



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS
Cirurgião Dentista
Especialista em Saúde Coletiva
Mestre em Histologia e Embriologia

Efeito da administração intermitente do fragmento 1-34 do
hormônio paratireóideo em defeito fenestrado na mandíbula
de ratos. Análise histomorfométrica.

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

Orientador: Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Rocha Marques

Piracicaba
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

V441e	Vasconcelos, Daniel Fernando Pereira. Efeito da administração intermitente do fragmento 1-34 do hormônio paratireóideo em defeito fenestrado na mandíbula de ratos. Análise histomorfométrica. / Daniel Fernando Pereira Vasconcelos. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Pedro Duarte Novaes. Co-orientador: Marcelo Rocha Marques. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Ossos. 2. Ligamento periodontal. 3. Osteoblastos. I. Novaes, Pedro Duarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em Inglês: Effect of intermittent PTH (1-34) administration in the fenestration defects of rats. Histologic study

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Bone. 2. Periodontal ligament. 3. Osteoblasts
Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Pedro Duarte Novaes, Rui Barbosa de Brito Júnior, Marco Antônio Dias da Silva, Poliana Mendes Duarte, Cristiane Ribeiro Salmon

Data da Defesa: 12-12-2008

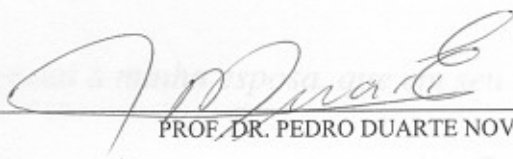
Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



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 12 de Dezembro de 2008, considerou o candidato DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS aprovado.


PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES


PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR



PROF. DR. MARCO ANTONIO DIAS DA SILVA


PROFª. DRª. POLIANA MENDES DUARTE



PROFª. DRª. CRISTIANE RIBEIRO SALMON



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 12 de Dezembro de 2008, considerou o candidato DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS aprovado.

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

PROF. DR. MARCO ANTONIO DIAS DA SILVA

PROFa. DRa. POLIANA MENDES DUARTE

PROFa. DRa. CRISTIANE RIBEIRO SALMON

Dedico este trabalho

a todos meus familiares,

em especial à minha esposa, que em seu ventre trás uma semente de nosso

amor...

...e...

a esses pais maravilhosos que

Deus me deu!!!

Agradecimento especial

A DEUS ...

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes, que acreditou em mim, assumindo minha orientação, por estar sempre aberto à discussão e disponível para ajuda a todo tempo;

Ao Dr. Marcelo Rocha Marques, grande amigo e também co-orientador, que sem suas idéias e toda sua ajuda nada teria se realizado...

À minha esposa, Any Carolina Cardoso Guimarães Vasconcelos, por todo amor, incentivo, apoio e compreensão durante toda essa etapa;

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP), na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, pela utilização de suas instalações.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao Prof. Dr. Fausto Bérzin, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP/UNICAMP, por sua amizade e pela seriedade na condução do Curso.

Aos professores da área de Histologia da FOP/UNICAMP, Profa. Dra. Darcy de Oliveira Tosello e Prof. Sérgio Roberto Peres Line, pelos ensinamentos e agradável convívio.

À Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, Raquel Q. M. César Sacchi e Tatiane Cristina Gava, secretárias da Coordenadoria de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pelas orientações em todas as questões de burocracia durante o curso e pelo apoio.

Aos meus grandes amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, Marisi Aidar, Juliana Santos Neves, Alexandre Espírio Santo, Nádia Omar, José Rosa, Maria Cristina Godoy, Cristiane Pereira Borges Saito, Liza Lima, Marcos Frozoni, Aline Cristiane Planello, Carolina Vieira de Almeida, Gilcy Raimundo Damm, Luciana Souto Mofato, Mariana Martins Ribeiro, Denise Carleto Andia, Glauce Regina Costa de Almeida, Naila Francis Paulo de Oliveira pelo companheirismo e pela amizade.

À Eliene Aparecida Orsini Narvaes, Maria Aparecida Varela, Ivani Odas Demétrio e Gustavo Narvaes Guimarães, funcionários do Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP, pelo auxílio técnico no laboratório de Histologia e divertido convívio.

À Suzete Regina Tobias Neder e Joelma Aparecida Machi, pela atenção junto à secretaria do Departamento de Morfologia da FOP-UNICAMP.

À minha ex-orientadora, Prof. Dra. Silvana P. Barros, que acreditou em meu trabalho desde a minha iniciação científica, pela amizade, orientação e liberdade na condução dos trabalhos;

Ao Dr. Bruno Braga Benatti por toda colaboração na cirurgia e a permissão da utilização de suas figuras;

À Profa. Dra. Gláucia M. Ambrosano por auxiliar-me durante as estatísticas.

Ao Marcos Frozoni pelo auxílio com a microscopia de luz polarizada e o convívio amigável no laboratório;

Ao amigo, Gustavo Narvaes Guimarães, pelo auxílio durante a fase de processamento do material, por sua amizade e pelo companheirismo;

À Dra. Adriana Piva pela prontidão em ajudar;

Ao Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior, pela colaboração durante a condução dos trabalhos;

Aos membros da banca examinadora: Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior, Dr. Marco Antônio Dias da Silva, Dra. Poliana Mendes Duarte, Dra. Cristiane Ribeiro Salmon, Dra. Ana Paula de Souza Pardo, Dra. Miralva Aparecida de Jesus Silva, Dra. Silvana Pasetto por aceitarem participar da banca;

À equipe da Biblioteca, Marilene Girello, Aparecida Ramos Cassieri e Eliseu Berti.

Aos bioteristas Wanderley e Fábio, pelo indispensável cuidado e responsabilidade com os meus ratos e pela convivência sempre agradável no biotério.

Ao meu pai, Osvaldo Almeida Vasconcelos Filho, o qual sempre me apoiou e deu forças desde o início dessa caminhada;

À minha mãe, Ana Lúcia Pereira Vasconcelos, por todo carinho, grande incentivo e sempre conselheira;

À minha irmã, Andréia Ap. Pereira Vasconcelos, por todo apoio;

Aos meus cunhados, Alexandre Bautista Ramos e Marcos Paulo Cardoso Guimarães e minha concunhada Daniela Cavani Falcin por todo convívio que sempre me proporcionou momentos felizes;

Aos meus queridos sogro e sogra, Antônio Martins Guimarães e Zelita Cardoso Guimarães, por todos momentos de bem estar e felicidades juntos;

Aos meus avôs, Antônio Pereira Júnior, Yolanda Mendes Pereira e Pedrina Barros Vasconcelos por sempre estarem preocupados com meu bem estar e por todo carinho a mim atribuído;

*“Tudo quanto te vier à mão para fazer, faze - o conforme as tuas forças,
porque no além, para aonde tu vais, não há obra, nem projetos, nem
conhecimento, nem sabedoria alguma”.*

(Eclesiastes – 9, 10);

RESUMO

A administração intermitente de hormônio paratireóideo (PTH) é capaz de promover anabolismo ósseo, favorecendo a neoformação óssea em condições como osteoporose e reparo de fraturas. Sabendo-se que tanto os tecidos ósseos mandibulares e alveolares como os tecidos periodontais podem responder à administração de PTH de forma intermitente, o objetivo deste estudo foi avaliar histomorfometricamente o efeito da administração de PTH (1-34) em um modelo de defeito periodontal, do tipo fenestrado, na mandíbula de ratos. Foram utilizados neste estudo 32 ratos Wistar machos, com o objetivo de expor a região vestibular da raiz distal do primeiro molar inferior direito. A criação do defeito possibilitou a remoção parcial de ligamento periodontal e do cimento dentário. Após a cirurgia os animais foram separados aleatoriamente em 4 grupos (n=8): Grupo C14: administração intermitente (3 vezes por semana) do veículo de diluição do PTH por 14 dias; Grupo P14: administração intermitente de PTH (1-34) por 14 dias; Grupo C21: injeções intermitentes do veículo de diluição do PTH por 21 dias; Grupo P21: injeções intermitentes de PTH por 21 dias. Os animais foram mortos e preparados para avaliação histomorfométrica dos seguintes parâmetros: I - extensão inicial do defeito, II - extensão do defeito remanescente, III - área do defeito ósseo remanescente, IV - densidade do osso neoformado, V - área do calo formado e marcação para TRAP, VI - área do cimento neoformado, VII - análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal reinserido sobre a raiz operada. A análise intergrupo demonstrou que os defeitos tinham tamanhos similares inicialmente e que a administração de PTH reduziu significativamente ($p<0,05$) a extensão e a área do defeito remanescente. Além disso, o PTH aumentou significativamente ($p<0,05$) a densidade do osso neoformado, a área do calo, o número de osteoclastos presentes no calo formado, a área de cimento neoformado e a birrefringência do ligamento periodontal reinserido.

Conclui-se que a administração intermitente de PTH (1-34), em modelo experimental de reparo em de ratos, pode influenciar positivamente o processo de reparação óssea e periodontal.

Palavras chaves: osso, PTH, cimento, ligamento periodontal, cementoblasto e osteoblasto.

ABSTRACT

The intermittent PTH administration is known to contribute to bone formation in cases of osteoporosis and bone fractures. Also, it has been reported to reduce periodontitis-related bone loss. The aim of this study was to evaluate the effect of anabolic PTH on periodontal repair and mandibular bone defect in rats. Fenestration defects were created unilaterally at the buccal surface of distal roots of lower first molars in Wistar rats (n=32), and both periodontal ligament and cementum were removed. Animals were then assigned to 4 groups (n=8): 1) C14 - placebo administration for 14 days; 2) P14 - PTH administration for 14 days; 3) C21 - placebo administration for 21 days; and 4) P21 - PTH administration for 21 days. All groups were treated intermittently (3 times a week). All animals were killed and prepared to histomorphometric analysis considering the following parameters: I - extension of the initial defect; II - extension of the remaining defect; III - area of the remaining defect; IV - density of neoformed bone; V - total callus area and staining for tartrate-resistant acidic phosphatase (TRAP); VI - area of the neoformed cementum; VII - polarized light microscopic analysis of root periodontal ligament reattachment. Intergroup analysis showed that the bone defects were initially similar in size ($p>0.05$). The intermittent PTH administration decreased ($p<0.05$) both extension and area of the remaining defect, and increased ($p<0.05$) the neoformed bone density and the total callus area. An increase in TRAP-positive cells was observed in the PTH treated groups ($p<0.05$). The area of the neoformed cementum and reattachment of the periodontal ligament were also observed to increase concerning PTH-treated groups ($p<0.05$). Data analysis suggests that the intermittent PTH administration might contribute to bone and periodontal repair in rats.

Key Words: bone, PTH, cement, periodontal ligament, cementoblast and osteoblast.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMP = proteína morfogenética óssea
BSP = Sialoproteína óssea
cAMP = adenosina cíclica monofosfatada
COL = colágeno
DNA = ácido desoxirribonucleico
EDTA = ácido etileno diamina tetra acético
FDA = Food and Drugs administration
TGF- β = fator transformador de crescimento beta
TNF = fator de necrose tumoral
HE = Hematoxilina e Eosina
IL = interleucina
IM = intramuscular
LP = ligamento periodontal
MCSF = fator estimulador de colônia de macrófago
mRNA = RNA mensageiro (RNA=ácido ribonucleico)
nm = nanômetros
OPG = osteoprotegerina
OPN = osteopontina
PGE₂ = prostaglandina E₂
PTH = hormônio paratireóideo, paratormônio;
PTHrP = peptídeo relacionado ao PTH
PTHR1 = receptor do PTH e PTHrP tipo 1
RANK = receptor ativador nuclear kappa beta
RANKL = ligante do receptor ativador nuclear kappa beta
RE = retículo endoplasmático
RO = retardo óptico
RTG = regeneração tecidual guiada
TC = Tricômio de Mallory
TRAP = Fosfatase ácida tartarato resistente
 μm = micrômetro
 μg = micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Hormônio paratireóideo, paratormônio ou PTH	3
2.2 Osso	08
2.3 Cimento	11
2.4 Ligamento Periodontal	16
2.5 Regeneração Periodontal	20
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Característica da amostra	26
4.2 Procedimento cirúrgico	26
4.3 Delineamento experimental	28
4.4 Processamento do material	29
4.5 Análises histomorfométricas	30
4.51 Extensão do defeito inicial	31
4.52 Extensão do defeito remanescente	31
4.53 Área do defeito ósseo remanescente	31
4.54 Densidade do osso neoformado	31
4.55 Área do calo e marcação com TRAP	33
4.56 Área de cimento neoformado	33
4.57 Análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal reinserido	34
4.6 Análise Estatística	35
5. RESULTADOS	36
5.1 Extensão inicial do defeito	36
5.2 Extensão do defeito remanescente	38
5.3 Área do defeito ósseo remanescente	40
5.4 Densidade do osso neoformado	41
5.5 Área do calo formado e marcação para TRAP	43
5.6 Área de cimento neoformado	42
5.7 Análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÕES	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9. ANEXO	76
9.1 Certificado de aprovação do comitê de ética de pesquisa em animais	77

1. INTRODUÇÃO

A reparação é um assunto de grande importância, e vem sendo amplamente estudado em diversos tecidos (Cortellini & Bowers, 1995; Heijl, 1997; Mellonig, 1997). Avanços no entendimento da reparação tecidual ocorrem devido a estudos experimentais em animais. A utilização destes é recomendada para melhoria do entendimento do processo biológico, desenvolvimento de técnica cirúrgica e teste de materiais para enxertos, como também uso de drogas e hormônios que possam influenciar a biologia de tais tecidos (Lane & Sandhu, 1987, Aaboe *et al.*, 1995, Barros *et al.*, 2003; Benatti, 2005; Marques *et al.*, 2005).

O organismo é capaz de substituir células lesadas ou mortas, promovendo reparo dos tecidos após a inflamação por meio de dois mecanismos distintos: regeneração e cicatrização. Ambos os eventos estão relacionados com migração, proliferação e diferenciação celulares. Estes processos são controlados, em grande parte, por mediadores químicos, hormônios, que inibem ou estimulam a proliferação celular através do recrutamento de células em repouso para o ciclo celular (Benatti, 2005; Bosshardt, 2008).

No processo de reparo, componentes da matriz extracelular, proteínas, glicoproteínas e proteoglicanas exercem um papel fundamental (Vernon & Sage, 1995). Tais estruturas podem modular o processo de reparo por possuírem capacidade de se ligar a receptores de superfície celular que interagem nesse processo complexo. Não diferentemente do que ocorre no restante do nosso organismo, os tecidos periodontais, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal, podem ser reparados parcialmente (Benatti, 2005; Bosshardt, 2008; Sculean *et al.*, 2008).

O tecido neoformado dependerá, em grande parte, do tipo celular que povoará a lesão (Melcher, 1976). Por exemplo, células do ligamento periodontal são as responsáveis pela síntese das fibras (McCulloch & Melcher, 1983; Pitaru *et al.*, 1994).

Tem sido demonstrado que alguns fatores podem interferir na qualidade e velocidade do reparo tecidual como: infecções, localização da ferida (King *et al.* 1997, Kornman & Robertson, 2000), consumo de cigarros, hormônios como o hormônio paratireóideo (PTH) (Shapiro, 2008).

O PTH regula o metabolismo ósseo, podendo aumentar ou diminuir a massa óssea. 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 e 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; Dempster *et al.*, 2001; Burr *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003; Seebach *et al.*, 2004; Andreassen *et al.*, 2004). Por esta capacidade de promover anabolismo ósseo, é a única droga anabólica liberada pelo FDA para auxílio no tratamento da osteoporose (Dempster *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003).

A ação do PTH intermitente sobre estruturas na cavidade oral vem sendo estudada nos últimos anos. Doses intermitentes de PTH promovem anabolismo ósseo mandibular (Silva, 2002) tanto inibem a perda óssea alveolar decorrente da periodontite induzida ratos (Barros *et al.*, 2003) quanto em ratas ovariectomizadas (Marques *et al.*, 2005).

Foi reportado que células do ligamento periodontal (LP) podem responder ao estímulo do PTH (Nohutcu *et al.*, 1995; Ouyang *et al.*, 2000). A administração intermitente de PTH aumenta a diferenciação de células do ligamento periodontal (Lossdorfer *et al.*, 2005), atua na diferenciação e sobrevivência das células do ligamento periodontal (Lossdorfer *et al.*, 2006) e ainda se sabe que cementoblastos possuem receptores para o PTH (Tenorio & Hughes, 1996). Portanto, é de interesse científico o entendimento do papel biológico dos efeitos do PTH sobre o tecido ósseo e os tecidos periodontais, já que, potencialmente, este hormônio pode interagir diretamente com células do periodonto, quando administrado de maneira intermitente.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hormônio Paratireóideo

Pesquisas sobre PTH tiveram seu início no século XX. Debates sobre o funcionamento das glândulas paratireóides começaram a chegar em consenso em 1925, quando se compreendeu a função do PTH em relação à fisiologia do cálcio. As glândulas foram descobertas no século XIX, durante esse período a ciência funcionava de forma empírica, então alguns desses dados são pouco controversos. Opiniões controversas sobre a remoção de paratireóides de gatos e cães, como também roedores, estavam associadas à morte por tetania (Gley, 1891). Dessa forma começaram a perceber as funções da tireóide e paratireóide, que entre elas existia apenas uma relação anatômica e não funcional.

Uma década após, o patologista Jacob Erdheim corroborando com os achados de Gley, pesquisando de maneira meticulosa o exame dos tecidos do pescoço de animais que haviam tido suas paratireóides removidas desenvolviam tetania (Erdheim, 1904). Ele mostrou em pacientes que haviam morrido após a remoção da glândula tireóide, não tinham nenhum remanescente da glândula paratireóide (Erdheim, 1906). A verdadeira causa das mortes só foi esclarecida em 1921 (Boothby *et al.*, 1921) que era a hipocalcemia, mas foi comprovado por meio da infusão de cálcio e que tal tratamento prevenia a tetania em animais sem a glândula (MacCallum & Voegtlin 1908, MacCallum 1911, MacCallum & Vogel 1913).

Finalmente, uma série de experimentos resolveu a controversa questão e foi estabelecida a principal função da glândula paratireóide que era a regulação dos níveis de cálcio. Collip (1925) preparou um extrato da glândula paratireóide, então administrou o preparado sendo que os animais passaram pela remoção da glândula paratireóide, esse experimento mostrou que alguma secreção presente na glândula evitava a tetania, assim provou que a glândula paratireóide produzia o hormônio batizado de PTH. Hanson (1924) tentou por anos purificar e saber quais eram realmente as porções ativas, mas apenas 35 anos mais tarde depois de inúmeras tentativas foi caracterizado o princípio ativo da glândula (Aurbach, 1959). Assim o progresso foi lento, pois como se sabe hoje o hormônio é processado, clivado, mas na época parecia impossível purificá-lo e subdividi-lo em suas

frações. Os primeiros achados foram de Handler *et al.* em 1954, mas a caracterização foi confirmada por Aurbach em 1959, seguindo os estudos iniciais de Collip.

No início da década de 1970, com novas técnicas, tornou possível a descoberta da sequência de nucleotídeos do gene que era responsável pela síntese do PTH. Dessa forma foi possível deduzir a sequência de aminoácidos do hormônio e o peptídeo pode ser sintetizado. Dois grupos independentes determinaram a estrutura do PTH humano e do bovino, após obtenção do material removido de tumores das glândulas de humanos (Brewer & Ronan 1970, Niall *et al.* 1970, Niall *et al.* 1974, Brewer *et al.* 1972, Sauer *et al.* 1974, Keutmann *et al.* 1978). Baseando-se na dedução da sequência dos aminoácidos e no conhecimento que a extração produzia fragmentos, ficou deduzido que os primeiros 34 aminoácidos do hormônio que eram suficientes para ter atividade biológica. O fragmento do PTH (1-34) foi então sintetizado primeiro o de bovino e depois o de humano (Potts *et al.* 1971, Tregear *et al.* 1973, 1974).

Este fragmento é análogo ao peptídeo natural da preparação de Collip e tanto o peptídeo natural purificado como o sintético (1-34) mostrou ter ação similar *in vitro* e *in vivo*.

Além disso, foi relatado que as moléculas de PTH dos mamíferos consistem de uma cadeia polipeptídica com 84 aminoácidos e peso molecular aproximado de 9400 daltons. No entanto, o PTH de galinha mostra diferenças significativas, como duas deleções na porção hidrofóbica da sequência e uma inserção de 22 aminoácidos, próximo à porção carboxilterminal, a qual substitui uma sequência de 9 aminoácidos (Kanaori *et al.*, 1997). A região aminoterminal do PTH é a sequência mínima e suficiente para a regulação da homeostase mineral, pois tal porção mostra a preservação da sequência em todas as espécies de vertebrados, como também semelhante a PTHrP (peptídeo relacionado ao PTH). O grau de preservação da molécula do PTH é menor na região carboxilterminal do que na região aminoterminal que a sequência é altamente conservada.

Um grande avanço no entendimento da fisiologia do PTH deu-se quando o receptor do PTH foi descoberto em 1991 (Jüppner *et al.* 1991, Abou-Samra *et al.* 1992). Por causa das diversas ações que o PTH exercia sobre diversos tecidos, descobriu-se que o PTH agia por meio de um mensageiro secundário. Tal sinalização ocorre pela ligação do PTH ou PTHrP com seu receptor, o PTHR1.

O PTHR1 é o receptor que ativa as diversas funções do PTH e da PTHrP sobre o tecido ósseo, renal e intestinal. O PTHR1 pertence à família de receptores da proteína G.

A estimulação da expressão celular mediada pelo PTHR1 com sua interação com o PTH ou com a PTHrP pode ativar dois outros mensageiros secundários: a adenil ciclase (cAMP)/proteína quinase A e a fosfolipase C/proteína quinase C (Potts & Jüppner, 1997), mas a forma com que tais processos bioquímicos ocorrem ainda não são claros (Gardella & Juppner, 2001)

Da mesma forma que o PTH atua sobre o PTHR1, a PTHrP também tem a capacidade de se ligar com o receptor (PTHrP), devido a sua grande similaridade com a estrutura do PTH (Kronenberg *et al.* 1979, Hendy *et al.* 1981). Existem evidências claras de se originarem (PTH/PTHrP) dos mesmos ancestrais, visto a similaridade em suas regiões terminais, homóloga ao PTH em sua região aminoterminal, onde 8 dos 13 primeiros aminoácidos são idênticos (Suva *et al.*, 1987).

Apesar dessa similaridade aminoterminal com a PTHrP, o PTH é um polipeptídeo que é primeiramente encontrado como um pré-hormônio (pré-pró-PTH), constituído de 115 aminoácidos (aa) com peso molecular de 9400 daltons. Após duas clivagens, encontra-se com 90 aa, e é transportado para o complexo de Golgi, onde é mais uma vez clivado, adquirindo sua forma final de 84 aa (Strewler *et al.*, 1987; Spiegel & Marx 1983; Genuth, 1998; Martin & Gonzalez, 2001; Swarthout *et al.*, 2002; Silva, 2005).

Essa sequência de aminoácidos do PTH produz, como efeito fisiológico, um aumento da concentração de cálcio iônico no soro, significa que a entrada de cálcio no sangue está aumentada em relação à saída. Tal controle se dá principalmente no intestino, rim e tecidos mineralizados (Habener *et al.*, 1984; Swarthout *et al.*, 2002).

No intestino o PTH não modifica substancialmente a transferência de cálcio na célula da mucosa, como faz a vitamina D, mas indiretamente, interferindo no controle de formação de 1,25-dihidroxicolecalciferol no rim (Habener *et al.*, 1984; Swarthout *et al.*, 2002). Enquanto no rim, o PTH acelera a reabsorção de Ca^{+2} no rim, mecanismo mais rápido no aumento da calcemia (Habener *et al.*, 1984; Swarthout *et al.*, 2002).

Estudos demonstram que o fragmento do PTH compreende os primeiros 34 aminoácidos do hormônio são os que produzem seus principais efeitos biológicos (Neer *et al.*, 2001), apresentando-se 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).

Por outro lado, a porção carboxiloterminar da molécula do PTH não tem a mesma capacidade de induzir a proliferação celular como o fragmento 1-34 (Aarts *et al.*, 1999). Assim a interação PTH/PTHrP ativa um gene, o da proteína Bcl-2 (Amling *et al.*, 1997), tal proteína pode prevenir a apoptose celular dos precursores dos osteoblastos (Bellido *et al.*, 2003). Esses precursores sobre o efeito do PTH intermitente produzem PTHrP, o mesmo pode estimular a proliferação de precursores de osteoblastos (fetais) (Cormish *et al.*, 1999) e inibir a ativação dos osteoclastos (Whitfield *et al.*, 1996 e 2002).

Essa ação do PTH pode ser decorrente da interação com as células da linhagem osteoblástica que afetam o processo de remodelação. O PTH modula a morfologia, proliferação, expressão protéica e gênica destas células (Canalis *et al.*, 1989). Esses efeitos do PTH no metabolismo acontecem por ele se ligar ao seu receptor, que está presente nas células osteoblásticas e seus precursores (Swarthout *et al.*, 2000; Swarthout *et al.*, 2002).

Sabe-se que o PTH pode atuar estimulando a formação de osteoclastos pela ligação com seu receptor tipo I, no osteoblasto o qual promove um aumento na produção do RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta), que tem a capacidade de se ligar ao RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa beta) induzindo a diferenciação dos osteoclastos. A OPG (osteoprotegerina) é um receptor solúvel, produzido por osteoblastos e está apta a bloquear a interação RANK/RANKL por competição com RANKL (Rodan & Martin, 1981; Liu *et al.*, 1998; Lee & Lorenzo, 1999; Suda *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2004).

O PTH administrado de forma intermitente tem sido utilizado para promover anabolismo ósseo (Morley *et al.*, 1997, Mohan *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2001; Moriyama *et al.*, 2002; Turner, 2002) podendo prevenir, suspender ou reverter parcialmente o processo de reabsorção óssea (Tam *et al.*, 1982; Pobdesk *et al.*, 1983 e Hock & Gera, 1992; Dempster *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997; Morley *et al.*, 1997; Skripitz *et al.*, 2000; Bikle *et*

al., 2002; Demiralp *et al.*, 2002; Oxlund *et al.*, 2002; Silva, 2005). Além do mais, o fragmento do PTH (1-34) quando administrado em humanos não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 2000; Neer *et al.*, 2001) ou qualquer outro efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes (com alto risco de fratura óssea), tratados com PTH (1-34) por três anos (Horwitz *et al.*, 2003, Silva, 2007).

2.2 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado mineralizado constituído de uma porção orgânica e uma porção inorgânica. A porção orgânica corresponde a 65% deste tecido, sendo representada por colágeno tipo I, osteonectina, osteocalcina, proteína óssea morfogenética, proteoglicanas ósseas e sialoproteína óssea, glicosaminoglicanas associadas à água de solvatação e células. Já a porção inorgânica é constituída principalmente por cristais de hidroxiapatita, que perfazem 50% do osso (Junqueira & Carneiro, 1999; Galliera *et al.*, 2008).

Os cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ possui dimensões aproximadas de 30 a 45nm de comprimento e 5nm de largura, depositando-se ao longo das fibrilas colágenas de forma paralela. Existem, em menor quantidades, fases não apatíticas com o carbonato de cálcio, dolomita, bruxita, fosfato de cálcio amorfo e fosfato octacálcico (Junqueira & Carneiro, 1999; LeGeros, 2002; Galliera *et al.*, 2008).

Uma característica marcante deste tecido conjuntivo especializado é o fato de estar constantemente passando por remodelação (Ten Cate, 2001; Galliera *et al.*, 2008), sem que haja formação de cicatriz (Taga *et al.*, 1997; Tong & Buchman, 2000). Dentre as suas funções, destaca-se o suporte estrutural, a proteção de estruturas nobres e a reserva de minerais (Junqueira & Carneiro, 2004). Os processos de formação, reabsorção, reparação e remodelação do tecido ósseo são conduzidos pelos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Junqueira & Carneiro, 2004).

O evento de formação óssea pode ser representado pela mineralização de proteínas da matriz extracelular produzida pelos osteoblastos. Durante a síntese da matriz e a mineralização algumas células podem ser acondicionadas no interior dessa matriz, estas células ficam no interior de lacunas e passam a ser chamadas de osteócitos. Estes se comunicam com células adjacentes e com o meio extracelular por meio de projeções citoplasmáticas localizadas em canalículos dispostos no interior da matriz mineralizada. Já os osteoclastos apresentam-se como células multinucleadas presentes na periferia das trabéculas. Estas células contêm substâncias que levam a um processo de osteólise, participando de maneira ativa nos processos de remodelação óssea e regulação dos níveis plasmáticos de cálcio (Junqueira & Carneiro, 1999; Galliera *et al.*, 2008).

Outras células importantes são os osteoblastos, células especializadas e mononucleares que derivam de células mesenquimais (Karsenty, 2003, Stains & Civitelli, 2003). Os osteoblastos têm uma importante função na produção e manutenção do tecido ósseo, sendo responsável pela regulação dos osteoclastos e deposição da matriz (Galliera *et al.*, 2008). Para que a deposição da matriz ocorra os osteoblastos devem estar ativos, com complexo de golgi e retículo endoplasmático rugoso abundante, apresentando junções comunicantes entre osteoblastos adjacentes (Mackie, 2003).

A reabsorção ou a reparação óssea resulta de uma complexa cascata de ocorrências que envolvem a proliferação de células mesenquimais indiferenciadas em células precursoras de osteoblastos, maturação dos osteoblastos (Galliera *et al.*, 2008).

Mundy *et al.*, (1982) demonstrou que a atração quimiotática inicial dos precursores dos osteoblastos é mediada por fatores locais produzidos durante o processo de remodelação. Sempre que haja algum evento que altere a homeostasia óssea, ocorre a liberação de mediadores químicos importantes que irão ativar a reparação óssea local pela ação dos osteoblastos e células mesenquimais indiferenciadas. Inúmeros fatores influenciam tais interações, como por exemplo, polimorfismos genéticos (Vasconcelos, 2005), a vascularização local, o estado dos tecidos moles adjacentes, a presença de infecção, a associação de doenças sistêmicas e hormônios calcitotróficos (Pereira, 2006).

Dentre os mediadores bioquímicos, podemos citar alguns que têm um importante papel na regulação da reabsorção óssea. O TGF- β (fator de crescimento transformador beta), uma vez ativo, é liberado pelas culturas ósseas em reabsorção (Pfeilschifter *et al.*, 1990), a interleucina-1 β (IL-1 β), o TNF- α , - β (fator de necrose tumoral alfa e beta) e a IL-6, são consideradas citocinas capazes de promover reabsorção óssea (Lorenzo, 1991; Puzas *et al.*, 1994; Marques, 2007).

A IL-8 secretada por macrófagos não promove reabsorção diretamente, mas é quimiotática para neutrófilos e induz a secreção de citocinas como IL-1 β e TNF- α (Lorenzo, 1991). A IL-3, RANKL e interferon gama, quando secretados pelos linfócitos T, também podem trabalhar como indutores de reabsorção (Baker, 2000; Marques, 2007).

Outros fatores ligados à reabsorção óssea, que podem ser observados após o estímulo de macrófagos, por exemplo, incluem a prostaglandina E₂ (PGE₂) e o óxido nítrico (Zubery *et al.*, 1998). Os efeitos destas citocinas inflamatórias dependem diretamente da

sua concentração, sendo que a concentração destas no tecido pode afetar diretamente sua função. Como exemplo pode-se citar o papel da IL-1 em induzir reabsorção óssea quando em altas concentrações, enquanto que em baixas concentrações, IL-1 induz a formação óssea (Lorenzo, 1991; Marques, 2004).

A regulação da osteoclastogênese e conseqüente reabsorção óssea são determinadas principalmente pelos seguintes fatores: RANKL, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-11, MCSF, e PGE₂ (Rodan & Martin, 2000). Algumas interleucinas como a IL-1, TNF- α e outras citocinas induzem formação de osteoclastos via osteoblasto (Bertolini *et al.*, 1986; Thomson *et al.*, 1986; Thomson *et al.*, 1987), já que quando estimulados por estas citocinas, os osteoblastos ativam sua produção de IL-6, que promove diferenciação osteoclástica culminando com reabsorção óssea (Gowen *et al.*, 1983; Marques, 2007).

2.3 Cimento

O cimento é um tecido avascular e mineralizado que recobre toda a superfície radicular. Devido à sua posição intermediária, formando a interface entre a dentina e o ligamento periodontal, o cimento é um componente do dente, mas pertence funcionalmente ao aparato de inserção, ou seja, ao periodonto. Uma das principais funções do cimento é ancorar as fibras colágenas do ligamento periodontal à superfície radicular, mas ainda apresenta uma importante função reparativa e adaptativa, exercendo um papel crucial na manutenção da relação oclusal e protegendo a integridade da superfície radicular (Bosshardt & Selvig, 1997, Gonçalves, 2006).

Anteriormente, o conhecimento sobre o desenvolvimento e a estrutura geral do periodonto estava limitado a informações morfológicas. Entretanto, na última década, houve um grande progresso no campo da biologia molecular e celular, o que veio a fornecer um melhor entendimento dos eventos que ocorrem durante o desenvolvimento e regeneração dos tecidos periodontais, incluindo o cimento dental. O cimento dental é um tecido único em vários aspectos: é avascular e não inervado, não sofre remodelação contínua como o osso, mas continua a crescer em espessura ao longo do tempo (Bosshardt & Selvig, 1997).

O cimento parece ter seu desenvolvimento controlado por vários fatores reguladores em comuns ao osso alveolar (McNeil *et al*, 1998, Saygin *et al*, 2000). Existem evidências histológicas de que o cimento é essencial para a maturação do periodonto, tanto durante o desenvolvimento quanto na regeneração periodontal (Saygin *et al*, 2000). Estudos recentes têm contribuído para o entendimento dos fatores moleculares envolvidos na regeneração do cimento dental (MacNeil & Somerman, 1993), mas a cementogênese continua sendo pouco entendida em sua base biológica e celular.

O cimento é produzido pelos cementoblastos sobre a superfície da raiz (dentina). A deposição de cimento inicia-se após a transposição da bainha epitelial de Hertwig (Paynter & Pudy, 1958), pelas células ectomesenquimais do folículo dental, tais células penetram entre porções da bainha e começam imediatamente a depositar matriz de cimento, enquanto restos epiteliais adjacentes são separados da superfície radicular pela lâmina basal, o que inibe a produção de cimento em tal região. Em contraste aos roedores,

em humanos, a deposição do cimento inicia-se após a desintegração da bainha epitelial de Hertwig (Schroeder, 1986).

As fibras colágenas, durante a cementogênese, aderem-se ao cimento, mas não diretamente sobre as fibras da dentina, há uma camada pobre em fibras. Tal união deve ocorrer pela adesão intermediada pelas proteoglicanas, que é necessária para a cementogênese tanto do cimento celular como do acelular de molares de ratos (Yamamoto *et al.*, 2001).

Além das proteoglicanas, possivelmente diferentes tipos moleculares constituem a matriz do cimento como: proteínas relacionadas ao esmalte (Hammarstrom 1997), BMPs (proteína morfogenética óssea) (Bosshardt *et al.*, 2008), proteínas não colagenosas (osteopontina e sialoproteína óssea), as quais parecem exercer um papel importante na diferenciação de células progenitoras em cementoblastos (Saygin *et al.*, 2001) além de glicoproteínas que fazem parte dessa camada de adesão dentina-cimento (Cho & Garant 1989).

A junção cimento-dentina parece desenvolver-se sobre as fibras principais (extrínsecas) do ligamento periodontal sobre o osso alveolar (Islam *et al.*, 2000). As fibras principais aderem-se a essa camada não diretamente sobre a matriz de osso pré-existente, mas sobre uma nova camada de tecido ósseo que se formará posteriormente, sugerindo a dependência de uma camada comum de adesão das fibras do ligamento periodontal sobre a nova matriz de tecido mineralizado (Yamamoto *et al.*, 2001).

Tradicionalmente, o cimento pode ser classificado em celular e acelular, dependendo da presença ou não de células (cementócitos) em sua estrutura. Outra classificação diz respeito à presença ou ausência de fibras colágenas intrínsecas ou extrínsecas (também chamadas de fibras principais) em seu interior formadas por cementoblastos ou fibroblastos, respectivamente. Em relação a estes aspectos, três tipos principais de cimento têm sido descritos em humanos (Jones, 1981; Schroeder, 1986).

O cimento acelular afibrilar cobre pequenas porções do esmalte dental, se estendendo sobre a junção cimento-esmalte. A localização deste tipo de cimento varia de dente para dente e ao longo da junção cimento-esmalte do mesmo dente (Schroeder & Scherle, 1988). Seus principais componentes estruturais são as glicosaminoglicanas (Schroeder, 1986) e sua significância funcional é desconhecida. A ausência de fibras

colágenas indica que esta variedade de cemento não tem função de inserção (Schroeder & Scherle, 1988).

O cemento celular de fibras intrínsecas contém cementócitos embebidos em uma matriz colágena rica em fibras. Estas fibras intrínsecas estão orientadas paralelamente à superfície radicular e têm um curso circular ao redor da raiz (Schroeder, 1986). Uma rápida deposição de matriz pelos cementoblastos, que ocorre no espaço entre as células derivadas da bainha epitelial de Hertwig e a superfície dentinária parece ser responsável pela incorporação de alguns cementoblastos, que se tornam os cementócitos aprisionados na matriz mineralizada (Bosshardt & Schroeder, 1991).

O cemento celular de fibras intrínsecas é encontrado na região de bifurcação, na porção apical das raízes, em lacunas de reabsorção, em irregularidades e fendas de fratura radicular, o que evidencia uma importante função adaptativa, embora não tenha função direta de inserção. Somente este tipo de cemento é capaz de reparar áreas de reabsorção da superfície radicular num tempo razoável, devido à sua capacidade de deposição muito mais rápida que qualquer outro tipo de cemento (Bosshardt & Schroeder, 1991).

O cemento acelular de fibras extrínsecas é encontrado nas porções cervical e média da raiz, cobrindo cerca de 40 a 70% da superfície radicular. Em dentes anteriores, pode cobrir também parte da porção apical, já que sua extensão em direção apical aumenta de dentes posteriores para anteriores. Sua função é de inserção, ancorando as fibras do ligamento periodontal à raiz (Gonçalves, 2006).

Sua estrutura consiste de uma densa rede de fibras colágenas curtas implantadas na matriz dentinária (glicosaminoglicanas) e orientadas perpendicularmente à superfície radicular (Schroeder, 1986). Quando estas fibras se tornam alongadas e contínuas com as fibras principais do ligamento periodontal, são denominadas de fibras de Sharpey (Schroeder, 1986). O cemento acelular de fibras extrínsecas seja um tecido em crescimento constante, linhas aposicionais de crescimento podem ser identificadas, em associação com uma mudança abrupta na direção das fibras de Sharpey (Cho & Garant, 2000). Este tipo de cemento apresenta um nível de crescimento mais rápido nas superfícies distais (4,3µm/ano) que nas mesiais (1,4µm/ano) das raízes (Dastmalchi *et al*, 1990), o que sugere seu potencial de adaptação às demandas funcionais, como a resultante oclusal anterior e inclinação mesial (Gonçalves, 2006).

Em humanos, as fibras extrínsecas transpassam e se mesclam às fibras intrínsecas do cemento celular, formando uma rede densa de fibras extrínsecas e intrínsecas; este tipo de cemento é referido como cemento celular estratificado misto (Schroeder, 1986).

Ainda não existem dados consistentes sobre o papel das fibras do ligamento periodontal e do cemento na regeneração dos tecidos periodontais. Embora a extensão da injúria e a quantidade de tecido perdido sejam fatores determinantes importantes, um tecido danificado irá cicatrizar ou regenerar dependendo de dois fatores cruciais: a disponibilidade dos tipos celulares adequados e a presença ou ausência de fatores sinalizadores necessários para o recrutamento e estimulação destas células (Gottlow *et al.*, 1986; Gonçalves *et al.*, 2001).

No caso da regeneração do cemento dental, as células do ligamento periodontal requeridas são os cementoblastos, entretanto, a origem dos cementoblastos e os fatores que regulam seu recrutamento e diferenciação ainda não estão completamente entendidos. Modelos *in vivo* para avaliar o padrão de expressão de moléculas específicas durante a cementogênese e estudos *in vitro* sobre os efeitos de componentes do cemento em diferentes tipos celulares periodontais tem sido desenvolvidos para melhor investigar como os componentes do cemento poderiam regular a regeneração deste tecido (Saygin *et al.*, 2000). Estes estudos podem gerar informações úteis para o desenvolvimento de novas técnicas e abordagens na terapia periodontal regenerativa (Gonçalves, 2006; Gonçalves *et al.*, 2008).

Muito se tem pesquisado sobre o mecanismo de regeneração e reparação tecidual. Uma das estratégias tem sido a identificação de fatores que interferem nesse processo e na modulação da resposta tecidual seja por meio da adição de células, materiais, fatores de crescimento e PTHrP (Giannobile, 1996, McCauley & Somerman, 1998; Ouyang *et al.*, 2000c, Gonçalves, 2006).

Tais fatores são proteínas sinalizadoras sintetizadas com o objetivo de modular a reparação de uma forma ordenada, estimulando e regulando o processo de reconstrução tecidual. São produzidos por uma grande variedade de células e podem estimular a quimiotaxia, proliferação e função secretora (McCauley & Somerman, 1998).

As diferentes técnicas utilizadas na tentativa de reparar os tecidos periodontais evidenciam a dificuldade em manipular populações celulares diversas, de maneira coordenada, de modo previsível.

2.4 Ligamento Periodontal

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo altamente vascularizado e celular (Freeman 1994; Katchburiam & Arana 2004).

O ligamento periodontal é constituído de células e fibras (Yamamoto & Wakita, 1992), das quais mais de 90% seria representado por colágeno, principalmente tipo I com cerca de 70% e tipo III com cerca de 20%, os demais tipos de colágeno encontrados em pequena quantidade (Berkovitz *et al.*, 1990; Berkovitz & Moxham, 1990).

Estudos mostram que a molécula de colágeno é composta por uma família de 28 tipos diferentes de colágeno, mas de uma maneira geral encontram-se dispostas em forma de fibrila, a qual apresenta uma periodicidade de 67nm, podendo atingir de 30nm até 500nm, dependendo do estágio de desenvolvimento do tecido (Fleischmajer *et al.*, 1988) em tecidos maduros as fibrilas podem ser maiores em extensão que os próprios fibroblastos (Craig *et al.*, 1989).

As fibrilas de colágeno podem organizar-se em uma estrutura tridimensional, que formam feixes de fibrilas paralelas. As fibrilas são sintetizadas no ligamento periodontal pelos fibroblastos. O colágeno é composto por: 35% em glicina, 11% em alanina, 21% em prolina e hidroxiprolina. A sequência de aminoácido do colágeno de maneira geral é uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxiprolina, onde X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos padrão (van der Rest & Garrone, 1991). Essa associação em trincas resulta numa estrutura de tripla hélice, que pode ser homotrimérica ou heterotrimérica dependendo do tipo de colágeno (Boot-Handford *et al.*, 2003).

O colágeno é produzido no retículo endoplasmático rugoso (RE), a formação e secreção da molécula de colágeno leva em torno de 35 a 60 minutos, após a molécula ser translocada para a luz do retículo, grande número de chaperonas e enzimas se associam (Hendershot & Bulleid, 2000). A porção carboxila do propeptídeo exerce uma função importante na clivagem em procolágeno e pode determinar a seletividade da cadeia (Lees *et al.*, 1997). O alongamento da tripla hélice requer modificações na cadeia polipeptídica, como a conversão de resíduos de prolina na sua forma trans (Davis *et al.*, 1989) e a conversão de resíduos de prolina em hidroxiprolina (Myllyharju, 2003). A hidroxilação

estabiliza a estrutura de tripla hélice do colágeno. A hidroxiprolina tem uma função de coordenar as reações de formação das pontes de hidrogênio entre as cadeias (Bella *et al.*, 1995).

Posteriormente, a molécula de procolágeno é transportada como grânulos de secreção a porção cis do complexo de golgi com o auxílio dos microtúbulos (Presley *et al.*, 1997; Scales *et al.*, 1997). No complexo de golgi, diversas enzimas (assunto ainda bastante controverso), podem acrescentar moléculas que sinalizam o destino do procolágeno. Essas vesículas organizadas como pilhas de procolágeno seguem uma rota intracelular a direção trans do complexo de golgi até a membrana plasmática (Orci *et al.*, 1987), transporte esse que ocorre na dependência dos microtúbulos.

Tais vesículas de transporte e secreção podem adquirir diferentes tamanhos e formas (Hirschberg *et al.*, 1998), expõem o colágeno por meio da fusão das membranas das vesículas com a membrana plasmática. O procolágeno sob ação do meio extracelular sofre a clivagem e perde as suas duas porções carboxila e aminoterminal, originando a molécula do tropocolágeno (Holmes *et al.*, 1992; Holmes *et al.*, 1998).

Dessa forma, o tropocolágeno no meio extracelular pode sofrer tanto o crescimento em diâmetro como em extensão. Como o alongamento em extensão da fibrila pode ocorrer em dois sentidos (de amino para carboxila como de carboxila para aminoterminal) propõem-se que essas porções da molécula de colágeno, como se repetem subsequentemente durante a formação da fibrila (Birk *et al.*, 1989, 1997), cria uma estrutura bastante organizada, permitindo a sua análise sob microscopia de luz polarizada (Vilarta & Vidahl, 1989).

O crescimento das fibrilas em espessura é dependente de outras proteoglicanas como as decorinas ou fibromodulinas. Em camundongos que não produzem tais proteoglicanas as fibrilas de colágeno tinham seu crescimento diâmetro comprometido (Keene *et al.*, 2000; Ameye & Young, 2002). O diâmetro das fibrilas colágenas em ratos variaram em torno de 45nm em três regiões diferentes, no primeiro molar, porção vestibular e lingual do incisivo de erupção contínua, apesar de que relatos que a fibrila colágena tenha diâmetros com múltiplos de 8, tal relação não pode ser descrita para as fibrilas do ligamento periodontal (Berkovitz *et al.*, 1981, Ramalho, 1994).

Além das proteoglicanas, outro fator modulador de tal crescimento pode ser o estresse sofrido pelo tecido em sua função normal (oclusão), na medida em que se alcança à maturidade esquelética (Frank *et al.*, 1989). Tal estresse pode ser da ordem de até dez mil vezes o seu próprio peso e as fibras são ditas possuir resistência à tensão maior que a de um fio de aço de igual área de secção (Lehninger *et al.*, 1995).

Não estão presentes apenas fibras colágenas, também encontramos, dependendo da espécie (Bosshardt & Schroeder, 1996), fibras oxitalânicas ou fibras elásticas no ligamento periodontal (Bowling & Rygh, 1988).

Outro componente importante no ligamento periodontal é a presença de substância fundamental composta principalmente de glicosaminoglicanas. As glicosaminoglicanas formam uma substância gelatinosa, altamente hidratada, na qual as proteínas fibrosas estão embutidas; o gel de polissacarídeo resiste à força compressora exercida sobre a matriz, e as fibras de colágeno fornecem a força tensora. A fase aquosa do gel de polissacarídeo permite a rápida difusão de nutrientes, metabólitos e hormônios entre o sangue e as células do tecido (Alberts *et al.*, 1997). Como o material extracelular é um gel viscoso, representa uma barreira a penetração de bactérias e partículas inertes (Lepert *et al.*, 1995). Os nutrientes e o oxigênio trazidos pelo sangue precisam atravessar a parede dos vasos e o tecido conjuntivo para chegar as células que vão nutrir (Lukes *et al.*, 1999).

As glicosaminoglicanas são polímeros lineares de alto peso molecular, formado por unidades dissacarídicas constituídas por um ácido urônico e uma hexoamina (glicosamina ou galactosamina). As principais glicosaminoglicanas são o ácido hialurônico, o dermatansulfato, o queratansulfato, o condroitinsulfato e o heparansulfato. São pouco flexíveis para dobrar em estruturas globulares compactas, características de cadeias polipeptídicas. São bastante hidrofílicas, tendendo a adotar uma conformação que ocupa um grande volume comparado as suas massas, e formam géis mesmo em baixas concentrações (Minor, 1988).

Ainda presente no ligamento periodontal, as proteoglicanas e glicoproteínas permitem que o mesmo exerça a função de absorção de choques e pequenos impactos mastigatórios (Yamamoto *et al.*, 1991 e 1992; Lekic & McCulloch, 1996).

Em relação à porção celular do ligamento periodontal, são encontradas células, representadas principalmente por fibroblastos (Lekic & McCulloch, 1996). Os fibroblastos sintetizam as fibras colágenas e elásticas, as glicoproteínas e as proteoglicanas da matriz extracelular, sendo a célula mais ativa denominada de fibroblasto, enquanto a quiescente é conhecida como fibrócito (Minor, 1988).

Num estudo utilizando-se de ratos com idade de 12 a 18 meses de idade, analisando aspectos ultraestruturais e citoquímicos de fibroblastos no ligamento periodontal de molares, verificaram que os fibroblastos multinucleados distribuem-se aleatoriamente no ligamento periodontal. São ricos em organelas envolvidas na biosíntese do colágeno como: retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi. Tais fibroblastos incorporavam e secretavam produtos marcados com prolina H^3 , estes também possuíam muitos fagossomos contendo fibrilas colágenas intactas. Sugere-se nesse trabalho que os fibroblastos multinucleados apresentam uma mudança de atividade celular, podendo perder algumas glicoproteínas da membrana o que poderia explicar a ocorrência da multinucleação nessas células (Ramalho, 1994).

Outras células encontradas (Berkovitz *et al.*, 2003) são os cementoblastos, osteoblastos ambos com funções formativas e os odontoclastos e osteoclastos ambos com funções de reabsorção e oriundos da linhagem de monócitos do sangue, células mesenquimais indiferenciadas, células de defesa e células epiteliais (restos de Malassez), contudo (Junqueira & Carneiro, 1995) apontam ainda a presença celular do fibrócito.

Tanto os componentes celulares como a matriz são os responsáveis em promover a regeneração, e foi estabelecido ao longo de uma série de estudos que avaliaram a participação destes tecidos no processo de cura (Nyman *et al*, 1980; Karring *et al*, 1980). Sua base racional surgiu dos postulados de Melcher (1976), o qual estabeleceu que as células capazes de neoformar as estruturas de sustentação dental eram as células do ligamento periodontal.

2.5 Regeneração Periodontal

A regeneração periodontal pressupõe a reconstrução do ligamento periodontal com fibras de colagénio, orientadas perpendicularmente de forma a estarem inseridas em novo cemento e novo osso (Cortellini & Bowers, 1995; Heijl, 1997; Melloning, 1997).

O objetivo da reparação óssea é restaurar a continuidade e funcionalidade do tecido, permitindo que o tecido volte a ter suas características morfológicas e fisiológicas normais. Agem nesse processo células progenitoras indiferenciadas que podem conter ou reparar os danos, além de prepararem outras células a se diferenciar (Martins, 2001; Galliera *et al.*, 2008).

A primeira etapa (inflamatória) para a reparação do osso consiste na formação do coágulo, de origem da ruptura de microvasos sanguíneos (Ham *et al.*, 1971). Tal coágulo tem um papel passivo no processo, mas sem a formação do mesmo ou diante de sua necrose causará atraso no reparo (Shafer *et al.*, 1987).

Inicialmente, ocorre uma vasoconstrição, formação do coágulo, e minutos após mediadores químicos como a histamina e as prostaglandinas causam vasodilatação, permitindo maior aporte sanguíneo com leucócitos e nutrientes para o reparo. Fibrina proveniente de extravasamento plasmático causa certa obstrução linfática, acumulando-se na área da lesão, diluindo os contaminantes e provocando edema (Junqueira & Carneiro, 2004).

Segundo Hupp (1996) nesse momento não ocorre deposição de colágeno, sendo o principal material contido na ferida nessa fase inflamatória a fibrina, que possui pequena resistência à tensão. Após a hemostasia e a formação do coágulo, há uma prioridade na descontaminação da ferida (Siqueira Jr & Dantas, 2000; Martins, 2001).

Com a ferida descontaminada, pode haver a ação dos osteoclastos, que removem tecido necrótico e tecido ósseo que necessita de remodelação. Células osteogênicas iniciam sua diferenciação em osteoblastos. Estudos demonstram que os osteoblastos podem derivar de três fontes: periósteo, endósteo e células mesenquimais indiferenciadas, que depositarão matriz osteóide. Tal matriz associada com a matriz fibrosa pode ocorrer em excesso gerando a formação do calo ósseo (Guimarães, 1982; Andreassen *et al.*, 2001).

Ainda nessa fase, o entrelaçamento dos fios de fibrina possibilita a precipitação de substância fundamental e colágeno pelos fibroblastos. Como também a produção de tropocolágeno entre o terceiro e quarto dia. Além disso, os fibroblastos secretam fibronectina, que ajudam a estabilizar a fibrina. Essa rede de fibrina acumulada forma um gel higroscópico. Dessa forma, estimula a migração e a proliferação de mais fibroblastos e células endoteliais para a ferida, o que permite o repovoamento celular da lesão (Martins, 2001; Galliera *et al.*, 2008).

Já na fase de remodelação a estrutura óssea final corresponderá às necessidades biomecânicas (Pritchard, 1963). Durante tal estágio o osso produzido desordenadamente pode ser reabsorvido por osteoclastos (Hupp, 1996). E os osteoblastos depositam novo osso, orientado para o menor grau de tensão (Galliera *et al.*, 2008). Pode-se distinguir uma fase inicial de máxima neoformação óssea seguida por uma fase de predominância de reabsorção (Schilling *et al.*, 1998). Inicialmente, há uma neoformação de osso imaturo preenchendo não apenas o defeito, como também estabilizando o periósteo e as paredes laterais, formando o calo ósseo. Posteriormente, tal calo sofre reabsorção e gradativamente é substituído por osso lamelar (Parfitt, 2005).

Todo esse processo pode ocorrer ou por cicatrização por primeira intenção ou por segunda intenção. Na cicatrização por primeira intenção, o defeito ou o espaço entre os fragmentos é pequeno (Schenk & Willeneger, 1967), geralmente ocorre entre espaços onde a fissura é menor que 1mm. Pois quando a fissura é menor que 0,3mm, há deposição de osso lamelar diretamente neste espaço. Se a fissura estiver entre 0,4 – 1mm, esta se fará por uma trama óssea e posteriormente osso secundário (Feinberg & Larsen, 1991).

De outra forma, quando as extremidades da região a ser reparada forem maiores do que 1mm o mesmo tecido se reparará por cicatrização por segunda intenção (Hupp, 1996; Gonçalves *et al.*, 2001).

Tal tipo de reparo tecidual pode acontecer em situações que as células não conseguem reconstituir a morfologia original do tecido, devido à perda extensa de células e tecido (Kummar *et al.*, 1994), para que o mesmo ocorra há um preenchimento por tecido de granulação, que cresce a partir das bordas da lesão, associado a uma intensa formação de tecido cicatricial (Hupp, 1996; Martins, 2001).

Diferentemente do tecido ósseo o cimento não tem a mesma habilidade de remodelação, tendo sua capacidade de regeneração espontânea bastante limitada (Benatti *et al.*, 2006). Dessa forma, diversas técnicas têm sido utilizadas na tentativa de entender e possibilitar uma melhor restituição dos tecidos periodontais. O primeiro procedimento que teve como finalidade à regeneração do periodonto destruído foi o uso de enxertos ósseos que, pelas suas propriedades, são capazes de levar à regeneração óssea com certas limitações (Reynolds *et al.*, 2003) e seu efeito limitado em relação aos demais constituintes do periodonto, levaram ao desenvolvimento de outras técnicas como, por exemplo, a regeneração tecidual guiada (RTG) (Karring *et al.*, 1982; Gottlow *et al.* 1986).

Outras tentativas estão sendo testadas além da regeneração tecidual guiada como: matrizes extracelulares (King *et al.*, 1997), proteínas de matriz de esmalte (Kalpidis *et al.*, 2002; Giannobile & Somerman, 2003). Segundo Pinho *et al.* (2005) em uma revisão de literatura concluiu que qualquer um dos tratamentos acima citados ou suas associações auxilia no processo regenerativo do periodonto, mas não é capaz de restituir de forma completa o tecido periodontal, muito menos explicar de que maneira tais interações acontecem em níveis celulares e moleculares.

O processo de reparo na mandíbula de ratos do defeito do tipo fenestrado (4x3x1mm), é modelo em que é possível analisar a neoformação de cimento (King *et al.*, 1997), e de reparação óssea (Benatti *et al.*, 2006) na raiz distal do primeiro molar inferior. Nota-se que o reparo da fenestração ocorre de maneira gradativa com a substituição do tecido de granulação por osso, o qual desenvolvem-se no sentido de se tornar mais organizado (osso secundário), com uma densidade maior com um trabeculado ósseo mais espesso, em relação ao cimento nota-se a presença de um tecido bastante delicado sugestivo de cimento a partir do 10º dia, mas que não se desenvolve de maneira distinguível até o 32º dia, período máximo estudado (Melman *et al.*, 2008). Corroborando com os achados de Benatti *et al.* 2007, demonstrando a capacidade limitada de regeneração do cimento.

Dessa forma, a regeneração do cimento requer cementoblastos e a origem de tais células e moléculas que regulam seu recrutamento ainda são pobremente entendidos (Grzesik & Narayanan, 2002; Ohta *et al.*, 2008). Muitos estudos têm sido realizados na fase de cementogênese tentando analisar como os componentes do cimento podem regular tal

processo (MacNeil and Somerman, 1999; Saygin *et al.*, 2000). Num estudo durante o desenvolvimento do dente, células do folículo dental de origem ectomesenquimal parecem ser responsáveis pela formação do cemento, em camundongos adultos acredita-se que os cementoblastos tem origem de células progenitoras localizadas perivascularmente no ligamento periodontal e nos espaços medulares do osso alveolar (McCulloch, 1993; Pitaru *et al.*, 1994). Embora a cementogênese de roedores seja diferente de mamíferos (Bosshardt & Schroeder, 1996), a observação de Liu *et al.*, (1997) indica que o ligamento periodontal possa ser uma fonte de precursores dos cementoblastos. Tais achados demonstram que algumas células do ligamento periodontal de humanos em cultura podem funcionar como cementoblastos, formando nódulos e proteínas expressas em cementoblastos (Bar-Kana *et al.*, 1998).

Os cementoblastos podem também ser derivados de células tronco presentes no interior do ligamento periodontal, gengiva ou até osso alveolar (Grzesik & Narayanan, 2002). No entanto, diferentes mediadores bioquímicos segundo Grzesik & Narayanan (2002) regulam tais processos como, por exemplo: IGF-1 (fator de crescimento insulínico) estimula a proliferação, diferenciação e síntese de matriz extracelular; FGF (fator de crescimento de fibroblasto) estimula a proliferação, diferenciação, síntese de matriz extracelular e a angiogênese; PDGF (fator de crescimento plaquetário) estimula a proliferação, diferenciação e síntese de matriz extracelular; TGF- β (fator transformador de crescimento) excita a síntese de matriz, a angiogênese e a quimiotaxia celular; BMPs estimulam a síntese de matriz extracelular e a neoformação óssea; EGF (fator de crescimento epidermal) e CGF (fator de crescimento de *Chlorella*) estimulam a proliferação, diferenciação das células. Além desses fatores, componentes da matriz podem estar envolvidos na reparação periodontal como: colágeno facilita a adesão, diferenciação e regula a proliferação celular; BSP controla a adesão e a diferenciação celular como também a mineralização; OPN regula a diferenciação e sobrevivência celular; fibronectina facilita a adesão, diferenciação e proliferação das células; Osteonectina regula a angiogênese e a proliferação celular; proteína de adesão celular facilita a adesão e a diferenciação celular (Grzesik & Narayanan, 2002).

Embora o cemento não tenha a mesma capacidade de regeneração e remodelação espontânea que o tecido ósseo, parece ter seu desenvolvimento controlado por vários

fatores reguladores em comum com os do osso alveolar (McNeil *et al.*, 1998, Saygin *et al.*, 2000). Além disso, cementoblastos expressam muitas proteínas similares aos osteoblastos (Takano-Yamamoto *et al.*, 1994; Kagayama *et al.*, 1997; McNeil *et al.*, 1998, Saygin *et al.*, 2000ab). Sabe-se que o tecido ósseo responde com anabolismo diante do tratamento com PTH administrado de forma intermitente (Morkey *et al.*, 1997, Mohan *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2001; Moriyama *et al.*, 2002; Turner, 2002). Sabe-se ainda que cementoblastos possuem receptores para o PTH (Tenorio & Hughes, 1996), como também foi reportado que células do ligamento periodontal podem responder ao estímulo do PTH (Nohutcu *et al.*, 1995; Ouyang *et al.*, 2000) interferindo com a diferenciação e sobrevivência de células do ligamento periodontal (Lossdorfer *et al.*, 2005; Lossdorfer *et al.*, 2006).

Portanto, é de interesse científico o entendimento do papel biológico dos efeitos do PTH sobre o tecido ósseo e os tecidos periodontais, já que, potencialmente, este hormônio pode interagir diretamente com células do periodonto, quando administrado de maneira intermitente.

3. PROPOSIÇÃO

1) Avaliar a influência da administração intermitente do PTH (1-34) sobre a reparação do tecido ósseo em defeitos do tipo fenestração na mandíbula de ratos;

2) Avaliar a influência da administração intermitente do PTH (1-34) sobre as fibras do ligamento periodontal neoformadas sobre a raiz na qual o cimento foi previamente removido;

3) Avaliar os efeitos do PTH (1-34) administrado de forma intermitente sobre a neoformação de cimento na raiz distal do primeiro molar inferior na qual o cimento foi previamente removido.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1) Característica da amostra

Foram utilizados 32 ratos, machos, (*Rattus Norvegicus*, Albinus, Wistar), pesando entre 150 e 200g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de 7 dias para aclimação ao ambiente do laboratório. Durante todo o período do estudo os animais permaneceram sob as mesmas condições ambientais com ciclos diários de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da UNICAMP (protocolo 1338-1).

4.2) Procedimento Cirúrgico

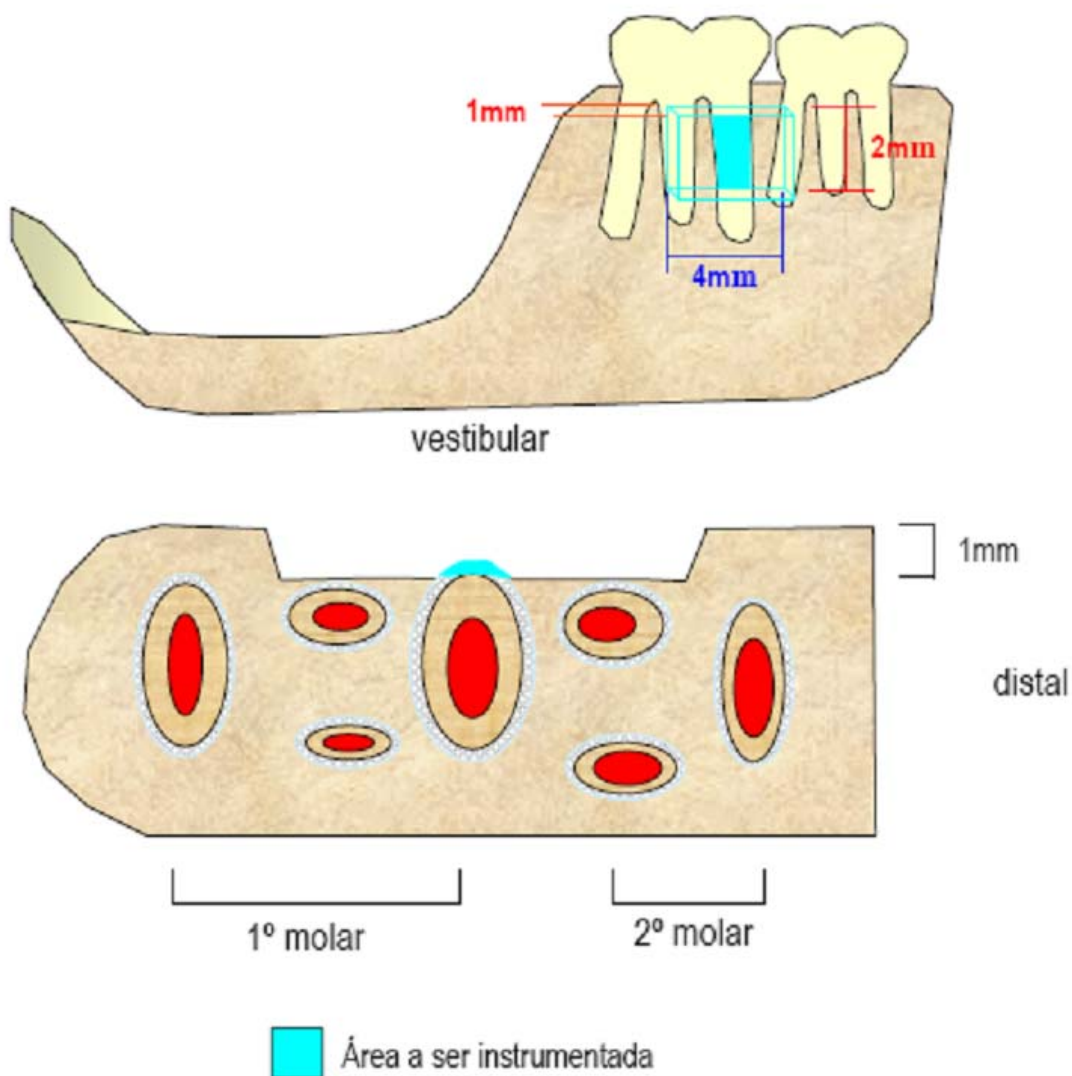
Os animais foram pesados, antes da cirurgia, e de acordo com seu peso corpóreo anestesiados com solução de ketamina na dose de 80mg/kg-IM (Francotar®) e cloridrato de xylasina na dose de 8mg/kg-IM (Virbaxil®). Uma solução de álcool iodado foi utilizada para a antisepsia do campo operatório (Figura 2), a hemimandíbula direita. Após tricotomia na região mandibular, foi feita uma incisão superficial de aproximadamente 2cm na altura da comissura labial, no sentido anteroposterior.

A fáscia superficial foi separada, expondo o músculo masseter. As inserções musculares foram incisadas, e tanto o músculo quanto o periósteo, elevados para exposição do tecido ósseo mandibular (Figura 3). Com o auxílio de um microscópio cirúrgico, o tecido ósseo que reveste a região vestibular da raiz distal dos primeiros molares foi removido com o auxílio de uma broca esférica, modelo FG 33 1/2 (Carbide - Fava®), em baixa rotação, sob irrigação com solução fisiológica, criando um defeito (Figura 1) de cerca de 4mm de comprimento, 2mm de altura e 1mm de profundidade medidas realizadas com auxílio de um paquímetro (Kuo-Kuang Huang *et al*, 2005) foi criado (Figura 5).

A margem superior do defeito estava localizada logo abaixo da linha mucogengival, e acima da região apical das raízes assegurando que os dentes não percam vitalidade. Em seguida, com o auxílio de curetas, a superfície radicular foi cuidadosamente raspada e alisada com o objetivo de remover cimento dental (Figura 4), ligamento periodontal e dentina superficial. Os defeitos foram irrigados constantemente com solução

salina fisiológica (0,9%) para a remoção de fragmentos que poderiam interferir com o processo de reparação. A cirurgia seguiu os parâmetros de King *et al.*, 1997, Kuo-Kuang Huang *et al.*, 2005 e Benatti *et al.*, 2006. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados pela equipe composta por mim, Dr. Marcelo Rocha Marques e Dr. Bruno Braga Benatti.

Figura 1. Ilustração esquemática do defeito tipo fenestração (abaixo). Imagens (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5) gentilmente cedidas pelo Dr. Bruno Braga Benatti.



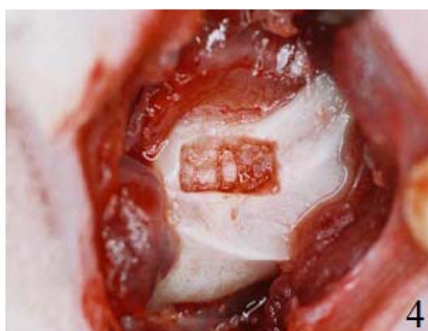
Figuras ilustrativas (figuras 2, 3, 4 e 5) da cirurgia de criação do defeito do tipo fenestrado. Seta em preto aponta para a raiz distal do 1º molar instrumentada cirurgicamente.



Região superficial da mandíbula após a tricotomia, campo operatório.



Face vestibular da mandíbula, exposição da superfície óssea.



Exposição do defeito fenestrado, na região do 1º molar inferior.



Maior aumento da raiz distal do 1º molar aplainada cirurgicamente.

4.3) Delineamento experimental

Após a criação do defeito, os ratos foram separados, aleatoriamente, em 8 animais por grupo:

C14: recebeu injeções subcutâneas de forma intermitente (três vezes por semana, sendo nas segundas, quartas e sextas-feiras, semelhante aos demais grupos) do veículo de diluição do hPTH (ácido acético 0,01%) e passou por um período de reparo dos tecidos de 14 dias;

P14: recebeu injeções subcutâneas de hPTH (fragmento 1-34, Sigma®, na dose de 40 µg/Kg na frequência de 3 vezes por semana) e passou por um período de reparo de 14 dias;

C21: recebeu injeções subcutâneas do veículo de diluição do hPTH (ácido acético 0,01%) e passou por um período de reparo dos tecidos de 21 dias;

P21: recebeu injeções subcutâneas de hPTH (fragmento 1-34, Sigma®, na dose de 40 µg/Kg na frequência de 3 vezes por semana) e passou por um período de reparo de 21 dias (Barros *et al.*, 2003 e Marques *et al.*, 2005).

4.4) Processamento do material

Os animais foram mortos por deslocamento cervical, suas mandíbulas foram removidas, fixadas em solução de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 0,5% e ácido pícrico 0,2% (Karnovsky modificado), por um período de 12 horas, o material foi lavado em tampão Tris/HCl e descalcificadas em EDTA (Merck®) 4,13% tamponado com Tris/HCl por aproximadamente 75 dias.

Posteriormente, as peças foram novamente lavadas em tampão, seguida pela desidratação crescentes em etanol (Reagentes Analíticos Dinâmica®) até atingir a concentração de 100%. Por meio de banhos de xilol (Reagentes Analíticos Dinâmica®), o material foi diafanizado, e infiltrado em parafina (Paraplast Plus – McCormick Cientific®), e montado para processamento dos cortes histológicos. Os mesmos foram feitos com 3µm de espessura, no sentido transversal em relação aos dentes como ilustrado no diagrama 1 (esquema em corte longitudinal do primeiro molar inferior). Para desparafinar utilizaram-se dois banhos de xilol, por um período de 10 minutos cada um, seguindo para a hidratação em solução decrescente em álcool etílico (Reagentes Analíticos Dinâmica®) até a água destilada.

Duas colorações foram utilizadas: Hematoxilina e Eosina (HE) (Reagentes Analíticos Dinâmica®) e Tricrômio de Mallory. Para a coloração com HE, as lâminas foram coradas com Hematoxilina por um tempo de 5 minutos, em seguida lavadas em água corrente e posteriormente coradas com Eosina por um período de 2 minutos e também lavadas em água corrente, desidratadas em estufa a 37°C e montagem em Bálsamo do Canadá (Labsynth®). Para a coloração de Tricrômio de Mallory (TM), os cortes foram corados por 3 minutos pela solução de fucsina ácida 1%, lavados em água acética (cinco imersões), diferenciados pela solução de ácido fosfomolibdico 1% (Fisher Cientific Company®) durante 1 minuto, lavados novamente em água acética, corados por um período de 5 minutos na mistura de azul de metileno (0,5%) (Merck®), orange G. (2%) (Synth®), ácido oxálico 2% (Synth®) preparados em água destilada (q.s.p. 100ml), lavados em água acética e montados também em Bálsamo do Canadá.

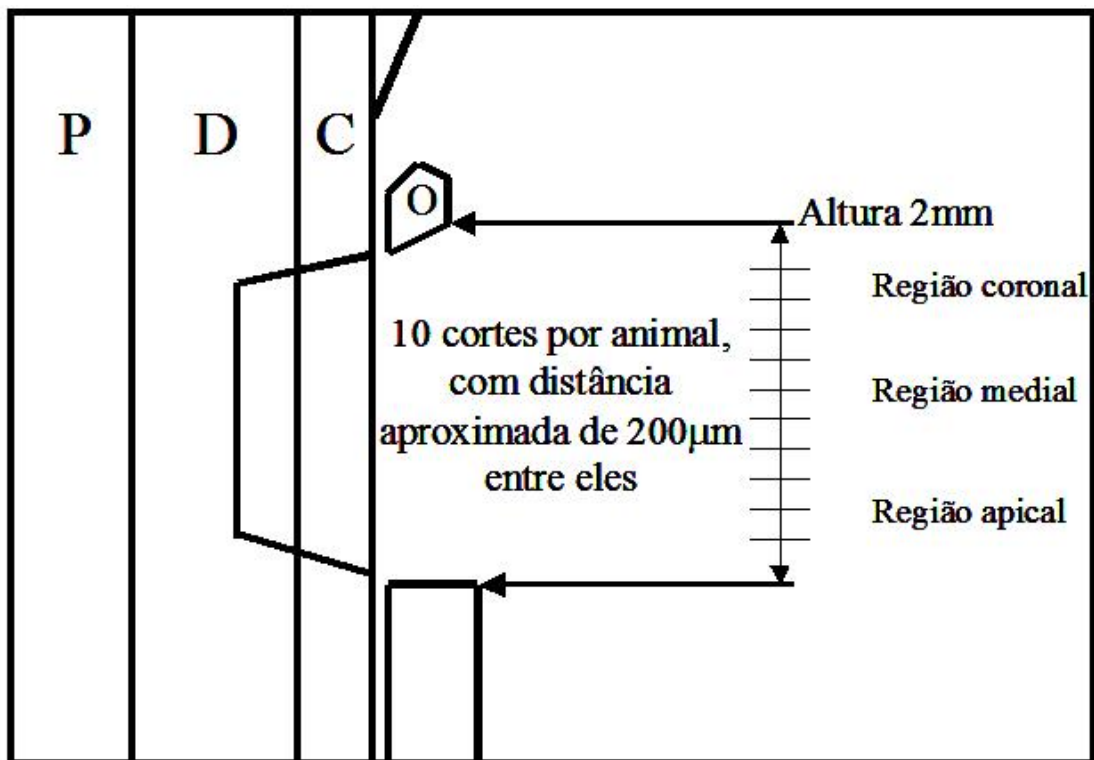
4.5) Análise Histomorfométrica

Em todas as análises histomorfométricas apenas um examinador mensurou as lâminas e o mesmo foi previamente calibrado. Para análise das medidas lineares e de área utilizou-se o Image Tool3.0® e para a análise de densidade e contagem utilizou-se o KS400®, além do microscópio óptico (Leica DMLP®).

Toda a extensão do defeito criado foi examinada, utilizando-se de dez cortes por animal, com uma distância entre os cortes de aproximadamente 200µm, conforme diagrama um.

Foram avaliados sete parâmetros: I - extensão inicial do defeito, II - extensão do defeito remanescente, III – área do defeito ósseo remanescente, IV – densidade do osso neoformado, V – área do calo formado e marcação para TRAP, VI – área do cimento neoformado, VII – análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal reinserido (King *et al.*, 1997, Gerstenfeld *et al.*, 2005, Benatti *et al.*, 2006).

Diagrama 1. Representa o defeito do tipo fenestração, em corte longitudinal do primeiro molar inferior, defeito com altura de 2mm e profundidade de 1mm; O= tecido ósseo alveolar, C= cimento, D= dentina, P= polpa (abaixo).



4.51 Extensão do defeito inicial

A medida foi realizada de bordo a bordo do defeito (representada pela seta na figura 6) (Benatti *et al*, 2006), em uma medida linear (mm) corada com HE, utilizando um aumento de 25 vezes.

4.52 Extensão do defeito remanescente

A medida da extensão do defeito remanescente foi feita na região superficial, supostamente onde deveria ter havido o total preenchimento por novo tecido ósseo (Benatti *et al*, 2006), medida essa realizada linearmente (mm), utilizando um aumento de 25 vezes corada com HE, como representado na figura 7.

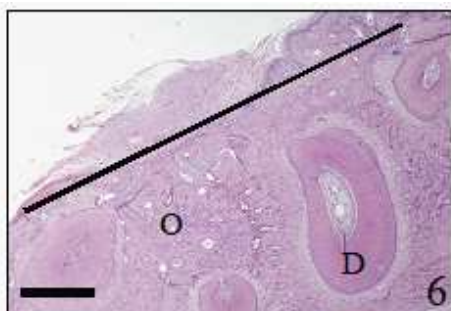
4.53 Área do defeito ósseo remanescente (área de osso que faltou para preencher o defeito)

Semelhante ao realizado no item II, ao invés de ser realizada uma medida linear, mensurou-se a área (mm²) de osso que não foi totalmente reparada, utilizando um aumento de 25 vezes corada com HE, segundo o esquema da figura 8.

4.54 Densidade do osso neoformado (proporção de tecido mineralizado)

Três regiões diferentes dentro da área do defeito foram analisadas (Benatti *et al*, 2006 modificado), utilizando uma malha (grade 10 x 10) com cem pontos (%), em aumento de 100 vezes, auxiliado por um microscópio óptico e um analisador de imagem o KS400® com coloração de HE. Todos os pontos (intersecção da grade) que coincidisse com o osso neoformado foram contados, isentando as regiões medulares (espaços entre os trabeculados ósseos), como mostrado nas figuras 9.

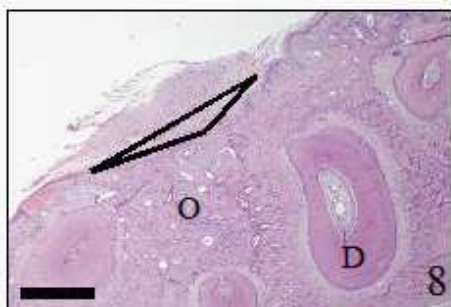
Prancha 1: Corte transversal em relação aos molares inferiores, as figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13 representam como a análise histomorfométrica foi realizada. D = dentina, O = osso, seta preta representa a borda do defeito inicial.



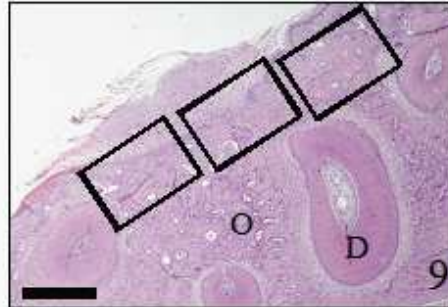
Extensão do defeito inicial representado pela linha em preto, barra = 800 μ m, 25x, HE.



Extensão do defeito remanescente representado pela linha em preto, barra = 800 μ m, 25x, HE.



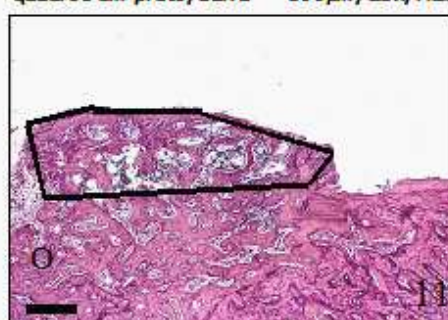
Área do defeito remanescente representado pelo triângulo em preto, barra = 800 μ m, 25x, HE.



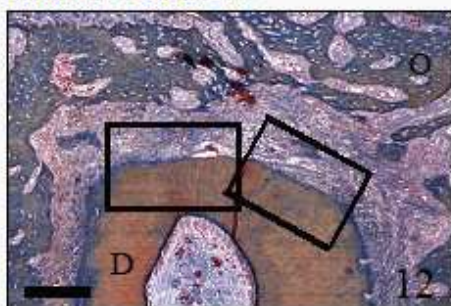
Regiões medidas representadas pelos quadros em preto, barra = 800 μ m, 25x, HE.



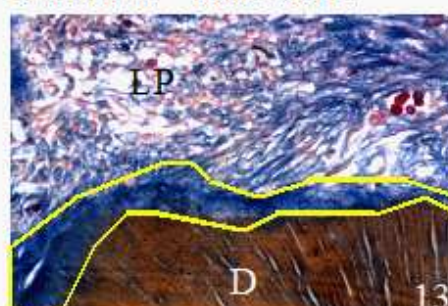
Áreas analisadas (retângulos) para TRAP no calo, barra=300 μ m, 50x.



Esquema de medida da área do calo ósseo formado, barra = 800 μ m 50x, HE.



Regiões analisadas do cimento, barra = 200 μ m, 100x, Tricômio de Mallory.



Área de cimento neoformado no interior do polígono em amarelo, aumento de 500x, tricômio de Mallory.

4.55 Área do calo e marcação com TRAP (Fosfatase Ácida Tartarato Resistente)

O tamanho do calo foi medido a partir da superfície óssea formada além do tamanho normal da mandíbula na região onde a cirurgia foi realizada, mais precisamente no limite do defeito em sua região mais posterior em direção à raiz mesial do segundo molar inferior, usou-se um aumento de 50 vezes corada com HE, como representado na figura 11, obtendo um valor de área em mm².

A marcação para TRAP (Histoquímica para Fosfatase Ácida Tartarato Resistente), utilizou o material emblocado em parafina (Paraplast Plus – McCormick Cientific®) e cortado com 3µm de espessura na região de primeiro molar inferior. Os cortes foram encubados por 2h a 37°C em câmara úmida com uma solução para detecção de Fosfatase Ácida Tartarato Resistente-(Sigma®), contendo: Naftol AS-BI fosfato, acetato de sódio, Fast Red Garnet GBC, Solução de tartarato, Nitrato de Sódio. Após a encubação os cortes foram lavados em água corrente por 30 minutos, e contracorados com hematoxilina por 50 segundos (Marques, 2007). Foi feita então uma análise histológica qualitativa e quantitativa. Na análise quantitativa contou-se o número de osteoclastos presentes na região do calo formado, utilizando 4 cortes por animal na região mediana do defeito, sendo medida duas áreas na região do calo de 0,25 mm² cada uma (figura 10), somando uma área total de 0,5mm² por corte com um aumento de 200x, e comparou-se posteriormente com outros dados da análise histomorfométrica.

4.56 Área de cimento neoformado

O cimento foi previamente removido com microcinzéis até o aplainamento da superfície radicular. Para melhor visualização do cimento novo e suas fibras a coloração de Tricômio de Mallory foi a de escolha para a mensuração. A área de cimento neoformado no primeiro molar inferior raiz distal (Kuo-Kuang Huang *et al*, 2005) foi medida em duas regiões diferentes, em um campo com extensão de 310µm a partir da borda mesial e outro a partir da borda distal da superfície radicular com extensão de 310µm também, obtendo uma soma de 620µm por animal. Semelhantes às análises anteriores, usaram-se 8 animais por grupo com 10 cortes por animal, com uma distância aproximada entre os cortes de 200µm, dessa forma analisando toda extensão da área operada. Foi utilizado um microscópio óptico com um aumento de 500 vezes (King *et al.*, 1997; modificado). Como demonstrado nas figuras 12 e 13.

4.57 Análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal reinserido

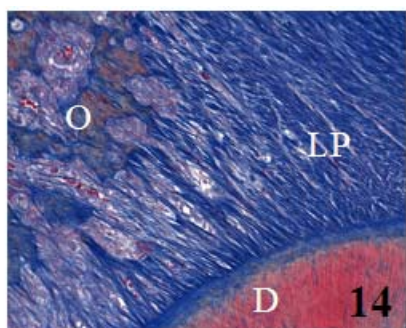
A utilização da microscopia de polarização teve como principal objetivo confirmar a neoformação de cimento, por meio da análise de birrefringência das fibras do ligamento periodontal, as quais se apresentam reinseridas perpendicularmente sobre o cimento neoformado (Cortellini & Bowers, 1995; Heijl, 1997; Melloning, 1997).

Assim como nas análises anteriores, foram utilizados 8 animais por grupo, e 10 cortes por animal (com uma distância aproximada entre eles de 200 μ m), varrendo toda a extensão da região operada, na raiz distal do primeiro molar inferior, o cimento foi removido tornando a superfície radicular aplainada (Figura 12). Analisou-se a reinserção das fibras do ligamento periodontal na superfície do cimento instrumentado e a organização das fibras neoformadas (como ilustrada na figura 15 - região não instrumentada, representando a birrefringência das fibras do ligamento periodontal organizadas), com o auxílio de um microscópio Leica DMLP®, equipado com filtro polarizador (Brace-Köhler compensator – Wild Leitz GMBH Inc., Wetzlar, Germany) e luz policromática (546nm), em um aumento de 200 vezes, as lâminas foram apenas montada em água destilada sem nenhum corante específico (Figuras 16 e 17).

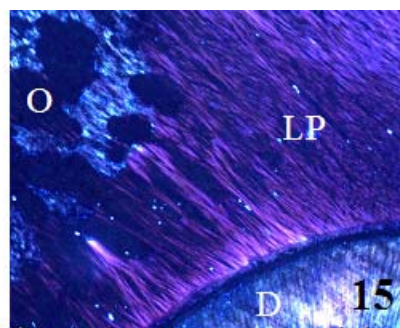
Após determinar a área de maior birrefringência (brilho mais intenso), os cortes de 3 μ m de espessura foram montados em uma lamínula com água destilada e 30 minutos depois mensurados.

Para a medição seguimos Bennett (1961), a área a ser medida foi girada até a posição de menor brilho (ponto de extinção) e então orientada diagonalmente em 45°, região de maior brilho. Girou-se o analisador até o ponto de extinção, os valores do retardo óptico foram coletados em nm e analisados estatisticamente.

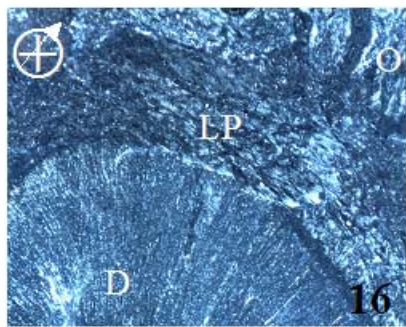
Prancha 2 – Cortes transversais da mandíbula na região dos molares, área do ligamento periodontal, D = dentina, LP = ligamento periodontal e O = tecido ósseo. Figura 14 representa uma região não instrumentada da raiz do molar com suas fibras colágenas em destaque pela coloração de Tricômio de Mallory (fibras em azul). Figura 15 representa a mesma região da figura 14, visualizada com luz polarizada, as regiões brilhantes (mais claras) representam as áreas mais birrefringentes. Figura 16, nota-se a birrefringência (regiões mais brilhantes) do ligamento periodontal. Figura 17, mesma região da figura 16 com a diferença que as fibras do LP aparecem *escuras* (chamado de ponto de extinção), mostrando a possibilidade de mensuração da birrefringência do ligamento periodontal.



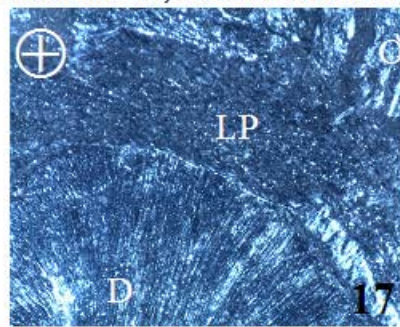
Fibras do ligamento periodontal, 200x, Tricômio de Mallory.



Fibras do ligamento periodontal mesma região da figura ao lado, 200x, Luz Polarizada, Tricômio de Mallory.



Área instrumentada, angulação de brilho intenso, 200x, Luz Polarizada.



Mesma região da figura ao lado, ponto de extinção (retardo óptico de 3,2nm), 200x, Luz Polarizada.

4.6 Análise Estatística

Uma vez obtidos os dados, as médias representativas de cada animal foram comparadas estatisticamente entre os grupos (análise intergrupos) com o auxílio do teste de Análise de Variância Dois Critérios, seguido pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Análises histomorfométricas:

5.1 Extensão inicial do defeito

A medida linear realizada de bordo a bordo do defeito, como esquematizado na figura 6, demonstrou que a extensão do defeito inicial não variou significativamente, de forma que alterasse as análises posteriores, hipótese confirmada pelo teste estatístico ($p=0,3536$; $^a 4,56\pm 0,16\text{mm}$, $^a 4,65\pm 0,17\text{mm}$, $^a 4,69\pm 0,35\text{mm}$, $^a 4,65\pm 0,07\text{mm}$, grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente) como apresentado no gráfico abaixo (Figura 18).

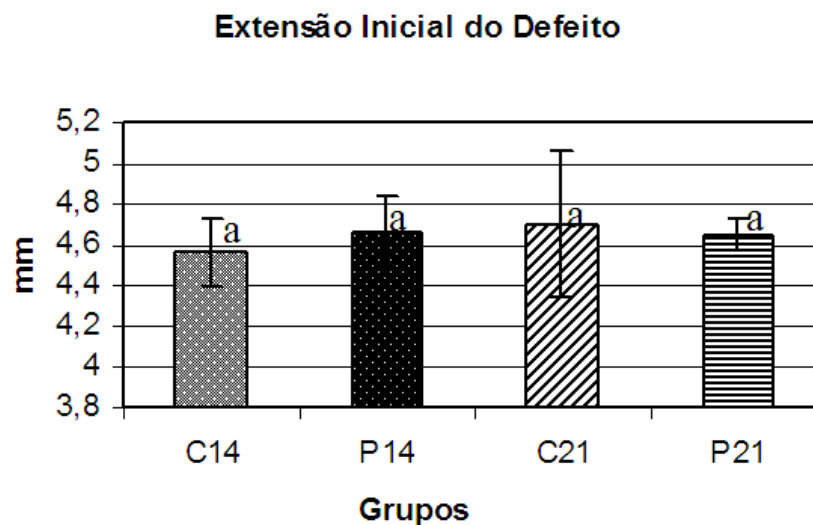


Figura 18. Gráfico representativo das médias e $\pm$ desvios padrões da extensão do defeito inicial nos diferentes grupos experimentais, mostrando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,3536$; $n=8$ animais por grupo).

Com o intuito de evitar termos repetitivos nas legendas dos gráficos dos resultados nos próximos parâmetros que se seguem, fica estabelecido que: em cada grupo mostrado nos gráficos, as letras iguais demonstram que não existe diferença estatisticamente significativa entre si ($p>0,05$). Por outro lado, quando as letras forem distintas umas das outras, significa que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos correspondentes às diferentes letras ($p<0,05$).

5.2 Extensão do defeito remanescente

A medida da extensão do defeito remanescente foi feita na região superficial (figura 7) e a análise intergrupo demonstrou que o tratamento intermitente com PTH (1-34) reduziu significativamente ($p=0,001$) a extensão do defeito remanescente (Figuras 21 e 23). Os dois grupos controles, C14 e C21, obtiveram os maiores valores médios (^a $1,72\pm0,37\text{mm}$; ^b $0,87\pm0,13\text{mm}$; ^a $1,17\pm0,18\text{mm}$; ^b $0,33\pm0,21\text{mm}$; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente) no tamanho do defeito remanescente (Figuras 20 e 22). Os grupos que receberam a administração do PTH (1-34) não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$), como também os dois grupos controles. Dados representados pela Figura 19.

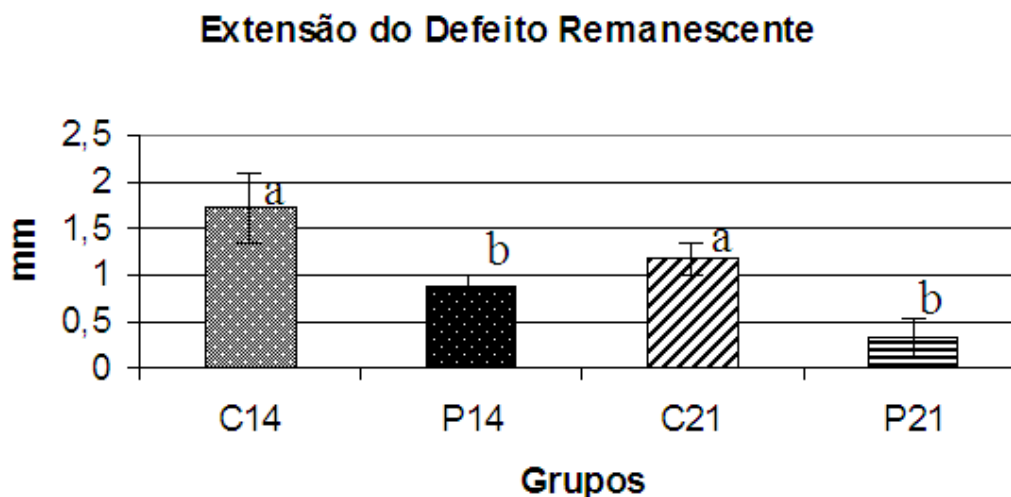
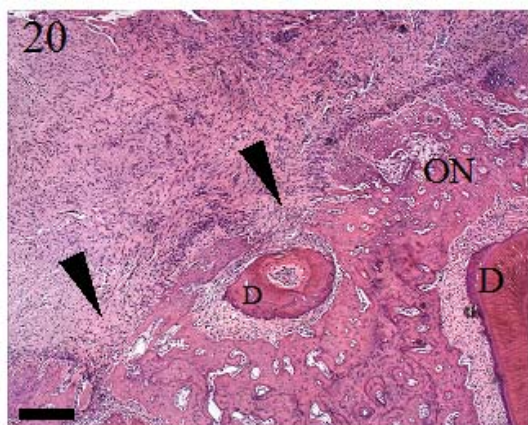
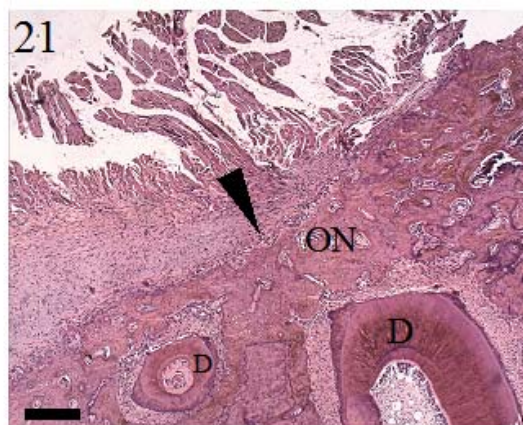


Figura 19. Gráfico representativo das médias e $\pm$ desvio padrão da extensão do defeito remanescente nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles e tratados com PTH (1-34) ($p=0,001$; $n=8$ animais por grupo).

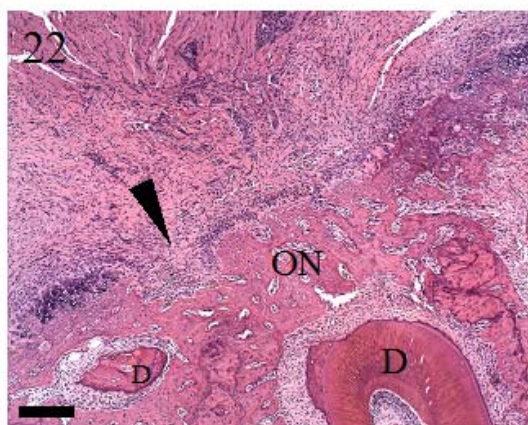
Prancha 3: Cortes transversais da mandíbula, região dos molares, figuras 20, 21, 22 e 23 são representativas da extensão (linear) e área do defeito remanescente de cada grupo experimental; D= dentina, ON= tecido ósseo neoformado, seta em preto aponta para defeito remanescente, barra=200µm, microscopia de luz em aumento de 50x, coloração HE.



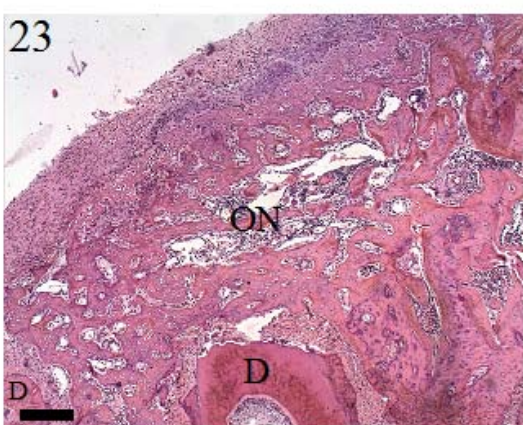
Grupo C14, defeito remanescente, barra=200µm, 100x, HE.



Grupo P14, defeito remanescente, barra= 200µm, 100x, HE.



Grupo C21, defeito remanescente, barra= 200µm, 100x, HE.



Grupo P21, ausência do defeito remanescente, barra= 200µm, 100x, HE.

5.3 Área do defeito ósseo remanescente

Mensurou-se a área de osso que não foi totalmente reparada, utilizando um aumento de 25 vezes, segundo o esquema da figura 8.

Todos os grupos diferiram entre si quando comparados estatisticamente, sendo a área do defeito ósseo não reparado maior nos grupos que não receberam o PTH (1-34), $C14 > C21 > P14 > P21$, grupos C14 e C21 (Figuras 20 e 22), enquanto os grupo P21 e P14 apresentaram os menores valores médios (como ilustrada nas Figuras 21 e 23), ($p=0,001$; ^a $1,98 \pm 0,09 \text{ mm}^2$; ^c $0,76 \pm 0,12 \text{ mm}^2$; ^b $1,22 \pm 0,18 \text{ mm}^2$; ^d $0,34 \pm 0,06 \text{ mm}^2$; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente), como ilustrado na Figura 24.

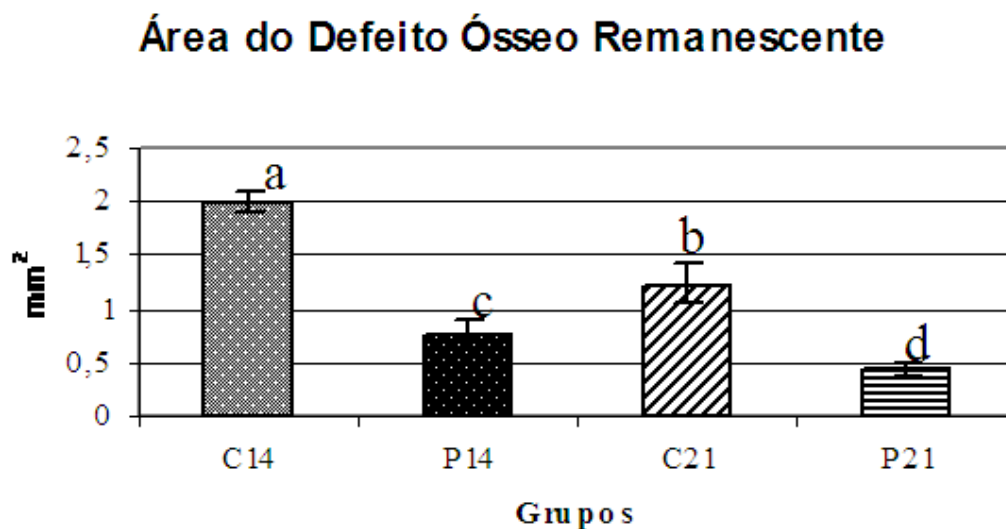


Figura 24. Gráfico representativo das médias e $\pm$ desvio padrão da área do defeito ósseo remanescente nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,001$; $n=8$ animais por grupo).

5.4 Densidade do osso neoformado

Três regiões diferentes dentro da área do defeito foram analisadas (Benatti *et al*, 2006, modificado), como mostrado nas figuras 9.

A análise intergrupo demonstrou que a administração de PTH (1-34) intermitente aumentou significativamente a densidade do osso neoformado (ilustrada pelas Figuras 27 e 29 grupos que receberam PTH e pelas Figuras 26 e 28 que são os grupos controles), ($p=0,001$; ^d $42,50\pm3,50\%$; ^b $59,62\pm6,09\%$; ^c $51,87\pm5,71\%$; ^a $72,12\pm5,38\%$; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente) quando comparados com os grupos de mesmo tempo cirúrgico (P14 x C14 e P21 x C21), ilustração na figura 25.

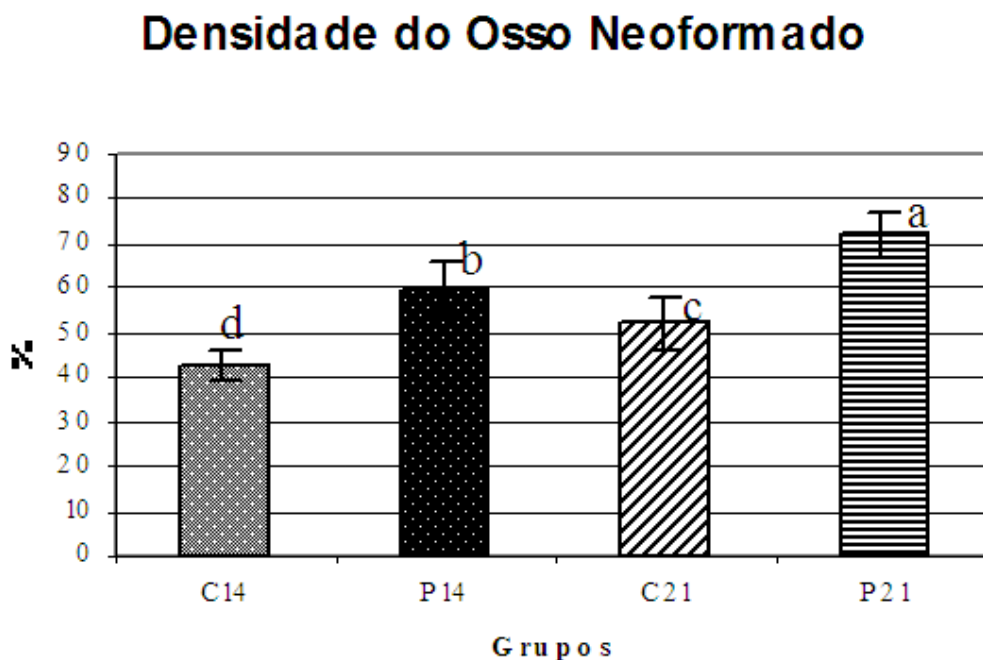
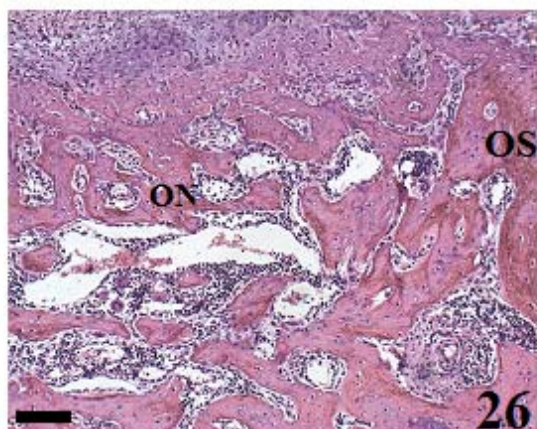
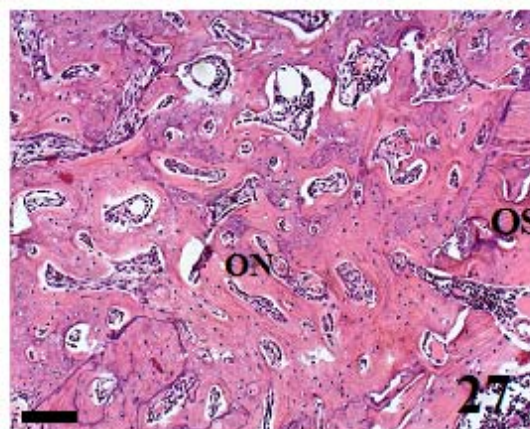


Figura 25. Gráfico representativo das médias e $\pm$ desvio padrão da densidade do osso neoformado nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,001$; $n=8$ animais por grupo).

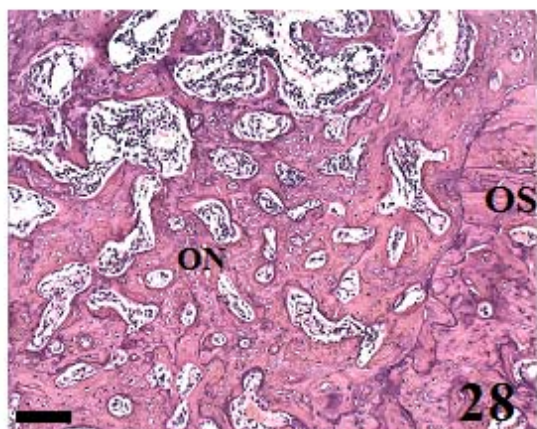
Prancha 4: Cortes transversais da mandíbula, região instrumentada cirurgicamente, figuras 26, 27, 28 e 29 são representativas da densidade óssea de cada grupo experimental, ON= tecido ósseo neoformado, OS= tecido ósseo secundário, barra=100µm, microscopia de luz em aumento de 100x, coloração HE.



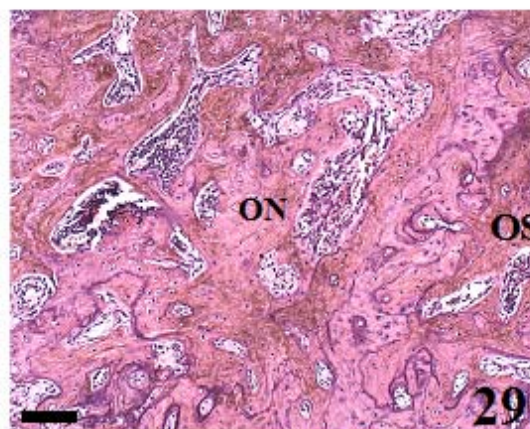
Grupo C14, densidade do osso neoformado e regiões medulares.



Grupo P14, densidade do osso neoformado e regiões medulares.



Grupo C21, densidade do osso neoformado e regiões medulares.



Grupo P21, densidade do osso neoformado e regiões medulares.

5.5 Área do calo formado e marcação para TRAP

O tamanho do calo foi medido a partir da superfície óssea formada além do tamanho normal da mandíbula, como representado na figura 11.

Em relação ao tamanho do calo formado, os grupos que receberam o PTH (1-34) de forma intermitente foram os que apresentaram maiores médias de área do calo, ficando o grupo P14 com o maior tamanho de calo ($p=0,001$; $^d0,51\pm0,10\text{mm}^2$; $^a3,21\pm0,31\text{mm}^2$; $^c0,96\pm0,15\text{mm}^2$; $^b2,20\pm0,24\text{mm}^2$; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente), enquanto os grupos controles apresentaram os menores tamanhos de calo, como representado na figura 30 (gráfico abaixo) e figuras da prancha 5 (figuras 31, 32, 33 e 34), imagens representativas de cada grupo experimental.

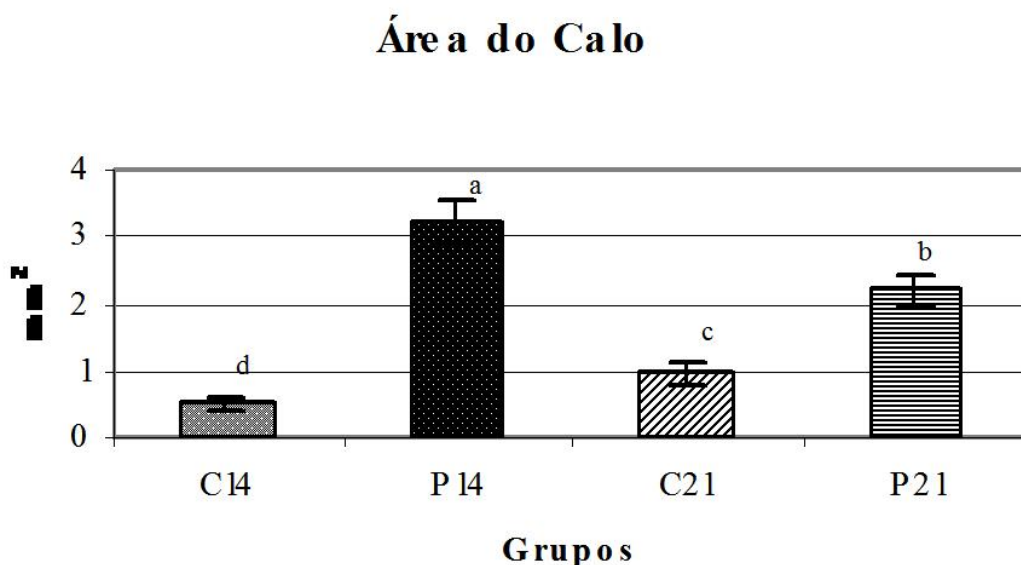
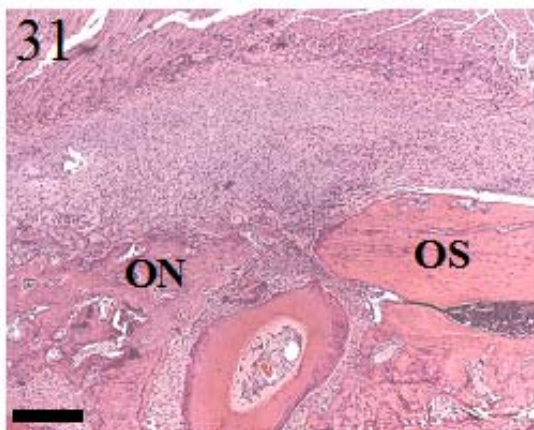
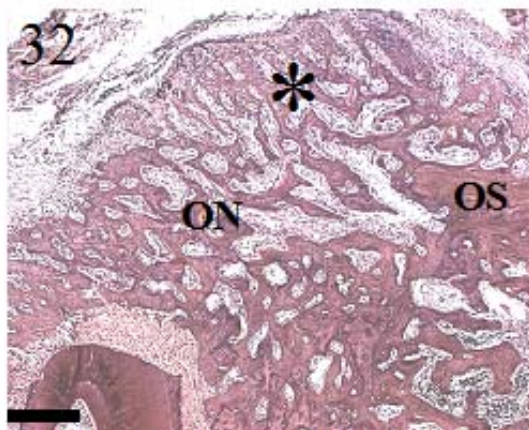


Figura 30. Gráfico representativo da média e desvio padrão da área do calo nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,001$; $n=8$ animais por grupo).

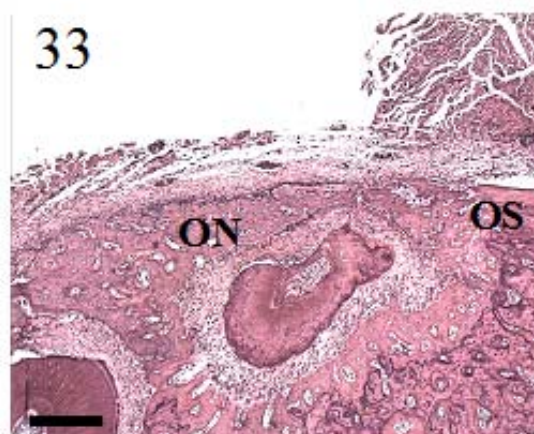
Prancha 5: Cortes transversais da mandíbula, região vestibular dos molares, figuras 31, 32, 33 e 34 são representativas do calo; ON= tecido ósseo neoformado, OS= tecido ósseo secundário, * = região central do calo.



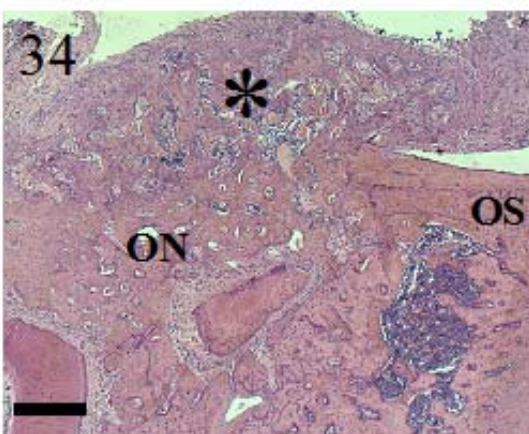
Grupo C14, barra=300µm, ausência de calo, 50x, HE.



Grupo P14, barra=300µm, presença do calo, 50x, HE.



Grupo C21, barra=300µm, ausência de calo, 50x, HE.



Grupo P21, barra=300µm, região do calo, 50x, HE.

Quanto à marcação para TRAP, os grupos que receberam a administração de PTH (1-34) de forma intermitente (Figuras 37, 39 e 41) apresentaram maior número de células marcadas com TRAP (osteoclastos e pré-osteoclastos) quando comparados com os grupos controles (Figuras 38 e 40) ($p < 0,01$; ^b $17,62 \pm 2,38$ células/ $0,5\text{mm}^2$ de calo, ^a $28,62 \pm 2,77$ células/ $0,5\text{mm}^2$ de calo, ^b $15,75 \pm 2,37$ células/ $0,5\text{mm}^2$ de calo, ^a $25,50 \pm 3,92$ células/ $0,5\text{mm}^2$ de calo; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente), figura abaixo ilustra os dados.

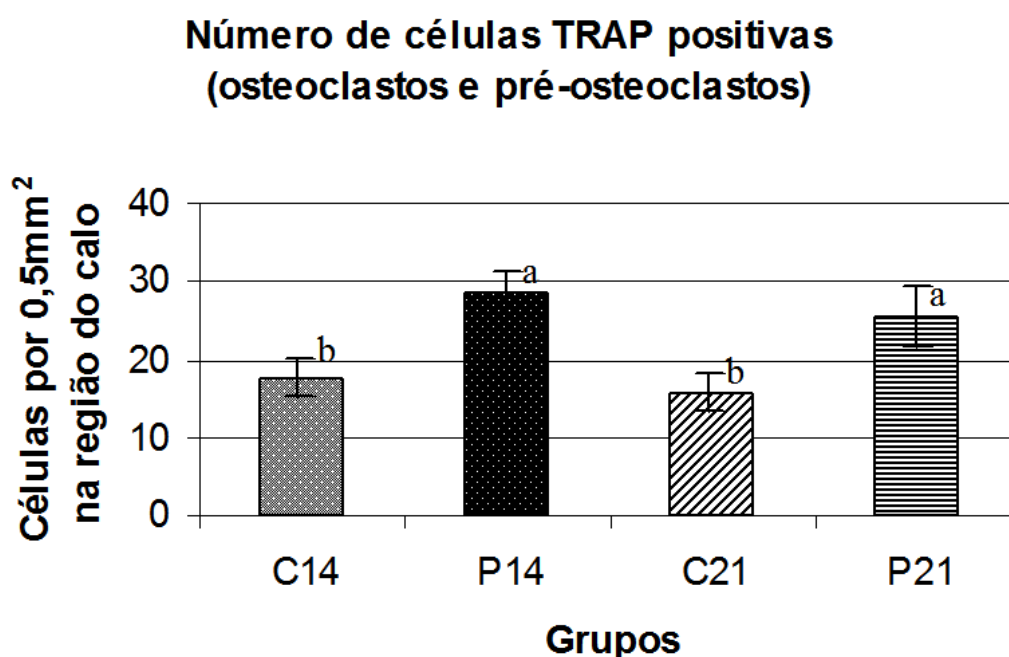
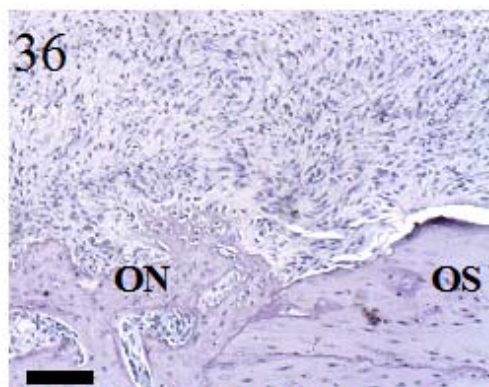
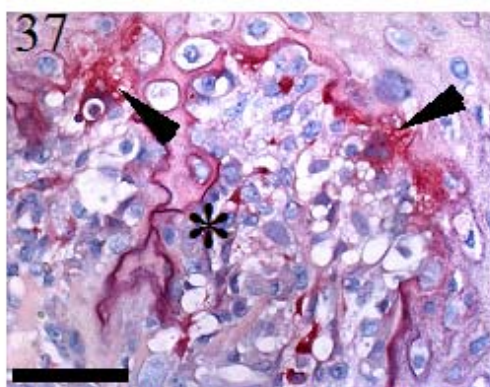


Figura 35. Gráfico representativo das médias e desvios padrões do número de células TRAP positivas nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,01$; $n = 8$ animais por grupo).

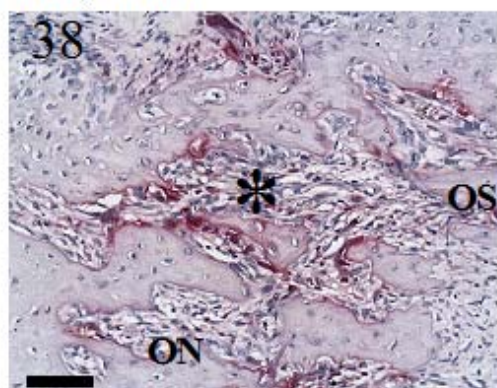
Prancha 6: Cortes transversais da mandíbula, região vestibular dos molares, figuras 36, 37, 38, 39, 40 e 41 são representativas da marcação para TRAP; ON= tecido ósseo neoformado, OS= tecido ósseo secundário, * = região central do calo, seta em preto aponta para células TRAP positivas (marcação em vermelho).



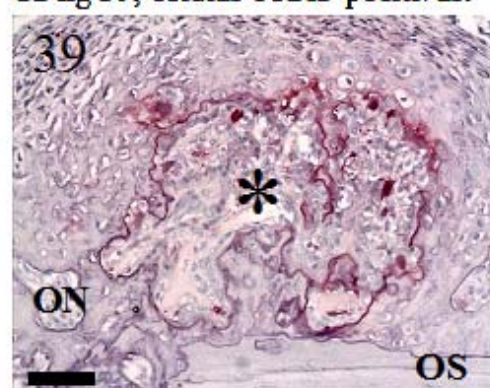
36
Controle negativo, barra=100µm, 200x, TRAP.



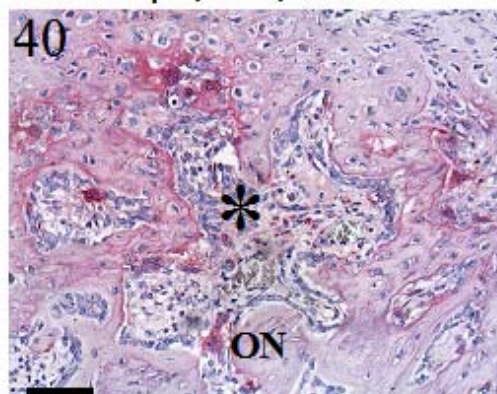
37
Grupo P14, barra=50µm, detalhe da fig 39, células TRAP positivas.



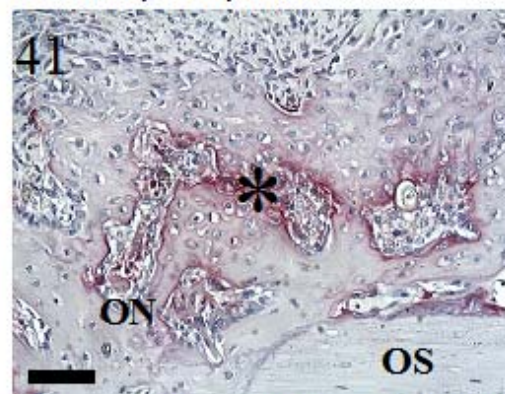
38
Grupo C14, células marcadas, barra=100µm, 200x, TRAP.



39
Grupo P14, barra=100µm, células marcadas, 200x, TRAP.



40
Grupo C21, células marcadas, barra=100µm, 200x, TRAP.



41
Grupo P21, células marcadas, barra=100µm, 200x, TRAP.

5.6 Área de cimento neoformado

O local mensurado foi previamente instrumentado cirurgicamente e posteriormente medido em duas regiões diferentes, somando uma extensão de 620µm por animal, como demonstrado nas figuras 12 e 13.

A administração de PTH (1-34) favoreceu a formação de cimento de forma significativa ($p=0,0029$; $^c5.564,10\pm293,42\mu\text{m}^2/620\mu\text{m}$ de raiz; $^b11.884,30\pm973,43\mu\text{m}^2/620\mu\text{m}$ de raiz; $^c6.421,84\pm446,87\mu\text{m}^2/620\mu\text{m}$ de raiz; $^a15.259,42\pm1.879,78\mu\text{m}^2/620\mu\text{m}$ de raiz; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente), os grupos C14 e C21 não apresentaram diferença estatística entre si, mas os grupos P14 e P21, ambos tratados com PTH (1-34) de maneira intermitente, apresentaram diferença estatisticamente significativa, como visto na figura 42 (gráfico abaixo) e na prancha 7 figuras representativas de cada grupo experimental.

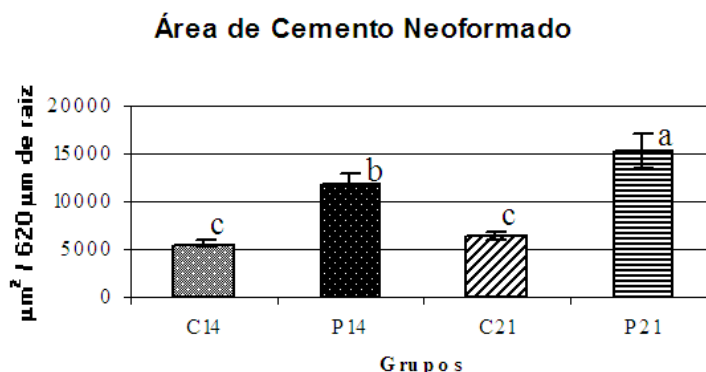
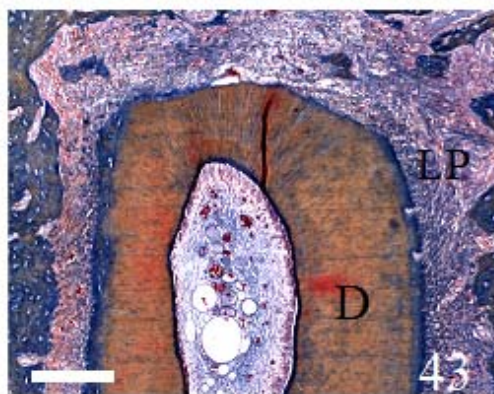


Figura 42. Gráfico representativo das médias e desvios padrões da área de cimento neoformado nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto grupos C14 e C21 ($p=0,0029$; $n=8$ animais por grupo).

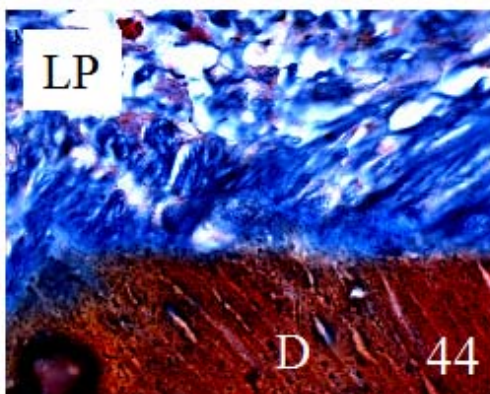
O grupo P21, o qual recebeu a administração intermitente de PTH (1-34) 3 vezes por semana, apresentou maior neoformação de cimento e demonstrou a reinserção de fibras do ligamento periodontal (figura 44, 48 e 55). O grupo P14, que recebeu a administração intermitente de PTH (1-34), também apresentou a formação de uma nova camada de cimento e as fibras do ligamento periodontal reinseridas no mesmo (Figura 46, 52 e 53).

As fibras colágenas do ligamento periodontal do grupo C14, de maneira geral, se apresentaram inseridas, mas não sobre toda a superfície instrumentada e menos organizadas (Figura 45).

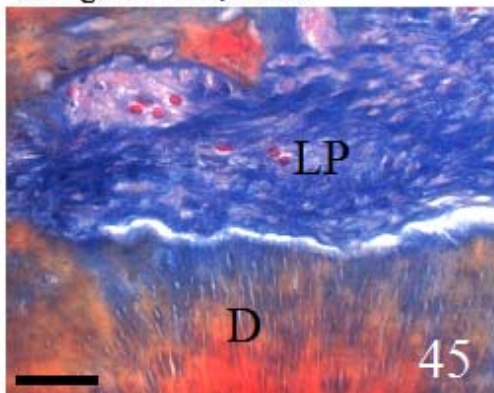
Prancha 7: Cortes transversais da mandíbula, região da superfície da raiz instrumentada, corado por tricrômio de Mallory; LP= ligamento periodontal, D= dentina, barra em preto=50µm, barra em branco=200µm seta branca demonstra a camada de cimento neoformado, seta em preto aponta para as fibras do ligamento periodontal neoformadas e reinseridas no cimento neoformado.



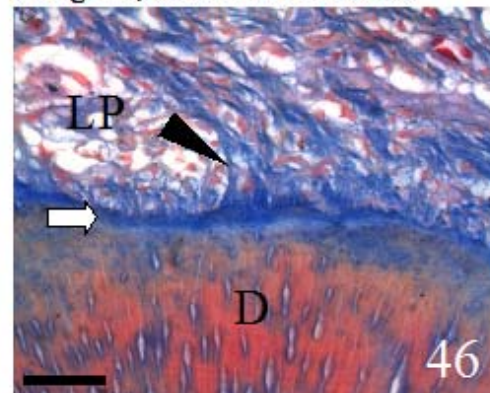
Raiz do molar, região aplainada cirurgicamente, 100x.



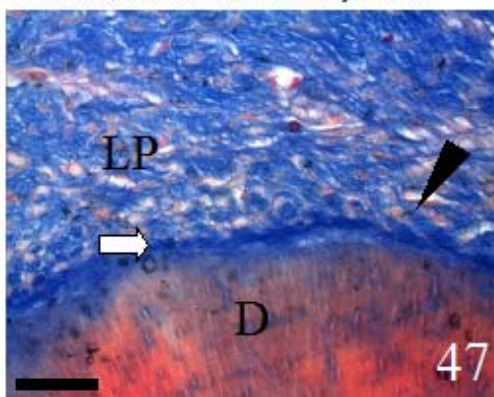
Raiz do molar, fibras em detalhe da fig. 48, aumento de 1.000x.



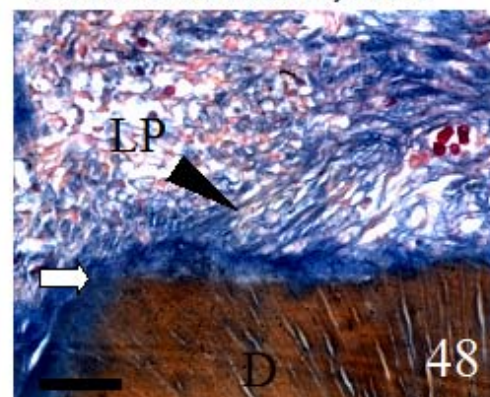
Grupo C14, pequena quantidade de cimento neoformado, 500x.



Grupo P14, reinserção das fibras e cimento neoformado, 500x.



Grupo C21, delgada camada de cimento neoformado, 500x.



Grupo P21, fibras e camada de cimento neoformado, 500x.

5.7 Análise do retardo óptico (birrefringência) do ligamento periodontal reinserido

Foi analisado se houve a reinserção das fibras do ligamento periodontal na região raspada cirurgicamente e a organização de tais fibras neoformadas (Figuras 16 e 17).

A análise do retardo óptico (birrefringência) demonstrou que ambos grupos que receberam a administração do PTH (1-34) de forma intermitente apresentaram um retardo óptico maior em relação aos grupos controles C14 e C21 ($p < 0,05$; $^b 1,97 \pm 0,22 \text{ nm}$; $^a 2,67 \pm 0,44 \text{ nm}$; $^b 2,19 \pm 0,17 \text{ nm}$; $^a 3,03 \pm 0,24 \text{ nm}$; grupos C14, P14, C21 e P21, respectivamente). Tanto nos grupos controles como nos que receberam o PTH (1-34) de forma intermitente não houve diferença estatisticamente significativa entre eles (C14 x C21 e P14 x P21), como representado na figura 49 (gráfico abaixo).

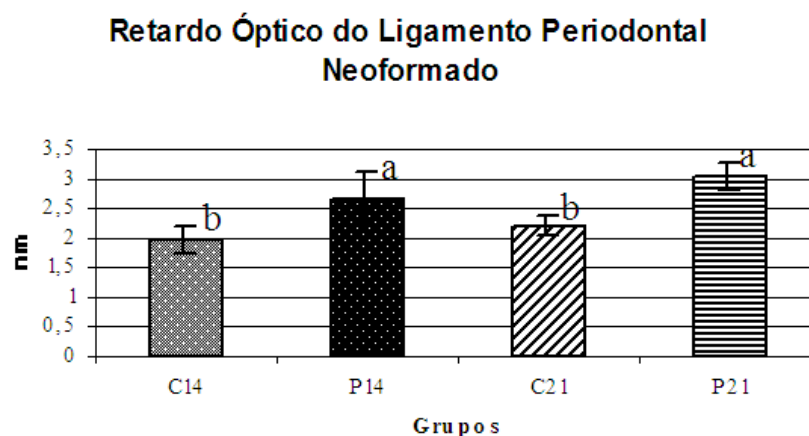
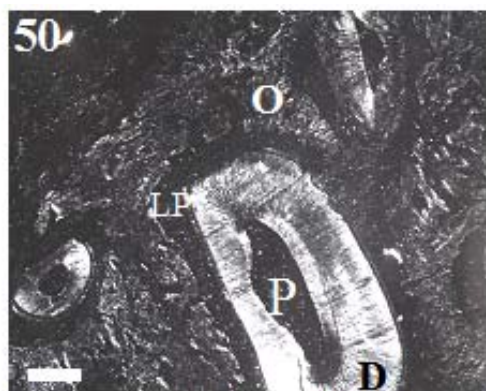


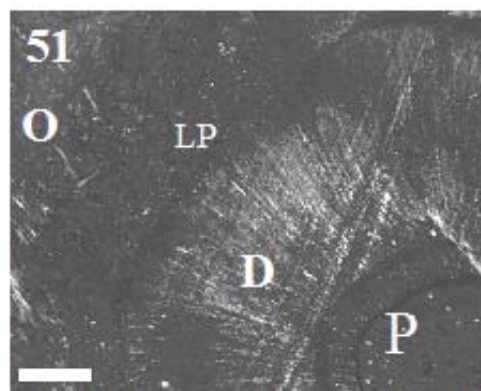
Figura 49. Gráfico representativo das médias e $\pm$ desvios padrões do retardo óptico do ligamento periodontal neoformado nos diferentes grupos experimentais, mostrando a diferença estatisticamente significativa entre os grupos controles e tratados com PTH (1-34) ($p < 0,05$; $n = 8$ animais por grupo).

As fibras do ligamento periodontal neoformadas apresentaram-se mais organizadas (maior birrefringência) nos grupos P21 (Figura 55) e P14 (Figura 52 e 53) quando comparados com os grupos C14 (Figura 51) e C21 (Figura 54).

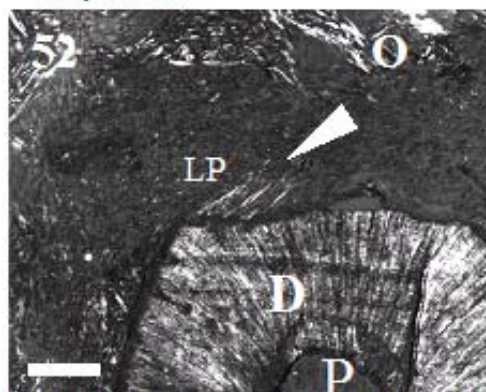
Prancha 8: cortes transversais da mandíbula observados sob luz polarizada, representam a região da superfície do cemento que foi instrumentada cirurgicamente; O= tecido ósseo, LP= ligamento periodontal, D= dentina, P= polpa; seta branca demonstra a orientação (birrefringência) das fibras neoformadas do ligamento periodontal.



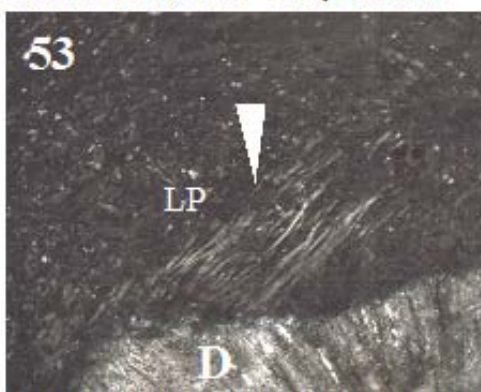
50
Região operada da mandíbula, barra = 300 μ m, 50x.



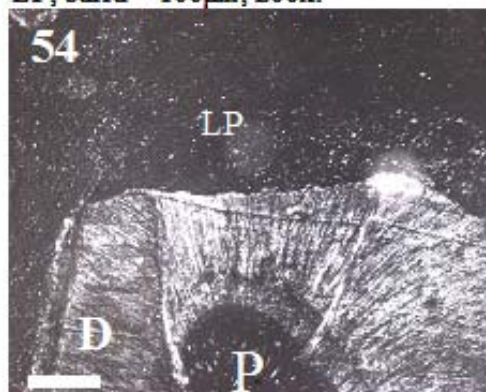
51
Grupo C14, região de neoformação de células do LP, barra = 100 μ m, 200x.



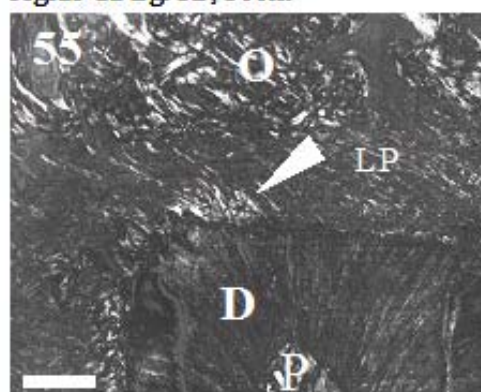
52
Grupo P14, região de neoformação do LP, barra = 100 μ m, 200x.



53
Detalhe da reinserção do LP, mesma região da fig. 52, 500x.



54
Grupo C21, região de neoformação de células do LP, barra = 100 μ m, 200x.



55
Grupo P21, birrefringência do LP neoformado, barra = 100 μ m, 200x.

6. Discussão

O fato de que a periodontite é uma das principais doenças que acometem a cavidade oral e também por ser uma doença que, em vários países do mundo, é um problema de saúde pública (Opan, 2008), explica o crescente número de pesquisas científicas relacionadas aos tecidos periodontais. Tais pesquisas envolvem buscas por um melhor conhecimento das características biológicas dos elementos do periodonto, por um entendimento dos mecanismos responsáveis pelo início e desenvolvimento da doença periodontal, e por melhores formas de recompor parte do tecido periodontal perdido.

No sentido de tentar restabelecer os tecidos periodontais diversas técnicas têm sido utilizadas como: enxertos ósseos (Reynolds *et al.*, 2003), regeneração tecidual guiada (Gottlow *et al.*, 1986) e o uso de matrizes protéicas de diferentes tecidos (King *et al.*, 1997; Kalpidis & Ruben, 2002; Giannobile & Somerman, 2003). Na tentativa de padronizar um modelo para o estudo de reparo periodontal, King *et al.* (1997) verificou que defeito do tipo fenestração na mandíbula de ratos pode ser um modelo previsível e confiável para a realização de testes de efeito de drogas, durante a cicatrização da ferida (King & Hughes 2001; Zhao *et al.*, 2004). Este tipo de modelo de defeito fenestrado tem sido utilizado tanto para a análise do comportamento do cimento (King & Hughes 2001, Zhao *et al.*, 2004; Benatti *et al.*, 2006) como também no processo de reparo do tecido ósseo (Benatti *et al.*, 2006), diante disso nos propusemos a investigar o efeito do tratamento intermitente do PTH (1-34) em tal modelo.

O presente estudo demonstrou que o tamanho inicial do defeito fenestrado produzido cirurgicamente na mandíbula de ratos apresentou dimensões que variaram de forma estatisticamente não significativa, dessa forma partindo de condições iniciais semelhantes quanto ao tamanho dos defeitos entre os grupos. Este fato é de particular importância, já que o tamanho do defeito pode influenciar na avaliação dos dados histomorfométricos realizados posteriormente sob influência do PTH.

Estudos em humanos e animais indicam que o PTH age de maneira fisiológica aumentando a concentração de cálcio no sangue, por meio da reabsorção óssea (Murrills *et al.*, 1990; Bellido *et al.*, 2003 O'Brien *et al.*, 2005), enquanto pacientes com hipoparatiroidismo, exibem redução na taxa de reabsorção óssea. Esse achado pode estar

vinculado ao fato do PTH estimular a formação de osteoclastos pela ligação com seu receptor tipo I, no osteoblasto o qual promove um aumento na produção do RANKL que se liga ao RANK na superfície de pré-osteoclastos estimulando sua diferenciação. (Rodan & Martin, 1981; Liu *et al.*, 1998; Lee & Lorenzo, 1999; Suda *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2004). A deleção distal do gene RANKL é suficiente para reduzir as taxas de reabsorção do osso, mimetizando os efeitos do hipoparatiroidismo, diminuindo a quantidade de pré-osteoclastos que são ativados a se diferenciar em osteoclastos (Galli *et al.*, 2007).

O PTH administrado de forma intermitente é conhecido por promover anabolismo ósseo (Morkey *et al.*, 1997, Mohan *et al.*, 2000; Morley *et al.*, 2001; Moriyama *et al.*, 2002; Turner, 2002) e por sua capacidade de prevenir, suspender ou reverter parcialmente os efeitos do processo de reabsorção óssea (Tam *et al.*, 1982; Pobdesk *et al.*, 1983 e Hock & Gera, 1992; Dempster *et al.*, 1993; Miller *et al.*, 1997; Morley *et al.*, 1997; Skripitz *et al.*, 2000; Bikle *et al.*, 2002; Demiralp *et al.*, 2002; Oxlund *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002).

A administração intermitente de PTH (1-34) foi capaz de acelerar o processo de reparo ósseo na mandíbula de ratos, tanto em relação à extensão do defeito remanescente (medida linear), como em relação à área do defeito remanescente. Uma das razões pode ser atribuída à ação do PTH no aumento do número de junções comunicantes do tipo GAP entre os osteoblastos (Civitelli *et al.*, 1998; Donahue *et al.*, 1995) facilitando a interação entre diversos mediadores químicos. Além disso, o PTH pode estimular a diferenciação (Schiller *et al.*, 2001) e diminuir a taxa apoptose de osteoblastos (Jilka *et al.*, 1999; Neer *et al.*, 2001; Horwitz *et al.*, 2003), o que pode favorecer a neoformação óssea.

Sabe-se que o PTH aumenta a taxa de remodelação óssea, então a massa óssea dependerá do equilíbrio entre reabsorção e neoformação do osso (Parfitt, 2005). Marques *et al.* em 2006 verificaram que ratas ovariectomizadas, ao receberem de maneira intermitente o PTH apresentaram um aumento da densidade óssea mandibular.

Outros estudos demonstraram o aumento da densidade óssea quando os animais eram tratados com o PTH de forma intermitente (Neer *et al.*, 2001 e Horwitz *et al.*, 2003), tal aumento pode ocorrer por meio da combinação no aumento da taxa de remodelação associado ao aumento na quantidade de osteóide neoformado, resultando num osso mais denso, com um trabeculado ósseo mais espesso (Hock *et al.*, 2001; Hock 2001b), além

disso, o fragmento utilizado em nosso estudo foi o (1-34) do PTH o qual se acredita ser a porção mais efetiva no acréscimo de massa óssea (Morley *et al.*, 1997, Mohan *et al.*, 2000).

O fragmento PTH (1-34), utilizado em nosso estudo, promoveu um aumento da área do calo formado, após o ato cirúrgico da criação da fenestração, possivelmente por meio da estimulação precoce de células progenitoras e aumento da osteoblastogênese na fase de remodelação do calo (Nakajima *et al.*, 2002). Como o calo formado ocorreu tanto por ossificação intramembranosa como endocondral, possivelmente o PTH atuou facilitando o recrutamento de condroblastos e condrócitos, além de promover a maturação dessas células (Kakar *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que o tratamento intermitente com o PTH fragmento (1-34), estudo realizado em tíbias de ratos adultos, foi capaz de aumentar o volume do calo em 75% (doses de 60µg/Kg de PTH) e em 99% (doses de 200µg/Kg de PTH) com 20 dias após a fratura, e num prazo de 40 dias aumentou o volume em 175% (doses de 60µg/Kg de PTH) e 72% (doses de 200µg/Kg de PTH) (Andreassen *et al.*, 1999). Em outro estudo, Holzer *et al.*, 1999, confirmaram os dados de Andreassen, com uma dose de 80µg/Kg de PTH (1-34) diários, obtiveram um aumento de volume do calo semelhantemente ao encontrado por Nakajima *et al.*, 2002; Alkhiary *et al.*, 2005 e Komatsubara *et al.*, 2005. Nossos dados corroboram com os demais, confirmando que o tratamento com o PTH pode aumentar o tamanho do calo durante o processo de reparo, apesar de utilizarmos uma dose menor, 40µg/Kg, administrados três vezes por semana e não diariamente como nos demais estudos.

As doses entre 40 e 200µg/Kg são as mais utilizadas nos trabalhos em animais, mas a administração do PTH na dose de 5 a 10µg/Kg é capaz de provocar um aumento na densidade óssea e no tamanho do calo quando comparado com animais do grupo controle (Nakajima *et al.*, 2002). A resposta ao tratamento com o PTH de forma intermitente ocorre de maneira semelhante com ratos velhos em relação a ratos novos, 21 dias após a fratura os animais apresentaram um aumento da resistência mecânica na região fraturada e um aumento no tamanho do calo (Andreassen *et al.*, 2001), demonstrando que a idade dos animais não interferiu com a capacidade do PTH em estimular essa complexa interação celular.

Nossos dados sugerem que o processo de reparação óssea foi acelerado (Fig. 30), quando comparado ao grupo que não recebeu o PTH, tanto em relação à formação do calo como em relação à reabsorção do mesmo (remodelação), demonstrada pela tendência na diminuição da área do calo mais rapidamente nos animais que foram tratados com o PTH quando comparados com os que animais que não receberam o PTH, os quais apresentavam uma tendência de aumento no tamanho do calo inversamente ao que ocorreu com os grupos tratados com o PTH.

A administração intermitente de PTH pode diminuir a expressão do gene da osteoprotegerina em osteoblastos recém diferenciados e elevar a expressão de RANKL em osteoblastos maduros acelerando a osteoclastogênese (Huang *et al.*, 2004). Nossos achados comprovam a diferença notada no trabalho de Huang *et al.*, 2004 em relação a osteoclastogênese, pois encontramos um aumento no número de osteoclastos na região do calo durante o processo de remodelação. Com a utilização da técnica de histoquímica para TRAP, que marca osteoclastos e seus precursores, notou-se a presença aumentada de osteoclastos quando utilizado o PTH de forma intermitente, o que já havia sido documentado tanto no fêmur como na região central da terceira vértebra lombar de camundongos (Reis *et al.*, 2008).

Outro fator que pode estar contribuindo com a aceleração do processo de reparo do osso ocorre durante o período de anabolismo ósseo, pelo processo de mineralização cartilagenosa que se dá mais rapidamente sob a administração intermitente do PTH (Barnes *et al.*, 2008), proporcionando maior estabilidade na área fraturada e um reparo mais rápido.

No modelo de estudo utilizado, o defeito do tipo fenestração, além de permitir analisar o reparo ósseo mandibular, permitiu estudar a neoformação do cimento, visto que o mesmo foi totalmente removido na superfície exposta pela cirurgia, na raiz distal do primeiro molar inferior, facilitando a visualização do cimento neoformado a partir daquela raiz que se encontrava aplainada.

O cimento é um tecido avascular e mineralizado que recobre toda a superfície radicular. Uma das principais funções do cimento é ancorar as fibras colágenas do ligamento periodontal à superfície radicular, exercendo um papel crucial na manutenção da oclusal e protegendo a integridade da superfície radicular (Bosshardt & Selvig, 1997).

A pré-existência do cimento é importante para que ocorra sua regeneração, considerando que o cimento é a superfície onde a inserção das fibras do ligamento periodontal deverá ocorrer, e considerando ainda que o cimento superficial é altamente quimiotático para cementoblastos (Nishimura *et al.*, 1989) e que a matriz do cimento é uma rica fonte de fatores de crescimento, que influenciam vários tipos celulares periodontais (Grzesik & Narayanan, 2002).

A existência do cimento sobre a superfície radicular pode favorecer a formação de novo cimento. Gonçalves *et al.*, 2008 induziram lesão de furca em cães e posteriormente trataram tais lesões de duas formas: primeiro grupo passou por raspagem e alisamento radicular com a remoção de tecido de granulação, cálculo e cimento, o segundo grupo sofreu polimento com ponta e taça de borracha preservando ao máximo cimento pré-existente e ambos finalmente foram submetidos à técnica de regeneração tecidual guiada. Notou-se que a preservação do cimento possibilitou melhor regeneração em espessura do mesmo, quando comparado com o grupo que sofreu sua remoção.

Sabe-se que a capacidade de regeneração espontânea do cimento é bastante limitada (Benatti *et al.*, 2006), e a neoformação de cimento pode ser conseguida com o uso de alguma técnica regenerativa específica (King *et al.*, 1997; King & Hughes, 2001; Zhao *et al.*, 2004; Laurell *et al.*, 2006).

O tratamento com o PTH (1-34) de maneira intermitente, sem a utilização de nenhuma técnica regenerativa específica e com a remoção total do cimento pré-existente, foi capaz de promover a neoformação de uma fina camada de cimento sobre a superfície previamente instrumentada da raiz distal do primeiro molar inferior.

Diferentes tipos celulares atuam nesse processo de regeneração periodontal e sabe-se que osteoblastos são fenotipicamente semelhantes a cementoblastos. Osteoblastos expressam proteínas como: osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e colágeno tipo I (COL I) e sua expressão se apresenta de maneira precocemente quando tais células são tratadas com PTH (Kondo *et al.*, 1997). Cementoblastos também expressam tais proteínas (BSP, OPN e COL I) (D'Errico *et al.*, 2000) além de expressarem o receptor tipo 1 do PTH/PTHrP (Tenorio & Hughes, 1996; D'Errico *et al.*, 2000).

Células do ligamento periodontal e cementoblastos podem responder ao tratamento com o PTH, exercendo uma função na regulação na mineralização do cimento (Ouyang *et al.*, 2000). Trabalhos mostram que a PTHrP, peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide, o qual é homólogo ao PTH em sua região amino-terminal, em que 8 dos 13 primeiros aminoácidos são idênticos e têm capacidade de se ligar ao receptor do PTH, influencia no balanço entre a produção de OPG e RANKL pelos cementoblastos, podendo interferir no processo de cementogênese e osteoclastogênese (Boabaid *et al.*, 2004).

Cementoblastos em cultura expressaram níveis elevados de cAMP quando estimulados pela PTHrP, além de expressarem quantidades menores de BSP e OCN, e ainda impedem a mineralização mediada por cementoblastos (Ouyang *et al.*, 2000A).

A quantidade de neoformação de cimento observada em nosso experimento foi semelhante em espessura ao trabalho de Huang *et al.*, 2005 quando comparamos o grupo que recebeu PTH por 21 dias com o grupo que passou pelo processo de regeneração tecidual guiada associado a uma esponja com BMP-6 por 28 dias, onde utilizou o mesmo modelo em ratos.

O cimento é o tecido que une o dente ao osso, por meio das fibras do ligamento periodontal, essas fibras são compostas principalmente por colágeno do tipo I (Yamauchi *et al.*, 1986; Sodek & Ferrier, 1988). Tais fibras são compostas por fibrilas menores com extensão de aproximadamente 67nm e apresentam uma periodicidade de 500nm dependendo do estágio de desenvolvimento e maturação, tais fibrilas se encontram organizadas tridimensionalmente (Canty & Kadler, 2005). Essa organização possibilita seu estudo por meio da birrefringência. A birrefringência é um fenômeno que ocorre quando a luz passa através de certas substâncias como cristais ou estruturas orientadas como o colágeno do ligamento periodontal (Vilarta & Vidahl, 1989) fazendo com que a luz seja dividida, de modo que saem dois raios luminosos derivados de apenas um raio (essas substâncias têm dois índices de refração, ou seja, são birrefringentes).

Análises de birrefringência têm sido realizadas como um método eficiente para o estudo da orientação macromolecular e a organização do colágeno (Wolman & Kasten, 1986; Whittaker *et al.*, 1988; Vilarta & Vidahl, 1989). Utilizou-se a microscopia de luz polarizada para verificar a reinserção de novas fibras de ligamento periodontal sobre a região de cimento previamente removida. A demonstração de reinserção destas fibras

permite a afirmação da existência de novo cimento formado. Semelhante ao que Laurell *et al.*, 2006 haviam encontrado também sob microscopia de luz polarizada, mas com o tratamento utilizando a técnica de regeneração tecidual guiada e em macacos.

Nossos dados sugerem que fibras do ligamento se apresentaram reinseridas sobre o novo cimento, além de estarem mais organizadas nessa região analisada, pois se encontrou maior valor de retardo óptico em relação ao grupo que não havia recebido o tratamento com o PTH.

Sabe-se que o PTH tem a capacidade de aumentar a proliferação de células do ligamento periodontal, que sintetizam parte das fibras colágenas, além de inibir a apoptose de tais células *in vitro* (Lossdörfer *et al.*, 2006).

Em relação ao ligamento periodontal reinserido na região instrumentada não se têm informações sobre a influência do PTH sobre tal superfície, restringindo-se aos nossos dados, que sugerem que o PTH influencia positivamente a neoformação de cimento, facilitando a reinserção e uma maior organização das mesmas sobre o cimento neoformado.

Os resultados desse estudo contribuem para melhorar o entendimento sobre o efeito do PTH administrado de forma intermitente sobre o tecido ósseo e os tecidos periodontais, e abrem portas para outros, no qual o tratamento com o PTH pode potencialmente vir a ser utilizado no processo de regeneração periodontal ou tratamento de distúrbios mandibulares do tecido ósseo.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os animais que receberam o tratamento intermitente com PTH (1-34) favoreceram:

- 1) Maior formação de calo, maior densidade do osso neoformado e aceleração do processo de reparo ósseo mandibular;
- 2) Maior organização das fibras do ligamento periodontal reinseridas sobre o cimento neoformado;
- 3) Maior neoformação de cimento sobre a raiz distal do primeiro molar inferior na qual o cimento foi previamente removido.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaboe M, Pinholt EM, Hjørting-Hansen E. Healing of experimentally created defects: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1995; 33(5):312-8. Review.

Aarts MM, Rix A, Guo J. The nucleolar targeting signal (NTS) of parathyroid hormone-related protein mediates endocytosis and nucleolar translocation. *J Bone Miner Res*. 1999; 14:1493-1503.

Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, *et al*. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. *PNAS*. 1992; 89: 2732–2736.

Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*. 2002; 12(9):107R-16. Review.

Andreassen TT, Ejersted C, Oxlund H. Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. *J Bone Miner Res*. 1999;14(6):960-8.

Andreassen TT, Fledelius C, Ejersted C, Oxlund H. Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone. *Acta Orthop Scand*. 2001;72:304-7.

Andreassen TT, Willick 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):351-6.

Alberts B. Weaver ME, Shore RC., *Biologia Molecular da Célula*, 3.ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.

Amling M, Neff L, Tanaka S, *et al*. Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol*. 1997; 136: 205-213.

Aurbach GD. Isolation of parathyroid hormone after extraction with phenol. *Journal of Biological Chemistry*. 1959; 234: 3179–3181.

Barros SP, Silva MA, Somerman MJ, Nociti FH Jr. Parathyroid hormone protects against periodontitis-associated bone loss. *J Dent Res*. 2003; 82(10): 791-5.

Barnes GL, Kakar S, Vora S, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Stimulation of fracture-healing with systemic intermittent parathyroid hormone treatment. *J Bone Joint Surg Am*. 2008; 90 Suppl 1:120-7.

Bella J, Brodsky B, Berman HM.. Hydration structure of a collagen peptide. *Structure* 1995; 3, 893-906.

Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, *et al*. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced antiapoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem*. 2003; 278: 50259–50272.

Benatti BB. Influência da inalação da fumaça de cigarro e da administração de nicotina sobre a regeneração periodontal espontânea. Estudo histológico em ratos [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Benatti BB, Neto JB, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Periodontal healing may be affected by aging: a histologic study in rats. *J Periodontal Res*. 2006; 41(4): 329-33.

Berkovitz BK, Weaver ME, Shore RC, Moxham BJ. Fibril diameters in the extracellular matrix of the periodontal connective tissues of the rat. *Connect Tissue Res*. 1981; 8(2): 127-32.

Berkovitz BK. The structure of the periodontal ligament: an update. *Eur J Orthod*. 1990; 12(1): 51-76. Review.

Berkovitz BK, Moxham BJ. The development of the periodontal ligament with special reference to collagen fibre ontogeny. *J Biol Buccale*. 1990; 18(3): 227-36.

Berkovitz KB, Holland GR, MoxhamBJ. Periodontal Ligament. In: Oral anatomy, histology and embriology. 3th ed. Philadelphia, Mosby, p180-204, 2003.

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; (6053): 516-8.

Bikle DD, Sakata T, Leary C, Elalieh H, Ginzinger D, Rosen CJ, Beamer W, Majumdar S, Halloran BP. Insulin-like growth factor I is required for the anabolic actions of parathyroid hormone on mouse bone. *J Bone Miner Res*. 2002; 17(9): 1570-8.

Birk DE, Southern JF, Zycband EI, Fallon JT, Trelstad RL. Collagen fibril bundles: a branching assembly unit in tendon morphogenesis. *Development*. 1989; 107(3): 437-43.

Boabaid F, Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK. Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, *et al*. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone micro

architecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 1846-53.

Boabaid F, Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK. The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. *J Periodontol*. 2004; 75(9): 1247-54.

Boot-Handford RP, Tuckwell, DS, Plumb DA, Rock CF, Poulosom, R. A novel and highly conserved collagen [pro(alpha)1(XXVII)] with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *J. Biol. Chem*. 2003; 278: 31067-31077.

Boothby WM. The parathyroid glands: a review of the literature. *Endocrinology*. 1921; 5 403–440.

Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec*. 1996; 245(2): 267-92. Review.

Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997 Feb;13:41-75. Review.

Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 87-105.

Bowling K, Rygh P. A quantitative study of oxytalan fibres in the transseptal region and tension zones of rat molars following orthodontic movement. *Eur J Orthod*. 1988 ; 10(1): 13-26.

Brewer HB Jr & Ronan R. Bovine parathyroid hormone: amino acid sequence. *PNAS*. 1970; 67: 1862–1869.

Brewer HB Jr, Fairwell T, Ronan R, Sizemore GW & Arnaud CD. Human parathyroid hormone: amino acid sequence of the amino-terminal residues 1–34. *PNAS*. 1972; 69 3585–3588.

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): 157-65.

Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM, *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.

Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. *J Clin Invest.* 1989 ; 83(1): 60-5.

Cho MI, Garant PR. Radioautographic study of [3H]mannose utilization during cementoblast differentiation, formation of acellular cementum, and development of periodontal ligament principal fibers. *Anat Rec.* 1989; 223(2): 209-22.

Collip JB. The extraction of a parathyroid hormone which will prevent or control parathyroid tetany and which regulates the level of blood calcium. *Journal of Biological Chemistry.* 1925; (63): 395-438.

Cormish J, Callon KE, Lin C. Stimulation of osteoblast proliferation by C-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein. *J Bone Miner Res.* 1999;14: 915-922.

Cortellini P, Bowers GM. Periodontal Regeneration of intrabony defects: an evidence-based treatment approach. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 1995; 15: 129-145.

Craig A, Birtles M, Conway J, Parry D. An estimate of the mean length of collagen fibrils in rat tail-tendon as a function of age. *Connect. Tissue Res.* 1989; 19, 51-62.

Dastmalchi R, Polson A, Bouwsma O, Proskin H.J. Cementum thickness and mesial drift. *Clin Periodontol.* 1990; 17(10): 709-13.

Davis JM, Boswell BA, Bachinger HP. Thermal stability and folding of type IV procollagen and effect of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase on the folding of the triple helix. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 8956-8962.

D'Errico JA, Berry JE, Ouyang H, Strayhorn CL, Windle JJ, Somerman MJ. Employing a transgenic animal model to obtain cementoblasts in vitro. *J Periodontol.* 2000; 71(1): 63-72.

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): 4038-47.

Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, Shane E, Plavetić K, Müller R, Bilezikian J, Lindsay R. 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): 1846-53.

Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol.* 2001; 45(5-6): 695-706.

Douglas CR, Tratado de fisiologia aplicada às ciências da saúde. 5ed. São Paulo: Robe 1994.

Erdheim J.. Beiträge zur pathologischen anatomie der menschlichen epithel-körperchen. Zeitschrift für Heilkunst. 1904; 25 1–15.

Erdheim J. Ueber tetania parathyreopriva. Wiener Klinische Wochenschrift. 1906; 19 716–717.

Fleischmajer R, Perlsh JS, Timpl R, Olsen BR. Procollagen intermediates during tendon fibrillogenesis. J. Histochem. Cytochem. 1988; 36: 1425-1432

Frank C, *et al.*, Electron microscopic quantification of collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament: a baseline for comparison. Conn Tiss Res. 1989, 19: 11-25.

Galli C, Zella LA, Fretz JA, Fu Q, Pike JW, *et al.*; Targeted deletion of a distant transcriptional enhancer of the RANKL gene reduces bone remodeling and increases bone mass. Endocrinology. 2007; 149: 146–153.

Gallien-Lartigue O, Carrez D. In vitro induction of the S phase in multipotent stem cells of bone marrow by parathyroid hormone. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 1974;278:1765-1768

Galliera E, Locati M, Mantovani A, Corsi MM. Chemokines and bone remodeling. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008; 21(3): 485-92.

Gardella TJ, Jüppner H. Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. Trends Endocrinol Metab. 2001; 12(5): 210-7. Review.

Gerstenfeld LC, Wronski TJ, Hollinger JO, Einhorn TA. Application of histomorphometric methods to the study of bone repair. J Bone Miner Res. 2005; 20(10): 1715-22.

Giannobile WV, Somerman MJ. Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing. A systematic review. Annals of Periodontology. 2003; 8: 193-204.

Gley E. Sur la toxicité des urines des chiens thyroïdectomisés: contribution à l'étude des fonctions du corps thyroïde. Comptes Rendus de la Société de Biologie. 1891; 3: 366–368.

Gonçalves PF, Lima LL, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr, Hock JM, Krishnan V, Onyia JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. J Bone Miner Res. 2001;16: 975-84.

Gonçalves PF. Efeito do cimento dental na regeneração periodontal. Um estudo histomorfométrico em cães [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2006.

Gonçalves PF, Lima LL, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. Root cementum may modulate gene expression during periodontal regeneration: a preliminary study in humans. J Periodontol. 2008; 79(2): 323-31.

Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *Journal of Clinical Periodontology* 1986;13: 604-616.

Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature*. 1983; 24-30;306(5941): 378-80.

Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002; 13(6): 474-84. Review.

Guimarães SAC. Processo de reparo. *Patologia básica da cavidade bucal*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

Habener JF, Rosenblatt M, Potts Jr JT. Parathyroid Hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol. Rev*. 1984; 64: 985-1053.

Ham AW, Harris WR. Repair and transplantation. In: Bourne, G.H. 4ed. *Biochemistry and physiology of bone*. New York: Academic Press, 1971.

Hammarström L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997; 24(9 Pt 2): 658-68. Review.

Hanson AM. The hydrochloric X a parathyroid preparation for intramuscular injection. *Military Surgery*. 1924; 259: 218-219.

Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report. *Journal of Clinical Periodontology*. 1997; 24: 693-696.

Hendershot LM, Bulleid NJ. Protein-specific chaperones: the role of hsp47 begins to gel. *Curr. Biol*. 2000. 10: R912-R915.

Hendy GN, Kronenberg HM, Potts JT Jr, Rich A. Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981; 78(12): 7365-9.

Hirschberg K, Miller CM, Ellenberg J, Presley JF, Siggia ED, Phair RD, Lippincott-Schwartz J. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J Cell Biol*. 1998; 14;143(6): 1485-503.

Ho SP, Sulyanto RM, Marshall SJ, Marshall GW. The cementum-dentin junction also contains glycosaminoglycans and collagen fibrils. *J Struct Biol*. 2005; 151(1): 69-78.

Hock JM, 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.

Hock JM. Anabolic actions of PTH in the skeletons of animals. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2001; (2): 33-47.

Hodsman AB, Kisiel M, Adachi JD, Fraher LJ, Watson PH. Histomorfometric Evidence for increased bone turnover without change in cortical thickness or porosity after 2 years of cyclic hPTH(1-34) therapy in woman with severe osteoporosis. *Bone.* 2000; (27): 311-8.

Holmes DF, Chapman JA, Prockop DJ, Kadler KE. Growing tips of type I collagen fibrils formed in vitro are near-paraboloidal in shape, implying a reciprocal relationship between accretion and diameter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 9855-9859.

Holmes DF, Graham HK, Kadler KE. Collagen fibrils forming in developing tendon show an early and abrupt limitation in diameter at the growing tips. *J. Mol. Biol.* 1998; (283): 1049-1058.

Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocana A, Stewart AF. Short-term, highdose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88: 569-575.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bilke DD, *et al.* PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004;19: 235–44.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. Parathyroid hormone differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 235–244.

Huang KK, Shen C, Chiang CY, Hsieh YD, Fu E. Effects of bone morphogenetic protein-6 on periodontal wound healing in a fenestration defect of rats. *J Periodontal Res.* 2005; 40(1): 1-10.

Hupp JR, Reparação de feridas. In: Peterson LJ. *Cirurgia oral e maxillofacial contemporânea.* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

Islam MN, Yamamoto T, Wakita M. Light and electron microscopic study of the initial attachment of principal fibers to the alveolar bone surface in rat molars. *J Periodontal Res.* 2000; 35(6): 344-51.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1999; 104: 439–446

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 8ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica.* 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Jüppner H, Abou-Samra AB, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. 1991; 254: 1024–1026.

Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I. Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodontal Res*. 1997; 32(3): 273-8.

Kakar S, Einhorn TA, Vora S, Miara LJ, Hon G, Wigner NA, Toben D, Jacobsen KA, Al-Sebaei MO, Song M, Trackman PC, Morgan EF, Gerstenfeld LC, Barnes GL. Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(12): 1903-12.

Kalpidis CDR, Ruben MP. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *Journal of Periodontology* 2002; 73: 1360-1376.

Kanaori K, Takai M, Nosaka AY. Comparative study of chicken and human parathyroid hormone-(1-34)-peptides in solution with SDS. *Eur J Biochem*. 1997; 249(3): 878-85.

Karaplis AC, Deckelbaum RA. Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development. *Front Biosci*. 1998; 1;3: d795-803.

Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*. 1980; 7(2): 96-105.

Karsenty G. The complexities of skeletal biology. *Nature* 2003; 423: 316-318.

Keene DR, San Antonio JD, Mayne R, McQuillan DJ, Sarris G, Santoro SA, Iozzo RV. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem*. 2000; 275(29): 21801-4.

Keutmann HT, Sauer MM, Hendy GN, O’Riordan LH & Potts JT Jr. The complete amino acid sequence of human parathyroid hormone. *Biochemistry*. 1978; 17: 5723–5729.

Khosla S, Johansen KL, Ory SJ, O’Brien PC, Kao PC. Parathyroid Hormone-related peptide in lactation and umbilical cord blood. *Mayo Clin. Proc.*, v. 65, p. 1408-14, 1990.

King GN, King N, Cruchley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 1997; 76(8): 1460-70.

Kneissel M, Boyde A, Gasser JA. Bone tissue and its mineralization in aged estrogen-depleted rats after long-term intermittent treatment with parathyroid hormone (PTH) analog SDZ PTS 893 or human PTH(1-34). *Bone*. 2001; 28: 237-250.

Koch WF. On the occurrence of methyl guanidine in the urine of parathyroidectomized animals. *Journal of Biological Chemistry*. 1912; 12: 313–315.

Komatsu K, Mosekilde L, Viidik A, Chiba M, Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999; 140: 3552–3561.

Kondo H, Ohyama T, Ohya K, Kasugai S. Temporal changes of mRNA expression of matrix proteins and parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein (PTH/PTHrP) receptor in bone development. *J Bone Miner Res*. 1997; 12(12): 2089-97.

Kornman KS, Robertson PB. Fundamental principles affecting the outcomes of therapy for osseous lesions. *Periodontol 2000*. 2000; 22: 22-43.

Krane SM. Identifying genes that regulate bone remodeling as potential therapeutic targets. *J Exp Med*. 2005; 201: 841-843.

Kronenberg HM, McDevitt BE, Majzoub JA, Nathans J, Sharp PA, Potts JT Jr, Rich A. Cloning and nucleotide sequence of DNA coding for bovine preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(10): 4981-5.

Kummar V, Cotran RS, Robbins SL. *Patologia básica*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

Laurell L, Bose M, Graziani F, Tonetti M, Berglundh T. The structure of periodontal tissues formed following guided tissue regeneration therapy of intra-bony defects in the monkey. *J Clin Periodontol*. 2006; 33(8): 596-603.

Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am*. 1987; 18(2): 213-25

Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999; 140: 3552–61.

Lees JF, Tasab M, Bulleid NJ. Identification of the molecular recognition sequence which determines the type-specific assembly of procollagen. *EMBO J*. 1997; 16(5): 908-16.

LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002; (395): 81-98.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica*. 2ed. São Paulo: Sarvier, 1995).

Lekic P, McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*. 1996; 245(2): 327-41. Review.

Lepert D, Waubant E, Galaray R, Brunnet NW, Hauser SL. T Cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol*, 1995; 154: 4379-4389.

Liu BY, Guo J, Lanske B, Divieti P, Kronenberg HM, Bringhurst FR. Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*. 1998; 139: 1952–1964.

Lorenzo JA. The role of cytokines in the regulation of local bone resorption. *Crit Rev Immunol*. 1991; 11(3-4): 195-213. Review.

Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. PTH(1– 34) affects OPG production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res*. 2005; 84: 634–638.

Lossdorfer S, Stier S, Gotz W, Jager A. Maturation-state dependent response of human periodontal ligament cells to an intermittent parathyroid hormone exposure in vitro. *J Periodont Res*. 2006; 41: 62– 72.

Lukes A, Mun-Bryce S, Lukes M, Rosenberg GA. Extracellular matrix degradation by metalloproteinase inhibitors. *Ann Neurol*, 1999; 44: 35-46.

MacCallum WG & Voegtlin C. On the relation of the parathyroid to calcium metabolism and the nature of tetany. *Johns Hopkins Hospital Bulletin* . 1908; 19: 91–92.

MacCallum WG. The seat of action in tetany after parathyroidectomy. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1911; 9: 23–24.

MacCallum WG & Vogel KM. Further experimental studies in tetany. *Journal of Experimental Medicine*. 1913; 28: 618–650.

Mackie EJ. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1301-1305.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000; 21: 115-137.

Marques MR. Efeito da administração intermitente de PTH na periodontite induzida em ratas com deficiência de estrogênio [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2004.

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): 421-9.

Marques MR. Avaliação do efeito do PTH nas citocinas IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, nas metaloproteinases da matriz 2 e 9, e na atividade osteoclástica em ratos com periodontite induzida [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2007.

Martins GL. Estudo microscópico do reparo ósseo na mandíbula de ratos submetida a ostectomias a fresa cirúrgica e laser de Er:YAG [Dissertação]. Porto Alegre: UFRS; 2001.

McCauley LK, Koh AJ, Beecher CA, Cui Y, Rosol TJ, Franceschi RTPTH/PTHrP receptor is temporally regulated during osteoblast differentiation and is associated with collagen synthesis. J Cell Biochem. 1996; 61(4): 638-47.

McCauley LK, Somerman MJ. Biologic modifiers in periodontal regeneration. Dent Clin North Am. 1998; 42(2): 361-87. Review.

McCulloch CA, Melcher AH. Cell migration in the periodontal ligament of mice. J Periodontal Res. 1983; 18(4): 339-52.

MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. J Periodontal Res. 1993; 28(6 Pt 2): 550-9. Review.

MacNeil RL, D'Errico JA, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ. Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? Eur J Oral Sci. 1998 ; 106 Suppl 1: 350-6.

Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol. 1976; 47(5): 256-60. Review.

Mellonig JT. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: Technique and clinical and histologic case report. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry 1999;19:9-19.

Meulman T, Rodrigues T, Vasconcelos DFP, Benatti BB, Nociti Jr FH. Wound healing in fenestration type defects in rats. Sobrepe (*in press*).

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): 1471-6.

Minor RR. Collagen metabolism. An J Pathol, 1988; 98: 255.

Mohan S, Kutilek S, Zhang C, Shen HG, Kodama Y, Srivastava AK, Wergedal JE, Beamer WG, Baylink DJ. Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice. Bone. 2000; 27(4): 471-8.

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Anabolic effects of parathyroid hormone on bone. Trends Endocrinol Metab. 1997; 8(6): 225-31.

Moriyama I, Iwamoto J, Takeda T, Toyama Y.J. 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. *Orthop Sci.* 2002; 7(3): 379-85.

Murrills RJ, Stein LS, Fey CP, Dempster DW. The effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on osteoclast resorption of bone slices in vitro: an analysis of pit size and the resorption focus. *Endocrinology.* 1990; 127: 2648–2653

Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* 2003; 22: 15-24.

Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, Yamazaki M. Mechanisms for enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 2038-2047.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001; 344(19): 1434-41.

Niall HD, Keutmann HT, Sauer RT, Hogan M, Dawson B, Aurbach G & Potts J Jr. The amino acid sequence of bovine parathyroid hormone I. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1970; 351 1586–1588.

Niall HD, Sauer RT, Jacobs JW, Keutman HT, Segre GV, O'Riordan JL, Aurbach GD & Potts JT Jr. The amino acid sequence of the amino-terminal 37 residues of human parathyroid hormone. *PNAS.* 1974; 71 384–388.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol.* 2000; 71(9): 1460-4.

Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Tramontina VA, Machado MA, Barros SP, Sallum EA, Sallum AW. Histometric evaluation of the effect of nicotine administration on periodontal breakdown: an in vivo study. *J Periodontal Res.* 2001; 36(6): 361-6.

Nohutcu RM, Somerman MJ, McCauley LK. Dexamethasone enhances the effects of parathyroid hormone on human periodontal ligament cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1995 ; 56(6): 571-7.

Nyman S, Karring T, Lindhe J, Plantén S. Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J Clin Periodontol.* 1980; 7(5): 394-401.

O'Brien CA, Jilka RL, Fu Q, Stewart S, Weinstein RS, Manolagas SC. IL- 6 is not required for parathyroid hormone stimulation of RANKL expression, osteoclast formation, and bone loss in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 289: E784–E793.

Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Perrelet A, Powell SK, Quinn DL, Moore HP. The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. *Cell*. 1987; 51(6): 1039-51.

Organização Pan-Americana de Saúde. *Saúde Bucal*, disponível em <http://www.opas.org.br/mostrant.cfm?codigodest=41>, 2008 (última visita em setembro de 2008).

Ouyang H, McCauley LK, Berry JE, D'Errico JA, Strayhorn CL, Somerman MJ, Pfeilschifter J, Mundy GR. Modulation of type b transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci*. 1987; 84: 2024–2028.

Ouyang H, McCauley LK, Berry JE, Saygin NE, Tokiyasu Y, Somerman MJ. Parathyroid hormone-related protein regulates extracellular matrix gene expression in cementoblasts and inhibits cementoblast-mediated mineralization in vitro. *J Bone Miner Res*. 2000a ; 15(11): 2140-53.

Ouyang H, McCauley L, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Somerman M. Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone related protein in vitro. *Arch Oral Biol*. 2000b; 45: 293–303.

Ouyang H, Franceschi RT, McCauley LK, Wang D, Somerman MJ. Parathyroid hormone-related protein down-regulates bone sialoprotein gene expression in cementoblasts: role of the protein kinase A pathway. *Endocrinology*. 2000c; 141(12): 4671-80.

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): 431-8.

Paynter KJ & Pudy G. A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat. Rec*. 1958; 131: 233-252.

Parfitt AM. Modeling and remodeling: how bone cells work together. In: Feldman D, Pike JW, Glorieux FH, eds. *Vitamin D*. New York: Elsevier Academic Press. pp 497–513, 2005.

Paton DN, Findlay L & Burns D. On guanidine or methylguanidin as a toxic agent in the tetany following parathyroidectomy. *Journal of Physiology*. 1914–1915; 49 17–18.

Perris AD, MacManus JP, Whitfield JF. Parathyroid glands and mitotic stimulation in rat bone marrow after hemorrhage. *Am J Physiol*. 1971;220:773-778.

Pitaru S, McCulloch CA, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodontal Res*. 1994 ; 29(2): 81-94. Review.

Podbesek R, Edouard C, Meunier PJ, Parsons JA, Reeve J, Stevenson RW, Zanelli JM. 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): 1000-6.

Polarized light microscopic analyses of collagen fibers in the rat incisor periodontal ligament in relation to areas, regions, and ages. *Anat Rec*. 2002; 268(4): 381-7.

Potts JT Jr, Tregear GW, Keutmann HT, Niall HD, Sauer R, Deftos LJ, Dawson BF, Hogan ML & Aurbach GD. Synthesis of a biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of parathyroid hormone. *PNAS*. 1971; 68 63–67

Potts JT Jr & Jüppner H. Parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in calcium homeostasis, bone metabolism, and bone development: the proteins, their genes, and receptors. In: *Metabolic Bone Disease*, edited by L. V. Avioli, and S. M. Krane. New York: Academic, p. 51-94;1997.

Presley JF, Cole NB, Schroer TA, Hirschberg K, Zaal KJ, Lippincott-Schwartz J. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature*. 1997; 389(6646): 81-5.

Pritchard JJ. Bone healing. *Sci. Basis Med. Annu. Rev. London*, 1963.

Puzas JE, Hicks DG, Reynolds SD, O'Keefe RJ. Regulation of osteoclastic activity in infection. *Methods Enzymol*. 1994; 236: 47-58.

Ramalho LTO. Estudo histomorfométrico do ligamento periodontal de incisivos de ratos em erupção impedida e desimpedida [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 1994.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003; 8: 227-265.

Reis LM, Kessler CB, Adams DJ, Lorenzo J, Jorgetti V, Delany AM,. Accentuated osteoclastic response to parathyroid hormone undermines bone mass acquisition in osteonectin-null mice. *Bone*. 2008; 264–273.

Response of immortalized murine cementoblasts/periodontal ligament cells to parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein in vitro. *Arch Oral Biol*. 2000; 45(4): 293-303.

Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL, Gunsolley JC. The efficacy of bone replacement grafts in the treatment of periodontal osseous defects. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003; 8: 227-265.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. *Calcif Tissue Int*. 1981; 33: 349–351.

Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ. Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts. *J Periodontol*. 2000a ; 71(10): 1591-600.

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000*. 2000b; 24: 73-98. Review.

Sauer RT, Niall HD, Hogan ML, Keutmann HT, O’Riordan JL & Potts JT Jr. The amino acid sequence of porcine parathyroid hormone. *Biochemistry*. 1974; 13: 1994–1999.

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ. Molecular and cell biology of cementum. *Periodontol 2000*. 2000; 24: 73-98. Review.

Schenk RK, Willenegger H. Morphological findings in primary fracture healing. *Simp Biol Hung*. 1967, 17: 75-82.

Schilling T et al., Influence of inflammation mediated osteopenia on the regional acceleratory phenomenon and the systemic acceleratory phenomenon during healing of a bone defect in the rat. *Calcif. Tissue Int*. 1998, 7: 160-166.

Schroeder HE. The Periodontium. In *Handbook of Microscopic Anatomy* (Ed. A. Oksche and L. Vollrath). Springer-Verlag, Berlin, pp. 23-128; 1986.

Schroeder HE, Scherle WF. Cemento-enamel junction--revisited. *J Periodontal Res*. 1988 ; 23(1): 53-9.

Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8 Suppl): 106-16.

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): 472-8.

Seeman E, Delmas PD. Reconstructing the skeleton with intermittent parathyroid hormone. *Trends Endocrinol*. 2001; 12: 281-3.

Silva MAD. Influência da administração intermitente de hormônio paratireoideo na taxa de erupção em incisivos e na evolução da doença periodontal induzida em molares de ratos [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2002.

Silva MAD. Influência da administração intermitente de hormônio paratireoideo humano fragmento (1-34) nas fibras de sharpey da face lingual do alvéolo de incisivos inferiores e na ultraestrutura dos hepatócitos de ratos. [Tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Silva MAJ. Estudo morfométrico dos compartimentos de várias regiões do ligamento periodontal de incisivos de ratos em condições de erupção alterada pelo desimpedimento e pela vimblastina. [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 1997.

Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Cicatrização de feridas bucais. Tratado de patologia bucal. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008; 15: 53-76. Review.

Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand*. 2000; 71(6): 619-24.

Swarthout JT, Doggett 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; 276(10): 7586-92. Epub 2000.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*. 2002; 282: 1-17.

Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol* 2003; 4: 222.

Strewler GJ, Nissenson RA. Parathyroid Hormone - Related protein. *Primer on the Metabolic and Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2ª Ed. Favus, v.12, p. 61-3, 1993.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families [In Process Citation]. *EndocrRev*. 1999; 20: 345-357.

Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall EH, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jagger H, Rodda CD, Kemp BE, Rodrigues H, Chen EY, Hudson PJ, Martin TJ, Wood WIA. Parathyroid Hormone - Related protein implicated in malignant hypercalcemia: Cloning and Expression. *Science*, 1987; 237, 893-6.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89: 309-319.

Siqueira Jr JF, Dantas CJS, Reparação tecidual: aspectos biodinâmicos. *Mecanismos celulares e moleculares da inflamação*. Rio de Janeiro: Medsi, 2000.

Takano-Yamamoto T, Takemura T, Kitamura Y, Nomura S. Site-specific expression of mRNAs for osteonectin, osteocalcin, and osteopontin revealed by in situ hybridization in rat periodontal ligament during physiological tooth movement. *J Histochem Cytochem*. 1994; 42(7): 885-96.

Tam CS, Heersche 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): 506-12.

Ten Cate AR. *Histologia Bucal*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 101-122. 2001.

Tenorio D, Hughes FJ. An immunohistochemical investigation of the expression of parathyroid hormone receptors in rat cementoblasts. *Arch Oral Biol*. 1996; 41(3): 299-305.

Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption by rat osteoclasts. *J Exp Med*. 1986; 164(1): 104-12.

Tong L, Buchman SR.J. Facial bone grafts: Contemporary science and thought. *Craniofac Trauma*. 2000; 6(1): 31-41.

Tonoki H, Narahara K, Matsumoto T, Niikawa N. Regional mapping of the parathyroid hormone gene (PTH) by cytogenetic and molecular studies. *Cytogenet Cell Genet*. 1991; 56(2): 103-4.

Tregear GW, van Rietschoten J, Greene E, Keutmann HT, Niall HD, Reit B, Parsons JA & Potts JT Jr. Bovine parathyroid hormone: minimum chain length of synthetic peptide required for biological activity. *Endocrinology*. 1973; 93: 1349–1353.

Tregear GW, van Rietschoten J, Greene E, Niall HD, Keutmann HT, Parsons JA, O’Riordan JL & Potts JT Jr. Solid-phase synthesis of the biologically active N-terminal 1–34 peptide human parathyroid hormone. *Hoppe-Seyler’s Zeitschrift für Physiologische Chemie*. 1974; 355: 415–421.

Turner CH, Burr DB, Hock JM, Brommage R, Sato M. The effects of PTH (1-34) on bone structure and strength in ovariectomized monkeys. *Adv Exp Med Biol*. 2001; 496: 165-79.

van der Rest, M, Garrone, R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991; (5): 2814-2823.

Vasconcelos DFP. Análise do Polimorfismo Genético do Fator de Necrose Tumoral Beta (+252 A/G) em pacientes com Periodontite Crônica [Dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol*. 1995; 147(4): 873-83. Review.

Vilarta R, Vidal Bde C. Anisotropic and biomechanical properties of tendons modified by exercise and denervation: aggregation and macromolecular order in collagen bundles. *Matrix*. 1989; 9(1): 55-61.

Zhao M, Jin Q, Berry JE, Nociti FH Jr, Giannobile WV, Somerman MJ. Cementoblast delivery for periodontal tissue engineering. *J Periodontol*. 2004; 75(1): 154-61.

Zhou H, Iida-Klein A, Lu SS, Ducayen-Knowles M, Levine LR, Dempster DW, Lindsay R. Anabolic action of parathyroid hormone on cortical and cancellous bone differs between axial and appendicular skeletal sites in mice. *Bone*. 2003; 32(5): 513-20.

Zubery Y, Dunstan CR, Story BM, Kesavalu L, Ebersole JL, Holt SC, Boyce BF. Bone resorption caused by three periodontal pathogens in vivo in mice is mediated in part by prostaglandin. *Infect Immun*. 1998; 66(9): 4158-62.

Yamamoto T, Wakita M. Bundle formation of principal fibers in rat molars. *J Periodontal Res*. 1992; 27(1): 20-7.

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam MN, Suzuki R. The fibrillar structure of cementum and dentin at the cemento-dentinal junction in rat molars. *Ann Anat*. 2000; 182(6): 499-503.

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam MN, Suzuki R. The initial attachment of cemental fibrils to the root dentin surface in acellular and cellular cementogenesis in rat molars. *Ann Anat*. 2001; 183(2): 123-8.

Whitfield JF, Isaacs RJ, Jouishomme H, et al. C-terminal fragment of parathyroid hormone-related protein, PTHrP-(107-111), stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murine skin keratinocytes. *J Cell Physiol*. 1996; 166: 1-11.

Whitfield JF, Morley P, Willick GE. Parathyroid hormone, its fragments and their analogs for the treatment of osteoporosis. *Treat Endocrinol*. 2002; 1(3): 175-90.

9. ANEXO

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp

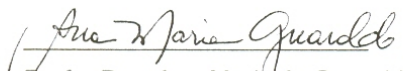
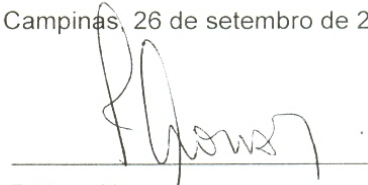
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1338-1, sobre "Efeito da administração intermitente de Pth1-34 em defeito na mandíbula de ratos, análise histológica e imuno-histoquímica", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Fausto Berzin / Daniel Fernando Pereira Vasconcelos, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 26 de setembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1338-1, entitled "Effect of intermittent Pth1-34 administration in the fenestration defect of rats. Histologic and immunohistochemical study", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on September 26, 2007.

Campinas, 26 de setembro de 2007.


Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente
Fátima Alonso
Secretária Executiva