KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN CIRURGIÃ-DENTISTA

Estudo de metaloproteinases de matriz e colágeno no processo de reparo ósseo alveolar em ratas osteoporóticas por ooforectomia

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Doutora em Estomatopatologia, com área de concentração em Patologia

PIRACICABA 2004

KARINA GOTTARDELLO ZECCHIN CIRURGIÃ-DENTISTA

Estudo de metaloproteinases de matriz e colágeno no processo de reparo ósseo alveolar em ratas osteoporóticas por ooforectomia

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Doutora em Estomatopatologia, com área de concentração em Patologia

Orientador: Prof. Dr. Jacks Jorge Junior

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Edgard Graner Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior Prof. Dr. Jacks Jorge Junior Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas Suplentes: Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes

Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

PIRACICABA 2004

Ficha Catalográfica

Zecchin, Karina Gottardello.
Estudo de metaloproteinases de matriz e colágeno no processo de reparo ósseo alveolar em ratas osteoporóticas por ooforectomia. / Karina Gottardello Zecchin. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. ix, 68f. : il.
Orientador : Prof. Dr. Jacks Jorge Junior. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Proteína. 2. Enzima. 3. Estrógeno. 4. Tíbia. 5. Molares. I. Jorge Junior, Jacks. 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.

Folha de aprovação a ser fornecida pela Coordenadoria de Pós-Graduação

Dedicatória

A **Deus**,

por me permitir ser quem sou, na verdade e na justiça. Todo o meu amor e devoção!

A meus pais **Wagner** e **Malvina**, por terem transformado meus sonhos em realidade. Todo o meu amor por vocês!

A meus irmãos **Henrique** e **Victor**, pela união e por serem os meus tesouros, obrigada por TUDO!

A meu amado **Daniel**, por ser a razão da minha vida e sempre estar ao meu lado. Amo você!

Ao Professor Doutor Jacks Jorge Junior,

por toda a atenção, carinho, orientação e confiança que tem por mim. Deixo aqui todo o meu respeito e gratidão pelos ensinamentos ao longo destes anos!

Ao Professor Doutor Edgard Graner,

por ser um exemplo de professor: atencioso, paciente, preocupado com minha formação. Sua ajuda foi fundamental neste trabalho e em minha formação. Toda a minha admiração e carinho.

Ao Professor Doutor **Oslei Paes de Almeida**, pelo exemplo de vontade e trabalho, obrigada.

Agradecimentos

- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido ao Prof. Dr. Jacks Jorge Junior, processo número 02/00514-0.
- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de doutorado concedida.
- Ao **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**, diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP.
- Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho** coordenador dos cursos de pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.
- Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em ESTOMATOPATOLOGIA, por seus ensinamentos, respeito, amizade e confiança.
- Agradeço ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** por suas contribuições fundamentais para a realização deste trabalho e por ter me iniciado no laboratório de Biologia Molecular, sempre com muita vontade e otimismo.
- Aos **Profs. Drs. Márcio Lopes, Hipólito, Heron Gonzaga, Bozzo** e **Luis Spolidório** por compartilharem conosco seus conhecimentos e experiências.
- Aos funcionários, Adriano, Ana Cristina, Cida, Cris, Eli, João, Maria Helena, Rogério, Rosa, Wanderlei e Zuleica, pelo carinho, pela ajuda fundamental e companhia ao longo destes anos.
- A **Prof^a. Dr^a. Fernanda Klein Marcondes** e ao aluno **Fábio José Bianchi**, por toda ajuda e orientação em relação aos procedimentos de ooforectomização.
- Ao **Prof. Dr. Luis Augusto Passeri,** por me permitir utilizar seu computador para o desenho dos *primers* utilizados.
- Ao **Prof. Dr. Sérgio Line,** pela utilização de seus equipamentos para documentação fotográfica dos géis de agarose.
- A Michelle Agostini, Juliana Pereira Almeida e Sílvia Maria P. Paes de Almeida, por fornecerem células em cultura para realização de testes e padronizações.

- Ao **Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior** por todos os ensinamentos logo que comecei no laboratório de Biologia Molecular.
- Aos queridos **Ana Cristina, Paola, Dawton e Fábio Ramôa** por toda a ajuda na realização das reações imunohistoquímicas.
- Ao querido amigo **Fábio Augusto Ito** por toda a amizade e ajuda na realização das documentações iniciais deste estudo.
- Aos meus queridos amigos e "alunos" **Dawton Abranches Pulhez, Michelle Agostini e Michele Pereira** pela amizade e companheirismo sem limites que me dedicam. Sentirei saudades!
- Aos meus queridos e preciosos amigos Alessandra, Bia, Belkys, Daniela, Fabiana, Gilberto, Luis Felipe, Yuki, Carol e, em especial, Juliana Salton, que sempre acreditaram em mim e por estarem ao meu lado há tantos anos. Meu carinho por vocês!
- À minha querida amiga **Cíntia de Souza Alferes Araújo**! Jamais conseguirei retribuir tudo o que faz por mim! Que Deus sempre abençõe a você e a sua família!
- A meu querido amigo **Rui Barbosa de Brito Junior,** pela força, empenho, por me ouvir e me ajudar sempre. Você é um exemplo de AMIGO! Muito obrigada pelo carinho!
- A toda a minha família, em especial meus primos **Ricardo Campane, Valéria Campane e Otávio Gottardello Ferraresso** por todo o apoio.
- Aos meus queridos **Sidiney, Ana Verônica** e **Eduardo Miranda da Silveira** que acompanharam de perto este trabalho e que sempre me apoiaram de maneira terna e amável.
- Às queridas **Dri, Lili, Cris, Emilena, Juliana, Kira** e **Sr^a Marlene de Oliveira Razera** pela agradável convivência e companhia.
- A todos os meus colegas do curso de estomatopatologia pelos bons momentos que compartilhamos, pela ajuda que cada um soube prestar ao longo deste trabalho e de minha formação. Obrigada a todos!
- A todos aqueles que não foram citados, porém têm conhecimento deste trabalho e de sua importância, bem como aqueles que ajudaram em momentos específicos e essenciais, minha gratidão.

"A vida é realmente escuridão, exceto quando há impulso. E todo impulso é cego, exceto quando há saber. E todo saber é vão, exceto quando há trabalho. E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor."

Kahlil Gibran

Sumário

	página
Lista de abreviaturas e siglas	1
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução	5
2. Revisão da literatura	7
3. Proposição	15
4. Materiais e métodos	16
5. Resultados	30
6. Discussão	43
7. Conclusões	50
Referências bibliográficas	51
Anexos	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- $1,25(OH)_2D 1,25$ -diidroxicolecalciferol
- AFIP Instituto de Patologia das Forças Armadas
- AP-1 Proteína ativadora-1
- BMP Proteína óssea morfogenética
- BSA Albumina sérica bovina
- cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar
- Cont Grupo controle (pseudo-ooforectomizado)
- DMEM Meio de cultura de Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO Dimetil sulfóxido
- DNA Ácido desoxirribonucléico
- dNTP Desoxinucleosídeo trifosfato
- D.O. Densidade óptica
- DP Desvio padrão
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- EGF Fator de crescimento epidérmico
- ERE Elemento de resposta ao estrógeno
- FGF Fator de crescimento fibroblástico
- HE Hematoxilina e Eosina
- $IFN\text{-}\gamma-Interferon\ gama$
- IL Interleucina
- IgG Imunoglobulina G
- kDa Quilodalton
- kVA Quilovoltampere
- M-CSF Fator estimulador de colônia de macrófagos
- MMP Metaloproteinase de matriz
- MOPS Ácido propanosulfônico 3-(N-morfolino)
- mRNA Ácido ribonucléico mensageiro
- MT-MMP Metaloproteinase de matriz de membrana celular

- NaCl-Cloreto de sódio
- NaF Fluoreto de sódio
- NEM N-etil-maleimida
- $NF-\kappa B Fator nuclear-\kappa B$
- OVX Ooforectomização
- PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida
- pb Pares de bases
- PBS Tampão fosfato salino
- PCR Reação de polimerase em cadeia
- PDGF Fator de crescimento derivado de plaquetas
- Phe-1,10-fenantrolina
- PMSF Fluoreto de fenilmetilsulfonil
- PTH Paratormônio
- RE Receptor de estrógeno
- RNA Ácido ribonucléico
- rpm Rotações por minuto
- RT Transcriptase reversa
- RT-PCR Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- TBST Tampão fosfato salino + 0,1% Tween 20
- TGF- β Fator de crescimento transformante beta
- TIMP Inibidor tecidual de metaloproteinase de matriz
- $TNF-\alpha Fator de necrose tumoral-\alpha$
- U Unidade
- UNICAMP Universidade Estadual de Campinas

RESUMO:

A osteoporose é uma doença óssea metabólica, de etiologia multifatorial, comumente associada à deficiência de estrógeno. Os efeitos da osteoporose sobre os ossos da face têm sido pouco estudados, mas há indícios de atraso na reparação alveolar pósexodontia em animais ooforectomizados. O aumento da expectativa de vida da população e o conseqüente aumento do número de pacientes afetados pela osteoporose ressaltam a necessidade de uma avaliação detalhada de seus possíveis efeitos sobre o processo de reparo ósseo alveolar. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ausência de estrógeno sobre a expressão, produção e atividade de MMP-1, -2, -9 e colágenos tipo I e III no tecido de granulação do processo de reparo alveolar após exodontia do primeiro e segundo molares inferiores em ratas. Sessenta e seis ratas (Ratus norvegicus albinus, Wistar) com 4 semanas de idade foram submetidas a ooforectomia bilateral (grupo OVX) ou pseudo-ooforectomia (grupo controle). Após três semanas os primeiros e segundos molares inferiores foram extraídos e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após 3, 5 e 7 dias das exodontias. Os tecidos de granulação dos alvéolos foram coletados e utilizados para realização de RT-PCR, western blot e zimograma. Ambos os grupos apresentaram aumentos graduais da expressão, produção e atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9 ao longo dos períodos pós-exodontia estudados nesse modelo experimental. A ausência de estrógeno no grupo OVX foi associada a diminuições significativas da atividade, expressão e produção de MMP-2 e -9, bem como redução da expressão e produção de colágenos do tipo I e III em todos os períodos estudados. Por outro lado, não foram observadas influências significativas da ausência de estrógeno sobre a produção de MMP-1. As alterações moleculares encontradas nesse trabalho refletem o atraso no processo de reparo ósseo alveolar mediante a ausência de estrógeno.

ABSTRACT:

Osteoporosis is a metabolic bone disease of multifatorial aetiology commonly associated with oestrogen deficiency. The effects of osteoporosis on bone structure of the oral cavity have scarcely studied but there are evidences of delayed healing process after tooth extraction in ovariectomized rats. The increased life span of most world populations and the consequent increase in the numbers of patients affected by osteoporosis reinforces the need of knowledge about its possible influence over the alveolar socket healing after tooth extraction. The aim of this study was to describe the effects of the absence of oestrogen on the expression, production and activity of matrix metalloproteinases -1, -2 and -9, and of types I and III collagens in the alveolar granulation tissue of young female rats after tooth extraction. Sixty-six four-week-old female rats underwent bilateral ovariectomies (OVX) or sham operations. Three weeks latter, both first and second mandible molars were extracted and the animals killed by cervical dislocation 3, 5 or 7 days after tooth extraction. The granulation tissue was collected from the alveolar sockets, and used for RT-PCR, western blot or zymography analysis. There was a gradual increase on the expression and production of all proteins as well as MMP-2 and -9 activities, in all periods after surgery, with this experimental model. In contrast, OVX animals showed a significant decrease on the gelatinolytic activities, production and expression of MMP-2 and -9 and types I and III collagens. Otherwise, there was no significant influence on MMP-1 production in OVX animals. The molecular changes found herein reflect the delayed alveolar wound healing associated with the absence of oestrogen.

1. INTRODUÇÃO:

Aproximadamente 30 milhões de norte-americanos estão sujeitos à osteoporose (Mundy et al., 1999) e estima-se que essa taxa chegue a mais de 70 milhões de pessoas no mundo (Boyle et al., 2003). No Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas são acometidas por esta doenca (Gali, 2001). São freqüentes as fraturas decorrentes da perda óssea nesta doença, responsável por significativo atraso no metabolismo mineral ósseo (Kubo et al., 1999; Frisch & Bartl, 1999; Namkung-Matthai et al., 2001). Apesar da relevância clínica da osteoporose, são poucas as pesquisas que avaliam o efeito da doença no reparo alveolar pós-exodontia (Salomao et al., 1974; Klemetti & Vainio, 1993; Elovic et al., 1994; Tanaka et al., 2001). Estudos em animais ooforectomizados indicam atraso no processo de reparo alveolar, com diminuição da formação de colágeno e de osso (Salomao et al., 1974; Li & Nishimura, 1994; Jahangiri et al., 1997). Estudos em mulheres com osteoporose demonstram redução das cristas alveolares decorrente de aumento na reabsorção das mesmas (Kribbs et al., 1983; Kribbs et al., 1989; von Wowern & Kollerup, 1992; Klemetti & Vainio, 1993). Por outro lado, o processo de reparo ósseo alveolar após exodontia é um assunto amplamente estudado e a seqüência de eventos conhecida em detalhes (Devlin, 2000). Inicialmente o coágulo preenche o alvéolo, onde será maturado e substituído pelo tecido de granulação. As células epiteliais iniciam intensa atividade mitótica com a finalidade de recobrir a ferida. Angiogênese também é observada e fibroblastos sintetizam grande quantidade de fibras colágenas. Em seguida, tem início a ossificação e maturação das trabéculas ósseas, processo este que poderá estender-se por 6 meses até que não haja diferença na densidade do osso neoformado e do osso alveolar adjacente (Carvalho et al., 1997a). Adicionalmente, o reparo alveolar apresenta-se como modelo de estudo adeguado para avaliação do reparo ósseo, tendo em vista a ausência de formação de cartilagem, o rápido ciclo ósseo e sua relevância clínica (Vignery & Baron, 1980; Hsieh et al., 1995). O aumento da expectativa de vida da população mundial realça a necessidade de estudos sobre a osteoporose (Kalu et al., 1989; Elovic et al., 1994; Namkung-Matthai et al., 2001). O elevado número de pacientes afetados, a maioria em idade avançada, torna mais freqüente a realização de exodontias nestes pacientes. Apesar de não haver pesquisas que avaliem o reparo pós-exodontia em humanos com osteoporose, esta doenca está associada

ao aumento da reabsorção óssea (Kribbs *et al.*, 1989; Klemetti & Vainio, 1993). Tendo em vista estes fatores, o objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos moleculares envolvidos no processo de reparo alveolar após exodontia dos primeiros e segundos molares inferiores de ratas ooforectomizadas com osteoporose.

2. REVISÃO DA LITERATURA:

2.1 Osteoporose:

O termo "doença óssea metabólica" se aplica àquelas condições associadas à redução difusa da densidade óssea (osteopenia) e à diminuição da resistência óssea. A doença óssea metabólica pode ser classificada de acordo com características histológicas: (i) osteoporose, na qual há redução concomitante do conteúdo mineral e da matriz óssea e (ii) osteomalácia, na qual a redução da densidade óssea é resultado da menor mineralização da matriz (Wronski *et al.*, 1988; Sims *et al.*, 1996; Manolagas, 2000; Gali, 2001; Levi *et al.*, 2002).

A osteoporose é a doença óssea metabólica mais comum, tendo sido melhor definida pelo "*Consensus Development Conference*" como uma doença caracterizada por redução da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo, resultando em maior fragilidade óssea e, conseqüentemente, em aumento no risco de fraturas (Consensus Development Conference, 1993).

Esta doença pode ser primária (idiopática) ou secundária, sendo a primária classificada em dois tipos: I – pós-menopausa e II – senil. A osteoporose secundária ocorre como conseqüência de processos patológicos (artrite reumatóide, hipertireoidismo, hiperparatireoidismo e mieloma múltiplo) e outras condições, tais como alcoolismo, imobilização, terapia crônica com heparina, uso de anticonvulsivantes e hipervitaminose A (Frisch & Bartl, 1999; Manolagas, 2000).

A osteoporose tipo I, pós-menopausa, é o tipo mais comum dessa condição e está associada à deficiência de estrógeno (Kalu *et al.*, 1989; Namkung-Matthai *et al.*, 2001). Nos pacientes afetados, observa-se uma redução na quantidade de osso presente, com perda maior de osso trabecular que de osso compacto (Sims *et al.*, 1996; Namkung-Matthai *et al.*, 2001), resultando nas características primárias da doença, ou seja, fraturas por achatamento de vértebras, fraturas do colo do fêmur e da porção distal do rádio (Cooper & Melton, 1992). A taxa de formação óssea é normal, na maioria das vezes, porém ocorre aumento da taxa de reabsorção óssea, uma vez que os osteoblastos não são capazes de acompanhar os

7

efeitos da ação dos osteoclastos (Sims *et al.*, 1996; Frisch & Bartl, 1999; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001).

O mecanismo pelo qual a ausência de estrógeno resulta em perda óssea é complexo e ainda não é totalmente compreendido (Kalu *et al.*, 1989; Sims *et al.*, 1996; Sunyer *et al.*, 1999; Manolagas, 2000). O aumento da reabsorção óssea na osteoporose está associado ao aumento do número e da atividade de osteoclastos, bem como à diminuição da incidência de apoptose nestas células. Paralelamente, observa-se diminuição da meia vida dos osteoblastos e incapacidade de reparação adequada dos defeitos causados pela reabsorção osteoclástica (Mundy *et al.*, 1999; Manolagas, 2000; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Harada & Rodan, 2003).

A ausência de estrógeno promove remodelação óssea inibindo a produção osteoblástica de citocinas com atividade sobre o tecido ósseo, resultando na proliferação de precursores osteoclásticos (Sunyer et al., 1999; Cenci et al., 2000b). As principais citocinas envolvidas na osteoclastogênese são interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral-a (TNF-α) (Manolagas, 2000; Cenci et al., 2000a). O TNF-α, inibido pelo estrógeno em condições normais, é um dos fatores de estímulo da osteoclastogênese na osteoporose (Riggs, 2000; Cenci et al., 2000b). A IL-1 é um potente estimulador in vitro e in vivo da reabsorção óssea por promover a diferenciação, atividade e sobrevida dos osteoclastos (Goldring & Krane, 1987; Srivastava et al., 1998; Sunyer et al., 1999; Boyle et al., 2003; Harada & Rodan, 2003). A perda óssea após ooforectomia em ratos pode ser bloqueada inibindo-se a atividade de IL-1 e TNF- α (Kimble *et al.*, 1995). Além disso, a ooforectomia não resulta em perda óssea em camundongos que não expressam o receptor de IL-1 (Lorenzo et al. 1998). A IL-6 estimula tanto a neoformação quanto a reabsorção óssea, bloqueando a apoptose de osteoblastos e osteoclastos, sendo que o seu principal efeito é observado nestes (Sunyer et al., 1999; Riggs, 2000; Harada & Rodan, 2003). O estrógeno suprime a secreção de IL-6 pelas células osteoblásticas da medula óssea (Riggs, 2000). Além disso, camundongos que não expressam o gene para IL-6 (*knockout*) não apresentam perda óssea após a OVX (Poli et al., 1994). Portanto, a IL-6 é considerada uma molécula crítica através da qual os osteoblastos estimulam a remodelação óssea.

Algumas hipóteses sugerem deficiência na regulação de calcitonina, 1,25diidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D) e paratormônio (PTH) como as principais causas da osteoporose pós-menopausa (Kalu *et al.*, 1989). A deficiência de estrógeno aumenta a sensibilidade do esqueleto aos efeitos reabsortivos do PTH, levando, conseqüentemente, a uma discreta elevação nos níveis séricos de cálcio. Desse modo, a elevação da calcemia suprime a secreção de PTH, reduzindo a formação renal de 1,25(OH)₂D, o que, por sua vez, limita a absorção intestinal de cálcio (Raisz *et al.*, 2003). Entretanto, mudanças nos níveis séricos de hormônios reguladores de cálcio não parecem ser fatores isolados e obrigatórios para que ocorra perda óssea na osteoporose (Kalu *et al.*, 1989). Além disso a descoberta de receptores de estrógeno (RE) em osteoblastos sugere que a deficiência deste hormônio pode alterar diretamente a formação óssea (Sunyer *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001).

2.2 Efeito da ausência de estrógeno sobre o reparo ósseo:

Muita atenção tem sido dada à influência da OVX no processo de reparo ósseo (Kubo *et al.*, 1999; Namkung-Matthai *et al.*, 2001), com diminuição da densidade mineral óssea após fratura em animais ooforectomizados (Lindholm, 1978) e redução da área do calo ósseo neoformado (Namkung-Matthai *et al.*, 2001). Além disso, a deficiência de estrógeno parece causar atraso no reparo ósseo mesmo 12 meses após a fratura (Kubo *et al.*, 1999). Por outro lado, interessantes achados demonstram que a osteopenia em animais após OVX não altera os mecanismos de reparo ósseo após ocorrência de fratura (Langeland, 1975; Blythe & Buchsbaum, 1976).

2.3 Reparo alveolar após exodontia:

O processo de reparo alveolar após exodontia em animais é assunto amplamente estudado e a seqüência de eventos é conhecida em detalhes (Hsieh *et al.*, 1994; Devlin *et al.*, 1996; Carvalho *et al.*, 1997b; Devlin, 2000). Inicialmente o coágulo preenche o alvéolo e passa por processo de maturação (Guglielmotti & Cabrini, 1985), sendo aos poucos substituído por tecido de granulação (Smith, 1974). Fibroblastos, provenientes do ligamento periodontal remanescente, multiplicam-se e apresentam pronunciada atividade de síntese de fibras colágenas do tipo I e III (Green *et al.*, 1969; Lin *et al.*, 1994; Devlin,

2000). Cerca de três dias após a exodontia, as células epiteliais mostram intensa atividade mitótica com a finalidade de recobrir a ferida. Ao longo deste período inicial, ocorre a angiogênese (Devlin et al., 1996; Carvalho et al., 1997b; McMillan, 1999). Após 4 a 5 dias, inicia-se a substituição do tecido conjuntivo denso por tecido ósseo neoformado, com deposição de osteóide pelos osteoblastos (Iizuka et al., 1992; Devlin, 2000), enquanto osteoclastos iniciam a reabsorção das cristas e septos alveolares (Smith, 1974; Devlin, 2000). Fibras de colágeno tipo I, principal componente da matriz óssea orgânica (Domon et al., 1999), também são formadas, sendo bem evidentes 6 dias após a exodontia. Colágeno I e III estão distribuídos pelo alvéolo, de maneira similar às trabéculas ósseas neoformadas, ou seja, das paredes alveolares para o centro (Devlin, 2000). Uma semana após a exodontia, o epitélio recobre quase a totalidade do alvéolo e aumenta a deposição de tecido ósseo intra-alveolar (Guglielmotti & Cabrini, 1985; Devlin et al., 1996). Cerca de 10 dias após a exodontia, o alvéolo está completamente recoberto por epitélio. Osso jovem está presente em todo o alvéolo, imaturo e fibrilar na região central e mais organizado nas proximidades das paredes ósseas (Hsieh et al., 1994; Devlin et al., 1996). Entre 2 e 3 semanas, ocorre união e espessamento das trabéculas ósseas neoformadas, juntamente com diminuição dos espaços medulares e vasculares (Carvalho et al., 1983; Iizuka et al., 1992; Devlin et al., 1996; Carvalho et al., 1997a). Após 21 dias, predominam os processos de remodelação óssea, os quais se estendem por meses após a remoção do dente, até não haver diferença estrutural entre o osso neoformado e o osso alveolar adjacente (Green et al., 1969; Guglielmotti & Cabrini, 1985; Kingsmill, 1999).

2.4 Efeito da ausência de estrógeno sobre reparo alveolar:

A influência da ausência de estrógeno no processo de reparo alveolar tem sido pouco estudada e seus efeitos em ossos do complexo maxilo-mandibular ainda não estão bem estabelecidos (Elovic *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2001). Atraso na neoformação óssea intra-alveolar foi relatado após OVX, com diminuição do número de fibroblastos, de capilares e de tecido ósseo neoformado, simultaneamente com reabsorção das trabéculas ósseas jovens. Este atraso no reparo alveolar foi detectado a partir do 4º dia após exodontia de incisivos em ratos que haviam sido submetidos a OVX 21 dias antes da remoção dental

(Salomao et al., 1974). No entanto, esta demora do reparo associada ao aumento da reabsorção óssea pode não ser detectada inicialmente, mas após um a dois meses da OVX (Tanaka et al., 2001). Também pode ocorrer aumento da neoformação óssea na face palatina e reabsorção na face vestibular da maxila após exodontia em ratos submetidos a OVX (Wronski et al., 1988; Hsieh et al., 1995). Animais ooforectomizados apresentam aumento dos espaços medulares e do número de osteoclastos na superfície da crista alveolar (Jahangiri et al., 1997), apesar de uma menor atividade de reabsorção osteoclástica nesta região ter sido relatada em animais submetidos a OVX (Li & Nishimura, 1994). A presenca de material calcificado com características intermediárias entre osso e cartilagem foi observada na ausência de estrógeno, possivelmente pelo fato das células osteoprogenitoras terem a capacidade de expressar fenótipo condrogênico (Li & Nishimura, 1994). OVX pode causar diminuição da expressão de colágeno tipo I em cristas alveolares após exodontia de molares (Jahangiri et al., 1997) ou desarranjo das fibrilas de colágeno mesmo na ausência de procedimentos cruentos (Tzaphlidou & Kafantari, 2000). Redução significativa na espessura da mandíbula após exodontia dos molares superiores foi observada em ratas ooforectomizadas (Elovic et al., 1994), assim como diminuição da espessura e dureza do osso alveolar (Tanaka et al., 2001).

2.5 Metaloproteinases de matriz (MMPs):

As metaloproteinases (MMPs) compreendem um grupo de 21 endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, com capacidade para degradar componentes da matriz orgânica dos tecidos conjuntivos em pH fisiológico (Hill *et al.*, 1994; Silva *et al.*, 2001; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Chau *et al.*, 2003). Estas enzimas regulam eventos fisiológicos, como a reparação de feridas e eventos patológicos, como invasão tumoral e metástases, doença periodontal e artrite. São divididas em 6 subgrupos: colagenases intersticiais (MMP-1, -8, -13), gelatinases (MMP-2, -9), estromelisinas e *estromelysin-like* (MMP-3, -10, -11, -12), matrilisinas (MMP-7, -26), MMPs de membrana celular (MMP-14, -15, -16, -17, -24, -25) e outras MMPs (MMP-19, -20, -23, -28) (Birkedal-Hansen, 1993a; Vu & Werb, 2000; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). A estrutura básica das MMPs inclui um peptídeo de sinalização, um pró-peptídeo, um domínio catalítico e um domínio

hemopexin-like (Seiki, 2002; Chau *et al.*, 2003). As gelatinases possuem um domínio adicional *fibronectin-like* em seu domínio catalítico (Chau *et al.*, 2003) o qual parece estar envolvido em sua união com a gelatina (Olson *et al.*, 2000; Ritty & Herzog, 2003). A quebra do pró-peptídeo das MMPs expõe seu sítio catalítico, tornando a enzima ativa (Chau *et al.*, 2003).

A molécula de MMP-1 (colagenase-1, colagenase intersticial, colagenase de fibroblastos) possui aproximadamente 55 kDa em forma latente e 41 kDa na forma ativa (Chau *et al.*, 2003), sendo secretada por fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, monócitos, macrófagos, condrócitos, osteoblastos e osteócitos, mas não por osteoclastos (Fuller & Chambers, 1995; Gack *et al.*, 1995; Pilcher *et al.*, 1997; Domon *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2001; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). Esta colagenase degrada colágenos tipo I, II, III, VII, VIII, X e gelatina (Chau *et al.*, 2003). Sua atividade enzimática inicia a degradação dos colágenos fibrilares (Rittie & Fisher, 2002), clivando sua tripla hélice em local específico nas cadeias $\alpha 1 e \alpha 2$: Gly⁷⁷⁵-Ile/Leu⁷⁷⁶, resultando em dois fragmentos de tamanhos conhecidos ³/₄ e ¹/₄ (Aimes & Quigley, 1995; Krane *et al.*, 1996; Pilcher *et al.*, 1997; Lauer-Fields *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Lauer-Fields *et al.*, 2003). Dessa forma, MMP-1 participa no processo de reabsorção óssea (Delaisse *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 1995), sendo também necessária para a migração de células epiteliais sobre a estrutura de colágeno tipo I (Pilcher *et al.*, 1997; Vu & Werb, 2000; Soo *et al.*, 2000).

O pró-peptídeo da MMP-2 (gelatinase A, colagenase tipo IV) possui cerca de 72 kDa, enquanto sua forma ativa possui aproximadamente 67 kDa (Chau *et al.*, 2003), sendo secretada por fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, condrócitos, osteoblastos e macrófagos (Birkedal-Hansen, 1993b; Pirila *et al.*, 2002; Mirastschijski *et al.*, 2002a; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). Esta enzima é capaz de degradar gelatina, colágenos tipo IV, V, VII e X, fibronectina, elastina e plasminogênio (Potier *et al.*, 2001; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Chau *et al.*, 2003). A principal forma de ativação de MMP-2 ocorre na superfície celular pelo complexo MT1-MMP/TIMP-2 (MMP de membrana celular tipo-1/inibidor tecidual de MMP-2) com subseqüente quebra do pró-peptídeo da MMP-2 por outra molécula de MT1-MMP adjacente e livre de TIMP-2. (Moalli *et al.*, 2002; Ratnikov *et al.*, 2002; Seiki, 2002; Toth *et al.*, 2003; Chau *et al.*, 2003). No entanto, outras MMPs

também estão envolvidas na ativação extracelular de MMP-2, tais como MMP-1, -7 e -13 (Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). Receptores de estrógeno modulam a expressão dessa enzima através de sua interação com o fator nuclear-κB (NF-κB), além da regulação direta da MMP-2 mediada pelo elemento de resposta ao estrógeno (ERE), presente em sua região promotora (Potier *et al.*, 2001; Ritty & Herzog, 2003). Apesar de sua principal atividade enzimática ser a degradação de colágeno desnaturado (gelatina), MMP-2 possui importante papel na reparação tecidual por apresentar atividade de colagenase, clivando a tripla hélice de colágenos fibrilares de maneira similar à MMP-1 e -8 (Aimes & Quigley, 1995; Lauer-Fields *et al.*, 2000; Lauer-Fields *et al.*, 2003), gerando ainda outros fragmentos menores além daqueles clássicos (Patterson *et al.*, 2001). Sugere-se que MMP-2 degrade a molécula de colágeno tipo I primeiro pela quebra da tripla hélice em fragmentos $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ dependente de seu domínio *hemopexin-like* e finalizando com a hidrólise destes produtos pelas repetições *fibronectin-like* (Patterson *et al.*, 2001). Desse modo, sua capacidade de degradar colágeno tipo I sugere importante participação em processos de remodelação da matriz orgânica (Aimes & Quigley, 1995).

MMP-9 (gelatinase B, colagenase tipo IV) possui cerca de 92 kDa em sua forma latente e cerca de 86 kDa em sua forma ativa (Limb *et al.*, 2002; Chau *et al.*, 2003). Esta enzima é secretada por fibroblastos, células epiteliais, neutrófilos, monócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoclastos (Birkedal-Hansen, 1993b; Uusitalo *et al.*, 2000; Soo *et al.*, 2000; Pirila *et al.*, 2002; Mirastschijski *et al.*, 2002b; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). MMP-9 degrada gelatina e colágenos tipo IV e V (Potier *et al.*, 2001; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Chau *et al.*, 2003). A ativação da MMP-9 ocorre no espaço extracelular através de uma cascata de enzimas ativadas, iniciada por MT1-MMP e mediada por MMP-2, -3 e – 13 (Fridman *et al.*, 1995; Moalli *et al.*, 2002; Seiki, 2002; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Toth *et al.*, 2003). Apesar da MMP-9 não possuir ERE, o estrógeno também participa de sua regulação através de outros elementos regulatórios importantes tais como a proteína ativadora-1 (AP-1) e NF-κB, os quais interagem com os receptores de estrógeno estimulando (via REα - *c-jun*) ou inibindo (via REβ - *c-fos*) a transcrição desta enzima (Potier *et al.*, 2001; Potier *et al.*, 2002; Moalli *et al.*, 2002; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003). Diferentemente de MMP-2, a MMP-9 quebra somente colágeno tipo I desnaturado (Aimes & Quigley, 1995). Porém, esta enzima é de extrema importância para o recrutamento de osteoclastos na remodelação óssea, bem como na osteogênese de ossos longos (Vu & Werb, 2000).

As MMPs são normalmente expressas em baixos níveis (Soo *et al.*, 2000; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003), porém seus genes podem ser ativados em condições fisiológicas ou patológicas (Chau *et al.*, 2003). A transcrição das MMPs é um evento complexo e controlado por fatores de crescimento e por citocinas (Birkedal-Hansen, 1993a). Alguns destes fatores estão associados com o aumento da remodelação óssea na osteoporose. TNF- α , fator de crescimento fibroblástico- β (FGF- β), IL-1, EGF (fator de crescimento epidérmico) e PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) estimulam a transcrição das MMPs (Gowen & Mundy, 1986; Bertolini *et al.*, 1986; Mirastschijski *et al.*, 2002a; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Chau *et al.*, 2003), enquanto IFN- γ (interferon gama), IFN- β , TGF- β (fator de crescimento transformante beta), BMP (proteína óssea morfogenética), ácido retinóico, estrógeno, progesterona e glucocorticóides reduzem a expressão desta família de enzimas (Birkedal-Hansen, 1993a; Chau *et al.*, 2003).

As metaloproteinases predominantes no tecido ósseo são a MMP-9 e -13 (Uusitalo *et al.*, 2000), sendo que as MMP-2 e -9 desempenham papel significativo na reabsorção óssea através da degradação de colágeno tipo I nativo e desnaturado (Hill *et al.*, 1994). MMP-9 é a mais abundante MMP em osteoclastos e a principal envolvida na atividade invasiva dos mesmos (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Delaisse *et al.*, 2000). Aumento constante da atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9 foi observado durante o processo de reparo ósseo alveolar após exodontia de molares inferiores de ratos entre o 1º e o 6º dia (Silva *et al.*, 2001). No entanto, os mecanismos através dos quais as MMPs participam dos processos de reabsorção óssea permanecem incertos (Birkedal-Hansen, 1993a).

3. PROPOSIÇÃO:

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da ausência de estrógeno sobre o processo de reparo alveolar após exodontia do primeiro e segundo molares inferiores de ratas Wistar com 4 semanas de idade e cerca de 100 a 150 gramas de peso, por meio de:

- Determinação da expressão de MMP-2 e -9 e cadeias α1(I) dos colágenos tipos I e III por meio de RT-PCR semi-quantitativa.
- 2. Verificação da produção de MMP-1, -2 e -9 e dos colágenos tipos I e III através de western blot.
- 3. Análise da atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9 por meio de zimogramas.

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1. MANUSEIO DOS ANIMAIS E DELINEAMENTO DO EXPERIMENTO:

4.1.1 Manuseio geral dos animais:

Foram utilizadas 66 ratas (*Ratus norvegicus albinus*, Wistar) com 4 semanas de idade e peso entre 100 a 150 gramas. Grupos de 4 animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno e receberam, exceto quando especificado de outra forma, alimentação granulada e água *ad libitum*, sendo pesados semanalmente.

4.1.2 Delineamento do experimento:

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de 33 ratos cada, sendo um grupo constituído por animais pseudo-ooforectomizados (grupo controle) e o outro por animais ooforectomizados (grupo OVX) como visto na tabela 1. O número de animais em cada grupo foi previamente determinado a partir de testes piloto com cada técnica proposta.

Tabela 1. Distribuição dos subgrupos de animais para cada experimento e os respectivos tratamentos recebidos. Os grupos controle (Cont) e ooforectomizado (OVX) possuem 33 animais cada.

Técnicas e períodos	3 dias		5 dias		7 dias		Total
-	Cont	OVX	Cont	OVX	Cont	OVX	
RT-PCR	4	4	4	4	4	4	24
Western blot	4	4	4	4	4	4	24
Zimograma	3	3	3	3	3	3	18
Total	11	11	11	11	11	11	66

4.1.3 Ooforectomia:

Para a ooforectomia, cada animal foi pré-anestesiado com cloridrato de tiazina 2% (Rompun[®] - Bayer, Brasil, 5mg/kg, intramuscular) e, depois de verificados os sinais de sedação, anestesiado com cloridrato de ketamina 10% (Dopalen[®] - Agribands, Brasil, 10mg/kg, intramuscular). A tricotomia foi realizada manualmente e a antissepsia feita com álcool iodado na região correspondente ao ovário a ser removido. Com o animal posicionado lateralmente, os ovários localizam-se aproximadamente a 1cm de distância da coluna vertebral e a 1cm abaixo da última costela. Uma incisão de 1cm foi realizada nesta

região, paralelamente ao longo eixo do animal, seguindo-se a divulsão dos tecidos subjacentes até a exposição do ovário. Foi feita a ligadura logo abaixo desse, com fio agulhado de nylon monofilamentar 5.0 (Mononylon[®] 5.0, Ethicon, Brasil), seguindo-se a remoção do ovário. O material removido foi fixado em formol tamponado a 10% e processado histologicamente para confirmação da remoção dos órgãos. Os tecidos foram reposicionados e a sutura feita em planos com fios de nylon monofilamentar 5.0 e 4.0. Procedimento similar foi realizado no lado esquerdo do animal, na mesma sessão cirúrgica. Os animais do grupo controle (animais pseudo-ooforectomizados) passaram pelas mesmas etapas cirúrgicas, com exceção da remoção dos ovários. Os animais permaneceram em gaiolas individuais após a cirurgia e receberam ração e água *ad libitum* até a recuperação total da cirurgia.

4.1.4 Extração dental:

Os animais foram pesados semanalmente durante todo o experimento. Três semanas após a remoção dos ovários, foram novamente anestesiados utilizando-se o mesmo protocolo descrito para a ooforectomização. Tão logo os sinais de anestesia foram observados, o animal foi posicionado em aparato similar ao de Doku (Doku et al., 1966) e uma gaze umedecida foi colocada sobre os olhos dos animais a fim de se evitar o ressecamento e opacificação das córneas. A gengiva ao redor do primeiro molar inferior direito foi descolada com hollemback 3ss e o dente seccionado no sentido vestíbulo-lingual com auxílio de broca carbide esférica $\frac{1}{4}$ em turbina de alta rotação. Irrigação constante com soro fisiológico estéril foi mantida com o objetivo de manter a loja cirúrgica limpa e evitar superaquecimento dos tecidos. A avulsão das raízes foi realizada com o auxílio de micro-cinzel cirúrgico biangulado com ponta ativa de 2mm de espessura e pinça Kelly curva adaptada como fórceps. O segundo molar foi luxado por meio de movimentos de alavanca aplicados entre esse e o terceiro molar, utilizando-se micro-cinzel e hollemback, finalizando-se a remoção com pinça Kelly curva. A sutura foi realizada com fio de nylon monofilamentar 5.0 agulhado e pinça Kelly reta adaptada como porta-agulha. Procedimento similar foi realizado no lado esquerdo da mandíbula. Durante o procedimento cirúrgico foram tomados cuidados para remoção de excessos de sangue e debris da cavidade bucal do animal. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais após a cirurgia e receberam água *ad libitum* por cerca de 20 a 24 horas. Os animais receberam ração moída durante a primeira semana do pós-cirúrgico para reduzir o trauma pós-operatório.

4.1.5 Sacrifício dos animais e considerações éticas:

Este experimento foi submetido ao comitê de ética para experimentação em animais do Instituto de Biologia da UNICAMP e aprovado antes do início dos experimentos (Número do Protocolo: 344-2). Todas as medidas possíveis foram tomadas para evitar sofrimento desnecessário dos animais, bem como para reduzir o número de animais utilizados e as perdas durante o trans e pós-operatório. Foram seguidas as normas éticas internacionais de manejo de animais de laboratório (OLAW – Office Of Laboratory Animal Welfare, 2000). O sacrifício dos animais foi realizado por deslocamento cervical e ocorreu aos 3, 5, e 7 dias após as exodontias, para 3 ou 4 ratos de cada grupo experimental, como descrito anteriormente na tabela 1.

4.1.6 Comprovação da ooforectomia:

A comprovação da eficácia do procedimento de ooforectomia foi realizada por meio de procedimentos macroscópicos, microscópicos e radiográficos.

a) Avaliação microscópica dos ovários:

Os ovários removidos de cada animal foram fixados em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas, em embalagens individuais identificadas. O material foi incluído em parafina, cortado com 5µm de espessura, corado com hematoxilina e eosina (HE) e analisado em microscopia óptica para confirmação da remoção dos ovários.

b) Lavado vaginal:

O ciclo reprodutivo da rata é denominado ciclo estral com duração média de 4 a 5 dias, sendo dividido em quatro fases: proestro, estro, metaestro (diestro I) e diestro (diestro II) (Freeman, 1994; Fata *et al.*, 2001), as quais podem ser caracterizadas pela distribuição morfológica de seus três tipos celulares: células epiteliais jovens, células epiteliais maduras e leucócitos (Marcondes *et al.*, 2002).

A técnica utilizada para determinação da fase do ciclo estral foi realizada conforme metodologia previamente estabelecida (Marcondes *et al.*, 2002). A secreção vaginal das ratas foi coletada no 21º dia do estudo, pela manhã, com inserção de pipeta de plástico contendo 10µl de solução salina estéril (NaCl 0,9%) na vagina do animal não anestesiado. O material aspirado foi colocado sobre lâmina de vidro e visualizado a fresco, em microscópio óptico, em aumento de 40 vezes. As células foram classificadas em:

- células epiteliais jovens: arredondadas e nucleadas
- células epiteliais maduras: anucleadas e com formato irregular
- leucócitos: células inflamatórias pequenas e arredondadas

A fase do ciclo estral de cada animal foi classificada de acordo com a proporção de cada tipo celular (Marcondes *et al.*, 2002), como descrito abaixo:

- proestro: predomínio de células epiteliais nucleadas
- estro: predomínio de células epiteliais anucleadas
- metaestro: proporções iguais de células epiteliais jovens, maduras e leucócitos
- diestro: predomínio de leucócitos

A ausência das fases estro e proestro indicam sucesso do procedimento de ooforectomização.

c) Avaliação visual dos úteros:

A abertura do abdômen de cada animal foi realizada após o sacrifício, expondo-se o útero e permitindo a visualização macroscópica da atrofía dos cornos uterinos, indicando o sucesso da ooforectomização. A avaliação permitiu a categorização dos animais em dois grupos: com atrofía (grupo OVX) e sem (grupo controle).

d) Avaliação densitométrica das tíbias:

Após o sacrificio, as tíbias de cada animal foram removidas, dissecadas, fixadas em formol neutro tamponado a 10% por 24 horas e radiografadas em filme oclusal (Ultra Speed DF-50[®], Eastman Kodak Company, E.U.A.) previamente identificado. Foi utilizado

aparelho radiográfico periapical (RX 6010[®], Gnatus, Brasil), com padrão de 65 kVA, tempo de exposição de 0,5 segundo e 21cm de distância foco-filme em posicionador confeccionado para este fim. Penetrômetro de alumínio com degraus de 1mm de espessura, cobrindo a borda esquerda da radiografía, também foi utilizado. Um degrau com densidade radiográfica similar a do osso avaliado foi previamente estabelecido como medida padrão durante as leituras densitométricas. As radiografias foram reveladas em processadora automática (Level 360[®], J Morita, Japão) utilizando soluções fixadora e reveladora recém preparadas e testadas. Cerca de 4 tíbias foram posicionadas em cada radiografia, previamente identificada, de acordo com o grupo de animais correspondente e mantidas em envelopes individuais. As radiografias foram digitalizadas em scanner (GS 700[®], BioRad Laboratories, E.U.A.) e analisadas pelo respectivo programa de computador (Molecular Analyst 1.5[®], BioRad Laboratories, E.U.A.). A densitometria foi realizada em área de tamanho padronizado (1,806mm²) sobre o côndilo lateral da porção proximal da tíbia. A mesma área foi aplicada sobre o degrau estabelecido, oferecendo uma medida padrão para cada radiografia. A divisão da leitura da área operada pela leitura de área similar do padrão permitiu obter razão equilibrada, eliminando ou reduzindo ao máximo as variações radiográficas causadas por fatores independentes à reparação óssea.

e) Avaliação histomorfométrica das tíbias:

Após terem sido radiografadas, as tíbias foram descalcificadas em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), em temperatura ambiente e sob agitação constante por cerca de 5 dias. Em seguida, o material foi lavado em água corrente por 12 horas e processado para a realização dos cortes histológicos, os quais foram corados com HE de acordo com as normas da AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*). A determinação da densidade volumétrica de osso na porção proximal das tíbias foi realizada com ocular kpl 10x com retículo de integração II Zeiss de 100 pontos quadriculados, objetiva de 10x e programa de análise computadorizada de imagens (KS 400[®] Karl Zeiss, Alemanha). Foram contados 100 pontos sobre as estruturas histológicas em 3 campos, perfazendo 300 pontos por tíbia (Figura 1).



Figura 1: Campos utilizados para determinação da densidade volumétrica de osso a partir de cortes histológicos de tíbias de animais controle e OVX, corados com HE.

4.2. Reação de polimerase em cadeia por transcriptase reversa (RT-PCR):

Exceto quando especificado, todos os reagentes utilizados nesta técnica pertencem a Invitrogen Life technologies, E.U.A.

4.2.1 Desenho e confecção dos *primers*:

a) Para utilização de *primers* corretos e específicos para cada gene, foram utilizadas as seguintes seqüências dos mRNAs do GenBankTM (NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – NIH, E.U.A. - http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), como demonstrado na tabela 2.

Proteína	mRNA
Beta-actina	gi 13592132
MMP-2	gi 13591990
MMP-9	gi 13591992
Colágeno tipo I (a1)	gi 2894105
Colágeno tipo III (α1)	gi 27671044

Tabela 2. Seqüências dos mRNAs obtidas no GenBankTM, para cada proteína estudada.

b) Em seguida, foram determinadas as fases abertas de leitura (ORF – *open reading frame*) de cada mRNA, através da identificação do início das fases representado pela seqüência ATG, assim como dos *stop* códons TAG, TGA ou TAA.

c) O desenho de cada *primer* foi realizado dentro da ORF, não muito distante do sinal de clivagem para colocação da cauda de poli-A (TTATTT). O programa utilizado para o desenho dos *primers* foi o Amplify 1.2 software[®] (Universidade de Wisconsin, E.U.A.) para Macintosh[®]. Os produtos finais de cada par de *primers* possuem aproximadamente 200 pares de base (pb), como descrito na tabela 3. A localização de cada par de *primers* em cada seqüência de seu respectivo mRNA está mostrada em ANEXOS.

cada proteína analisada.			
Proteína	pb		Primers
Beta-actina	220	Forward	TGA CAT CCG TAA AGA CCT CT
		Reverse	CTG CTT GCT GAT CCA CAT CT
MMP-2	199	Forward	ACA TCT TTG CAG GAG ACA AG
		Reverse	CTC TTG AGA CTT TGG TTC T
MMP-9	223	Forward	CAT GGC CTA TCC CAC A
		Reverse	TCC TCC GTG ATT CGA GAA C
Colágeno tipo I (a1)	212	Forward	AGA GTA CTG GAT CGA CCC TAA
		Reverse	AAC CTT CGC TTC CAT ACT C
Colágeno tipo III (α1)	201	Forward	TGC TGC CAT TGC TGG AGT TGG A
		Reverse	TGG CAG AAT TTC AGG TCT C

Tabela 3. Relação de cada par de *primers* e do tamanho do produto final em pares de base (pb) para cada proteína analisada.

d) A especificidade de cada *primer*, assim como do produto final amplificado por cada par de *primers*, foi verificada por meio de *BLAST* no próprio GenBankTM.

4.2.2 Curetagem dos alvéolos:

Após o sacrifício, a mandíbula de cada animal foi dissecada com auxílio de tesoura de ponta reta e a mucosa alveolar foi incisada com lâmina de bisturi número 15. Os alvéolos foram curetados com escavador de dentina número 16 e todo o material curetado a partir de cada subgrupo de 4 animais foi acondicionado em um tubo único de polipropileno, imediatamente congelado em gelo seco e posteriormente armazenado a -80°C.

4.2.3 Processamento do material dos alvéolos:

O material retirado dos alvéolos de 04 animais de cada tempo experimental foi transferido para graal de vidro estéril, previamente lavado com detergente para RNase (Ambion, E.U.A.). A maceração do precipitado foi realizada com 5ml de reagente TRIzol,

seguida por homogeneização da solução por 5 minutos a 24°C. O material foi transferido para outro tubo de polipropileno e incubado com 1ml de clorofórmio (Merck KgaA, Alemanha) por 3 minutos a 24°C, seguido por centrifugação a 9000 rpm, a 4°C por 15 minutos. A fase aquosa foi então transferida para tubo de polipropileno de 15ml e incubada por 10 minutos a 24°C, após adição de 2,5ml de isopropanol (Merck). Novamente o material foi centrifugado a 9000 rpm, a 4°C por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O precipitado de RNA foi lavado com etanol gelado a 75% (Merck) e centrifugado a 6000 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado desidratado por cerca de 1 hora a 24°C. Em seguida, o material foi suspenso em 20µl de água deionizada livre de nucleases e incubado a 56°C por 10 minutos.

4.2.4 Determinação da concentração, pureza e qualidade do material:

Para determinação da concentração e pureza do material, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) das soluções de RNA total em espectrofotômetro (Spectronic – GenesisTM2, E.U.A.) em cuvetas de quartzo, para os comprimentos de onda de 260 e 280nm. O material foi considerado puro quando a razão entre as duas leituras ficaram entre 1,7 e 1,8.

Para verificação da qualidade dos RNAs obtidos, cerca de 2µg de cada amostra foram separadas em gel de agarose a 1,2%, por meio de eletroforese a 100V constantes, em tampão contendo 20mM de MOPS, 5mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado através do programa Image Master[®] VDS (Pharmacia Biotech, Israel). A qualidade do material foi determinada pela presença das duas bandas do RNA ribossômico (28S e 18S), assim como pela presença da banda correspondente ao RNA transportador (Figura 2, ANEXOS).

4.2.5 Transcrição reversa:

Todas as amostras de RNA total extraído foram tratadas com 1 U de DNase I (Amplification Grade) por 10 minutos a 24°C, visando eliminar possíveis traços de DNA genômico contaminante. Para a síntese de cDNA, cerca de 5µg de RNA total foram reversamente transcritos em uma reação com volume final de 21 µl contendo 0,5 mM de

cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 40 U de inibidor de RNAse, 50 U da enzima Superscript III RT, 0,5 μg de *primers* Oligo-dT e tampão da reação 1x, contendo 1,5 mM MgCl₂. Esta solução foi incubada por 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C, finalizando a 4°C. Em seguida, a solução foi incubada por 20 minutos a 37°C com 2 U da enzima RNase H (*E.coli*). Reações sem a presença da enzima RT foram usadas como controles negativos.

4.2.6 Determinação do número de ciclos de PCR por primer:

Para assegurar que a amplificação por PCR ocorresse na fase exponencial (i.e., para que mudanças nos níveis originais de transcrição resultassem em mudanças relativamente similares na densidade do produto em eletroforese), cada par de *primers* foi amplificado em números de ciclos individualizados (Palmon *et al.*, 2001), caracterizando a RT-PCR semiquantitativa. Inicialmente, cada par de *primers* foi amplificado em números diferentes de ciclos, as amostras foram separadas em géis de agarose a 1,8% e as bandas foram submetidas à densitometria óptica. O número de ciclos para cada par de *primers* foi estabelecido de acordo com o aumento da D.O. das bandas, tendo sido selecionados os valores de 25 ciclos para beta-actina, 45 ciclos para MMP-2, 45 ciclos para MMP-9, 20 ciclos para colágeno tipo I (α I) e 40 ciclos para colágeno tipo III (α I) (Figura 1, ANEXOS).

4.2.7 PCR:

Para a amplificação específica dos cDNAs através de PCR 0,2mM de cada par de *primers* específico foram adicionados em 50µl de solução contendo 2µl de cada cDNA, 2 U da enzima Taq DNA polimerase, 0,05mM (5µM) de dNTP, 1,5mM de MgCl₂ e tampão da reação 1x. Os tubos foram levados ao termociclador (Gene Amp[®] PCR System 9700 – PE Applied Biosystems, E.U.A.), seguindo-se reações cíclicas de 45 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C e 45 segundos a 72°C. Cerca de 10µl do material amplificado foram visualizados em géis de agarose a 1,8% por meio de eletroforese a 100V constantes, em tampão contendo 45mM de Tris, 45mM de ácido bórico e 0,1mM de EDTA. Os géis foram corados com brometo de etídio e visualizados através do programa Image Master[®] VDS (Pharmacia Biotech).

4.2.8 Leitura dos resultados:

As imagens digitalizadas foram importadas para o programa de computador específico para a realização da densitometria óptica das bandas (Molecular Analyst). Para cada banda estudada, foram consideradas as áreas de pico correspondentes como valor da D.O.. Área homogênea na mesma altura das bandas foi utilizada como background para minimizar variações. Todas as bandas tiveram seus valores normalizados pelo valor da leitura da banda da beta-actina respectiva do grupo. Para a análise estatística, foram realizados 3 géis com o grupo de amostras mais representativo para a obtenção do número necessário de valores para a realização do teste *t* de Student.

4.3. WESTERN BLOT:

4.3.1 Curetagem dos alvéolos:

A obtenção do material alveolar para western blot foi realizada da mesma forma descrita para RT-PCR (item 4.2.2).

4.3.2 Extrato protéico:

As proteínas foram extraídas por maceração com graal e pistilo de vidro, utilizandose tampão de lise contendo 10% de sacarose, 1% de Triton-X, 20mM de Tris pH 8,0, 137mM NaCl, 10% de glicerol, 2mM de EDTA pH 8,0 e 1mM de NaF. Os inibidores de proteinases PMSF (1mM), NEM (1µM), benzamidina (1µM), inibidor de tripsina (*soybean tripsin inhibitor*) (1µM) e pepstatina A (1µM) foram adicionados ao tampão de lise imediatamente antes do uso. Cerca de 650µl deste tampão foram colocados em graal com o material curetado de 4 animais, sendo mantido no gelo por 30 minutos e agitado a cada 10 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado, sendo uma amostra de 2,5µl separada para quantificação protéica. Todas as alíquotas dos extratos protéicos foram imediatamente congeladas em gelo seco e estocadas a -80°C até o momento do uso. A quantificação das proteínas totais de cada extrato foi realizada a partir do método de Bradford.

4.3.3 Dosagem protéica:

O método de Bradford (Bradford, 1976) foi utilizado para quantificação das proteínas totais dos extratos totais protéicos a partir do material removido dos alvéolos e dos meios de cultura condicionados. Foram utilizados 750µl do reagente de Bradford (BioRad) em 747,5µl água deionizada (1500µl), descontando-se 2,5µl para a amostra protéica. Solução de branco (750µl de solução de Bradford, 747,5µl de água deionizada e 2,5µl do tampão de lise), em luz visível de comprimento de onda de 595nm foi usada para calibrar o espectrofotômetro (Spectronic). Os valores da absorbância das amostras foram aplicados ao gráfico da curva de Bradford, feito em planilha eletrônica (EXCEL[®] 9.0/2000, Microsoft, E.U.A.) a partir das leituras da solução padrão de albumina sérica bovina (BSA – Sigma) nas concentrações de 1,0 a 10µg/µl, realizadas no mesmo procedimento. Valores de absorbância próximos às extremidades das curvas do gráfico não foram utilizados, dando-se preferência a sua região central, caracterizada por uma linha reta.

4.3.4 Western blot:

Cerca de 33,8µg de proteína total foram homogeneizados em tampão de amostra redutor 4x concentrado contendo 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol, 0,001% azul de bromofenol e 2% de beta-mercaptoetanol. As proteínas foram desnaturadas a 100°C por 5 minutos e então separadas eletroforeticamente em SDS-PAGE a 8%, em tampão contendo 2,5mM de Tris-HCl pH 8,0, 19mM de glicina e 0,3mM de SDS. A seguir as amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schuell, E.U.A.) em tampão contendo 1,2mM de Tris-HCl pH 8,0, 9,6mM de glicina e 20% de metanol. A eficácia das transferências foi verificada através da coloração das membranas com o corante Ponceau S (Sigma Chemical Company, E.U.A.), seguida por bloqueio em uma solução contendo 5% de leite em pó desnatado (Nestlé, Brasil) dissolvido em tampão 20mM Tris-HCl pH 7,6 contendo 150mM de NaCl e 0,1% de Tween 20 (TBST) por 18 horas a 4°C. As membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos primários diluídos em TBST com 5% de leite em pó desnatado: anti-MMP-1 (The Binding Site, Inglaterra, 1:150), anti-MMP-2 (The Binding Site, Inglaterra, 1:500),

anti-MMP-9 (The Binding Site, 1:150), anti-colágeno tipo I (Santa Cruz Biotechnology, E.U.A., 1:300), anti-colágeno tipo III (Santa Cruz, 1:300) e anti-beta-actina (Sigma, 1:40.000), por 2 horas a 24°C, sob agitação constante. Foram então realizadas quatro lavagens de 15 minutos cada com TBST, seguidas de incubação com anticorpos secundários conjugados a peroxidase (Sigma) nas diluições de 1:15.000 (anti-IgG de ovelha para as reações contra MMP-1), 1:10.000 (anti-IgG de ovelha para as reações contra MMP-2), 1:8.000 (anti-IgG de ovelha para as reações contra colágeno tipo I e III) e 1:1.000 (anti-IgG de camundongo para as reações contra beta-actina), por 1 hora a 24°C, sob agitação constante. As membranas foram novamente lavadas com TBST, conforme descrito anteriormente. As reações foram reveladas através de quimioluminescência, utilizando-se o kit de detecção ECL – Western Blotting Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, E.U.A.), e expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Kodak).

4.3.5 Leitura dos resultados:

Após secagem, as películas radiográficas foram digitalizadas em scanner (GS 700) e a densitometria óptica das bandas foi realizada pelo respectivo programa de computador (Molecular Analyst), conforme descrito no item 4.2.8.

4.4. ZIMOGRAMA:

Esta técnica foi realizada para o estudo de MMPs secretadas no processo de reparo alveolar de acordo com estudo prévio executado neste mesmo laboratório com resultados satisfatórios (Silva *et al.*, 2001).

4.4.1 Curetagem dos alvéolos:

A obtenção do material alveolar para zimograma foi realizada da mesma forma descrita para RT-PCR (item 4.2.2), tendo sido o material coletado de cada subgrupo colocado em tubo único de polipropileno, lavado três vezes com solução salina tamponada de fosfato (PBS) a 4°C e incubados por 18 horas a 37°C em 600□1 de DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium – Sigma), contendo 100µg/ml de garamicina (Sulfato de
gentamicina 120 mg – Schering-Plough, Brasil). As amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm por 15 segundos a 4°C. O sobrenadante, contendo as proteínas secretadas, foi coletado e estocado a -80°C.

4.4.2 Zimograma:

Após a quantificação das proteínas totais dos meios de cultura condicionados (item 4.3.3), os zimogramas foram realizados conforme descrito previamente (Silva *et al.*, 2001). Cerca de 3µg de proteína total em meio de cultura celular condicionado foram homogeneizados em tampão de amostra não-redutor contendo 2% de SDS, 125 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10% de glicerol e 0,001% azul de bromofenol. As proteínas foram então separadas eletroforeticamente em SDS-PAGE a 10%, copolimerizados com 1,6mg/ml de gelatina (Sigma) como substrato, em tampão contendo 2,5mM de Tris, 19mM de glicina e 0,3mM de SDS. Após a eletroforese, os géis foram lavados, sob agitação suave a 24°C, em 2 banhos de 20 minutos cada em solução aquosa de Triton-X100 a 2% (Gibco Life Technologies BRL, E.U.A.) para remoção do SDS e retorno da conformação natural das MMPs. Em seguida, os géis foram incubados em tampão de ativação contendo 50mM de Tris-HCL pH 7,4 e 5mM de CaCl₂ a 37°C por 16 horas. A atividade gelatinolítica foi detectada após coloração com Coomassie blue R-250 0,05% (BioRad), após remoção do excesso de corante com solução aquosa de metanol 50%. Para confirmar que as atividades gelatinolíticas evidenciadas foram decorrentes da atividade das MMPs, foram adicionados ao tampão de ativação 2mM 1,10-fenantrolina (Sigma), um inibidor específico de MMPs.

4.4.3 Leitura dos resultados:

Os géis foram digitalizados em scanner (GS 700) e a densitometria óptica das bandas foi realizada pelo respectivo programa de computador (Molecular Analyst), conforme descrito no item 4.2.8, sendo que as bandas claras representaram o local de degradação da gelatina pelas MMPs.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados foram digitados em planilha eletrônica (EXCEL) e os resultados expressos em média \pm DP (desvio padrão) de três experimentos independentes, realizados em triplicata. Para as comparações entre animais controle e OVX, foi utilizado o teste de *t* de Student não-pareado, considerando nível de significância de 5% (*p*<0,05).

5. RESULTADOS:

5.1. Procedimento cirúrgico e obtenção de material alveolar:

Baseado nos resultados de pesquisas anteriores (Silva *et al.*, 2001; Zecchin, 2001) e nos resultados deste projeto, observou-se que a técnica cirúrgica desenvolvida é adequada e possibilita um pós-operatório satisfatório com número mínimo de fraturas e acidentes cirúrgicos. O número de animais necessário para cada técnica também foi determinado em estudo piloto, reduzindo-se, sempre que possível, o número de animais utilizados.

5.2. Pesos dos animais:

Houve aumento progressivo dos pesos dos animais ao longo do experimento. Os animais submetidos à OVX tiveram maior ganho de peso ao longo do experimento, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 2). O maior ganho de peso dos animais ooforectomizados ocorreu a partir do 7º dia após a OVX, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle a partir do 14º dia. A maior diferença de peso entre os grupos foi observada 21 dias após a OVX, momento em que foram realizadas as exodontias. Após as extrações, os animais do grupo controle apresentaram redução do ganho de peso em comparação com os períodos anteriores. Ao final do experimento não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados. Maiores detalhes da evolução dos pesos encontram-se na tabela 1 (ANEXOS).

Evolução dos pesos dos animais



Figura 2: Gráfico com as médias \pm DP dos pesos dos animais durante o experimento. O período zero indica o início do experimento, quando os animais foram submetidos à pseudo-ooforectomização ou ooforectomização, enquanto 21 dias corresponde ao momento das exodontias. Cont: grupo controle; OVX: grupo ooforectomizado. *OVX vs controle, *p*<0,05, n=66 ratas.

5.3. Comprovação da ooforectomia:

a) Avaliação microscópica dos ovários:

Os cortes histológicos dos tecidos removidos confirmaram a remoção dos ovários. Também foi possível observar parte do corno uterino, removido durante o procedimento de ooforectomização.

b) Lavado vaginal:

Antes da realização das exodontias, a confirmação *in vivo* da eficácia da OVX foi realizada por meio da avaliação do lavado vaginal. Os animais do grupo controle encontravam-se em diferentes fases do ciclo estral (Tabela 4), indicando a presença do padrão cíclico hormonal ovariano. Ao contrário, os animais do grupo OVX apresentavam-se somente nas fases metaestro ou diestro, o que caracteriza a ausência da secreção dos esteróides ovarianos.

Fase do ciclo estral	Cont	OVX
Proestro	2 (6,1%)	0
Estro	6 (18,2%)	0
Metaestro	11 (33,3%)	13 (39,3%)
Diestro	14 (42,4%)	20 (60,7%)

Tabela 4. Distribuição dos animais (n=66 ratas) segundo a fase do ciclo estral no 21° dia do experimento, conforme o grupo controle (Cont) e ooforectomizado (OVX).

c) Avaliação visual dos úteros:

A visualização macroscópica da presença de atrofia ou não dos cornos uterinos também permitiu confirmar o êxito das cirurgias para ooforectomização. Todos os animais do grupo controle apresentaram os cornos uterinos ricamente vascularizados, enquanto nos animais do grupo OVX foi observada atrofia uterina e intensa redução da vascularização.

d) Avaliação densitométrica das tíbias:

A determinação da D.O. das tíbias a partir de suas radiografias foi instrumento essencial para determinação da extensão dos efeitos da OVX sobre o tecido ósseo. O aumento estatisticamente significativo da D.O. no grupo OVX demonstrou aumento da radiolucidez da área analisada quando comparada à mesma área no grupo controle (controle=1,114±0,083 vs OVX=1,214±0,057, p<0,05), sugerindo diminuição do conteúdo de osso trabecular e caracterizando o quadro clínico de osteoporose nos animais estudados.

e) Avaliação histomorfométrica das tíbias:

Redução estatisticamente significativa foi observada em relação à densidade volumétrica óssea das tíbias dos animais OVX em relação ao grupo controle (controle=135,3 \pm 22,2 vs OVX=59,7 \pm 17,0, p<0,05), confirmando o padrão obtido a partir da densitometria radiográfica. As tíbias das ratas pseudo-ooforectomizadas apresentaram trabéculas ósseas bem formadas e contínuas, enquanto os animais ooforectomizados apresentaram formações ósseas arredondadas, dispersas no estroma e com poucos pontos de união entre si, caracterizando perda da estrutura da arquitetura óssea, característica da osteoporose.

5.4. RT-PCR:

As concentrações e purezas dos RNAs obtidos a partir do material curetado de 4 animais, após as exodontias, foram satisfatórias, demonstrando que a técnica pôde fornecer quantidade suficiente de RNA total para a realização das análises por RT-PCR. Detalhes destes valores podem ser vistos na tabela 2 (ANEXOS).

A presença de nítidas bandas de RNA ribossômico (28S e 18S), assim como a presença de banda correspondente ao RNA transportador, demonstrou a qualidade do material extraído (Figura 2, ANEXOS).

A figura 3A mostra o padrão mais representativo das bandas observadas em gel de agarose a 1,8%, de todos os *primers* estudados, exceto para MMP-2. Os valores das leituras das bandas apresentadas em géis de agarose, otimizados pelos valores da beta-actina, estão listados em anexo (Tabela 3, ANEXOS). Foi observado aumento da expressão destes mRNAs para MMP-9, em ambos os grupos controle e OVX, em função do tempo pós-exodontia, com tendência a uma maior expressão desta enzima no 5º dia pós-operatório (Figura 3B). A ausência de estrógeno no grupo OVX foi associada a uma diminuição da expressão de MMP-9 ao longo do experimento, em comparação aos valores do grupo controle.

A expressão da cadeia αI do colágeno tipo I esteve significativamente reduzida no grupo OVX 03 e 07 dias pós-exodontia em comparação ao grupo controle. Os dados mostraram tendência a níveis constantes de expressão de colágeno tipo I ao longo dos períodos analisados, apesar de valores discretamente maiores terem sido observados em ambos os grupos, 05 dias após as exodontias (Figura 3C).

A expressão da cadeia αI do colágeno tipo III mostrou novamente influência da ausência de estrógeno associada a sua redução. Foi observado aumento da expressão de colágeno tipo III em ambos os grupos, 05 dias após as exodontias, quando comparado aos níveis observados no início do pós-operatório, ou seja, em 03 dias (Figura 3D).

Não foram observadas bandas correspondentes à expressão de MMP-2 em nenhum dos grupos analisados. Para descartar eventuais problemas técnicos, diversas repetições sob condições variadas foram realizadas, obtendo-se resultados negativos. Para testar a eficácia dos *primers* desenhados para MMP-2, a mesma técnica de RT-PCR descrita em Material e Métodos foi realizada em cultura de fibroblastos gengivais de rato. A figura 4 mostra a banda respectiva para MMP-2 em fibroblastos gengivais e a ausência de bandas nos grupos estudados neste trabalho. A presença de bandas correspondentes à beta-actina comprova que a técnica foi realizada de maneira correta. Estes resultados sugerem que a expressão de MMP-2 em alvéolos de ratos é extremamente baixa, não sendo possível sua amplificação por RT-PCR.

5.5. Western blot:

Através de estudo anterior realizado neste departamento com fibroblastos gengivais de ratos imunossuprimidos com ciclosporina (Bolzani *et al.*, 2000), observou-se que este método é eficaz e adequado para a detecção e quantificação de MMPs. Os valores das concentrações dos extratos totais protéicos, obtidos a partir do material curetado de 4 animais após as exodontias, estão disponíveis em anexo (Tabela 4, ANEXOS). Os valores das leituras das bandas apresentadas nas radiografias estão listados em anexo (Tabela 5, ANEXOS).

A produção de MMP-1 não mostrou alteração significativa após a ooforectomização (Figura 5). A ausência de estrógeno nos grupos OVX esteve associada à diminuição da quantidade de MMP-2 presente nos alvéolos em todos os períodos analisados, em relação aos controles (Figura 6). Esta diminuição pôde ser observada nas duas formas de MMP-2, ativa e inativa, e foi confirmada também nos zimogramas. No entanto, a produção de MMP-2 ativa e inativa aumentou com o tempo pós-exodontia tanto no grupo controle quanto no grupo ooforectomizado.

MMP-9 inativa não foi detectada por meio de western blot 03 dias após as exodontias e bandas de intensidade óptica muito baixa foram observadas nos demais períodos (Figura 7). Houve tendência ao aumento da produção de MMP-9 inativa em ambos os grupos ao longo do experimento. No entanto, a ausência de estrógeno esteve associada a baixos valores desta MMP. A banda correspondente a MMP-9 ativa também apresentou valores de D.O. diminuídos em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos a partir do western blot mostraram maior quantidade de MMP-9 ativa 05 dias após as exodontias, acompanhando o padrão de expressão desta enzima, observado por RT-PCR.

Dados interessantes foram observados em relação à produção de colágeno tipo I uma vez que, apesar da diminuição da expressão observada por RT-PCR nos grupos OVX, níveis significativamente aumentados de colágeno tipo I foram encontrados através de western blot neste grupo (Figura 8). Aumento gradativo da produção de colágeno tipo I ao longo dos períodos analisados foi detectado em ambos os grupos.

A produção de colágeno tipo III não pôde ser detectada pela técnica de western blot em nenhum dos grupos estudados. Possivelmente esta dificuldade de detecção da proteína tenha sido decorrente de seus baixos níveis de expressão, observados por RT-PCR.

5.6. Zimograma:

O grupo OVX apresentou menor atividade gelatinolítica para as duas MMPs estudadas, quando comparado ao grupo controle (Figura 9). Em todos os períodos estudados, as médias das leituras da D.O. das bandas para MMP-2 e -9 no grupo OVX foram significativamente menores do que no grupo controle (p<0,05) em todos os valores. A análise da atividade de MMP-2 foi detalhada para detectar eventuais interferências em suas formas inativa e ativa. No entanto, os valores foram menores no grupo OVX em todas as análises realizadas (Tabela 6, ANEXOS).

Houve tendência ao aumento gradual da atividade gelatinolítica de MMP-2 e -9, tanto em suas formas latentes quanto ativas, ao longo dos períodos analisados, com atividade mais intensa no 7º dia pós-exodontia. A atividade gelatinolítica identificada nos zimogramas realizados foi completamente inibida pela 1,10-fenantrolina (Phe), como demonstrado na figura 9A.

Foi observada somente uma banda correspondente à atividade gelatinolítica de MMP-9. A confirmação de se tratar da MMP-9 ativa se fez pelo tamanho da banda e pelo fato de MMP-9 inativa praticamente não ter sido detectada por western blot.







Figura 4. Gel de agarose a 1,8% corado com brometo de etídio, mostrando as bandas dos produtos de RT-PCR para MMP-2 e beta-actina a partir de fibroblastos gengivais em cultura (Fibr) e de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores de ratas controle e ooforectomizadas. A presença da banda para MMP-2 em fibroblastos gengivais, assim como a presença das bandas para beta-actina em todas as amostras, demonstram a eficácia dos primers desenhados bem como a expressão de níveis não detectáveis de MMP-2 nos alvéolos.



Figura 5. Western blot para MMP-1 (A), mostrando as bandas de MMP-1 latente (~55kDa), MMP-1 ativa (~41kDa) e beta-actina, a partir de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores de ratas controle e ooforectomizadas. As bandas foram avaliadas através de densitometria óptica e os resultados expressos em gráficos com as médias ± DP das D.O.s para MMP-1 total (B), MMP-1 latente (C) e MMP-1 ativa (D), mostrando que não ocorreram diferenças significativas da ausência de estrógeno sobre a produção desta enzima.







Figura 7. Western blot para MMP-9 (A), mostrando as bandas de MMP-9 latente (~92kDa), MMP-9 ativa (~86kDa) e beta-actina, a partir de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores de ratas controle e ooforectomizadas. As bandas foram avaliadas através de densitometria óptica e os resultados expressos em gráficos com as médias \pm DP das D.O.s para MMP-9 total (B), MMP-9 latente (C) e MMP-9 ativa (D), mostrando a influência da ausência de estrógeno sobre a produção desta enzima. *OVX vs controle, p<0,05, n=24 ratas.



Figura 8. Western blot para colágeno tipo I (A), mostrando as bandas de colágeno tipo I e beta-actina, a partir de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores de ratas controle e ooforectomizadas. As bandas foram avaliadas através de densitometria óptica e os resultados expressos em gráfico com as médias ± DP das D.O.s mostrando aumento da produção de colágeno tipo I nos animais ooforectomizados (B). *OVX vs controle, p<0,05, n=24 ratas.





Figura 9. Quantidades iguais de proteínas secretadas nos tecidos de granulação de cada animal em diferentes tempos foram separada em géis de poliacrilamida a 10% copolimerizado com 1,6 mg/ml de gelatina. Bandas negativas foram visualizadas após incubação dos géis em tampão de ativação para MMPs. As atividades gelatinolíticas das MMPs (a ~67, 72 e 86 kDa) aumentaram gradualmente do 3° ao 7° dia após as exodontias (A). Phe representa um zimogram a com o mesmo meio de cultura condicionado, quando o gel foi incubado na presença de 2mM 1.10-fenantrolina, mostrando total inibição das atividades das MMPs. Os dados representam as análises das D.O. de MMP-9 (B), MMP-2 total (C), pró-MMP-2 (D) e MMP-2 ativa (E), segundo o período pós-exodontia e o grupo experimental (Controle e OVX) e estão dispostos como média ± DP. *OVX vs controle, *p*<0,05, n=18 ratas.

6. DISCUSSÃO:

As cirurgias para ooforectomização em ratas foram eficazes, rápidas (cerca de 15 minutos por animal) e de fácil realização. Além disso, este protocolo experimental utilizado é o modelo estabelecido para o estudo da osteoporose humana, recomendado pela FDA – *US Food and Drug Administration* (Tzaphlidou & Kafantari, 2000; Horcajada-Molteni *et al.*, 2000; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Bauss *et al.*, 2002; Pytlik, 2002).

A técnica apresentada neste trabalho para exodontia de 1^{os} e 2^{os} molares inferiores em ratas mostrou-se acessível, de realização relativamente fácil e rápida, durando cerca de 15 a 30 minutos por animal, além de proporcionar pós-operatório adequado. Em grande parte dos casos, a utilização do micro-cinzel cirúrgico como elevador permitiu realizar a correta avulsão da porção radicular mesial nos casos de fratura coronária. Em nosso conhecimento, há na literatura indexada somente um trabalho similar a este, baseado em técnica de odontossecção (Silva *et al.*, 2001), realizado por este mesmo grupo de pesquisa. Todo cuidado foi tomado para que o experimento fosse realizado da maneira mais ética possível. A utilização de alvéolos de molares, ao invés de incisivos, permitiu melhor evolução pós-operatória ao animal, permitindo a sua manutenção por períodos prolongados (Guglielmotti & Cabrini, 1985).

Houve aumento significativo de peso corporal nos animais submetidos à ooforectomização em comparação ao grupo controle. Aumento de peso significativo em animais submetidos à OVX já foi demonstrado previamente (Wronski *et al.*, 1988; Kalu *et al.*, 1989; Namkung-Matthai *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001) sem que, entretanto, tenha sido encontrada explicação conclusiva para este fenômeno (Butera *et al.*, 1993; Baskin *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996; Eckel *et al.*, 2002). Os hormônios sexuais participam na regulação da distribuição de tecido adiposo, tendo o estrógeno ação lipolítica (Rebuffe-Scrive *et al.*, 1986). Receptores citoplasmáticos para estrógeno e progesterona foram encontrados em células adiposas de ratos (Xu *et al.*, 1994) e, recentemente, em adipócitos humanos, sugerindo ação direta dos hormônios sexuais sobre o tecido gorduroso (Mizutani *et al.*, 1994). Em termos gerais, o estrógeno participa de um processo complexo, modulando o controle da ingestão alimentar no hipotálamo (Varma *et al.*, 1999), através de dois mecanismos. O primeiro consiste do efeito inibitório do estrógeno sobre o consumo de

alimentos, resultado da supressão da expressão de mRNA dos neuropeptídeos Y e galanina, no hipotálamo (Bray, 1997). O outro mecanismo proposto baseia-se no fato de que, em condições fisiológicas, o estrógeno reduz o consumo de alimentos devido ao aumento da sensação de saciedade promovida pela liberação de colecistoquinina (Butera *et al.*, 1993; Eckel *et al.*, 2002). Quando o estrógeno se faz ausente em ratos submetidos à ooforectomização, ocorre aumento da expressão dos neuropeptídeos Y e galanina, bem como diminuição da liberação de colecistoquinina, levando à perda do controle da saciedade e resultando em um número maior de refeições e maior quantidade de alimento ingerido (Baskin *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996).

Vários métodos foram utilizados neste trabalho para determinar a eficácia da ooforectomização realizada. A realização do lavado vaginal permitiu, de maneira prática e rápida, observar a eficácia do procedimento nos animais ainda vivos, pela ausência das fases proestro e estro em animais do grupo OVX. Estas fases são caracterizadas pela presença de estrógeno (Smith et al., 1975; Spornitz et al., 1999), sendo que a ovulação ocorre entre o início da fase proestro e o final da fase estro (Fata et al., 2001). A distribuição dos animais do grupo controle demonstrou predomínio das fases diestro e metaestro, fases estas de maior duração em horas (Hafez, 1970). A presença de nítida atrofia dos cornos uterinos em todos os animais ooforectomizados, conforme avaliação macroscópica dos úteros no momento do sacrifício, permitiu comprovar a eficácia da remoção cirúrgica dos ovários. Tal método tem sido amplamente utilizado por sua praticidade e facilidade de realização (Namkung-Matthai et al., 2001; Chen et al., 2001; Bauss et al., 2002). A determinação da D.O. das radiografias das tíbias demonstrou aumento da radiolucidez da área analisada no grupo OVX o que, juntamente com a significativa diminuição da densidade óssea volumétrica, indicam a diminuição do conteúdo de osso trabecular (osteopenia). Desse modo, foi possível confirmar a eficiência deste protocolo de indução de osteoporose em ratas. Esta metodologia foi baseada nos diversos trabalhos presentes na literatura, os quais demonstraram claramente os efeitos da ausência de estrógeno sobre o tecido ósseo de tíbias e fêmures através da utilização da densitometria óssea (Kalu et al., 1989; Cenci et al., 2000a; Cenci et al., 2000b; Chen et al., 2001; Bauss et al., 2002). A metáfise proximal da tíbia é mais sensível à depleção de estrógeno que outras partes do osso, resultando em perda do trabeculado ósseo em períodos mais curtos e de maneira mais intensa (Chen *et al.*, 2001). A perda óssea em mulheres pode ser detectada 1 ano após a remoção dos ovários, sendo que em ratos mudanças similares são vistas poucas semanas após a OVX, tendo em vista que o metabolismo ósseo em ratos é cerca de 3 a 5 vezes mais rápido que em humanos (Bauss *et al.*, 2002).

As MMPs possuem papel significativo no processo de reparo alveolar pósexodontia por serem responsáveis pela digestão da matriz extracelular provisória (Corbel *et al.*, 2000), fenômeno este necessário para substituição desta matriz e subseqüente deposição de osso neoformado. Nosso trabalho mostrou aumento da expressão, produção e atividade gelatinolítica das MMPs após exodontia, ao longo dos períodos analisados, em ambos os grupos, o que pode ser explicado pela intensa remodelação óssea e pelo aumento da densidade celular envolvendo, principalmente, células endoteliais, fibroblastos, células epiteliais, neutrófilos, osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células inflamatórias (Silva *et al.*, 2001). Tais células são fontes das principais MMPs envolvidas nas fases do reparo ósseo, como demonstrado previamente pela importância da infiltração de macrófagos em locais de injúria, servindo como fonte de todas as proteases necessárias para o reparo em um período de semanas a meses (Kerkela & Saarialho-Kere, 2003; Chau *et al.*, 2003).

A ausência de estrógeno decorrente da ooforectomização resultou em diminuição da expressão, produção e atividade gelatinolítica das MMP-2 e -9 em todos os períodos estudados. É possível que estes fenômenos sejam a chave para a compreensão dos atrasos morfológicos no processo de reparo alveolar de ratas ooforectomizadas, descritos previamente (Elovic *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 2001). Diversos trabalhos demonstraram aspectos da regulação das funções das MMPs pelo estrógeno (Potier *et al.*, 2001; Guccione *et al.*, 2002), o qual regula a expressão de MMPs em pele, útero, cérvix e ovário (Moalli *et al.*, 2002). Provavelmente os resultados deste trabalho estejam refletindo *in vivo* os efeitos já demonstrados *in vitro* do aumento da atividade e transcrição de MMP-2 e -9 observadas após tratamento com estrógeno em células mesangiais (Potier *et al.*, 2001; Guccione *et al.*, 2003), em linhagens de carcinoma de mama (Razandi *et al.*, 2003), em

amostras de tecido vaginal (Jackson *et al.*, 2002) e em epitélio pigmentado da retina (Marin-Castano *et al.*, 2003).

MMP-2 foi detectada por imunohistoquímica em células endoteliais e em fibroblastos de tecido de granulação de ossos com artrite reumatóide (Okada *et al.*, 1995). Tais achados indicam que esta enzima é importante durante a formação do tecido de granulação assim como em fases recentes (Soo *et al.*, 2000; Pirila *et al.*, 2002) e tardias do processo de remodelação tecidual (Inkinen *et al.*, 2000; Darby *et al.*, 2002). A ausência de estrógeno no grupo OVX esteve associada a uma diminuição significativa da produção e da atividade gelatinolítica de MMP-2 em todos os períodos analisados, concordando com achados prévios de diminuição da atividade desta enzima no processo de cicatrização cutânea em ratas ooforectomizadas (Pirila *et al.*, 2002).

Neste trabalho não foi possível detectar a expressão de MMP-2 em nenhum dos grupos analisados. O fato desta enzima ter sido detectada por western blot e zimograma sugere que a expressão de MMP-2 após exodontias seja muito baixa e/ou que a técnica utilizada não tenha a sensibilidade necessária para sua detecção. Esses dados também sugerem que a MMP-2 já esteja armazenada em algumas células e seja liberada no processo de reparo, sem que haja aumento significativo em sua transcrição gênica, de modo análogo à MMP-9, a qual pode ser produzida, estocada e liberada por macrófagos e neutrófilos quando necessária (Soo *et al.*, 2000; Kerkela & Saarialho-Kere, 2003).

A OVX causou significativas alterações nos valores de MMP-9, em todos os períodos analisados. Assim como a gelatinase A, a MMP-9 também possui fundamental importância nas fases iniciais do processo de reparo, como foi previamente demonstrado em feridas cutâneas de ratos e camundongos (Madlener *et al.*, 1998; Inkinen *et al.*, 2000). O fato da MMP-9 estar envolvida com a migração de células epiteliais e remodelação do tecido de granulação em feridas de mucosa oral (Salo *et al.*, 1994) realça a importância de se compreender as possíveis conseqüências da ausência de estrógeno sobre esta enzima, durante o processo de reparo alveolar após exodontia. Além disso, esta enzima é a MMP predominante em osteoclasto e a principal relacionada com sua atividade invasiva (Zhao *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1998; Delaisse *et al.*, 2000). O estrógeno parece estimular a expressão gênica de MMP-9 em tecido ósseo (Lindberg *et al.*, 2002), provavelmente pela

regulação deste gene através do receptor de estrógeno alfa (RE α), como demonstrado em células mesangiais (Potier *et al.*, 2001).

Aumento da produção e manutenção dos níveis de expressão de colágeno tipo I, ao longo dos períodos analisados, foram observados em ambos os grupos analisados. Este aumento é decorrente de sua maior produção por fibroblastos (Devlin, 2000), bem como por odontoblastos e osteoblastos, participando da formação da matriz extracelular que irá dar suporte à deposição de osso jovem. Fibroblastos e, em menor grau, células epiteliais são os dois principais grupos celulares responsáveis pela síntese e deposição dos diversos tipos de colágeno na reparação tecidual, além de glicoproteínas, elastina, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, todos estes substratos para as MMPs (Soo *et al.*, 2000). A degradação de colágeno tipo I é feita pela ação das colagenases (Rittie & Fisher, 2002; Chau *et al.*, 2003), principalmente MMP-8 (Kerkela & Saarialho-Kere, 2003), MMP-2 (Aimes & Quigley, 1995; Lauer-Fields *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Lauer-Fields *et al.*, 2003) e MT1-MMP (Seiki, 2002). Em alvéolos, colágeno tipo I é detectado no ligamento periodontal remanescente, 2 dias após as exodontias. Nos períodos subseqüentes, colágeno tipo I é detectado revestindo as trabéculas ósseas neoformadas, assim como formando feixes entre os osteoblastos (Devlin, 2000).

Os animais do grupo OVX apresentaram diminuição da expressão de colágeno tipo I e III em todos os períodos analisados, confirmando a associação existente entre estrógeno e colágeno, a qual parece ocorrer através do RE β (Neugarten *et al.*, 2000) e da integrina $\alpha_2\beta_1$ (Iype *et al.*, 2001). Aumento da expressão e produção de colágenos tipo I e III após a administração de estrógeno foi previamente demonstrado em fêmur (Seidlova-Wuttke *et al.*, 2003), uretra (Rizk *et al.*, 2003) e pele de animais OVX (Gendimenico *et al.*, 2002), assim como em osso cortical e trabecular da crista ilíaca de mulheres pós-menopausa (Khastgir *et al.*, 2001). Atrofia da pele, bem como redução de colágeno e de vasos sangüíneos são observadas pós-menopausa (Raine-Fenning *et al.*, 2003), sendo estes efeitos revertidos pela administração tópica ou sistêmica de 17 β -estradiol (Gendimenico *et al.*, 2002).

A ausência de estrógeno no grupo OVX esteve associada à diminuição da expressão de colágeno tipo I, porém, níveis elevados desta molécula foram observados por western

blot. É possível que a redução da atividade gelatinolítica de MMP-2 tenha causado este aumento do colágeno total, uma vez que esta também apresenta capacidade de degradar colágeno tipo I de maneira similar às demais colagenases (Aimes & Quigley, 1995; Lauer-Fields *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001; Lauer-Fields *et al.*, 2003) juntamente com o fato de não terem sido detectadas diferenças na produção de MMP-1 em ambos os grupos analisados. Além disso, outra MMP não estudada neste trabalho, a MMP-8, apresenta maior afinidade em clivar moléculas de colágeno tipo I (Kerkela & Saarialho-Kere, 2003) e não se pode descartar que esta também seja insensível aos efeitos do estrógeno.

A produção de colágeno tipo III não foi detectada neste trabalho, mas a diminuição da expressão de seu mRNA em função do tempo pode estar associada com redução do número de vasos sangüíneos nos alvéolos, em ambos os grupos. Em alvéolos, esta proteína é sintetizada por fibroblastos do ligamento periodontal remanescente (Devlin, 2000) e por reticulócitos. Com o passar dos dias, colágeno tipo III é identificado nas margens e na porção apical do alvéolo, locais estes de início da neoformação óssea (Devlin, 2000).

Este trabalho mostrou diversas vezes valores mais elevados de expressão, produção e atividade de algumas das proteínas estudadas a partir de 05 dias após as exodontias. A análise morfológica dos alvéolos mostrou maior diversidade celular neste dia, quando comparado aos demais avaliados (dados não mostrados). Notou-se a presença de epitélio recobrindo totalmente os alvéolos, bem como plasmócitos, neutrófilos, fibroblastos, macrófagos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, poucos linfócitos e início de neoformação óssea na porção apical e nas margens dos alvéolos. É possível que este dia seja um momento fundamental no processo de reparação alveolar pós-exodontia.

Não há, na literatura de língua inglesa indexada, estudo sobre MMPs no processo de reparo ósseo alveolar em animais ooforectomizados. Ainda que muitos aspectos moleculares do reparo alveolar tenham sido elucidados, faz-se necessária complementação destes resultados com os provenientes de outras metodologias para a ampla compreensão dos eventos envolvidos no processo de reparação alveolar neste modelo experimental. A necessidade de tratamento odontológico é uma das conseqüências da sobrevida prolongada dos pacientes com osteoporose, e exodontias são parte das opções terapêuticas

48

freqüentemente adotadas por dentistas. Desse modo, o conhecimento dos mecanismos moleculares do reparo alveolar pode desvendar novos alvos terapêuticos que possibilitem melhor prognóstico pós-exodontia em adultos com osteoporose decorrente da deficiência de estrógeno.

7. CONCLUSÕES:

- 1. A metodologia utilizada neste estudo foi eficaz na produção de quadro clínico compatível com osteoporose três semanas após a ooforectomização.
- A maturação e a substituição do tecido de granulação dos alvéolos de ambos os grupos foram acompanhadas por aumento da expressão, produção e atividade gelatinolítica de MMP-1, -2 e -9, assim como de colágenos tipo I e III, em todos os períodos analisados.
- 3. A ausência de estrógeno foi associada à diminuição da expressão, produção e atividade gelatinolítica de MMP-1, -2 e -9, em todos os períodos analisados.
- A ausência de estrógeno foi associada à diminuição da expressão, de colágenos tipo I e III, em todos os períodos analisados.
- A ausência de estrógeno foi associada ao aumento da produção de colágeno tipo I, em todos os períodos analisados.
- Os níveis de mRNA de MMP-2, assim como a quantidade de colágeno tipo III em processo de reparo alveolar após exodontia são muito baixos para serem detectados, respectivamente, por RT-PCR e Western blot.
- As alterações moleculares observadas neste estudo podem representar algumas das causas do atraso no processo de reparo ósseo alveolar após exodontia observado em ratos e, possivelmente, em humanos com osteoporose por redução ou ausência de estrógeno.

REFERÊNCIAS*

- Aimes RT, Quigley JP. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 1995; 270: 5872-6.
- Baskin DG, Norwood BJ, Schwartz MW, Koerker DJ. Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1995; 136: 5547-54.
- Bauss F, Wagner M, Hothorn LH. Total administered dose of ibandronate determines its effects on bone mass and architecture in ovariectomized aged rats. *J Rheumatol.* 2002; 29: 990-8.
- Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*. 1986; 319: 516-8.
- Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontal Res. 1993a; 28: 500-10.
- Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol. 1993b; 64: 474-84.
- Blythe JG, Buchsbaum HJ. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstet Gynecol.* 1976; 48: 351-2.
- Bolzani G, Della CR, Martelli JH, Martelli JH, Graner E. Cyclosporin A inhibits production and activity of matrix metalloproteinases by gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2000; 35: 51-8.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423: 337-42.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- Bray GA. Obesity and reproduction. Hum Reprod. 1997; 12 Suppl 1:26-32.: 26-32.
- Butera PC, Bradway DM, Cataldo NJ. Modulation of the satiety effect of cholecystokinin by estradiol. *Physiol Behav.* 1993; 53: 1235-8.
- Carvalho AA, de Castro AL, Melhado RM, Bedran De Castro JC. Healing of tooth extraction wounds in rats with renal hypertension. A histological study. *J Nihon Univ Sch Dent.* 1983; 25: 214-20.
- *De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseada no modelo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Carvalho TL, Araujo CA, Teofilo JM, Brentegani LG. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997a; 26: 149-52.
- Carvalho TL, Bombonato KF, Brentegani LG. Histometric analysis of rat alveolar wound healing. *Braz Dent J.* 1997b; 8: 9-12.
- Cenci S, Weitzmann MN, Gentile MA, Aisa MC, Pacifici R. M-CSF neutralization and egr-1 deficiency prevent ovariectomy-induced bone loss. *J Clin Invest*. 2000a; 105: 1279-87.
- Cenci S, Weitzmann MN, Roggia C, Namba N, Novack D, Woodring J et al. Estrogen deficiency induces bone loss by enhancing T-cell production of TNF-alpha. J Clin Invest. 2000b; 106: 1229-37.
- Chau I, Rigg A, Cunningham D. Matrix metalloproteinase inhibitors--an emphasis on gastrointestinal malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003; 45: 151-76.
- Chen JL, Yao W, Frost HM, Li CY, Setterberg RB, Jee WS. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effect on bone formation in sham and ovariectomized rats. *Bone*. 2001; 29: 126-33.
- Consensus Development Conference. Diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. Am J Med. 1993; 94: 636-8.
- Cooper C, Melton LJ. Epidemiology of osteoporosis. Trends Endocrinol Metab. 1992; 3: 224.
- Corbel M, Boichot E, Lagente V. Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33: 749-54.
- Darby IA, Bisucci T, Pittet B, Garbin S, Gabbiani G, Desmouliere A. Skin flap-induced regression of granulation tissue correlates with reduced growth factor and increased metalloproteinase expression. *J Pathol.* 2002, 197: 117-27.
- Delaisse JM, Eeckhout Y, Neff L, Francois-Gillet C, Henriet P, Su Y *et al.* (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J Cell Sci.* 1993; 106 (Pt 4): 1071-82.
- Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, del Carmen OM, Ferreras M, Lund L *et al.* Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta*. 2000; 291: 223-34.
- Devlin H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. *Cells Tissues Organs*. 2000; 167: 33-7.
- Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54: 1087-91.
- Doku HC, Shklar G, Bugbee B. The effect of epsilon aminocaproic acid on the healing of extraction wounds in hamsters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1966; 22: 569-77.

- Domon S, Shimokawa H, Matsumoto Y, Yamaguchi S, Soma K. In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement. *Arch Oral Biol.* 1999; 44: 907-15.
- Eckel LA, Houpt TA, Geary N. Estradiol treatment increases CCK-induced c-Fos expression in the brains of ovariectomized rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 283: R1378-85.
- Elovic RP, Hipp JA, Hayes WC. Maxillary molar extraction decreases stiffness of the mandible in ovariectomized rats. *J Dent Res.* 1994; 73: 1735-41.
- Fata JE, Chaudhary V, Khokha R. Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and not 17beta-estradiol during the estrous cycle. *Biol Reprod.* 2001; 65: 680-8.
- Freeman ME. The Ovarian Cycle of the Rat. In: Knobil E, Neill JD, editors. Physiology of Reproduction. New York: Raven Press; 1994: 1893-921.
- Fridman R, Toth M, Pena D, Mobashery S. Activation of progelatinase B (MMP-9) by gelatinase A (MMP-2). *Cancer Res.* 1995; 55: 2548-55.
- Frisch B, Bartl R. Osteoporosis. Biopsy Interpretation of Bone and Bone Marrow: Histology and Immunohistology in Paraffin and Plastic. Tel Aviv Israel: Arnold; 1999: 61-71.
- Fuller K, Chambers TJ. Localisation of mRNA for collagenase in osteocytic, bone surface and chondrocytic cells but not osteoclasts. *J Cell Sci.* 1995; 108 (Pt 6): 2221-30.
- Gack S, Vallon R, Schmidt J, Grigoriadis A, Tuckermann J, Schenkel J *et al.* Expression of interstitial collagenase during skeletal development of the mouse is restricted to osteoblast-like cells and hypertrophic chondrocytes. *Cell Growth Differ.* 1995; 6: 759-67.
- Gali JC. Osteoporose. Acta Ortop Bras. 2001; 9: 53-62.
- Gendimenico GJ, Mack VJ, Siock PA, Mezick JA. Topical estrogens: their effects on connective tissue synthesis in hairless mouse skin. *Arch Dermatol Res.* 2002; 294: 231-6.
- Goldring MB, Krane SM. Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells. *J Biol Chem.* 1987; 262: 16724-9.
- Gowen M, Mundy GR. Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol.* 1986; 136: 2478-82.
- Green LJ, Gong JK, Neiders ME. Relationship between Sr85 uptake and histological changes during healing in dental extraction wounds in rats. *Arch Oral Biol.* 1969; 14: 865-72.
- Guccione M, Silbiger S, Lei J, Neugarten J. Estradiol upregulates mesangial cell MMP-2 activity via the transcription factor AP-2. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002; 282: F164-9.

- Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* .1985; 43: 359-64.
- Hafez ESE. Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Philadelphia, USA: Lea and Febiger; 1970.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423: 349-55.
- Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ *et al.* The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J Cell Sci.* 1994; 107 (Pt 11): 3055-64.
- Horcajada-Molteni MN, Davicco MJ, Lebecque P, Coxam V, Young AA, Barlet JP. Amylin inhibits ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Endocrinol.* 2000; 165: 663-8.
- Hsieh YD, Devlin H, McCord F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Arch Oral Biol.* 1995; 40: 529-31.
- Hsieh YD, Devlin H, Roberts C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol.* 1994; 39: 425-8.
- Iizuka T, Miller SC, Marks SC, Jr. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic (ia) rats. *J Oral Pathol Med.* 1992; 21: 150-5.
- Inkinen K, Turakainen H, Wolff H, Ravanti L, Kahari VM, Ahonen J. Expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental granulation tissue. *APMIS*. 2000; 108: 318-28.
- Iype T, Jayasree K, Sudhakaran PR. Modulation of alpha2beta1 integrin changes during mammary gland development by beta-oestradiol. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1499: 232-41.
- Jackson S, James M, Abrams P. The effect of oestradiol on vaginal collagen metabolism in postmenopausal women with genuine stress incontinence. *BJOG*. 2002; 109: 339-44.
- Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. J Prosthet Dent. 1997; 77: 435-43.
- Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology*. 1989; 124: 7-16.
- Kerkela E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.* 2003; 12: 109-25.
- Khastgir G, Studd J, Holland N, Alaghband-Zadeh J, Sims TJ, Bailey AJ. Anabolic effect of longterm estrogen replacement on bone collagen in elderly postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2001; 12: 465-70.

- Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*. 1995; 136: 3054-61.
- Kingsmill VJ. Post-extraction remodeling of the adult mandible. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999; 10: 384-404.
- Klemetti E, Vainio P. Effect of bone mineral density in skeleton and mandible on extraction of teeth and clinical alveolar height. *J Prosthet Dent.* 1993; 70: 21-5.
- Krane SM, Byrne MH, Lemaitre V, Henriet P, Jeffrey JJ, Witter JP *et al.* Different collagenase gene products have different roles in degradation of type I collagen. *J Biol Chem.* 1996; 271: 28509-15.
- Kribbs PJ, Chesnut CH, III, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent*. 1989; 62: 703-7.
- Kribbs PJ, Smith DE, Chesnut CH, III. Oral findings in osteoporosis. Part I: Measurement of mandibular bone density. *J Prosthet Dent.* 1983; 50: 576-9.
- Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, Yoshioka M, Honjo H, Urabe M *et al.* Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 68: 197-202.
- Langeland N. Effects of oestradiol-17 beta benzoate treatment on fracture healing and bone collagen synthesis in female rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1975; 80: 603-12.
- Lauer-Fields JL, Tuzinski KA, Shimokawa K, Nagase H, Fields GB. Hydrolysis of triple-helical collagen peptide models by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 2000; 275: 13282-90.
- Lauer-Fields JL, Sritharan T, Stack MS, Nagase H, Fields GB. Selective hydrolysis of triple-helical substrates by matrix metalloproteinase-2 and -9. *J Biol Chem.* 2003; 278: 18140-5.
- Levi G, Geoffroy V, Palmisano G, de Vernejoul MC. Bones, genes and fractures: workshop on the genetics of osteoporosis: from basic to clinical research. *EMBO Rep.* 2002; 3: 22-6.
- Li X, Nishimura I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. J Prosthet Dent. 1994; 72: 324-30.
- Limb GA, Daniels JT, Pleass R, Charteris DG, Luthert PJ, Khaw PT. Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1847-55.
- Lin WL, McCulloch CA, Cho MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec.* 1994; 240: 492-506.

- Lindberg MK, Weihua Z, Andersson N, Moverare S, Gao H, Vidal O *et al.* Estrogen receptor specificity for the effects of estrogen in ovariectomized mice. *J Endocrinol.* 2002; 174: 167-78.
- Lindholm TS. Effects of 1alpha-hydroxycholecalciferol on osteoporotic changes induced by calcium deficiency in bone fractures in adult rats. *J Trauma*. 1978; 18: 336-40.
- Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M *et al.* Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology*. 1998; 139: 3022-5.
- Madlener M, Parks WC, Werner S. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair. *Exp Cell Res.* 1998; 242: 201-10.
- Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21: 115-37.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62: 609-14.
- Marin-Castano ME, Elliot SJ, Potier M, Karl M, Striker LJ, Striker GE *et al.* Regulation of estrogen receptors and MMP-2 expression by estrogens in human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44: 50-9.
- McMillan MD. Neutrophils in the molar tooth extraction wound in the rat: a transmission electron microscope (TEM) study. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28: 297-302.
- Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, AGren MS, Saarialho-Kere U. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol.* 2002a; 33: 355-64.
- Mirastschijski U, Impola U, Karsdal MA, Saarialho-Kere U, AGren MS. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-3103 unlike the serine proteinase inhibitor aprotinin abrogates epidermal healing of human skin wounds ex vivo. *J Invest Dermatol.* 2002b; 118: 55-64.
- Mizutani T, Nishikawa Y, Adachi H, Enomoto T, Ikegami H, Kurachi H *et al.* Identification of estrogen receptor in human adipose tissue and adipocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78: 950-4.
- Moalli PA, Klingensmith WL, Meyn LA, Zyczynski HM. Regulation of matrix metalloproteinase expression by estrogen in fibroblasts that are derived from the pelvic floor. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 187: 72-9.
- Mundy G, Garrett R, Harris S, Chan J, Chen D, Rossini G *et al.* Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science*. 1999; 286: 1946-9.

- Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, Hao LJ, Maastricht S, Swain M *et al.* Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone.* 2001; 28: 80-6.
- Neugarten J, Acharya A, Lei J, Silbiger S. Selective estrogen receptor modulators suppress mesangial cell collagen synthesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; 279: F309-18.
- Okada Y, Naka K, Kawamura K, Matsumoto T, Nakanishi I, Fujimoto N *et al.* Localization of matrix metalloproteinase 9 (92-kilodalton gelatinase/type IV collagenase = gelatinase B) in osteoclasts: implications for bone resorption. *Lab Invest.* 1995; 72: 311-22.
- OLAW Office Of Laboratory Animal Welfare. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals. National Institutes of Health NIH; 2000.
- Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP *et al.* Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem.* 2000; 275: 2661-8.
- Palmon A, Roos H, Reichenberg E, Grosskop A, Bar K, I, Pitaru S et al. Basic fibroblast growth factor suppresses tropoelastin gene expression in cultured human periodontal fibroblasts. J Periodontal Res. 2001; 36: 65-70.
- Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 2001; 503: 158-62.
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC. The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. J Cell Biol. 1997; 137: 1445-57.
- Pirila E, Parikka M, Ramamurthy NS, Maisi P, McClain S, Kucine A *et al.* Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. *Wound Repair Regen.* 2002; 10: 38-51.
- Poli V, Balena R, Fattori E, Markatos A, Yamamoto M, Tanaka H *et al.* Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *EMBO J.* 1994; 13:1189-96.
- Potier M, Elliot SJ, Tack I, Lenz O, Striker GE, Striker LJ *et al.* Expression and regulation of estrogen receptors in mesangial cells: influence on matrix metalloproteinase-9. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 241-51.
- Potier M, Karl M, Zheng F, Elliot SJ, Striker GE, Striker LJ. Estrogen-related abnormalities in glomerulosclerosis-prone mice: reduced mesangial cell estrogen receptor expression and prosclerotic response to estrogens. *Am J Pathol.* 2002; 160: 1877-85.
- Pytlik M. Effects of tibolone on the development of osteopenia induced by ovariectomy in rats. *Pol J Pharmacol.* 2002; 54: 35-43.

- Raine-Fenning NJ, Brincat MP, Muscat-Baron Y. Skin aging and menopause : implications for treatment. *Am J Clin Dermatol.* 2003; 4: 371-8.
- Ratnikov BI, Deryugina EI, Strongin AY. Gelatin zymography and substrate cleavage assays of matrix metalloproteinase-2 in breast carcinoma cells overexpressing membrane type-1 matrix metalloproteinase. *Lab Invest.* 2002; 82: 1583-90.
- Raisz LG, Kream BE, Lorenzo JA. Metabolic Bone Disease. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. Williams Textbook of Endocrinology. Saunders Company, 2003; 1384-93.
- Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem.* 2003; 278: 2701-12.
- Rebuffe-Scrive M, Eldh J, Hafstrom LO, Bjorntorp P. Metabolism of mammary, abdominal, and femoral adipocytes in women before and after menopause. *Metabolism*. 1986; 35: 792-7.
- Riggs BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. J Clin Invest. 2000; 106: 1203-4.
- Rittie L, Fisher GJ. UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing Res Rev. 2002; 1: 705-20.
- Ritty TM, Herzog J. Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. J Orthop Res. 2003; 21: 442-50.
- Rizk DE, Mensah-Brown EP, Chandranath SI, Ahmed I, Shafiullah M, Patel M *et al.* Effects of ovariectomy and hormone replacement on collagen and blood vessels of the urethral submucosa of rats. *Urol Res.* 2003; 31: 147-51.
- Salo T, Makela M, Kylmaniemi M, Autio-Harmainen H, Larjava H. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 during early human wound healing. *Lab Invest*. 1994; 70: 176-82.
- Salomao JI, Grandini SA, Okamoto T. Wound healing after dental extraction in oophorectomized rats. Histological study. *Rev Fac Odontol Aracatuba*. 1974; 3: 183-95.
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T *et al.* Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol.* 2003; 149: 351-62.
- Seiki M. The cell surface: the stage for matrix metalloproteinase regulation of migration. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14: 624-32.
- Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y, Mori M. Withdrawal of [corrected] estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett.* 1996; 204: 81-4.

- Silva HC, Coletta RD, Jorge J, Bolzani G, de Almeida OP, Graner E. The effect of cyclosporin A on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. *Arch Oral Biol.* 2001; 46: 875-9.
- Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge TC. Increased bone resorption precedes increased bone formation in the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int*. 1996; 59: 121-7.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975; 96: 219-26.
- Smith N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. *Aust Dent J.* 1974; 19: 250-4.
- Soo C, Shaw WW, Zhang X, Longaker MT, Howard EW, Ting K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair. *Plast Reconstr Surg.* 2000; 105: 638-47.
- Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA. (1999). Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *Anat Rec.* 1999; 254: 116-26.
- Srivastava S, Weitzmann MN, Kimble RB, Rizzo M, Zahner M, Milbrandt J *et al.* Estrogen blocks M-CSF gene expression and osteoclast formation by regulating phosphorylation of Egr-1 and its interaction with Sp-1. *J Clin Invest.* 1998; 102: 1850-9.
- Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells. J Clin Invest. 1999; 103: 1409-18.
- Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *Anat Rec.* 2001; 262: 203-12.
- Toth M, Chvyrkova I, Bernardo MM, Hernandez-Barrantes S, Fridman R. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 308: 386-95.
- Tzaphlidou M, Kafantari H. Influence of nutritional factors on bone collagen fibrils in ovariectomized rats. *Bone*. 2000; 27: 635-8.
- Uusitalo H, Hiltunen A, Soderstrom M, Aro HT, Vuorio E. Expression of cathepsins B, H, K, L, and S and matrix metalloproteinases 9 and 13 during chondrocyte hypertrophy and endochondral ossification in mouse fracture callus. *Calcif Tissue Int.* 2000; 67: 382-90.
- Varma M, Chai JK, Meguid MM, Laviano A, Gleason JR, Yang ZJ et al. Effect of estradiol and progesterone on daily rhythm in food intake and feeding patterns in Fischer rats. *Physiol Behav.* 1999; 68: 99-107.

- Vignery A, Baron R. Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. *Anat Rec.* 1980; 196: 191-200.
- von Wowern N, Kollerup G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J Prosthet Dent.* 1992; 67: 656-60.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14 : 2123-33.
- Wronski TJ, Cintron M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 1988; 43: 179-83.
- Xu X, Barry DC, Settleman J, Schwartz MA, Bokoch GM. Differing structural requirements for GTPase-activating protein responsiveness and NADPH oxidase activation by Rac. *J Biol Chem.* 1994; 269: 23569-74.
- Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res.* 2003; 57: 388-94.
- Zecchin KG. Avaliação do efeito da ciclosporina no reparo alveolar após exodontia em ratos. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, 2001.
- Zhao H, Cai G, Du J, Xia Z, Wang L, Zhu T. Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in osteoporotic bone tissues. *J Tongji Med Univ.* 1997; 17: 28-31.
- Zhao H, Xia Z, Cai G, Du J, Zhu T, Shen L. Expression of type-I collagen and matrix metalloproteinase-9 mRNA in bone of castrated adult female rats: effects of estrogen. *Chin Med J (Engl).* 1998; 111: 551-5.

ANEXOS

As seqüências dos mRNA utilizados, os *primers* desenhados (em negrito e sublinhado), bem como a ORF (somente em negrito seu início e fim) de cada proteína estudada estão descritas a seguir:

Beta-actina, gi 13592132











Colágeno tipo I (cadeia α1), gi 2894105



Colágeno tipo III (cadeia α1), gi 27671044





Figura 1. Determinação do número de ciclos de PCR para cada par de *primer* a partir da densitometria óptica de cada banda visualizada em géis de agarose a 1,8% para beta-actina (A), MMP-9 (B), cadeia α1 de colágeno tipo I (C) e cadeia α1 de colágeno tipo III (D), a partir de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores de ratas controle. As setas indicam o número de ciclos escolhido.
dos pesos para cada etapa do experimento demonstrou que a influência da OVX foi significativa sobre os mesmos, como mostra a tabela 1. Diferenças significativas foram notadas a partir do 14º dia após a OVX, mantendo-se ao longo do experimento.

Tabela 1. Médias e desvios padrão dos pesos dos animais utilizados durante o experimento, conforme o grupo (Controle e OVX). O período zero indica o início do experimento, quando os animais foram submetidos à ooforectomização, o período de 21 dias corresponde ao dia das exodontias. Foi utilizado o teste t de Student.

Grupo	Cont	OVX
-	Média±DP	Média±DP
Dia 0	96,04±21,16	99,07±19,13
Dia 7	128,60±17,84	138,23±13,01
Dia 14	146,86±15,35	167,86±13,52*
Dia 21	161,54±12,90	193,17±12,71*
Dia 24	159,39±19,00	191,01±12,78*
Dia 26	164,38±13,60	184,52±4,63*
Dia 28	188,85±35,51	198,72±9,32

Cont: grupo controle; OVX: grupo ooforectomizado; Média \pm DP: média \pm desvio padrão; *OVX vs controle, $p \leq 0.05$.

As concentrações e purezas dos RNAs totais obtidos a partir do material curetado de 4 animais estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Concentração e pureza dos RNAs obtidos a partir de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores dos grupos controle e OVX. A concentração foi determinada pela leitura em espectrofotômetro com 260nm, enquanto a pureza foi determinada pela razão entre as leituras a 260nm e 280nm.

Grupos e períodos após as exodontias	Concentração	Pureza
Controle/3 dias	2,096 µg/µl	1,58
OVX/3 dias	2,188 µg/µl	1,59
Controle/5 dias	4,072 µg/µl	1,72
OVX/5 dias	3,124 µg/µl	1,71
Controle/7 dias	2,760 µg/µl	1,69
OVX/7 dias	4,578 µg/µl	1,74



Figura 2. Gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio. Foram aplicados 2µg de RNA total em cada canaleta, obtidos a partir de material curetado de alvéolos de primeiro e segundo molares de ratas controle e ooforectomizadas. As bandas 28S e 18S representam o RNA ribossômico e indicam a qualidade e preservação do material. Nota-se também a presença de RNA transportador (RNAt) em todas as amostras.

A tabela 3 mostra os valores das D.O.s da expressão de MMP-9 e colágenos tipo I e III, normalizados pelos valores da beta-actina. A OVX esteve associada com redução da expressão destas proteínas em todos os períodos estudados.

Tabela 3.: Médias e desvios padrão das densitometrias ópticas para MMP-9, colágeno tipo I e colágeno tipo III, observados por RT-PCR, para os grupos controle e OVX. Os dados estão dispostos conforme o período de estudo e cada resultado representa a média de três leituras do experimento mais representativo com 04 animais para cada valor.

	Período (dias)	Cont (Média ± DP)	OVX (Média ± DP)
MMP-9	3	$0,736 \pm 0,018$	$0,697 \pm 0,022$
	5	$1,236 \pm 0,118$	$0,884 \pm 0,109*$
	7	$1,043 \pm 0,033$	$0,953 \pm 0,026*$
Colágeno tipo I	3	$1,054 \pm 0,066$	$0,802 \pm 0,038*$
	5	$1,124 \pm 0,082$	$1,014 \pm 0,063$
	7	$0,983 \pm 0,022$	$0,\!687\pm0,\!076*$
Colágeno tipo III	3	$0,577 \pm 0,079$	$0,\!458 \pm 0,\!057$
	5	$0,717 \pm 0,038$	$0,601 \pm 0,091$
	7	$0,570 \pm 0,069$	$0,324 \pm 0,086*$

Cont: grupo controle; OVX: grupo ooforectomizado; Média \pm DP: média \pm desvio padrão; *OVX vs controle, p < 0.05.

Os valores das concentrações dos extratos totais protéicos obtidos a partir do material curetado de 4 animais, após as exodontias estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Concentração dos extratos totais protéicos obtidos a partir de alvéolos de primeiro e segundo molares inferiores dos grupos controle e OVX, pelo método de Bradford.

Grupos e períodos após as exodontias	Concentração	
Controle/3 dias	3,67 µg/µl	
OVX/3 dias	4,30 µg/µl	
Controle/5 dias	2,72 µg/µl	
OVX/5 dias	3,55 µg/µl	
Controle/7 dias	1,69 µg/µl	
OVX/7 dias	2,35 µg/µl	

A tabela 5 mostra os valores das D.O.s da produção de MMP-1, MMP-2, MMP-9 e colágeno tipo I, obtidos por meio de western blot. A produção de MMP-1 não esteve associada com a OVX, porém estes animais apresentaram diminuição significativa de MMP-2 -9, em todos os períodos pós-exodontia. Por outro lado, a quantidade total de colágeno tipo I foi maior na ausência de estrógeno (grupo OVX). Todas estas enzimas apresentaram aumento da produção em função do tempo pós-operatório.

Tabela 5.: Médias e desvios padrão das densitometrias ópticas para MMP-1, MMP-2, MM-9 e colágeno tipo I, observados em western blot, para os grupos controle e OVX. Os dados estão dispostos conforme o período de estudo e cada resultado representa a média de três experimentos realizados com 04 animais cada.

	Período (dias)	Cont (Média ± DP)	OVX (Média ± DP)
MMP-1 total	3	$1,802 \pm 0,263$	$1,560 \pm 0,375$
	5	$2,619 \pm 0,895$	$2,270 \pm 0,325$
	7	$2,621 \pm 0,829$	$2,312 \pm 1,020$
MMP-1 inativa	3	$0,237 \pm 0,082$	$0,203 \pm 0,146$
	5	$0,437 \pm 0,231$	$0,444 \pm 0,185$
	7	$0,433 \pm 0,232$	$0,426 \pm 0,284$
MMP-1 ativa	3	$1,566 \pm 0,218$	$1,357 \pm 0,302$
	5	$2,181 \pm 0,670$	$1,826 \pm 0,150$
_	7	$2,189 \pm 0,640$	$1,886 \pm 0,762$
MMP-2 total	3	$1,106 \pm 0,091$	$0,718 \pm 0,054*$
	5	$1,813 \pm 0,150$	$1,134 \pm 0,173*$
_	7	$1,946 \pm 0,153$	$1,166 \pm 0,106*$
MMP-2 inativa	3	$0,729 \pm 0,107$	$0,504 \pm 0,068*$
	5	$0,904 \pm 0,068$	$0,761 \pm 0,073$
_	7	$0,783 \pm 0,090$	$0,601 \pm 0,066*$
MMP-2 ativa	3	$0,377 \pm 0,020$	$0,214 \pm 0,058*$
	5	$0,909 \pm 0,158$	$0,373 \pm 0,114*$
_	7	$1,163 \pm 0,064$	$0,565 \pm 0,079*$
MMP-9 total	3	$0,091 \pm 0,041$	$0,088 \pm 0,030$
	5	$0,224 \pm 0,075$	$0,155 \pm 0,054$
_	7	$0,226 \pm 0,024$	$0,157 \pm 0,011*$
MMP-9 inativa	3	$0,000 \pm 0,000$	$0,000 \pm 0,000$
	5	$0,023 \pm 0,020$	$0,019 \pm 0,017$
-	7	$0,066 \pm 0,043$	$0,020 \pm 0,020$
MMP-9 ativa	3	$0,091 \pm 0,041$	$0,088 \pm 0,030$
	5	$0,219 \pm 0,045$	$0,140 \pm 0,038$
-	7	$0,142 \pm 0,014$	$0,109 \pm 0,022$
Colágeno tipo I	3	$0,139 \pm 0,013$	$0,241 \pm 0,019*$
	5	$0,294 \pm 0,040$	$0,512 \pm 0,081*$
	7	$0,391 \pm 0,013$	$0,647 \pm 0,088*$

Cont: grupo controle; OVX: grupo ooforectomizado; Média \pm DP: média \pm desvio padrão; *OVX vs controle, p < 0.05.

A tabela 6 mostra os valores das D.O.s das atividades gelatinolíticas de MMP-2 e MMP-9 avaliadas por zimogramas. A ausência de estrógeno esteve associada com diminuição significativa da atividade enzimática destas MMPs, assim como foi observado aumento da sua atividade, em ambos os grupos, durante os períodos analisados.

periodo de estudo e cada resultado representa a media da retura de 65 animais.			
	Período (dias)	Cont (Média ± DP)	OVX (Média ± DP)
MMP-9 ativa	3	$0,974 \pm 0,198$	$0,248 \pm 0,041*$
	5	$0,613 \pm 0,131$	$0,405 \pm 0,089*$
	7	$1,553 \pm 0,618$	$0,850 \pm 0,380*$
MMP-2 total	3	$2,564 \pm 0,865$	$1,024 \pm 0,460*$
	5	$5,382 \pm 1,027$	$2,924 \pm 0,208*$
	7	$4,458 \pm 1,045$	$2,744 \pm 0,587*$
MMP-2 inativa	3	$0,442 \pm 0,185$	$0,147 \pm 0,052*$
	5	$0,889 \pm 0,144$	$0,686 \pm 0,053*$
	7	$1,000 \pm 0,150$	$0,774 \pm 0,060*$
MMP-2 ativa	3	$0,558 \pm 0,205$	$0,289 \pm 0,127*$
	5	$1,382 \pm 0,161$	$0,814 \pm 0,080*$
	7	$2,343 \pm 0,966$	$1,057 \pm 0,147*$

Tabela 6.: Médias e desvios padrão das densitometrias ópticas para MMP-9 e -2 obtidas a partir da técnica do zimograma, para os grupos controle e OVX. Os dados estão dispostos conforme o período de estudo e cada resultado representa a média da leitura de 03 animais.

Cont: grupo controle; OVX: grupo ooforectomizado; Média±DP: média±desvio padrão; *OVX vs controle, p < 0.05.