

## AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE LESÕES PERIAPICais EM RATAS COM OSTEOPOROSE INDUZIDA

Júlia Vendruscolo Do Prado<sup>1</sup>; Carina Michelon<sup>2</sup>; Carlos Alexandre Souza Bier<sup>3</sup>,  
Mônica Pagliarini Buligon<sup>4</sup>; Camilla Dos Santos Tibúrcio Machado<sup>5</sup>; Juliana Casarotto<sup>6</sup>; Flávia Kolling Marquezan<sup>7</sup>; Mariana De Carlo Bello<sup>8</sup>

### RESUMO

A osteoporose é uma condição sistêmica que pode influenciar a microarquitetura óssea da cavidade bucal. Avaliou-se a influência da osteoporose sobre lesões periapicais induzidas em ratas. Foram utilizadas 20 ratas da linhagem Wistar divididas em 2 grupos experimentais ( $n=10$ ): ovariectomia (OVX) e simulação da ovariectomia (SHAM). Em todos os animais foi induzido lesão periapical no primeiro molar inferior direito. Foram realizadas análises do nível de estrogênio, de estresse oxidativo, e mensurado a área das lesões periapicais e a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur e da mandíbula. A DMO no côndilo do fêmur foi显著mente menor no grupo OVX, porém na mandíbula não foram encontradas diferenças entre os dois grupos. Apesar de a osteoporose ter influenciado no nível de óxido nítrico e ter exercido um efeito sobre a densidade da DMO do fêmur nas ratas ovariecomizadas, não houve alteração na DMO da mandíbula, bem como no tamanho das lesões periapicais.

**Palavras-chave:** Menopausa, Osteoporose, Periodontite Apical.

**Eixo Temático:** Atenção Integral e Promoção à Saúde

### 1. INTRODUÇÃO

A periodontite apical é um processo inflamatório causado por microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, que afeta os tecidos periapicais. Estudos têm demonstrado que fatores sistêmicos, como a osteoporose, podem influenciar o desenvolvimento, progressão e severidade da doença periapical (SIQUEIRA JF., et al 2011).

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Odontologia - Universidade Franciscana (UFN)  
julia.vendruscolo@ufn.edu.br

<sup>2</sup> Pós-graduanda do curso de Odontologia - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)  
carina.michelon@hotmail.com

<sup>3</sup> Docente do curso de Odontologia - Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)  
alexandrebier@gmail.com

<sup>4</sup> Docente do curso de Odontologia - Universidade Franciscana (UFN) monica.buligon@ufn.edu.br<sup>5</sup> Pós-graduanda do curso de Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp)  
camilla\_tiburcio@hotmail.com<sup>6</sup> Acadêmica do curso de Odontologia - Universidade Franciscana (UFN)  
juliana.casarotto@ufn.edu.br<sup>7</sup> Docente do curso de Odontologia - Universidade Franciscana (UFN) flavia.marquezan@ufn.edu.br<sup>8</sup> Docente do curso de Odontologia - Universidade Franciscana (UFN) mariana.bello@ufn.edu.br

A osteoporose é um distúrbio osteometabólico caracterizado pela redução da densidade mineral óssea (DMO) e pela deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, levando a um aumento da fragilidade esquelética e do risco a fraturas. O tipo mais comum da doença ocorre no período pós-menopausa, devido à perda da função ovariana e consequente redução dos níveis de estrogênio. A deficiência desse hormônio resulta em altas taxas de remodelação óssea, sendo que a reabsorção excede a formação, o que leva, dessa forma, à perda de massa óssea corporal. Estudos demonstram que o estrogênio desempenha um papel importante na manutenção da massa óssea, tanto indiretamente pela inibição da osteoclastogênese, quanto diretamente por inibição da função dos osteoclastos. (WRONSKI TJ et al., 1989).

Outro fator que contribui para a deterioração da DMO é o dano celular causado pelo excesso de geração de espécies reativas de oxigênio, resultando no estresse oxidativo. Evidências demonstram que o estresse oxidativo está associado à perda óssea em pacientes com osteoporose (MANOLAGAS SC., et al 2010).

A osteoporose é considerada um fator de risco para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal, devido maior propensão à perda óssea alveolar. Em endodontia, alguns estudos avaliaram o desenvolvimento de lesões periapicais em modelos de ratas ovariectomizadas (GILLES JA ., et al 1997). A variação da concentração de estrogênio no plasma, garantida pela reprodução de um modelo de osteoporose pós-menopausa, produz alterações na microarquitetura óssea, o que influencia na reabsorção do osso alveolar e pode agravar o curso da periodontite apical. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar, através de análise radiográfica, o desenvolvimento de lesões periapicais em ratas ovariectomizadas. Adicionalmente, avaliou-se o perfil oxidativo sistêmico, através da aferição dos níveis de óxido nítrico, no modelo de estudo adotado (XIONG H ., et al 2007).

## 2. METODOLOGIA

Vinte ratas fêmeas da linhagem *Wistar*, pesando entre 150 e 200 gramas e com idade de aproximadamente 70 dias provenientes do Centro de Modelos Biológicos e Experimentais (CeMBE) foram usadas. Os animais foram mantidos sob condições controladas em número de quatro animais por microisolador (temperatura:  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , 70% umidade, e ciclo de 12h claro e 12h escuro) e com livre acesso à comida e água. O peso dos animais foi medido semanalmente para permitir o cálculo das substâncias anestésicas e analgésicas. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Registro CEUA nº 15/00436) onde a fase experimental foi realizada.

### Ovariectomia

A fim de simular a menopausa, dez animais foram submetidos à remoção bilateral dos ovários (ovariectomia - OVX). Nos demais animais ( $n=10$ ) foi realizada a simulação da ovariectomia (SHAM). Os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de xilazina (10mg/kg; Anasedan, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil) e ketamina (100mg/kg; Dopalen, Sespo Indústria e Comércio LTDA, Paulínia, São Paulo, Brasil). Durante as primeiras 48 horas foi administrado paracetamol (80mg/Kg) por gavagem para eliminar qualquer desconforto causado pela cirurgia.

### Indução da Lesão Periapical

Vinte e um dias após a cirurgia de ovariectomia, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10mg/kg) e ketamina (100mg/kg). A abertura coronária do primeiro molar inferior direito foi realizada com pontas diamantadas esféricas de alta rotação 1011 (KG Soarensen Ind. Ltda, Barueri, São Paulo, Brasil), sob refrigeração constante. A câmara pulpar foi deixada exposta ao meio bucal por 35 dias para permitir o desenvolvimento da lesão periapical.

### Eutanásia

Cinquenta e seis dias após o início da fase experimental, os animais foram eutanasiados através da anestesia profunda com sevoflurano (Sevoflurano, Instituto Biochimico Ind. Farm. Ltda, Rio de Janeiro, Brasil). Amostras de sangue foram rapidamente obtidas do coração das ratas por punção cardíaca com dispositivo vacutainer (BD Vacutainer® Eclipse™ BloodCollectionNeedle) para as análises do nível de estrogênio. O útero das ratas foi removido e pesado em balança de precisão e amostras de fígado foram coletadas para realização dos indicadores de estresse oxidativo. A hemimandíbula direita foi removida e dissecada para posterior realização da radiografia periapical. A hemimandíbula esquerda e o fêmur foram removidos para análise da densidade mineral óssea através de tomografia multislice.

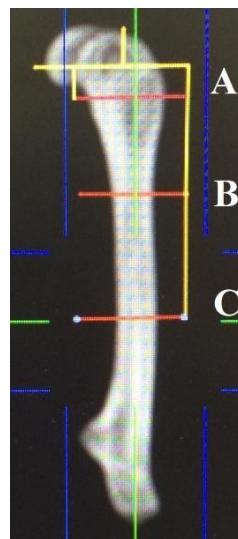
### Análise Radiográfica

As hemimandíbulas do lado direito foram radiografadas de forma padronizada utilizando um sensor digital (Digora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finlândia) e um aparelho de raio x (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil). As amostras foram posicionadas perpendicularmente a uma distância de 15 cm do conjunto mandíbula/filme com tempo de exposição de 0,63 segundos. A área das lesões periapicais associadas ao ápice das raízes mesiais do primeiro molar foram mensuradas e quantificadas em milímetro quadrado ( $\text{mm}^2$ ) usando o software ImageJ (National Institute of Health, Washington, DC). Uma endodontista cegada para os grupos experimentais realizou a mensuração da área da lesão. O coeficiente de correlação intraclasse foi calculado para verificar a reprodutibilidade ( $\text{ICC}= 0,94$ ).

### Análise da Densidade Mineral Óssea por Tomografia Computadorizada Multislice

O fêmur e a hemimandíbula esquerda foram submetidos ao exame de tomografia computadorizada multislice (BrightSpeed, GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) para determinar a densidade mineral óssea (DMO) de cada amostra. As imagens obtidas foram analisadas por um endodontista treinado e cegado para os grupos de comparação, com o auxílio do software Osirix (Prixmeo SARL, Geneva, Suíça) e as medidas de densidade óssea foram obtidas em Unidades de Housnfield (HU). A mensuração da densidade óssea foi realizada com base no estudo de Kuroda et al.<sup>26</sup> (2003), com mínimas adaptações. A densidade óssea da mandíbula

foi verificada no côndilo, na região periapical da raiz mesial do primeiro molar e no dente incisivo. No fêmur, foram realizadas três mensurações: a primeira medida foi obtida no côndilo, a dois mm da cartilagem de crescimento; a segunda e a terceira medida foram realizadas na epífise a 8,5 mm e a 17 mm da cartilagem, respectivamente (figura 1). Na região apical da raiz mesial do primeiro molar e no fêmur, as mensurações foram realizadas no osso cortical e esponjoso.



**Figura 1:** Mensurações realizadas no fêmur: a 2 mm (A), a 8,5 mm (B) e a 17 mm (C) da cartilagem de crescimento.

#### Análise do nível de Estrogênio

O sangue foi coletado e centrifugado por 12 min para separação do plasma e mantidos sob refrigeração (-20°C) até a realização da análise. O nível de estrogênio foi verificado por quimioluminescência (Estradiol Immulite®, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA).

#### Análise do Estresse Oxidativo

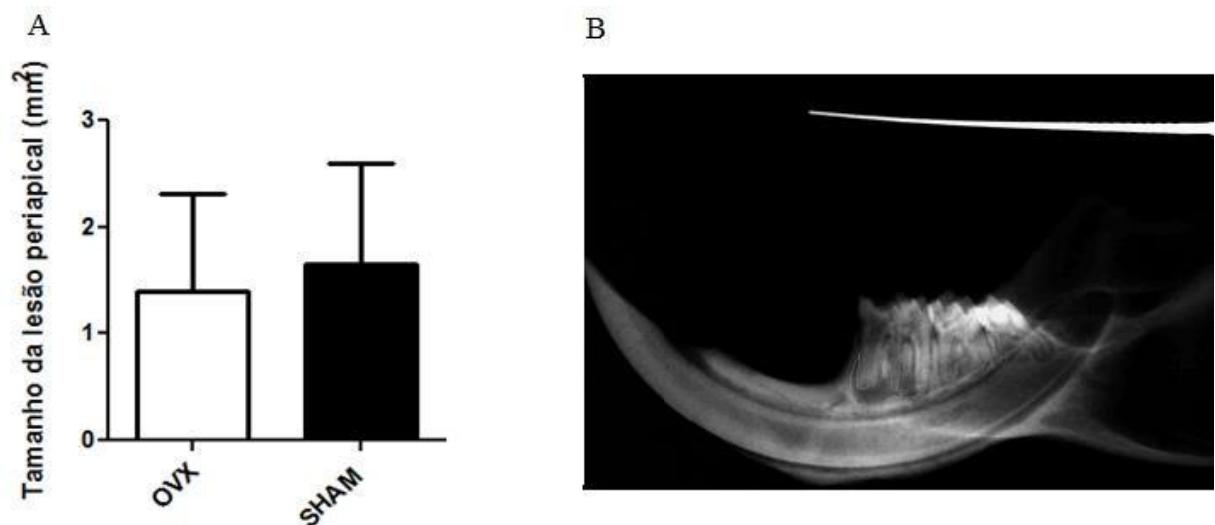
O parâmetro utilizado para avaliação do estresse oxidativo foi através da quantificação dos níveis de óxido nítrico no fígado pela metodologia utilizada em um estudo anterior (BRUNNING CA ., et al 2012).

#### Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo software GraphPadPrism 4 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e posteriormente foi aplicado o Teste *t* não pareado. O nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ( $P < 0.05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise Radiográfica Os resultados revelaram não haver diferença estatisticamente significante entre os grupos OVX e SHAM referente à área da lesão periapical, conforme ilustrado na figura 2A. A média e o erro padrão dos valores para o grupo OVX e SHAM foram, respectivamente,  $1,403 \pm 0,322 \text{ mm}^2$  e  $1,653 \pm 0,356$



mm<sup>2</sup>. A figura 2B ilustra a área da lesão periapical associada com a raiz mesial dos primeiros molares.

**Figura 2:** Análise comparativa do tamanho da lesão periapical, mensurada em mm<sup>2</sup>, entre os grupos OVX e SHAM (A); Imagem radiográfica representando a delimitação da lesão periapical (B). Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (de 7 a 9 animais por grupo)

Análise do Nível de Estrogênio e Peso do Útero

O grupo OVX apresentou níveis de estrogênio significantemente menor que o grupo controle SHAM ( $P=0,031$ ), bem como o peso do útero ( $P<0,001$ ).

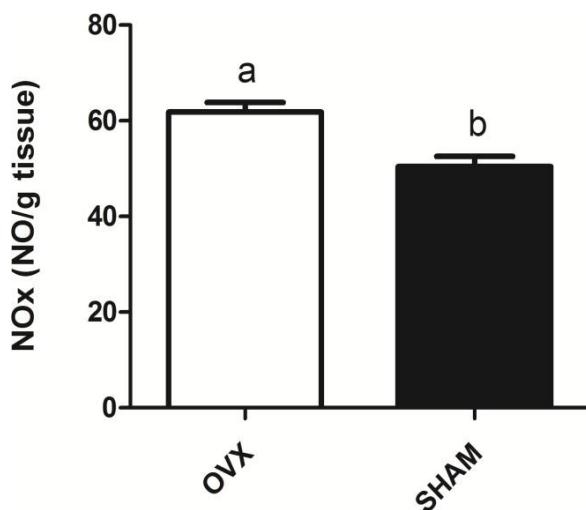
#### Tomografia Computadorizada Multislice

Não houve diferença estatística entre os grupos OVX e SHAM referente à DMO da mandíbula. No entanto, no côndilo do fêmur (osso esponjoso e cortical) a densidade média no grupo OVX foi significantemente menor quando comparado ao grupo SHAM ( $P=0,017$  para osso esponjoso e  $P=0,002$  para osso cortical).

#### Análise do Estresse Oxidativo

O grupo OVX apresentou níveis de óxido nítrico significativamente maiores que o grupo SHAM ( $P=0,0016$ ), conforme ilustra a figura 3.

**figura 3:** Análise comparativa dos níveis de NO entre os grupos OVX e SHAM. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (de 7 a 9 animais por grupo).



Após a menopausa, as mulheres apresentam um declínio na produção de estrogênio, e essa condição está associada ao aumento na reabsorção óssea, resultando em um quadro de osteopenia ou osteoporose. O tecido periodontal de suporte é suscetível às mudanças nos níveis de estrogênio, portanto a deficiência desse hormônio pode agravar a periodontite apical. O presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento das lesões periapicais induzidas em ratas ovariectomizadas. Os resultados encontrados não mostraram diferenças

significantes no tamanho da lesão periapical entre ratas ovariectomizadas (OVX) e ratas controle (SHAM) após 35 dias da abertura coronária e exposição pulpar. Xiong et al.20 (2007), revelaram um significativo aumento das lesões periapicais em ratas *Sprague-Dawley* (SD) ovariectomizadas quando comparadas ao grupo controle, após 20 dias da indução da lesão periapical. Essa inconsistência entre os resultados pode ser explicada pela utilização de diferentes linhagens de ratos nos modelos experimentais, visto que o presente estudo utilizou ratas *Wistar*. Fang et al.29 (2013) mostraram que, após a ovariectomia, ratas SD apresentaram significantemente maior perda de massa óssea na região lombar (L5 e L6) que as ratas *Wistar*, concluindo que as duas linhagens não são modelos equivalentes para estudo da osteoporose pós-menopausa.

A DMO do fêmur e da mandíbula foi avaliada através da tomografia multislice. Diferenças estatisticamente significante entre os grupos OVX e SHAM, tanto na cortical quanto na porção medular do côndilo do fêmur, foram encontradas pelo presente estudo. No entanto, a DMO na mandíbula entre os grupos OVX e SHAM foi similar, o que pode justificar a ausência de diferença no tamanho da lesão periapical entre os grupos. Segundo Kuroda et al.27 (2003), o fêmur é mais suscetível à deficiência de estrogênio que a mandíbula. Estes dados podem sugerir que a mandíbula necessite de um tempo maior de deficiência estrogênica que o fêmur para desenvolver alterações no padrão ósseo. Estas suposições vão de acordo com os achados de um estudo recente, o qual utilizou um longo período entre a ovariectomia e a eutanásia, permitindo evidenciar uma diferença estatisticamente significante no tamanho da lesão periapical entre os grupos SHAM e OVX (BRASIL SC ., et al 2016).

Entre os fatores que levam a uma diminuição da DMO no período pós-menopausa, destaca-se o aumento do estresse oxidativo gerado pela produção de espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo é responsável pela ocorrência de danos celulares e está intimamente relacionado com a perda na densidade óssea que ocorre na osteoporose. No presente estudo o parâmetro avaliado foi o óxido nítrico (NO), que é considerado uma molécula reguladora do metabolismo ósseo em humanos e animais. A produção excessiva de NO aumenta a citotoxicidade celular, resultando em dano tecidual. Os altos níveis de NO estão diretamente relacionados

com a diminuição da DMO, uma vez que esses níveis são, geralmente, gerados por iNOS, que é considerado um marcador de supressão da proliferação e diferenciação de osteoblasto, além de induzir a diferenciação de osteoclastos. O presente estudo encontrou níveis significantemente maiores de NO no grupo OVX quando comparado ao grupo SHAM. Resultados que vão de acordo com o estudo de Salvatore et al.35 (2003), que sugerem que o iNOS e seu subproduto NO regulam a reabsorção óssea em ratos com deficiência de estrogênio. A utilização de ratos como modelo animal para reprodução de alterações sistêmicas tem sido amplamente empregada, pois esse modelo apresenta muitas vantagens como, baixo custo, fácil manejo e possibilita a padronização e controle de muitas variáveis. Além disso, o rato possui semelhança com humanos em muitos aspectos, como a presença de osso cortical e trabecular e alterações ósseas similares às observadas na menopausa, no envelhecimento ou decorrentes da ovariectomia ( WRONSKI TJ ., et al 1989). O modelo de osteoporose é obtido através da remoção bilateral dos ovários, resultando na supressão dos níveis de estrogênio. A deficiência de estrogênio leva à redução no peso de útero devido a atrofia desse órgão e, comprovadamente, altera os padrões de remodelação óssea. O presente estudo encontrou diferença estatística entre o peso do útero e os níveis de estrogênio entre os grupos SHAM e OVX, o que comprova a eficiência do modelo utilizado. No entanto, o tempo transcorrido entre a ovariectomia e a eutanásia e a linhagem dos animais ainda é conflitante entre os estudos e pode promover diferentes respostas metabólicas dependendo da metodologia utilizada (GILLES JA ., et al 1997). Diante disso, se o estudo for avaliar perda óssea periapical devido à deficiência de estrogênio, sugere-se um período maior entre a ovariectomia e a eutanásia, bem como entre a indução da lesão periapical e a eutanásia.

#### 4. CONCLUSÃO

Embora os resultados apresentados pelo presente estudo tenham mostrado a eficiência do modelo experimental utilizado para reprodução da osteoporose em ratas, não foram observadas alterações na DMO da mandíbula e no tamanho das lesões periapicais induzidas em ratas ovariectomizadas. Portanto, a fim de alcançar

alterações da DMO na mandíbula, períodos experimentais mais longos devem ser aplicados entre a ovariectomia e a eutanásia, bem como a indução da lesão periapical e a eutanásia. Sendo assim, estudos relacionando lesão periapical e osteoporose devem ser realizados para comprovar essa relação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora, Profaº Dra Mariana De Carlo Bello, por nos proporcionar essa oportunidade e reservar tempo de sua rotina para dividir suas experiências e sabedorias sobre a endodontia. Além disso, gostaríamos de agradecer as professoras, Profaº Flávia Kolling Marquezan e Profaº Mônica Pagliarini Buligon e aos demais autores por sempre nos auxiliarem e estarem dispostos a contribuírem em nossos projetos.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL, S. C. et al. Influence of oestrogen deficiency on the development of apical periodontitis. **International endodontic journal**, v. 50, n. 2, p. 161-166, 2017.
- BRÜNING, C. A. et al. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochemical research**, v. 37, n. 10, p. 2249-2258, 2012.
- FANG, J. et al. Are there differences between Sprague-Dawley and Wistar rats in long-term effects of ovariectomy as a model for postmenopausal osteoporosis?. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 2, p. 1491, 2015.
- GILLES, J. A. et al. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. **Journal of endodontics**, v. 23, n. 7, p. 419-422, 1997.
- KURODA, S. et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. **Oral diseases**, v. 9, n. 1, p. 24-28, 2003.

MANOLAGAS, S. C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 31, n. 3, p. 266-300, 2010.

PARK, S. B. et al. Bone mineral density changes after ovariectomy in rats as an osteopenic model: stepwise description of double dorso-lateral approach. **Journal of Korean Neurosurgical Society**, v. 48, n. 4, p. 309, 2010.

SIQUEIRA J. R., J. F. et al. Polymorphism of the FcγRIIIa gene and post-treatment apical periodontitis. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 10, p. 1345-1348, 2011.

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcified tissue international**, v. 45, n. 6, p. 360-366, 1989.

XIONG, H. et al. Effect of an estrogen-deficient state and alendronate therapy on bone loss resulting from experimental periapical lesions in rats. **Journal of endodontics**, v. 33, n. 11, p. 1304-1308, 2007.