UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM BIOCIÊNCIAS E SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

CAROLINA DE CÁSSIA BOAMORTE

AVALIAÇÃO DA REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE O TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA.

CASCAVEL-PR
(Agosto/2016)

CAROLINA DE CÁSSIA BOAMORTE

AVALIAÇÃO DA REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE O TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA.

Dissertação apresentada ao Programa De Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença

ORIENTADOR: Carlos Augusto Nassar

CO-ORIENTADORA :Sara Cristina Sagae

CASCAVEL-PR

(Agosto/2016)

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA DE CÁSSIA BOAMORTE

AVALIAÇÃO DA REPOSIÇÃO HORMONAL SOBRE O TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA.

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Nassar
UNIOESTE

Prof. Dr. Christian Giampietro Brandão
UNIOESTE

Prof. Dr. Roberto Bombonatti
USP-Bauru

CASCAVEL-PR
(Agosto/2016)

DEDICATÓRIA

Dedicado à minha sobrinha e afilhada, Maitê Boamorte Libardoni, que lutou bravamente pela sua vida e é testemunho de um grande e verdadeiro milagre de Deus.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano”. (Isaac Newton)

AGRADECIMENTO

A todos que participaram desta etapa de minha vida...

Grata a Deus, sempre.

Aos meus queridos pais, pelos valores ensinados e pelo grande esforço de vida que fizeram, permitindo-me a dedicação aos estudos e por sempre incentivarem o caminho do conhecimento. Pelo apoio e amor incondicional. Aos meus pais a gratidão e amor eterno.

Ao meus irmãos, Camila e Robson, que mesmo longe me apoiam e torcem pelo meu sucesso. Obrigada pela amizade e parceria de vida. Amo vocês.

A minha família, avós, tios, primos, tão importantes na minha formação pessoal e por saber que sempre estarão ao meu lado e por me mostrarem o real valor de uma família. Amo a todos.

Ao Gustavo, namorado, namorido e agora marido, companheiro que esteve ao meu lado e me apoiou nessa jornada. Pela compreensão e paciência. Te amo...que seja eterno! Obrigada sempre.

Ao professor Carlos Augusto Nassar, que me aceitou como orientada sem me conhecer e que aceitou o desafio, mesmo sendo de outra área profissional. Por ter confiado e acreditado em mim, no desenvolvimento desse trabalho. Obrigada pela paciência, pelo incentivo, pela oportunidade de ter trabalhado com um exemplo de profissional que você é. Pela calma quando eu tinha incertezas, pelo tempo dispensado nesse processo. Agradeço por ter sido um grande orientador. A minha gratidão, respeito e admiração.

À professora Sara Cristina Sagae, pela coorientação, pela disponibilidade e disposição em me ensinar, auxiliar e ajudar para a concretização deste projeto. Pela paciência e ajuda com a cirurgia e eutanásia das ratas. Sua participação foi essencial neste trabalho. A você meu respeito e gratidão.

A todos os Professores que foram membros da banca examinadora que enfrentei durante esse curso: Profa. Dra. Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro, Profa .Dra. Rose Meire Costa Brancalhão. Suas sábias recomendações a respeito desta pesquisa, sem dúvida, engrandeceram este trabalho.

Às professoras, Rose Meire Costa Brancalhão e Lucinéia de Fátima Chasko, por me receberem e permitir a realização de parte desta pesquisa no laboratório de Biologia Celular.

Obrigada pelos ensinamentos teóricos e técnicos do laboratório e por sempre estarem disponíveis e solícitas respondendo minhas dúvidas.

À professora Patrícia Oehlmeyer Nassar, pelos ensinamentos, contribuição, dedicação e atenção.

Ao corpo docente do Mestrado em Biociências e Saúde da Unioeste, pela contribuição direta com a minha formação. Agradeço também à Graselha pela paciência e por estar sempre disponível para responder aos meus questionamentos.

Aos professores que aceitaram compor minha banca de defesa.

A todas as pessoas do laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo pela ajuda nos cuidados com os ratos do biotério, especialmente a Ana Claudia Paiva Alegre Maller por ter nos ajudado a fazer as análises do ELISA com tanto carinho e paciência.

À Lais Fernanda Pasqualotto, pela incrível parceria, ajuda imprescindível durante a realização desta pesquisa. Obrigada por passar suas férias de faculdade comigo no laboratório. À Lidiane Ura Affonso Brandão, pela amizade, ajuda e solidariedade de sempre. Também agradeço à Karine Figueredo da Costa pela ajuda. Por toda parceria, dedicação e apoio. Muito obrigada.

Enfim, a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, meu sincero e imenso agradecimento. Muito obrigada!

RESUMO

A relação da osteoporose na pós-menopausa é controversa, mas pode ser um fator de risco para doença periodontal, bem como possuir uma atuação direta e indireta no tecido ósseo devido a ação do estrógeno, uma vez que este pode inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa e a IL-6 que favorecem a reabsorção óssea.Uma das alternativas na terapia de reposição hormonal atualmente é a isoflavona, um fito-hormônio que vem se estabelecendo como terapia substitutiva por ter sua ação similar ao estrógeno, porém com efeitos protetores contra as doenças cancerígenas, osteoporose, entre outras. Assim, o objetivo foi avaliar a ação da isoflavona no tecido ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas com peridontite induzida. Sessenta (60) Ratas fêmeas com 8 semanas de vida foram divididas aleatoriamente em 6 grupos: 1) Grupo Controle (CON); 2) Grupo Ligadura(LIG); 3) Grupo Ovariectomia (OVX+DMSO); 4) Grupo Ovariectomia e Fitoestrógeno (OVX+FIT); 5) Grupo Ovariectomia e Ligadura (OVX+LIG+DMSO); 6) Grupo Ovariectomia, Fitoestrógeno e Ligadura (OVX+FIT+LIG).Todos os animais receberam dieta padrão e água a vontade. Aos 70 dias de vida, os animais foram anestesiados (xilazina 10 mg/Kg e quetamina 75 mg/Kg) e foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitia a manutenção da abertura bucal das ratas facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito e esquerdo. Após este procedimento, aos 79 dias de vida, as ratas também foram submetidas à anestesia e à cirurgia de ovariectomia para mimetizar a ausência de hormônios sexuais femininos da menopausa em mulheres. A ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias e favoreceu o acúmulo de placa bacteriana, enquanto a reposição hormonal (isoflavona) se realizou por 21 dias (0,25g/kg/dia s.c.) nos grupos anteriormente citados. Aos 100 dias de vida, as ratas foram eutanasiadas. Foram realizadas análises macroscópica, microscópica e radiográfica com as mandíbulas esquerda e direita de cada rata, bem como com amostras do tecido gengival para avaliar os tecidos periodontais e seus efeitos induzidos pela reposição hormonal. Como resultado das análises, foi observado que os grupos com fitoestrógeno apresentaram menor perda óssea alveolar do que os grupos que não receberam terapia com isoflavona ($p< 0,05$), bem como os grupos tratados com fitoestrógeno apresentaram uma maior quantidade de osteoblastos e osteócitos e menor de osteoclastos do que os grupos que não receberam terapia de reposição hormonal ($p<0,05$). Logo, a isoflavona pode conferir um efeito protetor à perda óssea alveolar, na progressão da doença periodontal, agravada pela osteoporose.

Palavras-chave: doença periodontal, menopausa, osteoporose, isoflavona.

ABSTRACT

The ratio of osteoporosis in postmenopausal women is controversial, but may be a risk factor for periodontal disease, as well as having a direct or indirect role in bone due to estrogen action, since this can inhibit production of proinflammatory cytokines -inflammatory such as TNF-alpha and IL-6 that favor bone resorption. One of the alternatives in hormone replacement therapy is the isoflavone, a phyto-hormone that has established itself as replacement therapy for having a similar action to estrogen, but with protective effects against cancers, osteoporosis, among others. The objective was to evaluate the effect of isoflavone on alveolar bone of ovariectomized rats with induced periodontitis. Sixty (60) Female rats with 8 weeks of age were randomly divided into 6 groups: 1) control group (CON); 2) Bandage Group (LIG); 3) Group Ovariectomy (OVX); 4) Ovariectomia and Phytoestrogen group (OVX + FIT); 5) Ovariectomia and ligature group (OVX + LIG); 6) Ovariectomia Group, Phytoestrogen and Ligation (OVX + FIT + LIG) .All the animals received standard diet and water at will. After 70 days of life, the animals were anesthetized (xylazine 10 mg / kg and ketamine 75 mg / kg) and were placed in proper operating table, which allowed the maintenance of the mouth opening of the rats facilitating access to the teeth of the posterior region jaw. With the aid of a modified forceps and an explorer, it was placed a cotton yarn number 40 around the mandibular first molar right and left. After this procedure, after 79 days of life, the rats were submitted to anesthesia and ovariectomy surgery to mimic the absence of female sex hormones of menopause in women. Ligation served as irritating gums for 30 days and favored the accumulation of plaque, while hormone replacement therapy (isoflavone) was held for 21 days (0.25 g / kg / day sc) in the above-mentioned groups. At 100 days of life, the rats were euthanized. Macroscopic, microscopic and X-ray analyzes were performed with the left and right jaws of each rat as well with samples of gingival tissue to assess the periodontal tissues and their effects induced by hormone replacement. As a result of analysis, it was observed that the groups of phytoestrogen showed less bone loss than the groups that received no therapy isoflavone ($p < 0.05$) and the treated groups had a higher phytoestrogen osteoblasts and osteocytes osteoclasts and lower than the groups not receiving hormone replacement therapy ($p < 0.05$). Therefore, the isoflavone may confer a protective effect on bone loss in periodontal disease progression, compounded by osteoporosis.

Keywords: periodontal disease, menopause, osteoporosis, isoflavone.

SUMÁRIO

RESUMO....8
LISTA DE ABREVIATURAS....12
INTRODUÇÃO GERAL....14
OBJETIVOS....17
GERAL:....17
ESPECÍFICOS:....17
REVISÃO DE LITERATURA....18
Menopausa....18
A osteoporose....19
A terapia de reposição hormonal....21
Isoflavona....24
A doença periodontal....27
A periodontia, a menopausa e a osteoporose....29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....31
ARTIGO CIENTÍFICO....37
RESUMO....38
INTRODUÇÃO....39
MATERIAL E MÉTODOS....41
- Animais....41
- Grupos Experimentais....41
- Indução da Doença Periodontal....42
- Ovariectomia e reposição hormonal:....42
- Descalcificação, processamento histológico e inclusão em blocos de parafina 43
- Observações microscópicas....43
- Morfometria da gengiva....44
- Morfometria do osso....44
- Análise Radiográfica....44
- Análise Estatística....45
RESULTADOS....46
Análise Radiográfica e Histomorfometria do Osso Alveolar:....46

Medida histomorfométrica do tecido gengival e Análise da morfometria do osso. 46
- Descrição das lâminas histológicas 47
DISCUSSÃO 49
AGRADECIMENTOS 53
REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS.....54
TABELAS, FIGURAS E LEGENDA DAS FIGURAS.....57
Figuras: 58
Tabelas: 69
Normas da revista cietífica: 71

LISTA DE ABREVIATURAS

CCBS: Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

CEUA: Comitê de Ética no uso de Animais.

COL: Controle

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

ELISA: Ensaio de Imunoabsorção Acoplado a Enzimas.

FIT: Fitoestrógeno

FSH: Hormônio folículo-estimulante.

IAM: Infarto agudo do miocárdio.

IL-1: Interleucina 1.

IL-10: Interleucina 10.

IL-12: Interleucina 12.

IL-1β: Interleucina 1 beta.

IL-4: Interleucina 4.

IL-6: Interleucina 6.

LH: Hormônio luteinizante.

LIG: Ligadura

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OVX: Ovariectomia

SUS: Sistema Único de Saúde.

TGFβ: Fator de transformação de crescimento beta.

TNFα: Fator de necrose tumoral alfa

TRH: Terapia de reposição hormonal.

UNIOESTE: Universidade Estadual do Oeste do Paraná

INTRODUÇÃO GERAL

A menopausa, referida como a última menstruação, é um período de inatividade reprodutiva que confere às mulheres queda na produção hormonal, principalmente do estradiol, impedindo a proliferação do endotélio. Tal ciclo do sistema reprodutor feminino, também conhecido por climatério, traz consequências biológicas, psicológicas e sociais (POLI; SCHWANKE; CRUZ, 2010). Uma das consequências da menopausa é a redução da produção estrogênica, uma vez que o estrógeno é responsável por um conjunto de funções, fora o eixo reprodutivo; como a modulação do metabolismo ósseo e mineral, cardíaco e função vascular, cognição e da memória, entre outros (WISE et al.1999). O estrógeno circulante é derivado principalmente da conversão dos androgênios adrenais através da aromatase, que ocorre principalmente no tecido adiposo (MESENGUER et al. 2002; VENKEN et al. 2008) e sua baixa produção pode acarretar em alterações fisiológicas ao longo da idade (WISE et al. 1999).

Posteriormente à menopausa, as consequências biológicas aparecem na forma de algumas doenças devido às alterações hormonais, que entre essas, são responsáveis pela diminuição da massa óssea, caracterizando às mulheres uma suscetibilidade a desenvolver osteoporose (BRANDÃO; MACHADO; ACURCIO, 2012). Essa doença óssea - metabólica, considerada uma disfunção sistêmica - altera a microarquitetura dos ossos, inclusive os da face (AMADEI et al. 2006).

A periodontite é uma inflamação associada à infecção bacteriana e atinge os tecidos de suporte dos dentes, causando reabsorção óssea alveolar e perda do tecido de inserção dental. É uma doença progressiva e destrutiva, acarretando em perda dental e edentulismo em adultos (PALLOS et al. 2006). A periodontite tem como consequência a destruição dos tecidos periodontais pela ação dos produtos tóxicos liberados na área subgengival por patógenos específicos, como também pela resposta inflamatória desencadeada pela presença desses microrganismos (BASTOS et al. 2005; NASCIMENTO et al. 2014). Tem sido postulado o conceito de que os hormônios ovarianos podem aumentar a inflamação dos tecidos gengivais e exacerbar a resposta a irritantes locais. A inflamação gengival parece ser agravada por um desequilíbrio e/ou

aumento dos hormônios sexuais. A literatura tem demonstrado que os hormônios sexuais afetam e modificam a ação das células do sistema imune, sendo sugerido que interações entre estrogênio e células do sistema imune podem ter efeitos regulatórios não imunes (CUTOLO et al. 1995).

Tanto a osteoporose quanto a doença periodontal causam perda óssea, sendo que a relação das duas doenças é a interação de fatores sistêmicos da osteoporose com fatores locais da periodontite, agravando o padrão de perda óssea alveolar (BERTULUCCI et al. 2012).

A terapia de reposição hormonal com estrógeno tem sido amplamente utilizada para mulheres na pós-menopausa, porém estudos vêm demonstrando os malefícios de tal reposição, como riscos para desenvolver doenças cardíacas e câncer de mama; entretanto, a prática da reposição hormonal traz benefícios no controle da osteoporose. Estudos do seguimento avaliam compostos que são similares ao estrógeno e que não apresentam tais efeitos colaterais; logo, os fitoestrógenos têm se mostrado eficazes e bem aceitos para tal objetivo (AMATYKUL et al. 2007; BRANDI, 1997; COLDITZ et al.1995; Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997).

Por ter uma estrutura similar a do estrógeno, o fitoestrógeno comumente utilizado para terapia de reposição hormonal é a isoflavona. (TANAKA et al. 2008). Evidências também mostram que as isoflavonas protegem contra várias doenças crônicas e atuam na prevenção da perda óssea na pós-menopausa e na osteoporose (BEDANI; ROSSI, 2005; ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

Existem estudos que divergem em relação à osteoporose na pós-menopausa que apresentam-na como um fator de risco para a doença periodontal (BERTULUCCI et al. 2012; PALLOS et al. 2006). Do mesmo modo, foram desenvolvidos muitos estudos nos últimos anos sobre os efeitos dos fitoestrógenos, apesar destas pesquisas não terem descrito claramente qual seu mecanismo de ação (BEDANI; ROSSI, 2005; TANAKA et al. 2008). O estrógeno atua diretamente no tecido ósseo aumentando a formação de osteoblastos, inibindo a osteoclastogênese e induzindo a apoptose de osteoclastos favorecendo, portanto, a mineralização do tecido ósseo. Dentre as evidências que suportam essas ações, destaca-se que quando ovariectomizado, o animal tem seu potencial osteogênico diminuído (OCARINO et al. 2008), além de

apresentar maior apoptose dos osteócitos, o que pode ser revertido após a reposição hormonal (FONSECA et al. 2011). Além de sua atuação direta no tecido ósseo, o estrógeno apresenta ainda efeitos indiretos sobre os ossos uma vez que inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF-alfa e IL-6 que favorecem a reabsorção óssea e estão aumentadas após a ovariectomia (WEITZMANN; PACIFICI, 2006).

Contudo, por não haver um consenso na literatura, a relação da osteoporose pós-menopausa e a doença periodontal ainda é divergente. Associado à introdução de um fito-hormônio, onde será estimada a influência na perda do tecido ósseo alveolar, mostra-se que há necessidade da realização de mais estudos e essa pesquisa espera contribuir e poder esclarecer a relação da doença periodontal com a osteoporose na pós-menopausa e ainda analisar a influência da terapia de reposição hormonal através da isoflavona.

OBJETIVOS

GERAL:

Avaliar a influência da reposição hormonal com isoflavona (fitoestrógeno) no tecido ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas com peridontite induzida.

ESPECÍFICOS:

Realizar os seguintes estudos em ratas com periodontite induzida ou não, ovariectomizadas ou não e/ou com reposição hormonal:

- Uma análise descritiva morfológica dos tecidos periodontais da mandíbula;
- Analisar a morfologia do tecido gengival da mandíbula de ratas;
- Avaliar histometricamente a altura da crista alveolar da mandíbula dos animais;
- Quantificar osteoblastos, osteócitos e osteoclastos na mandíbula dos animais através da análise morfométrica;
- Radiograficamente analisar a perda óssea alveolar das ratas;

REVISÃO DE LITERATURA

Menopausa

Na década de 70, a saúde da mulher no Brasil tinha como principal alvo a saúde materna. Somente na década de 80, com o lançamento de um documento intitulado “Assistência Integral à Saúde da mulher: base de ação programática”, a abordagem a este tema contemplou todas as fases de sua vida. Com o avanço dessa política em abrangência nacional e a percepção da importância do cuidado da saúde da mulher em sua fase de climatério, em 2003, a atenção a este assunto teve seu ponto alto e foram estabelecidas políticas com o intuito de atender essas necessidades. (BRASIL, 2008).

Estima-se que a população feminina brasileira, em 2007, totalizava mais de 98 milhões Dessas, em torno de 30 milhões tem entre 35 e 65 anos, uma estimativa de que 32% de mulheres brasileiras se encontravam na faixa etária em que ocorre o climatério (BRASIL, 2008). A WHO, 1996, estima que para ano de 2030, o número de mulheres na menopausa será de 1.200 milhões. Pedro et al.(2003) apontam em seu estudo, realizado em Campinas - São Paulo, como idade média da ocorrência de menopausa como sendo de 51,2 anos.

A menopausa é um evento natural e inevitável, período que se define por 12 meses sem menstruação (ALDRIGHI; ALDRIGHI; ALDRIGHI, 2014; MATT et al. 1998; WISE et al. 1999), apresentando uma fase de transição gradual, da reprodutiva para a não reprodutiva, podendo ter seu início aos 35 anos e terminando aos 65 anos. No entanto, por volta dos 40 anos, fase da Peri-menopausa, é que as ações endócrinas sofrem alterações consideráveis: ocorre exaustão dos folículos ovarianos e uma dissincronização dos sinais neuronais no hipotálamo e sistema nervoso central; a perda total da atividade folicular ovariana, acometendo a estrutura e função do ovário (ALDRIGHI; ALDRIGHI; ALDRIGHI, 2014; MATT et al.1998; WISE et al. 1999).

É na Peri-menopausa que a transição menopausal tem gradativa diminuição da produção hormonal do estrógeno. Os folículos primordiais ovarianos evoluem para atresia e os ovários diminuem de tamanho progressivamente no processo de menopausa. Os estímulos gonadotróficos nos ovários se tornam menos sensíveis; os

folículos, por sua vez, diminuem a produção de inibina e estradiol. O aumento do FSH desregula o ciclo, ocorrendo ovulações precoces e encurtamento da fase folicular. O estradiol sofre alterações de oscilações na sua produção e a inibina age na inibição da produção/secreção das gonadotrofinas hipofisárias, especialmente o FSH (ALDRIGHI; ALDRIGHI; ALDRIGHI, 2014; BRASIL, 2008).

Próximo ao início da menopausa, essas alterações hormonais tornam-se mais intensas.Os ciclos tornam-se irregulares, mais longos ou mais curtos, (geralmente são anovulatórios) com sangramentos irregulares, sendo nesta fase a produção mínima de progesterona no corpo lúteo. Uma vez iniciada a menopausa, ocorre falência folicular ou insensibilidade dos receptores de gonadotrofinas nos folículos (BRASIL, 2008).

Na pós-menopausa, o é FSH aumentado cerca de 10 a 15 vezes, enquanto que o LH de 3 a 5 vezes. O estradiol é reduzido por cerca de 80% e é progressivamente substituído pela estrona, hormônio predominante na pós-menopausa (BRASIL, 2008).

A menopausa traz consequências biopsicossociais e faz parte do processo de envelhecimento feminino. Não é considerada uma doença e os sinais e sintomas associados a esse período podem ser tratados através de terapias especificas para aliviar tais sinais (POLI et al. 2010). Essas indicações do início da menopausa consistem principalmente pela queda do hormônio estrógeno e podem ser caracterizados por fogachos, suores noturnos, distúrbios do sono, oscilações de humor, déficits cognitivos, ansiedade, fadiga, entre outros. Em consequência à menopausa, podem surgir doenças tardias como as cardiovasculares e a osteoporose (WHO, 1996).

A osteoporose

A osteoporose é considerada como a “Epidemia Silenciosa do Século”, vista como um problema de saúde pública no mundo devido ao aumento da expectativa de vida e afeta tanto o sexo masculino como o feminino, mas preferencialmente as mulheres após a menopausa (BRASIL, 2008; WHO, 2007).

A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura com

consequente aumento da fragilidade óssea e maior suscetibilidade às fraturas (RUSSO, 2001; WHO, 2007).

No Brasil, de acordo com Brasil (2008), cerca de 10 milhões de pessoas sofrem com osteoporose. As mulheres na pós-menopausa, por volta do 50 anos e durante a vida, podem apresentar riscos de fratura osteoporótica de 17,5% para o colo do fêmur, 15,6% para as vértebras, 16% para o rádio distal e de 40% para o resto do esqueleto (RADOMINSKI et al. 2004).

Ainda para as mulheres, 50% da perda óssea relacionada à idade ocorrem entre 8 a 10 anos após a menopausa. Além de esta perda estar relacionada à carência de estrógeno, outros fatores podem contribuir para tanto, como fatores genéticos, raciais, nutricionais, entre outros. Embora a deficiência do estrógeno tenha sua ação antirreabsortiva do tecido ósseo bem conhecida, seu mecanismo de ação não é bem esclarecido, mas sabe-se que os hormônios sexuais tem um importante papel no crescimento ósseo e na manutenção do pico de massa óssea. Há presença de receptores estrogênicos em osteoblastos cuja ação principal é a reabsorção óssea. Esses receptores do estrógeno podem realizar uma ligação aos receptores dos osteoblastos e inibir a liberação de fatores estimuladores dos osteoclastos ou ainda aumentar a atividade dos fatores dos mesmos. O estrógeno inibe também as citocinas (interleucinas 1 e 6 e TNFα), bem como fatores locais produzidos pelo osteoblasto que estimulam a chegada dos osteoclastos nas unidades de remodelação óssea e promovem maior atividade desta linhagem celular (AMADEI et al. 2006; COMPSTON, 2001; RAMALHO; CASTRO, 2006; RUSSO, 2001).

O estrógeno tem relação direta com o metabolismo ósseo, por isso a osteoporose pós-menopausa apresenta grande relação de importância, sendo que após os 65 anos ao menos uma em cada três mulheres apresentaram osteoporose (AMADEI et al. 2006). A WHO, 1994, aponta, para mulheres na pós-menopausa, que em fraturas de quadril – por exemplo – a por idade, até os 49 anos a incidência era de 0%; dos 50 aos 59 anos, de 3,9%; de 60 a 69 anos, de 8%; de 70 a 79 anos de 24,5% e mais de 80 anos, de 47,5%.

Baccaro et al. (2013), em seu estudo, buscou por fatores associados a fraturas por fragilidade óssea em mulheres acima de 50 anos de idade e obteve como resultado,

que a prevalência de fraturas por fragilidade óssea foi de 10,8%, sendo dessas 1,8% de fratura no quadril e associou esses resultados a um maior tempo de menopausa tendo a osteoporose como fator prevalente para as fraturas. Ressalta-se ainda que a pesquisa foi realizada com 622 mulheres cuja idade média foi de 64,1 anos.

Buttros et al.(2011) avaliou a densidade mineral óssea e os fatores de risco (idade, tempo de menopausa, tabagismo,uso da terapia de reposição hormonal (TRH), entre outros) associados à osteoporose na pós-menopausa. Das 431 mulheres avaliadas (40 a 75 anos), o pesquisador concluiu que 24,6% apresentaram osteoporose, 43,6% osteopenia e 31,8% eram normais. Das que apresentaram osteoporose, 12% estavam na faixa etária de 40 a 49 anos, 2,8% no grupo de 50 a 59 anos e 45,7% das mulheres tinham mais de 60 anos. A osteoporose ocorreu em 11,8% com o tempo de menopausa maior a 5 anos, de 29,4% com o tempo de 6 a 10 anos e de 41% acima de 10 anos. Portanto, conclui-se que os indicadores relevantes para detectar o risco de osteoporose aumentou com a idade e o tempo de menopausa quando comparados aos outros fatores de risco pesquisados.

A terapia de reposição hormonal

Na década de 70, a medicalização da menopausa ganhou força e seu discurso foi reforçado pelo seguimento médico que apontou a menopausa como uma doença e não mais como uma passagem ou marco natural na vida das mulheres. Paralelamente ao uso de medicamentos como o etinil estradiol, são realizados estudos para difundir as novas expectativas e achados de tal terapia para sintomas da menopausa (KAUFERT et al. 1986; TRENCH; SANTOS, 2005).

Já em 1980, a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1996), apontava recomendações que direcionavam os estudos para o futuro da prática clínica em menopausa. A OMS reconhece os benefícios da prática da TRH na redução de doenças cardiovasculares e na prevenção de osteoporose e, consequente, fraturas causadas pela doença óssea. Porém, a OMS sugeriu que mais estudos fossem continuados devido às evidências de relação da TRH com o aumento da incidência de

câncer de mama e do endométrio e também por haver poucos estudos conclusivos sobre tal relação (WHO, 1996).

O estudo de Whitehead et al. (1979) apontou indícios do risco de hiperplasia do endométrio pelo uso de estrógeno em mulheres na menopausa. Ainda nesta pesquisa, foi sugerido o uso combinado do estrógeno com a progesterona pelo fato de a progesterona poder possuir um efeito protetor do desenvolvimento de hiperplasia do endométrio e do carcinoma.

A reavaliação de mais de 90% de estudos epidemiológicos mundiais sobre a relação do risco de câncer de mama para mulheres em uso de TRH, demonstrou em análise que tal risco estava aumentando, principalmente para aquelas que faziam o uso prolongado desta terapia (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, 1997). Colditz et al. (1993), considerou em seu estudo o efeito do uso do estrógeno combinado à progesterona e concluiu que a progesterona não reduziu o risco de câncer de mama. Ainda em outro estudo, Colditz et al. (1995), apontou o risco do aumento de câncer de mama em mulheres idosas em uso da TRH.

Em uma pesquisa de 2003-A, The Women´s Health Inititive Randomized Trial (WHI) apontou resultados de que o uso de estrógenos mais a progesterona poderia estimular o desenvolvimento do câncer de mama. Porém, em 2006, a WHI publicou outro estudo, no qual os resultados contrastaram com o anterior e concluiu em sua pesquisa que em uso somente do estrógeno não há aumento do risco de câncer de mama, apesar de sugerir uma ressalva mostrando que a terapia com estrógeno deve ser usada somente por mulheres sem útero e recomenda para aquelas que ainda possuem este órgão o uso de hormônios combinados (estrógeno+progesterona) devido ao risco de câncer endometrial quando somente o estrógeno é usado.

A relação benéfica do estrógeno para riscos cardiovasculares são: melhora do perfil lipídico, do fluxo vascular arterial, da pressão arterial e do débito cardíaco, demonstrado pela Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia que em estudos observacionais apontam a diminuição da incidência e mortalidade por doença coronariana (FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA, 2008). Em um estudo observacional, Bush et al.(1987) obtiveram como resultado um índice da redução de ocorrência de infarto

agudo do miocárdio (IAM), ou mesmo de morte por IAM, em cerca de 50% para pacientes em uso do estrógeno. Porém, em estudo publicado em 2006, a WHI apontou que o estrógeno (conjugado de equino) não fornecia a proteção contra as doenças coronarianas isquêmicas e poderia aumentar o risco de infarto; relatou também que o uso de tal terapia no início da menopausa e na idade entre 50-59 anos, sugeriria um risco menor de doença cardíaca. Rossouw et al. (2007), em seu estudo, sugeriu que uso do estrógeno mais próximo à ocorrência da menopausa tende a ter um risco menor de doença cardíaca isquêmica quando comparadas àquelas com mais tempo de menopausa. Entretanto, devido a não ter significância estatística, sugeriu-se que tal terapia não seja usada com a finalidade de prevenção de doenças cardiovasculares, mas que o tempo de uso da TRH seja empregado para aliviar os sintomas vasomotores da menopausa por um curto período de tempo.

No Brasil, a posição do Ministério da Saúde em relação à TRH é que ela deve ser administrada para alívio dos sintomas desagradáveis relacionados à redução dos esteróides sexuais e que a dose ministrada deve ser mínima e ser interrompida assim que os sinais e sintomas apresentarem melhora. Ainda assinala que a TRH não deve ser utilizada com o propósito de prevenção primária ou secundária de doença cardiovascular, pois há terapias alternativas que se mostram eficazes para o tratamento (BRASIL,2008).

Outro benefício do uso do estrógeno, ou do estrógeno+progesterona, apontado pela WHO (1996), foi na ação protetora do hormônio na manutenção da densidade óssea nas mulheres na pós-menopausa. O estrógeno age na redução da remodelação óssea para níveis similares ao da pré-menopausa, assim reduz a taxa de perda do tecido ósseo e em consequência diminui as taxas de fraturas. Os efeitos da terapia persistem durante seu uso, sendo que na descontinuidade do tratamento eles cessam. Apontou-se também, que o uso do estrógeno anos depois da menopausa não fornecia proteção adequada às fraturas de quadril. A osteoporose também foi tema de estudo da WHI, que em 2003b, demonstrou que o uso da terapia hormonal aumentou a densidade mineral óssea, reduzindo o número de fraturas para até 34% no quadril e coluna e em 24% em outros locais comparada às mulheres não usuárias do hormônio. Costa-Paiva et al. (2003) em seu estudo de prevalência da osteoporose em mulheres na pós-

menopausa, conclui que a taxa de osteoporose e osteopenia é alta e mostrou que na coluna lombar o índice foi de 14,7% de osteoporose e 38% de osteopenia, e no fêmur esse índice foi respectivamente de 3,8% e 32,7%. Porém, Cauley et al. (2001), em seu estudo, não encontrou diferença estatística significativa, onde no grupo tratado a prevalência de fraturas foi de 26,3/1000 e no grupo placebo foi de 28/1000, logo sugeriu que mais estudos randomizados sejam realizados.

O Ministério da Saúde, em julho de 2002, publicou a Portaria MS/GM n°470 que aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para o Tratamento da Osteoporose e inclui o estrógeno como opção ao tratamento da osteoporose, além de calcitonina, carbonato de cálcio, vitamina D, entre outros. A indicação do Ministério da Saúde trouxe o estrógeno como não sendo a primeira opção de prevenção e tratamento esta doença, pois considerou, apesar de evidências clínicas, que o uso do hormônio pode estar relacionado ao aumento do risco de câncer de mama e do tromboembolismo (BRASIL, 2008). Em seu estudo, Lanzillotti et al. (2003) pesquisou os fatores de risco da osteoporose em mulheres na pós-menopausa, entre eles a ausência de atividade física, consumo inadequado de cálcio, tabagismo, entre outros, sendo que a ausência de terapia de reposição hormonal foi o fator de risco que indicou maior probabilidade de ocorrência da osteoporose.

Isoflavona

No final da década de 90 e início de 2000, chegou ao Brasil um tratamento alternativo à TRH. Tal terapia conhecida como fito-hormônio, tem origem vegetal com características semelhantes aos hormônios sintéticos (SÁ, 2012).

As isoflavonas, consideradas um fitoestrógeno, é um composto químico fenólico e está amplamente distribuída no reino vegetal, principalmente em leguminosas e soja, sendo que as principais isoflavonas encontradas na soja e seus derivados são a daidzeína, a genisteína e a gliciteina. Por ter uma estrutura não esteroidal e por comportarem-se como estrógenos na maioria dos sistemas biológicos, as isoflavonas despertam interesses de pesquisadores, pois podem conferir o controle de muitas doenças crônicas (ESTEVES; MONTEIRO, 2001).

Pesquisas experimentais e epidemiológicas demonstraram uma maior incidência de alguns tipos de câncer (mama, próstata e colón, entre outras) e doenças cardiovasculares na população ocidental, que é uma população exposta a menor quantidade de isoflavonas de soja na dieta. Modelos experimentais em animais também têm mostrado a ação protetora da isoflavona contra o câncer e doenças cardíacas. O fito-hormônio pode também prevenir a perda óssea pós-menopausa e a osteoporose. Tais efeitos da isoflavona parecem depender de suas propriedades agonistas-antagonistas dos estrógenos, ou derivar de outras propriedades bioquímicas, tais como a inibição da atividade enzimática e efeito antioxidante (BRANDI, 1997; BEDANI; ROSSI, 2005).

Em seu estudo, Barnes (1997) induziu câncer de mama em ratas e demonstrou que em tratamento com genisteína no período neonatal ou pré-pubertal, o tempo de latência antes do aparecimento de tumores de mama foi maior e com expressiva redução no número de tumores, provavelmente devido à ação preventiva da genisteína que possui atividade estrogênica, causando diferenciação das células das glândulas mamárias mais rápido. Também se demonstrou que nas ratas com 35 dias de idade, a administração de genisteína apresentou 27% de redução no risco de câncer de mama. Porém, em animais ovariectomizados, a genisteína apresentou aumento de proliferação de células cancerosas. O autor sugeriu futuras pesquisas sobre a potencial ação das isoflavonas de soja e seu efeito protetor do câncer.

Já para o efeito protetor da isoflavona na osteoporose, estudos têm sugerido que seu efeito benéfico no tecido ósseo é sua ação nos osteoblastos e osteoclastos. Pesquisas demonstraram que a genisteina e o estradiol em altas doses são tóxicos às células ósseas, mas que em baixas concentrações a genisteina e o estradiol aumentam a produção de biomarcadores ósseos e fosfatase alcalina de modo parecido (PICHERIT et al. 2000; WILLIAMS et al. 1998). Em um estudo posterior, onde os tecidos femorais de ratos foram investigados, as amostras contendo genisteína apresentaram um decréscimo no número de osteoclastos; ainda quando os osteoclastos foram isolados e cultivados em genisteína, por 24h, a atividade da proteína tirosina quinase foi significamente reduzida e a atividade de proteína tirosina fosfatase foi significativamente elevada. Portanto, os autores sugeriram que a genisteína possuía um

efeito supressor nos osteoclastos e esteve parcialmente envolvida na inibição da proteína tirosina quinase e na ativação da proteína tirosina fosfatase de osteoclastos (GAO; YAMAGUCHI, 2000).

Em estudo feito por Ishida et al.(1998) com ratas ovariectomizadas e com dieta deficiente em cálcio e tratadas com genisteína e daidzeina por 4 semanas, demonstrou-se que os ossos do fêmur dos animais tratados com genisteina e daidzeina tiveram resultados positivos em relação à prevenção da densidade, força, quebra, cinzas, peso e conteúdo de cálcio e fósforo. Este efeito preventivo do tratamento com daidzeína sobre a perda óssea em ratas ovariectomizadas parece ser devido ao efeito supressor do *turn-over* ósseo, apesar de fazer necessário clarear o mecanismo de ação de daidzeína e da genisteina na prevenção da perda óssea após a ovariectomia, para então estabelecer se estas isoflavonas têm potencial valor clínico (ISHIDA et al. 1998).

Arjmandi et al. (1998) em seu estudo utilizaram ratas ovariectomizadas com ou sem tratamento de reposição hormonal. Os grupos das ratas que receberam uma dieta baseada em isolado de proteína de soja (22,7/100g de dieta) por 35 e 65 dias, apresentaram uma efetiva ação protetora da perda óssea, provavelmente devido à deficiência de hormônio ovariano, promovendo assim maior densidade mineral óssea de fêmures e vértebras em especial, principalmente aquelas que receberam por tempo prolongado a dieta, quando comparadas ao grupo de ratas ovariectomizadas sem tratamento (ARJMANDI et al.1998).

Picherit et al.(2000), em um estudo comparativo utilizando ratas ovariectomizadas, com grupos de não tratadas, e tratadas com genisteína, daidzeína e 17 α-etinilestradiol, demonstraram como resultado que as ratas que consumiram o 17 α-etinilestradiol e daidzeína foram mais eficazes na prevenção da perda óssea induzida pela ovariectomia do que a genisteína. E que nem a daidzeína ou a genisteína tiveram atividade estrogênica no útero.

Tanaka (2008) pesquisou a relação entre uma dieta rica em isoflavona e a doença periodontal em mulheres japonesas, entre 18 e 22 anos, sugeriu uma probabilidade de diminuição da doença periodontal frente à ação das isoflavonas, uma vez que das 3.956 mulheres pesquisadas, a prevalência de doença periodontal foi de 8,0% e dessas, 30% apresentaram diminuição da doença periodontal sugerida por uma

ingestão diária de isoflavona com dose diária de consumo de 7709.0 KJ, uma vez que tal relação da dose de consumo da isoflavona também apresentou uma diminuição da prevalência da doença periodontal. Logo, sugeriu-se que maiores investigações do tema fossem realizadas a fim de confirmar estes achados.

A doença periodontal

Uma estimativa da WHO (2005) aponta que, na população mundial, entre 10 a 15% dos adultos podem estar acometidos pela doença periodontal. No Brasil, em 2003, a estimativa na faixa etária entre 35 e 44 anos, e entre 65 e 74 anos respectivamente foi de 21,9% e 7,9%, sendo que o grupo de idosos com essa baixa taxa provavelmente se justificou pela grande proporção de perda de dentes e da precariedade da higiene bucal (BRASIL, 2003).

O periodonto, também denominado de tecido de suporte dos dentes, compreende as seguintes estruturas: gengiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar apresentando como principal função garantir a integridade da superfície da mucosa mastigatória (LINDHE; KARRING; LANG, 2010; NANCI; BOSSHARDT, 2006). Segundo a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal de 2010, mais conhecido como SB Brasil, os problemas gengivais aumentam, de modo geral, com a idade. Os resultados da pesquisa indicaram que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal foi de 68% para a idade de 12 anos, 51% para a faixa de 15 a 19 anos, 17% para os adultos de 35 a 44 anos e somente 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos (BRASIL, 2014).

A inflamação periodontal caracteriza-se por um processo de destruição das estruturas de suporte dos dentes e está associada à infecção por bactérias gram-negativas, que produzem polissacarídeos e endotoxinas resultando em aumento de mediadores biológicos como prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 1β (IL-1β). A IL-1β é um dos mais potentes mediadores de reabsorção óssea, estimulando a diferenciação e ativação dos osteoclastos e inibindo também a formação óssea. O desenvolvimento da periodontite é influenciado pela combinação de fatores genéticos e ambientais, fatores de risco, tais como: obesidade, fumo, estresse,

diabetes, deficiência nutricional, uso de medicamento, que têm sido considerados fatores de inclusão novos em relação à progressão da doença periodontal, bem como a osteoporose, que surge como um novo fator de estudo a ser investigado com sua relação à periodontite (BERTULUCCI et al. 2012; PASSOS et al. 2010).

A doença periodontal acontece quando, a partir do acúmulo de biofilme dental, inicia-se um desequilíbrio entre a agressão microbiana e a resposta do hospedeiro, levando a um aumento de bactérias no tecido periodontal. Dessa maneira, dependendo da resposta do hospedeiro, a gengivite quando não tratada, pode evoluir para periodontite resultando em inflamação e destruição progressiva dos tecidos de suporte afetando sistemicamente o organismo humano através de mediadores inflamatórios. Clinicamente, a periodontite caracteriza-se pela perda de inserção, acompanhada pela formação de bolsa e reabsorção óssea (CARRANZA; NEWMAN, 2007).

A patogenia da periodontite é uma associação do acúmulo do biofilme dental, associado aos hospedeiros predominantemente por bactérias Gram-negativas, incluindo *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Bacterids forsythus*. A ação de antígenos, lipossacarídeos e outros fatores virulentos, estimulam os hospedeiros resultando na inflamação gengival e início da periodontite. A ação bacteriana estimula a produção de neutrófilos e anticorpos e possivelmente da liberação de citocinas inflamatórias, fator- β (TGF-β), interleucina-4 (IL-4), IL-10 e IL-12. Também ocorrem distúrbios homeostáticos, resultando na liberação de mediadores pró-inflamatórios, como: IL1, IL6, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), proteases, prostanóides (prostaglandina E_2), podendo causar destruição da matriz extracelular da gengiva e estimular a reabsorção óssea (ORINGER et al. 2002; PAGE, 1998).

A doença periodontal, sendo uma infecção oral crônica, recentemente tem indicativos de relação direta com doenças sistêmicas e seus efeitos. Essa suscetibilidade de interação com doenças sistêmicas pode ocorrer ao fato de que os lipossacarídeos e a viabilidade das bactérias gram-negativas no biofilme dental, bem como as citocinas inflamatórias dos tecidos do periodonto, podem entrar para corrente sanguínea em níveis patológicos. A severidade da doença periodontal é um fator de risco elevado para certas doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, aterosclerose e diabetes mellitus (IACOPINO; CUTLER, 2000; PAGE, 1998).

Outra doença sistêmica, como a osteoporose, vem sendo apontada como um risco em relação com a doença periodontal. Pode ocorrer que em pacientes com doença periodontal e osteoporose na pós-menopausa, a falta de estrógeno influencie nas atividades das células do osso e das células imunitárias, aumentando a progressão da perda óssea. O estrógeno também poderia influenciar na remodelação óssea em sítios com processos inflamatórios, uma vez que as células do ligamento periodontal expressam receptores específicos para os estrogênios (LERNER, 2006).

A periodontia, a menopausa e a osteoporose

As alterações hormonais nas mulheres, a exemplo da menopausa, podem ser mediadores de inflamação dos tecidos periodontais, em especial a gengiva, onde a interação da progesterona com o estrógeno e suas oscilações apresentam alterações clínicas no periodonto, uma vez que suas células são tecidos alvo dos hormônios esteróides (SANTOS et al. 2008). A redução dos estrogênios séricos promoveria maior perda óssea trabecular do que cortical. No climatério a saúde bucal pode ser prejudicada de várias formas, como com doenças periodontais severas, perdas dentais, entre outros (MORAES et al. 2013).

A osteoporose pós-menopausa, está diretamente relacionada ao hipoestrogenismo, acarretando aceleração da atividade de reabsorção e aumentando o *turn-over* desse tecido, levando a uma perda óssea excessiva, atingindo ossos da maxila, mandíbula e ossos longos. A osteoporose tem sido evidenciada em estudos e sua correlação com a periodontia pode ser devido à diminuição na densidade da massa óssea esquelética, massa óssea alveolar interproximal e a perda de inserção clínica em pacientes com doença periodontal (CAMPOS et al. 2009).

Pallos et al. (2006) pesquisaram se a menopausa era um fator de risco para a periodontite. Das 46 mulheres avaliadas, entre 44 e 68 anos de idade, houve uma avaliação de parâmetros periodontais comparado aos níveis de estrógeno e da densidade óssea mineral. Logo o estudo demonstrou dados que não correlacionavam a doença periodontal com a menopausa e osteoporose.

Bertulucci et al.(2008) pesquisaram a mesma relação demonstrada no estudo com 99 mulheres na pós-menopausa, na qual avaliou-se a condição periodontal e comparou-a com a osteoporose pela avaliação da densidade mineral óssea. Os resultados demonstraram que o grupo de mulheres com osteoporose apresentou maior percentual de doença periodontal e teve como conclusão que a osteoporose pode ter uma influência na condição periodontal, por haver relação entre periodontite e osteoporose em mulheres na pós-menopausa. Este estudo foi corroborado por Mohammad; Brunsvold (1996), que em estudo de relação entra a osteoporose pós-menopausa e a doença periodontal, observou-se 20 mulheres entre as idades de 50 a 75 anos, onde as condições periodontais foram comparadas à densidade óssea mineral e sugeriram que a osteoporose como doença sistêmica pode contribuir para doença periodontal.

Em outro estudo de associação da osteoporose com a doença periodontal, 39 mulheres na pós-menopausa foram avaliadas quanto à categorização da massa óssea, bem como a situação periodontal e, naquelas onde a osteoporose estava presente, a média de doença periodontal foi mais significante, levando à conclusão que a osteoporose na pós-menopausa poderia ser considerada como possível fator de risco para doença periodontal (LOPES et al., 2008).

Assim Passos et al. (2010) e Lopes et al. (2008) concluíram através das divergências nos estudos, que apontam a osteoporose pós-menopausa como fator de risco à doença periodontal, que o conhecimento atual ainda é insuficiente e requer mais estudos sobre o tema e também acerca dos reais mecanismos biológicos que relacionam essas evidências

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRIGHI, J.M.; ALDRIGHI,C.M.S.; ALDRIGHI, A.P.S. Alterações sistêmicas no climatério. Disponível em: http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=2168. Acesso em: 13/10/2014.

ALLENSPACH-PETRZILKA, G.E.; GUGGENHEIM, B. Bacterial invasion of the periodontium: an important factor in the pathogenesis of periodontitis? **J Clin Periodontol**. 10(6): 609-17. Nov, 1983.

AMADEI, U.A.; et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **Bras Patol Med Lab.** v. 42.n 1.p.5-12. Fev, 2006.

AMATYKUL, S. et al. Effects of genistein supplementation on gingival blood flow disturbances after menopause: in vivo study using ovarectomized rats. **Asian Biom**. vol. 1. n˚ 4. p. 421-4. December, 2007.

ARJMANDI, B.H.; et al. Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone deficiency in rats. **Am J Clin Nutr**. 68(supl):1358S-63S. 1998.

ASIKAINEN, S. Occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and spirochetes in relation to age localized juvenile periodontis. **J. Periodontol.** 57(9):537-41. 1986.

BACCARO, L.F.; et al. Factors associated with fragility fractures in women over 50 years of age: a population-based household survey. **Rev Bras Ginecol Obst**. 35(11):497-502. 2013.

BARNES, S. The chemo preventive properties of soy isoflavonoids in animal models of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. n. 46.169-179, 1997.

BASTOS, A. A.; FALCÃO, C.B.; PEREIRA, A. L. A.; PEREIRA, A. F. V.; ALVES, C. M. C. Obesidade e Doença Periodontal. **Pesq. Bras. Odontoped. Clin. Intergr**. v.5. n.3. p. 275-279, 2005.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A. Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. **B. CEPPA.** v.3. n.2. Jul/Dez. 2005.

BERTULUCCI, L.A.B. et al. Doença periodontal em mulheres na pós-menopausa e sua relação com a osteoporose. **Rev Brasi Ginecol Obst**. 34(12):563-7. 2012.

BRANDÃO, C.M.R.; MACHADO, G.P.M.; ACURCIO, F.A. Análise fármaco-econômica das estratégias de tratamento da osteoporose em mulheres nas pós-menopausa: uma revisão sistemática. **Revista Bras. Reumatol.** 52(6):912-937.2012.

BRANDI, M.L. Natural and Synthetic Isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. **Calcif Tissue** Int.61:S5-S8.1997.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. MANUAL DE ATENÇÃO À MULHER NO CLIMATÉRIO/MENOPAUSA**.** Série A. Normas e Manuais Técnicos. Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos-Caderno n˚9. Brasília-DF, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Condições de saúde bucal da população brasileira-SB. Brasil 2003.

BRASIL, Pesquisa Nacional de Saúde Bucal-2010. Brasil, 2010.

BUSH, T.L et al. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study**. Pathophysiology and Natural History –Coronary Artery Disease**. v.75. v.6. Feb.1987.

BUTTROS, D.A.B.; et al. Fatores de risco para osteoporose em mulheres na pós-menopausa do sudeste brasileiro. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 33(6):295-302. 2011.

CAMPOS, M.L.G. et al. A deficiência de estrogênio e a osteoporose com paradigmas atuais em periodontia. **R. Period**. v.19. n.03. Setembro, 2009.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. Periodontia Clínica. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.

CAULEY, J.A. et al. Effects of hormone therapy on clinical fractures and height loss: the heart and estrogen/progestin replacement study (HERS).**The Amer J of Med.** v.10. April, 2001.

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52, 705 women with breast cancer and 108, 411 women without breast cancer. **Lancet**. 350(9084):1047–1059. 1997.

COLDITZ, G.A.; EGAN, K.M.; SATMPFER, M.J. Hormone replacement therapy and risk of breast cancer: Results from epidemiologic studies**. AmJ Obstet Gynecol**. May, 1993.

COLDITZ, G.A. et al. The use of estrogens and progestin and the risk of breast cancer in postmenopausal women**. The New Eng J of Med**. v.332. June, 1995.

COMPSTON, J.E. Sex steroids and Bone. **Physiological Reviews.** vol.81. n. 1. Jan, 2001.

COSTA-PAIVA,L. et al. Prevalência de osteoporose em mulheres na pós-menopausa e associação com fatores clínicos e reprodutivos. **RBGO**. v.25. n.7. 2003.

CHRISTERSSON, C.E.; DUNFORD, R.G.; GLANTZ, P.O., BAIER, R.E. Effect of critical surface tension or retention of oral microorganisms. **Scand J Dent Res.** 97(3):247-56. 1989.

CUTOLO, M.; SULLI, A.; SERIOLO, B.; ACCARDO, S.; MAIS, A.T. Estogens, the immune response and autoimmunity. **Clin Exp. Rheumatol**. v.13. n.2. p.217-26, 1995.

ESTEVES, E.A.; MONTEIRO, J.B.R. Efeitos benéficos das isoflavonas em doenças crônicas. **Rev. Nut. Campinas**.14(1)43-52. 2001.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. Projeto Diretrizes: Climatério: Atenção primária e terapia hormonal. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Jun, 2008.

FONSECA, H.; et al. Voluntary exercise has long-term in vivo protective effects on osteocyte viability and bone strength following ovariectomy. **Calcified Tissue International**. v.88. p.443-454. 2011.

GAO, Y.H.; YAMAGUCHI, M. Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. **International Journal of Molecular Medicine**. March, 2000.

IACOPINO, A.M.; CUTLER, C.W. Pathophysiological relationships between periodontitis and systemic disease: recent concepts involving serum lipids. **J Periodontol**. vol.71. n.8. August, 2000.

ISHIDA, H. et al. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. **Biol. Pharm. Bull**. 21(1)62-66. 1998.

KAUFERT, P. et al. Menopause research: the korpilampi workshop. **Pergamon Journals.** v.22.n.11. 1986.

LANZILLOTTI, H.S. et al. Osteoporose em mulheres na pós menopausa, cálcio dietético e outros fatores de risco. **Rev. Nutr. Campinas**.16(2):181-193. 2003

LERNER, U.H. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. **J Dent Res.** 85(7):596-607, 2006.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. Clinical periodontology and implant dentistry. 5th edition. Copenhagen: Blakwell Munskgaard. 2010.

LOPES, F.F. et.al. Associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós-menopausa. **Rev Bras Ginecol Obst.** 30(8):379-83. 2008.

MATT, W.D.W. et al. Characteristics of luteinizing hormone secretion in younger versus older premenopausal women. **Am J Obstet Gynecol.** v.178.n.3. March, 1998.

MESEGUER, A.; PUCHE, C.; CABERO, A. Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. **Hormone Metabolic Research**. v.34. p.731-6. 2002.

MOHAMMAD, A.R.; BRUNSVOLD, M. The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease.**The Int J of Prost**. v.9. n.5. 1996.

MORAES, T.G. et al. Prevalência da doença periodontal em mulheres menopausadas atendidas na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. **Reprod Clim.** 28(2): 61-67. 2013.

NANCI, A.; BOSSHARDT,D.D. Structure of periodontal tissues in health and disease. **Period. 2000**. vol. 40. 2006.

NASCIMENTO, C. M.; CASSOL, T.; SILVA, F. S.; BONFLEUR, M. L.; NASSAR, C. A.; NASSAR, P. O. Radiographic evaluation of the effect of obesity on alveolar bone in rats with ligadure-induced periodontal disease. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**. v. 6. p. 365-370. 2013.

OCARINO, N. M. et al*.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**. v.19. p.320-325. 2008.

ORINGER, R.J. et al. Effect of Locally Delivered Minocycline Microspheres on Markers of Bone Resorption. **J Periodontol.** vol.73. n.8. August, 2002.

PAGE, R.C. The Pathobiology of periodontal disease may affect systemic diseases: Inversion of a paradigm. **Annals of Periodontology**. vol3. n.1. July, 1998.

PALLOS,D. et al. Menopausa: fator de risco para doença periodontal? **Rev. Bras. Ginecol. Obst**. vol. 28. n.5. Rio de Janeiro, Mai, 2006.

PASSOS, J.S.P. et al. A influência da osteoporose pós-menopausal na condição periodontal -uma revisão de literatura. **R. Ci. med. biol**. 9(2):157-162. 2010.

PEDRO, A.O. et al. Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar**. Cad. Saúde Pública**. 19(1):17-25,Rio de Janeiro, Jan-Fev, 2003.

PICHERIT, C. et al. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. **The J. of Nut.** 2000.

POLI, M.E.H.; SCHWANKE, C.H.A.; CRUZ, I.B.M. A menopausa na visão gerontológica**. Scientia Medica**. vol2. p.176-184.Porto Alegre, 2010.

RADOMINSKI, S.C. et al. Osteoporose em mulheres na pós-menopausa. **Rev Bras Reumatol**. v.44. n. 6.P.426-34. Dez, 2004.

RAMALHO, A.; CASTRO; M.L. Fisiopatologia da osteoporose Involutiva. **Arq Bras Endocrinol Metab**. vol.42. n.6. Dezembro, 2006.

ROSSOUW, J.E. et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. **JAMA**, 2007.

RUSSO, L.A.T. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. **Arq. Bras Endocrinol Metab.** vol.45.n^{0} 4. Agosto, 2001.

SÁ, I.M. Fito-hormônios: ciência e natureza no tratamento do climatério. **Physis.Rev de Saúde Col**. 22(4):1503-1522. 2012.

SANTOS, P.A.T. et al. Influência dos hormônios sexuais sobre os tecidos periodontais em usuárias de contraceptivos hormonais. **R. Period**. v.18. n.1. Março, 2008.

TANAKA,K. et al. Relationship between soy and isoflavone intake and periodontal disease: the freshmen in dietetic courses study II. **BMC Public Health**. 8:39. 2008.

THE WOMEN´S HEALTH INITIATIVE RANDOMIZED TRAIL, WHI. WHI updated analysis: No increased risk of breast cancer with Estrogen-alone**.** April, 2006.

THE WOMEN´S HEALTH INITIATIVE RANDOMIZED TRAIL, WHI. Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women. JAMA. v.289. n.24. June, 2003-a.

THE WOMEN´S HEALTH INITIATIVE RANDOMIZED TRAIL, WHI. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density. JAMA. v.290. n.13. Octber, 2003-b.

TRENCH, B.; SANTOS, C.G. MENOPAUSA OU MENOPAUSAS? **Saúde e Sociedade** .v.14. n.1. p.91-100. Jan-Abr, 2005.

VENKEN, K.; CALLWAERT, F.; BOONEN, S.; VANDERSCHEREN, D. Sex hormones, their receptors and bone health. **Osteoporosis International**, v.19. p.1517–1525. 2008.

WEITZMANN, M. N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **The J of Clin Invest**. v.116. p.1186-1194. 2006.

WILLIAMS, J.P.; JORDAN, S.E.; BARNES, S.; BLAIR, H.C. Tyrosine kinase innibitor effects on avian osteoclastic acid transport[1-3]. **Am J. Clin Nutr**. 68(supl):1369S-74S.1998.

WISE, P.M. et al. Neuroendocrine Influences and Repercussions of the Menopause. **Endocrine Reviews**. v.20. n3. 243-248. 1999.

WHITEHEAD, M.I. et al. Endometrial histology and biochemistry in climacteric women during oestrogen and oestrogen/progestogentherapy. **J of the Royal Soc of Med**. v72. May, 1979.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. Geneva, 1994.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION.REASERCH ON THE MENOPAUSE IN THE 1990s**.** Geneva, 1996.

WHO - WORLD HEALTH OGANIZATION. Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. 2005.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Sumary Meeting Report Brussels, Belgium, 5-7, May, 2004. Publicado em 2007.

ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO FITOESTRÓGENO SOBRE O TECIDO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATAS OVARIECTOMIZADAS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA.

Carolina de Cássia Boamorte[δ], Laís Fernanda Pasqualotto[*], Rose Meire Costa Brancalhão[¥], Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro[Ω], Patricia Oehlmeyer Nassar[#], Sara Cristina Sagae[§], Carlos Augusto Nassar[+]

[δ] Carolina de Cassia Boamorte - Mestrado em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

[*] Laís Fernanda Pasqualotto - Acadêmica do Curso de Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

[¥] Rose Meire Costa Brancalhão – Bióloga. DDS em Biologia Funcional e Molecular. Professora Adjunta do Programa Strictu Sensu em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

[Ω] Lucinéia de Fátima Chasko Ribeiro – Bióloga. DDS em Biologia Funcional e Molecular. Professora Adjunta do Programa Strictu Sensu em Biociências e Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

[#] Patricia Oehlmeyer Nassar - Cirurgiã-Dentista. DDS em Periodontia. Professora Adjunta de curso de Odontologia e Programas de Pós-Graduação em Biociências, Saúde e Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil

[§] Sara Cristina Sagae - Bióloga. DDS em Biologia Funcional e Molecular. Professora Adjunta no Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil.

[+] Carlos Augusto Nassar - Cirurgião-Dentista. DDS em Periodontia. Professor Associado de curso de Odontologia e Programas de Pós-Graduação em Biociências, Saúde e Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brasil

Autor Correspondente: Carlos Augusto Nassar, DDS, Periodontia, Curso de Odontologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná– UNIOESTE, Cascavel, Paraná, Brasil. Rua Pernambuco, 593 – apto 504 – Centro –CEP 85810-020 – Centro – Cascavel – Paraná – Brazil. Fone: + 55 45 91170903 e-mail: canassar@yahoo.com

RESUMO

A osteoporose pode ser um fator de risco para doença periodontal. Uma das alternativas, para prevenção de perda óssea nessas condições é a terapia de reposição hormonal com isoflavona, um fito-hormônio com ação similar ao estrógeno. O objetivo desse estudo foi avaliar a ação da isoflavona no tecido ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas com peridontite induzida. Sessenta ratas fêmeas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos: Controle; Ligadura; Ovariectomia; Ovariectomia e Fitoestrógeno ; Ovariectomia e Ligadura ; Ovariectomia, Fitoestrógeno e Ligadura, sendo que todos os animais receberam dieta padrão e água a vontade. Aos 70 dias de vida, os animais foram induzidos a uma periodontite experimental e após este procedimento, aos 79 dias, foram submetidas à cirurgia de ovariectomia. A ligadura atuou por 30 dias e a isoflavona foi administrada por 21 dias. Aos 100 dias, as ratas foram eutanasiadas e retirada a mandíbula para análises macroscópica, microscópica e radiográfica. Como resultado das análises, foi observado que os grupos com fitoestrógeno apresentaram menor perda óssea alveolar do que os grupos que não receberam terapia com isoflavona ($p < 0.05$). Logo, a isoflavona pode conferir um efeito protetor à perda óssea alveolar, na progressão da doença periodontal, agravada pela osteoporose.

Palavras-chave : periodontite, pós-menopausa, osteoporose, isoflavona.

INTRODUÇÃO

A menopausa referida como a última menstruação é um período de inatividade reprodutiva, que confere às mulheres queda na produção hormonal, principalmente do estradiol, impedindo a proliferação do endotélio. Tal ciclo do sistema reprodutor feminino, também conhecido por climatério traz consequências biológicas, psicológicas e sociais. (1). O hipoestrogenismo da pós-menopausa pode acarretar em alterações fisiológicas, ao longo da idade. (2).

Na pós-menopausa, as consequências biológicas aparecem na forma de algumas doenças devido às alterações hormonais, que entre essas, são responsáveis pela diminuição da massa óssea, caracterizando às mulheres uma suscetibilidade a desenvolver osteoporose (3). Essa doença óssea – metabólica –, considerada uma disfunção sistêmica, altera a microarquitetura dos ossos, inclusive os da face (4), podendo influenciar, dentre outras doenças, na progressão de doenças periodontais (5).

Outra doença que afeta grande proporção da população é a periodontite, onde sua natureza polimicrobiana orquestra um mecanismo complexo de inflamação que é caracterizado por destruição das fibras colágenas, outros constituintes da matriz do ligamento periodontal e do osso alveolar, em conjunto com a formação de bolsas periodontais (6,7). É causada predominantemente por bactérias que liberam endotoxinas que ativam citocinas pró-inflamatórias (interleucina 1 - IL1; fator de necrose tumoral alfa - TNF-α; entre outras) que afetam os tecidos de suporte dos dentes (8,9).

Tanto a osteoporose quanto a doença periodontal causam perda óssea, e a relação das duas doenças é na interação de fatores sistêmicos da osteoporose com fatores locais da periodontite, agravando o padrão de perda óssea alveolar. Estudos com mulheres indicam que a relação da osteoporese na pós-menopausa com a progressão da doença periodontal, tem se mostrado positiva (10,11). Entretanto, outros estudos (12,13,14) demonstraram que essa correlação não foi relevante e que, portanto, o conhecimento atual ainda é insuficiente e requer mais estudos sobre o tema e também sobre os reais mecanismos biológicos que relacionam essas evidências.

A terapia de reposição hormonal com estrógeno tem sido utilizada para mulheres na pós-menopausa, porém estudos vêm demonstrando os malefícios de tal reposição, como riscos para desenvolver doenças cardíacas e câncer de mama. Entretanto, a

prática da reposição hormonal traz benefícios, entre outros, no controle da osteoporose (15, 16). Estudo como da The Women´s Heatlh Initiative Randomized Trail (WHI), 2003-a (15), mostrou que uso combinado de estrógeno com progesterona, poderia estimular o desenvolvimento do câncer de mama. Então, terapias alternativas passaram a ser consideradas, sendo que os compostos similares ao estrógeno não apresentaram tais efeitos colaterais, com destaque para as isoflavonas de soja, fitoestrógenos que têm se mostrado eficazes e bem aceitos para tal objetivo (16,17,18,19).

Aquino et al. (20) em estudo longitudinal no Brasil, com 3.281 mulheres das regiões sul, nordeste e sudeste, pesquisaram quais dessas mulheres ainda utilizavam a terapia de reposição hormonal (TRH) e obtiveram como resultado que 27,4% da mulheres utilizavam esta terapia, contrariando aos dados desse mesmo grupo de estudo que em 1997 era de 55,7%, as mulheres que ainda faziam uso da TRH, excedendo largamente o limite de idade recomendado, o tempo de menopausa e o tempo de uso.

Shifren J.L., Gass M.L.S. (21) em estudo realizado para a Associação Norte Americana de menopausa para Cuidados Clínicos para as mulheres de meia-idade, trouxeram recomendações sobre a utilização da terapia hormonal onde o uso da TRH poderia ser apropriado para mulheres sintomáticas ou para prevenção de osteoporose.

Evidências mostram que as isoflavonas protegem contra várias doenças crônicas e atuam na prevenção da perda óssea na pós-menopausa e na osteoporose (22,23). Sua ação seria nas células ósseas, onde a isoflavona pode apresentar um efeito supressor no número de osteoclasto (24).

Há controvérsias em estudos na relação da osteoporose na pós-menopausa como sendo um fator de risco para doença periodontal (10,12). Porém, tem se estudado nas últimas décadas os efeitos dos fitoestrógenos, apesar de não ter sido descrito claramente qual seu mecanismo de ação (25). Logo, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da isoflavona no tecido ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas com peridontite induzida.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, experimental, realizada no laboratório de Biologia Celular (Biocel) e Fisologia e Biofísica do CCBS da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), na cidade de Cascavel, Paraná, Brasil.

- Animais

Foram utilizadas 60 Ratas *Wistar* fêmeas (peso corporal entre 180-350 g) provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) e que foram mantidas em biotério setorial do laboratório de Fisiologia e Biofísica do CCBS em caixas individuais em ambiente com ciclo claro-escuro (luzes acesas às 07:00 horas e apagadas às 19:00 horas) e temperatura controlados. Os animais tiveram livre acesso à água e alimento e foram separadas em caixas individuais em grupos de 3-5 por caixa (41 cm de comprimento X 34 cm de largura X 17 cm altura).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIOESTE (Anexo), estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

- Grupos Experimentais

Os animais foram divididos em 6 grupos, cada grupo contendo 10 ratas, número esse baseado em prévio estudo realizado pelo grupo de pesquisadores (26), totalizando assim 60 ratas para o experimento.

1- Grupo Controle (CON);

2- Grupo Ligadura (LIG): onde foi induzida a doença periodontal por ligadura;

3- Grupo Ovariectomia(OVX): ratas submetidas à ovariectomia;

4- Grupo Ovariectomia e Fitoestrógeno (OVX+FIT): ratas submetidas à ovariectomia e reposição hormonal com fitoestrógeno;

5- Grupo Ovariectomia e Ligadura (OVX+LIG): ratas submetidas à ovariectomia e indução da doença periodontal por ligadura.

6- Grupo Ovariectomia, Fitoestrógeno e Ligadura (OVX+FIT+LIG): ratas submetidas à ovariectomia e reposição hormonal com fitoestrógeno, onde foi induzida doença periodontal por ligadura.

Após a divisão aleatória dos grupos, os animais foram submetidos ao procedimento de indução da doença periodontal, por ligadura, sendo um total de 30 ratas dos grupos assinalados por LIG. Os animais submetidos à cirurgia de retirada dos ovários para indução da menopausa foi de um total de 40 ratas, assinaladas por OVX. As ratas que receberam a dose de isoflavona como terapia de reposição hormonal, após a indução da menopausa, foram de 20 ratas, identificado por FIT.

- Indução da Doença Periodontal

Aos 70 dias de vida os animais foram anestesiados (xilazina 0,04 mL/100 g e quetamina 0,08 mL/100 g) e posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma pinça modificada e de uma sonda exploradora, foi colocado um fio de algodão número 40 ao redor do primeiro molar inferior direito. Esta ligadura atuou como irritante gengival por 30 dias, favorecendo o acúmulo de placa bacteriana e consequente desenvolvimento da doença periodontal (26).

- Ovariectomia e reposição hormonal:

Aos 79 dias de vida, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (Dopalen, 100 mg / kg de peso corporal, ip) e xilazina (Anadesan, 14 mg / kg de peso corporal, ip), sendo posteriormente feita uma incisão na pele entre a última costela e a coxa, realizada no tecido subcutâneo e músculo. Uma ligadura foi realizada logo abaixo da tuba uterina e o ovário foi isolado e retirado. As camadas muscular e cutânea foram suturadas separadamente. O ovário do lado oposto foi removido através do mesmo

processo. Após a cirurgia, as ratas foram tratadas com pentabiótico (Fort Dodge, 0,1 ml / rato, IM) e analgésico (meglumina Fluxinin, Banamine; Schering-Plough, 2,5 mg / kg, SC) e colocadas em gaiolas individuais. A reposição hormonal dos grupos OVX+FIT e OVX+FIT+LIG foi realizada com isoflavona, diluída e aplicada por via subcutânea (0,25 mg / kg / dia, SC) durante 21 dias (27).

- Descalcificação, processamento histológico e inclusão em blocos de parafina

Após a eutanásia dos animais, as hemi-mandíbulas do lado direito obtidas foram fixadas em solução de formol a 10% por 24 horas. Após este período, foram lavadas em água corrente por 1 hora e imersas em solução de ácido tricloracético, preparado da seguinte forma: 100 ml de água destilada, para 5 ml de ácido. As peças foram mantidas na solução descalcificadora por 20 dias, sendo que, diariamente, se verificava o grau de descalcificação e a cada 5 dias a solução de ácido tricloracético era trocada. Após esse intervalo de tempo, as peças foram colocadas em solução de Sulfato de Sódio a 5% por três horas e meia para neutralização do ácido; posteriormente, as peças foram lavadas em água corrente por doze horas e em seguida realizou-se a desidratação e diafanização das peças. A partir daí, as peças foram inclusas em parafina, obtendo-se 60 blocos que foram seccionados, por um micrótomo semi-automático, em cortes de 7µm cada. Foram confeccionadas as lâminas por grupo, sendo que cada lâmina apresentava 4 cortes seriados, totalizando 40 cortes por grupo; as lâminas foram coradas utilizando-se a técnica histológica de hematoxilina e eosina.

- Observações microscópicas

A análise microscópica foi realizada por um único examinador através da avaliação dos cortes histológicos corados. As lâminas foram analisadas com auxílio de um microscópio de luz transmitida comumente (Leica Microsystems, Switzerland) para observações morfológicas do tecido gengival, processo alveolar e contagem de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos das hemimandíbulas dos animais.

- Morfometria da gengiva

As medidas morfométricas foram feitas nas gengivas marginais, vestibular e lingual direita em todos os grupos, utilizando-se um programa analisador de imagens acoplado a um microscópio de luz com objetiva de 10x, a intervalos de 10 cortes entre uma contagem e outra no seriamento dos cortes (cerca de 70 µm).

As mensurações foram feitas a partir de pontos morfológicos pré-determinados na gengiva marginal, como ilustrado na Figura 1. Os resultados foram expressos em µm.

- Morfometria do osso

Foi realizada a quantificação de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos presentes em cinco campos consecutivos da crista óssea alveolar vestibular partindo do ponto mais alto da crista. Para a observação foi utilizado o aumento de 100 vezes em imersão no microscópio. Foram feitas duas observações por campo e, então, foi feito a média dos valores para cada animal e para cada grupo.

A medida da crista óssea alveolar foi realizada através de um microscópio acoplado a um computador, o que permitiu capturar as imagens através do software LazEz®. Foi realizada uma medida da menor distância entre o ápice da crista óssea alveolar vestibular e a junção cemento-esmalte. As medidas foram repetidas uma vez por dia, em três dias diferentes, e então foi feito a média entre os valores.

- Análise Radiográfica

Logo após o sacrifício, a hemimandíbula do lado esquerdo de cada animal foi retirada, fixada em formol tamponado (pH 7,2) durante 48 horas. As hemimandíbulas foram colocadas com o lado vestibular sobre o filme radiográfico periapical (AGFA DENTUS®, Ultraspeed) e posicionadas para que as cúspides vestibulares e linguais dos primeiros molares fiquem no mesmo plano vertical. Foi utilizado aparelho de raio X GE – 1000, regulado para 15mA, 65Vp, 18 impulsos, distância foco/filme de 50 centímetros com incidência de raio X perpendicular às peças. Para processamento dos

filmes, foram utilizados revelador e fixador Kodac® no respectivo processamento de tempo/temperatura e digitalizadas através de um “scanner” para dispositivos (Polaroid Sprint Scan 35 Plus, Polaroid). As imagens digitalizadas foram analisadas em 3 medidas no programa Image Tools 3.0(University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX, USA) e retiradas uma média entre elas através de uma medida linear, que percorreu a distância da junção cemento-esmalte até a crista óssea alveolar do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo da rata, com as medições em pixels.

- Análise Estatística

Para a análise estatística, todos os valores numéricos foram expressos como média ± desvio padrão. Em um primeiro momento foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição de normalidade dos dados. Após a verificação da normalidade dos dados, foram realizados o teste ANOVA e, consequentemente, o teste Tukey com $p<0,05$ para avaliar a diferença entre os grupos.

RESULTADOS

Análise Radiográfica e Histomorfometria do Osso Alveolar:

A análise radiográfica e histomorfométrica do osso alveolar dos primeiros molares inferiores (Tabela 1), demonstraram que nos grupos onde foi feita a indução da periodontite por ligadura, houve maior perda óssea alveolar significativamente ($p<0,05$), demonstrando a ação da periodontite induzida sobre o tecido ósseo. Destaca-se também o grupo OVX+LIG onde a perda óssea alveolar foi mais significativa estatisticamente ($p<0,05$) do que grupo OVX+FIT. Assim o grupo que recebeu tratamento com a isoflavona teve menor perda óssea do que o grupo sem tratamento.

Pode-se observar que os grupos em que a periodontite não foi induzida, mas foram submetidos à ovariectomia (OVX+ FIT e OVX), houve uma perda óssea significante se comparados ao grupo Controle, podendo sugerir uma indução da osteoporose, bem como o grupo que recebeu tratamento com a isoflavona teve uma perda óssea menor se comparado ao grupo sem tratamento ($p<0,05$), sugerindo a hipótese de um efeito protetor da isoflavona na perda óssea alveolar.

Medida histomorfométrica do tecido gengival e Análise da morfometria do osso.

Os resultados observados demonstram que em todas as medidas da morfometria gengival não há diferença estatisticamente significante entre os grupos onde não ocorreu a indução da periodontite experimental ($p>0,05$) (tabela 2). Com relação aos grupos submetidos à periodontite experimental, todos apresentaram medidas aumentadas significantemente ($p<0,05$) em relação aos demais grupos, porém sem diferença estatística entre si ($p>0,05$) na média da largura do epitélio bucal. Entretanto, nas demais medidas os grupos LIG e OVX+LIG apresentaram médias superiores significativamente em relação ao grupo OVX+FIT+LIG ($p<0,05$), sugerindo novamente uma ação protetora sobre a inflamação do tecido gengival em ratos submetidos à periodontite experimental.

Na histomorfometria óssea (Tabela 3), os grupos OVX e OVX+LIG, seguidos do grupo LIG ($p<0,05$), obtiveram maior quantidade de osteoclastos na contagem de células, podendo sugerir um aumento da osteoclastogênese. Nota-se que no grupo OVX+FIT+LIG houve um decréscimo no resultado, bem como quando comparados os grupos OVX+FIT com OVX, onde nos grupos com FIT, a quantidade de osteoclastos foi menor ($p<0,05$), com maior presença de osteoblastos e osteócitos, sugerindo uma ação positiva do fitoestrógeno.

- Descrição das lâminas histológicas

Análise morfológica da hemimandibula direita

GRUPO CONTROLE

Nesse grupo, a avaliação dos parâmetros foi dentro da normalidade para os tecidos do epitélio oral, juncional, sulcular e tecido conjuntivo, sem a verificação de processo inflamatório. O osso alveolar apresentou-se intacto, compacto e regular, com a crista óssea apresentando a altura na porção do terço cervical da raiz. Foi observada a presença de osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, linhas incrementais no padrão da normalidade da remodelação óssea. Ainda, junção cemento-esmalte, cemento e ligamento periodontal, sem particularidades (Figura 2 e 3).

GRUPOS LIGADURA

Nos grupos onde foi induzida a doença periodontal por ligadura notamos a anormalidade na morfologia dos epitélios oral, juncional, sulcular, com migração para a região apical e tecido conjuntivo com predominância de estado inflamatório agudo. A retração da crista óssea foi observada nos grupos ligadura (Figuras 4, 6), com menor impacto por aqueles grupos onde foi administrada a isoflavona; a crista óssea também se apresentou de forma irregular, com extensa perda óssea alveolar, fazendo com que ocorra a exposição do terço cervical (Figura 5). Os osteoclastos apresentaram-se em grande quantidade nos grupos ligadura (Figura 7) e ligadura-ovariectomia, revelando a maior atividade de reabsorção óssea, sendo que no grupo ligadura-ovariectomia-isoflavona a reabsorção óssea verificada, foi menos acentuada do que em relação aos

demais. Também são observadas alterações em cemento e ligamento periodontal, com perda significativa destes tecidos.

GRUPOS OVARIECTOMIA

Nos grupos submetidos à ovariectomia, foi observado padrão de retração óssea, mesmo nos grupos sem indução de ligadura, podendo sugerir a osteoporose como consequência (Figura 8). Os grupos que tiveram tratamento com isoflavona tiveram reabsorção óssea menos acentuada (Figura 9) e nos grupos com ligadura, um agravamento no padrão de reabsorção. Em relação às células ósseas, os grupos ovariectomizados, sem ação da isoflavona, obtiveram maior concentração de osteoclastos sugerindo maior reabsorção óssea (Figura 10), diferente dos grupos com tratamento da isoflavona, que apresentaram menor concentração de osteoclastos e maior de osteoblastos/osteócitos, sugerindo seu efeito protetor sobre o tecido ósseo (Figura 11).

DISCUSSÃO

A menopausa traz consequências biopsicossociais e faz parte do processo de envelhecimento feminino. Não sendo considerada uma doença, os sinais e sintomas associados a esse período podem ser tratadas através de terapias especificas para aliviar tais sinais (1). Esses sinais e sintomas consistem principalmente pela queda do hormônio estrógeno e, como consequência, podem surgir doenças tardias, dentre elas, doenças cardiovasculares e a osteoporose (1). A osteoporose é definida como uma doença esquelética sistêmica, caracterizada por uma diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura, com consequente aumento da fragilidade óssea e maior suscetibilidade às fraturas (28, 29). Logo, nosso estudo buscou uma alternativa terapêutica natural, como a isoflavona, que pudesse ser utilizada para auxiliar na proteção contra a perda óssea alveolar provocada pelo desenvolvimento da doença periodontal.

Estudos demonstram a relação da doença periodontal com a osteoporose, advinda principalmente das mulheres na pós-menopausa. O hipoestrogenismo tem relação direta com o aumento da reabsorção óssea, inclusive em ossos da mandíbula (10, 30,12). A ação do estrógeno no osso parece estar relacionado à redução do número de células precursoras do osteoclasto e em evidências da expressão de receptores do estrógeno nas células do osteoblasto (31, 32).

As alterações ósseas provocadas pela osteoporose pode ser um fator de risco para a progressão da doença periodontal. A densidade da massa óssea reduzida na osteoporese pode facilitar a reabsorção do osso alveolar pela doença periodontal (33, 34). Assim, conforme demonstraram os resultados da tabela 1, a perda óssea foi significativa no grupo com ovariectomia e ligadura, onde a doença periodontal possa ter uma relação com a osteoporose. Em nosso estudo, a indução da menopausa através da técnica de ovariectomia demonstrou ser efetiva na diminuição da ação estrogênica, o que levou a um aumento significativo da perda óssea alveolar nos grupos ovariectomizados em comparação ao grupo controle, destacando-se ainda mais nas ratas que foram ovariectomizadas e não receberam tratamento de reposição hormonal com isoflavona.

As alterações hormonais nas mulheres, a exemplo da menopausa, podem ser mediadores de inflamação dos tecidos periodontais, em especial a gengiva, onde a interação da progesterona com o estrógeno e suas oscilações apresentam alterações clínicas no periodonto, uma vez que suas células são tecidos alvo dos hormônios esteróides. A redução dos estrogênios séricos promoveria maior perda óssea trabecular do que cortical (35), como demonstrado em nosso estudo (Tabela 1), onde os grupos OVX e OVX+LIG apresentaram maior perda óssea alveolar significativamente do que os grupos OVX+FIT e OVX+FIT+LIG, corroborado pela análise microscópica, onde foi possível observar maior retração óssea dos grupos ligadura e/ou ovariectomizadas, sem ação do fito-hormônio (Figuras 4 e 7). Nos resultados da tabela 3 também foi demonstrado que na contagem de células ósseas, a relação de maior perda óssea foi no grupo OVX+LIG seguido do grupo LIG, e onde foi administrado isoflavona observamos menor perda óssea, em destaque para o grupo OVX+FIT. Quando comparado o grupo OVX+FIT+LIG com o grupo OVX+LIG, observamos que o grupo com a isoflavona também conferiu uma menor perda óssea, sugerindo o mecanismo protetor da isoflavona na perda de massa óssea.

Xu et al. (36) em seu estudo com ratas ovariectomizadas e com peridodontia induzida, demonstrou que o efeito da deficiência estrogênica causa perda de massa óssea alveolar e redução da altura da crista alveolar, logo, a osteoporose na pós-menopausa pode influenciar na progressão da doença periodontal. Estudos como de Lopes et al. (14), Bertulucci et al. (2012) (10) e Mohammad; Brunsvold (11), demonstram que nas mulheres estudadas houve uma relação de risco da osteoporose para a progressão da doença periodontal, corroborando com nossos resultados, apesar de haver estudos controversos nessa relação, como de Pallos et al. 12) e Lopes et at. (37).

A alternativa da terapia hormonal proposta nesse estudo para estabelecer a tentativa de manutenção da densidade da massa óssea com a isoflavona, se deve ao fato de que sua estrutura química assemelha-se ao do 17β-estradiol e tem maior afinidade para ligar-se aos receptores estrogênicos do tipo β (ERβ), receptor esse presente em células do estroma e/ ou osteoblasto, mediadores da osteoclastogênese juntamente com o receptor do tipo α (ERα) (38, 32, 22).

O mecanismo mais sugerido para explicar os efeitos benéficos das isoflavonas de soja no tecido ósseo, os quais podem ajudar a prevenir o desenvolvimento da osteoporose, foi proposto por Williams et al. (39), onde sugeriram que os osteoblastos e os osteoclastos são as células alvo para a ação da genisteína e da daidzeína. A genisteína combina com receptores de estrógenos e exerce seus efeitos pelo mesmo mecanismo que este hormônio. Por outro lado, ela pode também exercer efeitos por outros mecanismos, independentes de receptores para estrógenos (39, 23). A genisteína inibe a topoisomerase II, interferindo assim, com a progressão do ciclo celular, ou ainda a genisteína ativa receptores peptídicos ligados à membrana, iniciando outros efeitos independentes de estrógenos. Por exemplo, os osteoclastos são dependentes da atividade de receptores tirosina quinase (PTK), então os inibidores de PTK são candidatos à prevenção da osteoporose. A genisteína e a daidzeína, isoflavonas naturais, são inibidoras de PTK e poderiam agir por este mecanismo (39, 23), suportando a hipótese dos resultados de nosso estudo onde a terapia com isoflavona apresentou resultados benéficos demonstrados nas Tabela 1 e 3. Ainda, evidências sugerem que a isoflavona possa ter um mecanismo supressor da reabsorção óssea, concomitantemente aumentando a atividade osteoblástica (22).

Ishida et al. (40) estudaram a ação da genisteína e daidzeina com ratas ovariectomizadas e dieta pobre de cálcio e obtiveram resultados positivos na avaliação da prevenção da perda óssea e fatores do metabolismo ósseo, supondo a ação supressora do turn-over ósseo causado por esses derivados da isoflavona. Outros estudos corroboraram com estes achados, uma vez que o uso de isoflavonas em ratas ovariectomizados apresentaram resultados demonstrando a redução da perda de massa óssea ocorrida após a ovariectomia (41, 42)

Arjmandi et al. (43) em seu estudo utilizaram ratas ovariectomizadas com ou sem tratamento de reposição hormonal e os resultados demonstraram que os grupos das ratas que receberam uma dieta por tempo prolongado de proteína de soja (isoflavona), apresentaram uma efetiva ação protetora da perda óssea, quando comparadas ao grupo de ratas ovariectomizadas sem tratamento, corroborando com nosso estudo onde os grupos OVX+FIT e OVX+FIT+LIG demonstraram uma menor perda óssea alveolar do que os demais grupos ovariectomizados (Tabela 1).

Estes mesmos resultados da ação da isoflavona podem ocorrer também em mulheres, demonstrado no estudo de Tanaka et al. (25), onde a relação entre uma dieta rica em isoflavona e a doença periodontal em mulheres japonesas obteve como resultado uma relação positiva da isoflavona na proteção da perda óssea e progressão da doença periodontal, sendo que a dose de ingestão, está diretamente ligada à diminuição da prevalência da doença periodontal. Alekel et al. (44), em estudo com mulheres na pós menopausa e dieta controlada com grupos em ingestão de dieta rica de soja, pobre de soja e proteína isolada, obteve como resultado na análise da coluna espinhal dessas mulheres, que aquelas com ingestão rica em soja, a isoflavona atenuou a perda de massa óssea da coluna .

Yu et al. (45) em seu estudo de revisão bibliográfica sugere que a isoflavona possa ter uma ação antiinflamatória e Ganai et al. (46) sugere a ação supressora de citocinas pró-inflamatórias pela isoflavona. Conforme resultados da tabela 2, onde os grupos com isoflavona tiveram menor infiltrado do tecido conjuntivo, diminuindo a altura e largura.

Logo, podemos sugerir que a isoflavona pode conferir um efeito protetor à perda óssea alveolar na progressão da doença periodontal. A queda da utilização da terapia hormonal pelas mulheres, devido a suspeita dos estudos sobre relatos de câncer, trouxe à tona a busca pelos tratamentos alternativos e o proposto para a reposição hormonal das mulheres na pós-menopausa é prevenir a perda óssea da osteoporose, assim fica sugestivo, que apesar da isoflavona ser indicativo de protetor de perda da massa óssea e tem seu uso favorável como terapia alternativa, a escolha e iniciativa de fazer uso ou não do fito-hormônio deve ser optativa e à critério das mulheres e seus médicos, sempre buscando o bem estar e a qualidade de vida de cada uma.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, fundação Araucária e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo suporte financeiro. Nós também agradecemos aos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e Metabolismo e de Biologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) pelo apoio estrutural. Os autores são agradecidos à Celeste da Rocha Paiva, técnica do Laboratório de Biologia Celular, pela assistência técnica na realização deste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGÁFICAS

1. Poli MEH, Schwanke CHA, Cruz IBM (2010) A menopausa na visão gerontológica. Scientia Medica. Porto Alegre. vol.2.p.176-184.

2. Wise PM, Smith MJ, Dubal DB, Wilson ME, Krajnak KM, Rosewell KL (2013) Neuroendocrine Influences and Repercussions of the Menopause. Endocrine Reviews. v.20.n3.243-248.1999.

3. Brandão CMR, Machado GPM, Acurcio FA (2012) Análise fármaco-econômica das estratégias de tratamento da osteoporose em mulheres nas pós-menopausa: uma revisão sistemática. Revista Bras. Reumatol. 52(6):912-937.

4. Amadei UA, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF (2006) A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. Bras Patol Med Lab. v. 42.n 1.p.5-12.

5. Lerner UH (2006) Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. J Dent Res. 85(7):596-607.

6. Rivera MF, Lee JY, Aneja M, Goswami V, Liu L, Velsko IM, Chukkapalli SS, Bhattacharyya I, Chen H, Lucas AR (2013) Polimicrobial infection with major periodontal pathogens induced disease and aortic atherosclerosis in hyperlipidemic apoe null mice. Plos one 8(2):1-10.

7. Sakalauskiene J, Giedrimiene D, Kubilius R, Gleiznys A, Vitkauskiene A, Ivanauskiene E, Puskunigyte K (2014) Cytokine production by leukocytes in patients with periodontitis. Cent Eur J Med, 99(6) 821-829.

8. Nishimura F, Murayama Y (2001) Periodontal inflammation and insulin resistance – lesson from obesity. J Dent Res, 80(8):1690-1694.

9. Yakob M, Meurman JH, Jogestrand T, Novak J, Söder PO, Söder B (2012) C-reative protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis. Clin Oral Inv, 16:259-265.

10. Bertulucci LAB, Pereira FM, Oliveira AE, Brito LM, Lopes FF (2012) Doença periodontal em mulheres na pós-menopausa e sua relação com a osteoporose. Rev Brasi Ginecol Obst.34(12):563-7.

11. Mohammad AR, Brunsvold M (1996). The strength of association between systemic postmenopausal osteoporosis and periodontal disease. The Int J of Prost.v.9n.5.1996.
12. Pallos D, Ceschin A, Victor, Bulhões RC, Quirino MRS (2006) Menopausa: fator de risco para doença periodontal? Rev.Bras.Ginecol.Obst. vol28.n˚5.Rio de Janeiro

13. Passos JSGF, Vianna lS, Cruz MIP, Oliveira SS, Farias DC, Rabelo TS et al. (2010) A influência da osteoporose pós-menopausal na condição periodontal-uma revisão de literatura.R.Ci.med.biol.9(2):157-162.

14. Lopes FF, Loureiro FH, Pereira ADEF, Pereira AL, Alves CM (2008) Associação entre osteoporose e doença periodontal em mulheres na pós-menopausa. Rev Bras Ginecol Obst**.** 30(8):379-83.

15. Chlebowski RT, Hendrix SL, Stefanick ML, Gass M, Lane D, Rodabough RJ et al. (2003-A) Influence of estrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women.JAMA.vol289.n.24.

16. Amatykul S, Kasiyaphat A, Patumraj S, Chotipaibulpana S, Siriviriyakul P (2007) Effects of genistein supplementation on gingival blood flow disturbances after menopause: in vivo study using ovarectomized rats. Asian Biom. vol1.n˚4.p.421-4.

17. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52, 705 women with breast cancer and 108, 411 women without breast cancer. Lancet 350(9084):1047–1059

18. Colditz G, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ et al (1995) The use of estrogens and progestin and the risk of breast cancer in postmenopausal women**.** The New Eng J of Med. v. 332.

19. Brandi, ML (1997) Natural and Synthetic Isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. Calcif Tissue Int. 61:S5-S8.

20. Aquino EM, Almeida MC, Menezes GM, de Figueiredo RC, Bensenor IM, Menque SS, da Fonseca MJ et al. (2016) Postmenopausal hormone therapy in the brazilian longitudinal study os adult health (ELSA-Brasil): who still uses it? Pharmacoepidemiol Drug Saf. DOI: 10.1002/pds.

21. Shifren JL, Gass MLS (2014) The North American Menopause Society Recommendations for Clinical Care of Midlife Women. Menopause: The Journal of the North American Menopause Society. vol 21. n.10.

22. Bedani R, Rossi EA (2005) Isoflavonas: bioquímica, fisiologia e implicações para a saúde. B. CEPPA. v.3.n.2.

23. Esteves EA, Monteiro JBR (2001) Efeitos benéficos das isoflavonas em doenças crônicas. Rev. Nut. Campinas.14(1)43-52.
24. GaoYH, Yamaguchi M (2000) Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclast: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. International Journal of Molecular Medicine. Int J Mol Med. 5(3):261-7.

25. Tanaka K, Sasaki S, Murakami K, Okubo H, Takahashi Y, Miyake Y et al. (2008) Relationship between soy and isoflavone intake and periodontal disease: the freshmen in dietetic courses study II.BMC Public Health. 29, 8:39

26. Nassar PO, Nassar CA, Guimarães MR, Aquino SG, Andia DC, Muscara MN et al. (2009) Simvastatin therapy in cyclosporine A- induced alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res. 44(4):479-88.

27. Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chamber TJ (1992) Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. J Clin Invest. 89:74-8.

28. Russo LAT (2001) Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. Arq. Bras Endocrinol Metab. vol.45.n^0 4.

29. World Health Organization (2004) Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Sumary Meeting Report Brussels, Belgium, 5-7.

30. Campos MLG, Corrêa MG, Velasco FG, Sallum EA, Junior FHN, Casati M et al. (2009) A deficiência de estrogênio e a osteoporose com paradigmas atuais em periodontia. R. Period. v 19. n. 03.

31. Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC (1998) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblas-like cells. Science v. 241, p. 84-6.

32. Ramalho ACR. Lazaretti-Castro M, Cohen-Solal ME, Vernejoul MC (2000) Por que o estrogeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismos de ação do estrogeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. Arq Bras Endocrinol Metab. Vol. 44 n. 6

33. Genco RJ, Borgnakke WS (2013) Risk factors for periodontal disease. Periodontol 2000. 62(1):59–94)

34. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ (2000) The relationship between bone mineral densityand periodontitis in postmenopausal women. J Periodontol. 71(9):1492–8.

35. Santos PAT, Fontes TMV, Cabral MCB, Novaes SMA (2008) Influência dos hormônios sexuais sobre os tecidos periodontais em usuárias de contraceptivos hormonais. R. Period. v18. n.1

36. Xu XC, Chen H, Zhang ZJ, Liu XQ, Zheng XY, Zhang J et al. (2015) Effects os oestrogen deficiency on the alveolar bone of rats with experimental periodontitis. Mol Med Rep 12(3):3494-502.

37. Lopes FF, Loureiro FHF, Alves CMC, Pereira AFV, Oliveira AEF (2008) Densidade mineral óssea sistêmica VS situação clínica periodontal: estudo transversal em mulheres na pós menopausa. Rev Assoc Med Bras. 54 (5): 411-4)

38. Zhang RW, Supowit SC, Xu X, Li H, Chritensen MD, Lozano R et al. (1995) Expression of selected osteogenic markers in the fibroblast-like cells of rat marrow stroma. Calcif Tissue Int. 56:283-91.

39. Williams JP, Jordan SE, Barnes S, Blair HC (1998) Tyrosine kinase innibitor effects on avian osteoclastic acid transport[1-3]. Am J ClinNutr. 68 (supl):1369S-74S

40. Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K et al. (1998) Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. Biol. Pharm. Bull. 21(1)62-66.

41. Arjmandi BH, Getliger MJ, Goyal NV, Alekel L, Hasler CM, Juma S (1998 a) Role of soy protein with normal or reduced isoflavone content in reversing bone loss induced by ovarian hormone defience in rats. The American Journal of Clinical Nutrition**.** v. 68, p. 1358S-1363S.

42. Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ,Lebecque P, Barlet JP (2001).Dose dependent bone-sparing effects dietary isoflavones in the ovariectomized rat. British Journal of Nutrition. v. 85, p. 307-316

43. Arjmandi B, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L et al. (1998 b) Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. Am J Clin Nutr. 68(suppl): 1364S-8S.

44. Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T (2000) Isoflavone-rich soy spares lumbar spine bone. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenipausal women. Am J Clin Nutr. 72:844-52

45. Yu J, Bi X, Yu B, Chen D (2016) Isoflavones: Anti-Inflamtory benefit and possible caveats. Nutrients. Jun. 10;8(6).

46. Ganai AA, Faroogi H (2015) Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. Biomed Pharmacother. Dec; 76:30-8.

TABELAS, FIGURAS E LEGENDA DAS FIGURAS

Figuras:

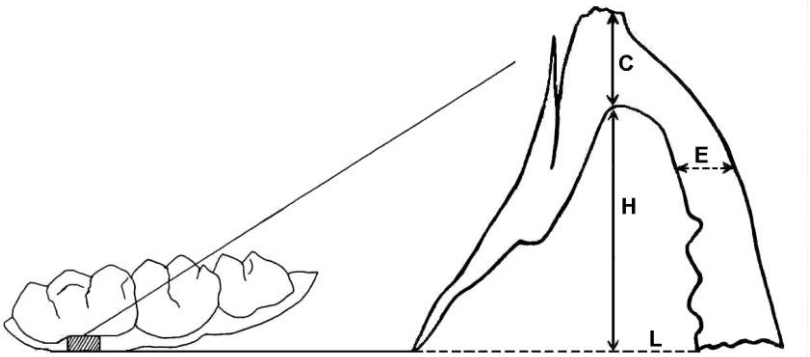

Figura 1.- Esquema da gengiva marginal do rato, mostrando os pontos de referência usados para as medidas morfométricas do epitélio bucal, crista epitelial e tecido conjuntivo. C - altura do epitélio da crista gengival. E - largura do epitélio bucal. H - altura do tecido conjuntivo na região média .L - largura do tecido conjuntivo na região basal.

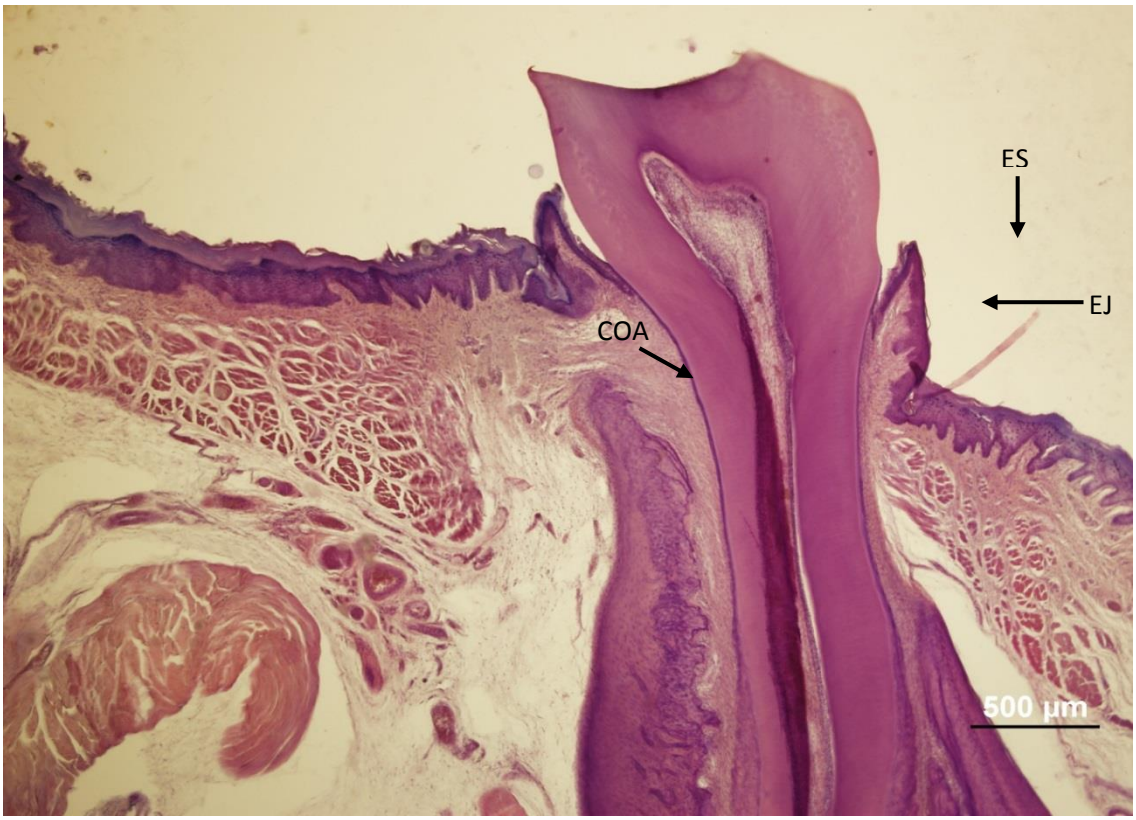

Figura 2: Fotomicrografia de dente de rato, grupo Controle, coloração hematoxilina e eosina,4x, corte sagital. COA, crista óssea alveolar, EJ, epitélio juncional, ES, epitélio sulcular

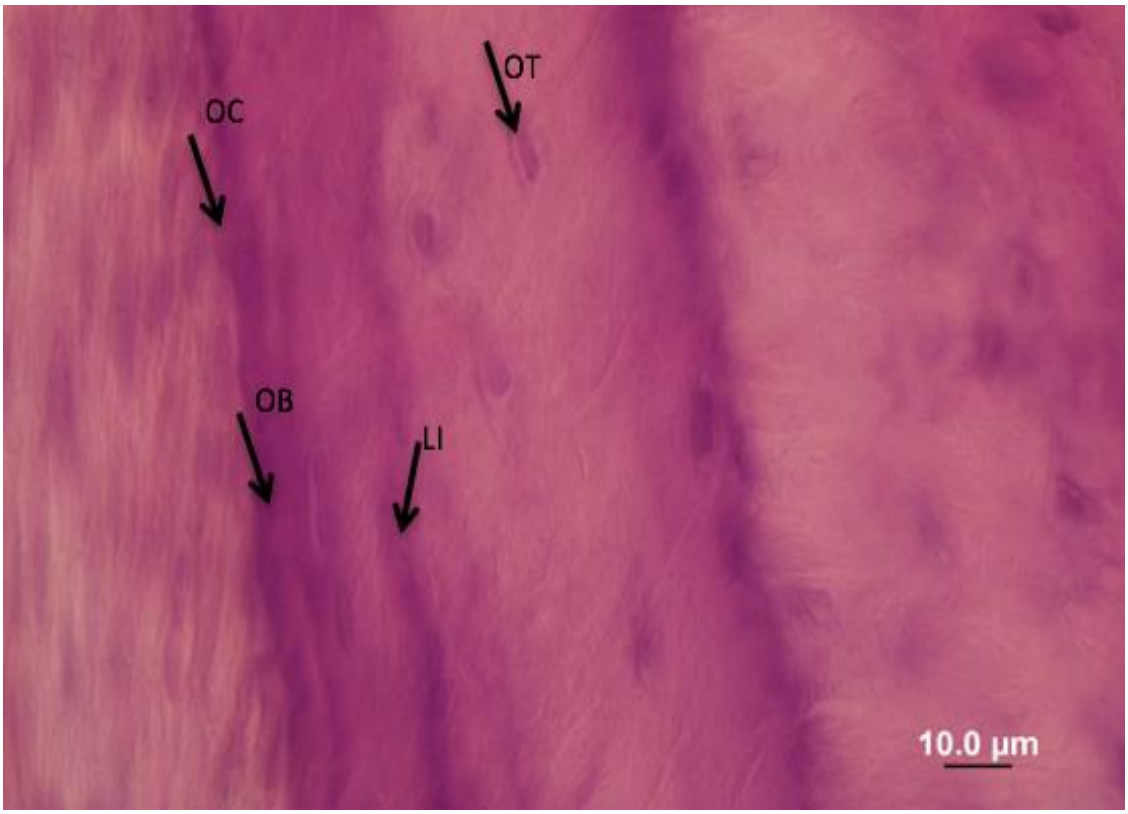

Figura 3: Fotomicrografia de dente de rato, grupo Controle, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, 4° quadrante, corte sagital. Imagem mostra local de osso alveolar de medida morfométrica de células ósseas: OC, osteoclasto; OB, osteoblasto; OT, osteocito e LI, linhas incrementais.

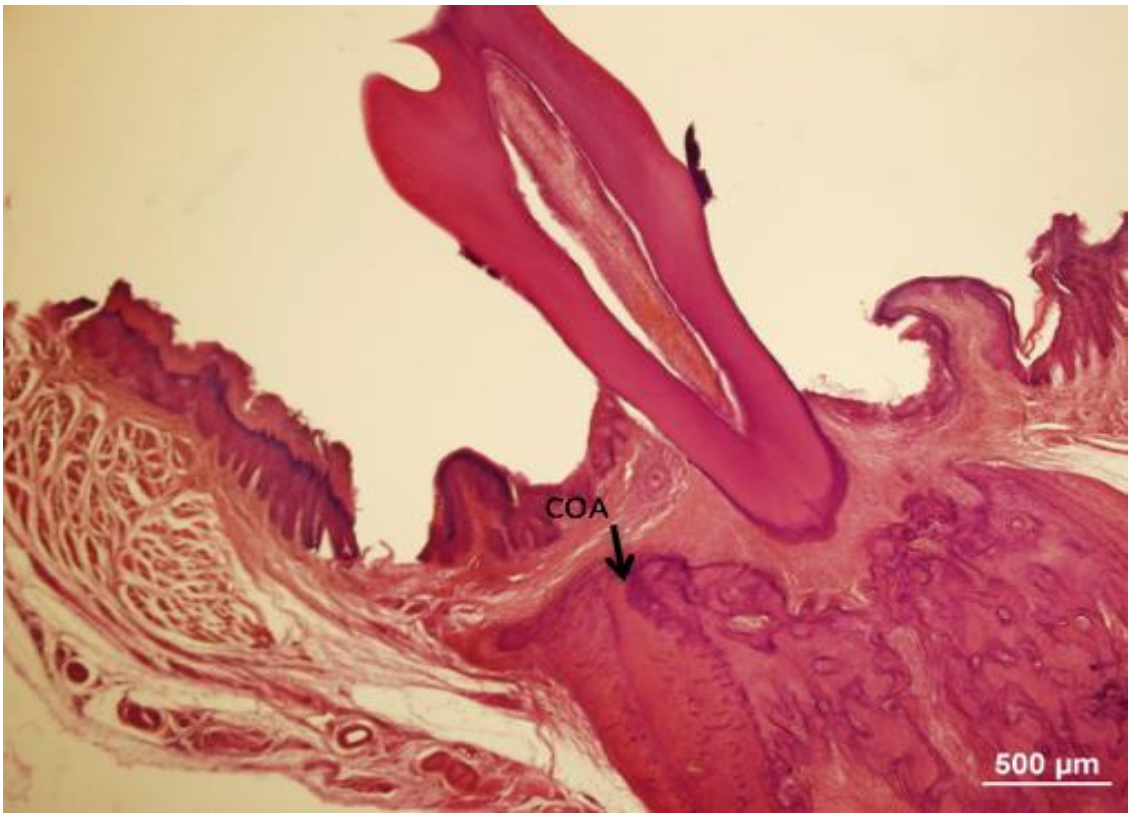

Figura 4: Fotomicrografia de dente de rato, grupo Ligadura, coloração hematoxilina e eosina, 4x, corte sagital. Imagem demonstra, retração óssea, no padrão encontrado nos grupos com LIGADURA. COA, crista óssea alveolar.

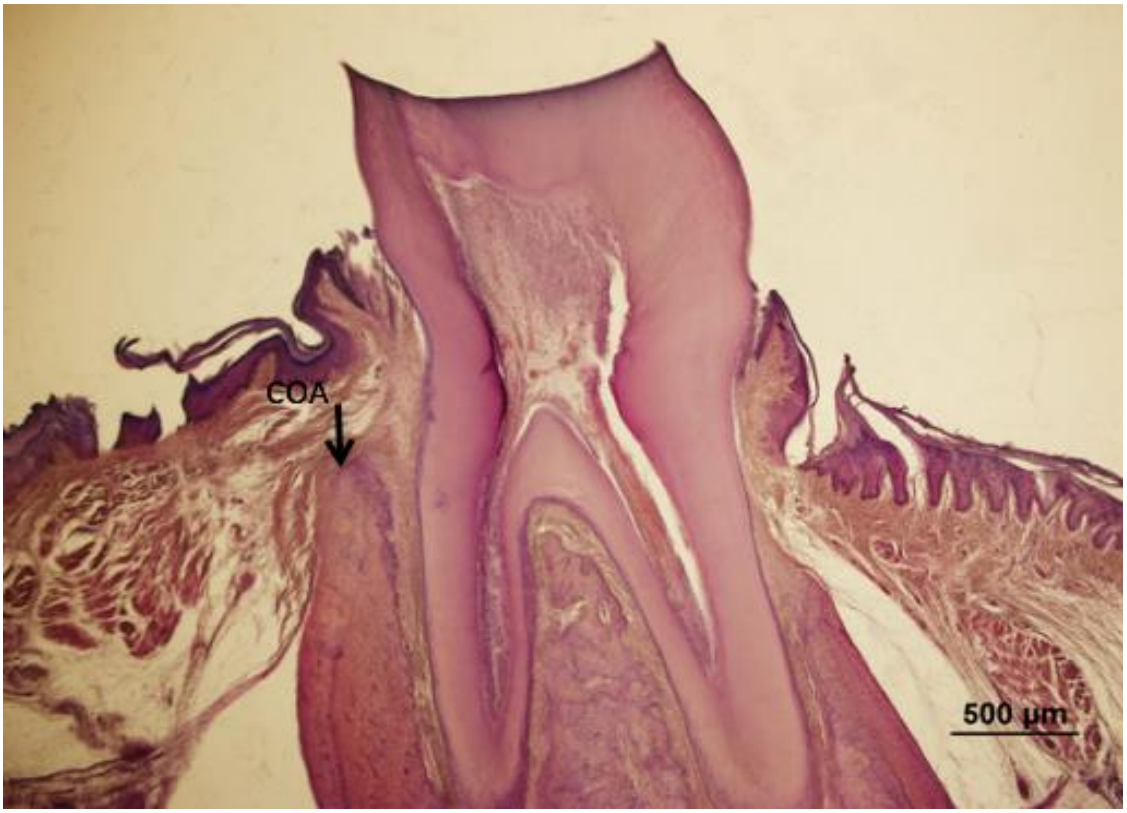

Figura 5: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX+LIG+FIT, coloração hematoxilina e eosina, 4x, corte sagital. Figura mostra padrão de reabsorção óssea alveolar, dos grupos sob influência da isoflavona. COA, crista óssea alveolar.

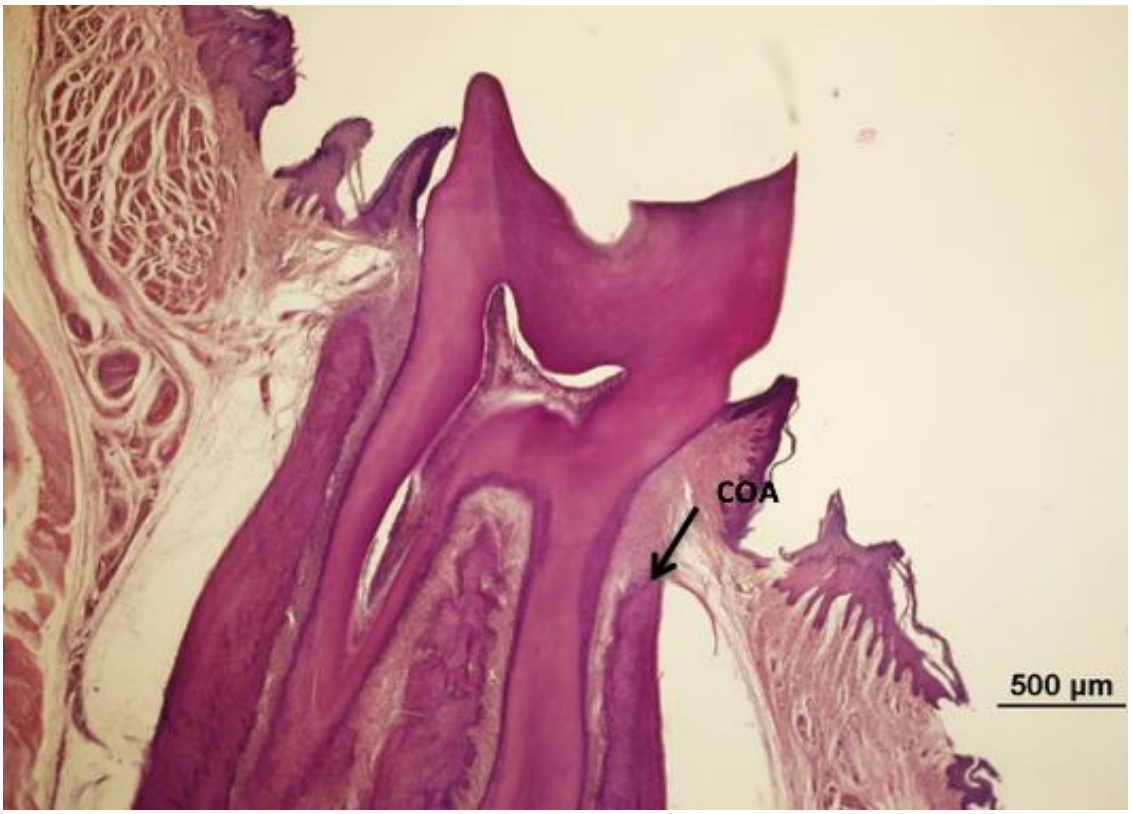

Figura 6: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX+LIG, coloração hematoxilina e eosina, 4x, corte sagital. Figura mostra padrão de reabsorção óssea alveolar, dos grupos induzidos pela doença periodontal. COA, crista óssea alveolar.

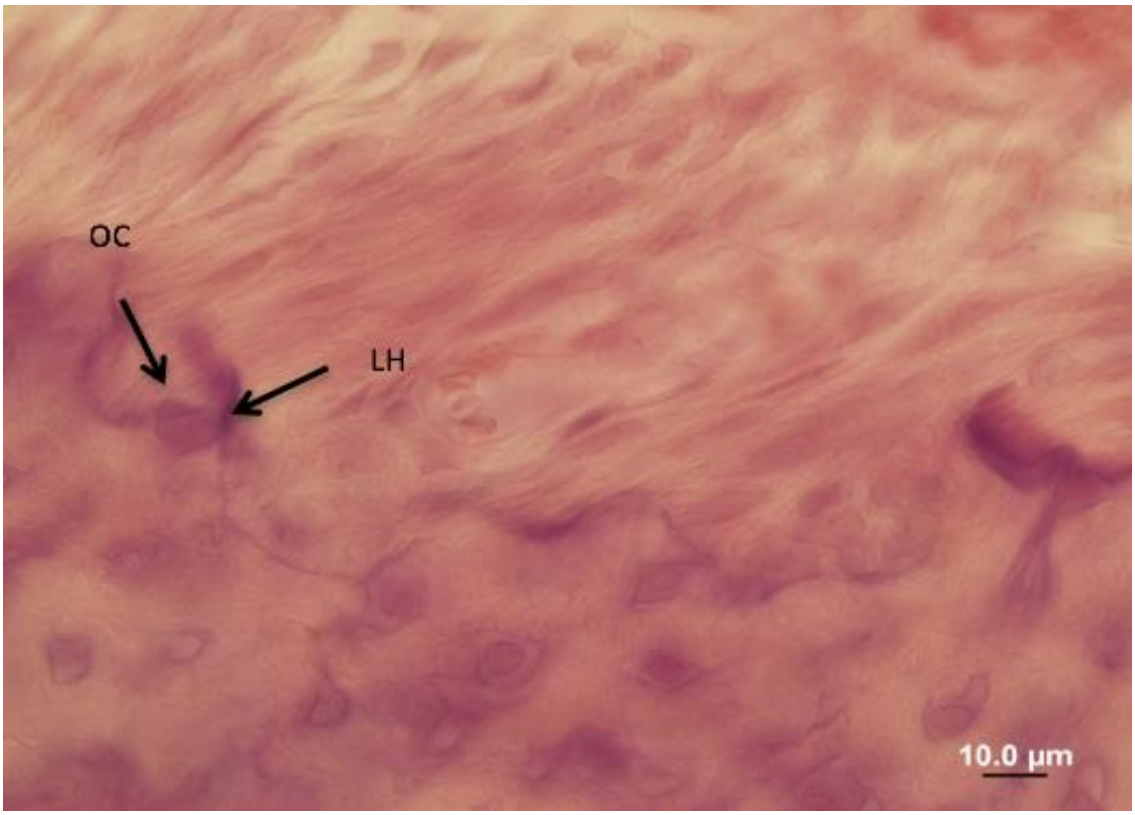

Figura 7: Fotomicrografia de dente de rato, grupo Ligadura, coloração hematoxilina e eosina, 1000x, corte sagital. Imagem apresenta osso alveolar, com evidencia de reabsorção óssea, dos grupos experimentais onde a periodontite foi induzida. Mostra o osteoclasto ocupando a lacuna de Howship, indicando uma área de reabsorção óssea. LH,lacuna de Howship; OC osteoclastos.

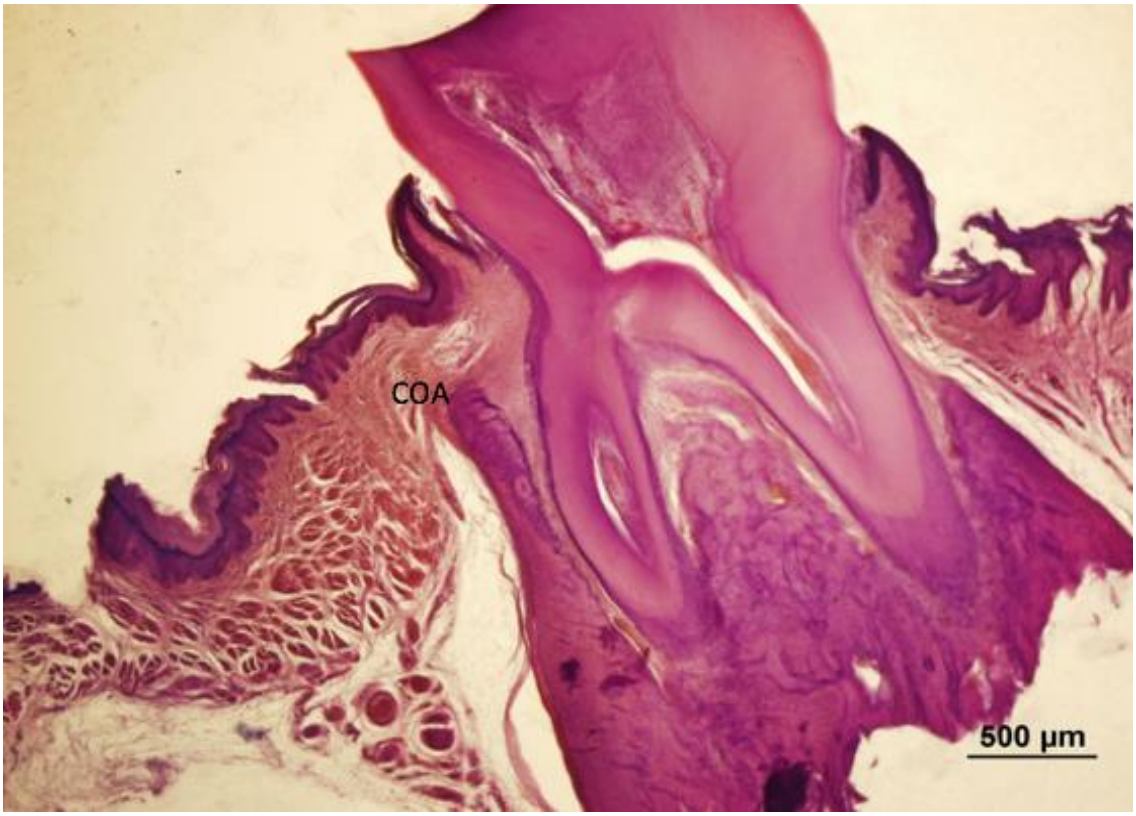

Figura 8: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX, coloração hematoxilina e eosina, 4x, corte sagital. Figura mostra padrão de reabsorção óssea alveolar dos grupos ovariectomizados. COA, crista óssea alveolar.

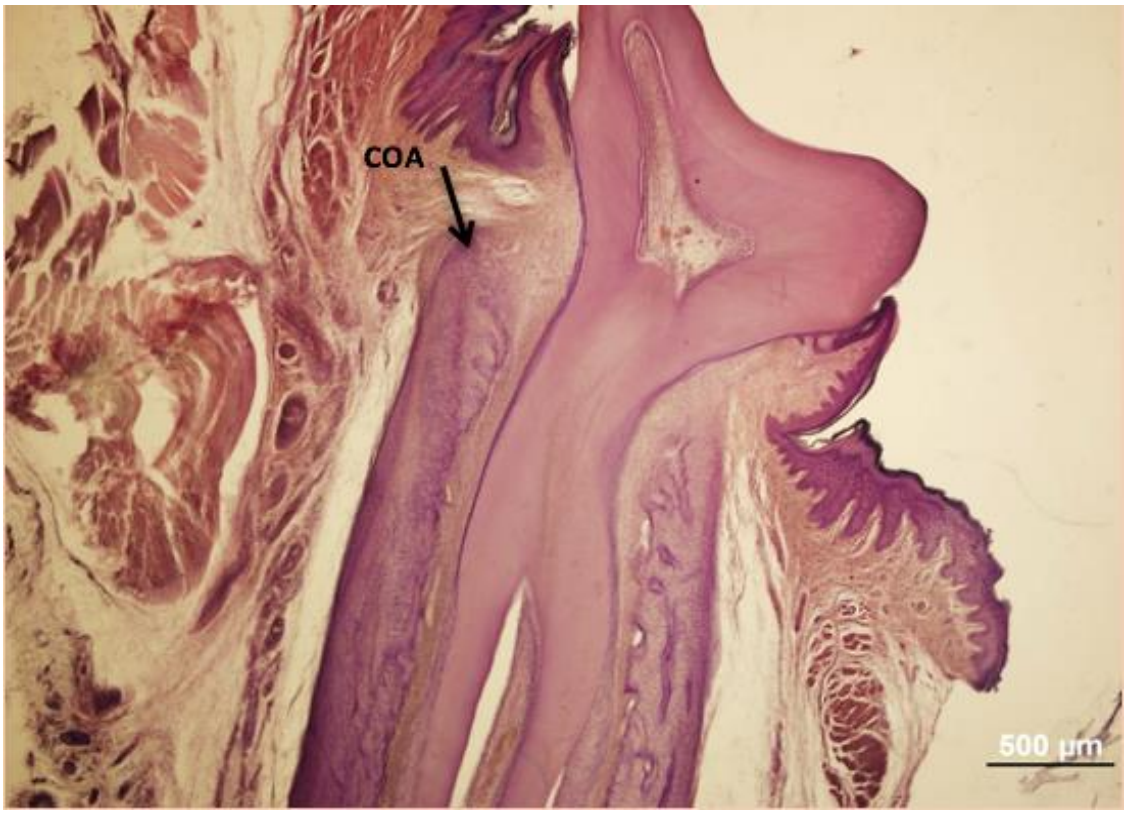

Figura 9: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX+FIT, coloração hematoxilina e eosina, 4x, corte sagital. Figura mostra padrão de reabsorção óssea alveolar dos grupos ovariectomizados, com tratamento com isoflavona. COA, crista óssea alveolar.

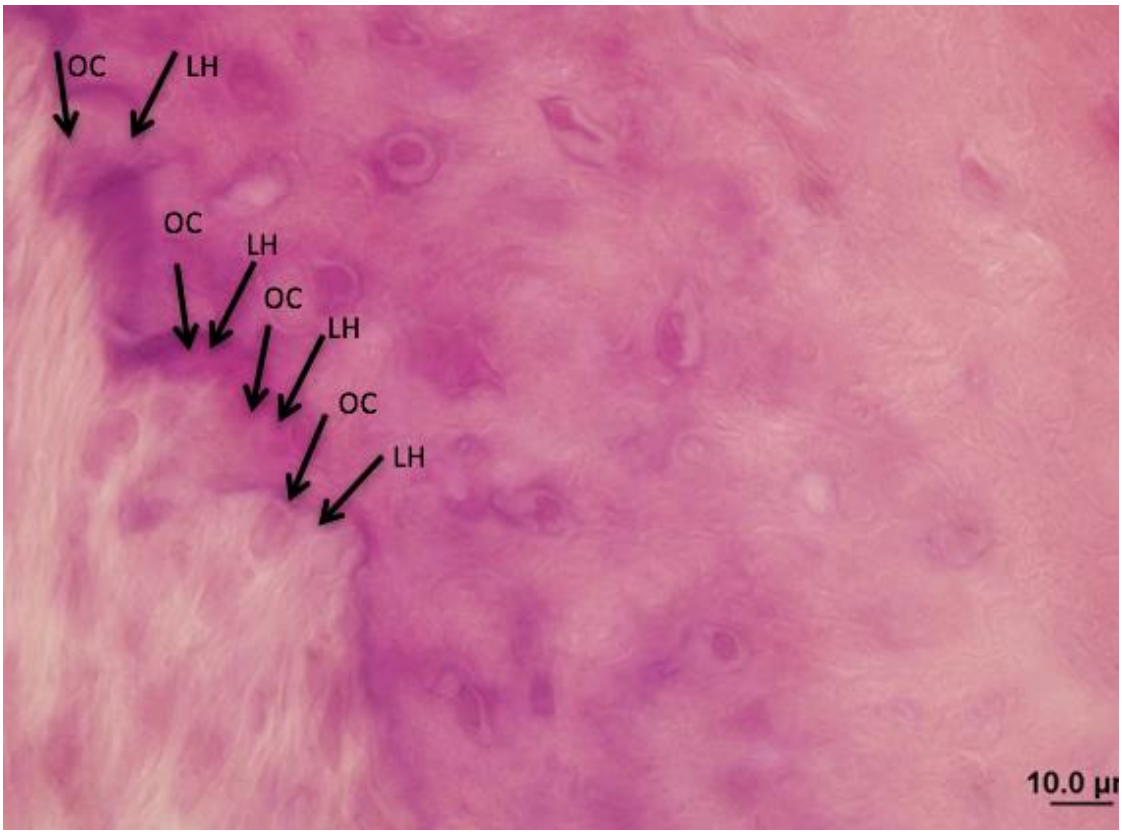

Figura 10: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX+LIG, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, corte sagital. Imagem apresenta osso alveolar, com evidencia de reabsorção óssea. Mostra o osteoclasto ocupando a lacuna de Howship, indicando áreas de reabsorção óssea. LH,lacuna de Howship; OC osteoclastos.

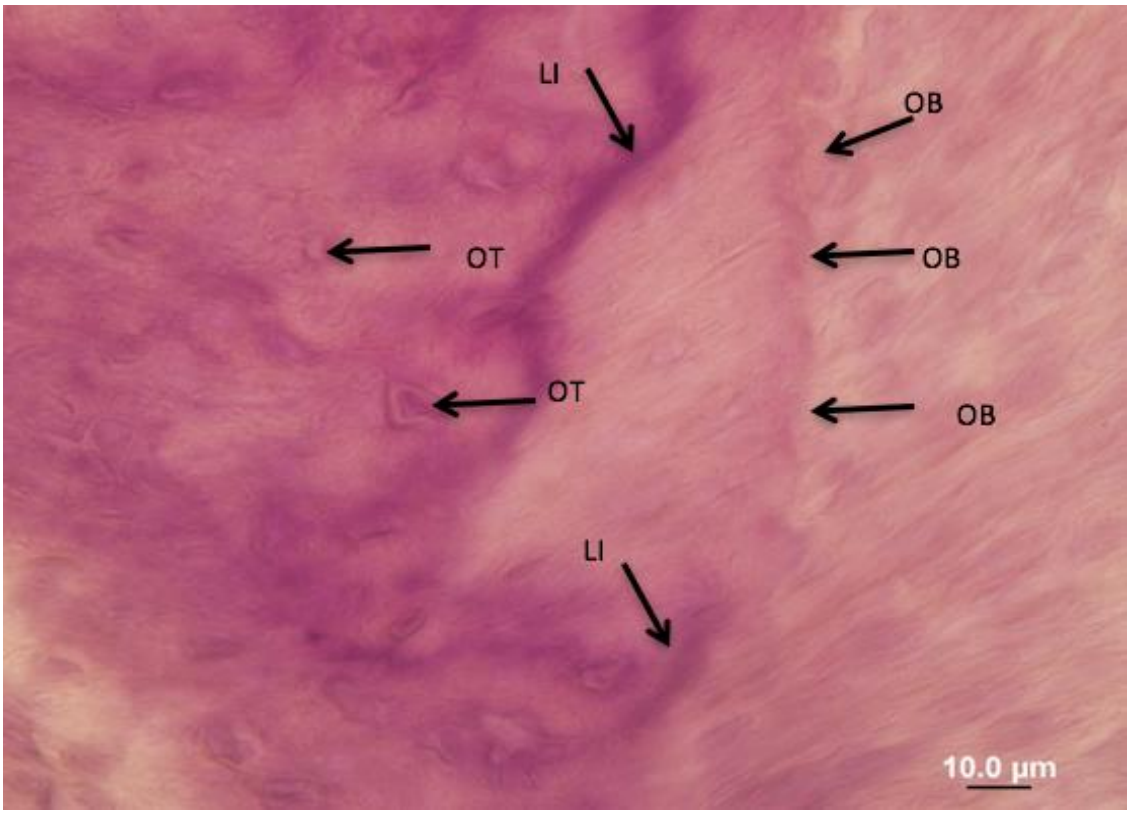

Figura 11: Fotomicrografia de dente de rato, grupo OVX+FIT, coloração hematoxilina e eosina, 1000X, corte sagital. Imagem apresenta osso alveolar, com evidencia de formação óssea, com presença de osteoblasto e linhas incrementais. LI, linhas incrementais, OB, osteoblastos, OT, osteócito.

Tabelas:

Tabela 1: Análise histomorfométrica do primeiro molar inferior direito das ratas e análise radiográfica do lado mesial do primeiro molar inferior esquerdo das ratas da distância junção cemento-esmalte até a crista óssea alveolar de todos os grupos. Os valores representam a média ± desvio padrão e estão expressos em pixels.

Grupos	Análises	
	Radiográfica	Histomorfométrica
CONTROLE	6,70±0,49 A	312,70±5,07 A
LIGADURA	10,21±0,11 B	348,62±13,84 B
OVX+FIT+LIG	10,03±0,18 C	336,87±4,96 C
OVX+FIT	9,01±0,67 D	320,69±5,38 D
OVX	9,83±0,1 E	330,91±4,92 E
OVX+LIG	11,02±0,15 F	367,93 ±8,21 F

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes dentro do mesmo parâmetro com p<0,05 e os testes utilizados foram o ANOVA e o Teste de TUKEY.

Tabela 2: Análise histomorfométrica da gengiva da hemimandíbula direita das ratas dos grupos estabelecidos. Os valores representam média ± desvio padrão e estão expressos em micrômetros (µm).

Grupos	**Medidas histomorfométricas**			
	C	**H**	**E**	**L**
CONTROLE	32,45±0,36 A	224,21±5,80A	29,20±2,12 A	84,96±6,93 A
LIGADURA	37,47±1,23 B	241,07±1,27B	33,22±1,27B	132,01±10,57B
OVX+FIT+LIG	35,58±0,33 C	234,53±5,30 C	33,11±0,26B	122,10±2,24 C
OVX+FIT	32,34±0,86 A	222,03±6,19A	28,50±0,89A	82,21±9,75 A
OVX	32,28±0,57 A	223,56±4,79A	29,00±3,29A	84,27±3,47 A
OVX+LIG	37,34±0,21B	240,92±3,13B	34,13±2,51B	126,45±5,91B

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes dentro do mesmo parâmetro com p<0,05 e os testes utilizados foram o ANOVA e o Teste de TUKEY. **C**: altura do epitélio da crista gengival. **H**: altura do tecido conjuntivo na região média. **E**: largura do epitélio bucal. **L**: largura do tecido conjuntivo na região basal.

Tabela 3 - Análise histomorfométrica do tecido ósseo da hemimandíbula direita das ratas dos grupos estabelecidos. Os valores representam média ± desvio padrão e estão expressos em unidades.

Grupos	Células		
	Osteócitos	Osteoblastos	Osteoclastos
CONTROLE	389,87±7,02A	72,09±1,22A	9,87±1,22A
LIGADURA	354,72±12,97B	64,60±1,57B	13,40±1,09B
OVX+FIT+LIG	367,25±11,51C	67,45±1,47C	12,36±1,10C
OVX+FIT	382,85±7,58D	69,30±1,75D	11,00±1,01D
OVX	328,62±10,27E	59,33±2,68E	15,00±1,35E
OVX+LIG	317,00±12,22F	56,78±2,47F	16,85 ±1,67F

Letras diferentes significam que os dados são estatisticamente diferentes dentro do mesmo parâmetro com $p<0,05$ e os testes utilizados foram o ANOVA e o Teste de TUKEY.

Normas da revista científica:

POLICY

The Journal is produced quarterly by Nihon University School of Dentistry for the purpose of publishing original full-length articles, short communications (which should not exceed 4 pages in print, i.e., approximately 2000 words including abstract, legends and references; the total number of tables and figures should not exceed 2), invited reviews, and case reports pertinent to dentistry and related fields. All papers are subjected to peer-review. Issue contents are available online (http://jos.dent.nihon-u.ac.jp/).

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts that are being submitted should be complete in all respects, and deal with original material not previously published, or being considered for publication elsewhere. The original, written in English, complete with tables and/or figures, should be submitted to the JOS manuscript submission site (https://mc.manuscriptcentral.com/josnusd). The preferred storage medium is a file in MS Word (Windows) format. If accepted, the manuscript should not be published elsewhere in the same form, in either the same or another language, without the consent of the Editor and Publisher. Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'.

[Ethics]

Manuscripts that reveal a lack of proper, ethical consideration for human subjects or experimental animals will not be accepted for publication. The authors must declare that all experiments on human subjects were conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (http://www.wma.net) and that all procedures were carried out with the adequate understanding and written consent of the subjects. The authors must also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the human subjects review board of their institution and could be provided upon request.

All animal experiments should be carried out in accordance with institutional and national guidelines for the care and use of experimental animals that are in compliance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. Manuscripts should be accompanied by a statement that all efforts were made to minimize animal suffering, to reduce the number of animals used, and to utilize alternatives to *in vivo* techniques, if

available.

[Conflict of Interest]

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

STYLE OF MANUSCRIPTS

General

Manuscripts should be typewritten with double-spacing (at least 6 mm between lines) on A4 or Letter size papers with ample margins (at least 2.5 cm) on all four sides. A standard, at least 12-point, type face should be used.

Number pages at the bottom, as follows:

Page 1. Title Page: complete title; first name, middle initial, surname of each author where the work was done; mailing address, FAX number, and e-mail address of author for editorial correspondence regarding the manuscript and for reprint requests.

Page 2. Abstract: not more than 200 words, followed by 3 to 6 keywords.

Beginning on page 3: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Tables, Figures and Figure legends. Begin each section on a new page. All pages should be numbered consecutively and stored in one file, the title page being page 1.

Methods

Give manufacturer's name and location (city, country) in parentheses for reagents and instruments; e.g. "The composite (Clearfil Majesty, Kuraray Medical Inc., Tokyo, Japan)...". Quantitative results must be supported by appropriate experimental design, statistical tests, and *P* values.

References

References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, table and figure legends by Arabic numbers in parentheses such as (1), (2,3), and (1,3,4-8). Use the style of the examples below. Abbreviations of journals should conform to those of Index Medicus.

Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "(in press)" after the abbreviated title of the journal. Manuscripts written in languages other than English should be limited. Cite unpublished work as such in the text. Personal

communication should be acknowledged in the text and accompanied by written permission. The author(s) has(ve) the responsibility for correct citation of the references.

Sample references
[Journals]

1. De Jager N, Pallav P, Feilzer AJ (2005) Finite element analysis model to simulate the behavior of luting cements during setting. Dent Mater 21, 1025-1032.

2. Suzuki Y, Hayashi M, Tanabe N, Yasukawa T, Hirano Y, Takagi S et al. (2015) Effect of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate on osteoblasts in comparison with mineral trioxide aggregate. J Oral Sci 57, 25-30.
   List all authors when six or fewer (Ex. Ref. 1); when seven or more, list first six and add et al. (Ex. Ref. 2).

3. Avoid referencing abstracts if possible. If unavoidable, reference as follows:
   Takagi S, Ogata H, Chow LC (2011) Properties of DCPA+CaO and DCPA+$CaCO_3$ fluorapatite-forming calcium phosphate cements. J Dent Res 90, Spec Iss B 2476. (Abstract)

[Others]

4. International Organization for Standardization (2009) Dentistry--Polymer-based restorative materials. ISO 4049:2009, Geneve.

5. Ibaragi K, Kazama H, Oguri M (2003) Dental catalyst for chemical polymerization and use thereof. US Patent 6660784 B4, Dec 9.

6. Johnson N, Schmid S, Franceschi S, MacDonald DG, Ferlay J, Bouquot JE et al. (2005) Squamous cell carcinoma. In: WHO classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours, Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D eds, IARC Press, Lyon, 168-175.

   Websites cannot be cited in the reference list. They may be cited within the text or in the table as a footnote.

Figures and tables

Authors will be charged for color illustrations. Each illustration should be numbered consecutively with Arabic numbers and accompanied by a legend clearly describing it. All illustrations must be submitted in a form and condition suitable for reproduction either across a single column (=8.4 cm) or a whole page (=17.6 cm). Each table should be clearly titled and provided with a comprehensive legend. Statistical measures of variation, SD, SEM etc. should be identified. Tables should be numbered separately in Arabic numbers (Table 1, 2 etc.).

Case reports

The journal only publishes case reports if they deal with new scientific hypotheses on known diseases or represent new disease entities or cases with a highly unusual appearance or extremely rare cases. Case reports must not exceed 4 printed pages, with a limited number of figures and a maximum of 10 pertinent references. The authors should comply with the following format.

1. Number of authors: limit to six or less for the JOS Case repots.

2. Abstract: describe how the case is unique and significant (not more than 100 words).

3. Introduction: provide a historical perspective of the topic clearly and concisely, and also state why the case needs to be reported. Do not include didactic factual information.

4. Case Report: give a short description of the case. Include the necessary documentations (clinical photograph, radiograph, microscopic figure, etc.).

5. Discussion: describe what makes the case interesting and novel from past reports, and also provide a brief comment of how the finding advances knowledge of the field. Do not include a literature review.

Case reports that do not conform to the above-mentioned requirements will be returned without review.

PROOFS

Proofs will be sent to the authors. Only printer's errors must be corrected; no change in, or additions to, the edited manuscript will be allowed at this stage. The corrected proofs must be returned within 2 days of receipt, preferably by e-mail. If the Editor receives no reply after approximately 2 weeks, the assumption will be made that there are no errors to correct and the article will be published after in-house correction.

REPRINTS

All reprints are supplied at cost.