

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

PATRÍCIA DE FREITAS ABREU

Avaliação da remodelação periodontal em molares de ratos sob modificações experimentais na carga oclusal.

ALFENAS/MG

2026

PATRÍCIA DE FREITAS ABREU

Avaliação da remodelação periodontal em molares de ratos sob modificações experimentais na carga oclusal.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas.
Orientador: Prof.^a Dra. Juliana dos Santos Neves

ALFENAS/MG

2026

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Abreu, Patrícia de Freitas .

Avaliação da remodelação periodontal em molares de ratos sob modificações experimentais na carga oclusal. / Patrícia de Freitas Abreu. - Alfenas, MG, 2026.

65 f. : il. -

Orientador(a): Juliana dos Santos Neves.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2026.

Bibliografia.

1. Força oclusal. 2. Periodonto. 3. Remodelação óssea . 4. SOST. 5. Metaloproteinase de Matriz 2.. I. Neves, Juliana dos Santos, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

PATRÍCIA DE FREITAS ABREU

Avaliação da remodelação periodontal em molares de ratos sob modificações experimentais na carga oclusal.

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 26 de Março de 2026

Prof. Dra. Juliana dos Santos Neves
Universidade Federal de Alfenas.

Assinatura:  Documento assinado digitalmente
JULIANA DOS SANTOS NEVES
Data: 13/04/2026 13:23:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof.^a Dr.^a Nádia Fayez Omar
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Assinatura:



Documento assinado eletronicamente por **Juliana dos Santos Neves, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/03/2026, às 11:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1724519** e o código CRC **2EA901ED**.

Dedico este trabalho a

Helder, meu marido, que além de me apoiar e incentivar em cada etapa desta jornada, ainda me acompanhou pessoalmente até Alfenas, tornando possível a realização deste sonho.

Aos meus filhos, Gustavo e Gabriel, que compreenderam, mesmo em tantos momentos em que não pude dedicar-lhes a devida atenção, que este esforço também é por eles e para um futuro melhor.

À minha mãe, Silma, que ofereceu apoio incondicional e sendo fonte de força em todos os momentos.

Ao meu pai, Lázaro, que sempre torce por mim e celebra cada conquista como se fosse dele.

E à minha querida amiga Juliana Zorzin, por enxergar em mim o potencial para seguir no mestrado, mesmo antes que eu mesma acreditasse. Seu apoio, incentivo e confiança foram fundamentais nesta jornada.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À minha professora orientadora, Dra. Juliana dos Santos Neves, expresso minha mais profunda gratidão por todo o suporte, acompanhamento e dedicação ao longo desta trajetória. Em cada fase do desenvolvimento deste trabalho, estive ao meu lado, conduzindo-me com sabedoria, orientando-me de forma clara e paciente e transformando cada desafio em oportunidade de aprendizado. Sua experiência, generosidade e estímulo foram fundamentais para a realização desta dissertação. Obrigada por acreditar em meu potencial e por compartilhar seu conhecimento com tanto comprometimento.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da UNIFAL-MG, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Raphael Cavalcante Costa, e a todo o corpo docente, agradeço pela formação e pelo suporte acadêmico ao longo desta trajetória.

Aos funcionários do Biotério Central da UNIFAL-MG e aos profissionais do Laboratório de Histologia, expresso minha gratidão pelo apoio técnico, pela disponibilidade e pela colaboração, que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio concedido por meio do Projeto N°APQ-05853-23 .O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua razão de existir.”

(Albert Einstein, 1955).

RESUMO

A oclusão é essencial para a homeostase do periodonto de sustentação, fornecendo estímulos mecânicos que mantêm o equilíbrio funcional de suas estruturas. Alterações como bruxismo, restaurações mal ajustadas, hábitos parafuncionais, mordida aberta e perdas dentárias podem gerar cargas oclusais anormais — hiperfunção ou hipofunção — que desencadeiam respostas adaptativas distintas e modificações estruturais no periodonto. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de modificações experimentais na carga oclusal sobre características histológicas e moleculares dos tecidos periodontais de molares de ratos. Os primeiros molares inferiores esquerdos foram submetidos à elevação da superfície oclusal com fio de aço (hiperfunção) ou à extração dos primeiros e segundos molares superiores esquerdos (hipofunção), enquanto molares normofuncionais serviram como controle. Após 4 e 8 dias, as hemimandíbulas foram analisadas na região de furca por histomorfometria e histoquímica (colágeno do ligamento periodontal, espessura do ligamento periodontal e do cimento, volume ósseo e osteoclastos TRAP-positivos) e por imunohistoquímica (MMP-2 e esclerostina). As modificações oclusais induziram mudanças rápidas, sem sinais macroscópicos de inflamação. Na hipofunção, houve padrão de desuso: redução de colágeno e espessura do ligamento periodontal, aumento de osteoclastos, menor volume ósseo em 8 dias e maior espessura de cimento acelular na região de furca. Na hiperfunção, observou-se uma resposta em duas fases: em 4 dias ocorreram alterações mais intensas (maior reabsorção/atividade osteoclástica e redução do volume ósseo), seguidas de tendência de recuperação em 8 dias, com parâmetros aproximando-se do controle. A imunomarcagem para MMP-2 no ligamento periodontal permaneceu semelhante entre os grupos, sem mudanças consistentes ao longo do período experimental. A esclerostina aumentou no Hipo 8d e elevou-se transitoriamente no Hiper 4d. Modificações de curto prazo na carga oclusal induziram alterações histológicas no periodonto de sustentação e a esclerostina se mostrou um marcador-chave da adaptação dos osteócitos do septo interradicular às variações de carga.

Palavras-chave: Força oclusal; Periodonto; Remodelação óssea; SOST; Metaloproteinase de Matriz 2.

ABSTRACT

Occlusion is essential for the homeostasis of the supporting periodontium, providing mechanical stimuli that maintain the functional balance of its structures. Alterations such as bruxism, poorly fitted restorations, parafunctional habits, open bite, and tooth loss may generate abnormal occlusal loads—hyperfunction or hypofunction—triggering distinct adaptive responses and structural changes in the periodontium. This study aimed to evaluate the effects of experimental modifications in occlusal load on the histological and molecular characteristics of periodontal tissues in rat molars. The mandibular left first molars were subjected to occlusal surface elevation with a steel wire (hyperfunction) or extraction of the maxillary left first and second molars (hypofunction), while normally functioning molars served as controls. After 4 and 8 days, the hemimandibles were analyzed in the furcation region by histomorphometry and histochemistry (periodontal ligament collagen, periodontal ligament and cementum thickness, bone volume, and TRAP-positive osteoclasts) and by immunohistochemistry (MMP-2 and sclerostin). Occlusal modifications induced rapid changes without macroscopic signs of inflammation. In hypofunction, a disuse pattern was observed, with reduced collagen and periodontal ligament thickness, increased osteoclasts, lower bone volume at 8 days, and increased acellular cementum thickness. In hyperfunction, a biphasic response was observed: more intense changes at 4 days (greater resorption/osteoclastic activity and reduced bone volume), followed by a tendency toward recovery at 8 days, with parameters approaching control values. MMP-2 immunostaining in the periodontal ligament remained similar among groups, with no consistent changes throughout the experimental period. Sclerostin increased in Hipo 8d and showed a transient increase in Hiper 4d. Short-term modifications in occlusal load induced histological changes in the supporting periodontium, and sclerostin was shown to be a key marker of the adaptation of interradicular septum osteocytes to load variations.

Keywords: Occlusal force; Periodontium; Bone remodeling; SOST; Matrix Metalloprotei

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Delineamento do experimento.....	29
Figura 2-- Procedimento experimental de hiperfunção	31
Figura 3-Procedimento experimental de hipofunção	32
Figura 4-Procedimento experimental de hipofunção	34
Figura 5-Análise da densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradiculare no software Image Pro Plus.....	35
Figura 6-Fotomicrografias de cortes histológicos do primeiro molar	36
Figura 7-Processo de quantificação da área de colágeno no ligamento periodontal por meio do software Image J	37
Figura 8-Hemimandíbulas esquerdas de ratos após fixação dos grupos Controle, Hiperfunção oclusal por 4 dias (Hiper 4d) e Hipofunção occlusal por 4 dias (Hipo 4d), posicionadas sobre régua milimetrada.....	40
Figura 9-Fotomicrografias de cortes do primeiro molar inferior esquerdo corados em HE nos grupos controle, Hipo 4d e Hipo 8d.	42
Figura 10-Fotomicrografias de cortes do primeiro molar inferior esquerdo corados em HE nos grupos controle, Hiper 4d e Hiper 8d.	44
Figura 11-Representação gráfica das análises histomorfométricas	46
Figura 12-Fotomicrografias de cortes submetidas à reação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) utilizada para identificação de osteoclastos, com contracoloração para evidenciar a morfologia tecidual	48
Figura 13-Fotomicrografias do campo 6 (LP da raiz distal cervical lado furca) do primeiro molar inferior esquerdo	50
Figura 14-Fotomicrografias do campo 6 (LP da raiz distal cervical lado furca) do primeiro molar inferior esquerdo em hiperfunção	51
Figura 15-Fotomicrografias representativas de cortes evidenciando a imunorreatividade para MMP-2 (DAB, marrom) nos tecidos periodontais, com contracoloração por hematoxilina.....	52
Figura 16-Quantificação da imunomarcção para MMP-2 no ligamento periodontal (LP) na região de furca/septo inter-radicular do	

primeiro molar inferior de ratos.	53
Figura 17-Imunomarcção para esclerostina em osteócitos do osso alveolar na região de furca/septo inter-radicular do primeiro molar inferior.	54
Figura 18-Frequências de osteócitos positivos e negativos para esclerostina (nº/0,05 mm ²) no septo interradicular.	55

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Peso dos ratos em gramas no início e no final do período experimental.....	34
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
HIPER	Hiperfunção
HIPO	Hipofunção
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LP	Ligamento periodontal
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz 2
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa-B
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos.....	19
2	DESENVOLVIMENTO.....	20
2.1	TECIDO DE SUSTENTAÇÃO DOS DENTES	20
2.2	MODIFICAÇÃO DA CARGA OCLUSAL E OS IMPACTOS NO PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO	22
2.3	EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE ESCLEROSTINA, E METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 NOS TECIDOS PERIODONTAIS	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Delineamento experimental	29
3.2	Modelo experimental de modificação da carga oclusal	29
3.3	Preparo das amostras	33
3.4	Análise da espessura do cemento e do ligamento periodontal na região de furca.....	35
3.5	Quantificação de osteoclastos e densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradicular.....	36
3.6	Análise de colágeno no ligamento periodontal.....	36
3.7	Análise de expressão de MMP-2 e Esclerostina nos tecidos periodontais	37
3.8	Análise estatística	39
4	RESULTADOS.....	39
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO.....	65

1 INTRODUÇÃO

O periodonto de sustentação é constituído pelas estruturas que são responsáveis pela ancoragem dos dentes na maxila e na mandíbula, sendo elas o cemento, o ligamento periodontal e o osso alveolar. Estes tecidos têm a mesma origem ectomesenquimal do folículo dentário, sendo o cemento um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a dentina radicular, o osso alveolar um revestimento ósseo do alvéolo dentário e o ligamento periodontal um tecido conjuntivo frouxo atravessado por grossos feixes colágenos que se inserem no cemento e no osso alveolar (Katchburian & Arana, 2012).

A estrutura e a função dos tecidos periodontais estão intimamente relacionadas à função oclusal (Rios *et al.*, 2008). Em um periodonto saudável, a oclusão oferece o estímulo mecânico necessário para manter o equilíbrio e o bem-estar dos tecidos periodontais (Furlaneto *et al.*, 2009). Problemas como má oclusão, bruxismo (ranger ou apertar dos dentes), restaurações dentárias mal ajustadas ou hábitos parafuncionais podem resultar em cargas oclusais anormais (Fan & Caton, 2018). O trauma oclusal é definido como dano ao aparelho de inserção periodontal resultante do excesso de força oclusal (Noma *et al.*, 2007).

Algumas alterações no periodonto de molares de ratos decorrentes de carga oclusal excessiva têm sido descritas, como estreitamento do espaço do ligamento periodontal na área de furca, desorganização do ligamento periodontal com diminuição de fibras colágenas e da celularidade, aumento da reabsorção óssea no septo interradicular e presença de vasos sanguíneos dilatados (Kaku *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2008; Wan *et al.*, 2012; Noma *et al.*, 2007). Tais alterações, no entanto, foram observadas como efeitos iniciais da hiperfunção dentária (até 5 dias de sobrecarga oclusal), pois após um período de cerca de 10 a 14 dias o arranjo periodontal tendeu a voltar aos aspectos dos dentes controle - normofuncionais (Kaku *et al.*, 2005; Yoshinaga *et al.* 2007). Entretanto, em uma análise de longo prazo de molares de ratos em sobrecarga oclusal (6 semanas de hiperfunção) observou-se degeneração do ligamento periodontal, levando a reabsorção alveolar mais severa, colapso do espaço periodontal, e alterações inflamatórias mais intensas em comparação com animais controle (Lassila & Koivumaa, 1982).

Por outro lado, a ausência de estímulo oclusal também influencia a estrutura periodontal (Levy; Mailland, 1980; Tran Van; Mailland, 1981; Deporter et al., 1982;

aneko et al., 2001; Xu et al., 2016). Diversos tipos de má oclusão, como mordida aberta e posição alta dos caninos, podem resultar em dentes hipofuncionais por falta de contato oclusal efetivo (Okeson, 2008). A perda do elemento dentário é uma situação clínica frequente que pode levar à hipofunção oclusal e à supererupção do dente antagonista remanescente (Okeson, 2008; Levy; Mailland, 1980; Tran Van; Mailland, 1981). Levy e Mailland (1980), Tran Van e Mailland (1981), Deporter et al. (1982) e Kaneko et al. (2001) descreveram que a perda do contato oclusal em roedores promove, em curto prazo, um padrão consistente de alterações atróficas nos tecidos de suporte, com redução da espessura do ligamento periodontal, diminuição da vascularização local, atrofia/desorganização de fibras colágenas e comprometimento de eventos associados à formação óssea, caracterizando um quadro típico de desuso funcional. Também foi observada reabsorção óssea leve em algumas áreas, sugerindo que a ausência de carga pode comprometer a manutenção da arquitetura periodontal. (Levy & Mailland, M.L.,1980). Tran Van & Mailland, em 1981, observou presença de sinais iniciais de atrofia tecidual, com redução do número de fibroblastos e colágeno. Em alguns estudos de longo prazo (6 semanas a 3 meses), a hipofunção de molares de roedores levou a reabsorção e diminuição da altura da crista óssea alveolar, maturação do novo osso alveolar formado com conseqüente manutenção do estreitamento e desorganização do ligamento periodontal e osteoporose na parte inferior do septo interradicular (Levi & Mailland, 1980; Lassila & Koivumaa, 1982; Xu *et al.* 2016).

Embora haja muitas evidências demonstrando a importância do estímulo oclusal para a manutenção da homeostase do periodonto de sustentação, muitos dos mediadores celulares e moleculares das respostas adaptativas ainda precisam ser elucidados (McCauley; Nohutcu, 2002; Dieterle et al., 2021; Wang et al., 2024). A regulação da homeostase do periodonto envolve a proliferação, diferenciação e apoptose de várias células do tecido periodontal e a remodelação da matriz extracelular, sendo modulada por várias moléculas que incluem hormônios, fatores de crescimento, citocinas e enzimas (McCauley & Nohutcu,2002).

Em contrapartida, a esclerostina (produto do gene SOST) é uma glicoproteína secretada principalmente por osteócitos e atua como inibidora da sinalização Wnt/ β -catenina, reduzindo a formação óssea (Weivoda; Youssef; Oursler, 2017; Ashifa et al., 2021; Li et al., 2008). Os osteócitos são células ósseas maduras inseridas na matriz óssea mineralizada e exercem papel central na mecanossensação e na coordenação da atividade de osteoblastos e osteoclastos (Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Choi et al., 2022). A esclerostina participa dessa resposta mecânica, e sua expressão pode ser modulada pela carga, influenciando o balanço remodelador (Robling et al., 2008; Nam et al., 2022; Wang et al., 2024).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) constituem uma grande família de endopeptidases dependentes de zinco e cálcio, com mais de 23 membros descritos em humanos, envolvidas na remodelação e degradação da matriz extracelular e também na clivagem de moléculas regulatórias (Maciejczyk et al., 2016). No periodonto, colagenases (como a MMP-1) e gelatinases (como MMP-2 e MMP-9) participam do turnover de colágeno e da dinâmica inflamatória/remodeladora dos tecidos periodontais, sendo frequentemente discutidas no contexto de saúde e doença periodontal (Maciejczyk et al., 2016; Santos et al., 2004). No ligamento periodontal, o colágeno e componentes da substância fundamental são substratos relevantes para essas enzimas, e alterações de carga mecânica podem modificar a organização e a deposição de proteínas da matriz, reforçando o papel do estímulo oclusal na homeostase tecidual (Dieterle et al., 2021; Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Nan et al., 2023). Em modelo clássico de hipofunção em ratos, observou-se redução da fagocitose de colágeno por fibroblastos do ligamento periodontal em curto prazo, acompanhada de diminuição do conteúdo de fibras colágenas (Deporter et al., 1982). Alterações na substância fundamental também foram descritas, como redução do conteúdo de proteoglicanas no ligamento periodontal após hipofunção oclusal (Kaneko et al., 2001). Em incisivos de ratos submetidos à perda de contato oclusal por 14 dias, foi demonstrado aumento da atividade de MMP-2, com redução de MT1-MMP e TIMP-2 e desorganização do colágeno no ligamento periodontal, sugerindo participação direta do eixo MMP-2/MT1-MMP/TIMP-2 na remodelação associada à hipofunção (Omar et al., 2018). Em conjunto, esses achados sustentam que o remodelamento do ligamento

periodontal em condições de desajuste oclusal pode envolver tanto mudanças na atividade celular dos fibroblastos quanto modulação do equilíbrio entre MMPs e seus inibidores, contribuindo para alterações estruturais da matriz extracelular (Maciejczyk et al., 2016; Omar et al., 2018; Deporter et al., 1982; Kaneko et al., 2001)

A compreensão das interações moleculares e biomecânicas que regulam o periodonto é essencial para a avaliação dos efeitos das modificações da carga oclusal. A esclerostina, BMP-2 e MMP-2 desempenham papéis cruciais nesses processos, oferecendo potenciais alvos terapêuticos para a regeneração e manutenção da saúde periodontal. Estudos futuros devem focar em elucidar os mecanismos precisos pelos quais essas moléculas interagem e como sua modulação pode influenciar o tratamento de doenças periodontais e traumas oclusais.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da carga oclusal nas características histológicas dos tecidos periodontais e sua relação com a expressão de algumas moléculas envolvidas na remodelação periodontal.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar os efeitos de curto prazo (4 a 8 dias) da hiperfunção e hipofunção oclusal na área e quantidade de colágeno do ligamento periodontal, espessura do cemento, área e quantidade de osteoclastos do osso alveolar em molares de ratos.

- b) Avaliar a distribuição da expressão de MMP-2 e Esclerostina no periodonto de molares de ratos com ou sem trauma oclusal.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 TECIDOS DE SUSTENTAÇÃO DOS DENTES

O periodonto pode ser dividido em periodonto de proteção e periodonto de suporte (Newman et al., 2020; Lindhe et al., 2010). O periodonto de proteção tem a função de promover a homeostase, vedando o meio interno e permitindo que o hospedeiro mantenha a saúde periodontal frente às constantes agressões provocadas pela placa bacteriana e por estímulos físicos (Lindhe et al., 2010; Newman et al., 2020). Já o periodonto de sustentação é composto pelos tecidos que suportam e fixam os dentes ao osso alveolar (Newman et al., 2020; Lindhe et al., 2010). Ele desempenha papel na estabilidade dentária, na absorção de forças mastigatórias e na manutenção da integridade dos dentes dentro da cavidade alveolar (Newman et al., 2020; Lindhe et al., 2010). O ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar propriamente dito integram o periodonto de sustentação (Newman et al., 2020; Lindhe et al., 2010).

O cemento radicular é um tecido conjuntivo mineralizado que recobre a superfície da dentina na raiz do dente (Arana; Katchburian, 2012). A cementogênese inicia-se em concomitância com o desenvolvimento radicular, após o início da formação da dentina radicular (Arana; Katchburian, 2012). Na interface dentina–cimento, descreve-se inicialmente a deposição de uma camada hialina (também referida como camada intermediária), associada à adesão entre a dentina e o cemento em formação (Arana; Katchburian, 2012). Com a fragmentação da bainha epitelial de Hertwig, células ectomesenquimais do folículo dentário passam a entrar em contato com a superfície radicular e se diferenciam em cementoblastos e fibroblastos do ligamento periodontal (Arana; Katchburian, 2012). Os cementoblastos então secretam uma matriz orgânica rica em colágeno, que posteriormente se mineraliza principalmente pela deposição de cristais de hidroxiapatita, sem depender do mecanismo de vesículas da matriz (Arana; Katchburian, 2012).

O ligamento periodontal é um tecido conjuntivo não mineralizado situado entre o cemento e o osso alveolar, que fixa o dente ao alvéolo e corresponde ao espaço periodontal observável radiograficamente (Lindhe et al., 2010; Newman et al., 2020). Sua composição conjuntiva e não mineralizada, formada por tecido frouxo com feixes colágenos espessos inseridos no cemento e no osso alveolar,

favorece a dissipação e a distribuição das forças mastigatórias (Arana; Katchburian, 2012; Lindhe et al., 2010). O ligamento periodontal origina-se de células ectomesenquimais do folículo dentário, que se diferenciam em fibroblastos e outras células responsáveis pela síntese de fibras colágenas e componentes da matriz extracelular (Ten Cate; Mills, 1972; Arana; Katchburian, 2012). Além disso, mecanorreceptores presentes no ligamento periodontal contribuem para o controle sensorial e a adaptação funcional dos movimentos mastigatórios (Okeson, 2008).

O osso alveolar, que forma os alvéolos dentários na maxila e mandíbula, desenvolve-se a partir de células ectomesenquimais associadas ao germe dentário/folículo dentário (Ten Cate; Mills, 1972; Lindhe et al., 2010). Essas células se diferenciam em osteoblastos, responsáveis pela deposição da matriz óssea que posteriormente se mineraliza (Florencio-Silva et al., 2015; Lindhe et al., 2010). Inicialmente, pode apresentar características de osso imaturo (não lamelar), sendo remodelado continuamente com o crescimento, a erupção e as demandas funcionais, ajustando-se às exigências estruturais e mecânicas (Florencio-Silva et al., 2015; Lindhe et al., 2010).

O periodonto de sustentação mantém o dente firmemente ancorado no osso alveolar (Lindhe et al., 2010; Newman et al., 2020). As fibras do ligamento periodontal contribuem para a distribuição e dissipação das forças mastigatórias, favorecendo a adaptação funcional do dente ao alvéolo e reduzindo o risco de alterações por sobrecarga (Lindhe et al., 2010; Okeson, 2008). O ligamento periodontal é ricamente inervado por mecanorreceptores, que fornecem feedback sensorial e auxiliam no controle da força de mordida e na coordenação da função mastigatória (Okeson, 2008). Alterações de carga oclusal, como forças excessivas, podem provocar respostas adaptativas e/ou lesões no periodonto, incluindo sinais compatíveis com trauma oclusal, dependendo da intensidade e duração do estímulo (Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018).

A remodelação óssea ocorre continuamente por meio da atividade coordenada de osteoclastos, responsáveis pela reabsorção, e osteoblastos, responsáveis pela formação de nova matriz óssea, enquanto os osteócitos atuam como mecanossensores que percebem alterações de carga e modulam esse equilíbrio (Turner; Forwood; Otter, 1994; Klein-Nulend et al., 1995; Choi et al., 2022). Fatores locais e sistêmicos também participam da homeostase óssea,

influenciando o recrutamento celular, a deposição de matriz e a intensidade do remodelamento (Florencio-Silva et al., 2015). Assim, a manutenção da integridade do osso alveolar depende da integração entre estímulos mecânicos, sinalização celular e regulação biológica, permitindo adaptação às demandas funcionais e preservação do suporte dentário (Florencio-Silva et al., 2015; Thompson; Rubin; Rubin, 2012).

2.2 MODIFICAÇÃO DA CARGA OCLUSAL E OS IMPACTOS NO PERIODONTO DE SUSTENTAÇÃO

A compreensão adequada da oclusão dentária é essencial para a prática de uma odontologia de qualidade (Okeson, 2008). O cirurgião-dentista deve estar familiarizado com os princípios que definem uma oclusão ideal em dentes naturais e aplicar esses conceitos no restabelecimento da oclusão quando necessário, buscando estabilidade e função (Okeson, 2008; Newman et al., 2020).

Na oclusão fisiológica, o sistema mastigatório opera de forma eficiente e sem causar dor (Okeson, 2008). Os dentes permanecem firmes, sem deslocamento, e a articulação temporomandibular, juntamente com as estruturas associadas, funciona de maneira equilibrada, sem ruídos ou desconforto, contribuindo para a manutenção do conforto funcional e da saúde periodontal (Okeson, 2008; Lindhe et al., 2010; Newman et al., 2020). As forças oclusais exercem estímulo para a remodelação óssea no osso alveolar, desencadeando respostas celulares dependentes de carga mecânica (Duncan; Turner, 1995; Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Lindhe et al., 2010). Essa remodelação é um processo contínuo que envolve reabsorção por osteoclastos e formação por osteoblastos, ajustando a estrutura óssea conforme necessário para manter estabilidade e integridade do suporte dentário (Florencio-Silva et al., 2010; McCauley; Nohutcu, 2002; Thompson; Rubin; Rubin, 2012).

A carga mecânica ativa respostas em células ósseas, incluindo osteoblastos, estimulando proliferação e síntese de matriz óssea em interação com citocinas, fatores de crescimento e hormônios (Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Florencio-Silva et al., 2015). Esse processo, denominado mecanotransdução, envolve a detecção do estímulo físico, sua conversão em

sinais bioquímicos e a modulação da expressão gênica no núcleo (Turner; Forwood; Otter, 1994; Duncan; Turner, 1995). Os osteócitos desempenham papel central nesse mecanismo, atuando como mecanossensores e liberando sinais que influenciam a atividade osteoblástica e osteoclástica (Klein-Nulend et al., 1995; Choi et al., 2022). A magnitude, o tipo e a duração do estímulo mecânico determinam padrões distintos de resposta celular e de remodelação óssea (Duncan; Turner, 1995; Thompson; Rubin; Rubin, 2012).

Já a oclusão patológica, caracterizada por alterações como má oclusão, bruxismo, restaurações desadaptadas e hábitos parafuncionais, pode gerar cargas oclusais anormais (Okeson, 2008; Furlaneto et al., 2009). Essas forças desequilibradas podem estar associadas a microtraumas cumulativos que afetam dentes, periodonto, músculos mastigatórios e articulação temporomandibular, contribuindo para disfunções orofaciais que exigem diagnóstico e conduta clínica adequada (Okeson, 2008; Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018).

A relação entre trauma oclusal e remodelação óssea tem sido amplamente abordada na literatura odontológica (Hallmon, 1999; Furlaneto et al., 2009; Fan; Caton, 2018; Lindhe et al., 2010). O trauma oclusal é definido como a aplicação de forças oclusais excessivas que excedem a capacidade adaptativa do aparelho de inserção periodontal, resultando em alterações nas estruturas de suporte (Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018). Esse estímulo pode desencadear remodelação óssea alveolar, com aumento de reabsorção e neoformação em tentativa de adaptação às novas condições de carga, envolvendo mediadores como RANKL e a ativação de osteoclastos (McCauley; Nohutcu, 2002; Yoshinaga et al., 2007; Walker et al., 2008; Wan et al., 2012).

Estudos demonstram que o trauma oclusal pode induzir respostas inflamatórias nos tecidos periodontais e estimular a osteoclastogênese, aumentando a reabsorção óssea alveolar (Hallmon, 1999; McCauley; Nohutcu, 2002; Yoshinaga et al., 2007; Walker et al., 2008; Fan; Caton, 2018). A remodelação óssea em resposta ao trauma oclusal pode ocorrer como mecanismo compensatório, na tentativa de manter a integridade funcional do sistema estomatognático e do suporte periodontal (Lindhe et al., 2010; McCauley; Nohutcu, 2002). No entanto, quando forças excessivas persistem por tempo prolongado ou com alta intensidade, podem ocorrer alterações

progressivas no periodonto, com perda óssea e comprometimento da estabilidade dos dentes envolvidos (Hallmon, 1999; Lassila; Koivumaa, 1980; Fan; Caton, 2018; Wan et al., 2012).

O desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, mediado pela atividade de osteoclastos e osteoblastos, pode reduzir a densidade óssea e comprometer o suporte dentário (Florencio-Silva et al., 2015; Thompson; Rubin; Rubin, 2012). Além disso, em situações de forças oclusais excessivas, pode haver intensificação de respostas inflamatórias e de mediadores associados à reabsorção óssea, o que pode agravar a destruição dos tecidos periodontais, especialmente quando há inflamação periodontal concomitante (McCauley; Nohutcu, 2002; Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018). A identificação precoce e o manejo adequado do trauma oclusal são importantes para reduzir danos ao osso alveolar e favorecer a estabilidade funcional (Okeson, 2008; Fan; Caton, 2018; Lindhe et al., 2010). A persistência de sobrecarga oclusal pode manter a ativação de vias relacionadas à osteoclastogênese e à remodelação desadaptativa, contribuindo para piora do quadro quando associada a inflamação periodontal (Yoshinaga et al., 2007; Walker et al., 2008; Wan et al., 2012; Fan; Caton, 2018). Assim, o controle das forças oclusais, associado ao controle da inflamação, é relevante para preservar a saúde periodontal e reduzir risco de perda de suporte ao longo do tempo (Lindhe et al., 2010; Fan; Caton, 2018).

A relação entre o trauma oclusal e a remodelação óssea envolve uma série complexa de respostas biológicas com participação coordenada de osteoblastos, osteoclastos e osteócitos (Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Choi et al., 2022; McCauley; Nohutcu, 2002). Essa remodelação é um processo dinâmico e contínuo, regulado por estímulos mecânicos e por mediadores locais que controlam a formação e a reabsorção óssea (Florencio-Silva et al., 2015; Duncan; Turner, 1995). O trauma oclusal ocorre quando as forças aplicadas aos dentes excedem a capacidade adaptativa do aparelho de inserção periodontal, desencadeando alterações no periodonto e modulando a remodelação óssea (Furlaneto et al., 2009; Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018). Ao ser detectada a sobrecarga, pode haver aumento de sinais pró-reabsortivos e ativação de células osteoclásticas, favorecendo reabsorção do osso alveolar ao redor dos dentes sob maior demanda mecânica (Wan et al., 2012; Walker et al., 2008). Evidências em modelos experimentais de hipofunção/sobrecarga indicam que alterações de

estresse mecânico podem modificar a expressão de mediadores associados à osteoclastogênese e ao remodelamento, incluindo o sistema RANKL/OPG (Yoshinaga et al., 2007; Kohli; Kohli, 2011; Wang et al., 2024). O RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) é um mediador essencial para diferenciação e ativação de osteoclastos, contribuindo para o aumento da reabsorção óssea quando sua regulação é deslocada para um perfil pró-reabsortivo (Kohli; Kohli, 2011; Yoshinaga et al., 2007).

A sobrecarga mecânica aplicada ao osso alveolar pode ser percebida por osteócitos, células maduras embebidas na matriz mineralizada, que atuam como mecanossensores e iniciam sinais capazes de regular o remodelamento ósseo ao influenciar células efectoras da formação e reabsorção (Klein-Nulend et al., 1995; Duncan; Turner, 1995; Choi et al., 2022). Entre esses sinais, a modulação do sistema RANKL/RANK/OPG é central para a osteoclastogênese e para o aumento de reabsorção óssea em contextos pró-reabsortivos (Kohli; Kohli, 2011). Além disso, os osteócitos produzem esclerostina (produto do gene SOST), que inibe a formação óssea ao antagonizar a sinalização Wnt e, assim, influencia o balanço remodelador (Poole et al., 2005; Weivoda; Youssef; Oursler, 2017). A expressão de Sost/esclerostina é mecanorregulada, podendo diminuir com estímulo mecânico in vivo, reforçando seu papel na adaptação do osso às cargas (Robling et al., 2008). Estudos mais recentes também descrevem a integração entre vias mecanossensoriais em osteócitos que controlam simultaneamente a expressão de esclerostina e RANKL, articulando a resposta ao carregamento com a regulação do remodelamento ósseo (Wang et al., 2024).

Os osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea, podem ser ativados em contextos de trauma oclusal, especialmente quando há aumento de mediadores pró-reabsortivos nos tecidos de suporte, favorecendo osteoclastogênese e reabsorção alveolar (Hallmon, 1999; McCauley; Nohutcu, 2002; Yoshinaga et al., 2007; Walker et al., 2008; Fan; Caton, 2018; Wan et al., 2012). Eles aderem à superfície óssea e promovem degradação da matriz mineralizada por mecanismos enzimáticos, resultando em reabsorção localizada (Florencio-Silva et al., 2015; McCauley; Nohutcu, 2002). Esse processo faz parte do remodelamento fisiológico, mas, se a sobrecarga persiste, a atividade osteoclástica pode se intensificar e contribuir para perda óssea excessiva (Florencio-Silva et al., 2015; Fan; Caton, 2018). Ao mesmo tempo, os

osteoblastos atuam na formação óssea, sintetizando nova matriz para substituir o osso previamente reabsorvido (Florencio-Silva et al., 2015; Thompson; Rubin; Rubin, 2012). Contudo, quando o estímulo traumático se mantém, pode ocorrer desequilíbrio em favor da reabsorção, com prejuízo progressivo do suporte ósseo (Florencio-Silva et al., 2015; Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Wan et al., 2012). Além disso, osteócitos incorporados à matriz óssea funcionam como mecanossensores, detectando alterações de carga e modulando sinais que influenciam osteoblastos e osteoclastos durante a adaptação às forças (Klein-Nulend et al., 1995; Thompson; Rubin; Rubin, 2012; Choi et al., 2022).

2.3 EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE ESCLEROSTINA E METALOPROTEINASE DE MATRIZ 2 NOS TECIDOS PERIODONTAIS

A esclerostina, um produto proteico do gene *Sost*, secretada principalmente pelos osteócitos, célula óssea especializada encontrada na matriz óssea mineralizada é um potente regulador da remodelação óssea, controlando a formação e a reabsorção óssea por meio de um fator inibidor da formação óssea, atuando através da supressão da via de sinalização Wnt, que é essencial para a diferenciação e atividade dos osteoblastos, células responsáveis pela formação de novo osso. (Li et al., 2008; Weivoda et al., 2017). Segundo Winkler et al. (2003), a esclerostina age como um antagonista da proteína morfogenética óssea (BMP), modulando negativamente sua ação, o que resulta na diminuição da osteogênese (Winkler et al., 2003). Este efeito regulador é essencial para a manutenção da homeostase óssea, pois controla a ação excessiva dos osteoblastos e promove a adaptação do esqueleto às demandas mecânicas e às condições metabólicas do organismo (Jastrzebski et al., 2013; Weivoda et al., 2017).

A esclerostina também interage com outras vias além da via Wnt, incluindo vias de sinalização relacionadas às BMPs (Winkler et al., 2003; Weivoda; Youssef; Oursler, 2017). Winkler et al. (2003) demonstraram que a esclerostina pode atuar como antagonista de BMP, interferindo na sinalização osteogênica e modulando respostas celulares. Isso reforça a ideia de que a esclerostina não só regula a formação óssea, mas também pode influenciar a reabsorção óssea ao modular mediadores e o acoplamento entre formação e

reabsorção no remodelamento (Weivoda; Youssef; Oursler, 2017). Sua interação com vias osteogênicas e sua influência sobre o equilíbrio remodelador indicam que a esclerostina exerce um papel regulador amplo e multifatorial na remodelação óssea (Winkler et al., 2003; Weivoda; Youssef; Oursler, 2017).

O processo de remodelação óssea é diretamente influenciado pela carga mecânica aplicada ao tecido ósseo. A esclerostina tem um papel central nesse processo, sendo regulada por estímulos mecânicos. Estudos de Robling et al. (2008) indicam que a expressão da esclerostina é reduzida em resposta a estímulos mecânicos, promovendo a formação óssea (Robling et al., 2008). Quando o osso é submetido à carga mecânica, a redução nos níveis de esclerostina permite a ativação da via Wnt, o que estimula a osteogênese (Robling et al., 2008; Meslier et al., 2025). De forma contrária, em situações de descarga mecânica, como a imobilização, há um aumento na expressão da esclerostina, resultando em inibição da formação óssea (Lin et al., 2009; Zhao et al., 2024).

A esclerostina também desempenha um papel relevante em condições patológicas, como nas doenças periodontais, que envolvem a destruição do osso alveolar. Estudos recentes indicam que a esclerostina pode ser um mediador chave no processo de reabsorção óssea associada à periodontite (Liao et al., 2022; Nan et al., 2020). Segundo Ashifa et al. (2021), a presença de esclerostina no periodonto inibe a regeneração óssea e contribui para a perda óssea característica da doença periodontal (Ashifa et al., 2021). Essa ação ocorre por meio da inibição da via Wnt, que é essencial para a regeneração do osso alveolar (Liao et al., 2022; Nam et al., 2020).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas proteolíticas que desempenham um papel na remodelação dos tecidos conjuntivos, incluindo o tecido ósseo e os tecidos periodontais (Maciejczyk et al., 2016; Radzki et al., 2024). Entre as diversas MMPs, a MMP-2 destaca-se pela sua ação na degradação de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno desnaturado (gelatina) e outras macromoléculas da matriz, participando de processos de manutenção e remodelação tecidual (McCauley; Nohutcu, 2002). No contexto periodontal, a MMP-2 tem sido associada a processos de degradação/remodelação dos tecidos periodontais durante inflamação periodontal e também em contextos de reparo/regeneração (Maciejczyk et al.,

2016; Radzki et al., 2024;).

A MMP-2, também conhecida como gelatinase A, é uma enzima que participa da degradação da matriz extracelular e tem sido relacionada a processos de remodelação tecidual e ao microambiente associado à reabsorção óssea (Maciejczyk et al., 2016). Segundo McCauley e Nohutcu (2002), as MMPs, incluindo a MMP-2, são mediadoras relevantes na destruição do osso alveolar observada em doenças periodontais.

Durante a periodontite, a inflamação dos tecidos periodontais leva à ativação de MMPs, o que resulta na degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, na destruição do osso alveolar (McCauley; Nohutcu, 2002; Maciejczyk et al., 2016; Radzki et al., 2024). A MMP-2 participa na degradação de componentes colagênicos/gelatina derivados do colágeno (incluindo colágeno tipo I no contexto de turnover/remodelação), contribuindo para o processo de degradação da matriz em inflamação periodontal (Radzki et al., 2024). Estudos demonstram que o desequilíbrio entre a atividade de MMPs e seus inibidores naturais, como os inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs), é um fator relevante associado à progressão da destruição tecidual e à perda óssea na periodontite (Maciejczyk et al., 2016; Radzki et al., 2024).

Embora a MMP-2 esteja frequentemente associada à reabsorção óssea, ela também desempenha um papel importante na regeneração e remodelação óssea (Khoswanto, 2023;). Durante o processo de cicatrização óssea, a MMP-2 facilita a remodelação da matriz extracelular, criando um ambiente propício para a regeneração tecidual (Khoswanto, 2023). Estudos mostram que a regulação precisa da atividade das MMPs, incluindo a MMP-2, é essencial para garantir que a remodelação óssea ocorra de forma equilibrada, promovendo a formação de novo tecido ósseo após a reabsorção (Maciejczyk et al., 2016; Radzki et al., 2024; Khoswanto, 2023).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram utilizados 25 ratos machos com 7 semanas de idade (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar). Os animais foram adquiridos e mantidos no Biotério Central da UNIFAL-MG sob condições controladas de luz (12 horas no claro, 12 horas no escuro) e temperatura (25-30°C), e tratados com ração balanceada padrão sólido e água *ad libitum*. Os parâmetros éticos do uso de animais por este estudo foram aprovados pelo CEUA-UNIFAL (proposta 33/2024 - Anexo).

3.1 Delineamento experimental

Dez animais tiveram o primeiro molar inferior esquerdo retirado de oclusão (Grupo Hipofuncional) e em outros 10 animais um pedaço de fio de aço (Ø 1 mm) foi aderido à face oclusal do 1º molar inferior esquerdo para a elevação da superfície oclusal (Grupo Hiperfuncional). Esses animais foram subdivididos em quatro grupos de acordo com o período em dias que o dente ficou sob modificação oclusal: Hipo 4 dias, Hipo 8 dias, Hiper 4 dias e Hiper 8 dias, com 5 animais em cada grupo (Fig. 1). Outros 5 animais sem quaisquer alterações realizadas na carga oclusal foram utilizados como controle (Grupo Controle). Todos os ratos foram pesados no primeiro e no último dia do experimento.

Figura 1-Delineamento do experimento



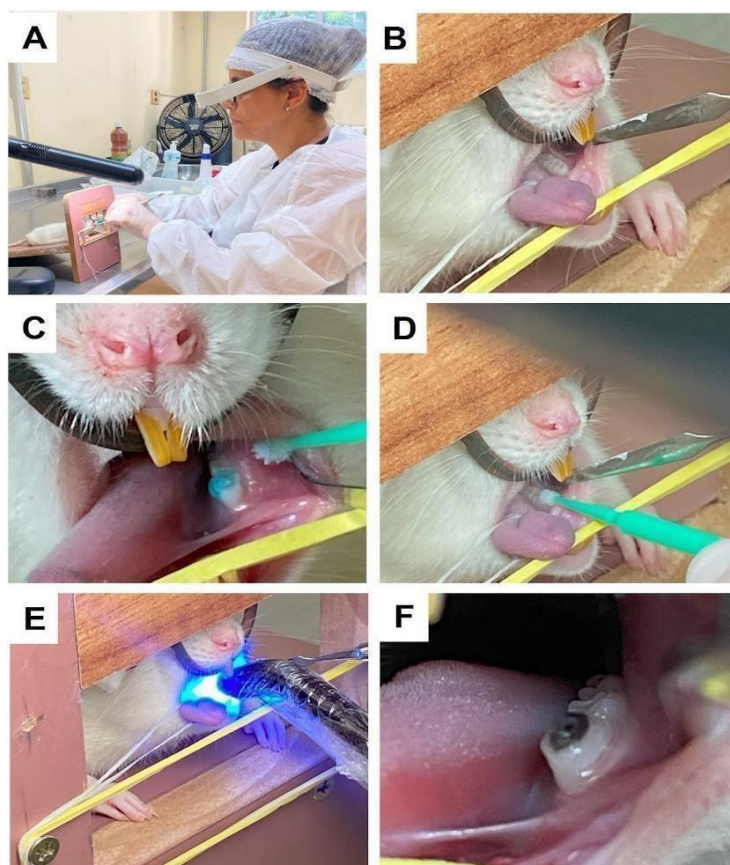
Fonte: do autor

3.2 Modelo experimental de modificação da carga oclusal

3.2.1 Dente hiperfuncional

Dez ratos foram anestesiados com ketamina (Dopalen, Agribands) 80mg/Kg, associado ao relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer) 8mg/Kg, e posicionados em decúbito ventral em um aparato confeccionado para estabilizar o animal com a boca aberta (Fig.2B). O procedimento começou com a aplicação de ácido fosfórico 37% (Biodinâmica) na face oclusal do primeiro molar inferior esquerdo com o auxílio de um pincel *microbrush* por 20 seg. (Fig.2C). O ácido foi removido com cotonete embebido em água e a secagem do dente realizada com outro cotonete seco (Fig.2D). Em seguida aplicou-se uma camada de adesivo (Single bond 2, 3M), o qual foi fotopolimerizado por 20 seg. (Fig.2E). Um pedaço de fio de aço com 1 mm de diâmetro da marca Morreli e, aproximadamente, 2 mm de largura foi fixado na face oclusal do dente com resina fotopolimerizável (Z100, 3M), um *microbrush* foi utilizado para alisar as extremidades para evitar bordas cortantes e a resina foi fotopolimerizada por 40 seg. (Fig. 2F).

Figura 2- Procedimento experimental de hiperfunção



Fonte:do autor (2025)

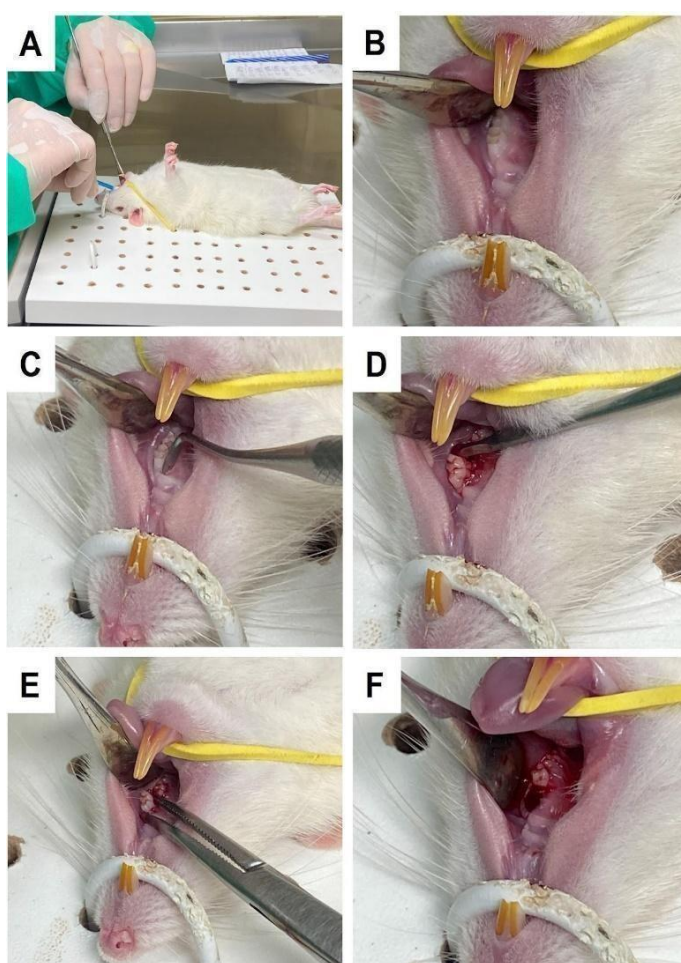
Legenda: Fixação de fio metálico na face oclusal do primeiro mola inferior esquerdo de rato, com resina composta fotopolimerizável, simulando interferência oclusal. A – Posicionamento do animal e realização do procedimento em bancada com contenção adequada, B – Isolamento e exposição do molar superior, C – Aplicação do sistema adesivo, D – Inserção da resina composta, E – Fotopolimerização do material restaurador, F – Aspecto final da restauração em resina composta

3.2.2 Dente hipofuncional

Dez animais foram anestesiados com Ketamina (Dopalen, Agribands, Brasil) 80mg/Kg e Cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil) 8mg/Kg e uma injeção intraperitoneal de cloridrato de buprenorfina (Beniv, Ourofino) diluído em salina (0,05mg/kg) foi aplicada adicionalmente para analgesia pós-operatória. Os ratos foram posicionados em decúbito dorsal em um aparato confeccionado para estabilizar o animal com a boca aberta. Os primeiros e segundos molares superiores esquerdos foram extraídos da seguinte maneira: a gengiva ao redor

dos dentes foi descolada com holleback 3ss e o dente luxado utilizando-se micro-cinzel Ochenbein n°.1. Em seguida, os dentes foram luxados e avulsionados com o auxílio de pinça Mosquito curva adaptada como fórceps (Fig. 3). Os alvéolos foram secados com gaze e deixados sem sutura. Os animais receberam outra dose de cloridrato de buprenorfina 24h após o procedimento.

Figura 3-Procedimento experimental de hipofunção



Fonte: do autor (2025)

Legenda: Extração dos primeiros e segundos molares superiores esquerdos de rato.

A – Posicionamento do animal em plano com contenção, B – Abertura da cavidade oral e visualização do molar, C – Inserção da alavanca entre o dente e o osso adjacente, D – Luxação do dente, E – Remoção do dente com pinça anatômica, F – Cavidade alveolar exposta após exodontia.

3.2.3 Dente controle

Cinco animais sem quaisquer alterações realizadas na carga oclusal foram utilizados como controle (Grupo Controle).

3.3 Preparação das amostras

Após o período experimental de 4 ou 8 dias, os ratos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia em Isoflurano (Isoforine, Cristália) e as hemimandíbulas esquerdas dissecadas e colocadas em uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio 0.1M, pH 7.4, por 48 horas.

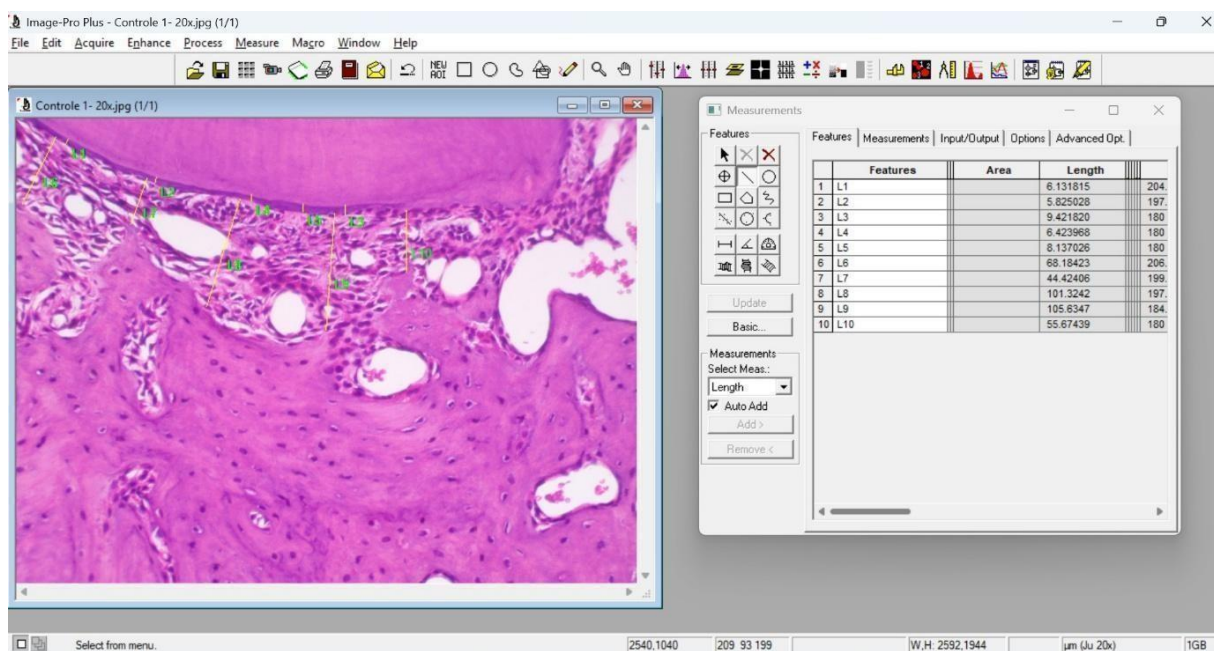
Em seguida, elas foram descalcificadas em EDTA 4.13% sob agitação por 6 semanas, sendo a solução descalcificadora trocada toda semana. As hemimandíbulas descalcificadas foram aparadas com uma lâmina de aço (Gillette®) para delimitar a região dos molares. As amostras foram extensivamente lavadas em água corrente e processadas para inclusão em parafina. A inclusão das amostras foi realizada com a face bucal das hemimandíbulas voltada para a face de corte. Os blocos foram desgastados em micrótomo rotatório (RM2125, Leica Biosystems) até o início da região de furca do primeiro molar, e então, cortes sagitais seriados com 5µm de espessura, contendo as raízes mesial e distal, foram obtidos e montados em lâminas silanizadas.

3.4 Análise da espessura do cemento e do ligamento periodontal na região de furca

Para esta análise 3 cortes semi-seriados de cada amostra foram corados com hematoxilina e eosina e as alterações morfológicas no ligamento periodontal e seus tecidos adjacentes foram observadas. Imagens histológicas da região de furca foram capturadas em aumento de 200x em microscópio de luz (Axioscope A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado à câmera digital (Toup View) com a utilização do programa Toup View for Digital Camera 3.7. A espessura do ligamento periodontal e a espessura do cemento acelular foram analisados a partir do software ImagePro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). O programa foi previamente calibrado para obtenção de medidas em

micrômetros utilizando barra de escala correspondente ao aumento de 200x. As medidas de espessura foram obtidas a partir da média de cinco linhas traçadas ao longo do cimento e do ligamento periodontal (Fig. 4).

Figura 4- Procedimento experimental de hipofunção



Fonte: do autor (2025)

3.5 Quantificação de osteoclastos e densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradicular

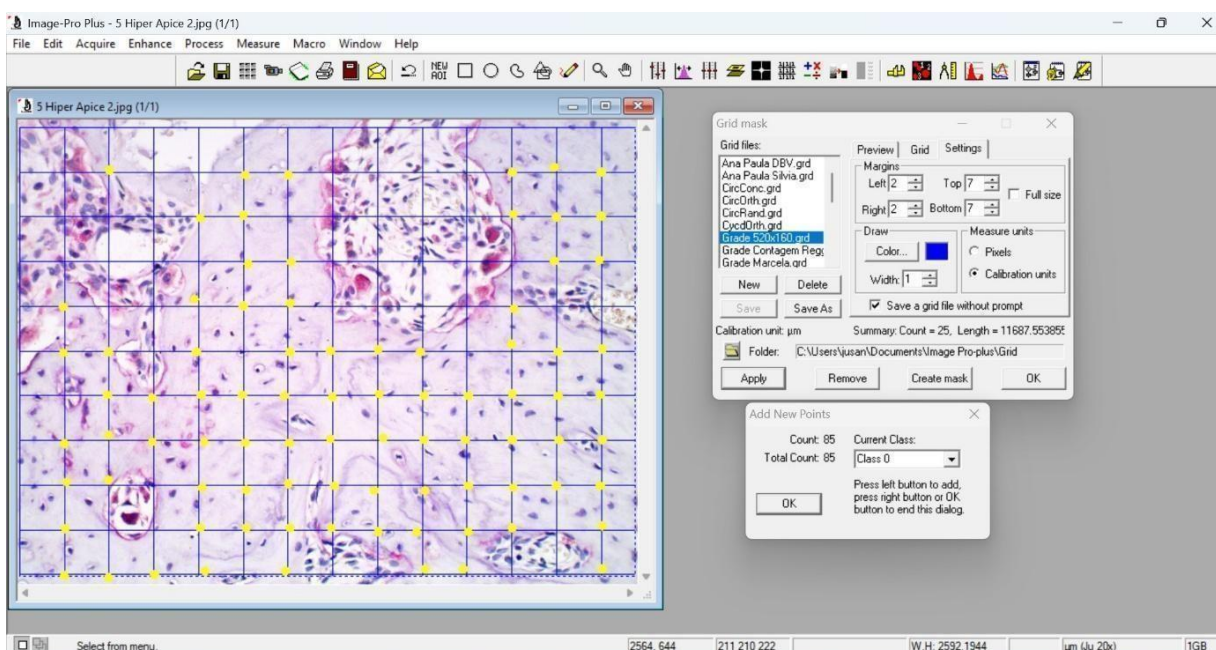
Para a quantificação de osteoclastos no septo interradicular 3 cortes semi-seriados de cada amostra foram corados com o método histoquímico de evidenciação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). Para esta reação os cortes foram incubados por 1 hora à 37°C com uma solução de tampão acetato 0.2M (25mL) contendo 35mg de Fast Red Violeta (Sigma Aldrich), 2 gotas de cloreto de magnésio 10%, 188 mg de ácido L-tartárico (Sigma Aldrich) e 4mg de Naftol AS-BI fosfato (Sigma Aldrich) dissolvido em 0,25 mL de N,N dimetil formamida. O pH da solução foi ajustado para 5. Após a lavagem das lâminas em água corrente os cortes foram contra corados com hematoxilina de Harris por 1 min.

Imagens histológicas foram capturadas em microscópio de luz (Axioscope

A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado à câmera digital (Toup View) com a utilização do programa Toup View for Digital Camera 3.7. Oito campos distribuídos ao longo do septo interradicular foram capturados em aumento de 200x e os osteoclastos TRAP-positivos contados em uma área de 0.22 mm² utilizando o software ImagePro-Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA). Os resultados foram expressos como número de células TRAP positivas/0.22 mm².

A densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradicular foi obtida utilizando os mesmos campos descritos acima. Nestes campos, um retículo de 130 pontos quadriculados foi posicionado e os pontos coincidentes com a matriz óssea foram selecionados (Fig. 5). A determinação da densidade volumétrica de osso alveolar na furca foi baseada no princípio da estereologia aplicado à histologia por Weibel (1969), no qual a densidade de volume de uma estrutura pode ser calculada através da fórmula $V_v = P_i/P$, onde P_i é a soma do número de pontos coincidentes sobre a estrutura de interesse e P é o número total de pontos do retículo. O valor resultante foi multiplicado por cem para obter a densidade volumétrica em porcentagem.

Figura 5-Análise da densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradiculare no software Image Pro Plus.

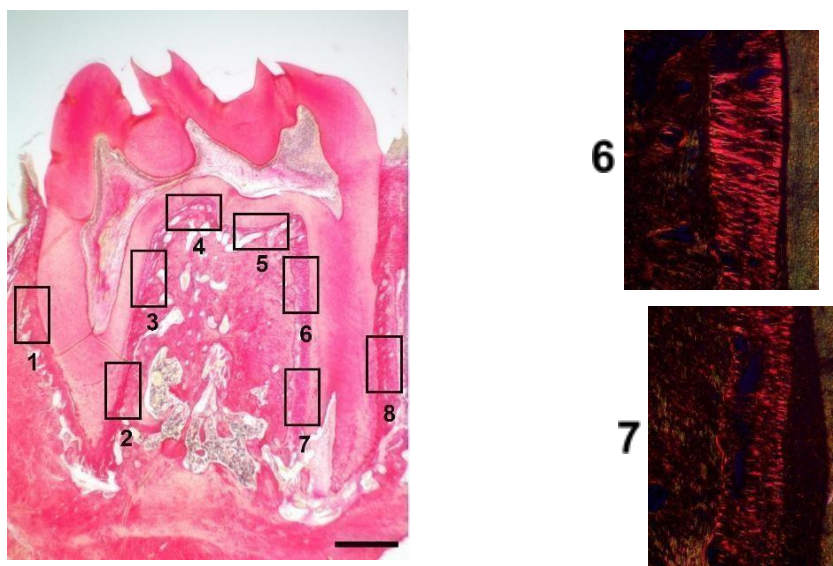


Fonte: do autor (2025).

3.6 Análise de colágeno no ligamento periodontal

Para a análise do colágeno no ligamento periodontal 3 cortes semi-seriados de cada amostra foram corados com Sirius Red/Hematoxilina e observados sob microscopia de polarização. Imagens histológicas foram capturadas em aumento de 200x na posição de maior brilho de birrefringência das fibras colágenas. Para abranger as diversas regiões do ligamento periodontal do primeiro molar inferior (LP), oito imagens foram obtidas de campos padronizados como mostrado na figura 6: 1- LP raiz mesial lado crista alveolar, 2- LP raiz mesial apical lado furca, 3- LP raiz mesial cervical lado furca, 4- LP furca mesial, 5- LP furca distal, 6- LP raiz distal cervical lado furca, 7- LP raiz distal apical lado furca, 8- LP raiz distal lado crista alveolar.

Figura 6- Fotomicrografias de corte do primeiro molar inferior esquerdo do grupo controle corado com sirius red/hematoxilina e obtidas em microscopia de campo claro e polarização.

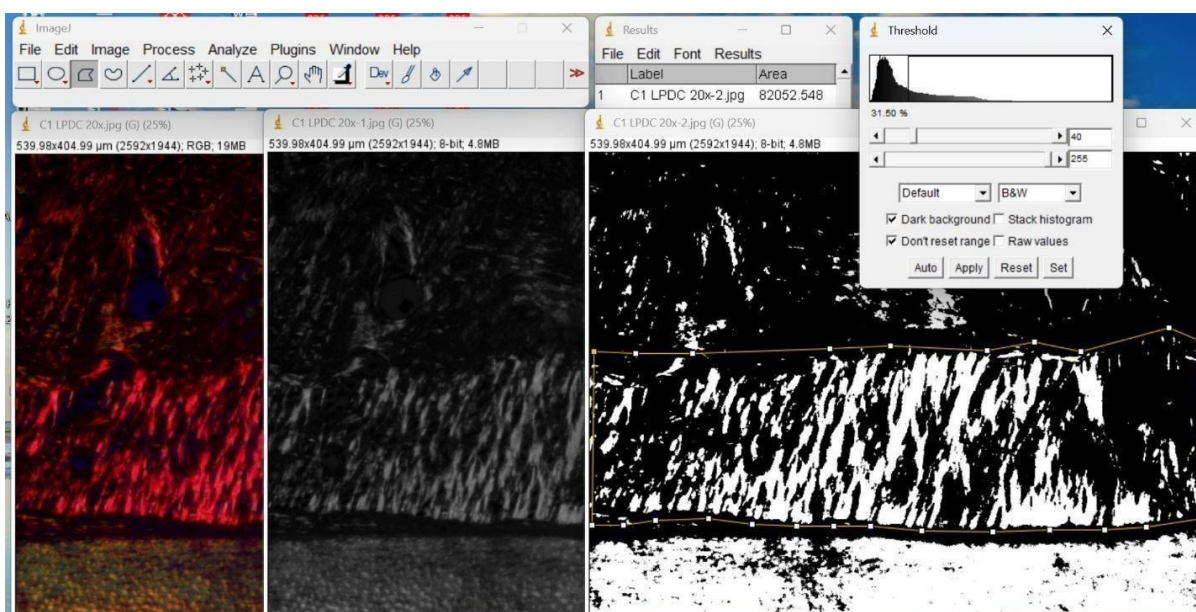


Fonte: do autor (2025).

Legenda: A fotomicrografia do lado esquerdo mostra os campos utilizados para a análise de colágeno no ligamento periodontal, sendo 1- LP raiz mesial lado crista alveolar, 2- LP raiz mesial apical lado furca, 3- LP raiz mesial cervical lado furca, 4- LP furca mesial, 5- LP furca distal, 6- LP raiz distal cervical lado furca, 7- LP raiz distal apical lado furca, 8- LP raiz distal lado crista alveolar. As fotomicrografias do lado direito mostram os campos 6 e 7 visualizados sob luz polarizada. Barra: 500 μ m.

Posteriormente, as fotomicrografias foram analisadas pelo software ImageJ (National Institutes of Health, USA). As imagens foram convertidas em escala de cinza (8-bit). As intensidades do brilho de birrefringência foram equalizadas usando a ferramenta threshold do programa ImageJ. O threshold é usado para limitar um objeto de interesse em uma imagem, eliminando os efeitos de background, no qual todos os pixels na imagem que estão abaixo de um limite pré-determinado pelo avaliador são convertidos em preto e todos os pixels com valores acima deste limite são convertidos em branco. A área do ligamento periodontal avaliada foi determinada por meio da ferramenta de contorno pela ligação de pontos (polígono). A porcentagem dessa área delimitada na imagem ocupada pela cor branca (fibras colágenas) foi obtida pelo histograma (Fig. 7). Para saber a quantidade de colágeno na área histológica foi utilizada a fórmula: área de colágeno (μm^2) = [% colágeno da área delimitada x dimensão da área utilizada] / 100 (Novaes et al., 2015). O valor obtido de cada amostra corresponde a média da área de colágeno obtida dos oito campos.

Figura 7-Processo de quantificação da área de colágeno no ligamento periodontal por meio do software Image J.



Fonte:do autor (2025)

3.7 Análise da expressão de MMP-2 e Esclerostina nos tecidos periodontais.

Para a análise da expressão da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2) e esclerostina (SOST) nos tecidos periodontais do primeiro molar inferior, três cortes de cada amostra foram submetidos à reação de imuno-histoquímica. Os cortes foram desparafinizados, reidratados em uma série decrescente de soluções de etanol e lavados em água destilada. Para os cortes que posteriormente seriam incubados com anti-esclerostina, foi realizada a reativação antigênica em tampão Tris-EDTA, pH 9, à 80°C por 20 min (EnVision Flex target retrieval solution, high pH). Os cortes foram lavados em tampão Tris com Tween 20, pH 7,6 (EnVision Flex Wash buffer) e a peroxidase endógena dos tecidos foi bloqueada com H₂O₂ 0.3% por 15 min. Na sequência, os cortes foram incubados com anti-BMP2 (Invitrogen cat#PA578874) ou anti-MMP2 (Invitrogen cat#436000) ou anti-esclerostina (EMD Millipore cat# MABS445) diluídos em tampão Tris – 1:100 – 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com as soluções do kit de amplificação EnVision Flex (Agilent Technologies, California, EUA) como recomendado pelo fabricante e revelados com uma solução do cromógeno diaminobenzidina. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris. A omissão do anticorpo primário foi usada como controle negativo das reações. Os cortes foram analisados (análise qualitativa) em microscópio de luz (Axio Lab, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital (AxioCam MRc 1.4 Mb, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) nos aumentos de 25, 200 e 400x.

A intensidade de marcação para MMP2 no ligamento periodontal foi analisada utilizando a ferramenta color deconvolution do software Image J (National Institutes of Health, USA). Esta ferramenta separa em imagens diferentes as cores azul (hematoxilina) e marrom (diaminobenzidina). Em seguida, a intensidade de marrom no LP foi determinada delimitando a área de interesse (AOI) e utilizando o histograma, o qual mede a densidade óptica em pixels numa escala de 0 (marrom escuro) a 255 (marrom claro). Para melhor interpretação dos resultados, os valores de densitometria obtidos em escala de marrom (0–255), na qual menores valores indicam maior marcação, foram invertidos matematicamente (255 – valor original) para facilitar a interpretação gráfica, de modo que valores mais altos representassem maior expressão de MMP2.

A análise da expressão de esclerostina foi feita no osso alveolar do septo

interradicular do primeiro molar inferior. Imagens do septo foram capturadas em aumento de 400x e os osteócitos positivos e negativos para esclerostina foram contados em uma área padronizada de 0.05 mm².

3.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão e as diferenças entre as variáveis espessura do LP, densidade volumétrica de osso alveolar, espessura do cimento, área de colágeno no LP, densidade óptica da marcação para MMP2 e número de osteoclastos determinadas intra-grupos (Hipo ou Hiperfuncional) nos diferentes tempos estudados (4 e 8 dias) e comparados ao controle. A normalidade na distribuição dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk* e o teste ANOVA *one way* aplicado. Em seguida, o teste de Tukey foi utilizado para as comparações. A significância das diferenças nas frequências observadas de osteócitos positivos e negativos para esclerostina no septo interradicular foi avaliada pelo teste do qui-quadrado. Resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos clínicos

Por meio do registro do peso dos animais no início e ao final do experimento verificou-se que houve ganho de peso em todos os grupos experimentais, um indicativo de que prováveis desconfortos gerados pelas modificações oclusais causadas não impediram os animais de se alimentarem (Tabela 1).

Tabela 1 – Peso dos ratos em gramas no início e no final do período experimental. *Teste t pareado, n= 5 animais por grupo.

Controle	Hiper 4 dias		Hiper 8 dias		Hipo 4 dias		Hipo 8 dias	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Peso (g) ±DP								
243 ±10	239 ±20	245 ±20	247 ±16	268 ±15	217 ±9	222 ±7	230 ±4	243 ±5
	*p<0.0001		*p<0.0001		*p<0.0001		*p<0.0001	

Fonte: do autor (2025)

Em uma avaliação macroscópica do primeiro molar inferior esquerdo não foram observados sinais de inflamação gengival, quebra ou extrusão dentária em nenhum dos grupos experimentais (Fig. 8).

Figura 8-Hemimandíbulas esquerdas de ratos após fixação dos grupos Controle, Hiperfunção oclusal por 4 dias (Hiper 4d) e Hipofunção oclusal por 4 dias (Hipo 4d), posicionadas sobre régua milimetrada

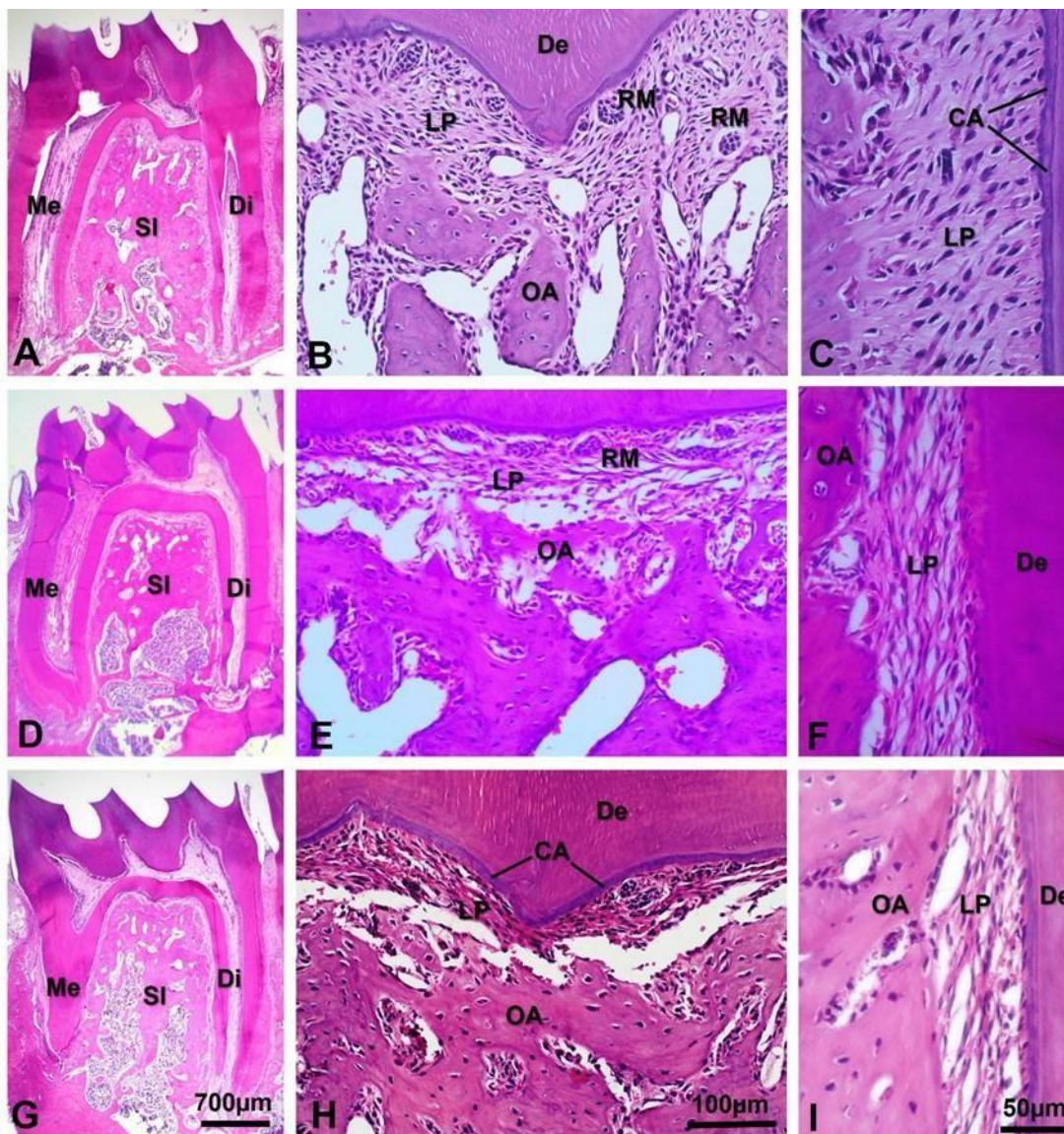


Fonte: do autor (2025)

4.2 Aspectos microscópicos dos tecidos periodontais sob modificações na carga Oclusal

Ao analisar os cortes histológicos do primeiro molar inferior esquerdo corados em HE na região de furca observou-se na base do septo interradicular dos dentes hipofuncionais um aumento dos espaços medulares no tecido ósseo. O ligamento periodontal (LP) não apresentou sinais de inflamação em nenhum dos períodos experimentais. No entanto, observou-se estreitamento do LP nos dentes hipofuncionais tanto na região de furca quanto ao longo das raízes mesial e distal margeando o septo interradicular. Foi possível observar mudanças na direção das fibras colágenas do LP no grupo hipofuncional, as quais apresentaram direção mais paralela em relação à superfície dentária. Tais observações mostraram-se progressivas entre o período de 4 e 8 dias de hipofunção dentária. Restos epiteliais de Malassez foram frequentemente observados no LP da região de furca em todos os grupos experimentais. Não foram observadas alterações morfológicas no cemento acelular e celular entre os grupos controle e hipofuncional (Fig. 9)

Figura 9-Fotomicrografias de cortes do primeiro molar inferior esquerdo corados em HE nos grupos controle, Hipo 4d e Hipo 8d.

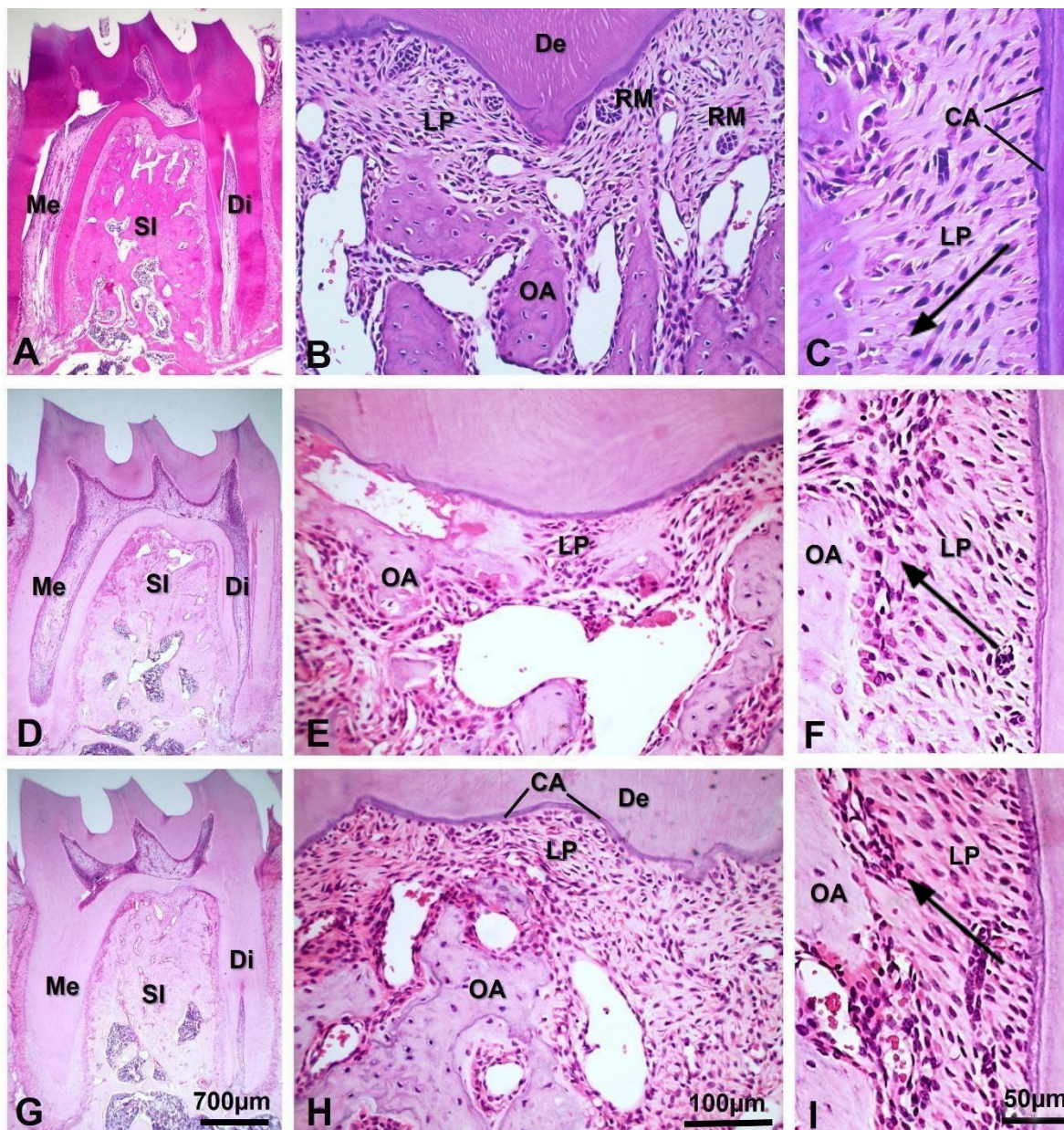


Fonte:do autor (2025)

Legenda: A- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo controle; B- Grupo controle, detalhe da região de furca do dente mostrado em A; C- Grupo controle, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em A. D- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo Hipo 4d; E- Grupo Hipo 4d, detalhe da região de furca do dente mostrado em D; F- Grupo Hipo 4d, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em D; G- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo Hipo 8d.; H- Grupo Hipo 8d, detalhe da região de furca do dente mostrado em G; I- Grupo Hipo 8d, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em G. CA: Cimento Acelular; De: Dentina; Di: Raiz distal; LP: Ligamento Periodontal; Me: Raiz mesial; OA: Osso Alveolar; RM: Restos epiteliais de Malassez; SI: Septo Interradicular

No grupo hiperfuncional, observou-se nos cortes histológicos corados em HE um estreitamento do LP na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo apenas no período de 4 dias de hiperfunção. Nesta região, o LP apresentou-se desorganizado e com áreas de hialinização das fibras colágenas. Muitos osteoclastos estavam presentes reabsorvendo tanto o osso alveolar do ápice do septo interradicular quanto o tecido periodontal degenerado, sem presença de infiltrado inflamatório. No período de 8 dias de hiperfunção, houve recuperação da espessura do LP na região de furca e este apresentou aspecto fibroso e celularizado. Ao longo das raízes mesial e distal o LP manteve morfologia e espessura preservadas em ambos os períodos experimentais, no entanto observou-se inversão da direção das fibras colágenas, a qual parece ter acompanhado a direção da carga incidente sobre o primeiro molar. O ápice do septo interradicular apresentou vários osteoblastos ativos e presença de tecido ósseo recém-formado, enquanto na sua base não se observou aumento dos espaços medulares, como observado no Hipo 8d. Não foram notadas alterações morfológicas evidentes no cimento (acelular/celular) na avaliação qualitativa.(Fig.:10)

Figura 10-Fotomicrografias de cortes do primeiro molar inferior esquerdo corados em HE nos grupos controle, Hiper 4d e Hiper 8d.



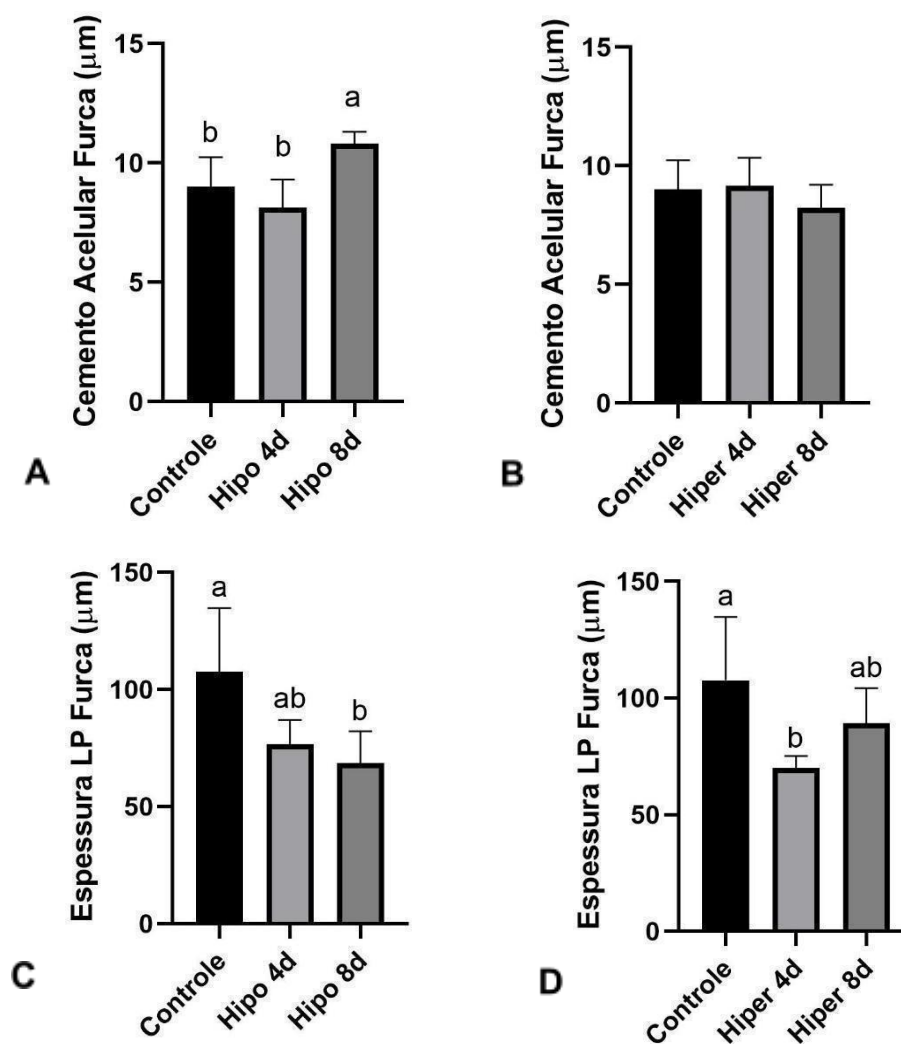
Fonte:do autor (2025)

Legenda: A- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo controle; B- Grupo controle, detalhe da região de furca do dente mostrado em A; C- Grup Grupo controle, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em A. D- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo Hiper 4d; E- Grupo Hiper 4d, detalhe da região de furca do dente mostrado em D; F- Grupo Hiper 4d, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em D; G- Primeiro molar inferior esquerdo do grupo Hiper 8d.; H- Grupo Hiper 8d, detalhe da região de furca do dente mostrado em G; I- Grupo Hiper 8d, detalhe do LP da raiz distal do dente mostrado em G. CA: Cimento Acelular; De: Dentina; Di: Raiz distal; LP: Ligamento Periodontal; Me: Raiz mesial; OA: Osso Alveolar; RM: Restos epiteliais de Malassez; SI: Septo Interradicar. Setas em C, F e I apontam a direção das fibras colágenas no LP da raiz distal.

4.3 Análise da espessura do cimento e LP na região de furca sob modificações na carga oclusal

Ao avaliar quantitativamente o cimento e ligamento periodontal na região de furca do primeiro molar inferior esquerdo, os resultados mostraram um aumento estatisticamente significativo na espessura do cimento acelular no grupo Hipo 8d (Fig. 11A). Já a hiperfunção não promoveu aumento mensurável do cimento acelular na furca em ambos os períodos analisados (Fig.11B). A espessura do LP no grupo controle foi de 107,7 μm ($\pm 27,1$), enquanto nos grupos Hipo 4d e 8d foram, respectivamente, 76,7 μm ($\pm 10,4$) e 68,5 μm ($\pm 13,7$), sendo esta diminuição de espessura significativa no grupo Hipo 8d ($p < 0.05$) (Fig. 11C). Nos grupos Hiper 4d e 8d, foram respectivamente 69,9 μm ($\pm 5,3$) e 89,3 μm (± 15), sendo esta diminuição de espessura significativa no grupo Hiper 4d ($p < 0,05$) (Fig.11D).

Figura 11-Representação gráfica das análises histomorfométricas



Fonte: do autor (2025)

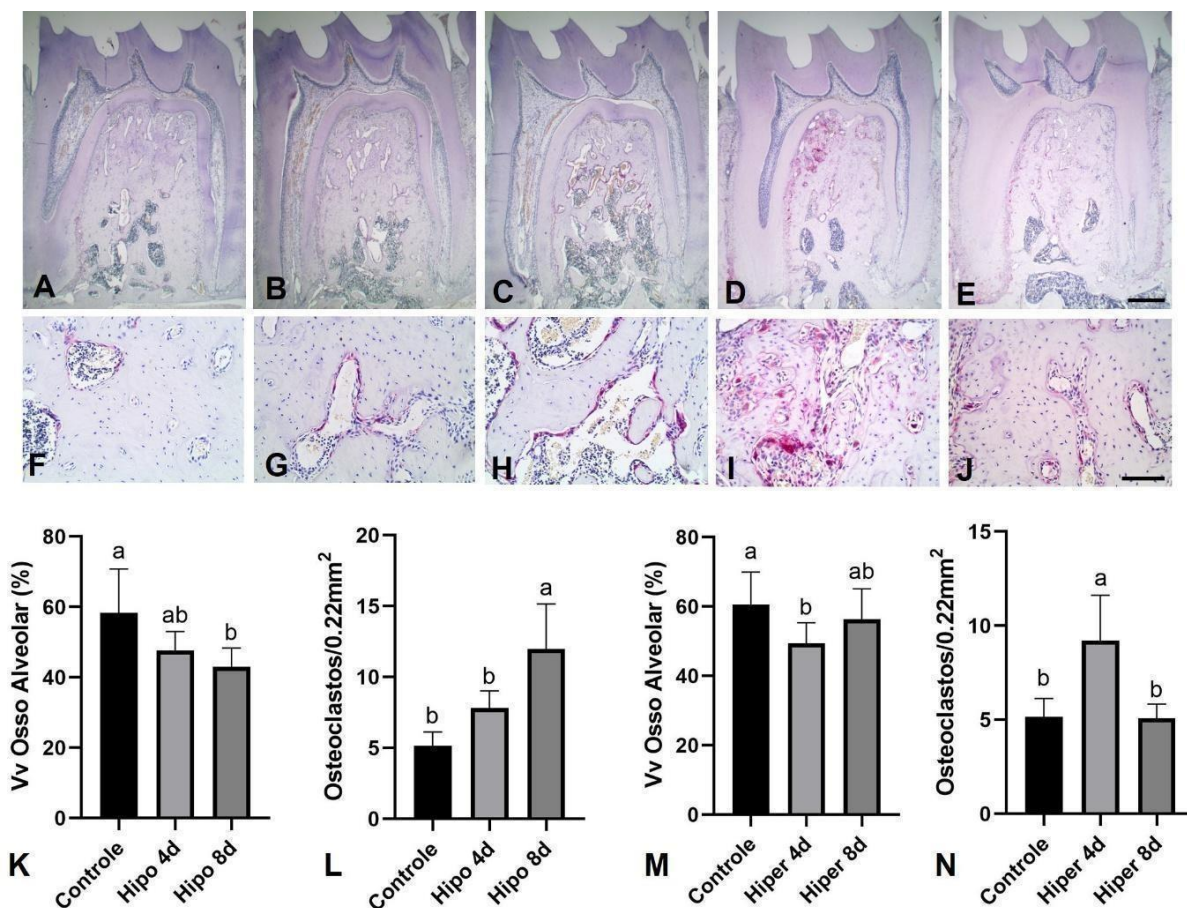
Legenda: região e furca de molares de ratos submetidos à condição de hipofunção e hiperfunção oclusal por 4 (Hipo 4d) e 8 dias (Hipo 8d), em comparação ao grupo controle. Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$).

4.4 Quantificação de osteoclastos e densidade volumétrica de osso alveolar no septo interradicular

Os osteoclastos foram identificados nas imagens histológicas como células multinucleadas TRAP-positivas (marcação avermelhada) em superfícies do osso alveolar na região de furca/septo interradicular (Fig 12 F-J). No grupo Hipofuncional observou-se que os osteoclastos concentraram-se na superfície óssea das cavidades medulares, predominantemente presentes na base do septo interradicular, enquanto no grupo hiperfuncional, os osteoclastos foram observados principalmente na superfície do ápice do septo no período de 4 dias, demonstrando o efeito da sobrecarga oclusal nesta região (Fig 12 A-E). Na quantificação por área, a hipofunção mostrou aumento progressivo do número de osteoclastos, atingindo valores significativamente maiores no Hipo 8d em comparação ao controle e ao Hipo 4d ($p < 0,05$) (Fig. 12 L). Na hiperfunção, observou-se um aumento significativo de osteoclastos apenas no Hiper 4d ($p < 0,05$) seguido de retorno a valores comparáveis ao controle no Hiper 8d (Fig.12 N).

Ao avaliar o volume relativo de osso alveolar no septo interradicular, o grupo Hipo 8d exibiu a menor porcentagem óssea, com redução significativa desta no período de 8 dias em relação ao controle ($p < 0,05$) (Fig.12K). Na hiperfunção (Fig.12M), observou-se diminuição significativa da porcentagem óssea no Hiper 4d comparada ao controle, sugerindo resposta inicial de rarefação/perda óssea frente ao aumento abrupto de carga, enquanto o Hiper 8d apresentou valores intermediários, compatíveis com tendência de recuperação parcial/adaptação do tecido ao longo do tempo (Fig. 12M; $p < 0,05$).

Figura 12-Fotomicrografias de cortes submetidas à reação histoquímica para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) utilizada para identificação de osteoclastos, com contracoloração para evidenciar a morfologia tecidual



Fonte:do autor (2025)

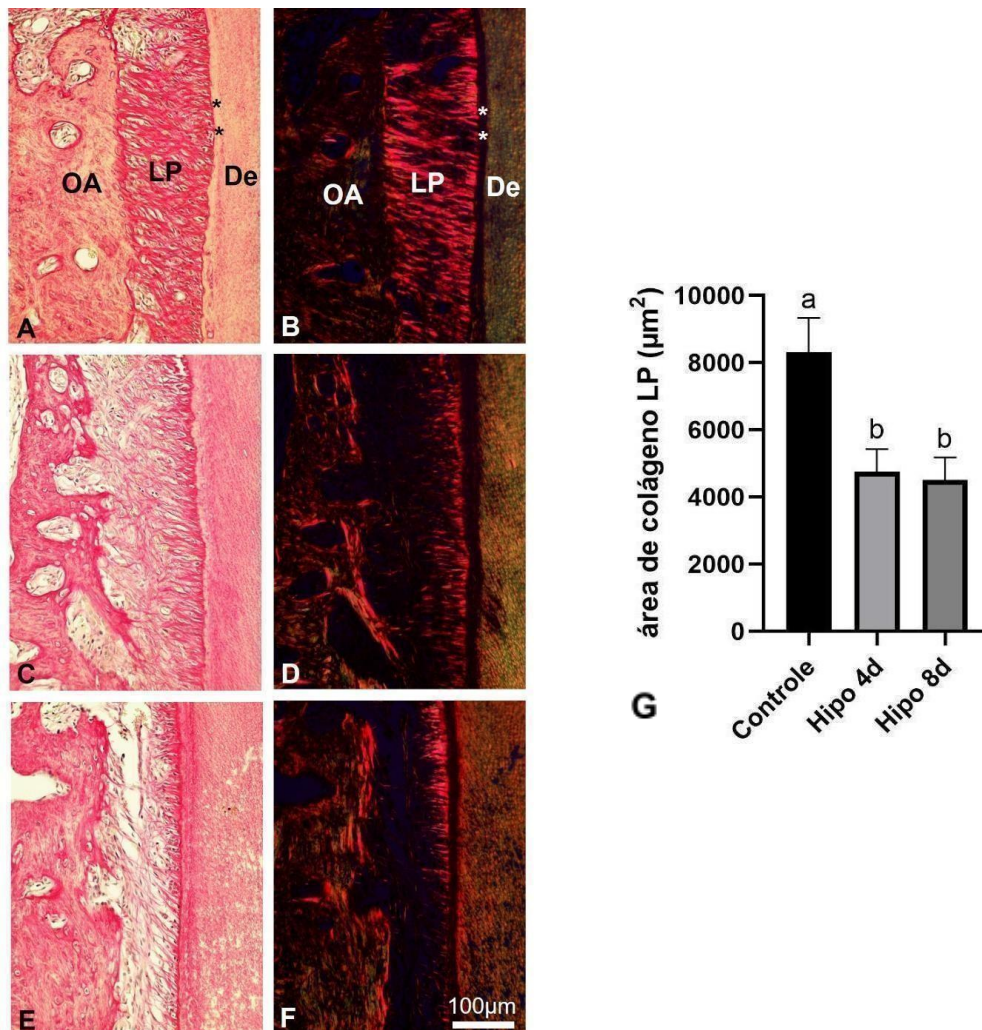
Legenda:Controle (A, F), Hipo 4d (B, G), Hipo 8d (C, H), Hiper 4d (D, I) e Hiper 8d (E, J).

Gráficos representados por (K) Volume relativo de osso alveolar (Vv, %) na hipofunção; (L) densidade de osteoclastos (n/mm²) na hipofunção; (M) Vv de osso alveolar (%) na hiperfunção; (N) densidade de osteoclastos (n/mm²) na hiperfunção. Barras - E: 500 μ m, J 100 μ m. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos no mesmo gráfico ($p < 0,05$).

4.5 Análise de colágeno no ligamento periodontal sob modificações na carga oclusal

No ligamento periodontal observou-se feixes de fibras colágenas evidenciadas em vermelho (microscopia de campo claro) ou em tons brilhantes de laranja e vermelho (microscopia de polarização). A birrefringência laranja e vermelha evidencia o colágeno do tipo I, característico das fibras principais do LP. Em uma análise qualitativa, observou-se que o LP dos dentes controles apresentou maior brilho do que o LP dos dentes hipofuncionais em ambos os períodos experimentais (Fig. 13). A quantificação da área média de colágeno em todos os campos do LP analisados mostrou que houve redução significativa na área de colágeno nos grupos Hipo 4d e Hipo 8d ($p < 0.0001$) (Fig. 13 G). Em contrapartida, nos grupos submetidos à hiperfunção (Fig.14), a área média de colágeno manteve-se semelhante à observada no grupo controle, sem diferenças significativas entre Controle, Hiper 4d e Hiper 8d (Fig. 14G).

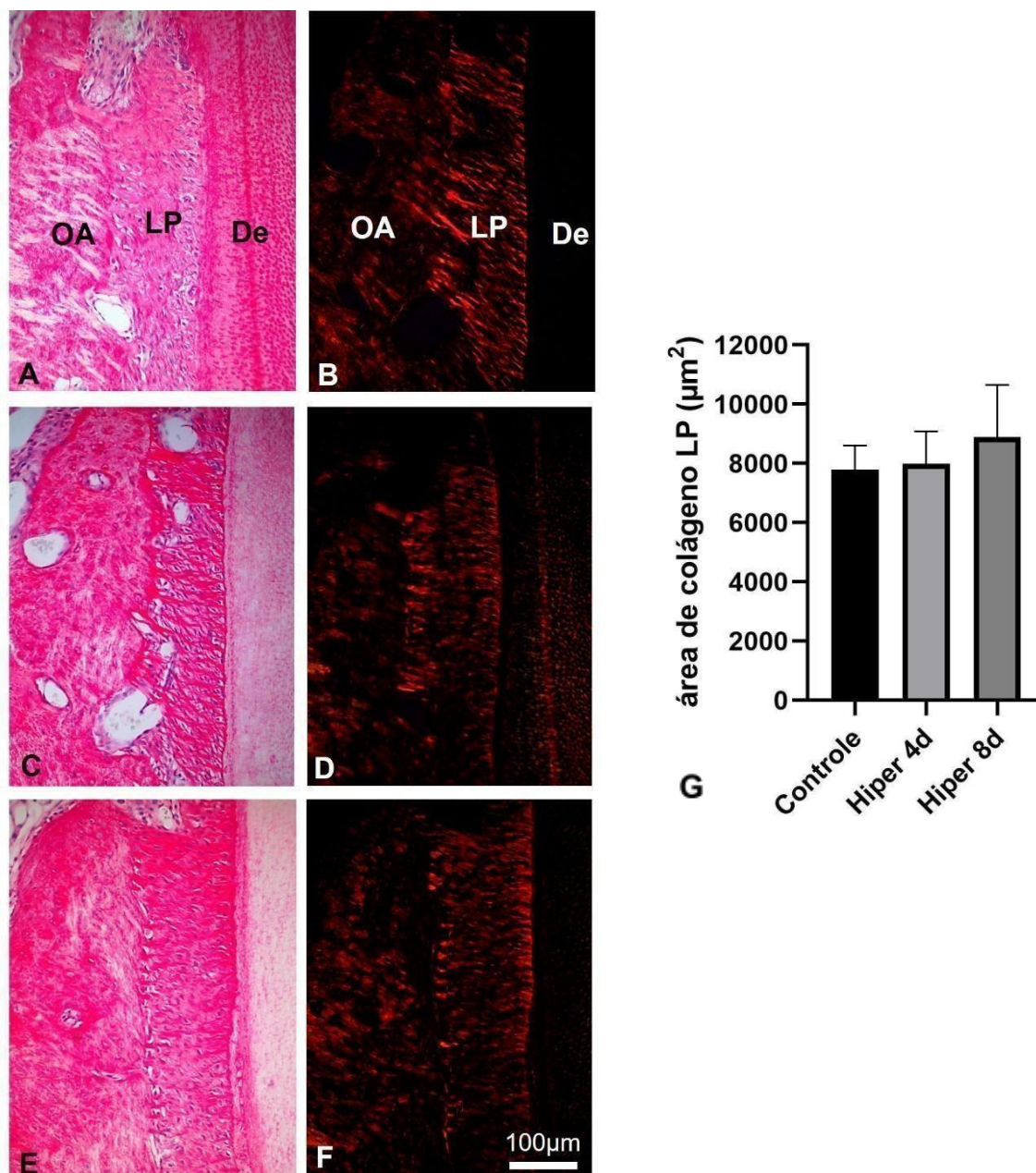
Figura 13-Fotomicrografias do campo 6 (LP da raiz distal cervical lado furca) do primeiro molar inferior esquerdo



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Controle (A e B), Hipo 4d (C e D) e Hipo 8d (E e F) corado com sirius red/hematoxilina e obtidas em microscopia de campo claro e polarizaç polarização. De: dentina; LP: ligamento periodontal; AO: osso alveolar; **: faixa de cimento acelular.G- Gráfico da Área de colágeno no ligamento periodontal (LP) de molares de ratos submetidos à hipofunção oclusal por 4 dias (Hipo 4d) e 8 dias (Hipo 8d), comparados ao grupo controle. Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.0001$).(G)

Figura 14-Fotomicrografias do campo 6 (LP da raiz distal cervical lado furca) do primeiro molar inferior esquerdo em hiperfunção



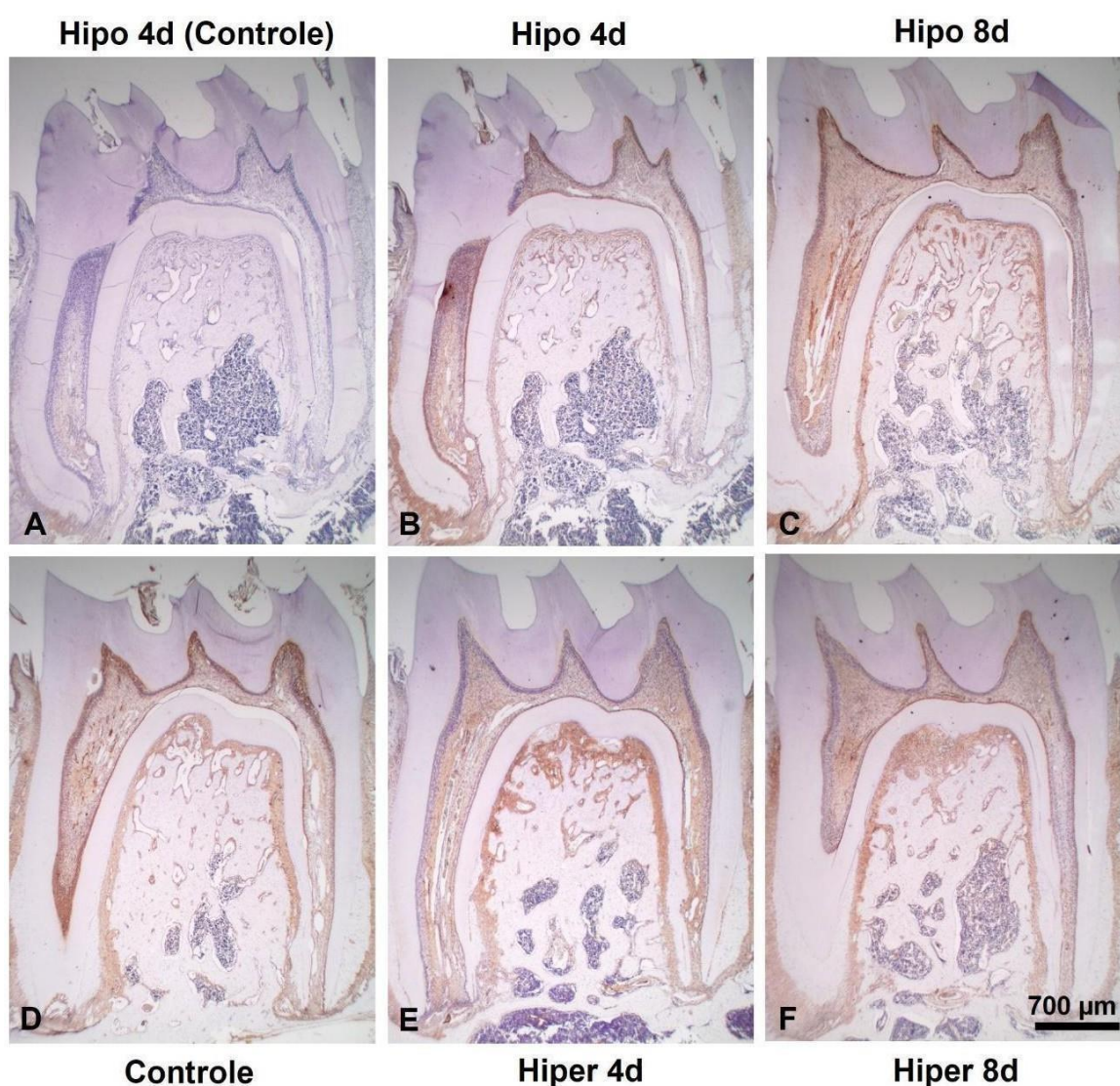
Fonte:do autor (2025).

Legenda: grupos Controle (A e B), Hiper 4d (C e D) e Hiper 8d (E e F) corado com sirius red/hematoxilina e obtidas em microscopia de campo claro e polariz polarização. De: dentina; LP: ligamento periodontal; AO: osso alveolar; **: faixa de cimento acelular. .Gráfico da Área de colágeno no ligamento periodontal (LP) de molares de ratos submetidos à hiperfunção oclusal por 4 dias (Hiper 4d) e 8 dias (Hiper 8d), comparados ao grupo controle. Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p < 0.0001$). (G)

4.6 Análise da expressão de MMP-2 no ligamento periodontal

Nos cortes histológicos do primeiro molar inferior esquerdo em todas as condições experimentais observou-se marcação para MMP2 de padrão difuso no LP e na polpa dentária. Os cortes que não foram incubados com o anticorpo anti-mmp2 (controle negativo) não apresentaram imunomarcação (Fig. 15).

Figura 15-Fotomicrografias representativas de cortes evidenciando a imunorreatividade para MMP-2 (DAB, marrom) nos tecidos periodontais, com contracoloração por hematoxilina



Fonte: do autor (2025).

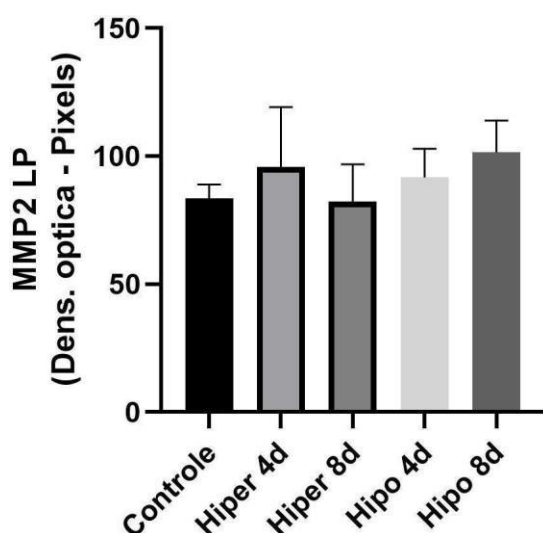
Legenda: Grupos: (A) Hipo 4d (Controle), (B) Hipo 4d, (C) Hipo 8d, (D) Controle, (E) Hiper 4d e (F) Hiper 8d. Barra de escala = 700 µm.

A densidade óptica da imunomarcação para MMP-2 no ligamento

periodontal manteve-se em faixa semelhante entre os grupos avaliados (controle, hipofunção e hiperfunção), sem evidência de alteração consistente ao longo do período

experimental (Fig16). Observou-se apenas variação discreta entre os tempos e condições, com tendência a valores um pouco mais elevados em hiperfunção 4 dias e em hipofunção 8 dias, porém sem um padrão robusto que indique modulação clara de MMP-2 no LP sob modificação na carga oclusal de curto prazo (Fig.16)

Figura 16-Quantificação da imunomarcagem para MMP-2 no ligamento periodontal (LP) na região de furca/septo inter-radicular do primeiro molar inferior de ratos.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: A densidade óptica da marcação (pixels) foi comparada entre os grupos Controle, Hiperfunção 4 dias (H Hipo 4d) e Hipofunção 8 dias (Hipo 8d). Os dados são apresentados como média \pm desvio-padrão (barras de erro)

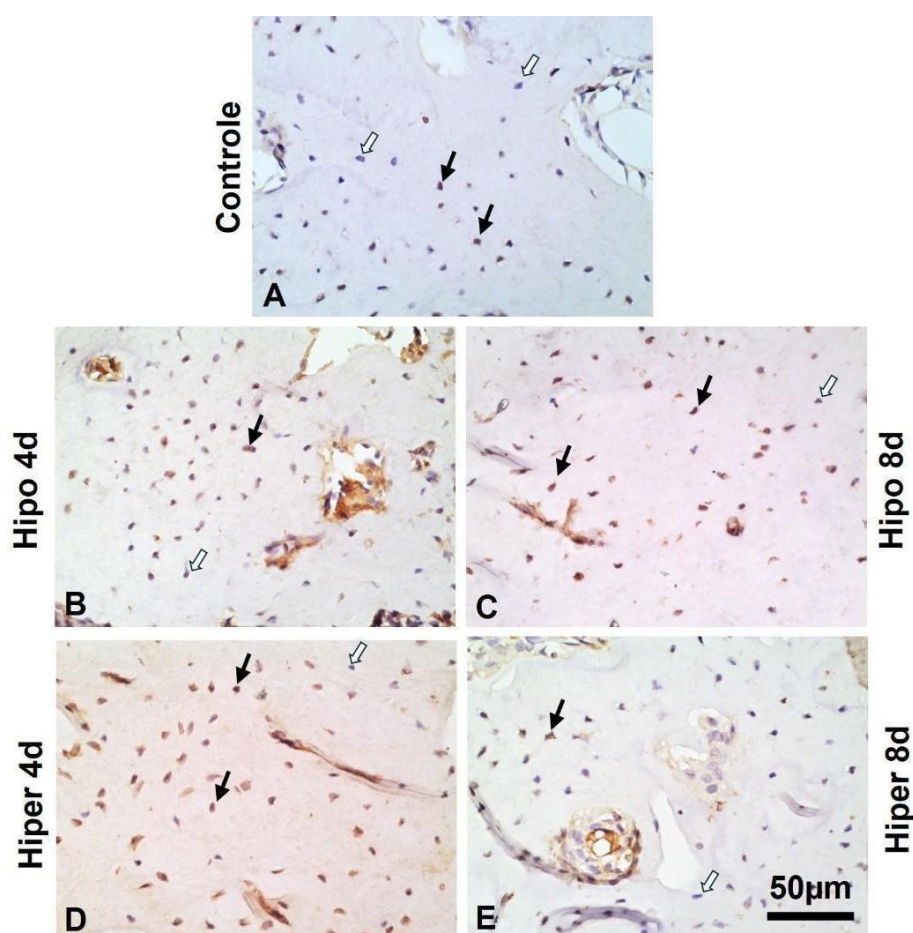
4.7 Análise da expressão de Esclerostina em osteócitos do septo interradicular

Nos cortes histológicos do primeiro molar inferior esquerdo em todas as condições experimentais observou-se marcação para esclerostina em alguns osteócitos. Interessantemente, células semelhantes à mastócitos no ligamento periodontal e na medula óssea também apresentaram marcação para esclerostina em seus grânulos citoplasmáticos. A figura 17 apresenta o padrão de marcação de esclerostina em osteócitos no osso alveolar do septo

interradicular nos diversos grupos experimentais.

A comparação das frequências de osteócitos positivos e negativos para esclerostina realizada intragrupos pelo teste do qui-quadrado mostrou um aumento estatisticamente significativo de osteócitos positivos para esclerostina no grupo Hipo 8d comparado ao grupo controle ($p < 0.05$). Na hiperfunção, verificou-se aumento significativo de osteócitos positivos para esclerostina no grupo Hiper 4d comparado ao controle, seguido por tendência de retorno a valores semelhantes ao controle no grupo Hiper 8d (Fig.18).

Figura 17-Imunomarcção para esclerostina em osteócitos do osso alveolar na região de furca/septo inter-radicular do primeiro molar inferior.

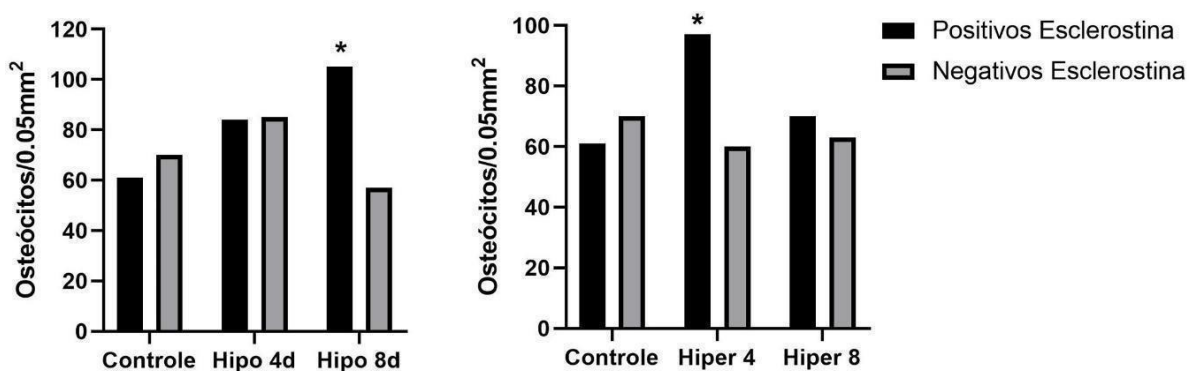


Fonte: do autor (2025)

Legenda: (A) Controle; (B) Hipofunção 4 dias; (C) Hipofunção 8 dias;

(D) Hiperfunção 4 dias; (E) Hiperfunção 8 dias. A imunorreatividade é visualizada em marrom (DAB) e os núcleos em azul (hematoxilina). Setas pretas indicam osteócitos positivos para esclerostina; setas brancas indicam osteócitos com ausência de marcação. Barra = 50 µm.

Figura 18-Frequências de osteócitos positivos e negativos para esclerostina ($n^{\circ}/0,05$ mm^2) no septo interradicular.



Fonte: do autor (2025).

Legenda: Barras pretas: osteócitos imunopositivos para esclerostina. Barras cinza: osteócitos imunonegativos. Painel esquerdo: Controle, Hipofunção 4 dias (Hipo 4d) e Hipofunção 8 dias (Hipo 8d). Painel direito: Controle, Hiperfunção 4 dias (Hiper 4d) e Hiperfunção 8 dias (Hiper 8d). *Diferença estatisticamente significativa em relação ao respectivo controle

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou, em curto prazo (4 e 8 dias), como alterações experimentais na carga oclusal modulam a homeostase do periodonto na região de furca/septo inter-radicular do primeiro molar inferior esquerdo de ratos. De forma integrada, os achados indicam que a variação do estímulo mecânico é capaz de desencadear respostas rápidas no ligamento periodontal e no osso alveolar, com padrões distintos entre hipofunção e hiperfunção. Do ponto de vista biológico, tais respostas são coerentes com o conceito de que forças fisiológicas sustentam o equilíbrio tecidual, enquanto sua ausência leva a atrofia/disuso e seu excesso pode induzir uma fase inicial mais reabsortiva, seguida de adaptação conforme o tecido se remodela (Wang et al., 2024; Xu et al., 2016; Walker et al., 2008; Deporter et al., 1982).

O ganho ponderal observado em todos os grupos experimentais sugere preservação do estado geral e manutenção da alimentação ao longo do protocolo, o que é relevante para reduzir a influência de fatores sistêmicos sobre a remodelação óssea e a dinâmica do ligamento periodontal. Além disso, a avaliação macroscópica sem sinais evidentes de inflamação gengival, quebra ou extrusão dentária reforça que as alterações microscópicas e morfométricas observadas são mais bem interpretadas como respostas primariamente biomecânicas (i.e., relacionadas ao estímulo oclusal), e não como alterações guiadas por inflamação marginal. Esse ponto é especialmente importante porque a literatura periodontal indica que trauma oclusal/excesso de forças não é considerado iniciador de gengivite/periodontite por si só, embora possa modificar a resposta dos tecidos de suporte e, em cenários com inflamação, alterar o padrão de destruição (Yoshinaga et al, 2007; Fan & Caton, 2018).

Nos grupos hipofuncionais, a análise histológica em HE evidenciou alterações que, em conjunto, sugerem um fenótipo de “desuso” do periodonto: aumento de espaços medulares no tecido ósseo na base do septo inter-radicular, estreitamento do ligamento periodontal (LP) na furca e ao longo das raízes e mudança no direcionamento das fibras colágenas, com aspecto mais paralelo à superfície dentária. Esse conjunto de achados é consistente com descrições clássicas e estudos experimentais em roedores mostrando que a perda de estímulo oclusal induz alterações atróficas no LP e no osso alveolar, incluindo

estreitamento do espaço periodontal e desorganização/reorientação de fibras (Kaneko et al., 2001; Levy; Mailland, 1980; Deporter et al., 1982; Nan et al., 2023)

A morfometria reforçou essa interpretação: houve redução significativa da espessura do LP no Hipo 8d e redução importante da área média de colágeno nos grupos Hipo 4d e Hipo 8d. A técnica de picrosírius/polarização, ao evidenciar birrefringência em tons alaranjados e avermelhados compatíveis com predominância de colágeno tipo I, permite inferir que a menor “intensidade/brilho” e a redução de área colagênica refletem perda de feixes colágenos principais e/ou menor organização/maturação desses feixes no LP sob hipofunção (Katchburian; Arana, 2012; Lindhe et al., 2010). Do ponto de vista funcional, isso pode representar menor demanda mecânica e menor tensão transmitida pelas fibras de Sharpey, com impacto sobre a atividade fibroblástica e sobre o turnover da matriz extracelular. Em modelos experimentais, a hipofunção está associada a alterações estruturais do LP e a mudanças em componentes de matriz e sinalização que sustentam a integridade do tecido (Levy; Mailland, 1980; Tran Van; Mailland, 1981; Deporter et al., 1982; Kaneko et al., 2001; Nan et al., 2023; Omar et al., 2018; Maciejczyk et al., 2016; Radzki et al., 2024).

A quantificação de osteoclastos acrescenta um componente importante: na hipofunção, observou-se aumento progressivo do número de osteoclastos, com diferença significativa no Hipo 8d, acompanhado de redução significativa do volume relativo de osso alveolar (Vv) no mesmo período. Esses resultados sugerem que, além das alterações atróficas do LP, a hipofunção promove um microambiente favorável à reabsorção óssea na região de furca ao longo do tempo experimental, culminando em perda/rarefação óssea detectável em 8 dias. Em linha com essa interpretação, estudos em roedores apontam que a hipofunção pode induzir remodelação do osso alveolar com perda óssea e participação de vias osteocíticas, incluindo a sinalização por esclerostina e a modulação de Wnt/ β -catenina, com repercussões sobre equilíbrio formação–reabsorção (Xu et al., 2016)

Nos grupos submetidos à hiperfunção, os achados sugerem um padrão temporal bifásico. Em 4 dias, observou-se aumento significativo da densidade de osteoclastos e redução significativa da densidade volumétrica do osso alveolar, enquanto em 8 dias houve retorno a valores intermediários/semelhantes ao controle (tendência de recuperação parcial).

Esse comportamento é compatível com a ideia de que um aumento abrupto de carga pode desencadear uma fase inicial de resposta reabsortiva (recrutamento/diferenciação osteoclástica), seguida por adaptação do tecido ao novo regime mecânico. Modelos experimentais de hiperclusão/trauma oclusal mostram aumento de células TRAP-positivas e maior osteoclastogênese em janelas temporais curtas, acompanhado por maior expressão de mediadores associados à reabsorção, como RANKL e osteopontina (OPN), além de quimiocinas envolvidas em recrutamento celular (Walker et al., 2008)

Nesse contexto, o aumento significativo de osteoclastos no Hiper 4d observado aqui encontra respaldo em estudos que documentam elevação de osteoclastos TRAP-positivos em períodos iniciais (dias) após hiperclusão, acompanhada por maior expressão de mediadores pró-reabsortivos no ligamento periodontal e no osso alveolar. O retorno do padrão osteoclástico e do volume de osso alveolar em 8 dias pode representar acomodação mecânica com redistribuição de tensões e ajuste do equilíbrio remodelador após a fase inicial de reabsorção (Walker et al., 2008; Yoshinaga et al., 2007).

Um ponto a ser discutido é a espessura do LP nos grupos de hiperfunção: houve redução significativa no Hiper 4d (e tendência a normalização no Hiper 8d), em vez do padrão clássico frequentemente descrito de “alargamento do espaço periodontal” sob trauma oclusal. Uma explicação plausível é que a resposta do LP é heterogênea e depende de onde se mede: áreas sob compressão tendem a apresentar estreitamento e maior ativação osteoclástica adjacente, enquanto áreas sob tensão podem exibir espessamento relativo. Assim, a padronização da região de furca/septo inter-radicular pode capturar predominantemente um domínio de compressão no início da sobrecarga. Essa interpretação é coerente com conceitos bem estabelecidos de remodelação alveolar guiada por zonas de compressão/tensão e com observações de que o trauma oclusal altera principalmente os tecidos de suporte, sem necessariamente produzir um padrão uniforme ao longo de todo o periodonto (Hallmon, 1999; Fan; Caton, 2018; Okeson, 2008).

A espessura do cemento acelular aumentou significativamente no Hipo 8d. Embora não tenham sido observadas alterações morfológicas evidentes em HE entre controle e hipofunção, a morfometria pode detectar mudanças discretas de deposição/aposição que não são facilmente perceptíveis na análise

qualitativa. Biologicamente, o cimento é um tecido de adaptação e pode responder a mudanças no ambiente mecânico ao longo do tempo; o aumento de espessura pode representar uma resposta compensatória para manutenção do aparato de inserção em um cenário de LP mais estreito e com menor conteúdo colagênico funcional.

Além disso, há evidências de expressão de SOST/esclerostina em cementócitos, sugerindo que células relacionadas ao cimento possam participar de vias associadas à homeostase mineralizada e potencialmente responder a alterações do ambiente mecânico (Jäger et al., 2010; Robling et al., 2008; Lin et al., 2009; Weivoda; Youssef; Oursler, 2017)

A manutenção da densidade óptica da imunomarcação para MMP-2 no ligamento periodontal em faixa semelhante entre controle, hipofunção e hiperfunção sugere que, no intervalo curto avaliado (4–8 dias), a modulação da carga oclusal não foi suficiente para promover uma alteração consistente na presença proteica detectável por imunohistoquímica, o que é compatível com o papel da MMP-2 como enzima frequentemente envolvida no turnover basal da matriz extracelular do periodonto e com respostas mecanobiológicas que podem ser dependentes de intensidade, duração e microambiente tecidual (Dieterle et al., 2021; Radzki; Skiba; Paradowska-Stolarz, 2024). Além disso, alterações funcionais relevantes podem ocorrer predominantemente por mecanismos pós-traducionais (ativação/inibição por TIMPs e outras MMPs), sem necessariamente se traduzirem em mudanças robustas de densitometria em um período curto reforçando que “ausência de modulação clara” na imunohistoquímica não exclui participação da MMP-2 na adaptação do LP (Mccauley; Nohutcu, 2002; Khoswanto, 2023). Em modelos experimentais de hipofunção por perda de contato oclusal, por exemplo, já se descreveu impacto sobre a expressão/atividade de MMP-2 e sobre a organização de fibras colágenas no LP, porém com forte dependência do desenho experimental, do dente analisado e da janela temporal, o que pode explicar a presença apenas de tendências discretas (hiperfunção 4d e hipofunção 8d) no seu achado, sem um padrão reprodutível de curto prazo (Omar et al., 2018; Gomes et al., 2017).

A imunomarcação para esclerostina em osteócitos e cementócitos nos diferentes grupos é compatível com o papel dessa proteína como reguladora da remodelação óssea/cementária, presente em matrizes mineralizadas e capaz de

modular negativamente a via Wnt/ β -catenina, reduzindo a atividade formadora óssea (Van Bezooijen et al., 2009; Winkler et al., 2003; Glass; Karsenty, 2006; Ashifa et al., 2021). O aumento significativo de osteócitos positivos no grupo Hipo 8d em relação ao controle corrobora evidências de que a hipofunção/descarregamento mecânico tende a elevar a expressão de Sost/esclerostina, reforçando um perfil biológico associado à redução da formação óssea e associado à perda óssea alveolar em situações de desuso (Lin et al., 2009; Xu et al., 2016; Dieterle et al., 2021). Na hiperfunção, o aumento transitório em Hiper 4d seguido de tendência de retorno em 8d pode indicar uma resposta inicial do osteócito ao estresse mecânico com ajuste do nível de sensibilidade ao estímulo e reequilíbrio da sinalização ao longo do tempo, em linha com o entendimento de que as respostas à carga podem ser bifásicas e dependentes da intensidade/duração do estímulo (Duncan; Turner, 1995; Choi et al., 2022; Wang et al., 2024).

6 CONCLUSÃO

Modificações de curto prazo na carga oclusal (Hipofunção e hiperfunção) induzem alterações histológicas no periodonto de sustentação e a esclerostina se mostrou um marcador-chave da adaptação dos osteócitos do septo interradicular às variações de carga. Novos estudos, com outros tempos experimentais e marcadores, são necessários para esclarecer os mecanismos envolvidos e a participação de vias não detectadas neste modelo.

REFERÊNCIAS

- ALAWAMI, E.A.A.; ALOMARI, F.; ALOQAYBI, S.A.; et al. Efficacy of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Alveolar Cleft Treatment for Children: Systematic Review and Meta-Analysis. **Life**, v. 15, n. 2, p. 185, 2025.
- ASHIFA N, VISWANATHAN K, SUNDARAM R, SRINIVASAN S. Sclerostin and Its role as a bone modifying agent in periodontal disease. **J Oral Biosci**.v.2, 104-110, 2021.
- BALEMANS W, EBELING M, PATEL N, Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). **Hum Mol Genet**, v.5, p. 37-43, 2001.
- BERGLUNDH, T; GIANNOBILE, W V.; NIKLAUS P. LANG; **Lindhe Tratado de Periodontia Clinica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Grupo GEN, 1999.
- CHOI JUA, KIJAS AW, LAUKO J, ROWAN AE. The Mechanosensory Role of Osteocytes and Implications for Bone Health and Disease States. **Front Cell Dev Biol**, v.9, p.65-76, 2022.
- DEPORTER, A.; SVOBODA, E.L.A.; MOTRUK, W.; HOWLEY, T. P. A stereologic analysis of collagen phagocytosis by periodontal ligament fibroblasts during occlusal hypofunction in the rat. **Archs Oral Biol**, v. 27, p. 1021-1025, 1982.
- DIETERLE, M. P. et al. Role of mechanotransduction in periodontal homeostasis and disease. **Journal of Dental Research**, v. 100, n. 11, p. 1210-1219, 2021
- DUNCAN, R. L., & TURNER, C. H. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. **Calcified tissue international**, v.5, p.344-358, 1995.
- FAN, J.; CATON, J.G. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. **J Periodontol**, v. 89, Suppl 1, p. 214-222, 2018.
- FLORENCIO-SILVA, R. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed Research International**, v.13, p.72- 85, 2015.
- FURLANETO, F.A.C.; MELO, L.G; NAGATA, M.J.; BOSCO ,A.F.; DELIBERADOR,T.R.; MESSORA, M.; GARCIA, A.R.I. Oclusão e periodontia: uma análise crítica da literatura. **RSBO**, v. 6, n. 1, p. 85-93, 2009.
- GLASS 2ND, D.A; KARSENTY, G. Molecular bases of the regulation of bone remodeling by the canonical Wnt signaling pathway. **Curr Top Dev Biol**, v.5; 73-84, 2006.

GOMES, J.R.; OMAR, N.F.; NEVES, J.d.S.; NOVAES, P.D. Doxycycline reduces the expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in the periodontal ligament of the rat incisor without altering the eruption process. **J Periodont Res**, v. 52, p. 353-359, 2017.

HALLMON, W.W. Occlusal trauma: effect and impact on the periodontium. **Ann Periodontol**.v.4; p.102-108, 1999.

HAYASHI, H.; TERAOKA, A.; KUNIMATSU, R.; KAWATA, T. Effects of a Low Level Laser on Periodontal Tissue in Hypofunctional Teeth. **Plos One**, v.9, n. 6, e100066, 2014.

JÄGER, A.; GÖTZ, W.; LOSSDÖRFER, S.; RATH-DESCHNER, B. Localization of SOST/sclerostin in cementocytes in vivo and in mineralizing periodontal ligament cells in vitro. **Journal of Periodontal Research**, v. 45, n. 2, p. 246–254, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0765.2009.01227.x.

JASTRZEBSKI S, KALINOWSKI J, STOLINA M, MIRZA F, TORREGGIANI E, KALAJZIC I, WON HY, LEE SK, LORENZO J. Changes in bone sclerostin levels in mice after ovariectomy vary independently of changes in serum sclerostin levels. **J Bone Miner Res**. v.3; p.618-626, 2013.

KAKU, M.; UOSHIMA, K.; YAMASHITA, Y.; MIURA, H. Investigation of periodontal ligament reaction upon excessive occlusal load – osteopontin induction among periodontal ligament cells. **J Periodont Res**, v. 40, p. 59–66, 2005.

KANEKO, S.; OHASHI, K.; SOMA, K.; YANAGISHITA, M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. **J Periodont Res**, v. 36, p. 9-17, 2001.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Periodonto. In: KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. Cap. 9, p. 205-245.

KING GN, HUGHES FJ. Effects of occlusal loading on ankylosis, bone, and cementum formation during bone morphogenetic protein-2-stimulated periodontal regeneration in vivo. **J Periodontol**, v.70, p.1125-1135, 1999.

KLEIN-NULEND, J.; VAN DER PLAS, A.; SEMEINS, C.M.; AJUBI, N.E.; FRANGOS, J.A.; NIJWEIDE, P.J.; BURGER, E.H. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. **FASEB J**, v. 9, p. 441-445, 1995.

KHOSWANTO, C. Role of matrix metalloproteinases in bone regeneration: a narrative review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 13, n. 5, p. 539-543, 2023.

KOHLI, S.S.; KOHLI, V.S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. **Indian J**

Endocrinol Metab, v.15, p.175-181, 2011.

KUCHLER, U.; SCHWARZE, U.Y.; DOBSAK, T.; HEIMEL, P.; BOSSHARDT, D.D.; KNEISSEL, M.K.; GRUBER, R. Dental and periodontal phenotype in sclerostin knockout mice. **Int J Oral Sci**, v. 6, p. 70-76, 2014.

LASSILA, V.; KOIVUMAA, K.K. Deteriorating effect of occlusal disorders on the periodontium of rats with experimental arteriosclerosis. **Acta Odontol Scand**, v. 38, n. 1, p. 41-50, 1980.

LEE, J.-B.; HONG, J.-Y.; SHIM, H.; et al. Bone morphogenetic protein-2-derived osteogenic peptide promotes bone regeneration via osteoblastogenesis. **Regenerative Therapy**, v. 30, p. 911–919, 2025

LEVY, G.G.; MAILLAND, M.L. Histologic study of the effects of occlusal hypofunction following antagonist tooth extraction in the rat. **J Periodontol**, v. 51, n. 7, p. 393-399, 1980.

LI, X.; OMINSKY, M.S.; NIU, Q.T.; SUN, N.; DAUGHERTY, B.; D'AGOSTIN, D.; et al. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. **J Bone Miner Res**, v.23, p.860-869, 2008.

LIAO, C. et al. Sclerostin is a promising therapeutic target for oral inflammation and regenerative dentistry. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, 343, 2022

LIN, C.; JIANG, X.; DAI Z. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. **J Bone Miner Res**, v.24, p.1651-1661, 2009.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LIU, J.; JIN, Z.L.; LI, Q. Effect of occlusal hypofunction and its recovery on the three-dimensional architecture of mandibular alveolar bone in growing rats. **J Surg Res**, v.19, p. 229-236, 2015.

LIU, P.; TU, J.; WANG, W.; LI, Z.; LI, Y.; YU, X.; ZHANG, Z. Effects of Mechanical Stress Stimulation on Function and Expression Mechanism of Osteoblasts. **Front Bioeng Biotechnol**, v.10, 830722, 2022.

DANISZEWSKA, I. The significance of matrix metalloproteinases in oral diseases. **Adv Clin Exp Med**, v. 25, n. 2, p. 383-390, 2016.

MCCAULEY, L.K.; NOHUTCU, R.M. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol**, v. 73, p.1377-1391, 2002.

- MESLIER, Q. A. et al. 3D spatial distribution of Sost mRNA and sclerostin protein expression in response to in vivo tibia loading in female mice. **Bone**, 2025;193:117422. doi:10.1016/j.bone.2025.
- MIGLIORINI, M.; VALAT, A.; PICART, C.; CAVALCANTI-ADAM, E.A. Tuning cellular responses to BMP-2 with material surfaces. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 27, p. 43-54, 2016.
- NAM, Y. S. et al. Sclerostin in periodontal ligament: homeostatic regulator in biophysical force-induced tooth movement. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 49, p. 932-944, 2022.
- NAN, N.; EVERTS, V.; FERREIRA, D. et al. Alteration of extracellular matrix proteins in atrophic periodontal ligament of hypofunctional rat molars. **BDJ Open**, 2023.
- NEWMAN, M.G.; KLOKKEVOLD, P; CARRANZA, F. **Periodontia Clínica**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.1 p.20-49,2020.
- NISHIMORI, L.E. Occlusal adjustment by selective grinding in patients after orthodontic treatment. **Orthodontic. Uningá review journal, [S.l.]**, v. 17, n. 1, p. 2178-2571, 2018.
- NOMA, N.; KAKIGAWA, H.; KOZONO, Y.; YOKOTA, M. Cementum Crack Formation by Repeated Loading In Vitro. **J Periodontol**, v. 78, p. 764-769, 2007.
- NOVAES, R.D.; CUPERTINO, M.C.; SARANDY, M.M.; SOUZA, A.; SOARES, E.A.;GONÇALVES, R.V. Time-dependent resolution of collagen deposition during skin repair in rats: a correlative morphological and biochemical study. **Microsc Microanal**,v. 21, p. 1482-1490, 2015.
- OKESON, J.P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. 6. ed. São Paulo: Elsevier, Cap.2, p.86-94, 2008.
- OMAR, N.F.; GOMES, J.R.; NEVES, J.S.; NOVAES, P.D. Effects of loss of occlusal contact on the expression of matrix metalloproteinase-2, membrane type 1-MMP, tissue inhibitor of the MMP-2, eruption rate, organization and resistance of collagen fibers of the rat incisor periodontal ligament. **J Periodontal Res**, v. 53, p. 40-46, 2018.
- POOLE, K.E.; VAN BEZOOIJEN, R.L.; LOVERIDGE, N.; HAMERSMA, H.;PAPAPOULOS, S.E.; LÖWIK, C.W.; REEVE, J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. **FASEB J**, v. 19, n. 13, p.1842-1844, 2005.
- RADZKI, D.; SKIBA, N.; PARADOWSKA-STOLARZ, A. Matrix metalloproteinases in the periodontium: a review. **International Journal of**

Molecular Sciences, v. 25, 11640, 2024.

RIOS, H.F.; MA, D.; XIE, Y.; GIANNOBILE, W.V.; BONEWALD, L.F.; CONWAY, S.J.; FENG, J.Q. Periostin Is Essential for the Integrity and Function of the Periodontal Ligament During Occlusal Loading in Mice. **J Periodontol**, v. 79, n. 8, p. 1480–1490, 2008.

ROBLING, A.G.; NIZIOLEK, P.J.; BALDRIDGE, L.A.; ET, A.L. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. **J Biol Chem**, v.29, p. 283-189, 2008.

SANTOS, M.C.L.G.; SOUZA, A.P.; GERLACH, R.F.; TREVILATTO, P.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M.; LINE, S.R.P. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. **J Oral Rehabil**, v. 31, p. 660-664, 2004.

SILVÉRIO, K.G.; DAVIDSON, K.; JAMES, R.G.; ADAMS, A.M.; FOSTER, B.L.; NOCITI JR, F.H.; *et al.* Wnt/ β -catenin pathway regulates BMP2-mediated differentiation of dental follicle cells. **J Periodontal Res**, v. 47, n. 3, p. 309-319, 2012.

SUZUKI, R.; NEMOTO, E.; SHIMAUCHI, H. Cyclic tensile force up-regulates BMP-2 expression through MAP kinase and COX-2/PGE₂ signaling pathways in human periodontal ligament cells. **Exp Cell Res**, v. 323, p. 232-241, 2014.

TEN CATE, A.R.; MILLS, C. The development of the periodontium: the origin of alveolar bone. **Anat Rec**, v. 173, n. 1, p. 69-77, 1972.

TERMSUKNIRANDORN, S.; HOSOMICHI, J.; SOMA, K. Occlusal Stimuli Influence on the Expression of IGF-1 and the IGF-1 Receptor in the Rat Periodontal Ligament. **Angle Orthodontist**, v. 78, n. 4, p. 610-616, 2008.

THOMPSON, W.R.; RUBIN, C.T.; RUBIN, J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. **Gene**, v. 503, n. 2, p.179-193, 2012.

TRAN VAN, P.; MAILLAND, M.L. Short-term effects of occlusal hypofunction following antagonist tooth extraction upon periodontal tissues in the rat. **J Biol Buccale**, v. 9, n. 4, p. 385-400, 1981.

TU, X. *et al.* Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. **Bone**, 2012;

TURNER, C.H.; FORWOOD, M.R.; OTTER, M.W. Mechanotransduction in bone: do bone cells act as sensors of fluid flow? **FASEB J**, v. 8, n. 11, p. 875-878, 1994.

VAN BEZOOIJEN, R.L.; BRONCKERS, A.L.; GORTZAK, R.A.; HOGENDOORN, P.C.; VAN DER WEE-PALS, L.; BALEMANS, W.; *et al.* Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. **J Dent Res**, v. 88, n. 6, p. 569-74, 2009.

WALKER, C.G.; ITO, Y.; DANGARIA, S.; LUAN, X.; DIEKWISCH, T.G. RANKL osteopontin, and osteoclast homeostasis in a hyperocclusion mouse model. **Eur J Oral Sci**, v. 116, n. 4, p. 312-318, 2008.

WAN, H.Y.; SUN, H.Q.; SUN, G.X.; LI, X.; SHANG, Z.Z. The early phase response of rat alveolar bone to traumatic occlusion. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 6, p. 737-743, 2012.

WANG, T. et al. Mechanisms of mechanical force in periodontal homeostasis: a review. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 1438726, 2024.

WEIVODA, M.M.; YOUSSEF, S.J.; OURSLER, M.J. Sclerostin expression and functions beyond the osteocyte. **Bone**, v. 96, p. 45-50. 2017.

WINKLER, D.G.; SUTHERLAND, M.K.; GEOGHEGAN, J.C. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. **EMBO J**, v. 22, n. 23, p. 6267-6276, 2003.

XU, Y.; WANG, L.; SUN, Y.; HAN, X.; GAO, T.; XU, X.; *et al.* Sclerostin is essential for alveolar bone loss in occlusal hypofunction. **Exp Ther Med**, v. 11, p. 1812-1818, 2016.

YOSHINAGA, Y.; UKAI, T.; ABE, Y.; HARA, Y. Expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand relates to inflammatory bone resorption, with or without occlusal trauma, in rats. **J Periodont Res**, v. 42, p. 402-409, 2007.73

ZHAO, N.; NOCITI-JR, F.H.; DUAN, P.; PRIDEAUX, M.; ZHAO, H.; FOSTER, B.L.; SOMERMAN, M.J.; BONEWALD, L.F. Isolation and Functional Analysis of an Immortalized Murine Cementocyte Cell Line, IDG-CM6. **J Bone Miner Res**, v. 2, p. 430-442, 2016.

ZHAO, D. et al. Activation of connexin hemichannels enhances mechanosensitivity and anabolism in disused and aged bone. **JCI Insight**, 2024;

ANEXO – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação da remodelação periodontal em molares de ratos sob modificações experimentais na carga oclusal**, registrada com o nº **0033/2024**, sob a responsabilidade de **Juliana dos Santos Neves**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **06/01/2025 a 06/04/2026**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	30	30	0	Biotério central unifal-mg

Alfenas, 11 de Julho de 2025

Prof(a). Dr(a). Lisandra Brandino de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidade/certificado/> e digite a chave: 291e6468-4903a07ce6953beb3a2fbd