



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Mariana Cristina Rodriguez Moure

Orientador(a): . Dr. Márcio Zaffalon Casati

Ano de Conclusão do Curso: 2004



Assinatura do(a) Orientador(a)


TCC 150

Mariana Cristina Rodriguez Moure

Avaliação histométrica da influência do estrógeno e da calcitonina na evolução da periodontite induzida em ratas ovariectomizadas.

Monografia apresentada ao
Curso de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba- UNICAMP, para
obtenção do Diploma de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. _____



Piracicaba
2004

Dedico este trabalho a todos que de uma forma ou de outra me ajudaram na execução deste trabalho

Sumário

	p.
1- Resumo.....	06
2- Introdução e Justificativa.....	07
3- Revisão da literatura.....	15
4- Objetivo.....	18
5- Materiais e métodos.....	18
- Seleção da amostra.....	18
- Ovariectomia.....	18
- Delimitação do estudo.....	19
- Análise do ciclo estral.....	20
- Análises laboratoriais.....	20
- Indução da doença periodontal.....	21
- Preparo histológico.....	21
- Análise histométrica.....	21
- Análise estatística.....	23
6- Resultados finais.....	24
- Observações clínicas.....	24
- Análises laboratoriais.....	25
- Resultados histométricos.....	25
7- Discussão dos resultados.....	28
8- Referências.....	31

Lista de ilustração

	Pág.
1- Figura 1: Ovário amarrado, sendo removido com um tesoura durante a ovariectomia.....	19
2- Figura 2: Fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior direito.....	
3- Figura 3: Retículo quadriculado posicionado na região a ser avaliada.....	22
4- Figura 4: Contagem de pontos coincidentes com tecido conjuntivo.....	23
5- Tabela 1: Médias e desvio padrão dos pesos finais e iniciais, em gramas (g).....	24
6- Tabela 2: Médias de cálcio e fosfatase alcalina para os grupos ovariectomia simulada (grupo 1); ovariectomia (grupo 2); calcitonina (grupo 3); estradiol (grupo 4) presentes no plasma no início do experimento.....	25
7- Tabela 3: Média e desvio padrão (mm ²) da perda óssea na região inter-radicular de dentes com e sem ligadura, de acordo com cada grupo experimental.....	26
8- Figura 5: Fotomicrografias ilustrando a região de ligamento periodontal e área óssea inter-radicular. A: sem ligadura (grupo 1); B: com ligadura (grupo 1); C: sem ligadura (grupo 2); D: com ligadura (grupo 2).....	27

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar histometricamente a influência do estrógeno e da calcitonina na evolução da periodontite induzida em ratas ovariectomizadas.

Sessenta ratas foram divididas em quatro grupos experimentais. Grupo 1 (15): ovariectomia, Grupo 2 (15): ovariectomia simulada, Grupo 3 (15): ovariectomia e administração de calcitonina, Grupo 4 (15): ovariectomia e administração de estradiol. (analisados pelo ciclo estral). Vinte e um dias após, foi induzida a periodontite através de ligaduras, e após 60 dias desta, os animais foram sacrificados e submetidos ao processamento histológico. Os níveis séricos de fosfatase alcalina e cálcio foram dosados no início e no final do experimento.

A análise intergrupo revelou que os animais com deficiência de estrógeno apresentou uma perda óssea significativamente maior devido a periodontite, e que este efeito não pode ser prevenido pela administração de estrógeno ou de calcitonina (0.34 +- 0.13, 0.65 +-0.06, 0.63+_ 0.19, 0.67 +_0.28 para os grupos 1,2,3 and 4, respectivamente). Além disso, a influência negativa da deficiência de estrógeno no osso alveolar também pode ocorrer sem o acúmulo de biofilme, nessas condições, a administração de estrógeno pode ser utilizada de maneira preventiva ($p<0.05$).

A análise sérica demonstrou um maior *turnover* celular nos animais com deficiência de estrógeno, e a terapia estrogênica restabeleceu o metabolismo ósseo.

Concluimos então, que a administração de estrógeno foi capaz de prevenir os efeitos da deficiência de estrógeno no osso alveolar, apesar disto, nem a terapia com o estógeno nem com a calcitonina foi capaz de proteger o osso alveolar na presença de placa.

Introdução e Justificativa

A periodontite está bem definida como resultado da expansão do processo inflamatório mediado pelo biofilme dental, capaz de gerar modificações patológicas como edema, sangramento e destruição do osso alveolar. A destruição do osso alveolar, por sua vez, pode levar a perda da função dos dentes devido à mobilidade dental, sendo, portanto, a maior causa de extração precoce de dentes na população adulta (JOHNSON *et al.*, 1988).

Osteoporose é uma doença osteometabólica decorrente de um desequilíbrio entre atividade osteoclástica e osteoblástica que resulta em uma redução da massa óssea e conseqüente predisposição a fraturas (ALBRIGHT, 1941). A diminuição de massa óssea tem sido correlacionada a diversos fatores de risco tais como hereditariedade, atividade física e composição corporal, deficiência de vitamina D e cálcio e diminuição do nível de hormônio de crescimento (GUYTON, 1992). Entretanto o declínio da atividade ovariana, pela excisão cirúrgica dos ovários ou naturalmente no período da menopausa, tem sido considerado o maior responsável pela osteoporose (RIGGS & MELTON, 1986). A diminuição da função ovariana resulta em uma deficiência do nível de estrógeno, hormônio capaz de inibir a reabsorção óssea por uma ação direta em osteoblastos e osteoclastos, e indireta na regulação do nível de citocinas como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF) (GIRASOLE *et al.*, 1992).

Uma vez que a osteoporose atinge não somente os ossos longos mas também os ossos da face, tem sido investigada sua relação com a doença periodontal. Estudos em humanos têm considerado a osteoporose como um fator de

risco para perda óssea periodontal. INAGAKI *et al.* (2001) demonstraram correlação positiva entre baixa densidade óssea mineral, periodontite e perda dentária em mulheres japonesas no período pós-menopausa. TEZAL *et al.* (2000), verificaram que a densidade óssea mineral está relacionada a uma maior perda óssea interproximal, sendo a osteopenia pós-menopausa um fator indicador de risco para doença periodontal em mulheres caucasianas. Entretanto, a maioria dos estudos clínicos que correlaciona doença periodontal e osteoporose apresenta amostra reduzida, limitado controle dos fatores de confundimento e são desprovidos de controle prospectivo.

Utilizando um modelo de ratas com deficiência de estrógeno (ovariectomizadas), GILLES *et al.* (1997), demonstraram que a deficiência de estrógeno leva a um aumento da perda óssea nos maxilares. MORIYA *et al.* (1998) sugeriram que a osteoporose isolada não é capaz de causar a destruição periodontal. HIDAKA *et al.* (2000), verificaram que a ovariectomia causa alterações no periodonto, enquanto TANAKA *et al.* (2002), demonstraram que a deficiência de estrógeno causa alterações osteoporóticas, resultando em um osso alveolar delgado na região interradicular dos primeiros molares inferiores de ratas ovariectomizadas.

Embora o controle da dieta e a prática de exercícios físicos sejam formas de tratamento e prevenção de osteoporoses bastante empregadas (PROVINCE *et al.*, 1995), o uso de diferentes medicamentos tem sido amplamente relatado na literatura. A maioria dos agentes terapêuticos atua evitando a reabsorção óssea como, por exemplo, os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs), a terapia de reposição hormonal, os bifosfonatos e a calcitonina (NIH, 2001).

A terapia de reposição hormonal com estrógenos tem sido considerada a principal forma de tratamento e prevenção de osteoporose pós-menopausa. Estudos

clínicos e laboratoriais têm comprovado que a presença do hormônio reduz significativamente o ritmo de reabsorção óssea (CHRISTIANSEN *et al.*, 1981; VAANANEN & HARKONEN, 1996; WRONSKI *et al.* 1986, 1988). PAYNE *et al.*, em 1997, sugeriram que o nível de estrógeno pode influenciar a densidade óssea alveolar em mulheres com periodontite. REINHARDT *et al.* (1999) verificaram que a reposição com estradiol está associada a uma redução no nível de inflamação gengival e perda de inserção clínica em mulheres no período da menopausa.

A calcitonina, por sua vez, têm como mecanismo de ação a inibição a atividade osteoclástica (GONZALEZ 1987; NODA & KUWAHARA, 1993), além de apresentar efeito analgésico e (LYRITIS *et al.*, 1991) capacidade de modular os níveis séricos de cálcio e fósforo (CHAMBERRS, 1988). Estudos clínicos prospectivos sugerem que o uso desse medicamento diminui a incidência de fraturas da coluna vertebral em cerca de 37%, (CIVITELLI *et al.*, 1988; OVERGAARD *et al.* 1990). Estudos utilizando ratas ovariectomizadas têm demonstrado que o tratamento com calcitonina diminui o remodelamento ósseo, prevenindo assim a osteopenia (WRONSKI *et al.*, 1991; SHEN *et al* 1996).

Embora existam indícios da influência negativa da deficiência de estrógeno na evolução da doença periodontal, não há relatos na literatura se os medicamentos disponíveis para o tratamento da osteoporose são capazes de atenuar esses efeitos prejudiciais em ratas ovariectomizadas. Portanto, o objetivo deste estudo será trabalho será o de avaliar, histometricamente, a influência que o estrógeno e a calcitonina podem apresentar na evolução da periodontite induzida em animais com deficiência de estrógeno (ratas ovariectomizadas).

Revisão da literatura

Segundo KRISBBS (1983), o cálcio total do corpo foi medido pela análise de ativação do nêutron, e foi encontrado sua associação com a densidade mandibular quando foi relacionado através da análise quantitativa das radiografias intrabucais.

VON WOWERN *et al* (1994) relatou em um estudo seccionado cruzado, que indivíduos com osteoporose e história de fraturas tinham menos conteúdo mineral no osso mandibular quando medido por absorção dual de fótons (DXA) do que as mulheres normais.

WACTAUSKI- WENDE *et al* (1996), em uma análise com 70 mulheres na pós-menopausa, encontraram um relação significativa entre a altura da crista óssea alveolar como medida da periodontite e a osteopenia esquelética (fêmur e coluna lombar) medido por meio de DXA. Esta relação foi vista após controle de possíveis variáveis como placa dentinária, anos de menopausa e tabagismo. Além disso, os autores mostraram uma relação entre a osteopenia da bacia e verificação da perda de inserção no mesmo grupo.

De maneira semelhante VON WOVERN *et al* (1996), em um estudo de contole de casos, comparando 12 pacientes do sexo feminino com fraturas osteoporóticas e 14 mulheres normais, relataram significativamente maior perda de inserção periodontal nas mulheres com osteoporose, quando comparada com as normais. Eles demonstraram que as mulheres com osteoporose tinham menos conteúdo ósseo mineral na região mandibular, como medido pela absorção dual de

fótons, do que as 14 mulheres normais. Conseqüentemente, embora limitadas, as incidências sugeriram uma associação entre a osteopenia, osteoporose e doença periodontal. A deficiência de estrógeno pode explicar, em parte, a natureza dessa associação.

GENCO (1996) sugeriu que a osteoporose e o fumo são fatores importantes na promoção de perda dental. Observou, também, uma associação direta entre osteopenia do esqueleto e mandibular e a doença periodontal destrutiva em mulheres pós-menopausa.

Segundo SALVI et al (1997), é importante diferenciar osteopenia, que é definida como uma diminuição no osso mineralizado normal. Da osteoporose pós-menopausa, que é causada pela falta de produção de estrógeno e caracterizada por fraturas espinhais em mulheres de 50 a 70 anos, e a osteoporose propriamente dita que afeta pessoas mais velhas e resulta em fraturas do fêmur. Existe a hipótese de que anormalidades metabólicas sistêmicas que ocorrem na osteopenia podem acarretar um aumento local na reabsorção óssea causada pela infecção periodontal. Os autores entenderam ser mais apropriado considerar a osteoporose como um fator de risco em potencial para a periodontite.

De acordo com COHEN & ROSE (1998), a perda de osso bucal associada com a osteoporose pode ser importante na criação de um hospedeiro susceptível à doença periodontal. Entre as mulheres há uma forte correlação entre a massa óssea bucal e a massa óssea total e o número de dentes restantes. Da mesma forma, a perda de dente causada pela doença periodontal pode ser um fator de risco para a osteoporose. A mastigação insuficiente pode influenciar a digestão de alimentos,

sendo assim necessária a ingestão de alimentos ricos em cálcio para manter os dentes e ossos saudáveis.

KINANE (1999) sugere que a menopausa pode causar redução na densidade do osso alveolar e que altura da crista alveolar e a perda dental estão relacionadas com a situação de pós-menopausa.

Em um estudo realizado por TEZAL *et al* (2000), onde foi utilizado 70 mulheres no período pós-menopausa, caucasianas de 51 a 78 anos. A densidade mineral óssea (BMD) foi avaliada através da absorção da energia do raio X (DXA) em várias regiões do esqueleto. A doença periodontal foi mensurada através de perda de inserção clínica (CAL) e perda de osso alveolar interproximal (ABL). E com este estudo foi concluído que a BMD está relacionada com a perda de osso alveolar interproximal e de inserção clínica, demonstrando assim, que a osteopenia na pós-menopausa seria um indicador para a doença periodontal em mulheres caucasiana no período pós-menopausa.

TAYB 2003 afirma que é bem sabido que a osteoporose e a periodontite representam duas doenças muito prevalentes com o avançar da idade e ambas as doenças são crônicas, multifatoriais e resultam em perda óssea. REDDY 2002 relata evidências, de que um paciente com osteoporose sistemática possui uma densidade mineral óssea oral diminuída. Além disso, um paciente com densidade mineral óssea diminuída apresenta uma incidência mais alta para progressão da periodontite. Portanto, segundo esses autores, a osteoporose poderia ser considerada um fator de risco para a periodontite.

Em um estudo de INAGAKI *et al* (2001), com mulheres japonesas foi possível identificar que as mulheres na pós-menopausa que tinham um densidade mineral óssea do metacarpo (m-BMD) baixa apresentavam-se com uma quantidade menor de dentes presentes do que as mulheres com m-BMD normal. Indicando que a perda óssea m-BMD está relacionada com a periodontite e com a perda de dentes.

MOHAMMAD *et al* (2003) demonstrou em seu estudo clínico com mulheres Asiático- Americanas que a diminuição da densidade mineral óssea (BMD) está associada com o aumento de inserção clínica e perda de dentes, independente do índices de placa, apoiando assim a associação entre BMD e doença periodontal.

NIH (2001) afirma que o uso de diferentes medicamentos tem sido amplamente utilizados como forma de controle da osteoporose pós-menopausa, como os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs), a terapia de reposição hormonal, os bifosfonatos e a calcitonina.

A terapia de reposição hormonal com estrógenos tem sido considerada a principal forma de tratamento e prevenção de osteoporose pós-menopausa. Estudos clínicos e laboratoriais têm comprovado que a presença do hormônio reduz significativamente o ritmo de reabsorção óssea (CHRISTIANSEN *et al*,1981; VAANANEN & HARKONEN, 1996; WRONSKI *et al*. 1986, 1988).

HORSMAN & RISS (1987) demonstra de forma clara, que o estrogênio inibe o aumento de reabsorção óssea associado com a menopausa. Com a retirada de estrogênio um aumento iniciável em formação óssea. Depois, reabsorção óssea

acontece mais rapidamente que formação, com um efeito líquido de perda de osso e que o tratamento com estrógeno previne estes efeitos.

ERIKSEN (1988) e OUSLER (1990) mostraram que os efeitos do estrógeno são mediados por uma combinação de efeitos diretos e indiretos. Os efeitos diretos são mediados por receptores específicos achados em células de osteoblastos e linhagens de osteoblastos. Os efeitos do estrogênio em osteoclastos são em parte diretos e em parte mediados por osteoblastos. Alguns dos efeitos diretos do estrogênio são o aumento da expressão dos fatores de crescimento IGF-1 e TGF-beta, e de citocinas e inibição da produção de prostaglandinas por meio de células ósseas.

GRAY (1989) e ERIKSEN (1988) demonstraram que é possível que o estrogênio tenha uma ação prolongada na estimulação da formação óssea, sendo mostrado que o estrogênio pode aumentar a expressão de TGF- beta e IGF-1 em células com fenótipo de osteoclastos. Assim, o efeito principal do estrogênio é o de inibir a reabsorção óssea e também um efeito adicional na estimulação óssea.

REINHARDT *et al* (1999) demonstrou que a suplementação do nível sérico de estradiol está associado com a redução da inflamação gengival e na periodontite, em pacientes com osteoporose/osteopenia durante a menopausa, devido a inibição de citocinas pró-inflamatórias.

COHEN-SOLAL *et al* (1993) e PACIFIC (1996) observaram que os monócitos periféricos sanguíneos de uma mulher que entrou na menopausa recentemente (5 a 7 anos), mostrou-se elevado, estimulando a produção de lipopolisacarídeos pela

interleucina (IL-1), fator de necrose tumoral e IL-6 que foi diminuído com a terapia com estrógeno. O estrogênio também tem se mostrado como inibidor das células T mediadoras da inflamação, suprimindo a produção de leucócitos através da medula óssea, e afetando na distribuição de células polimorfonucleares (PMN) no sangue periférico dos ratos. Demonstrou-se também que E2 reduziu significativamente a quimiotaxia dos PMN em humanos através do mecanismo receptor-dependente.

PAYNE *et al.*, (1997), sugeriram que nível de estrógeno pode influenciar a densidade óssea alveolar em mulheres com periodontite.

REINHARDT *et al.* (1999) verificaram que a reposição com estradiol está associada a uma redução no nível de inflamação gengival e perda de inserção clínica em mulheres no período da menopausa.

COHEN & ROSE (1998) ressaltaram a relação da menopausa com a perda dental. A diminuição dos níveis de estrógeno está ligada a um risco maior de perda dental. As mulheres que fazem a reposição hormonal também mostraram-se com um nível mais baixo de placa, sangramento gengival e de agentes patogênicos periodontais do que aquelas na fase pós-menopausa que não usam o estrógeno, apesar de que a influência dos hábitos de cuidado dentário deva ser levada em conta.

Segundo GREENSTEIN & LAMSTER (2000), a atuação da deficiência de estrógeno como fator de risco para periodontite ainda não é conclusiva. Entretanto, mulheres com osteoporose manifestam efeitos adversos na massa óssea mandibular e na altura da crista, além de apresentarem maior perda de inserção que

mulheres normais. Além do mais, mulheres com deficiência estrogênica possuem maior tendência ao sangramento à sondagem e menor densidade óssea alveolar que as mulheres com estrógeno suficiente. Assim, a terapia de reposição hormonal resulta em menor retenção dental e está associada com a redução na perda de inserção. Uma redução no nível de estrógeno resulta em menor deposição óssea e aumento na reabsorção óssea osteoclástica.

EGYETEM (2002) ressalta que a terapia de reposição hormonal protege a mulher na fase pós-menopausa contra os efeitos da osteoporose e a doença periodontal. Sugere, pois, o autor que existe associação entre a doença periodontal e a osteoporose.

A calcitonina, por sua vez, têm como mecanismo de ação a inibição da atividade osteoclástica de acordo com GONZALEZ 1987 e NODA & KUWAHARA, (1993), além de representar efeito analgésico (LYRITIS et al, 1991) capacidade de modular os níveis sérico de cálcio e fósforo (CHAMBERRS, 1998). Estudos clínicos prospectivos sugerem que o uso desse medicamento diminui a incidência de fraturas da coluna vertebral em cerca de 37%, (CIVITELLI et al., 1988; OVERGAARD et al. 1990).

FRIEDMAM *et al* (2002) demonstraram que a calcitonina pode inibir a reabsorção óssea por osteoclastos, assim, o efeito da calcitonina nos osteoclastos é mediado por AMP cíclico. A calcitonina diminui a atividade dos osteoclastos, como pode ser visto minutos após o tratamento por meio da diminuição do tamanho das bordas ondulantes e zona clara. Outros estudos mostram que a calcitonina inibe a

formação de novos osteoclastos e causa a diferenciação dos osteoclastos em células mononucleares.

São poucos os efeitos da calcitonina na reabsorção óssea. Porém, os osteoclastos eventualmente perdem sua eficácia, depois de repetidas exposições prolongadas à calcitonina, um fenômeno chamado fuga. Uma explicação para este fenômeno pode envolver uma diminuição no número de receptores depois de um período longo de exposição. Outra possível explicação é que uma segunda população de osteoclastos não é sensível a calcitonina. Considerando que a calcitonina tem efeito apenas passageiro na reabsorção óssea, houve especulações consideráveis sobre se ela tem ou não um papel importante na homeostasia do cálcio. Hoje, acredita-se em uma inibição passageira da reabsorção óssea quando o retorno ósseo não for necessário para a homeostasia do cálcio (como depois de uma comida rica em cálcio). Um receptor para a calcitonina foi identificado em osteoclastos e foi mostrado que pode haver uma mediação direta da calcitonina nestas células.

De acordo com WRONSKI *et al*, (1991) e SHEN *et al* (1996), o tratamento com calcitonina em ratas ovariectomizadas diminui o remodelamento ósseo, prevenindo assim a osteopenia.

Objetivo

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho será avaliar, histometricamente, a influência do estrógeno e da calcitonina na evolução da periodontite induzida em animais com deficiência de estrógeno (ratas ovariectomizadas).

Materiais e Métodos

Seleção da Amostra :

Foram utilizadas sessenta (60) ratas Wistars, adultas (90 dias), com peso médio inicial de 205,28g. os animais foram mantidos, durante todo período experimental, em gaiolas plásticas sob as mesmas condições ambientais e água *ad libitum*. Houve apenas restrição alimentar para grupo de ratas ovariectomizadas a fim de prevenir o aumento de peso induzido pela diminuição do nível de estrógeno⁵⁻

13

Ovariectomia :

Todos os animais foram pesados e receberam via intramuscular uma solução de 1ml/kg de cloridrato de ketamina (Francotar®; Virbac do Brasil Industria e Comércio Ltda, Roseira, S.P., Brasil) e 0,1 ml/kg de cloridrato de xylazina (virbrasil®; virbac do brasil indústria e comércio ltda, roseira, s.p., brasil.). Em seguida, foi realizada a tricotomia das regiões laterais até dorso e anti-sepsia local com álcool iodado. Quarenta e cinco ratas foram submetidas a ovariectomia (ovx), através de incisões cutâneas bilaterais com tesoura, divulsionamento do tecido

muscular e remoção dos ovários (fig. 1). Outras quinze ratas foram submetidas a ovariectomia simulada onde os mesmos procedimentos anteriores foram realizados, mas os ovários foram recolocados intactos na posição original. em seguida, os animais receberam uma aplicação única de 1ml/kg de antibiótico via intramuscular (pentabiótico pequeno porte, laboratórios Wyeth-Whiehall Ltda., São Paulo, Sp, Brasil).



Figura 1: Ovário amarrado, sendo removido com um tesoura durante a ovariectomia.

Delineamento do estudo :

Após a ovariectomia os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo 1 (n =15): ovariectomia simulada;

Grupo 2 (n =15): ovariectomia;

Grupo 3 (n =15): ovariectomia e administração subcutânea de 16 iu/kg de calcitonina sintética de salmão (miacalcic[®], sandoz a.g., fertigung schützenstrsse, ravenburg, germany), 4 dias por semana durante todo período experimental;

Grupo 4 (n=15): ovariectomia e administração subcutânea de 20 μ g/kg de 17 β estradiol (sigma chemical, st. louis, mo,USA), dissolvido em etanol 100% e diluído em óleo mineral , diariamente durante todo período experimental.

Análise do ciclo estral :

Duas semanas após a ovariectomia, para confirmar o sucesso da mesma, os animais foram submetidos à análise do ciclo estral. Para isso realizou-se a coleta do esfregaço vaginal do animal durante pelo menos cinco dias consecutivos. Uma pequena quantidade de solução salina foi dispensada no interior da vagina da rata com o auxílio de uma pipeta e este líquido transferido para uma lâmina para análise em microscopia ótica.

Análises laboratoriais :

No início do experimento e antes do sacrifício foi realizada a coleta de sangue de todos os animais para obtenção do plasma. este por sua vez foi enviado à um laboratório de análises (CAEC Centro de Análises Especializadas de Campinas Ltda.) para a dosagem do nível de fosfatase alcalina e cálcio.

Indução da doença periodontal :

Com o objetivo de induzir acúmulo de biofilme e conseqüente doença periodontal, vinte e um dias após a ovariectomia, os animais foram anestesiados segundo protocolo da ovariectomia. Em seguida, foi colocada uma ligadura de fio de algodão ao redor dos 1º molares inferiores direito ao nível do sulco gengival (fig.2). O primeiro molar inferior esquerdo não recebeu o fio para ser utilizado como controle.

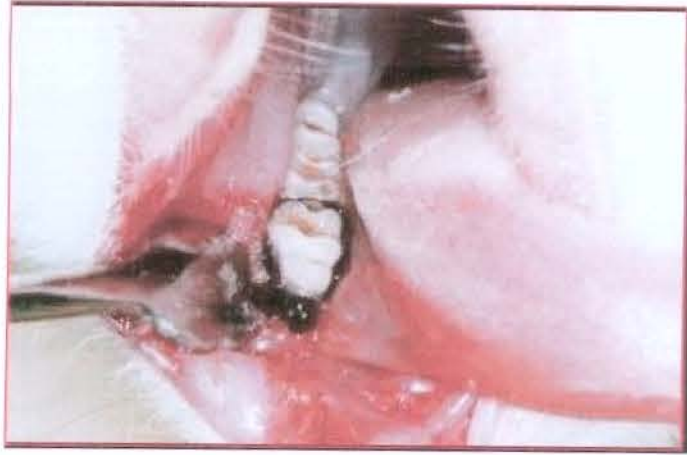


Figura 2: fio de algodão ao redor do primeiro molar inferior direito.

Preparo histológico :

Após sessenta dias da colocação da ligadura, os animais foram sacrificados para a remoção das mandíbulas. Em seguida, com o auxílio de um bisturi com lâmina 15, os tecidos foram dissecados, desarticulando e dividindo a mandíbula pela sínfise, de modo a obter hemi-mandíbulas contendo os dentes teste (com ligadura) e controle (sem ligadura). As peças foram identificadas e fixadas em formol neutro a 4% tamponado (ph 7,2 - 7,4). A descalcificação foi realizada em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 50% em partes iguais (solução de morse). A solução foi renovada a cada três dias por seis semanas, para que o tecido fosse suficientemente descalcificado. Ao final deste período, as peças foram aparadas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Escolhida a orientação de corte méso-distal mais conveniente para a delimitação da região de bifurcação dos primeiros molares inferiores, foram obtidos cortes seriados de 6µm de espessura, que foram em seguida corados por hematoxilina e eosina.

Análise histométrica :

Para cada amostra, foram separados os cortes nos quais a região da

bifurcação fosse claramente identificada. Para a análise da área de perda óssea inter-radicular foi desprezado o primeiro corte, selecionando-se os demais distanciados igualmente entre si, de modo a obter no mínimo 10 cortes por dente.

As imagens da região de bifurcação dos cortes selecionados foram adquiridas através de uma câmera digital (digital kocam ccd camera; dmi, São Paulo, Brazil) acoplada ao microscópio (axioskop 2 plus[®]; zeiss, jena, Germany), utilizando a objetiva de 5x. A área de tecido conjuntivo resultante da destruição do tecido ósseo na região da bifurcação foi mensurada através de um sistema de análise de imagens digitalizadas (image-pro[®]; media cybernetics, silver spring, md, USA), utilizando o recurso de contagem de pontos de um retículo quadriculado. O retículo foi posicionado de maneira a incluir dentina coronária, dentina radicular e o tecido ósseo, sendo computados os pontos que coincidem com o tecido conjuntivo delimitado por estas estruturas. Para a análise estatística foi obtida uma média das áreas inter-radulares selecionadas para histometria.

Figura 3: Retículo quadriculado posicionado na região a ser avaliada.

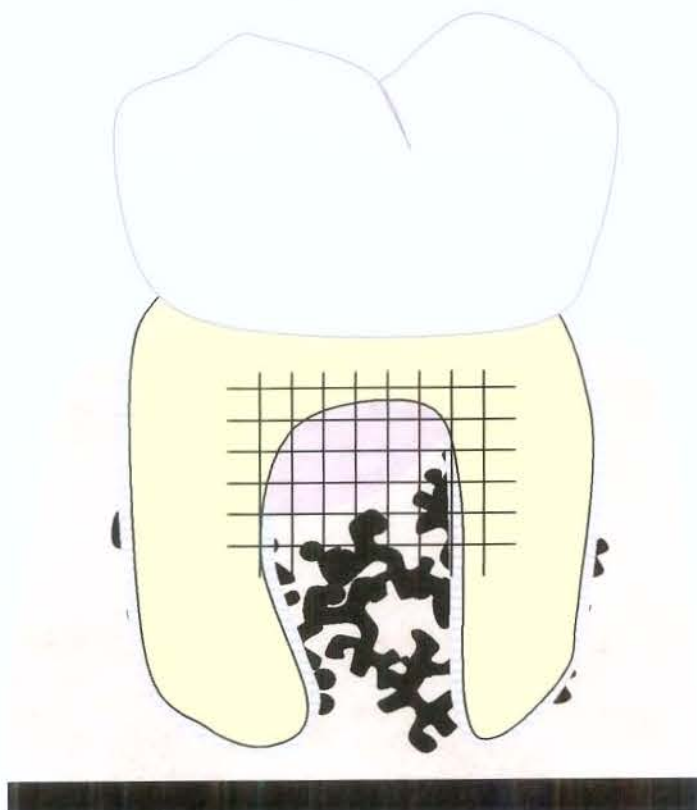
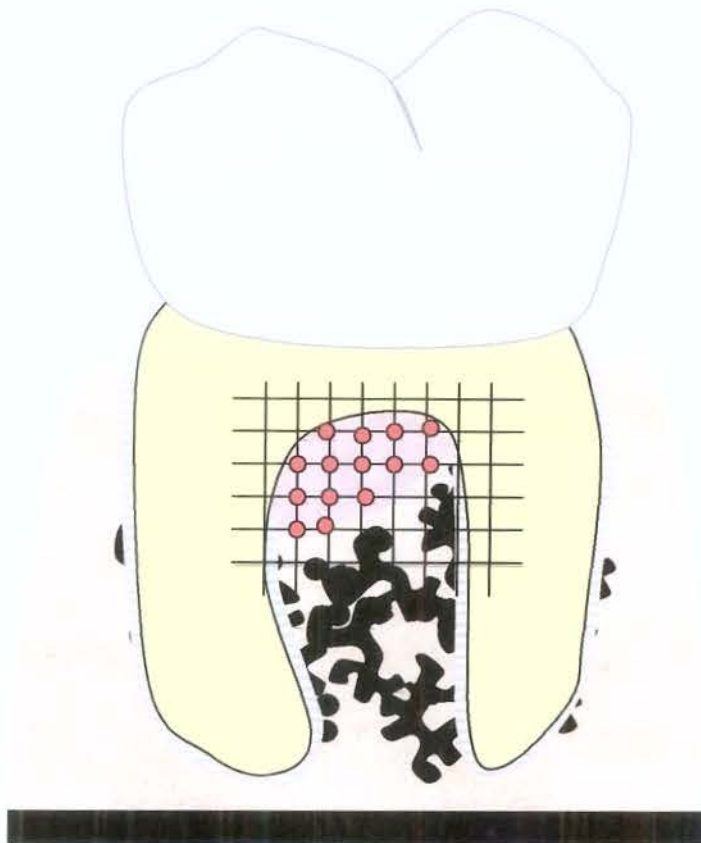


Figura 4: Contagem de pontos coincidentes com tecido conjuntivo.



Análise estatística :

A hipótese de que a presença da ligadura não influenciaria a perda óssea inter-radicular foi testada por uma análise intragrupo através do teste t-student ($\alpha=5\%$). A hipótese de que a administração de estrógeno e de calcitonina não influenciaria a perda óssea inter-radicular foi testada usando uma análise intergrupo (teste anova; $\alpha=5\%$). Quando foram detectadas diferenças estatísticas, o teste de tukey ($\alpha=5\%$) foi usado para isolar o grupo ou grupos que se diferenciam dos outros.

Resultados finais:

Observações clínicas:

Comparando-se os períodos inicial e final, todos os animais ganharam peso durante o experimento. antes do sacrifício os animais do grupo 4 apresentaram média de peso significativamente menor que os demais grupos ($p < 0.05$). as médias iniciais e finais do peso corpóreo para todos os grupos estão representadas na tabela 1.

Tabela 1: médias e desvio padrão dos pesos finais e iniciais, em gramas (g).

grupo	inicial	final
1	204,40 \pm 14,94 aA	256,27 \pm 15,7aB
2	203,00 \pm 9,75 aA	261,67 \pm 14,98aB
3	209,20 \pm 12,92 aA	255,47 \pm 20,25aB
4	209,67 \pm 12,06 aA	228,57 \pm 13,68bB

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si estatisticamente pela ANOVA ($\alpha = 5\%$) e médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste t pareado.

Em relação ao ciclo estral, os animais dos grupos ovariectomia e calcitonina apresentaram-se na fase diestro, confirmando a redução do nível de estrógeno e o sucesso da ovariectomia. Apenas um deles, do grupo calcitonina apresentou todas as fases do ciclo ovariano durante os cinco dias de acompanhamento, e este animal não foi incluído na amostra final. Os animais do grupo que recebeu estradiol (grupo 4), apresentaram-se no estágio estro, sugerindo que a terapia de reposição foi capaz de manter o nível desse hormônio de forma efetiva. O grupo que foi submetido apenas à simulação da ovariectomia (grupo 1) demonstrou todas as fases do ciclo estral, comprovando que estes animais estavam realmente no padrão de normalidade do ciclo ovariano.

Análises Laboratoriais:

Os resultados da análise laboratorial de fosfatase alcalina e cálcio sérico no início do experimento estão representados na tabela 2, não demonstrando variação estatisticamente significativa entre os grupos para ambas as medidas.

Tabela 2: Médias de cálcio e fosfatase alcalina para os grupos ovariectomia simulada (grupo1); ovariectomia (grupo 2); calcitonina (grupo 3); estradiol (grupo 4) presentes no plasma no início do experimento.

GRUPO	CÁLCIO NMOL/L	FOSFATASE ALCALINA (UI/L)
1	0,97	33,84
2	1,05	39,5
3	0,97	39,66
4	1,00	37,8

Entretanto, o nível sérico de fosfatase alcalina variou entre os grupos experimentais no final do experimento. Para os grupos 1 e 4, a taxa de fosfatase alcalina foi similar ($29,13 \pm 10,93$ IU/l e $33,29 \pm 14,91$ IU/l, respectivamente $p < 0,05$) e estatisticamente menor que o grupos 2 e 3 ($80,47 \pm 20,16$ IU/l e $98,20 \pm 14,27$ IU/l, respectivamente $p < 0,05$), confirmado um maior metabolismo ósseo nos animais com deficiência de estrogênio. Em relação ao cálcio, expresso em nmol/l, os animais ovariectomizados e não tratados (grupo2) apresentaram valores estatisticamente maiores que os demais grupos ($p < 0,05$). Os níveis de cálcio foram para os grupos 1, 2, 3 e 4 respectivamente $1,10 \pm 0,07$; $1,24 \pm 0,08$; $1,10 \pm 0,14$ e $1,07 \pm 0,13$.

Resultados Histométricos :

A análise intragrupo demonstrou que a presença da ligadura ao redor do dente é capaz de induzir perda óssea na região inter-radicular ($p < 0,05$) (Tabela 3). Nos dentes sem ligadura, a análise intergrupo revelou que a deficiência de

estrógeno pode apresentar um efeito direto no osso alveolar, independente do acúmulo de placa, resultando em alguma perda óssea na região de furca. Entretanto, este efeito negativo foi restituído com a administração de 17(beta) estradiol, mas não através do tratamento com calcitonina (Tabela 3). Nos animais com ligadura e um nível de estrógeno deficiente, houve uma significativa perda óssea quando comparado com animais estrógeno-suficientes ($p < 0,05$). Entretanto, nenhum dos tratamentos (grupo 3 e 4) foi capaz de proteger o osso alveolar na presença de biofilme ($p < 0,05$) (Tabela3). A figura 1 (A-D) ilustra alguns achados histológicos.

Tabela 3: Média e desvio padrão (mm^2) da perda óssea na região inter-radicular de dentes com e sem ligadura, de acordo com cada grupo experimental.

	SHAM	OVX	CALCITONINA	ESTRADIOL
SEM LIGADURA	0.18 ± 0.03 aA	0.32 ± 0.08 aB	0.26 ± 0.04 aB	0.17 ± 0.03 aA
COM LIGADURA	0.34 ± 0.13 bA	0.65 ± 0.06 bB	0.63 ± 0.19 bB	0.67 ± 0.28 bB

Letras maiúsculas são consideradas em linhas (análise intergrupos: ANOVA, $p < 0,05$) e as letras minúsculas em colunas (teste t pariado, $p < 0,05$).

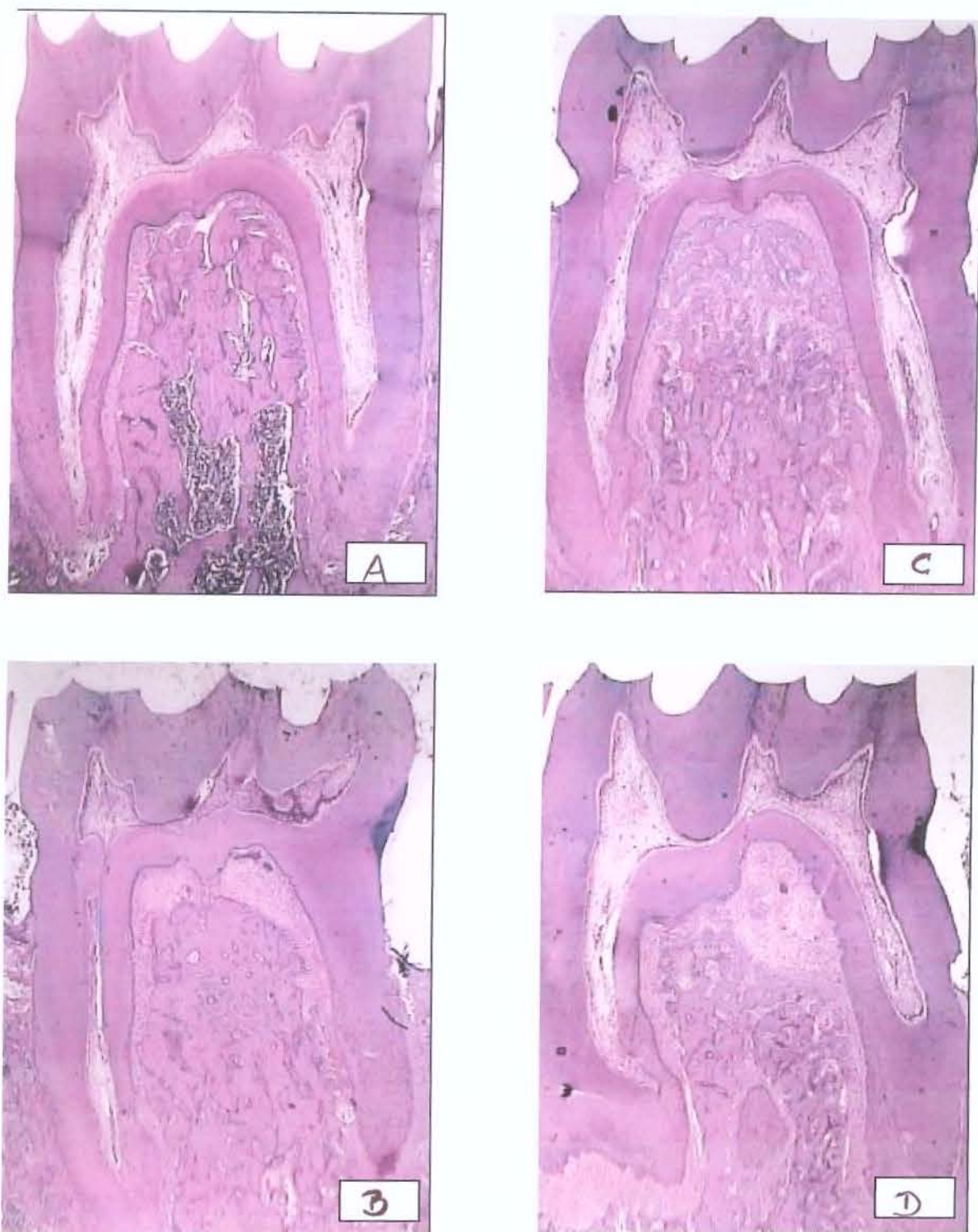


Figura 5: Fotomicrografias ilustrando a região de ligamento periodontal e área óssea interradicular. **A:** sem ligadura (grupo 1); **B:** com ligadura (grupo 1); **C:** sem ligadura (grupo 2); **D:** com ligadura (grupo 2). Aumento original de 12,5X. Hematoxilina & eosina.

Discussão dos Resultados

Periodontite é uma doença caracterizada pela inflamação dos tecidos de suporte do dente, resultando em reabsorção óssea e perda de ligamento periodontal (49). O papel de fatores sistêmicos no estabelecimento e progressão da periodontite tem sido amplamente estudado (13).

Osteoporose e osteopenia, por sua vez, são doenças do metabolismo ósseo causadas principalmente por uma deficiência de estrógeno (22). Assim, a terapia reposição estrogênica tem sido considerada o tratamento mais efetivo para prevenção de osteoporose (70). Entretanto terapias alternativas a reposição hormonal como, por exemplo, a calcitonina também têm sido amplamente propostas para esse objetivo (69).

Desde de que alterações osteoporóticas têm sido observadas no osso alveolar, a osteoporose poderia ser considerada um indicador de risco para a doença periodontal, que da mesma forma é responsável por perda de osso alveolar (39). Logo, objetivo do presente estudo foi investigar o impacto da deficiência de estrógeno e de duas importantes terapias para a osteoporose (estradiol e calcitonina) na perda óssea alveolar resultante da periodontite experimental em ratas ovariectomizadas.

Os resultados demonstraram que a deficiência de estrógeno pode afetar diretamente a perda óssea alveolar, independente do acúmulo de placa. A deficiência de estrógeno pode ainda aumentar significativamente a perda óssea alveolar após a indução da periodontite. Embora outros estudos tenham demonstrado que a deficiência de estrógeno e a osteopenia/osteoporose podem aumentar a reabsorção óssea oral, juntamente com a perda de dentes (39,32), este é o primeiro estudo em animal que objetiva verificar diretamente a correlação entre

periodontite e baixos níveis de estrógeno.

Em nível molecular, a reabsorção óssea está bem caracterizada pela interação entre duas moléculas chave, o ligante Kappa β do receptor ativador nuclear (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) (59). A inibição da função do RANKL, via OPG, tem revelado uma significativa redução da destruição do osso alveolar, conforme reportado por Teng *et al* (2000) (62). Tem sido demonstrado que o estrógeno é importante para o controle da reabsorção óssea diretamente por sua ação em OPG (40). Assim, pode ser sugerido que, no presente estudo, o efeito sinérgico observado entre a deficiência de estrógeno e o acúmulo de placa foi decorrente de um aumento no nível de RANKL e uma diminuição do nível de OPG, resultante tanto da estimulação de lipopolissacarídeos como da deficiência de estrógeno. Entretanto, o real mecanismo envolvido nesses resultados ainda necessita ser mais profundamente investigado.

A terapia com estrógeno, imediatamente após a ovariectomia, protegeu contra o efeito negativo da deficiência de estrógeno no osso alveolar ao redor do dente sem a ligadura. Este achado está de acordo com estudos que demonstraram que a deficiência de estrógeno induz osteoclastogênese e osteoporose nos septos inter-radulares dos primeiros molares de ratas, e a administração de estrógeno pode prevenir este efeito negativo (34). Por outro lado, a terapia com estrógeno não foi capaz de proteger o osso alveolar contra a influência negativa da deficiência de estrógeno endógeno na presença de placa. O mecanismo protetor do estrógeno no tecido ósseo está aparentemente envolvido na supressão do "turnover" ósseo, com efeito direto nas células óssea e indireto na regulação de citocinas (64). Deste que o efeito do estrógeno no metabolismo ósseo também tem sido atribuído ao seu efeito em OPG (40), a reposição estrogênica pode não ter reproduzido um nível de OPG capaz de inibir a estimulação de RANKL pelos lipopolissacarídeos da placa

acumulada.

Wronski *et al*, em 1991 (69), reportaram que a terapia com calcitonina por 41 dias diminuiu o “turnover” ósseo e preveniu o desenvolvimento da osteopenia em ratas ovariectomizadas. Entretanto, Shen *et al*, em 1996 (58), demonstraram que a calcitonina quando administrada em ratas ovariectomizadas por 90 dias, preveniu somente parcialmente a perda óssea. Da mesma forma, os resultados deste estudo demonstraram que a calcitonina preveniu parcialmente a perda óssea ao redor do dente sem a ligadura, apesar deste efeito não ter sido observado na presença da placa dental. Como previamente reportado (20), este fenômeno sugere que a resposta óssea para a calcitonina pode ter sido diminuída de forma tempo-dependente, provavelmente por uma desregulação na ligação da droga ao receptor das células ósseas (42).

Finalmente, o presente estudo, demonstrou um efeito sinérgico da deficiência de estrógeno e o acúmulo de placa. Além disso, a administração de estrógeno ou calcitonina não foi capaz de proteger contra o efeito negativo da deficiência de estrógeno na presença de placa. De acordo com os resultados do presente estudo, a influência negativa da deficiência de estrógeno no osso alveolar também pode ocorrer sem o acúmulo de biofilme. Nessas condições, a administração de estrógeno pode ser utilizada de maneira preventiva. Por essa razão, além do impacto da deficiência de estrógeno na saúde geral da população, esta pode ser um aspecto crítico para a periodontite. Assim, estudos clínicos controlados devem ser conduzidos para fornecer informações mais consistentes sobre a inter-relação doença periodontal, osteoporose e seus tratamentos.

Referências Bibliográficas

- 1-Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopause osteoporosis. It's clinical features *JAMA* 1941;**116**:2465-74
- 2-Binstock ML, Mundy GR. Effect of calcitonin and glucocorticoids in combination in malignant hypercalcemia. *Na Intern Med* 1980;93:269-272.
- 3- Chambers TJ The effect of calcitonin on the osteoclast. *Triangle* 1988;27:53
- 4-Christiansen C, Christensen MS, Transbol I Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of estrogen/gestagen replacement therapy. *Lancet* 1981;1:459-461
- 5-Civitelli R, Gonnelli S, Zacchei F, Bigazzi S, Vattimo A, Avioli LV, Gennari C Bone turnover in postmenopausal osteoporosis. Effect of calcitonin treatment. *J Clin Invest* 1988 Oct;82(4):1268-74
- 6-Cohen-Solal ME, Granlet AM, Denner MA, Gueris J, Baylink D, de Vernejoul MC. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: Involvement of cytokines. *J Clin Endocrinol Metab.*1993;77:1648-1653.
- 7-Cohen D W, Rose LF. The periodontal- medical risk relationship. In: *Compend of Contin Educ Dent*, Jamesburg, v.19, p.11-24, Fall 1998.
- 8-Egyltern S. Osteoporosis: a risk factor for periodontal disease (literature review).

Clin Periodontol, Copenhagen, v.29, n.4, p.326-35, Apr.2002.

9-Eriksen EF, Colvard DS, Berg N J et al. Evidence os estrogen receptors in normal human osteoblast like cells. *Science* 1988;**241**:84-86.

10-Friedlander AH. The phisiology, medical management and oral implications of menopause. *J Am Dent Assoc*, Chigaco, v.133, n.1, p.73-81, Jan.2002.

11-Friedman J W, Au YW, Raisz LG. Responses of fetal rat bone to tryocalcitonin in tissue culture. *Endocrinology* 1968;**82**:149-156.

12-Feldman R, Kriegr N, Tashjian AJ. Effects of parathyid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vidro. *Endocrinology* 1980;**107**:1137-1143.

13-Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 1996;**67**:1041-1049.

14-Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod*. 1997 Jul;**23**(7):419-22.

15-Girasole G, Jika RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC. 17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblats in vidro:a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 1992 Mar; **89**(3):883-91

- 16-Gonzalez D, Vga E, Ghirighelli G, Mautalen C. Comparison of the acute effect of the intranasal and intramuscular administration of salmon calcitonin in Paget's disease. *Calcif Tissue Int* 1987Dec; 41 (6):313-5.
- 17-Gray TK, Mohan S, Linkart TA, Baylink DJ. Estradiol simulates *in vitro* the secretion of insulin- like growth factors by the clonal osteoblastic cell line, VMR-106. *Biochim Biophys Res Comm* 1989;158:407-412.
- 18-Greenstein, G, Lamster, I. Changing periodontal paradigms therautic implications. *Int J Periodontics Restorative Dent*, Carol Stream, v.20, n.4, 2000.
- 19-Grossi SG, Nishida M, Wactawski – Wende J, et al. Skeletal osteopenia increses the risk for periodontol disease. *J Dent Res* 1998;17 Abstract#2140.
- 20-Gruber HE, Ivey JL, Baylink DJ *et al.* Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism* 1984;**33**:295-303.
- 21-Guyton AC Tratado de Fisiologia Médica 8º ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 16. Lane, J.M.: Osteoporosis: medical prevention and treatment. *Spine* 22, suppl. 24: 32S-37S, 1997.
- 22-Harrison JE. Osteoporosis. In: CS, Heersche JNM, Murray TM, eds. *Metabolic bone diseases: cellular and tissue mechanisms*. Boca raton: CRC Press, 1989:240-267.

- 23-Hidaka S, Okamoto Y, Yamada Y, Miyazaki K, Kimura T. Alterations in the periodontium after ovariectomy in rats: the effects of a Japanese herbal medicine, Chujo-to. *Phytother Res.* 2000 Nov;14(7):527-33.
- 24-Holtrop ME, Raisz LG. Comparison of the effects of 1,25 dihydroxycholecalciferol, prostaglandin E2, and osteoclastactivating factor with parathyroid hormone on the ultrastructure of osteoclasts in cultured long bones of fetal rats. *Calcif Tissue Int* 1979;29:201-206.
- 25-Horsman A, Gallagher JC, Simpson M, Nordin BEC: Prospective trial of estrogen and calcium in postmenopausal women. *Br Med J* 1977;2:789-792.
- 26-Inagaki K, Kurosu Y, Kamiya T, Kondo F, Yoshinari N, Noguchi T, Krall EA, Garcia RI. Low metacarpal bone density, tooth loss, and periodontal disease in Japanese women. *J Dent Res.* 2001 Sep;80(9):1818-22.
- 27-Ito I, Hayashi T, Yamada K, Kuzuya M, Naito M, Iguchi ^a Physiological concentration of estradiol inhibits polymorphonuclear leukocyte chemotaxis via a receptor mediated system. *Life Sci.*1995;56:2247-2253.
- 28-Jeffcoat MK, Readdy MS, Magnusson I, et al. Efficacy of quantitative digital subtraction radiography using radiographs exposed in a multicenter trial. *J Periodontol Res.*1996;157-60.
- 29-Jeffcoat MK, Readdy MS. Alveolar bone loss and osteoporosis: evidence for a common mode of therapy using the bisphosphate alendronate. In: devidovitch Z,

editor. The biologic mechanism of tooth resorption and replacement by implants. Boston: *Harrard Society for the Advancement of Orthodontics*; 1996.

30-Jeffcoat MK, Readdy MS, Lewis CE, et al. Postmenopausal bone loss and its relationship to oral bone loss. *Periodontol 2000* [In Press].

31-Johnson NW, Griffiths GS, Wilton JMA, et al. Detection of high risk groups and individuals for periodontal diseases. Evidence for existence of high risk groups and approaches to their detection. *J Clin Periodontol* 1988; **15**: 276-282.

32-Johnson RB, Gilbert JA, Cooper RC et al. Alveolar bone loss one year following ovariectomy in sheep. *J Periodontol* 1997;68:864-871.

33-Josefsson E, Tarkoski A, Carlsten H. Antiinflammatory properties of estrogen. I. In vivo suppression of leukocyte production in bone marrow and redistribution of peripheral blood neutrophils. *Cell immunol* 1992;142:67-78.

34-Kawamoto S, Eijiri S, Hoshi K et al. Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. *Arch Oral Biol* 2002;47:55-58.

35-Kinane, D. F. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*, Chicago, v.4, n1, Dec1999.

36-Kinare DF, Marshall GJ. Periodontal manifestations of systemic disease. *Aust Dent. J*, Saint Leonards, v.46, n.1, p.2-12, 2001.

37-Kribbs PJ, Smith DE, Chesnut CH. Oral findings in osteoporosis. Part II.

Relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. *J Prosthet dent* 1983;50:719-24.

38-Kribbs PJ, Chesnut CH. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent*. 1989;62:703-7.

39-Kribbs PJ, Chesnut CH, Ott SM, Kilcyne RF. Relationship between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. *J Prosthet Dent* 1990;63:86-9.

40-Lindberg MK, Rrlandsson M, Alatalo SL *et al*. Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol* 2001;171:425-433.

41-Lyritis GP, Tsakalacos N, Magiasis B, Karachalios T, Yiatzides A, Tsekoura M. Analgesic effect of salmon calcitonin in osteoporotic vertebral fractures: a double-blind placebo-controlled clinical study. *Calcif Tissue Int* 1991 Dec;49(6):369-72

42-Messer HH, Copp DH. Changes in response to calcitonin following prolonged administration to intact rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1974;146:643-647.

43-Mohammad AR, Hooper DA, Vermilyea SG, Maiotti A, Preshaw PM. An investigation of the relationship between systemic bone density and clinical periodontal status in post-menopausal Asian-American women. *Int- Dent J* 2003 Jun;53(3):121-5.

44-Moriya Y, Ito K, Murai S Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998Dec;40(4):171-5.

45-NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy *JAMA* 2001 285:785

46-Noda K, Kuwahara Y The occurrence of mitochondrial variations including large mitochondria in osteoclasts following calciton treatment. *JelectronMicrosc(Tokyo)* 1993Aug;42(4):218-26

47-Ouler MS, Pyfleroen J, Osdoby P, Riggs BL, Spelsbug TC. Osteoclasts express mRNA for estrogen receptor. *J Bone Miss Res.*1990;5:517.

48-Overgaard K, Hansen MA, Nielsen VA, Riis BJ, Christiansen C. Discontinuous calcitonin treatment of established osteoporosis—effects of withdrawal of treatment. *Am J Med* 1990 Jul;89(1):1-6

49-Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 1976;34:235-249.

50-Pacific R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.*1996;11:1043-1051.

51-Payne JB, Zachs NR, Reinhardt RA, Nummikoski PV, Patil K The association between estrogen status and alveolar bone changes in postmenipausal womwn with a history of periodontitis. *J Periodontol* 1997 Jan; 68(1): 24-31.

52-Province, M.A., Hadley E.C., Hornbrook, M.C. et al : The effects of exercise on falls in elderly patients. A preplanned meta-analysis of the FICSIT Trials. *JAMA* 273 : 1341-1347, 1995

53-Reddy MS. Oral osteoporosis: is there na association between periodontitis and osteoporosis? *Compend-Contin-Educ-Dent* 2002 Oct;23(10 Suppl):21-8.

54-Reinhardt RA, Payne JB, Maze CA, Patil Kd, Gallagher SJ, Mattson JS Influence of estrogen and osteopenia/osteoporosis on clinical periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol* 1999 Aug; 70(8): 823-8.

55-Riggs BL, Melton LJ 3rd. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986 Jun 26;314(26):1676-86

56-Riis BJ, Thomsen K, Strom V, Chistiansen C. The effect of percutaneous estratiol and natural progesterone os postmenopausal bone loss. *Na J Osbstet Gynecol* 1987;156:61-65.

57-Salvi GE et al. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000, Copenhagen, v.14, p.173-201.

58-Shen Y, Li M, Wronski TJ. Skeletal effects of calcitonin tretment and withdrawal in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1996;58:263-267.

59-Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR *et al*. Osteoprotegerin: a novel secreted

protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-319.

60-Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res.* 2002 Apr;37(2):161-5.

61-Tayeb Y, Goultchin J, Fogel M, Schwartz Z. The relationship between osteoporosis, osteopenia and periodontitis. *Refeat -Hapeh- Vehashinayim* 2003 Jan;20(1):8-22,78.

62-Teng Y-TA, Nguyen H, Gao X *et al.* Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest* 2000;106:R59-R67.

63-Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol.* 2000 Sep;71(9):1492-8.

64-Vaananen HK, Harkonen PL. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 1996 May;23 Suppl:S65-9

65-von Wowern N, Klaresen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:1134-8.

66-Wactawski – Wende J, Grossi SG, Trevisan M, *et al.* The role of osteopenia in periodontal disease. *J Periodontol*1996;67:1076-84.

67-Wronski TJ, Cintron M, Doherty AL, Dann LM. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1988 Aug;123(2):681-6

68-Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986;7(2):119-23

69-Wronski TJ, Yen CF, Burton KW, Mehta RC, Newman PS, Soltis EE, DeLuca PP. Skeletal effects of calcitonin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991 Oct;129(4):2246-50

70-Wronski TJ, Dann LM, Qi H *et al.* Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1993;53:210-216.