

MARCO ANTÔNIO DIAS DA SILVA

*INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DE
HORMÔNIO PARATIREÓIDEO HUMANO FRAGMENTO
(1-34) NAS FIBRAS DE SHARPEY DA FACE LINGUAL
DO ALVÉOLO DE INCISIVOS INFERIORES E NA
ULTRAESTRUTURA DOS HEPATÓCITOS DE RATOS.*

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção de
título de Doutor em Biologia Buco-Dental,
área de histologia.

PIRACICABA
2005

MARCO ANTÔNIO DIAS DA SILVA

*INFLUÊNCIA DA ADMINISTRAÇÃO INTERMITENTE DE
HORMÔNIO PARATIREÓIDEO HUMANO FRAGMENTO
(1-34) NAS FIBRAS DE SHARPEY DA FACE LINGUAL
DO ALVÉOLO DE INCISIVOS INFERIORES E NA
ULTRAESTRUTURA DOS HEPATÓCITOS DE RATOS.*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de histologia.

Orientadores: Profa. Dra. Silvana Pereira Barros

Co-orientador: Prof. Dr. José Merzel

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Merzel

Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Profa. Dra. Paula Cristina Trevilatto

Prof. Dra. Ana Paula de Souza Pardo

Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.

CPG, 10.1.02.2006.

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2005

UNIDADE BC
Nº CHAMADA UNICAMP
Si 37.1
V EX
TOMBO BCI 67413
PROC 16-Proc 23.06
C 0
PREÇO 11.00
DATA 17/03/06
Nº CPD Rebol 375808

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

Si38i Silva, Marco Antônio Dias da.
Influência da administração intermitente de hormônio paratireóideo humano fragmento (1-34) nas fibras de Sharpey da face lingual do alvéolo de incisivos inferiores e na ultraestrutura dos hepatócitos de ratos. / Marco Antônio Dias da Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

Orientadores: Silvana Pereira Barros, José Merzel

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Dentes – Erupção. 2. Fígado. I. Barros, Silvana Pereira. II. Merzel, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em inglês: Influence of hPTH (1-34) intermittent administration in rats lower incisor alveolar socket Sharpey fibers and in hepatocytes ultrastructure

Palavras-chave em inglês (Keywords): 1. Tooth eruption. 2. Liver

Área de concentração: Histologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco Dental

Banca examinadora: José Merzel, Sérgio Roberto Peres Line, Paula Cristina Trevilatto, Ana Paula de Souza Pardo, Francisco Humberto Nociti Jr.

Data da defesa: 16/11/2005



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 16 de Novembro de 2005, considerou o candidato MARCO ANTONIO DIAS DA SILVA aprovado.

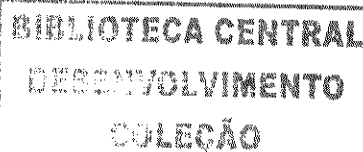
PROF. DR. JOSÉ MERZEL

PROFª. DRª. ANA PAULA DE SOUZA PARDO

PROFª. DRª. PAULA CRISTINA TREVILATTO

PROF. DR. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JÚNIOR

PROF. DR. SERGIO ROBERTO PERES LINE



DEDICATÓRIA

Aos meus pais **MARCO ANTONIO FREIRE DA SILVA e SANDRA LÚCIA GONÇALVES DIAS DA SILVA**, pelo estímulo, confiança, incentivo, carinho, pelo exemplo de conduta e sobretudo pela amizade;

Ao meu irmão **JÚLIO LOURENÇO DIAS DA SILVA** e a todos os meus familiares por sua amizade, confiança e incentivo;

À minha esposa **ANDRESA COSTA PEREIRA** pela paciência, companhia, conselhos e amor tão importantes e necessários.

AGRADECIMENTOS

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

Ao coordenador dos cursos de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Professor Doutor **PEDRO LUIZ ROSALEN**;

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba Professor Doutor **PAULO HENRIQUE FERREIRA CARIA**;

À Professora Doutora **SILVANA PEREIRA BARROS** com quem aprendi muito;

Ao Professor Doutor **JOSÉ MERZEL**, com quem cada conversa de poucos minutos equivale à leitura de uma série de livros e artigos, por me orientar durante minhas pesquisas e elaboração da minha tese;

Aos Professores Doutores **SERGIO ROBERTO PERES LINE**, **PEDRO DUARTE NOVAES** e **FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR**, exemplos de dedicação ao ensino e principalmente à pesquisa;

À Professora **GLÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO** pela ajuda com os cálculos estatísticos.

Às funcionárias do Departamento de Morfologia **MARIA APARECIDA SANTIAGO VARELLA, ELIENE APARECIDA O. N. ROMANI, SUZETE REGINA T. NEDER** e pelo apoio e pela atenção;

À **ELI CRISTINA GOMES ALVES** por me ajudar com a papelada e a burocracia.

Aos doutores **PAULA CRISTINA TREVILATTO, ANA PAULA DE SOUZA** e **RUI BARBOSA DE BRITO JR.** pela amizade e companheirismo que continuam firmes ainda que a distância imposta pelo destino forcem o contrario;

Aos meus amigos **MARCELO ROCHA MARQUES**, grande cozinheiro conhecido como “homem do molho”, **DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS**, que se tornou um exímio lavador de louças por não apresentar um bom desempenho no pôquer, obrigado por todos os momentos no laboratório, no biotério, no restaurante, no bar, no msn...

Aos amigos **JOÃO BATISTA CÉSAR NETO, EDUARDO DE PAULA E SILVA** e **ISABEL MARIA PORTO**, pela colaboração e acima de tudo pela amizade;

Aos amigos **FÁBIO HARUO TASHIMA** e **ANDRÉ LUIS MAFETANO**
por quase uma década de amizade e por fazerem minha segurança nas montanhas e ginásios
da vida;

Ao **PAULO EDUARDO XAVIER RIBEIRO**, meu amigo de todas as
horas e a sua família, que até parece ser um pouco minha também;

À **ÉRICA A. PINHO SINHORETI** e **RAQUEL Q. MARCONDES**
CESAR SACCHI da secretaria de pós-graduação pela atenção e simpatia;

Ao **CNPq** pelo fornecimento da bolsa de doutorado e taxa de bancada que
facilitaram a execução desse trabalho;

Aos meus amigos das repúblicas por me agüentarem mesmo quando eu
voltava bem humorado e pelas histórias e frases, das quais lembrarei e rierei por muito
tempo.

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

Um regador verde de plástico

Para uma planta de borracha chinesa falsificada

Numa terra de plástico falso ...

Radiohead, the bands, fake plastic trees.

Thom Yorke

... Será mais nobre sofrer na alma

Pedradas e flechadas do destino feroz

Ou pegar em armas contra o mar de angústias...

Hamlet, Ato 3, cena 1.

William Shakespeare

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	02
1 INTRODUÇÃO	03
2 REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1 Erupção dental	05
2.2 Hormônio paratireóideo	06
2.3 Efeitos colaterais e toxicidade	08
3 PROPOSIÇÃO	10
4 MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Animais	11
4.2 Obtenção de diferentes condições funcionais	12
4.3 Obtenção e preparo do material	13
5 RESULTADOS	17
5.1 Fibras de Sharpey	17
5.2 Estruturas citoplasmáticas de hepatócitos	25
6 DISCUSSÃO	31
6.1 Fibras de Sharpey	31
6.2 Hepatócitos	34
7 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

RESUMO

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com doses intermitentes PTH na morfologia e na quantidade das fibras de Sharpey de dentes de crescimento contínuo em diferentes condições funcionais e na ultraestrutura dos hepatócitos de ratos. Os animais foram preparados de forma a apresentar normo, hipo e hiperfunção. O grupo tratado recebeu 40µg/kg PTH três vezes por semana, durante trinta dias e o grupo controle recebeu a mesma dose de veículo (ac. acético 1%). A) Utilizando microscopia eletrônica de varredura, foi avaliada a densidade de fibras de Sharpey na face lingual do alvéolo de incisivos. Os resultados demonstraram que os animais tratados com PTH, nas três condições funcionais apresentam uma maior densidade das fibras de Sharpey em relação aos respectivos controles. A mesma diferença se observa quando se considera apenas as fibras de Sharpey mineralizadas. B) No fígado cortes semifinos e ultrafinos foram analisados, através de microscopia de luz e eletrônica de transmissão e obtida a densidade volumétrica de hepatócitos e organelas. Foi demonstrado que os hepatócitos dos animais tratados com PTH apresentam aumento do retículo liso e diminuição da reserva de glicogênio. Os resultados indicam que doses intermitentes de PTH administradas por um período de 30 dias promovem um aumento da densidade de área das fibras de Sharpey em particular das totalmente mineralizadas, o que pode ter resultado no aumento da resistência do ligamento periodontal o que explicaria o retardo da velocidade eruptiva observado em animais tratados. As alterações ultraestruturais descritas nos hepatócitos indicam um aumento no metabolismo hepático promovido pelo hormônio.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of PTH intermittent treatment on periodontal Sharpey fibers and hepatocytes ultrastructural components of wistar rats. The animals were divided in groups and exposed to different occlusal forces, normal occlusion, hyperfunction and hypofunction. PTH treated animals received 40 µg/Kg of PTH, three times a week, during thirty days and the rats from control group received vehicle in following the same protocol. Sharpey fibers density was evaluated through scanning electron microscopy in the lingual face of lower incisors. We observed that PTH treated animals presented increased density of Sharpey fibers and more mineralized fibers, in the three occlusal conditions analyzed, when compared to the control. Transmission electronic microscopy morphometric analysis demonstrated that hepatocytes from PTH treated animals presented an increase of smooth endoplasmatic reticulum and a decrease on glycogen volumetric density. These results indicate that thirty days of PTH intermittent administration are responsible by an increase in alveolar Sharpey fibers density and this evidence might be associated to an enhancement of periodontal ligament resistance and consequently to reduced eruptive rates previously observed. In hepatic tissue the increase in smooth endoplasmatic reticulum and the reduction in glycogen amount induced by PTH might be related to an enhancement of hepatic metabolism promoted by the hormone.

1. INTRODUÇÃO

O hormônio paratireóideo (PTH), o maior controlador do metabolismo orgânico do cálcio e do fosfato (STREWLER, 1987), organiza, por meio da remodelação óssea, o fluxo destes minerais nos ossos e rins (HABENER *et al.*, 1984; SWARTHOUT, 2001).

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

O tratamento com doses intermitentes de PTH é reconhecido por promover aumento da massa e da resistência óssea em camundongos, ratos, coelhos, macacos e humanos (HODSMAN *et al.*, 2000; BURR *et al.*, 2001; DEMPSTER *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2003; SEEBACH *et al.*, 2004; ANDREASSEN *et al.*, 2004).

Em estudo anterior demonstramos que doses intermitentes de PTH promovem anabolismo ósseo mandibular, redução nas taxas de erupção de dentes de crescimento contínuo (SILVA, 2003) e inibição da perda óssea alveolar decorrente da periodontite induzida em ratos (BARROS *et al.*, 2003) e em ratas ovariectomizadas (MARQUES *et al.*, 2005). Entretanto, o conhecimento sobre as alterações geradas pelo tratamento intermitente com PTH nos tecidos periodontais ainda é limitado.

Embora uma série de estudos minimize os poucos efeitos colaterais descritos em função do tratamento com PTH (NEER *et al.*, 2001; TASHJIAN e CHABNER, 2002;

REEVE, 2002; DOBNIG, 2004), no ano de 2002, foi apresentado um estudo mostrando o desenvolvimento de osteosarcomas detectados após tratamento com PTH por 2 anos nas doses 0, 5, 30, ou 75µg/kg, indicando que o desenvolvimento desses tumores ocorreu de maneira dose dependente. Esse estudo concluiu que importantes diferenças entre estudo em ratos e uso clínico em humanos sugerem que a incidência de neoplasia óssea em ratos tratados diariamente por 2 anos não é indicativo de risco aumentado de câncer ósseo em indivíduos adultos (tecido ósseo maduro) que recebam PTH(1-34) por um período limitado de tempo no tratamento de osteoporose (VAHLE *et al.*, 2002), e por recomendação do FDA, PTH (Teraparatide) 20 µg/kg foi considerada uma dose apropriada para o tratamento de osteoporose, mulheres na pos-menopausa e em homens.

Apesar de durante o tratamento com doses intermitentes de PTH serem usadas doses muito maiores que o nível normal (sérico) e de ser metabolizado principalmente no fígado, não existem estudos que demonstrem as reações do tecido hepático a esse tratamento.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Erupção dental

A erupção dental é considerada um processo complexo e estritamente regulado, no qual encontram-se envolvidos todos os tecidos circundantes do dente (WISE *et al.*, 2002). É aceito atualmente como um processo multifatorial, no qual qualquer mudança em um ou mais destes fatores resulta em mudanças em todo o processo (MOXHAN e BERKOVITZ, 1995). Apesar de já ter sido exaustivamente estudado, o complexo processo de erupção dental permanece pobremente explicado.

Para que um dente erupcione deve existir não só um mecanismo que seja responsável pela geração das forças de extrusão como também um processo através do qual estas forças promovam um movimento do elemento dental por entre os tecidos circunjacentes. Ocorrem diversas mudanças tanto nos tecidos periodontais quanto no elemento dental em erupção antes de seu aparecimento na cavidade oral (TEN CATE, 1971; CAHILL & MARKS 1982; GORSKI *et al.*, 1988), e a dinâmica deste processo pode ser afetada por fatores ligados à resistência dos tecidos circundantes (MOXHAN e BERKOVITZ, 1981; BURN-MURDOCH, 1990b). Acredita-se também que deva existir um processo pelo qual os movimentos eruptivos suportem o dente em sua nova posição além de uma remodelação dos tecidos periodontais para que seja mantida a integridade funcional de todo o sistema (MOXHAN e BERKOVITZ, 1981).

Incisivos de erupção contínua, como os de ratos, são freqüentemente utilizados para o estudo do processo eruptivo, por serem um modelo experimental que oferece condições nas quais sutis alterações no processo eruptivo como, por exemplo, na taxa de erupção,

podem ser facilmente detectadas, permitindo que as interferências de determinadas substâncias possam ser testadas (BERKOVITZ *et al.*, 1972; CHIBA *et al.*, 1980; BURN-MURDOCH, 1990).

Estudando dentes de crescimento contínuo observamos recentemente que ratos submetidos a doses intermitentes de hormônio paratireóideo (PTH) apresentam redução nas taxas eruptivas. Verificamos também, por meio de um marcador fluorescente, que há um aumento da formação de tecido ósseo na face lingual do ligamento periodontal de dentes de crescimento contínuo de ratos tratados com PTH (SILVA, 2003).

2.2 Hormônio paratireóideo (PTH)

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

2002). As moléculas deste hormônio são guardadas e maturadas em vesículas de exocitose e, uma vez lançadas na circulação, atingem um nível plasmático normal de 30 pg/ml (GENUTH, 1998), sendo inativadas nos rins e fígado.

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

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

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

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

2.3 Efeitos colaterais e toxicidade

Até pouco tempo eram tidos como efeitos colaterais do tratamento com PTH; náuseas (9%), dores de cabeça (8%), restrições nos movimentos das pernas (3%), aumentos dos níveis de ácido úrico (13%) e vertigens (9%) (NEER *et al.*, 2001; REEVE, 2002; TASHJIAN e CHABNER, 2002; DOBNIG, 2004; CAPPUZZO e DELAFUENTE, 2004).

Após estudo sobre toxicidade apresentado por VAHLE *et al.* (2002) os dados e considerações a respeito do risco de osteosarcoma relacionados ao tratamento com PTH foram revistos por TASHJIAN E CHABNER (2002) e FOX (2002) e mesmo a menor dosagem usada nestes estudos (VAHLE *et al.*, 2002) sendo maior que a menor dose administrada em humanos, o tratamento em humanos sendo mais curto e que osteosarcomas não tenham sido relacionados ao tratamento com PTH em humanos, o tratamento com doses intermitentes de PTH não é indicado a portadores de doença de Paget, a pacientes submetidos à radioterapia, pacientes com hipercalcemia ou hiperparatireoidismo, bem como a crianças e adolescentes (DEAL, 2004).

Apesar do PTH e dos seus análogos serem metabolizados nos rins e principalmente no fígado (BRIXEN *et al.*, 2004) e da possibilidade de se avaliar a citotoxicidade de um tratamento observando-se a conformação ultraestrutural dos hepatócitos (MOODY e REDDY, 1976; MEHANNY e ABDEL-RAHMAN, 1991), não existem estudos demonstrando a influência da administração intermitente de PTH no tecido hepático.

3. PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar a influência do tratamento com doses intermitentes de PTH na morfologia e na densidade de área das fibras de Sharpey de dentes de crescimento contínuo e na ultraestrutura dos hepatócitos de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 30 ratos machos Wistar, inicialmente com quatro semanas de idade, adquiridos junto ao CEMIB-UNICAMP, que permaneceram no biotério central da Faculdade de Odontologia de Piracicaba durante um mês, em gaiolas plásticas (fig. 1) para ambientação. Os animais foram mantidos com um ciclo alternado de 12 horas claro-escuro e receberam ração (Nuvital[®], Paraná/Br) e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

Os procedimentos realizados neste experimento foram avaliados e considerados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP.



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

Aos animais do grupo tratado foi administrado 40µg/Kg de solução hormônio paratireóideo humano (hPTH) fragmento (1-34) (Sigma-Aldrich CO., USA) e ao grupo controle dose semelhante de solução de ácido acético 1% (veículo), subcutaneamente, 3 vezes por semana (NAKAJIMA *et al.*, 2000; IWANIEC *et al.*, 2001; HAGINO *et al.*, 2001, BARROS *et al.*, 2003, MARQUES, *et al.*, 2005), durante 4 semanas.

4.2 Obtenção de diferentes condições funcionais

Dez animais de cada um dos grupos tiveram seus incisivos inferiores esquerdos seccionados na altura da papila gengival, com auxílio de broca diamantada em caneta de alta rotação (fig. 2), a cada dois dias, de modo que fossem mantidos livres de contato oclusal, sendo considerados desimpedidos ou hipofuncionais. Os incisivos inferiores direitos são considerados como dentes impedidos ou hiperfuncionais, devido à manutenção do contato oclusal com os dois incisivos superiores (STEIGMAN *et al.*, 1989). Os incisivos dos outros cinco animais permaneceram em normofunção.



Fig. 2- Desocclusão dos incisivos.

4.3 Obtenção e preparo do material

Completadas as 4 semanas de tratamento, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram suas mandíbulas e parte de seus fígados removidos.

4.3.1 Preparo das peças a partir das mandíbulas

As mandíbulas foram separadas em hemimandíbulas e fixadas em formol 4%, pH 7,4 durante 24 horas. Em seguida, com disco de diamante, a região do diastema foi separada da mandíbula e dividida em duas partes (anterior e posterior) (fig. 3).

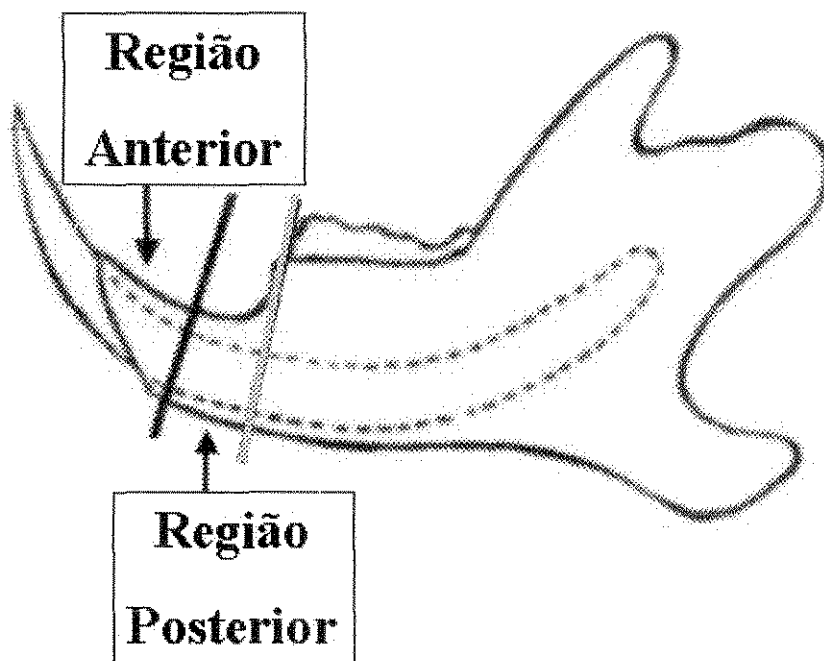


Fig. 3- Esquema mostrando as regiões anterior e posterior do diastema mandibular (área à esquerda da linha cinza), usadas neste estudo.

Em seguida as amostras da região do diastema foram tratadas com hipoclorito de sódio 2,5%. Ao longo deste período foram realizadas cinco trocas de 30 minutos, sendo que a primeira meia hora foi realizada em um aparelho de vibração ultra-som.

As amostras foram cuidadosamente lavadas, três vezes, em água corrente e submersas em acetona durante 10 horas, sendo então levadas à estufa 37°C.

Após 4 horas as amostras foram cobertas com ouro (cerca de 10 nm de espessura, Sputter Coater MED 010, Balzers, Liechtenstein), analisadas e fotografadas em um microscópio eletrônico de varredura (JSM 5600 LV Jeol, Japan).

A densidade das fibras de Sharpey por área foi determinada por contagem de pontos (WEIBEL *et al.*, 1966). Uma área teste com 50 pontos equidistantes (cada ponto equivalendo à $33.823 \mu\text{m}^2$) foi montada usando um sistema de análise de imagens (KS400-2.0, Kontron Electronic, Germany). A análise foi realizada na face lingual do alvéolo do incisivo. Três imagens randômicas foram obtidas de cada região (anterior e posterior da região do diastema) utilizando-se uma ampliação de 300x. A densidade de área corresponde à área ocupada pelas fibras de Sharpey em relação à área teste, obtida pela fórmula:

$$A_a = p_a / 3 \times 50 \times 33,823 \mu\text{m}^2 / \mu\text{m}^2$$

p_a = numero de pontos sobrepostos às fibras de Sharpey em três imagens do mesmo animal sendo identificadas também as fibras totalmente e parcialmente mineralizadas.

Os dados foram submetidos à análise de variância em forma de parcela subdividida, comparando condições funcionais, tratamentos e regiões. As diferenças foram analisadas pelo teste Tukey, adotando-se o nível de significância $p < 0,05$.

4.3.2 Preparo das peças extraídas do fígado

Após a remoção do órgão, foram obtidos blocos de aproximadamente 1 mm³, os quais foram imersos em glutaraldeído 3% (pH 7,2), durante 4 horas, lavados com tampão fosfato resfriado 0,1 M (pH 7,4) e pós fixados em tetróxido de ósmio 1%, 0,1M tamponado à temperatura ambiente por 1 hora. As amostras foram então, desidratadas em soluções crescentes de acetona 50%, 70%, 80% e 90% (10 minutos em cada solução) e em seguida em acetona pura (3 vezes por 20 minutos cada).

Posteriormente as amostras foram incluídas em resina (araldite 502) e em seguida foram obtidos cortes semi-finos (1 µm), corados com azul de metileno e ultrafinos (50-100nm), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As imagens de 5 cortes semifinos de cada animal, de ambos os grupos foram capturadas no sistema de análise de imagens e sobrepostas com uma área teste de 99 pontos equidistantes – cada ponto equivalente a 116,16 µm³. Foram então determinadas as densidades volumétricas de núcleo e citoplasma de hepatócitos, pela fórmula:

$$V_{vn} = p_n / 5 \times 99 \times 116,16 \mu m^3 / \mu m^3$$

e

$$V_{vc} = p_c / 5 \times 99 \times 116,16 \mu m^3 / \mu m^3$$

Onde p_n e p_c são respectivamente os pontos coincidentes com o núcleo e o citoplasma de hepatócitos (WEIBEL *et al.*, 1966).

Foram em seguida calculadas as relações entre núcleo e citoplasma $N/C = V_{vn} / V_{vc}$ e a fração correspondente ao citoplasma $FC = V_{vc} / V_{vc} + V_{vn}$.

Na microscopia eletrônica de transmissão, foram selecionados dez cortes ultrafinos (EM10, Zeiss, Germany) de cada animal e usando uma ampliação de 12000x destes cortes, vinte fotografias digitais foram aleatoriamente obtidas (EM900, Zeiss, Germany).

As imagens foram transferidas para o sistema de análises e uma área teste de 42 pontos equidistantes – cada ponto equivalente a $0,0425\mu\text{m}^3$ – foi usada para determinar a densidade de volume (WEIBEL *et al.*, 1966) das estruturas citoplasmáticas: mitocôndrias, REL, RER, glicogênio e gotículas de lipídios.

Para cada estrutura (por ex. mitocôndria) a densidade de volume V_{mit} foi obtida pela fórmula:

$$V_{\text{mit}} = p_{\text{mit}} / 20 \times 42 \times 0,0425\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$$

Onde p_{mit} é o número de pontos coincidentes com as mitocôndrias nas 10 imagens.

Em seguida correlacionamos a densidade de cada estrutura com a fração citoplasmática (FC). Obtendo assim a densidade volumétrica corrigida pela fórmula:

$$V_{\text{cmi}} = V_{\text{mit}} \times \text{FC}$$

Onde V_{cmi} é a densidade de volume corrigida, V_{mit} a densidade de volume obtida e FC a fração volumétrica do citoplasma dos hepatócitos dos grupos tratado ou controle.

Os dados foram analisados utilizando os Teste t de Student e teste F com nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Fibras de Sharpey

Na região anterior do diastema da face lingual, as fibras de Sharpey apresentaram-se densamente agrupadas formando colunas dispostas longitudinalmente e separadas entre si por áreas de tecido ósseo sem fibras extrínsecas. Na região posterior da face lingual do alvéolo as fibras de Sharpey se agruparam formando ilhas, as quais tornaram-se gradualmente menores em numero e tamanho em direção basal.

Nas várias condições funcionais, em ambas regiões, os animais tratados com PTH apresentaram um aumento da densidade de área das fibras de Sharpey (Tabela 1), e que expressas em porcentagem resultaram respectivamente em: hipo=189,2%, normo=32,7% e hiperfuncional=132,6% em relação aos correspondentes controles.

No grupo controle os alvéolos de dentes hipofuncionais apresentaram uma diminuição na densidade de área das fibras de Sharpey, quando comparados às outras condições funcionais. No grupo tratado não houve diferença significativa entre as diferentes condições funcionais (Tabela 1).

A região anterior do diastema do alvéolo apresentou uma maior densidade de fibras de Sharpey quando comparada a posterior tanto no grupo controle: hipo=141,8%, normo=86,7% e hiperfuncional=74%; quanto no grupo tratado com PTH: hipo=140,6%, normo=153,1% e hiperfuncional=158,4% (Tabela 1 e Figuras 4, 5).

A análise sob microscopia eletrônica de varredura também demonstrou que as inserções de fibras de Sharpey parcialmente mineralizadas eram representadas por

depressões circulares calcificadas e que as inserções das fibras de Sharpey totalmente mineralizadas se apresentaram como projeções em forma de domo arredondado (Figura 6).

Animais tratados com PTH apresentaram, em média, mais fibras mineralizadas que os do grupo controle em todas as condições funcionais. Observamos ainda que a região anterior apresentou mais fibras mineralizadas que a posterior tanto no grupo controle quanto no grupo tratado com PTH, particularmente nos incisivos hiperfuncionais de animais tratados com PTH e controle.

Em relação às fibras parcialmente mineralizadas, a diferença foi significativa na condição hipofuncional do grupo controle em relação as demais condições (tabela 1).

Tratamento	Condição Funcional	Região Anterior			Região Posterior		
		Fibras de Sharpey (S)	Fibras de Sharpey (T)	Fibras de Sharpey (P)	Fibras de Sharpey (S)	Fibras de Sharpey (T)	Fibras de Sharpey (P)
Controle	hipo	94.7±31.1 Bb	6.7±14.2 Bb	87.9±32.8 Bb	50.7±17.9 Bb	10.1±6.08 Bb	40.5±21.3 Bb
	normo	135.2±55.1 Ba	71.0±49.0 Ba	64.2±33.4 Ac	77.7±27.7 Ba	20.2±23.6 Ba	57.4±16.2 Aa
	hiper	196.1±44.6 Ba	81.1±32.8 Ba	114.9±36.1 Aa	81.1±60.2 Ba	27.0±31.1 Ba	54.1±36.1 Aa
PTH	hipo	273.9±29.7 Aa	121.7±23.6 Ac	152.2±24.0 Aa	108.2±26.7 Aa	40.5±21.3 Ab	67.6±22.6 Aa
	normo	260.4±50.3 Aa	165.7±40.5 Ab	94.7±34.8 Ab	108.2±38.2 Aa	47.3±28.4 Ab	60.8±21.3 Aa
	hiper	314.5±76.4 Aa	229.9±57.1 Aa	84.5±45.6 Ab	121.7±39.5 Aa	67.6±27.7 Aa	54.1±17.5 Aa

Tab. 1 –Densidade de média ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^2 \pm \text{d.p.}$) das fibras de Sharpey (S) e subdivididas em totalmente mineralizadas (T) e parcialmente mineralizadas (P), na face lingual das regiões anterior e posterior do diastema do alvéolo de incisivos inferiores nas condições normo, hiper ou hipofuncionais, em animais dos grupos tratado com PTH e controle. Médias seguidas de letras distintas (maiúsculas entre os tratamentos e minúsculas dentro do mesmo grupo) diferem entre si ($p < 0,05$). Em todas as condições funcionais a densidade de fibras (S, T e P) é maior na região anterior quando comparada a região posterior ($p < 0,05$).

Para posterior discussão, reproduzimos numa tabela os dados obtidos por Silva (2003) referentes aos valores das taxas diárias de erupção de incisivos de ratos cujo tratamento e respectivos controles foram idênticos aos aqui descritos (Tabela 2).

		Controle			Tratado com PTH		
Dias	Condição funcional	Hipofuncional	Normofuncional	Hiperfuncional	Hipofuncional	Normofuncional	Hiperfuncional
3		0,83	0,47	0,42	0,91	0,51	0,57
5		0,77	0,49	0,45	0,63	0,5	0,42
7		0,8	0,46	0,48	0,56	0,46	0,33
10		0,73	0,46	0,39	0,53	0,47	0,33
12		0,8	0,47	0,48	0,5	0,48	0,29
14		0,76	0,5	0,47	0,49	0,45	0,27
17		0,8	0,5	0,49	0,46	0,45	0,29
19		0,82	0,46	0,48	0,4	0,45	0,19
21		0,76	0,47	0,52	0,41	0,43	0,19
24		0,77	0,48	0,42	0,39	0,42	0,17
26		0,8	0,48	0,48	0,33	0,4	0,11
28		0,76	0,51	0,48	0,29	0,38	0,07
		Aa	Bb	Ab	Ba	Bb	Bb

Tab. 2- Valores das taxas eruptivas diárias de incisivos inferiores de ratos nos grupos controle e tratado com PTH. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) entre os grupos (tratado e controle) em cada condição funcional e minúsculas entre as condições funcionais de um mesmo grupo.

As significâncias estatísticas entre as taxas eruptivas e a densidade de área das fibras de Sharpey são comparadas na tabela 3.

Condição	Grupos	Taxa Eruptiva	Densidade de área das Fibras de Sharpey Parcialmente Mineralizadas	Densidade de área das Fibras de Sharpey Totalmente Mineralizadas
Funcional				
Hipofuncional	Controle	Aa	Bb	Bb
	Tratado	Ba	Aa	Ac
Normofuncional	Controle	Bb	Ba	Ba
	Tratado	Ba	Aa	Ab
Hiperfuncional	Controle	Ab	Ba	Ba
	Tratado	Bb	Aa	Aa

Tab. 3- Comparação entre as significâncias estatísticas para taxas eruptivas (SILVA, 2003) e densidade de área de Fibras de Sharpey (totalmente e parcialmente mineralizadas). Letras maiúsculas indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos (tratado e controle) em cada condição funcional e minúsculas entre as condições funcionais de um mesmo grupo.

Analisando os dados das três tabelas, verifica-se que parece existir uma relação entre o aumento da densidade de área das fibras de Sharpey e a diminuição das taxas eruptivas, nos dentes hipo e hiperfuncionais. Nos dentes normofuncionais houve aumento da densidade, mas a diferença na taxa eruptiva entre os grupos tratado e controle não foi significativa.

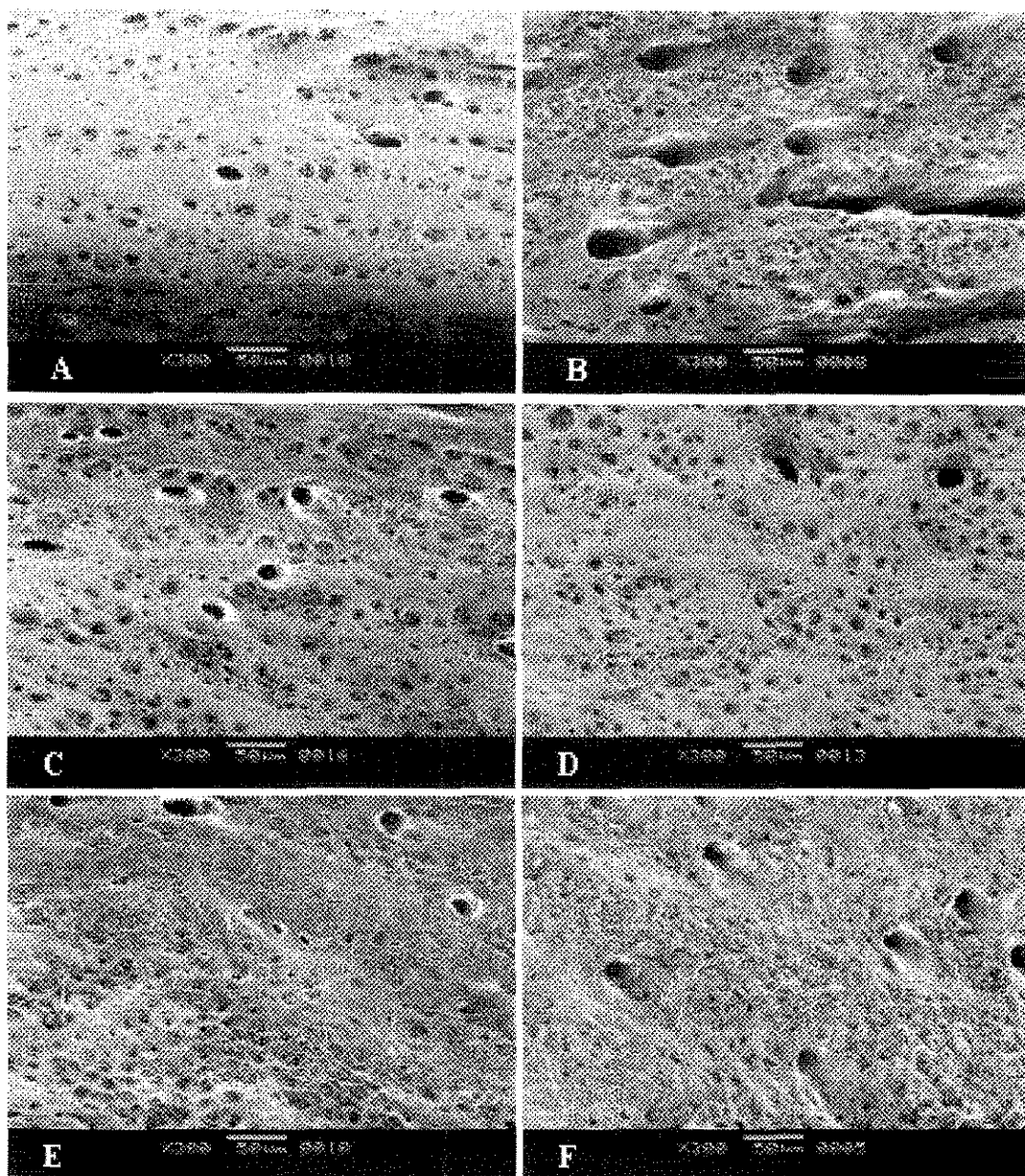


Fig. 4- Micrografia de MEV da face lingual do alvéolo na região anterior do diastema. Observamos uma maior densidade de fibras no grupo tratado com PTH (B, hipofuncional, D normofuncional e F hiperfuncional) quando comparados com o grupo controle (A hipofuncional, C normofuncional e E hiperfuncional).

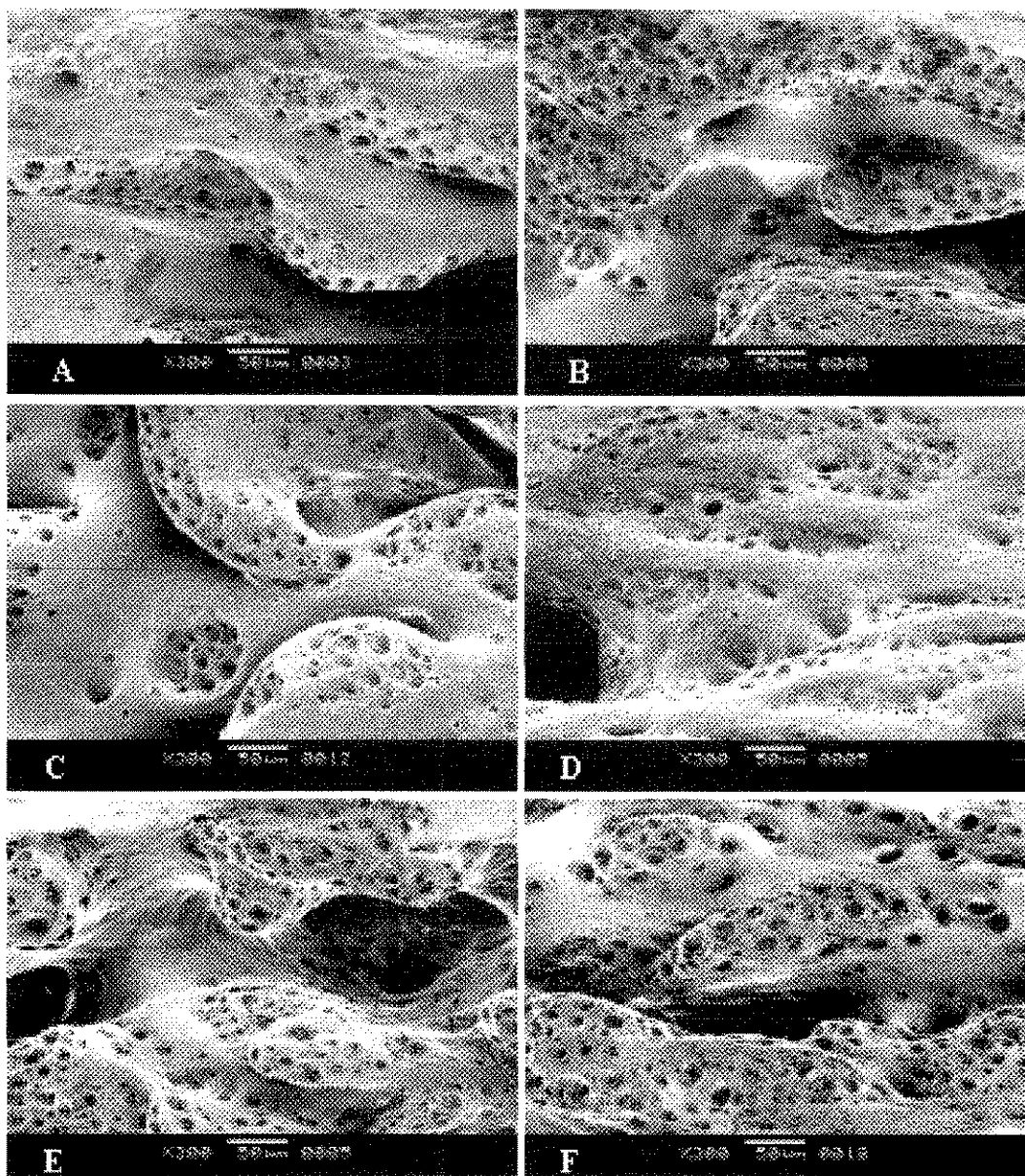


Fig. 5- Micrografia de MEV da face lingual do alvéolo na região posterior do diastema. Observamos uma maior densidade de fibras no grupo tratado com PTH (B, hipofuncional, D normofuncional e F hiperfuncional) quando comparados com o grupo controle (A hipofuncional, C normofuncional e E hiperfuncional).

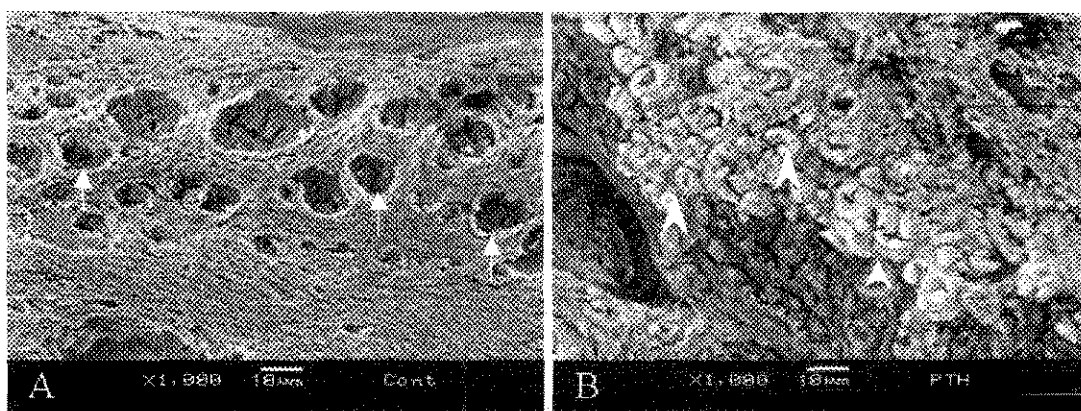


Fig. 6 - Micrografia de MEV da face lingual do alvéolo na região posterior do diastema. Observamos fibras parcialmente mineralizadas (setas) na região anterior do diastema de animal normofuncional do grupo controle (A) e fibras totalmente mineralizadas (cabeças de seta) na região anterior do diastema de animal normofuncional do grupo tratado com PTH (B).

5.2 Estruturas citoplasmáticas de hepatócitos

A relação núcleo citoplasma dos hepatócitos foi semelhante nos grupos controle (0,057) e tratado (0,052) (figs. 7 e 8).

Os grupos tratado e controle também não apresentaram diferenças na fração celular ocupada por citoplasma: respectivamente, controle 0,945 e tratado 0,949.

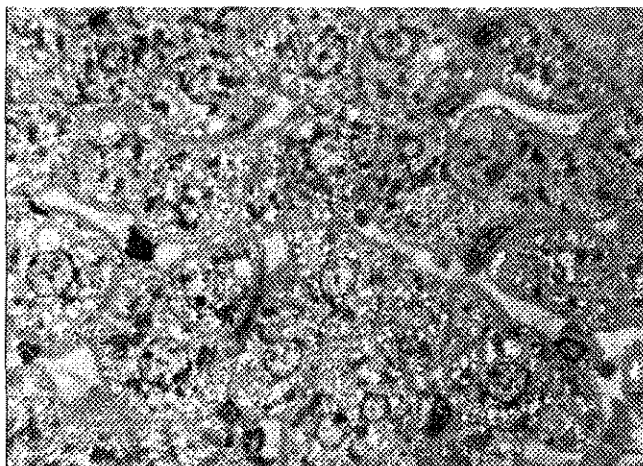


Fig. 7 - Fotomicrografia do tecido hepático de animal do grupo controle, corada com azul de metileno.

Microscopia de luz, aumento 100x.

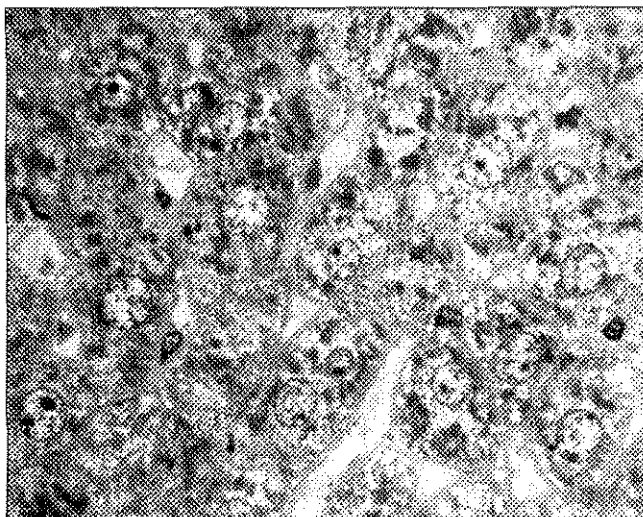


Fig. 8 - Fotomicrografia do tecido hepático de animal do grupo tratado, corada com azul de metileno.

Microscopia de luz, aumento 100x.

O aspecto morfológico das estruturas examinadas não diferiu entre os grupos. Via de regra, porções de citoplasma contendo RER foram encontradas muito próximas às mitocôndrias (figuras 10 e 11). Junções contínuas entre o retículo endoplasmático liso (REL) e o retículo endoplasmático rugoso (RER) eram evidenciadas freqüentemente (figuras 10 e 11). Partículas densas, de 100 a 350nm de diâmetro, de glicogênio foram encontradas próximas ao REL (figs. 10, 11, 12 e 13).

As únicas estruturas que apresentaram diferenças na densidade volumétrica foram o REL (aumentado) e o glicogênio (diminuído) nos animais tratados com PTH (fig. 9).

Foi também demonstrada no grupo tratado uma acentuada diminuição na quantidade de glicogênio ($p<0,05$) (figuras 9, 10, 11, 12 e 13).

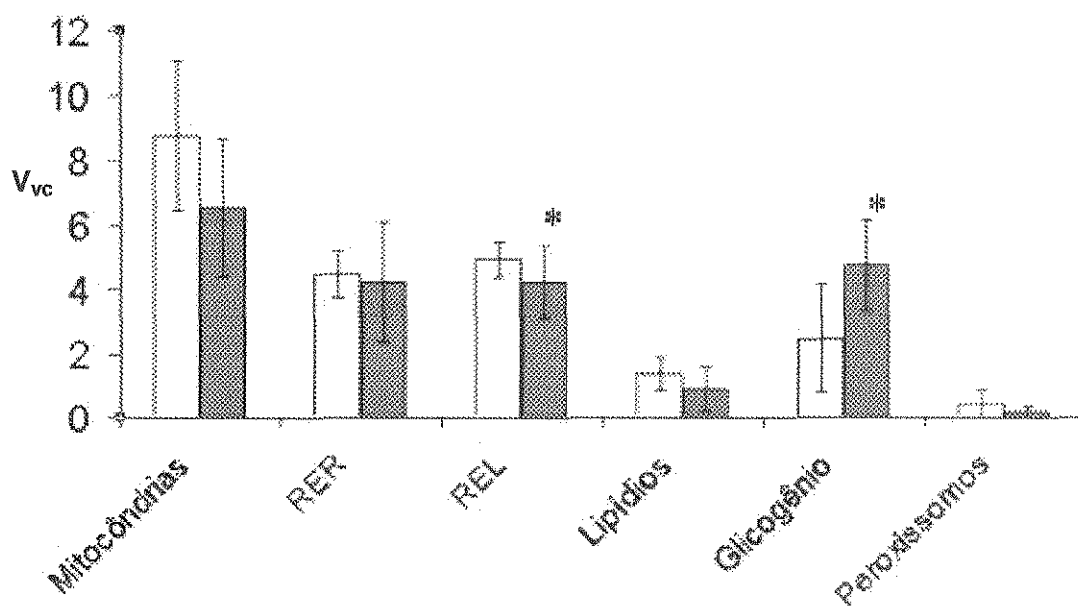


Fig. 9- Densidade volumétrica corrigida (V_{vc}) média ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3 \pm \text{dp}$) de mitocôndrias, retículos rugoso (RER) e liso (REL), gotículas de lipídio, glicogênio e peroxissomos nos hepatócitos de animais dos grupos tratado $\square$ e controle $\blacksquare$. Os hepatócitos do grupo tratado apresentaram em seu citoplasma uma maior densidade de REL e uma menor densidade de glicogênio, quando comparados aos do grupo controle. (* = $p<0,05$).

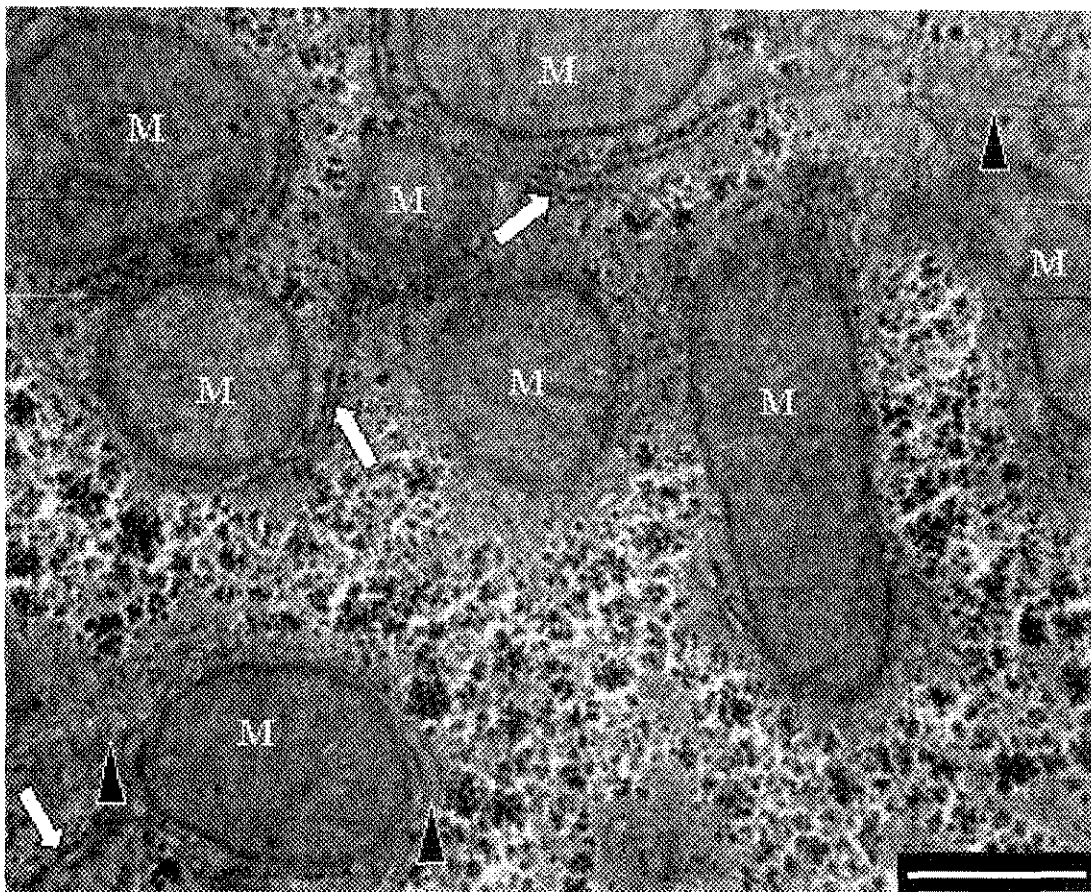


Fig. 10- Fotomicrografia de hepatócito do grupo controle. Notamos grande quantidade de glicogênio e pequena quantidade de REL, RER e mitocôndrias. Setas brancas = RER; triângulos pretos = REL; M=mitocôndrias.

Barra = 500 nm.

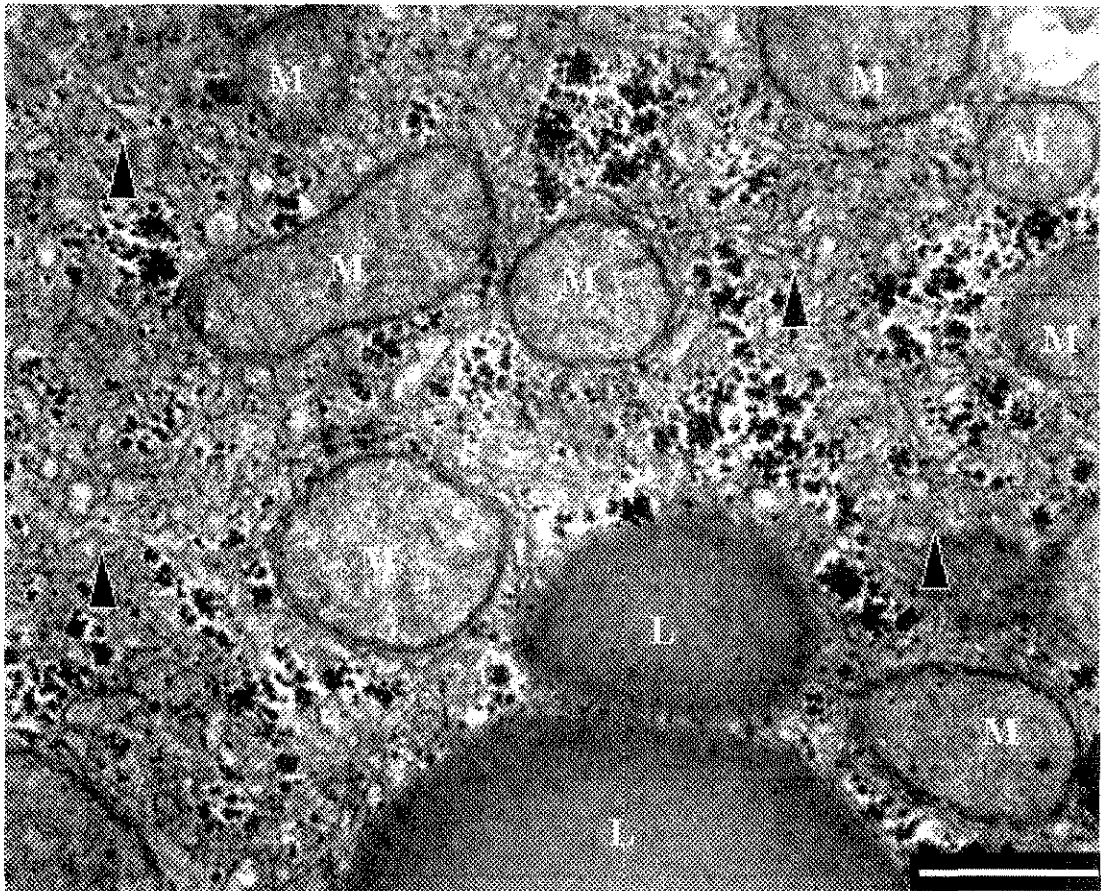


Fig. 11- Fotomicrografia de hepatócito do grupo tratado com PTH. Notamos grande quantidade de REL e acúmulos de lipídios juntamente com mitocôndrias e pequena quantidade de glicogênio. Setas brancas = REL; Triângulos pretos = REL; L = gotículas de lipídio e M = mitocôndrias. Barra = 500nm.

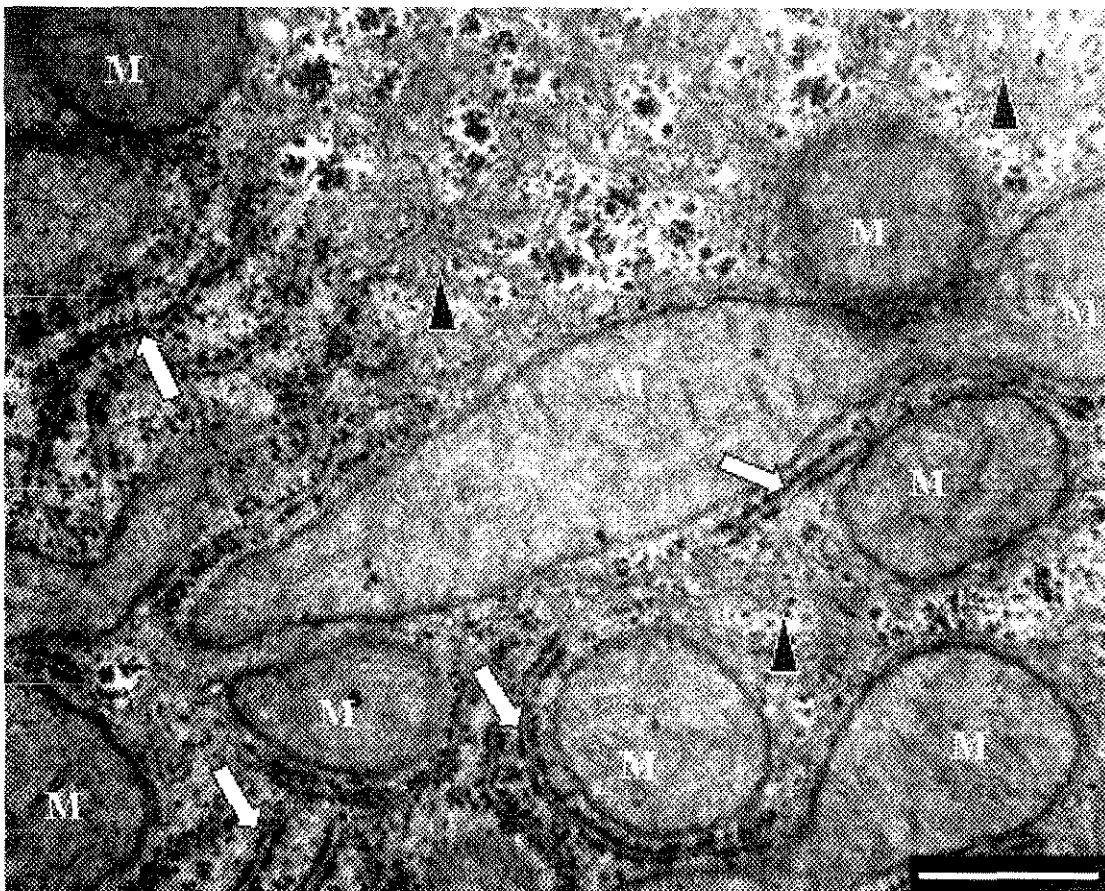


Fig. 12- Fotomicrografia de hepatócito do grupo controle. Notamos a presença de RER, mitocôndrias bem como REL entremeado a porções de glicogênio. Setas brancas = RER; triângulos pretos = REL e M = mitocôndrias. Barra = 500 nm.

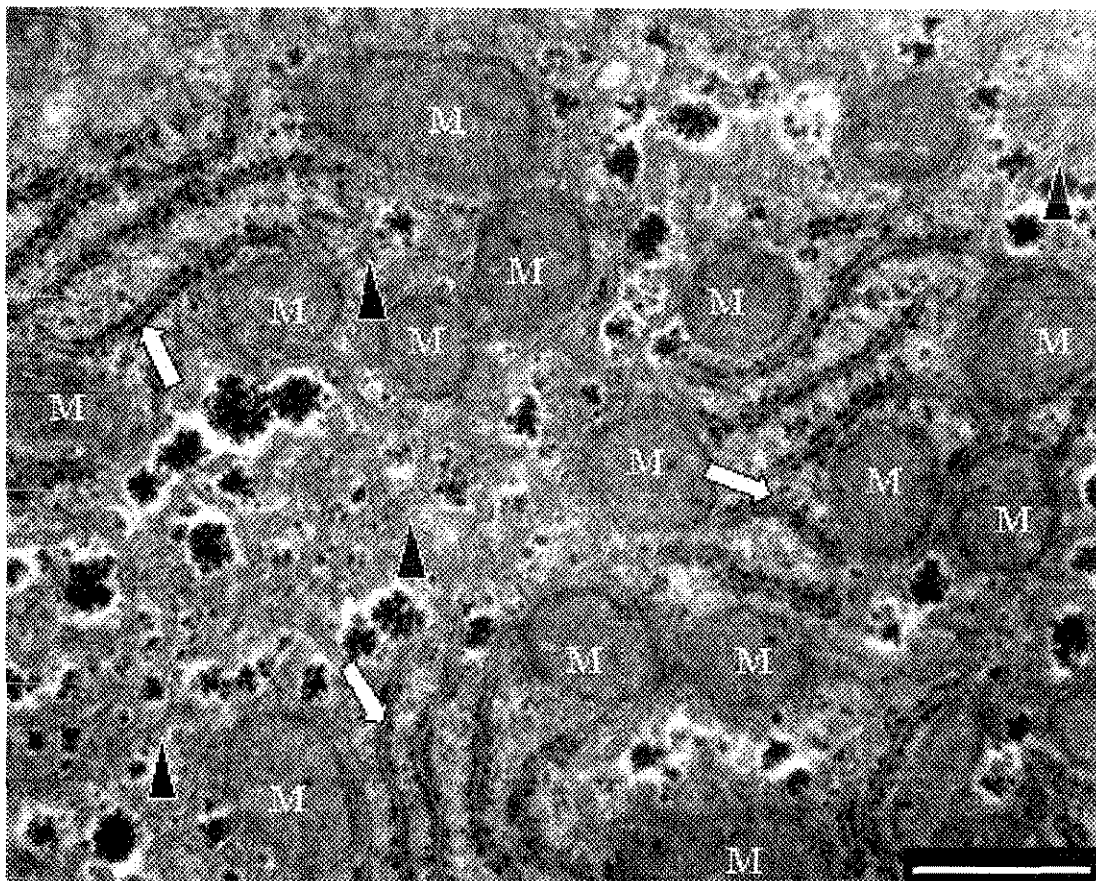


Fig. 13- Fotomicrografia de hepatócito do grupo tratado com PTH.

Setas brancas = RER; triângulos pretos = REL; e M=mitocôndrias. Barra = 500 nm.

6. DISCUSSÃO

6.1 Fibras de Sharpey

As fibras de Sharpey no alvéolo de ratos nas três condições funcionais aqui descritas foram recentemente estudadas por Silva e Merzel (2004), que em seu estudo descreveram que a densidade das fibras de Sharpey se reduz de incisal em direção basal e que na condição hipofuncional houve uma diminuição da densidade em relação às demais condições. Sugeriram também que a mineralização possa estar relacionada com a região do alvéolo e a condição funcional dos incisivos.

Nesse estudo, observou-se que dentes livres de contato oclusal apresentam uma diminuição não só na densidade de área, mas também na densidade de fibras de Sharpey totalmente mineralizadas. Os animais submetidos ao tratamento com doses intermitentes de PTH apresentaram um aumento na mineralização das fibras de Sharpey no periodonto dos incisivos.

Os resultados obtidos neste estudo, referentes à mineralização e ao aumento da quantidade de fibras de Sharpey, podem ser explicados uma vez que as células do ligamento periodontal demonstram características e respondem de formas semelhantes aos osteoblastos (CHOU *et al.*, 2002). Por este motivo acredita-se também que possuem potencial para diferenciar-se em células ósseas (BASDRA e KOMPOSCH, 1997).

Recentemente foram demonstradas evidências da influência do PTH no tecido periodontal, como a modulação da proliferação, diferenciação e produção de OPG, variando de acordo com o grau de maturação celular e modo de administração da droga

(LOSSDÖRFER, *et al.*, 2005). Uma das explicações para o aumento do número de osteoblastos e conseqüentemente da mineralização provavelmente se dá pela inibição da apoptose, decorrente da diminuição dos níveis de Runx2, induzidos pelo PTH por meio da via de proteólise proteossomal mediada por Smurf1 (BELLIDO *et al.*, 2003).

Ainda analisando os efeitos do PTH intermitente nas células periodontais e interessante apontar o fato deste tratamento também induzir aumento da produção de RNAm para fosfatase alcalina e pró-colágeno tipo I pelos osteoblastos (LOCKLIN *et al.*, 2003).

Colágeno tipo I é o componente mais importante das fibras de Sharpey e juntamente com as fibras colágenas tipo III são os principais constituintes da matriz extracelular do ligamento periodontal (TAKITA *et al.*, 1987; HUANG *et al.*, 1991).

Analisando os dados obtidos neste estudo juntamente aos nossos resultados anteriores (Tabela 3), verifica-se que dentes hipo e hiperfuncionais de animais submetidos ao tratamento com doses intermitentes de hPTH (1-34) apresentaram uma relação entre o aumento da densidade de fibras de Sharpey e a diminuição das taxas eruptivas (SILVA, 2003). Já nos dentes normofuncionais o aumento da densidade das fibras de Sharpey não correspondeu a uma alteração na taxa eruptiva.

O processo eruptivo é tido como multifatorial. Deste modo, para que um dente erupcione acredita-se que deva existir não só um mecanismo para geração de forças extrusivas como também um processo pelo qual essas forças sejam transformadas em movimentos eruptivos por entre os tecidos circundantes. Dessa forma a erupção pode ser influenciada por mudanças na resistência dos tecidos circundantes. Além disso, deve também existir um processo através do qual os movimentos eruptivos sejam mantidos,

tendo como resultado o suporte do dente em uma nova posição, a partir da remodelação dos tecidos periodontais e conseqüente manutenção da integridade funcional desse sistema. As ações destes fatores não são totalmente entendidas, entretanto é importante perceber que mudanças no processo eruptivo podem ocorrer devido a mudanças na força eruptiva, na resistência a erupção, na remodelação dos tecidos circundantes ou em mais de um destes fatores simultaneamente (MOXHAM e BERKOVITZ, 1995).

É possível inferir que o tratamento com PTH induzindo um aumento na densidade e na mineralização das fibras de Sharpey resultou numa maior resistência do ligamento periodontal, um dos fatores que atuam no processo eruptivo.

Contudo, tal fato não ocorreu em relação aos dentes normofuncionais onde, a mesma alteração nas fibras de Sharpey não foi seguida de desaceleração da erupção.

Estudos afirmam que os movimentos dentários produzem forças no ligamento periodontal, as quais quando transferidas para o alvéolo se traduzem em respostas celulares periodontais (TANNE *et al.*, 1987; KATONA *et al.*, 1995; MIDDLETON *et al.*, 1996; PUENTE *et al.*, 1996; TAMATSU *et al.*, 1996). Em resposta a essas forças, o tecido ósseo é depositado sobre a parede alveolar nas regiões de tensão de modo que a reabsorção ocorre em lugares atingidos por forças de pressão (YAMASAKI *et al.*, 1980; LILYA *et al.*, 1984; MARTINEZ e JOHNSON, 1987; CHAO *et al.*, 1988; LEE, 1990; KING *et al.*, 1991; KING e KEELING, 1995; ASHIZAWA e SAHARA, 1998). É possível, portanto, que quando estas forças estão alteradas, como no caso de dentes em hipo e hiperfunção, estas modificações acabem por atuar sinergicamente ao aumento da densidade das fibras de Sharpey, retardando a erupção dental. Fato análogo ocorre com drogas citotóxicas, como a ciclofosfamida, que só desacelera a erupção de dentes desimpedidos (hipofuncionais)

(BURN-MURDOCH, 1990). A hipótese deste autor é que a droga só mostra seus efeitos quando as forças atuando nas fibras periodontais se alteram.

Nossos dados demonstram que o aumento das taxas eruptivas, obtido a partir da redução na resistência ao movimento eruptivo (dentes hipofuncionais) pode ser controlado a partir de modificações no padrão de remodelação dos tecidos de sustentação (aumento da mineralização e da densidade das fibras de Sharpey), reafirmando, dessa forma, a característica multifatorial do processo eruptivo e que alterações na erupção podem ocorrer devido a mudanças nas forças eruptivas, na resistência a erupção nas características da remodelação dos tecidos de suporte ou em mais de um destes fatores simultaneamente.

6.2 Hepatócitos

Estudos ultraestruturais ampliaram o conhecimento sobre as características celulares estruturais e suas funções no fígado. Os hepatócitos poliédricos normais apresentam grande quantidade estruturas subcelulares como mitocôndrias, peroxissomos, lisossomos e retículos liso e rugoso (STABULI *et al.*, 1969; MOODY e REDDY, 1976; MEHANNY e ABDEL-RAHMAN, 1991) e alterações no seu padrão de funcionamento podem causar alterações em sua disposição.

Seguindo este raciocínio, observamos que um mês de tratamento com PTH intermitente induz algumas alterações ultraestruturais nos hepatócitos de ratos. A alteração considerada mais importante foi o aumento da porção citoplasmática ocupada por REL.

O aumento do REL é observado em animais submetidos a diabetes experimental, (WELT *et al.*, 2004) a administração de cocaína (MEHANNY e ABDEL-RAHMAN, 1991)

e fenobarbital (STABULI *et al.*, 1969). A ampliação do REL também geralmente está associada a drogas indutoras da proliferação dos peroxissomos (HESS *et al.*, 1965; REDDY *et al.*, 1974; LAKE *et al.*, 1975; REDDY e KRISHNAKANTHA, 1975).

MOODY e REDDY (1976) consideram que a proliferação do REL por alguns tipos de substâncias pode não estar relacionada à proliferação dos peroxissomos e sim com a indução de enzimas envolvidas no metabolismo de drogas. Entretanto, a composição das membranas limitantes do REL e dos peroxissomos tem demonstrado ser muito similares (DONALDSON *et al.*, 1972), em adição continuidades entre os peroxissomos e o REL são freqüentemente descritas durante observações ultrastruturais (NOVIKOFF e SHIN, 1964).

Neste estudo, apesar de não apresentar diferença estatística, foi observado um aumento de 184,9% no volume dos peroxissomos nos hepatócitos. Além de estar associado ao crescimento do REL, em roedores, a proliferação dos peroxissomos é considerada um indicador de exposição e possivelmente ligação a mecanismos carcinogênicos, desde que pode levar a superprodução intracelular de H_2O_2 (DIEZ-FERNANDEZ, *et al.*, 1998).

A proliferação do REL pode causar hepatomegalia e aumento no risco de neoplasia hepatocelular, quando induzida por proliferadores de peroxissomos (ASHBY *et al.*, 1994; GONZALEZ *et al.*, 1998; KOSTKA *et al.*, 2002). Neste estudo, apesar de termos encontrado, no grupo tratado com PTH, um aumento na porção citoplasmática ocupada por REL quando comparado ao grupo controle, analisando a relação entre núcleo e citoplasma dos hepatócitos numa área determinada não houve evidência de aumento no volume celular após um período curto de tratamento.

Hormônios metabólicos alteram drasticamente a quantidade de glicogênio no interior dos hepatócitos (PILICHOS, *et al.* 2005). Corroborando com isso, nossos

resultados revelaram que comparados aos hepatócitos dos animais do grupo controle, ricos em glicogênio, os hepatócitos dos animais do grupo experimental mostraram quantidades diminutas de glicogênio, possivelmente decorrente do excesso metabólico a que foram submetidos.

Tendo em vista o fato de que os tratamentos com doses intermitentes de PTH em humanos estendem-se por vários meses, atentamos também para o indício de aumentos do acúmulo de lipídios nos hepatócitos dos animais do grupo tratado (50%). Apesar de não apresentarem diferença entre os grupos tratado com PTH e controle, segundo FUSKEVAG *et al.*, (2000) o aumento do acúmulo de lipídios pode provavelmente refletir degeneração celular e necrose. Além disso, gotículas de lipídio, como as observadas nos animais do grupo tratado, interferem na distribuição do oxigênio e dos nutrientes pelas células do fígado. Entendemos que a avaliação das condições hepáticas de animais tratados por períodos maiores com doses intermitentes de PTH mostra-se importante, pois, ao estudar alcoólatras, LIEBER (1993) descreveu o fígado gorduroso como o primeiro estágio da deterioração hepática.

Alterações como as descritas anteriormente requerem um aumento na produção de energia pelas células e, desta forma, um adequado número de mitocôndrias. Assim torna-se importante ressaltar a densidade volumétrica das mitocôndrias observada no grupo tratado com PTH, que se apresentou aproximadamente 40% maior que a do grupo controle ($p=0,051$). Entendemos que um aumento na amostra ou no período de tratamento provavelmente tornem estas diferenças estatisticamente significantes.

Assim consideramos que a proliferação do REL e o indício do aumento do número de mitocôndrias e de vesículas contendo lipoproteínas de baixa densidade sugerem um

aumento no metabolismo lipídico pelos hepatócitos (MAHLEY *et al.*, 1969; GHADIALLY, 1988).

Entendemos também que, como já observado por outros autores drogas (FUSKEVAG *et al.* 2000) ou hormônios (PILICHOS, *et al.* 2005) promovem alterações na proporção e disposição dos componentes intracelulares dos hepatócitos, não estando, contudo, no período estudado, diretamente relacionados a um aumento da citotoxicidade.

Podemos concluir, então, que a administração intermitente de PTH, apesar de ser um potente tratamento no que diz respeito ao anabolismo ósseo, induz alterações ultrastruturais nos hepatócitos de ratos wistar, como aumento do REL e diminuição do glicogênio, os quais, combinados com indícios de alterações em outras estruturas citoplasmáticas indicam um aumento do metabolismo hepático.

7. CONCLUSÃO

O PTH administrado de forma intermitente durante trinta dias em ratos Wistar induz:

A: um aumento na densidade de área e na mineralização das fibras de Sharpey nas diferentes condições funcionais avaliadas, sugerindo que a já relatada redução progressiva das taxas de erupção dos incisivos inferiores de ratos, em resposta ao tratamento intermitente com PTH, possa estar relacionada com um aumento da resistência oferecida pelo ligamento periodontal ao movimento eruptivo.

B: um aumento na densidade de REL e uma diminuição na densidade de glicogênio em hepatócitos de ratos, indicando um aumento no metabolismo hepático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDREASSEN TT, WILICK GE, MORLEY P, WHITFIELD JF. Treatment with parathyroid hormone hPTH(1-34), hPTH(1-31), and monocyclic hPTH(1-31) enhances fracture strength and callus amount after withdrawal fracture strength and callus mechanical quality continue to increase. *Calcif Tissue Int*, 2004; **74**(4): 351-356.

ASHBY J., BRADY A., ELCOMBE C.R., *et al.*, Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol*, 1994; **13**(2):S1-S117.

ASHIZAWA Y, SAHARA N. Quantitative evaluation of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol*, 1998; **43**:473-484.

BARROS SP, SILVA MA, SOMERMAN MJ, NOCITI FH JR. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res*, 2003; **82**(10):791-795.

BASDRA EK, KOMPOSCH G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod*. 1997;**19**(6):615-21.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

BELLIDO T, ALI AA, PLOTKIN LI, *et al.*, Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem.* 2003;**12**;278(50):50259-72.

BERKOVITZ BK, MIGDALSKI A, SOLOMON M. The effect of the lathyritic agent aminoacetonitrile on the unimpeded eruption rate in normal and root-resected rat lower incisors. *Arch Oral Biol*, 1972; **17**(12):1755-1763.

BIKLE DD, SAKATA T, LEARY C, *et al.*, Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res*, 2002; **17**(9):1570-1578.

BRIXEN KT, CHRISTENSEN PM, EJERSTED C, LANGDAHL BL. Teriparatide (biosynthetic human parathyroid hormone 1-34): a new paradigm in the treatment of osteoporosis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004; **94**(6):260-270.

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

BURN-MURDOCH, R., The role of the vasculature in tooth eruption. *Eur J Orthod*, 1990a;**12**(1):101-108.

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

BURR DB, HIRANO T, TURNER CH, HOTCHKISS C, BROMMAGE R, HOCK JM. Intermittently administered human parathyroid hormone(1-34) treatment increases intracortical bone turnover and porosity without reducing bone strength in the humerus of ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Miner Res*, 2001;**16**(1):157-165.

CAHILL, D.R., MARKS, S.C. JR., Chronology and histology of exfoliation and eruption of mandibular premolars in dogs. *J Morphol*, 1982;**171**(2):213-8.

CALVI LM, SIMS NA, HUNZELMAN JL, *et al.* Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest*, 2001; **107**:277-86.

CAPPUZZO KA, DELAFUENTE JC. Teriparatide for severe osteoporosis. *Ann Pharmacother*, 2004; **38**(2):294-302.

CHAO CF, SHIH C, WANG TM, LO TH. Effects of prostaglandin E₂ on alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement. *Acta Anat*, 1988; **132**:304-309.

CHIBA, M., TAKIZAWA, K.; OHSHIMA, S., Dose-response effects of colchicine and vinblastine on unimpeded eruption rates of the rat mandibular incisor. *Arch Oral Biol*, 1980;**25**:115–119.

CHOU AM, SAE-LIM V, LIM T, *et al.*, Culturing and characterization of human periodontal ligament fibroblasts—a preliminary study. *Mater Sci Eng*, 2002; **20**:77-83.

DEAL C. The use of intermittent human parathyroid hormone as a treatment for osteoporosis. *Curr Rheumatol Rep*, 2004; **6**(1):49-58.

DEMIRALP B, CHEN HL, KOH AJ, KELLER ET, MCCAULEY LK. Anabolic actions of parathyroid hormone during bone growth are dependent on c-fos. *Endocrinology*, 2002;**143**(10):4038-4047.

DEMPSTER DW, COSMAN F, KURLAND ES, *et al.* Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res*, 2001;**16**(10):1846-1853.

DEMPSTER DW, COSMAN F, PARISIEN M, SHEN V, LINDSAY R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev*, 1993;**14**:690-709.

DIEZ-FERNANDEZ C, SANZ N, ALVAREZ AM, WOLF A, CASCALES M. The effect of non-genotoxic carcinogens, phenobarbital and clofibrate, on the relationship between reactive oxygen species, antioxidant enzyme expression and apoptosis. *Carcinogenesis*. 1998 Oct;**19**(10):1715-22.

DOBNIG H. A review of teriparatide and its clinical efficacy in the treatment of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother*, 2004; **5**(5):1153-1162.

DONALDSON, R. P., TOLBERT N. E., SCHNARRENBURGER C. A comparison of microbody membranes with microsomes and mitochondria from plant and animal tissue. *Arch. Biochem. Biophys*, 1972;**152**:199-215.

FOX, J. Developments in parathyroid hormone and related peptides as bone-formation agents. *Curr. Opin. Pharmacol*, 2002;**2**:338-344.

FUSKEVAG OM, KRISTIANSEN C, OLSEN R, AARBAKKE J, LINDAL S. Microvascular perturbations in rats receiving the maximum tolerated dose of methotrexate or its major metabolite 7-hydroxymethotrexate. *Ultrastruct Pathol*, 2000;**24**(5):325-332.

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

GHADIALLY, F. N. Ultrastructure of the Cell and Matrix, *Buttersworth*, 1988;**2**(3):767–781.

GONZALEZ F.J., PETERS J.M., CATTLEY R.C., Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator activated receptor α . *J. Natl. Cancer Inst*, 1998;**22**:1702–1709.

GORSKI JP, MARKS SC JR, CAHILL DR, WISE GE. Developmental changes in the extracellular matrix of the dental follicle during tooth eruption. *Connect Tissue Res*, 1988;**18**(3):175-190.

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

HAGINO H, OKANO T, AKHTER MP, ENOKIDA M, TESHIMA R. Effect of parathyroid hormone on cortical bone response to in vivo external loading of the rat tibia. *J Bone Miner Metab*, 2001;**19**(4):244-250.

HESS R, STAUBLI W, RIESS W. Nature of the hepatomegaly effect produced by ethyl-chlorophenoxy-isobutyrate in the rat. *Nature*, 1965;**208**(13):856-858.

HOCK, J.M., GERA, I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*, 1992;7(1):65-72.

HODSMAN AB, KISIEL M, ADACHI JD, FRAHER LJ, WATSON PH. Histomorphometric evidence for increased bone turnover without change in cortical thickness or porosity after 2 years of cyclical hPTH(1-34) therapy in women with severe osteoporosis. *Bone*, 2000;27(2):311-318.

HUANG YH, OHSAKI Y, KURISU K. Distribution of type I and type III collagen in developing periodontal ligament of mice. *Matrix*, 1991;11:25-35.

IWANIEC UT, SAMNEGARD E, CULLEN DM, KIMMEL DB. Maintenance of cancellous bone in ovariectomized, human parathyroid hormone [hPTH(1-84)]-treated rats by estrogen, risedronate, or reduced hPTH. *Bone*, 2001; 29(4):352-360.

JUPPNER H, ABOU-SAMRA AB, FREEMAN M, *et al.* A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*, 1991;254:1024-1026.

KATONA TR, PAYDAR NH, AKAY HU, ROBERTS WE. Stress analysis of bone remodeling response to rat molar orthodontics. *J Biomech*, 1995;28:27-38.

KING GJ, KEELING SD, WRONSKI TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone*, 1991; **12**:401-409.

KING GJ, KEELING SD. Orthodontic tooth remodeling in relation to appliance decay. *Angle Orthod*, 1995;**65**:129-140.

KOSTKA G, PALUT D, LUDWICKI JK, KOPEC-SZLEZAK J, WIADROWSKA B, LEMBOWICZ K. Hepatocellular peroxisome proliferation and DNA synthesis in Wistar rats treated with herbicide fluazifop. *Toxicology*, 2002;**16**,178(3):221-228.

LAKE BG, GANGOLLI SD, GRASSO P, LLOYD AG. Studies on the hepatic effects of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1975;**32**(2):355-367.

LEE W. Experimental study of the effect of prostaglandin administration on tooth movement-with particular emphasis on the relationship to the method of PGE₁ administration. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 1990;**98**:231-241.

LIEBER C. S., Herman Award Lecture: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr*, 1993;**58**(3):430-442.

LILYA E, LINDSKOG S, HAMMARSTROM L. Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Odontol Scand*, 1984;**42**:1-11,.

LOSSDÖRFER, S; GÖTZ, W; JÄGER, A, PTH(1-34) Affects Osteoprotegerin Production in Human PDL Cells in vitro. *J Dent Res*, 2005; **84**(7):634-638,

LOCKLIN RM, KHOSLA S, TURNER RT, RIGGS BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem*, 2003;**1,89**(1):180-190.

MAHLEY, R. W., HAMILTON, R. L., AND LEQUIRE, L. S. Characterization of lipoprotein particles isolated from the Golgi apparatus of rat liver. *J Lipid Res*, 1969;**10**:433–439,.

MARQUES MR, DA SILVA MA, MANZI FR, CESAR-NETO JB, NOCITI FH JR, BARROS SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*, 2005;**50**(4):421-429.

MARTINEZ RH, JOHNSON RB. Effects of orthodontic forces on the morphology and diameter of Sharpey fibers of the alveolar bone of the rat. *Anat Rec*, 1987;**219**:10-20.

MARTÍN, K.J., GONZALEZ, E.A. The evolution of assays for parathyroid hormone. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001;**10**(5):569-574.

MEHANNY SZ, ABDEL-RAHMAN MS. Cocaine hepatotoxicity in mice: histologic and enzymatic studies. *Toxicol Pathol*, 1991;**19**(1):24-29.

MIDDLETON J, JONES M, WILSON A. The role of the periodontal ligament in bone remodeling: the initial development of time-dependent finite element model. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 1996;**109**:155-162.

MILLER SC, HUNZIKER J, MECHAM M, WRONSKI TJ. Intermittent parathyroid hormone administration stimulates bone formation in the mandibles of aged ovariectomized rats. *J Dent Res*, 1997;**76**(8):1471-1476.

MOODY DE, REDDY JK. Morphometric analysis of the ultrastructural changes in rat liver induced by the peroxisome proliferator SaH 42-348. *J Cell Biol*, 1976;**71**(3):768-780.

MOHAN S, KUTILEK S, ZHANG C, *et al.*, Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice, *Bone*, 2000;**27**(4):471-478.

MOXHAM, B.J. AND BERKOVITZ, B.K.B., The periodontal ligament and physiological tooth movements. In: Berkovitz, B.K.B., Moxham, B.J. and Newman, H.N., Editors, The Periodontal Ligament in Health and Disease, Mosby, London, 183–214. 1995.

MOXHAM, B.J. e BERKOVITZ, B.K.B., A quantitative assessment of the effects of axially directed extrusive loads on displacement of the impeded and unimpeded rabbit mandibular incisor. *Arch Oral Biol*. 1981;**26**(3):209-15.

MORLEY, P.; WHITFIELD, J.F.; WILLICK, G.E. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. *Curr Pharm Des*, 2001;**7**(8):671-687.

MORLEY, P.; WHITFIELD, J.F.; WILLICK, G.E. Anabolic Effects of Parathyroid Hormone on Bone, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1997;**8**(6):225-231.

MORIYAMA I, IWAMOTO J, TAKEDA T, TOYAMA Y. Comparative effects of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on cancellous and cortical bone loss in tail-suspended and sciatic neurectomized young rats. *J Orthop Sci*, 2002;**7**(3):379-385.

NAKAJIMA M, EJIRI S, TANAKA M, TOYOOKA E, KOHNO S, OZAWA H. Effect of intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) on the mandibular condyle of ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*, 2000;**18**(1):9-17.

NEER RM, ARNAUD CD, ZANCHETTA JR, *et al*. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 2001;**10**(19):1434-441.

NOVIKOFF, A. B., SHIN W. The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells. *J Microsc*, 1964;**3**:187-206.

OXLUND H, DALSTRA M, EJERSTED C, ANDREASSEN TT. Parathyroid hormone induces formation of new cancellous bone with substantial mechanical strength at a site where it had disappeared in old rats. *Eur J Endocrinol*, 2002;**146**(3):431-438.

PILICHOS C, PREZA A, KOUNAVIS I, ZAFEIRATOU S, KAPATSORIS D. Fine structural alterations induced by cortisol administration in non-adrenalectomized/non-fasted rat hepatocytes. *Int Immunopharmacol*. 2005 Jan;**5**(1):93-6.

PODBESK, R. Effects of two treatment regimes with synthetic human parathyroid hormone fragment on bone formation and the tissue balance of trabecular bone in greyhounds. *Endocrinology*, 1983;**112**(3):1000-1006.

PUENTE MI, GALBAN L, COBO JM. Initial stress differences between tipping and torque movements: a three-dimensional finite element analysis. *Eur J Orthod*, 1996;**18**:329-339,.

REDDY JK, KRISHNAKANTHA TP. Hepatic peroxisome proliferation: induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. *Science*, 1975;**21**,190(4216):787-789.

REDDY JK, AZARNOFF DL, SVOBODA DJ, PRASAD JD. Nafenopin-induced hepatic microbody (peroxisome) proliferation and catalase synthesis in rats and mice. Absence of sex difference in response. *J Cell Biol*, 1974;**61**(2):344-358.

REEVE J. Recombinant human parathyroid hormone. *BMJ*, 2002; **23**,324(7335):435-436.

RUBIN, M.R.; BILEZIKIAN, J.P. The potential of parathyroid hormone as a therapy for osteoporosis. *Int J Fertil Womens Med*, 2002;**47**(3):103-115.

SEEBACH C, SKRIPITZ R, ANDREASSEN TT, ASPENBERG P. Intermittent parathyroid hormone (1-34) enhances mechanical strength and density of new bone after distraction osteogenesis in rats. *J Orthop Res*, 2004;**22**(3):472-478.

SILVA, MAD Influência da administração intermitente de hormônio paratireóideo na taxa de erupção de incisivos e na evolução da doença periodontal induzida em molares de ratos, 2003, 63p, Dissertação de Mestrado em Biologia Buco Dental Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, ,2003.

SILVA MA, MERZEL J. Alveolar bone Sharpey fibers of the rat incisor in normal and altered functional conditions examined by scanning electron microscopy. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;**279**(2):792-7.

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

SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J. Parathyroid hormone and vitamin D receptors. *Clin Endocrinol Metab*, 1983;**12**(1):221-241.

STAUBLI W, HESS R, WEIBEL ER. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes. *J Cell Biol*, 1969;**42**(1):92-112.

STEIGMAN S, MICHAELI Y, YITZHAKI M, WEINREB M. A three-dimensional evaluation of the effects of functional occlusal forces on the morphology of dental and periodontal tissues of the rat incisor. *J Dent Res*, 1989;**68**(8):1269-1274.

STREWLER, G.J. Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest*, 1987;**80**:1803-1807.

SWARTHOUT JT, D'ALONZO RC, SELVAMURUGAN N, PARTRIDGE NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 2002;**9**(1)2:1-17.

SWARTHOUT JT, DOGETT TA, LEMKER JL, PARTRIDGE NC. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem*, 2001;**9**,276(10):7586-7592.

TAKITA K, OHSAKI Y, NAKATA M, KURISU K. Immunofluorescence localization of type I and type III collagen and fibronectin in mouse dental tissues in late development and during molar eruption. *Arch Oral Biol*, 1987;**32**:273–279.

TAM CS, HEERSCHJE JN, MURRAY TM, PARSONS JA. Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: differential effects of intermittent and continuous administration. *Endocrinology*, 1982;**110**(2):506-512.

TAMATSU Y, KAIMOTO K, ARAI M, IDE Y. Properties of the elastic modulus from buccal compact bone of human mandible. *Bull Tokyo Med Dent Univ*, 1996;**37**:93-101.

TANNE K, SAKUDA M, BURSTONE CJ. Three-dimensional finite element analysis for stress in the periodontal tissue by orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofac Orthop*, 1987;**92**:499-505.

TASHJIAN AH JR, CHABNER BA. Commentary on clinical safety of recombinant human parathyroid hormone 1-34 in the treatment of osteoporosis in men and postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 2002;**17**(7):1151-1161.

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

TURNER, C.H. Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality. *Osteoporos Int*, 2002;**13**(2):97-104.

VAHLE JL, SATO M, LONG GG, *et al.*, Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*. 2002;**30**(3):312-321.

WELT K, WEISS J, MARTIN R, *et al.*, Ultrastructural, immunohistochemical and biochemical investigations of the rat liver exposed to experimental diabetes und acute hypoxia with and without application of Ginkgo extract. *Exp Toxicol Pathol*, 2004;**55**(5):331-345.

WEIBEL ER, KISTLER GS, SCHERLE WF. Practical stereological methods for morphometric cytology. *J Cell Biol*, 1966;**30**(1):23-38.

WISE GE, FRAZIER-BOWERS S, D'SOUZA RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2002;**13**(4):323-334.

WHITFIELD, J.F.; MORLEY, P.; WILICK, G.E. Parathyroid Hormone, Its Fragments and Their Analogs for the Treatment of Osteoporosis, *Treatments in Endocrinology*, 2002;**1**(3):175-190.

YAMASAKI K, MIURA F, SUDA T. Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J Dent Res*, 1980;**59**:1635-1642.

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