisadas usando o programa de análise de imagens KS 400 (Kontron Elektron GmbH, Echingen, Alemanha) (Fig. 9).

3.7 Análises estatísticas

Os resultados a partir dos volumes de ligamento periodontal, das regiões intraósseas delimitadas pelas marcas de alizarina e das medidas da erupção dental, aferidas três vezes por semana, calculadas para cada grupo (normo, hipo e hiperfuncionais) foram submetidos aos testes ANOVA ONE WAY e TUKEY.

4 RESULTADOS

O volume ósseo aferido na área de furca de molares do grupo T (fig. 7) não mostrou diferença quando comparado aos molares não ligados (grupo N) (fig. 5). Contudo, quando comparado com o grupo C (fig. 6), que apresentou perda óssea, demonstrou-se significativamente diferente ($p < 0,01$) (Gráfico 1).

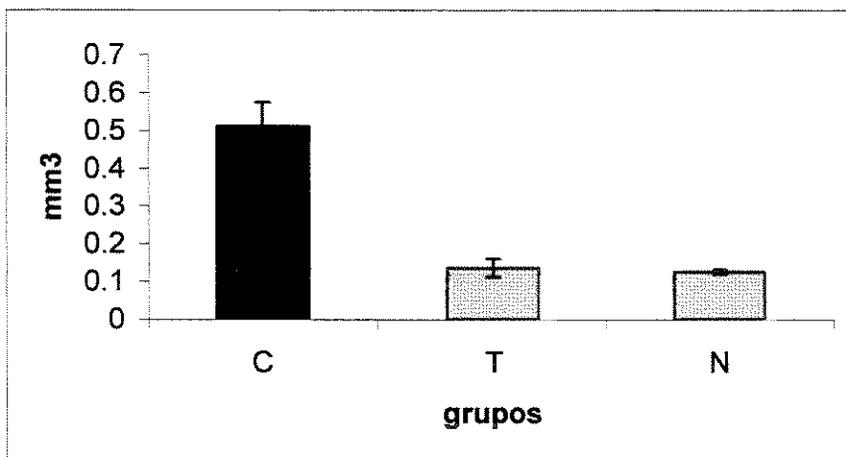


Gráfico 1 – Médias e desvio padrão do espaço existente na região de furca (região entre o cimento e o osso alveolar). C: grupo controle ligado; T: grupo tratado ligado; N: controle sem ligadura. Barras de cores diferentes significam presença de diferença estatística.

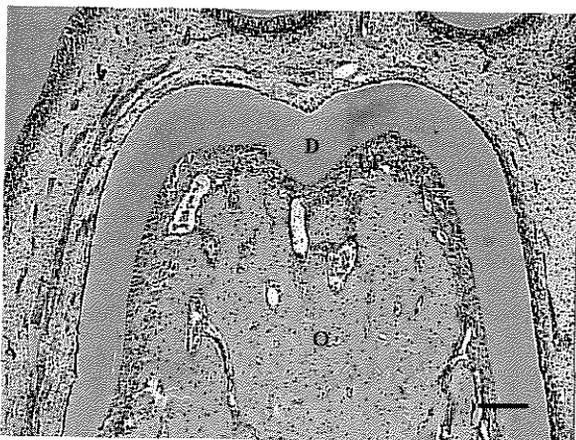


Fig. 5 - Fotomicrografia da região de furca de molar inferior sem ligadura (grupo N): periodonto normal.**

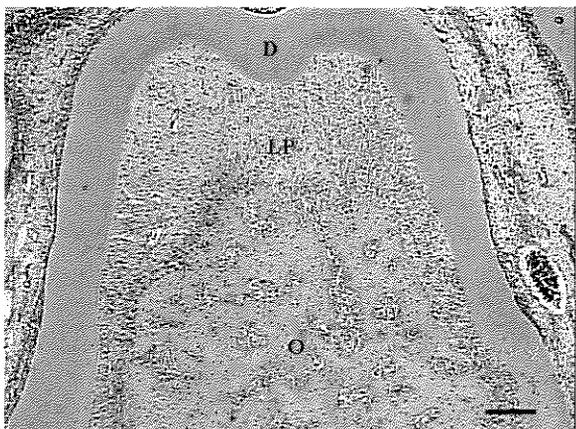


Fig. 6 - Fotomicrografia da região de furca de molar inferior ligado (veículo) (grupo C): perda óssea.**

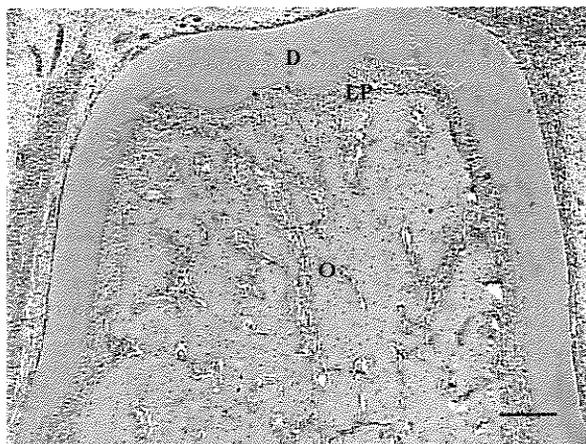


Fig. 7 - Fotomicrografia da região de furca de molar inferior ligado (grupo T) (40 mg/Kg PTH (1-34): sem perda óssea.**

**LP – Ligamento Periodontal; D – Dentina; O – Osso Alveolar. Barra 200 μ m.

As taxas de erupção do grupo T, apresentaram uma redução progressiva em todas as condições avaliadas ($p < 0,01$) (Gráficos 2, 3 e 4).

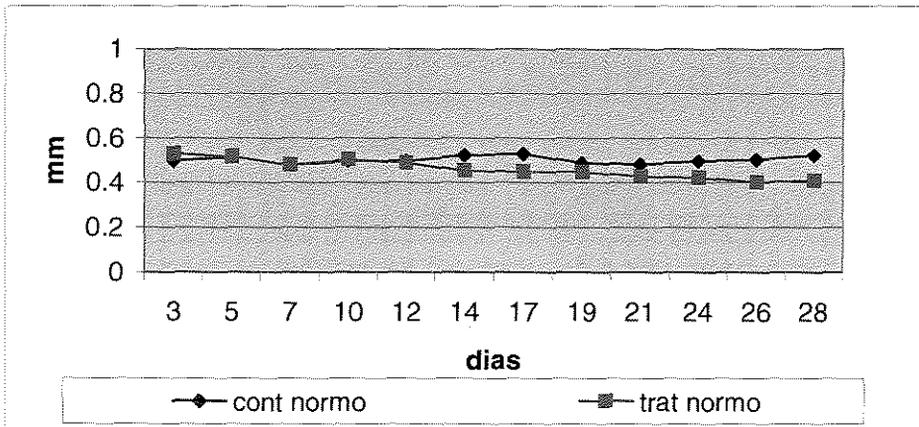


Gráfico 2 – Dentes normofuncionais Tratado-PTH e Controle .

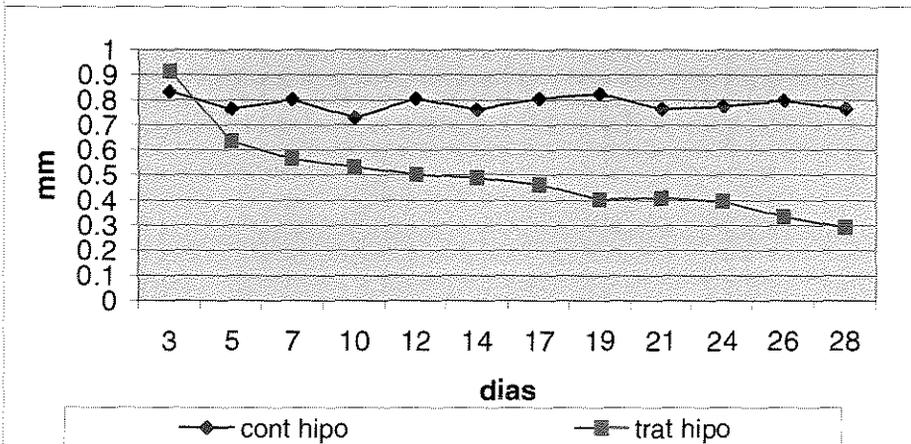


Gráfico 3 – Dentes hipofuncionais Tratado-PTH e Controle .

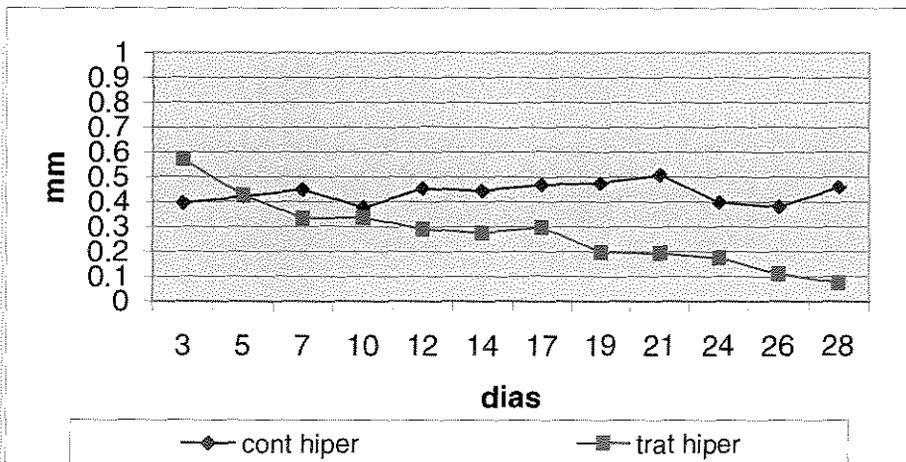


Gráfico 4 – Dentes hiperfuncionais Tratado - PTH e Controle .

Pela observação da região R1 sob luz fluorescente pudemos evidenciar áreas de formação óssea junto à região do ligamento periodontal. Os maiores valores obtidos foram os dos dentes impedidos e, em seguida, os dos desimpedidos e normais (figs. 6A, 6C e 6E). Foi também observada uma maior quantidade de tecido ósseo neoformado nos grupos tratados com PTH (fig. 6B, 6D e 6F). Além disso, as três marcas criadas pela alizarina no tecido ósseo só puderam ser evidenciadas, com total clareza, no grupo de dentes impedidos tratado com PTH (fig. 6F).

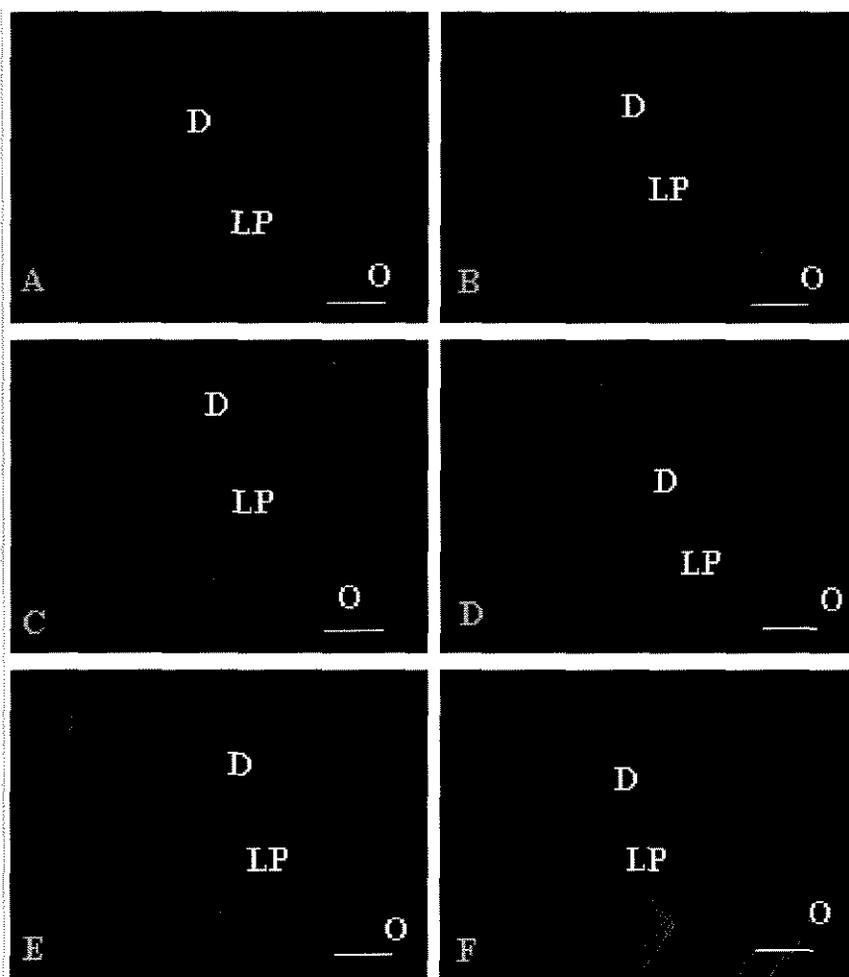


Fig. 8 - Evidenciação, por alizarina, de tecido mineralizado neoformado nos grupos: A controle normofuncional, B tratado normofuncional, C controle desimpedido, D tratado desimpedido, E controle impedido e F tratado impedido.

LP – Ligamento Periodontal; D – Dentina; O – Osso Alveolar . barra 100 µm

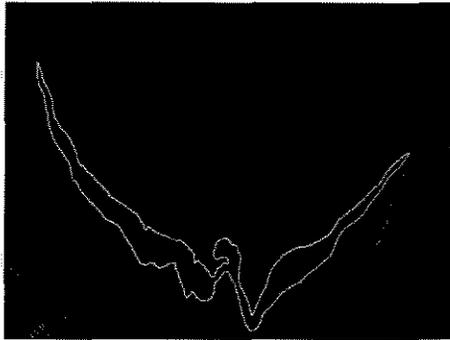


Fig. 9 – Medição da área limitada pelas marcas de alizarina.

A análise histológica da região da gengiva marginal dos primeiros molares revelou que a resposta inflamatória nos animais tratados com PTH foi muito pequena, sendo caracterizada por um pobre infiltrado de células (polimorfos e mononucleares) semelhante a encontrada nos animais não ligados (Figs.3A, 3B). Nos animais do grupo C, foi evidenciado um maior grau de inflamação (Figs 3C, 3D). A análise estatística (testes Tukey) mostrou que os grupos T e N são diferentes do grupo C ($p > 0,01$).

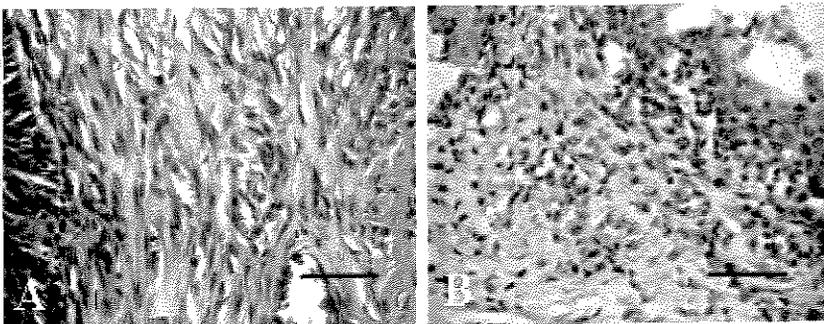


Fig. 10 – A- Corte histológico de gengiva livre do grupo T, B – Corte histológico de gengiva livre do grupo C.

Observar a menor quantidade de células inflamatórias na amostra correspondente ao tratamento com PTH.

Barras = 50 μ m

5 DISCUSSÃO

Estudos de base clínica envolvendo osteoporose e paratormônio demonstram que, quando administrado intermitentemente, o PTH estimula o crescimento ósseo cortical e/ou trabecular (MORLEY *et al.*, 1997; BIKLE *et al.*, 2002; DEMIRALP *et al.*, 2002; RUBIN *et al.*, 2002).

Atualmente é atribuída ao PTH a capacidade de prevenir, de suspender ou de reverter parcialmente o processo de reabsorção óssea, resultados obtidos a partir de experimentos em animais e clínicos (TAM *et al.*, 1982; PODBESK *et al.*, 1983 e HOCK & GERA, 1992; DEMPSTER *et al.*, 1993; MILLER *et al.*, 1997; MORLEY *et al.*, 1997; SKRIPITZ *et al.*, 2000; BIKLE *et al.*, 2002; DEMIRALP *et al.*, 2002; OXLUND *et al.*, 2002; RUBIN *et al.*, 2002). O fragmento de paratormônio humano - hPTH (1-34) tem se mostrado o mais efetivo fragmento atuando no aumento da densidade óssea (MORLEY *et al.*, 1997, MOHAN *et al.*, 2000; MORLEY *et al.*, 2001; MORIYAMA *et al.*, 2002; TURNER, 2002).

Neste estudo procuramos utilizar as propriedades anabólicas do PTH para avaliar a importância da resistência óssea no processo de erupção dental. Neste processo a reabsorção óssea é fundamental (GRIER & WISE, 1998) e, por esse motivo, a resistência dos tecidos peridentais é considerada um fator essencial no controle de todo o processo (BALL, 1977, MOXHAN, 1981, BURN-MURDOCH, 1990, GRIER & WISE, 1998).

Tendo em vista sua característica multifatorial, a erupção dos dentes de crescimento contínuo depende; dentre outros fatores; da reabsorção do osso adjacente ao periodonto relacionado ao esmalte, que é seguido da formação óssea na cortical externa e junto ao ligamento periodontal (GERLACH *et al.*, 2002).

Nossos resultados mostraram, através da marcação intra-óssea com alizarina, a atividade anabólica do PTH (1-34) no tecido ósseo adjacente ao ligamento periodontal, paralelamente pudemos verificar, através da medição das taxas de erupção, uma redução na velocidade deste processo (gráficos 2, 3 e 4). Entretanto estudos demonstraram que lesões no ligamento periodontal de incisivos inferiores de ratos pouco alteram o processo eruptivo, diferentemente do que se observa quando da lesão do periodonto relacionado ao esmalte, que provoca longos períodos de interrupção da erupção (MERZEL *et al.*, 2000). Nossos resultados permitem inferir que o PTH pode atuar no metabolismo do osso adjacente ao periodonto relacionado ao esmalte, assim como no osso adjacente ao ligamento periodontal, provocando uma alteração da relação formação/reabsorção onde a taxa de reabsorção é diminuída drasticamente levando a uma redução da taxa eruptiva (gráficos 2, 3 e 4). Estes dados também acabam por corroborar com outros autores, os quais utilizaram tratamento com corticóides, onde existe uma diminuição da resistência óssea (BALL, 1977), e com bifosfonatos, onde existe uma inibição da reabsorção óssea (GRIER & WISE, 1998), que resultaram respectivamente no aumento e diminuição das taxas eruptivas.

Após avaliar a influência da administração intermitente do PTH num modelo fisiológico - a erupção dentária, o efeito anabólico do PTH também foi estudado em um modelo patológico, a doença periodontal.

A doença periodontal se baseia na destruição dos tecidos de suporte do dente e se desenvolve a partir de um processo inflamatório crônico no ligamento periodontal, desencadeado por bactérias, principalmente gram-negativas. O ligamento periodontal (PDL) é um tecido conjuntivo especializado, localizado entre o cemento do dente e o osso alveolar, que tem como principal célula o fibroblasto, responsável pela manutenção e pela regeneração do periodonto (SAITO *et al.*, 2002). Os fibroblastos são também as células predominantes no PDL, que podem ser multipotentes ou formadas por uma população de células heterogêneas, capazes de produzir e digerir componentes da matriz tecidual, sendo deste tipo celular a responsabilidade de renovar e regenerar todo o tecido (MCCULLOCH *et al.*, 1987; BEERTSEN *et al.*, 1997; SAITO *et al.*, 2002). Outras células presentes nos tecidos peridentais são as células de defesa (polimorfonucleares e mononucleares), que formam a principal barreira contra a invasão bacteriana (SOSROSENO *et al.*, 2002).

Entretanto, como a maioria das bactérias não invade os tecidos periodontais (WILSON *et al.*, 1996) e a liberação de suas endotoxinas, dentre elas os lipopolissacarídeos (LPS), podem fazer com que as células de defesa provoquem osteoclastogênese (WILSON, 1995, KONG *et al.*, 1999; HORWOOD *et al.*, 1999, SAITO *et al.*, 2002) é aceito o fato de que a atuação das células de defesa seja a responsável pela maior parte do dano às estruturas de suporte periodontais, durante a doença periodontal (PAGE, 1991; HOWELL,

1996; GEMMELL *et al.*, 1997; OKADA & MURAKAMI, 1998; KONG *et al.*, 1999; HORWOOD *et al.*, 1999; BAKER, 2000).

Em nosso estudo observamos a presença de reabsorção óssea alveolar na região de furca no grupo onde a periodontite foi induzida (fig. 17), este resultado é consistente com achados obtidos em modelo experimental semelhante (NOCITI-JR *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2002; GASPERSIC *et al.*, 2002; HOLZHAUSEN *et al.*, 2002). Contudo, com injeção intermitente de PTH, pudemos demonstrar, pela primeira vez, uma inibição de perda óssea alveolar, mesmo na presença de idêntico agente físico indutor de periodontite. Tal inibição de perda óssea, provavelmente, se deve a uma inibição do processo inflamatório que levaria à reabsorção óssea. Esta hipótese se baseia em diversos estudos que relacionam a capacidade dos lipopolissacarídeos (LPS) em estimular resposta inflamatória local que, em último estágio, leva à reabsorção do osso periodontal (TAKATA *et al.*, 1997; MIYAUCHI *et al.*, 1998; FLETCHER *et al.*, 2001).

No periodonto, LPS podem ativar processo inflamatório através da indução da produção de produtos inflamatórios como, interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (HANAZAWA *et al.*, 1987; LINDEMANN *et al.*, 1988; GARRISON & NICHOLS 1989; MCFARLLANE *et al.*, 1990; KEETING *et al.*, 1991), e da citocina osteoclastogênica interleucina-6 (IL-6) (ISHIMI *et al.*, 1990; LITTLEWOOD *et al.*, 1991) por macrófagos, fibroblastos, células endoteliais e até mesmo os osteoblastos (SAITO *et al.*, 2002). Ao atuar sobre as células do tecido ósseo periodontal, estas citocinas alteram o metabolismo tecidual (MANTHEY & VOGEL, 1994; BAKER, 2000) e levam à destruição

do dos tecidos de sustentação dental (MANTHEY & VOGEL, 1994; OKAMURA *et al.*, 1999).

Desde a descoberta do sistema de sinalização RANKL-RANK, RANKL tem sido considerado como um dos principais fatores na indução da diferenciação osteoclástica. Contudo, achados recentes indicam que citocinas inflamatórias e LPS estão diretamente envolvidas na diferenciação e na função dos osteoclastos, mediada por osteoblastos (CHIANG *et al.*, 1999; SUDA *et al.*, 1996; NAGASAWA *et al.*, 2002). Todavia, o exato mecanismo pelos quais tais microorganismos induzem tal resposta ainda não está esclarecido.

Embora de forma bastante especulativa, depreendemos que o efeito neutralizante do PTH sobre a atividade de LPS, observada neste estudo, pode estar relacionada com a habilidade do PTH de se ligar a receptores específicos, prevenindo a tradução de sinais de LPS e, por consequência, inibindo a reabsorção óssea induzida pelo LPS.

Deste modo, e dentro dos limites deste estudo, é plausível supor que a inibição da evolução da doença periodontal induzida a partir do tratamento com injeções intermitentes de PTH, possa ter ocorrido devido à ação anabólica do PTH sobre o tecido ósseo periodontal, que atuaria promovendo uma superexpressão dos produtos osteoblasticos, colágeno do tipo I (NAKAJIMA *et al.*, 2002) e III além de fatores de crescimento (WHITFIELD *et al.*, 2002), existentes na matriz orgânica ossos, quando da sua estimulação pela ligação do PTH aos receptores associados à proteína G, que possivelmente atuam

mantendo equilibradas as taxas de formação e reabsorção, deste tecido, mesmo durante um processo patológico como a doença periodontal.

Até o presente momento, existem poucos estudos onde o tratamento baseado no anabolismo, induzido pelo PTH, é utilizado no reparo de fraturas ósseas onde os tecidos se encontram inflamados. Entretanto não existem estudos que relatem o papel do PTH nos tecidos peridentais, durante a evolução da periodontite, uma doença inflamatória com desencadeada e estabelecida por um processo dependente da presença de bactérias (BROWN & LOE, 1993, PILOT & MIYAZAKI, 1991).

Entendemos, no entanto, que é necessária a caracterização futura das células e das substâncias atuantes no processo de progressão da periodontite na presença ou não do tratamento com PTH, para que os aspectos moleculares deste processo possam ser mais bem entendidos, possivelmente permitindo o tratamento com PTH com essa finalidade clínica específica. Além disso, a partir destes resultados, novos estudos poderão ser realizados para que possamos compreender o real papel das células presentes no PDL na progressão da periodontite, identificando, assim, a participação ou não destas células na destruição do periodonto. No presente estudo pudemos notar que a administração intermitente do PTH foi capaz de provocar a neutralização da inflamação decorrente da periodontite induzida, mediada pelos LPS. Estes resultados sugerem que administração intermitente de PTH reduz a relação RANKL/OPG, localmente, evita a reabsorção óssea mediada por LPS. Além disso, PTH pode também neutralizar os efeitos biológicos

mediados por LPS, pela redução da expressão das citocinas inflamatórias envolvidas na ativação dos osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea.

Concluindo, a redução das taxas de erupção e a inibição da progressão da doença periodontal apresentadas neste estudo, parecem estar relacionadas com a atividade anabólica do PTH (1-34) e seu controle do metabolismo. A partir deste são necessários novos estudos onde este tratamento deverá ser testado em modelos experimentais diferentes, principalmente aqueles em que a periodontite já se encontre presente, com a finalidade de estabelecer a dose ideal e a forma de administração local do PTH, mais condizentes com as características desta doença.

6 CONCLUSÃO

O tratamento com injeções subcutâneas intermitentes de 40 μ g/Kg de hPTH (1-34) foi capaz de inibir a perda óssea alveolar em dentes sob a ação de agente indutor de doença periodontal.

O PTH administrado de forma intermitente pode induzir uma maior formação de tecido ósseo e também redução progressiva nas taxas de erupção dos incisivos inferiores de ratos (dentes de crescimento contínuo), nas diferentes condições de funcionalidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

BALL, P.C. The effect of adrenal glucocorticoid administration on eruption rates and tissue dimensions in rat mandibular incisors. J Anat, London, v.124, n.1, p.157-164, Sept. 1977.

BAKER, P.J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease, Microbes Infec, Paris, v.2, p.1181-1192, 2000.

BEERTSEN W. *et al.* The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000, Copenhagen, v.13, p.20-40, Feb, 1997.

BIKLE D.D. *et al.* Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. J Bone Miner Res, Washington, v.17, n.9, p.1570-1578, Sept. 2002.

BRANDI, M.L. *et al.* Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. Proc Natl Acad Sci USA, Washington, v.28, n.7, p.2954-2958, Mar 1995.

BROWN, L.J., LOE, H. PREVALENCE, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000, Copenhagen, v.2, p.57-71, June 1993.

BROWN, E.M., Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro. Curr. Opin. Nephrol. Hypertens, Philadelphia, v.2, p.541-551, 1993.

BURN-MURDOCH, R., The role of the vasculature in tooth eruption. Eur J Orthod, London, v.12, n.1, p.101-108, Feb 1990a.

*De acordo com a NBR 6023, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

BURN-MURDOCH, R.A., The effect of ciclophosphamide on the eruption of the impeded and resected incisors in rats, Arch. Oral Biol, Oxford, v.35, p.801-806, 1990b.

CAHILL, D.R., MARKS, S.C. JR., Chronology and histology of exfoliation and eruption of mandibular premolars in dogs. J Morphol, Philadelphia, v.171, n.2, p.213-8, Feb 1982.

CALVI, L.M., *et al.*, Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. J Clin Invest, New Haven, v.107, p.277-86, 2001.

CANALIS, E., MCCARTHY T., CENTRELLA M., Growth factors and the regulation of bone remodeling. J Clin Invest, New Haven, v.81, p.277-281, 1988.

CIELINSKI, M.J., MARKS, S.C. JR., Understanding bone cell biology requires an integrated approach: reliable opportunities to study osteoclast biology in vivo. J Cell Biochem, New York, v.56, n.3, p.315-322, Nov 1994.

CHIANG C.Y. The role of interleukin-1beta in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced bone resorption. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, Taipei, v.65, n.5, p.225-230, May, 2002

COTTON, W.R., GAINES, J.F., Unerupted dentition secondary to congenital osteopetrosis in the Osborne-Mendel rat. Proc Soc Exp Biol Med, Malden, v.146, p.554-561, 1974.

DEMIRALP, B., *et al.* Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos. Endocrinology, Springfield, v.143, n.10, p.4038-4047, Oct 2002.

DEMPSTER, D.W., *et al.* Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. Endocr Rev, Baltimore, v.14, p.690-709, 1993.

DUCY, P., *et al.*, Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell, Cambridge, v.21, n.2, p.197-207, Jan 2000.

FLETCHER, J.M. Analysis of the effect of changing environmental conditions on the expression patterns of exported surface-associated proteins of the oral pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Microb Pathog, London, v.30, p.359-368, 2001

GASPERSIC, R., STIBLAR-MARTINCIC, D., SKALERIC, U., Influence of restraint stress on ligature-induced periodontitis in rats. Eur J Oral Sci, Copenhagen, v.110, n.2, p.125-9, Apr 2002.

GARRISON S.W. AND NICHOLS F.C. LPS-elicited secretory responses in monocytes: altered release of PGE2 but not IL-1 beta in patients with adult periodontitis. J Periodontal Res, Copenhagen, v.24, n.2, p.88-95 Mar, 1989.

GEMMELL, E.; MARSHALL, R.I.; SEYMOUR, G.J., Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontol 2000, Copenhagen, v.14, p.112-143, June 1997.

GENUTH, S.M., Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. *In*: R.M. Berne and M.N. Levy, Physiology, St. Louis: Mosby, p.848-871, 1998.

GERLACH, R.F., *et al.* Alveolar bone remodelling pattern of the rat incisor under different functional conditions as shown by minocycline administration. Arch Oral Biol, Oxford, v.47, n.3, p.203-209, Mar 2002.

GORSKI, J.P.; MARKS S.C. Jr. Current concepts of biology of tooth eruption. Crit Rev Oral Biol Med, Boca Raton, v.3, p.185-206, 1993.

GORSKI, J.P., *et al.* Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. Connect Tissue Res, New York, v.18, n.3, p.175-190, 1988.

GRIER RL 4TH, WISE GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. J Dent Res, Chicago, v.77, n.1, p.8-15, Jan 1998.

GRUBER, H.E.; FARLEY, S.M.; BAYLINK, D.J. Predictions on future diagnosis and treatment of osteoporosis: results and discussion of a recent opinion poll. Calcif Tissue Int, Berlin, v.57, n.2, p.83-85, Aug 1995.

HABENER, J.F., ROSENBLATT, M.; POTTS, JR J.T. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. Physiol Rev, Washington, v.64, p.985-1053, 1984.

HAGINO, H., *et al*. Effect of parathyroid hormone on cortical bone response to in vivo external loading of the rat tibia. J Bone Miner Metab, New York, v.19, n.4, p.244-250, 2001.

HALL, T.J., CHAMBERS, T.J. Molecular aspects of osteoclast function. Inflamm Res, Basel, v.45, n.1, p.1-9, Jan 1996.

HANAZAWA, S., *et al*. Biological characterization of interleukin-1-like cytokine produced by cultured bone cells from newborn mouse calvaria. Calcif Tissue Int, Berlin, v.41, n.1, p.31-37, July 1987.

HOCK, J.M., GERA, I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. J Bone Miner Res, New York, v.7, n.1, p.65-72, Jan 1992.

HOFBAUER LC, HEUFELDER AE. Osteoprotegerin and its cognate ligand: a new paradigm of osteoclastogenesis. Eur J Endocrinol, Oslo, v.139, n.2, p.152-154, Aug, 1998.

HOLZHAUSEN, M., *et al.* Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. J Periodontol, Chicago, v.73, n.9, p.1030-1036, Sept 2002.

HOROWITZ, M.C. Parathyroid hormone and lipopolysaccharide induce murine osteoblast-like cells to secrete a cytokine indistinguishable from granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J Clin Invest, New Haven, v.83, n.1, p.149-157, Jan 1989.

HORWITZ, M.; STEWART, A.; GREENSPAN, S.L. Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis--robbing Peter to pay Paul? J Clin Endocrinol Metab, Springfield, v.85, n.6, p.2127-2128, June 2000.

HORWOOD, N.J., *et al.* Activated T lymphocytes support osteoclast formation in vitro. Biochem Biophys Res Commun, New York, v.265, n.1, p.144-150, Nov 1999.

HOWELL, T.H. Polypeptide growth factors for periodontal regeneration. Curr Opin Periodontol, Philadelphia, v.3, p.49-56, 1996

IIZUKA, T., *et al.* The effects of colony-stimulating factor-1 on tooth eruption in the toothless (osteopetrotic) rat in relation to the critical periods for bone resorption during tooth eruption. Arch Oral Biol, Oxford, v.37, n.8, p.629-636, Aug 1992.

IRIE, K., OZAWA, H. Relationships between tooth eruption, occlusion and alveolar bone resorption: cytological and cytochemical studies of bone resorption on rat incisor alveolar bone facing the enamel. Arch Histol Cytol, Niigata, v.53, p.497-509, 1990.

ISHIHARA, Y., *et al.* Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. J Periodontal Res, Copenhagen, v.26, n.3 Pt 1, p.155-160, May 1991.

ISHIMI, Y., *et al.* IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. J Immunol, Baltimore, v.15, n.10, p.3297-3303, Nov 1990.

IWANIEC, U.T., *et al.* Maintenance of cancellous bone in ovariectomized, human parathyroid hormone [hPTH(1-84)]-treated rats by estrogen, risedronate, or reduced hPTH. Bone, Elmsford, v.29, n.4, p.352-360, Oct 2001.

JÜPPNER, H., *et al.* A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. Science, Washington, v.254, p.1024-1026, 1991.

KEETING, P.E., *et al.*, Evidence for interleukin-1 beta production by cultured normal human osteoblast-like cells. J Bone Miner Res, New York, v.6, n.8, p.827-33, Ago 1991.

KIMMEL, D.B.; SLOVIK, D.M.; LANE, N.E. Current and investigational approaches for reversing established osteoporosis. Rheum Dis Clin North Am, Philadelphia, v.20, n.3, p.735-758, Ago 1994.

KONG, Y.Y., *et al.* Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. Nature, London, v.18, n.6759, p.304-309, Nov 1999.

KONDO, A.; KOSHIHARA, Y.; TOGARI, A. Signal transduction system for interleukin-6 synthesis stimulated by lipopolysaccharide in human osteoblasts. J Interferon Cytokine Res, New York, v.21, p.943-950, 2001.

KROLL, M.H. Parathyroid hormone temporal effects on bone formation and resorption. Bull Math Biol, New York, v.62, n.1, p.163-188, Jan 2000.

LACEY, D.L. *et al.*, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell, Cambridge, v.93, p.165-176, 1998.

- LINDEMANN R.A. *et al.* Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J Dent Res, Chicago, v.67, n.8, p.1131-1135, Aug, 1988.
- LITTLEWOOD, A.J., *et al.* The modulation of the expression of IL-6 and its receptor in human osteoblasts in vitro. Endocrinology, Springfield, v.129, n.3, p.1513-1520, Sept 1991.
- MANTHEY C.L. and VOGEL S.N. Interactions of lipopolysaccharide with macrophages. Immunol Ser, New York, v.60, p.63-81, 1994.
- MARIE, P.J. Human endosteal osteoblastic cells: relationship with bone formation. Calcif Tissue Int, Berlin, v.56, p.13-16, 1995.
- MARTÍN, K.J., GONZALEZ, E.A. The evolution of assays for parathyroid hormone. Curr Opin Nephrol Hypertens, Philadelphia, v.10, n.5, p.569-74, Sept 2001.
- MARTIN, T.J.; NG, K.W. Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity. J Cell Biochem, New York, v.56, n.3, p.357-366. Nov 1994.
- MCCULLOCH C.A. *et al.* Paravascular cells in endosteal spaces of alveolar bone contribute to periodontal ligament cell populations. Anat Rec, Dassel v.219, n.3, p.233-42, Nov, 1987.
- MCFARLANE C.G. *et al.* The release of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J Periodontal Res, Copenhagen, v.25, n.4, p.207-14. Jul, 1990.
- MERZEL, J.; NOVAES, P.D.; FURLAN, S. The effects of local trauma to the enamel-related periodontal tissues in the eruption of the rat incisor. Archs Oral Biol, Oxford, v.45, p.323-333, 2000.

MEUNIER, P.J. Anabolic agents for treating postmenopausal osteoporosis. Joint Bone Spine, Paris, v.68, n.6, p.576-581, Dec 2001.

MILLER, S.C., *et al.* Intermittent parathyroid hormone administration stimulates bone formation in the mandibles of aged ovariectomized rats. J Dent Res, Chicago, v.76, n.8, p.1471-1476, Aug 1997.

MIYAKOSHI, N., *et al.* Evidence that anabolic effects of PTH on bone require IGF-I in growing mice. Endocrinology, Springfield, v.142, n.10, p.4349-4356, Oct 2001.

MIYAUCHI M. *et al.* Distribution of macrophage lineage cells in rat gingival tissue after topical application of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies: OX6, ED1 and ED2 J Periodontal Res, Copenhagen, v.33, n.6, p.345-351. Aug, 1998.

MORIYAMA, I., *et al.* Comparative effects of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on cancellous and cortical bone loss in tail-suspended and sciatic neurectomized young rats. J Orthop Sci, Tokyo, v.7, n.3, p.379-385, 2002.

MORLEY, P.; WHITFIELD, J.F.; WILLICK, G.E. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. Curr Pharm Des, Schiphol, v.7, n.8, p.671-687, May 2001.

MORLEY, P.; WHITFIELD, J.F.; WILLICK, G.E. Anabolic Effects of Parathyroid Hormone on Bone, Trends in Endocrinology and Metabolism, New York, v.8, n.6, p.225-231, Aug 1997.

MOHAN, S., *et al.* Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice, Bone, Elmsford, v.27, n.4, p.471-478, Oct 2000.

MOXHAM, B.J. A quantitative assessment of the effects of axially directed extrusive loads on displacement of the impeded and unimpeded rabbit mandibular incisor. Arch Oral Biol, Oxford, v.26, n.3, p.209-215, 1981.

MUNDY, G.R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. J Periodontal Res, Copenhagen, v.26, n.3 Pt 2, p.213-217, May 1991.

NAIR, S.P. Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. Infect Immun, Bethesda, v.64, n.7, p.2371-2380, July 1996.

NAGASAWA T. *et al.* LPS-stimulated human gingival fibroblasts inhibit the differentiation of monocytes into osteoclasts through the production of osteoprotegerin. Clin Exp Immunol, Oxford, v.130, n.2, p.338-344. Nov, 2002.

NAKAJIMA, M., *et al.* Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. J Bone Miner Metab, Tokyo, v.18, n.1, p.9-17, 2000.

NEER, R.M., *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. N Engl J Med, Boston, v.10, n.19, p.1434-441, May 2001.

NOCITI F.H. JR., *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. J Periodontol, Chicago, v.71, n.9, p.1460-1464. Sep, 2000.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated PGE2 and IL-1beta production in gingival fibroblast cells from old rats. Exp Gerontol, Oxford, v.34, n.3, p.379-392, June 1999.

OKADA H. and MURAKAMI S. Cytokine expression in periodontal health and disease. Crit Rev Oral Biol Med, Boca Raton, v.9, n.3, p.248-266, 1998

OXLUND, H., *et al.* Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. Eur J Endocrinol, Oslo, v.146, n.3, p.431-438, Mar 2002.

PAGE R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res, Copenhagen, v.26, n.3 Pt 2, p.230-42, May, 1991.

PARTRIDGE, N.C.; BLOCH, S.R.; PEARMAN, A.T. Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression. J Cell Biochem, New York, v.55, p.321-327, 1994.

PILOT, T.; MIYAZAKI, H. Periodontal conditions in Europe. J Clin Periodontol, Copenhagen, v.18, n.6, p.353-357, July 1991.

PODBESK, R. Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds. Endocrinology, Springfield, v.112, n.3, p.1000-1006, Mar 1983.

POTTS, J.T., *et al.* Structure based design of parathyroid hormone analogs. J Endocrinol, London, v.154, p.S15-S21, 1997.

RAISZ, L.G.; KREAM, B.E. Regulation of bone formation. N Engl J Med, Boston, v.7, n.1, p.29-35, July 1983.

RAISZ, L.G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. N Engl J Med, Boston, v.31, n.13, p.818-828, Mar 1988.

RIANCHO, J.A. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. J Bone Miner Res, New York, v.10, n.3, p.439-446, Mar 1995.

RODAN, G.A. and MARTIN, T.J. Therapeutic approaches to bone diseases, Science, Washington, v.289, p.1508-1514, Sept 2000.

RODAN, G.A. Bone mass homeostasis and bisphosphonate action. Bone, Elmsford, v.20, n.1, p.1-4, Jan, 1997.

ROODMAN G.D. Cell biology of the osteoclast. Exp Hematol, Copenhagen, v.27, n.8, p.1229-1241, Aug, 1999

RUBIN, M.R. The anabolic effects of parathyroid hormone. Osteoporos Int, London, v.13, n.4, p.267-277, 2000.

RUBIN, M.R.; BILEZIKIAN, J.P. The potential of parathyroid hormone as a therapy for osteoporosis. Int J Fertil Womens Med, Port Washington, v.47, n.3, p.103-115, May-June 2002.

SAITO, Y. *et al.*, A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. J Cell Sci, London, v.1, n.115(Pt 21), p.4191-4200, Nov 2002.

SELYE, H. On stimulation of new bone formation with parathyroid extract in irradiated ergosterol. Endocrinology, Springfield, v.16, p.547-558, 1932.

SILVA, M.A.D. *et al.* The influence of Nicotine and Alcohol on periodontal tissue and induction of apoptosis. Acta Microscopica, Rio de Janeiro, v.C, p. 137-138, Nov, 2002.

SIMONET, W. S. *et al.*, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. Cell, Cambridge, v.89, p.309-319, 1997.

SKRIPITZ, R.; ANDREASSEN, T.T.; ASPENBERG, P. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. A dose-response study. J Bone Joint Surg Br, London, v.82, n.1, p.138-141, Jan 2000.

SEEMAN, E., DELMAS, P.D. Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. Trends in Endocrinology & Metabolism, New York, v.12, p.7, Sept 2001.

SILVERBERG, S.J., *et al.* A 10-year prospective study of primary hyperparathyroidism with or without parathyroid surgery. New Engl J Med, Boston, v.341, p.1249-1255, 1999.

SOSROCENO W. *et al.* The role of CD4+ cells in vivo on the induction of the immune response to *Porphyromonas gingivalis* in mice. J Periodontol, Chicago; v.73, n.10, p.1133-1340, Oct, 2002.

SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J. Parathyroid hormone and vitamin D receptors. Clin Endocrinol Metab, London, v.12, n.1, p.221-241, Mar 1983.

STANISLAUS, D., *et al.* In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment. Bone, Elmsford, v.27, n.2, p.209-218, Aug 2000.

STEIGMAN, S., *et al.* A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. J Dent Res, Chicago, v.68, n.8, p.1269-1274. Aug 1989.

STREWLER, G.J. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. J Clin Invest, New Haven, v.80, p.1803-1807, 1987.

SUDA K, *et al.* Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF-alpha, IL-1, and RANKL. J Cell Physiol, Philadelphia, v.190, n.1, p.101-108, Jan, 2002

SWARTHOUT, J.T., *et al.*, Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. Gene, Amsterdam, v.9, n.1-2, p.1-17, Jan 2002.

TAKATA T. Reactive change in proliferative activity of the junctional epithelium after topical application of lipopolysaccharide. J Periodontol, Chicago, v.68, n.6, p.531-535. Jun, 1997.

TAM, C.S., *et al.* Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. Endocrinology, Springfield, v.110, n.2, p.506-512, Feb 1982.

TEN CATE, A.R. Physiological resorption of connective tissue associated with tooth eruption, J Period Res, v.6, p.168-181, 1971.

TURNER, C.H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. Osteoporos Int, London, v.13, n.2, p.97-104, 2002.

TSUDA, E., *et al.*, Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun, New York, v.234 p.137-142, 1997.

YASUDA, H., *et al.* A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. Bone, Elmsford, v.25, p.109-113, 1999.

YASUDA, H., *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, v.95, p.3597-3602, 1998.

WHITFIELD, J.F.; MORLEY, P.; WILLICK, G.E. Parathyroid Hormone, Its Fragments and Their Analogs for the Treatment of Osteoporosis, Treatments in Endocrinology Copyright 2002 Adis International, v.1, n.3, p.175-190, 2002.

WIEBE, S.H., *et al.* Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. Oral Dis, Houndmills , v.2, n.2, p.167-80, June 1996.

WILSON, M.; REDDI, K.; HENDERSON, B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. J Periodontal Res, Copenhagen, v.31, n.6, p.393-407, Aug 1996.

WISE, G.E., *et al.* Osteoprotegerin and osteoclast differentiation factor in tooth eruption. J Dent Res, Chicago , v.79, p.1937-1942, 2000.

WISE, G.E.; FAN, W. Changes in the tartrate-resistant acid phosphatase cell population in dental follicles and bony crypts of rat molars during tooth eruption. J Dent Res, Chicago, v.68, n.2, p.150-156, Feb 1989.

ZOU, W.; BAR-SHAVIT, Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. J Bone Miner Res, New York, v.17, p.1211-1218, 2002.



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 334-2, sobre Influência de Administração contínua de PT Hop na taxa de erupção e na progressão da periodontite Estudos em ratos sob a responsabilidade de Prof. Dr. Silvana Teófilo Barros está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 21.02.2002. Este certificado expira em 20.02.2003

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 334-2, entitled Influence of PT Hop continuous administration in erupt rate and periodontitis progression in rats is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 21.02.2002 This certificate expires on 20.02.2003
(d) (m) (y)

Campinas, 21 de fevereiro de 2002
Armando Ferreira Lima

Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CAIXA UNIVERSITÁRIA ZEPERINO VAZ
13081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE 35 37897116
FAX 35 19 32891124