

Danielle Shima Luize

**INFLUÊNCIA DA OVARIECTOMIA NO
PROCESSO DE REPARO DE ENXERTO
AUTÓGENO EM BLOCO NA
MANDÍBULA. ESTUDO HISTOLÓGICO
EM RATAS ADULTAS**



Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do “Câmpus de Araçatuba – UNESP”, para obtenção do Título de “Mestre em Odontologia - Área de Periodontia”.

Orientador: *Prof. Dr. Alvaro Francisco*

ARAÇATUBA - 2004

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

L953a Luize, Danielle Shima
Influência da ovariectomia no processo de reparo de enxerto
autógeno em bloco na mandíbula. Estudo histológico em ratas
adultas / Danielle Shima Luize. – Araçatuba : [s.n.], 2004.
118 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2004
Orientador: Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco.

1.Ovariectomia. 2.Menopausa. 3.Deficiência estrogênica. 4.
Transplante ósseo. 5.Transplante autólogo.

Black D64
CDD 617.601



is Curriculares

Danielle Shima Luize

- Nascimento:** 04.03.1977 – MARINGÁ/PR
- Filiação:** Arlei José Luize
Sumie Shima Luize
- 1995/1999:** Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Maringá – UEM – Maringá.
- 2000/2002:** Especialização em Implantodontia no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC – USP – Bauru.
- 2000/2002:** Treinamento Supervisionado no Setor de Periodontia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC – USP – Bauru.
- 2003/2004:** Curso de Pós-graduação em Odontologia (Área de concentração em Periodontia), nível de mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.



Dedicatória

Dedico este trabalho:

Aos meus pais, Arlei e Sumie.
Pela grandiosidade que existe na
pessoa de vocês.
Por todo o apoio e confiança que
me dedicaram.
Pelo incentivo que me impulsiona a
crescer sempre.
Pela serenidade e responsabilidade
com que encaram a vida.
Pela sabedoria que me transmitem
num simples abraço...
Por serem meus pais...
Espero que a emoção deste momento
e a vida, de sempre, traduzam a
gratidão infinita, a admiração e o
amor imensurável que tenho por
vocês.

Aos meus irmãos,
Patrícia e Marcelo.
Maior riqueza da minha
vida...

Pelas virtudes que
carregam dentro de si.
Pela indefinível
sensação de que existe
perfeição quando penso
em vocês.

Sempre presentes no meu
coração e no meu
pensamento...

Obrigada pelo apoio,
pelo carinho, pela
compreensão.

E pelo privilégio de
poder desfrutar desta
riqueza maior.

Aos meus avós (Vovô, Vó Nené e Vó
Takeko).

À Tia Neide e à Tia Felícia.

E a todos os meus familiares...

Fonte palpável de amor, razão pela
qual a vida vale a pena.
Pela acolhida em cada retorno.
E pela torcida a cada ida.
Obrigada por fazerem-me sentir, a
todo momento, amada e especial.

Ao André.
Poucas palavras não traduziriam
esta "história" que vivemos.
Mas dedico esta vitória a você,
porque ela também é sua, porque
você esteve presente em tudo, a
todo momento.
Obrigada pelo companheirismo em
cada passo dado.
Pela alegria, comemorando cada
pequena vitória.
Pelo colo, quando o cansaço foi
maior.
Por tudo o que me ensina em
pequenos atos ou palavras.
Pelo seu entusiasmo de viver que
me contagia.
E, acima de tudo, pelo amor que me
encoraja na busca do meu ideal.
Amo você !!!



Agradecimentos Especiais

A Deus.

Pela força e pela coragem que
provêm de ti e me fazem viver.

Por iluminar meu caminho.

Por me proteger nesse caminho.

Por ser o caminho...

Ao Prof. Dr. Alvaro Francisco
Bosco.

Por ter o privilégio de tê-lo como
orientador.

Que soube me orientar com
admirável coerência.

Pela confiança que depositou em
mim desde o início,

e pelos preciosos ensinamentos
profissionais e de vida.

Pela prontidão e humildade, apesar
da grandeza dos seus

conhecimentos.

Pelo desprendimento do que é
passageiro e pelo valor que dá ao
que é realmente humano e
duradouro.

Meu eterno “mestre”...
Minha profunda admiração.

À Prof^a Dr^a Maria Lúcia Rubo
de Rezende (Malu).

Por todos os ensinamentos que
muito me engrandeceram.

Pelo equilíbrio e segurança que
transmite em seus atos.

Pela sensibilidade humana e
ética profissional admiráveis.

Por inúmeras vezes ...

...Espelho-me na sua pessoa
como exemplo de mulher.

Ao Prof. Dr. Valdir Garcia
Gouveia.
E à Prof^a Dr^a Maria José Hitomi
Nagata.
Exemplos de brilhantismo em suas
carreiras.
Pelas orientações valiosas e
ensinamentos transmitidos.
E pela convivência sempre
encorajadora, pautada em
princípios sólidos de vida
e busca constante de
aperfeiçoamento pessoal e
profissional.

À companheira, Samara.
Pela convivência tão agradável,
que transformou o nosso dia-a-dia
penoso
em uma luta gratificante em prol
de um mesmo objetivo.
Pelas risadas de coisas tão
simples, mas que se transformaram
em momentos grandiosos,
inesquecíveis...

Pela compreensão e amabilidade nas horas de decisão.
E pelo elo de respeito mútuo que conduziu toda nossa jornada.

Ao Prof. Dr. Dagoberto Sottovia
Filho.

Pelos ensinamentos valiosos em
cada pequeno detalhe.

Pela criteriosa análise dos
resultados obtidos
e obtenção das maravilhosas
imagens histológicas.

Por ter sido um verdadeiro co-
orientador deste trabalho.

A Dina Maria Dotto Sottovia.
Pela preocupação no transpor de
cada etapa.

Pelas preciosas diretrizes
profissionais e de vida
transmitidas.

A vocês e à Mariana,
Obrigada pelo apoio e carinho
incondicional
com que me acolhem em sua família.

Aos meus amigos de verdade:
Iza, Laís, Afonso e Henrique.
Pelo porto seguro que é nossa
amizade.
Sempre, desde crianças, torcendo
uns pelos outros,
para que pudéssemos ser “gente
grande”.
Apesar da distância, senti o apoio
de sempre.
Saudades de vocês...



agradecimentos

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba-UNESP, nas pessoas do seu Diretor Prof. Dr. Paulo Roberto Botacim e Vice-Diretor Prof. Dr. Célio Percinoto por proporcionar a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Celso Koogi Sonoda, Chefe do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, pelo engrandecimento humano e profissional que a sua pessoa proporciona.

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Poi, coordenador do Programa de Pós-graduação e exemplo de docência, pelas preciosas orientações e entusiasmo que enriquece a nossa convivência.

Ao Prof. Dr. Tetuo Okamoto pela integridade de caráter e conhecimento imensurável que o torna um pilar desta faculdade de ensino e pesquisa. Admiro a sua sabedoria e humildade, que o torna grandioso. Obrigada por me acolher com alegria e prontidão a qualquer hora.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Maria Aparecida Neves Jardim e Andréa de Carvalho Azem, do Departamento de Periodontia da Universidade de São Paulo-SP, por nos confiar a metodologia de pesquisa desenvolvida e pela solicitude durante a realização deste trabalho.

A Profa. Rita, do Departamento de Fisiologia, pelo pontapé inicial, transmitindo suas experiências com ratas ovariectomizadas, importante para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Mario Jefferson Lousada (Veterinária), pelo despojamento e solicitude.

Aos colegas de mestrado e companheiros, Valmir e Juliano, pelo respeito que abrilhantou nossa convivência, pela ajuda verdadeira do início ao fim, troca de experiências, pela reciprocidade, enfim... pela amizade que nasceu e que certamente será referência por toda a minha vida profissional.

À Dirce, Gilmar, Bernadete, funcionários do Laboratório do Departamento de Cirurgia, pela competência, presteza e qualidade de trabalho, agradeço muito pela imensurável contribuição durante todas as fases desta jornada, desde as infundáveis cirurgias dos ratinhos até o processamento histológico das peças.

À Cleide, um anjo da guarda, sempre de coração aberto... Um exemplo de dedicação e ética profissional, sempre procurando uma maneira de ajudar.

À Roberta Okamoto, de admirável simpatia e delicadeza, pela preocupação, troca de experiências, e presença constante durante toda a fase experimental do trabalho.

Ao Odair, funcionário do Biotério, companheiro... Pela oportunidade de poder contar com essa pessoa tão especial. Pelo convívio sempre alegre, pela imensa responsabilidade profissional que me deixou tranqüila, pela preciosa ajuda durante toda a fase experimental e por tudo o que me ensinou relacionado à experimentação animal.

Ao Camilo e demais funcionários do Biotério, pelas inúmeras vezes que me ajudaram e me apoiaram no decorrer do trabalho.

Ao Claudiomiro, funcionário do Departamento de Periodontia, pela preciosa contribuição, pela dedicação e ensinamentos durante a realização dos cortes histológicos.

À Antônia, funcionária do Departamento de Periodontia, pelos bons momentos que estivemos trabalhando no laboratório, pela ajuda fornecida, aprendi a

respeitá-la com imensa gratidão.

À Marina, Adélia e Valéria, sempre prestativas, dispostas, de bom-humor e preocupadas com o bom andamento do curso.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Unesp: Ana Cláudia, Cláudia e Ivone, Luzia, Cláudia e Jéssica, Isabel e Izamar, pela atenção, disposição e todas as instruções dadas com muito desprendimento.

A Nelci, funcionária do Departamento de Endodontia, pelas valiosas instruções.

À Luzia e demais funcionários da limpeza, pela prontidão, disposição e companhia em diversos momentos.

A Prudent, materiais odontológicos, na pessoa do Sr. Renato, pelo fornecimento das trefinas cirúrgicas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Giscard, colega da graduação, pelo laço de companheirismo criado e precioso auxílio nos momentos em que mais precisei.

Às colegas de mestrado e de “casa”, Tatiana e Flávia, pelo apoio em vários momentos, pela integridade na convivência diária e experiências compartilhadas durante o curso.

A Joseane M. D. Bosco, pelo carisma e caráter admiráveis, e auxílio incondicional durante todas as fases deste trabalho, e a Sra. Teresa Bosco, pelo acolhimento e apoio no dia-a-dia.

À Luciana Liarte Gasparini Ribeiro, colega do doutorado em periodontia, pela disposição em ajudar e deliciosa convivência nas clínicas.

À Olívia, estagiária da periodontia, pelo desprendimento ajudando em momentos difíceis com muita presteza e meiguice.

Aos colegas do mestrado-início 2004, Celinha, Thiago, Fernando e Michel; e Luiz Gustavo, colega do doutorado em periodontia, pelo convívio agradável.

Ao Ciandrus, colega do Mestrado em Prótese, e família, pelo apoio e incentivo.

À Carmem Elisa, sempre preocupada com o nosso bem-estar, obrigada pela atenção e cuidados desde o início, que a tornaram parte fundamental da nossa “casa”.

À Universidade Estadual de Maringá e docentes, pelo aprendizado que se tornou alicerce para que eu pudesse progredir na nossa profissão.

Ao Centrinho (Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – USP/Bauru), seus profissionais (em especial à Dr^a Malu), funcionários (Beth e Rose), amigos da turma de Implantodontia/2000-2002 e pacientes, pelo imensurável engrandecimento profissional e pessoal que me proporcionaram. Minha eterna gratidão e saudades...

À Bióloga Tânia Mary Cestari da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, pelos ensinamentos iniciais no manejo com ratos.

A todos os que ajudaram nas cirurgias dos ratinhos (André, Giscard, Valmir, Juliano, Ana Cristina Murakawa, Luis Augusto Esper, Matheus, Joseane Bosco, Fábio Tanaka, Daniel Kayat).

A todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.



ígrafe

“Só se vê com o coração.
O essencial é invisível aos
olhos.”

Antoine de Saint Exupéry



Resumo

LUIZE, D. S. **Avaliação histológica do efeito da ovariectomia em ratas adultas, no processo de reparo de enxerto autógeno em bloco na mandíbula.** 2004. 116f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio de análise histológica, a influência da ovariectomia (depleção de estrógeno) no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco. Para isso, foram utilizadas 36 ratas fêmeas, com idade de 12 meses, divididas em grupo controle (GC) e grupo experimental (GE) de 18 animais cada. As ratas do GE foram submetidas à cirurgia de ovariectomia (Ov), enquanto as ratas do GC foram submetidas a simulação do mesmo procedimento cirúrgico, sem a remoção dos ovários (Si). Transcorridos 30 dias da Ov ou Si, todos os animais receberam enxerto ósseo autógeno em bloco na mandíbula, na região próxima ao ângulo, tendo como área doadora o osso parietal da calvária. Os animais de cada grupo foram divididos em subgrupos de 6 animais, os quais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 14 e 28 dias, após a realização do enxerto ósseo. Aos 7 dias, a interface enxerto-leito receptor no GC mostrou-se preenchida por um típico tecido de granulação, com discreta atividade de angiogênese na porção central, ao passo que no GE, havia ainda a presença de coágulo sanguíneo e um tecido de granulação em organização. Aos 14 dias, no GC, a interface apresentou-se parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada, estabelecendo uma união do enxerto ao leito receptor, enquanto que no GE, a maior parte da interface encontrou-se preenchida por um típico tecido de granulação com nítida angiogênese e discreta atividade osteogênica, com neoformação de matriz óssea em algumas áreas. Aos 28 dias, o enxerto no GC apresentou-se histologicamente integrado ao leito receptor, com acentuada atividade osteogênica, ao passo que no GE a interface apresentou-se parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada, encontrando-se também áreas de tecido conjuntivo entre o enxerto e o leito receptor. Dentro dos limites deste trabalho, foi possível concluir, com base na análise histológica realizada, que a deficiência de estrógeno, decorrente da ovariectomia, atrasou o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco em mandíbula de ratas adultas e que, embora o processo de reparo tenha se mostrado atrasado no GE havia indícios de que este poderia se completar em períodos mais longos.

Palavras-chave: Ovariectomia; menopausa; deficiência estrogênica; transplante ósseo; transplante autólogo.



Abstract

LUIZE, D. S. **Histological evaluation of the effect of ovariectomy in female adult rats on the repair process of autogenous block grafts in the mandible.** 2004. 116p. Dissertation. (Master in Periodontics) – Dental School of Araçatuba, São Paulo State University, Araçatuba.

The aim of this study was to investigate, by means of histological analysis, the influence of ovariectomy (estrogen depletion) on the repair process of autogenous block bone grafts. 36 female adult rats, age twelve months, were assigned to two groups (n=18): control group (CG) and experimental group (EG). The rats in the EG had an ovariectomy (Ovx) whereas those in the CG underwent the same surgical intervention but did not have their ovaries removed (“Sham”). Thirty days after Ovx or “Sham” all the animals received autogenous block bone grafts in the mandible, in the region near the mandibular angle. The donor area was the parietal bone. The animals of each group were euthanized at 7, 14 and 28 days postoperative. On the 7th postoperative day, the graft-recipient site interface in the CG appeared filled by a typical granulation tissue with discreet angiogenic activity in the central portion whereas the EG still exhibited a blood clot and an organizing granulation tissue. On the 14th postoperative day, the interface in the CG was partially filled with newly formed bone matrix establishing a union between the graft and the recipient site. The majority of the interface in the EG was filled by a typical granulation tissue with evident angiogenic activity, discreet osteogenic activity and newly formed bone matrix in some areas. On the 28th postoperative day, the graft in the CG appeared histologically integrated with the recipient site and exhibited pronounced osteogenic activity. On the other hand, the interface in the EG appeared partially filled by newly formed bone matrix with areas of connective tissue observed as well. Within the limitations of the study, it may be concluded that estrogen depletion caused by the ovariectomy hindered the healing process of autogenous block bone grafts placed in the mandible of female adult rats. Although the repair process appeared delayed in the EG, there was evidence that it would be completed after a longer period of time.

Keywords: Ovariectomy; menopause; estrogen deficiency; bone transplantation; autograft.

Lista de Figuras

FIGURA 1	Tricotomia bilateral ao ventre.	59
FIGURA 2	Acesso ao ovário.	59
FIGURA 3	Procedimento de ovariectomia.	59
FIGURA 4	Ovário removido.	59
FIGURA 5	Sutura externa.	59
FIGURA 6	Anti-sepsia do campo operatório.	61
FIGURA 7	Isolamento da área cirúrgica.	61
FIGURA 8	Incisão linear na pele, expondo o músculo masseter.	61
FIGURA 9	Divulsão do músculo masseter.	61
FIGURA 10	Acesso à porção medial da mandíbula.	61
FIGURA 11	Raspagem do leito receptor, com espátula Hollembach.	61
FIGURA 12	Osso mandibular exposto.	61
FIGURA 13	Incisão em meia-lua no tegumento de revestimento do crânio.	63
FIGURA 14	Exposição do osso parietal.	63
FIGURA 15	Osteotomia para remoção do bloco ósseo com trefina cirúrgica.	63
FIGURA 16	Remoção do bloco ósseo.	63
FIGURA 17	Sutura do tegumento.	63
FIGURA 18	Bloco ósseo perfurado.	66
FIGURA 19	Perfuração da área receptora.	65
FIGURA 20	Transpassagem do fio pelo bloco e osso mandibular.	65
FIGURA 21	Bloco ósseo estabilizado na mandíbula.	65
FIGURA 22	Sutura da musculatura.	65
FIGURA 23	Sutura externa da pele.	65
FIGURA 24	Fotomicrografia representativa da adaptação do enxerto ao leito receptor para todos os grupos. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, MM=músculo masseter. Coloração H.E. Aumento original 10:1.	70
FIGURA 25	Grupo controle (7 dias). Visão panorâmica de um espécime deste grupo. Nota-se tecido de granulação (TG) envolvendo todo o enxerto, bem como na interface entre o enxerto e o leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS= fio de sutura. Coloração H.E.	73

Aumento original 10:1.

- FIGURA 26 Grupo controle (7 dias). Maior aumento da Figura 25. Observa-se a presença de remanescentes de coágulo sanguíneo (CO) lateralmente à borda do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, TG= tecido de granulação. Coloração H.E. Aumento original 25:1. 73
- FIGURA 27 Grupo controle (7 dias). Observa-se, na interface, a rede de fibrina com presença de fibroblastos (F), leucócitos (LE) e capilares sanguíneos (C). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1. 74
- FIGURA 28 Grupo controle (7 dias). Vista panorâmica. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, TG= tecido de granulação. Coloração T.M. Aumento original 10:1. (a) Maior aumento do mesmo espécime. Nota-se a presença de blastemas ósseos (BO) na porção mais central da interface. Coloração T.M. Aumento original 25:1. (b) Maior aumento do mesmo espécime. Matriz óssea neoformada (MO) relacionada ao Canal de Volkmann (*).Coloração T.M. Aumento original 25:1. 75
- FIGURA 29 Grupo controle (7 dias). Blastema ósseo. Observa-se matriz óssea neoformada (MO) circundada por osteoblastos (OB), além da presença de fibroblastos (F) e capilares (C). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1. 76
- FIGURA 30 Grupo experimental (7 dias). Nota-se a presença de remanescentes de coágulo (CO) na periferia do enxerto e interface. Observa-se a presença de tecido de granulação (TG) na periferia do enxerto e na interface, além de esquirolas ósseas na interface (seta verde). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, TG= tecido de granulação. Coloração T.M. Aumento original 10:1. 78
- FIGURA 31 Grupo experimental (7 dias). Maior aumento da Figura 30. Observa-se Canal de Volkmann (λ) comunicando a superfície externa e espaço medular, além de lacunas de reabsorção (seta azul) nas bordas do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1. 78
- FIGURA 32 Grupo experimental (7 dias). Observa-se, na interface, coágulo sanguíneo imaturo, com presença marcante de hemácias (H), fibroblastos (F), capilares sanguíneos (C) e alguns leucócitos (LE). E=enxerto, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1. 79
- FIGURA 33 Grupo controle (14 dias). Vista panorâmica. Observa-se a

- interface parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada (MO). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS=fio de sutura. Coloração T.M. Aumento original 10:1. (a) Maior aumento do mesmo espécime. Trabéculas ósseas imaturas, circundadas por osteoblastos (seta amarela). Coloração T.M. Aumento original 25:1. (b) Maior aumento do mesmo espécime. Matriz óssea, circundada por osteoblastos (seta amarela), preenchendo parcialmente os espaços medulares. Coloração T.M. Aumento original 25:1. 82
- FIGURA 34 Grupo controle (14 dias). Observa-se a face externa do enxerto com estreita faixa de matriz óssea neoformada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração T.M. Aumento original 25:1. 83
- FIGURA 35 Grupo controle (14 dias). Observam-se linhas de reversão (Li) na face externa do enxerto, com inserção de fibras colágenas (ϖ) ao osso neoformado. E=enxerto, FE=face externa, EM=espaço medular, C=capilar. Coloração T.M. Aumento original 100:1. 83
- FIGURA 36 Grupo experimental (14 dias). Observa-se discreta atividade osteogênica na interface, com a presença de matriz óssea neoformada (MO) e tecido de granulação (TG) na periferia do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 10:1. 85
- FIGURA 37 Grupo experimental (14 dias). Maior aumento da Figura 36. Observa-se, na interface, matriz óssea neoformada (MO) circundada por osteoblastos (seta amarela) em algumas áreas. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1. 85
- FIGURA 38 Grupo experimental (14 dias). Vista do enxerto. E=enxerto, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração T.M. Aumento original 25:1. (a) Ampliação da imagem superior. Observam-se espaços medulares parcialmente recolonizados por células. Ainda persistem células degeneradas. (b) Ampliação da imagem superior. Osteogênese discreta em pontos isolados da face externa. 86
- FIGURA 39 Grupo controle (28 dias). Observa-se acentuada atividade osteogênica neste período, com grande quantidade de matriz óssea neoformada (MO) preenchendo toda a interface. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 10:1. 88
- FIGURA 40 Grupo controle (28 dias). Observa-se que o enxerto apresenta-se histologicamente integrado ao leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, MO=matriz

óssea neoformada. Coloração T.M. Aumento original 25:1.	88
FIGURA 41 Grupo controle (28 dias). Observa-se extensa neoformação de matriz óssea (MO) generalizada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1. (a) Ampliação da imagem superior. Observa-se neoformação óssea na face externa e bordas do enxerto, com lacunas de reabsorção em locais isolados. (b) Ampliação da imagem superior. Nota-se também total preenchimento dos espaços medulares com matriz óssea neoformada.	89
FIGURA 42 Grupo experimental (28 dias). Observa-se moderada atividade osteogênica, com preenchimento parcial da interface com matriz óssea neoformada (MO), além de remanescentes de tecido de granulação (TG) na periferia do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS=fio de sutura. Coloração H.E. Aumento original 10:1.	91
FIGURA 43 Grupo experimental (28 dias). Observa-se a presença de tecido conjuntivo (δ) interposto entre o enxerto e o leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, MO=matriz óssea neoformada. Coloração T.M. Aumento original 25:1.	91
FIGURA 44 Grupo experimental (28 dias). Observa-se moderada neoformação de matriz óssea (MO) generalizada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS=fio de sutura. Coloração T.M. Aumento original 25:1. (a) Ampliação da imagem superior. Observa-se discreta atividade osteogênica na face externa do enxerto. (b) Ampliação da imagem superior. Espaços medulares parcialmente preenchidos por matriz óssea neoformada.	92

Lista de Abreviações e Legendas

BMP	Proteína óssea morfogenética
BO	Blastema ósseo
C	Capilar
cm	centímetro
cm ³	centímetro cúbico
CO	Coágulo
E	Enxerto
EM	Espaço medular
F	Fibroblasto
FE	Face externa do enxerto
FS	Fio de sutura
g	grama
H.E.	Hematoxilina e Eosina
IL-1	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IN	Interface enxerto-leito receptor
LE	Leucócitos
LR	Leito receptor
ml	mililitro
MM	Músculo masseter
mm	milímetro
MO	Matriz Óssea neoformada
OB	Osteoblasto
PTFE-e	Politetrafluoretileno expandido
TG	Tecido de granulação
TGF- β	fator de crescimento transformante- β
T. M.	Tricrômico de Masson



Sumário

1	Introdução	21
2	Revisão de Literatura	25
2.1	Enxerto Ósseo Autógeno	26
2.1.1	Fisiologia do tecido ósseo	30
2.1.2	Reparo do enxerto ósseo autógeno	31
2.2	Osteoporose, estrogênio e remodelação óssea	41
2.2.1	Osteoporose	41
2.2.2	Estrogênio e remodelação óssea	43
2.2.3	Deficiência de estrógeno e reparo de feridas ósseas	46
2.3	Caracterização do rato como modelo experimental	48
3	Proposição	53
4	Material e Método	55
4.1	Procedimento cirúrgico para realização da ovariectomia	57
4.1.1	Ovariectomia	57
4.1.2	Simulação da ovariectomia	58
4.2	Procedimento operatório de enxerto ósseo autógeno em bloco	60
4.2.1	Preparo do leito receptor	60
4.2.2	Obtenção do enxerto ósseo	62
4.2.3	Fixação do enxerto ósseo	64
4.3	Eutanásia	66
4.4	Processamento laboratorial	66
4.5	Análise histológica dos resultados	67
5	Resultado	69
6	Discussão	93
7	Conclusão	101
	Referências	103
	Anexo A	117



Introdução



1 Introdução

Com o advento dos implantes osseointegrados, preconizados por Brånemark et al. (1969; 1977), a Odontologia passou a contar com uma excelente alternativa de tratamento reabilitador com prognóstico favorável, principalmente para casos anteriormente considerados insolúveis. No entanto, a concepção de sucesso em implantodontia está relacionada com a disponibilidade óssea da área a ser restaurada (BAHAT, 1996). Limitações anatômicas provocadas pela perda prematura dos dentes ou por trauma, muitas vezes dificultam ou até mesmo inviabilizam a reabilitação com implantes osseointegrados. Em decorrência, as deformidades e/ou deficiências ósseas impedem a instalação de implantes em angulações adequadas e de dimensões satisfatórias, a ponto de comprometer as características funcionais e estéticas da prótese (TOLMAN, 1995).

Pesquisas com substitutos ósseos têm sido intensificadas com o objetivo de alcançar resultados previsíveis para a reconstrução dos tecidos ósseos perdidos. No entanto, apesar da busca incessante de uma alternativa para simplificação dos enxertos ósseos, principalmente eliminando a necessidade de área doadora, o osso autógeno tem se comportado como o material de maior índice de sucesso (KLINE; RIMER, 1983; RAGHOEBAR et al., 1993; ZEISS et al., 1960), sendo considerado o “padrão ouro” dos enxertos (SPRINGFIELD, 1992).

De acordo com as fases do reparo ósseo, Anderson et al. (1964), descreveram o processo de reparo do enxerto ósseo ocorrendo em quatro estádios:

revascularização, incorporação, substituição e remodelação. Este processo está sob o controle de inúmeros fatores, locais ou sistêmicos, dentre eles os níveis sanguíneos dos hormônios sexuais, os quais podem modificar a evolução do reparo ósseo. Com o avanço da idade, ocorrem diversas alterações no equilíbrio hormonal sistêmico, principalmente em mulheres no período pós-menopausa, quando a produção do hormônio estrógeno diminui ou cai praticamente a zero (GUYTON; HALL, 1998). Neste estágio, o osso é um dos tecidos bastante afetados. Os efeitos da deficiência hormonal em mulheres no período pós-menopausa resultam em significativa perda da massa óssea. Nesta fase, a atividade osteoclástica supera a atividade osteoblástica, caracterizando uma desordem no esqueleto denominada osteoporose (RAISZ, 1988).

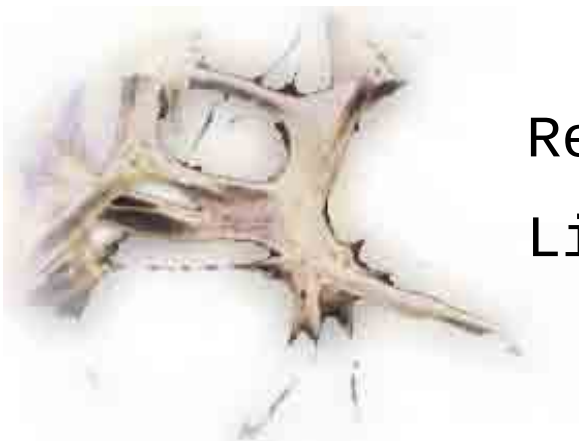
O mecanismo pelo qual o estrógeno previne a perda óssea está principalmente relacionado com a sua habilidade em bloquear a reabsorção, diminuindo a osteoclastogênese e a atividade reabsortiva de osteoclastos maduros (BAIN et al., 1993; CHOW et al., 1992). Além disso, o estrógeno estimula os osteoblastos a produzirem fatores de crescimento que, por sua vez, são mitogênicos para células osteoprogenitoras, e induzem a síntese de matriz orgânica e a rápida proliferação endotelial. A deficiência deste hormônio ovariano, portanto, interfere sobremaneira no processo de remodelação e reparo ósseo (HARRIS et al., 1996).

De acordo com diversos estudos, a deficiência de estrógeno provoca diminuição na densidade óssea mandibular (BRAS et al., 1982; KRIBBS et al., 1983, 1989; NISHIMURA et al., 1992; VON WOWERN; KOLLERUP, 1992), induz a osteoclastogênese no periodonto de ratas (KAWAMOTO et al., 2002), acentua a remodelação do osso alveolar induzida pelo trauma oclusal (KAWAMOTO;

NAGAOKA, 2000) e interfere na morfologia óssea alveolar (MARQUES, 1998). No reparo alveolar pós-exodontia, a deficiência estrogênica provoca significativa alteração no metabolismo ósseo retardando a formação e mineralização óssea (SHIMIZU et al., 1998, 2000; HSIEH et al., 1995; TANAKA et al., 2001). O efeito deletério da deficiência do estrógeno também parece resultar em menor área de contato titânio-osso, quantidade e qualidade óssea ao redor de implantes, bem como menor resistência ao torque (DUARTE et al., 2003; LUGERO et al., 2000; YAMAZAKI et al., 1999).

O rato tem sido preferencialmente utilizado como modelo experimental na avaliação das consequências ósseas, relativas à deficiência de estrógeno, por meio de ovariectomia, uma vez que as características da perda óssea e suas seqüelas assemelham-se àquelas encontradas em mulheres no período pós-menopausa. KALU et al. (1989) propuseram que ratas de 12 meses seriam adequadas para esse fim, assegurando que nesta idade as alterações ósseas, seguinte a ovariectomia, são primariamente devidas à deficiência do hormônio ovariano, evitando o crescimento ósseo acelerado que ocorre em animais jovens e a perda óssea própria de idades mais avançadas.

Com base nas considerações apresentadas e na relevância do assunto, é importante verificar os efeitos da ovariectomia (depleção de estrógeno) no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco em mandíbula de ratas adultas, principalmente pelo fato de haver escassez de trabalhos de cunho experimental analisando a influência da ovariectomia sobre o processo de reparo neste tipo de procedimento.



Revisão de Literatura



2 Revisão de Literatura

Esta revisão de literatura apresenta-se dividida em três tópicos: 1) Enxerto ósseo autógeno, 2) Osteoporose, estrogênio e remodelação óssea, e 3) Caracterização do rato como modelo experimental.

2.1 Enxerto ósseo autógeno

O sucesso clínico e a longevidade dos implantes osseointegrados – função, estética e fonética – estão diretamente relacionados com a disposição e morfologia do tecido ósseo na área edêntula, quantidade e qualidade do tecido mole, além de saúde geral do paciente. Baseados no desenho dos implantes e na região a ser reabilitada, estudos clínicos têm preconizado dimensões mínimas de osso no rebordo edêntulo incluindo a largura de 5mm, para permitir que o implante permaneça recoberto por osso na face vestibular e lingual após a sua inserção, e altura óssea vertical de 7 a 10mm (LEKHOLM; ZARB, 1985; SHULMAN, 1988). Portanto, reabsorção alveolar seguinte à extração dentária, trauma, agenesia ou patologia, podem resultar em um rebordo com espessura e/ou altura inadequadas para a instalação de implantes.

Diversos procedimentos cirúrgicos têm sido descritos para aumentar o volume ósseo, incluindo enxertos autógenos e substitutos ósseos. Apesar dos esforços no desenvolvimento de substitutos ósseos, o enxerto ósseo autógeno ainda persiste como o padrão ideal quando comparado aos demais materiais (KLINE & RIMER, 1983; RAGHOEBAR et al., 1993; ZEISS et al., 1960).

Sob a óptica reabilitadora, os enxertos ósseos para reconstrução de rebordos ósseos deficientes proporcionam ao paciente inúmeras vantagens, tanto do ponto de vista biomecânico quanto estético, na instalação de implantes osseointegrados. Por estes motivos tem-se intensificado tanto o seu emprego na odontologia (BAHAT, 1996).

Diversos sítios doadores de enxerto autógeno têm sido avaliados, incluindo a crista ilíaca, calvária, tibia, costela (HARSHA et al., 1986; KELLER et al., 1987; LISTROM; SYMINGTON, 1988) e sítios intrabucais, como o osso zigomático e mandíbula nas suas porções retromolares, corpo, ramo e sínfise (LUNDGREN et al., 1996; MISH, 1997; TOLMAN, 1995).

Após a introdução dos implantes osseointegrados, Breine e Brånemark (1980) foram os primeiros pesquisadores a empregarem os enxertos ósseos autógenos para reconstrução de maxilas intensamente reabsorvidas associados à instalação de implantes osseointegrados. Os autores utilizaram enxerto ósseo córtico-trabecular de tibia, em bloco, estabilizados no rebordo residual com os próprios implantes de titânio.

Posteriormente, em 1985, Brånemark substituiu o osso de tibia pelo da crista ilíaca lateral-anterior, para o qual utilizou uma incisão alta na mucosa labial para

assegurar que a linha de incisão fosse posicionada anatomicamente deslocada da área enxertada.

Em 1987, Keller et al. modificaram a técnica descrita por Brånemark, passando a utilizar a porção medial-anterior da crista ilíaca para obtenção de enxertos ósseos “onlay”. Esta foi uma importante mudança, visto que o bloco ósseo córtico-trabecular passou a ter um contorno côncavo mais anatômico no seu aspecto vestibular e a porção medular mostrou-se mais convexa, adaptando-se bem ao rebordo residual côncavo reabsorvido.

Mais tarde, Donovan et al. (1994) e Jensen e Sindet-Pedersen (1991) descreveram o tratamento de 15 e 13 pacientes, respectivamente, com a técnica de enxerto ósseo em bloco colhido da calvária. Teoricamente, segundo os autores, o osso da calvária aumenta o potencial de cicatrização do enxerto em bloco por ser de origem intramembranosa.

Os enxertos de origem intrabucal possuem vantagens sobre os enxertos obtidos extra-bucalmente, por não necessitarem de internação hospitalar e apresentarem menor taxa de morbidade relacionada à área doadora. Estudos clínicos que compararam enxerto de mento com enxerto de crista ilíaca ou costela para reconstrução de fissuras alveolares, revelaram mínimas complicações na área doadora mandibular e reabsorção significativamente menor dos enxertos de mento (KOOLE et al., 1989; BORSTLAP et al., 1990).

Resultados favoráveis relatados com o uso de enxerto de mento no reparo de defeitos de fissura alveolar, induziram Misch et al. (1992) a avaliarem este procedimento para reconstrução de deficiências alveolares de tamanho limitado

anteriormente à instalação de implantes, com resultados vantajosos quando comparado aos enxertos de origem extrabucal. De acordo com os autores, as vantagens inerentes ao enxerto ósseo de mento são a acessibilidade, tempo operatório reduzido e quantidade óssea disponível suficiente. Outras vantagens, quando comparado aos enxertos colhidos de sítios extrabucais, incluem menor morbidade pós-operatória, redução ou eliminação da hospitalização, o que diminui o custo do procedimento, e mínimo desconforto pós-operatório.

Em 1997, Misch avaliou vantagens, desvantagens e indicações de enxertos obtidos da sínfise e do ramo mandibulares. Para o estudo, 50 pacientes que apresentavam volume ósseo inadequado para instalação de implantes foram tratados com enxertos ósseos mandibulares da sínfise ou do ramo, de acordo com a morfologia do defeito. Comparativamente, os enxertos de ramo resultaram em menos complicações, enquanto os procedimentos para obtenção do enxerto de sínfise ofereceram maior risco de parestesia temporária do nervo mentoniano (9,6%), sensação alterada nos dentes anteriores da mandíbula (29%) e deiscência de sutura na região doadora (10,7%). No entanto, a sínfise ofereceu maior volume de osso que o ramo, obtendo-se em média $1,74\text{cm}^3$ e $0,9\text{cm}^3$, respectivamente. Todos os enxertos foram incorporados ao leito receptor com mínima reabsorção (0 a 25%) e mantiveram a qualidade densa.

Independente das características individuais de cada técnica, a escolha do sítio doador baseia-se principalmente na morfologia do defeito ósseo, no tipo e quantidade de osso requerido, acesso ao leito doador, dificuldade e tempo dispensado para o procedimento e custo (MISCH, 1997).

A superioridade dos enxertos autógenos é atribuída ao seu mecanismo de reparo, que permite uma rápida incorporação e adaptação funcional à área receptora (ANDERSON et al., 1964; ZEISS et al., 1960). Para compreender os fundamentos do reparo de enxertos autógenos e seu papel no âmbito odontológico, serão abordados dois tópicos relacionados aos enxertos autógenos em bloco: fisiologia do tecido ósseo e reparo do enxerto ósseo autógeno.

2.1.1 Fisiologia do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, cujo peso consiste em 33% de matriz orgânica, dos quais 28% de colágeno tipo I e 5% de proteínas não-colagenosas, tais como osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea, proteoglicanas ósseas e sialoproteína óssea. A matriz orgânica é permeada por sais minerais, principalmente cristais de hidroxiapatita, que perfazem os 67% remanescentes do osso (TEN CATE, 2001). A resiliência do osso está associada com o colágeno, seu principal componente orgânico, enquanto a rigidez é característica do aspecto inorgânico, composto primariamente por hidroxiapatita.

Além das suas funções esqueléticas de suporte, proteção e locomoção, o osso constitui-se um reservatório importante de minerais, tais como cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais. Este processo é sistematicamente controlado por fatores sistêmicos (hormonais e nutricionais) e, localmente, ele é controlado por forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas liberadas pelas células ósseas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Caracteristicamente, todos os ossos apresentam uma densa camada externa de osso compacto ou cortical e uma cavidade medular central, preenchida por uma malha trabecular óssea, denominada osso esponjoso ou trabecular. Do ponto de vista microscópico, ambos são histologicamente constituídos de camadas ou lamelas microscópicas, as quais, no osso compacto, estão densamente arranjas numa disposição concêntrica, denominada sistema de Havers (TEN CATE, 2001).

Ao redor de cada osso compacto, existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico (células formadoras de osso), denominada periósteo, que consiste de duas camadas. A camada interna, próxima à superfície óssea, é mais rica em células, principalmente precursoras de células ósseas, e um rico suprimento vascular, enquanto a camada externa é mais fibrosa. A superfície interna do osso compacto, bem como a do osso esponjoso são recobertas por uma camada única de células ósseas, o endósteo (TEN CATE, 2001).

Basicamente, encontram-se dois tipos de ossificação durante a formação do tecido ósseo: a intramembranosa, que se dá a partir de membranas conjuntivas, e a endocondral, que se inicia sobre um molde cartilaginoso, que é destruído gradualmente e substituído por tecido ósseo formado a partir de células do conjuntivo adjacente. De acordo com Hollinger et al. (1999), apesar das diferentes origens embriológicas, não existem evidências de diferenças bioquímicas, morfológicas ou funcionais entre o osso endocondral e intramembranoso. No entanto, diferenças na carga biofuncional e vascularização existem e, portanto, a concentração de proteínas ósseas morfogenéticas também deve ser diferente devido às características do suprimento sanguíneo.

2.1.2 Reparo do enxerto ósseo autógeno

A neoformação óssea, de acordo com Garg (1999), pode ocorrer por três diferentes modos: osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é a formação e desenvolvimento de osso. Desta forma, células osteogênicas podem estimular neoformação óssea em áreas ectópicas ou acelerar a formação óssea. Osteoindução é o estímulo para a proliferação de células osteoprogenitoras (mitogênico) e conseqüente diferenciação de osteoblastos, os quais iniciam uma rápida e efetiva osteogênese. Enxertos osteoindutores podem ser utilizados para promover regeneração óssea, por induzirem a neoformação de tecido ósseo em áreas onde não é normalmente encontrado. A osteocondução é a propriedade de promover uma matriz física ou arcabouço para a deposição de novo osso, não apresentando qualquer estímulo mitogênico. Para que ocorra aposição de novo osso, os enxertos osteocondutores exigem que haja osso pré-existente ou células mesenquimais indiferenciadas na área receptora.

Durante o processo de neoformação óssea nos enxertos autógenos, na primeira fase, as células sobreviventes do enxerto são responsáveis pela formação de tecido osteóide por meio de osteogênese. Estas células apresentam maior atividade nas primeiras 4 semanas depois de realizado o enxerto (MARX; SAUNDERS, 1995). O processo de osteoindução começa na segunda semana após a realização do enxerto e atinge seu pico entre 6 semanas e 6 meses, com progressiva diminuição. Os vasos

sanguíneos do leito receptor invadem o enxerto, e células ósseas seguem a trajetória dos vasos sanguíneos para remodelação do enxerto por um fenômeno duplo de reabsorção e neoformação (ROBERTS et al., 1987). Proteínas ósseas morfogenéticas (BMP), derivadas da matriz óssea enxertada e reabsorvida por osteoclastos, atuam como mediadores para a fase de osteoindução (URIST, 1965). As BMPs e outras proteínas devem ser liberadas anteriormente ao ciclo de osteoindução. O processo de osteocondução ocorre com o componente inorgânico do osso, atuando como matriz e fonte de minerais durante a deposição de matriz pelo osso circunjacente. No processo de reparo do enxerto ósseo autógeno, os três processos se sobrepõem na seqüência temporal e não são eventos separados do crescimento ósseo.

Segundo Lane (1995) o enxerto de osso autógeno é o único com capacidade osteogênica. Além disso, o autor sugeriu que ocorre uma sobreposição dos três eventos, permitindo que ocorra formação óssea mais rápida e eficiente.

De acordo com as fases do reparo ósseo, Anderson et al. (1964), descreveram o processo de enxerto ósseo ocorrendo em quatro estádios: revascularização, incorporação, substituição e remodelação. A completa revascularização do enxerto ocorre em torno de 1 a 2 semanas para o osso medular, enquanto que 1 a 2 meses podem ser necessários para o osso cortical. A revascularização ocorre por meio de vasos sanguíneos, provenientes do leito receptor, que se estendem para o interior dos espaços medulares através do sistema de canais pré-existentes no enxerto. Na incorporação, ocorre o processo de união do enxerto ao osso hospedeiro. O osso doador, algumas vezes, não modifica suas características físicas. No processo de substituição, o enxerto ósseo é reabsorvido e substituído por

depósito de osso novo. A formação de camadas de osso neoformado, no interior do osso enxertado, tem sido descrito como *creeping substitution*. Finalmente, a remodelação é a última fase da reabsorção do enxerto ósseo, tendendo a devolver a arquitetura do osso hospedeiro. Esta fase exhibe os processos osteoclástico e osteoblástico. Estes processos estão sob o controle de inúmeros fatores, e cada qual pode modificar os elementos celulares.

O papel da revascularização vem sendo pesquisado há anos, enfatizando a importância do suprimento sanguíneo quando se realiza um enxerto para promover o crescimento ósseo, bem como o fato de existir uma íntima relação entre a penetração vascular nos enxertos ósseos e a sua incorporação ao respectivo leito (ALBEE, 1923; STRINGA, 1957). Stringa, em 1957, concluiu que a incorporação do enxerto ósseo depende primariamente da velocidade de penetração vascular. De acordo com Marx e Saunders (1995), se o enxerto for posicionado em íntimo contato com o leito receptor, novos vasos sanguíneos partem do leito e penetram no enxerto numa taxa de 0.5mm ao dia.

No processo de incorporação dos enxertos ósseos autógenos, a resposta celular parece ser diferente quando se utiliza enxerto de osso medular ou cortical. Porém, ambos apresentam eventos similares durante as duas primeiras semanas depois de realizado o enxerto (ABBOTT et al., 1947; ALBEE, 1923; DELEU; TRUETA, 1965). O coágulo sanguíneo promove o ambiente inicial para o enxerto. Uma resposta inflamatória prevalece e um tecido de granulação, com brotos vasculares penetrando no enxerto, invade a área. Alguns linfócitos, plasmócitos e osteoclastos envolvem o enxerto. Ao final da segunda semana, observa-se um tecido de granulação fibroso,

diminuição do número de células inflamatórias, aumento da atividade osteoclástica e morte celular no interior do enxerto, ainda não atingido pela resposta vascular (BURCHARDT; ENNEKING, 1978). A partir deste momento, as diferenças entre enxerto cortical e medular tornam-se evidentes.

No enxerto autógeno medular, a resposta vascular é muito maior que no enxerto cortical. O enxerto medular pode ser completamente vascularizado em aproximadamente 1 a 2 semanas (DELEU; TRUETA, 1965). Na fase subsequente, a população celular deste ambiente compreende predominantemente osteoblastos. Não se sabe se estas células são produzidas a partir do sítio receptor ou se são descendentes das células transplantadas com o próprio enxerto (BURCHARDT, 1983). De qualquer maneira, estas células delineiam as trabéculas do enxerto e depositam uma camada de tecido osteóide que circunda e entremeia o osso original desvitalizado. Este osso entremeado é, em seguida, reabsorvido por osteoclastos. Radiograficamente, o osso medular primeiramente torna-se mais denso devido ao novo osso formado nas antigas trabéculas e, posteriormente, passa a ficar menos denso em decorrência da remodelação osteoclástica.

A principal diferença histológica aparente entre o enxerto cortical e o medular é a sua vascularização tardia. O osso cortical pode não ser revascularizado tão rapidamente quanto o osso medular, podendo levar até 2 meses para a completa revascularização. Este atraso pode ser atribuído à estrutura cortical densa, uma vez que a penetração vascular no enxerto cortical é o resultado da reabsorção periférica por osteoclastos e infiltração vascular através de antigos canais harvesianos e de Volkmann. Seguido da vascularização na periferia do enxerto, o interior segue-se mais

rapidamente. A revascularização do interior do enxerto de osso cortical dá início ao processo de *creeping substitution*, descrito como a dinâmica do processo de substituição do osso necrótico por novo tecido ósseo a partir dos canais de revascularização (ABBOTT *et al.*, 1947, DELEU; TRUETA, 1965, ENNEKING *et al.*, 1975). Em estudos em cães, Enneking *et al.* (1975) demonstraram que a fase reabsortiva apresentou-se aumentada acima dos níveis normais nas primeiras 2 semanas, permanecendo aumentada nas 4 semanas subsequentes, e então diminuindo rumo a níveis normais por aproximadamente 1 ano. A avaliação histológica destes dados demonstrou que, no processo de reabsorção, os sistemas harvesianos periféricos foram remodelados juntamente com suas lamelas intersticiais adjacentes. Em seguida, os sistemas harvesianos internos foram remodelados, sem a remodelação de sua lamela intersticial correspondente deixando, deste modo, áreas de osso cortical desvitalizado misturadas com osso novo remodelado. Os resultados mostraram que o osso nas bordas do enxerto estava mais completamente remodelado que o osso no centro do enxerto.

Em 1983, Maletta *et al.*, estudaram as bases biológicas da cicatrização e revascularização de enxertos ósseos autógeno e alógeno liofilizado de costela, por meio de técnicas histológica e microangiográfica, em maxila edêntula de macacas *Macaca fascicularis*, fêmeas adultas. Para o experimento, foi realizada uma incisão horizontal de 1.5cm logo acima da junção muco-gengival, na região de canino e pré-molares da maxila. O perióstio foi rebatido, criando um túnel, no interior do qual os enxertos de costela medindo 2x5x2mm foram colocados. Dos 13 animais, 6 receberam enxerto ósseo autógeno obtido imediatamente antes da sua colocação, 6 receberam

enxerto alógeno obtido 2 meses antes e devidamente processado pela National Naval Medical Center Tissue Bank para sua liofilização, e 1 animal foi usado como controle. Foi realizada eutanásia dos animais (1 de cada grupo) após 2 semanas, 1 mês, 2, 4, 6 e 8 meses. A análise histológica do grupo que recebeu enxerto autógeno demonstrou que:

- Período de 2 semanas: a tábua cortical da maxila apresentou-se intacta sob o enxerto. Na área imediatamente ao redor do enxerto, um leve infiltrado inflamatório, composto por neutrófilos polimorfonucleares e linfócitos, foi observado juntamente com a proliferação de um tecido conjuntivo maduro. Alguma remodelação foi evidente na periferia do enxerto, aumento da vascularização e foi observado depósito de novo osso sobre a face lateral da maxila próximo ao enxerto.

- Período de 1 mês: O enxerto apresentou-se, nesta fase, consideravelmente remodelado, com atividade osteoclástica na periferia lateral do enxerto e reabsorção no interior do novo tecido osteóide formado. Remanescentes do enxerto não apresentavam osteócitos viáveis nas lacunas. Medialmente ao enxerto, tecido osteóide e imaturo e áreas lineares de osteoblastos ativos foram observados, sendo que o espaço entre a maxila e o enxerto havia sido preenchido com tecido ósseo neoformado.

- Período de 2 meses: Pequenas quantidades de enxerto ainda persistiam lateralmente à maxila. Evidenciou-se novo osso viável formado e tecido osteóide em aposição direta à maxila. Vascularização abundante e pequena quantidade de infiltrado inflamatório foram observadas neste estágio do reparo.

- Período de 4 meses: não restou evidências do enxerto de costela e nenhuma célula inflamatória foi observada. Algum osso neoformado, relativamente maduro, estava aderido à maxila e recontornado por atividade osteoclástica na sua periferia.

- Períodos de 6 e 8 meses: não se observou qualquer evidência de enxerto remanescente. O contorno da maxila apresentou-se similar ao espécime controle.

Os espécimes do grupo que recebeu enxerto alógeno, neste estudo, demonstraram padrão de comportamento muito similar aos enxertos autógenos, considerando reabsorção e indução da remodelação óssea. No entanto, os períodos envolvidos nestes eventos foram diferentes. Os enxertos autógenos foram muito reabsorvidos em 1 mês e quase totalmente reabsorvidos em 2 meses, com mínimo aumento ósseo no leito receptor. Por outro lado, moderada quantidade de osso alógeno ainda permaneceu aos 2 meses e não havia sido totalmente reabsorvido após 4 meses. Os autores concluíram que ambos os enxertos ósseos, autógeno e alógeno de costela, pareceram apresentar mínimo potencial osteogênico, e foram levados à reabsorção.

As características do leito receptor também parecem influenciar na incorporação de enxertos ósseos em bloco. Carvalho et al. (2000) analisaram a histomorfometria de enxertos ósseos autógenos em leito receptor cortical, perfurado e decorticalizado, na mandíbula de 6 cães. Os enxertos ósseos córtico-trabeculares foram colhidos da região posterior da mandíbula e fixados com parafusos. Após 45 e 90 dias, foi realizada eutanásia dos animais e blocos contendo o enxerto e osso adjacente foram removidos e preparados para análise histológica. Os autores concluíram que: a) a

incorporação do enxerto ósseo variou conforme o tipo de preparação do leito; b) nos espécimes sem preparação (osso cortical intacto) ocorreu interposição de tecido conjuntivo e reabsorção parcial do enxerto mais freqüentemente; e c) quando o leito receptor foi preparado com perfuração ou decorticalização, foi observada integração do enxerto ósseo e manutenção do volume do enxerto. Segundo os autores, os resultados obtidos neste estudo devem-se provavelmente à rápida revascularização que ocorre a partir dos sítios preparados, mantendo a vitalidade dos enxertos ósseos. Os pobres resultados no grupo com osso cortical mantido intacto podem ser explicados pela alta densidade do osso mandibular e revascularização deficiente do enxerto ósseo ou, ainda, o resultado pode ter sido por falta de adaptação do enxerto.

Kahnberg et al., em 1998, descreveram um modelo experimental em coelhos para estudar a incorporação de enxertos ósseos “onlay”. Enxertos ósseos autógenos extraídos do osso rádio foram posicionados na base da mandíbula de 6 coelhos. Cada animal foi operado 2 vezes, de modo que em um dos lados o enxerto pudesse permanecer durante 6 meses e, no lado contra-lateral, durante 6 semanas. A integração do enxerto ósseo foi encorajadora. A remodelação do enxerto foi observada na sexta semana, com atividade osteoclástica/osteoblástica primariamente no leito receptor em contato com o enxerto, e mais pronunciada após 6 meses. Reabsorção foi mais pronunciada nas bordas do enxerto. Os autores concluíram que o modelo experimental descrito serve como método confiável para o estudo da cicatrização e integração de enxertos ósseos “onlay”.

Em 2001, Jardini apresentou um modelo biológico para o estudo da reparação de enxertos ósseos em bloco em mandíbula de ratos. O objetivo deste estudo

foi analisar, quantitativa e qualitativamente, o padrão de reparação do enxerto autógeno em bloco associado ou não à membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Foram utilizados 60 ratos *Wistar* machos, divididos em um grupo que recebeu o enxerto mais a membrana (ME) e outro que recebeu somente o enxerto (E). Uma trefina foi utilizada para a remoção do enxerto ósseo em bloco da calvária do animal, que a seguir foi fixado próximo ao ângulo da mandíbula. Foi realizada eutanásia dos animais nos seguintes períodos: 0 hora, 7, 14, 21 e 45 dias. A análise histológica da interface enxerto-leito demonstrou que:

- Período de 0 hora: superfície regular, recoberta por coágulo sanguíneo em ambos os grupos.
- Período de 7 dias: em E a superfície óssea do leito voltada para o enxerto mostrou-se discretamente irregular, apresentando linhas de reversão, indicando reabsorção/aposição óssea. Próximo às linhas de reversão, observou-se a formação de trabéculas ósseas imaturas contendo osteócitos e circundadas por osteoblastos, estabelecendo uma união entre o leito e o enxerto. No grupo ME, observou-se típico tecido de granulação entre o leito e o enxerto e algumas áreas de coágulo sanguíneo. Algumas áreas de neoformação óssea em ponte foram observadas unindo o leito ao enxerto.
- Período de 14 dias: No E, ainda observou-se áreas de osso imaturo formando uma ponte de união entre o leito e o enxerto, assim como áreas de tecido conjuntivo interposto aos dois. No ME, algumas trabéculas ósseas formaram pontes entre o leito e a superfície interna do enxerto, assim como, entre o leito e as bordas laterais do enxerto, sob a membrana.

- Período de 21 dias: No E, a interface na sua maior parte já apresenta ligação entre o leito receptor e o enxerto. No ME, observou-se integração entre o leito e o enxerto em diversas áreas da interface, bem como neoformação óssea no leito além dos limites da borda lateral do enxerto, sob a membrana.

- Período de 45 dias: No E, observa-se fusão total do enxerto ao leito, além de maior reabsorção nas bordas laterais. No ME, a maior parte do enxerto mostrou integração com o leito, evento também observado nas bordas laterais do enxerto.

Neste mesmo estudo, a análise histométrica demonstrou que, para o grupo E, houve perda óssea ao longo do período de reparação em torno de 24%. Por outro lado, no grupo ME houve um ganho de tecido ósseo ao redor de 55%.

Utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente, AZEM, em 2002, estudou a revascularização de enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não a membrana de PTFE-e. Durante a eutanásia, nos períodos de 0 hora, 3, 7, 14 e 21 dias, os animais foram perfundidos com tinta nanquim e paraformaldeído a 4% em tampão em partes iguais. A análise histológica demonstrou que:

- Aos 3 dias, o enxerto mostrou-se difundido no grupo E, observando-se brotos vasculares provenientes do leito, enquanto que no grupo ME, estes brotos vasculares foram observados de maneira mais discreta e o enxerto não se apresentou difundido.

- Aos 7 dias, a revascularização no grupo E ocorreu a partir de vasos originários do leito e do tecido conjuntivo circunjacente penetrando toda a

periferia do enxerto, ao passo que no grupo ME, só vasos provenientes do leito atingiram o enxerto.

- Aos 14 dias, o grupo E mostrou penetração de vasos na periferia do enxerto, alcançando variáveis extensões no interior do mesmo. No grupo ME, observou-se penetração vascular no enxerto próxima às áreas de perfuração, nos bordos e na interface leito-enxerto.

- Aos 21 dias, a penetração vascular pôde ser observada em ambos os grupos, embora tenha sido evidente a presença de vasos em praticamente toda a extensão do enxerto no grupo E, enquanto no grupo ME, esta penetração vascular foi principalmente notada nas regiões próximas a perfuração.

A autora concluiu que a revascularização ocorreu mais precocemente e esta foi mais intensa, em todos os períodos experimentais, no grupo E do que no grupo ME.

2.2 Osteoporose, estrogênio e remodelação óssea

2.2.1 Osteoporose

Osteoporose é definida como “uma doença esquelética sistêmica progressiva caracterizada por perda de massa óssea e deterioração da microestrutura do tecido ósseo, com aumento conseqüente da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura” (ASSESSMENT..., 1994). Numerosos estudos têm demonstrado que muitas

mulheres apresentam acelerada perda óssea que coincide temporalmente com o período pós-menopausa (RIGGS et al., 1982).

Fatores de risco para osteoporose têm sido bastante estudados (COOPER; MELTON, 1996; JEFFCOAT; CHESNUT, 1993; VICO et al., 1992). Alguns destes fatores são modificáveis e outros não. A osteoporose é muito mais prevalente em mulheres do que em homens, devido ao papel da deficiência de estrógeno na patogênese da perda óssea. Os níveis de estrógeno presentes antes da menopausa são preventivos contra a perda de mineral ósseo, da mesma maneira que a terapia de reposição hormonal após a menopausa (FELSON et al., 1993; LINDSAY, 1991). Menopausa, tanto a que ocorre naturalmente ou induzida por drogas ou cirúrgica, sem terapia de reposição hormonal, predispõe à osteoporose (VICO et al., 1992).

A idade é o principal fator de risco não-modificável para osteoporose (VICO et al., 1992). Na maioria das mulheres a massa óssea alcança seu pico na terceira década de vida e declina a partir daí. Este declínio é acelerado com a chegada da menopausa (VICO et al., 1992; JEFFCOAT; CHESNUT, 1993). Apesar das estimativas da taxa de perda óssea no período pós-menopausa variarem de acordo com a população e tecnologias de medida, uma taxa de 0.5 a 1.0% por ano tem sido relatada.

Outro fator não-modificável inclui estrutura corpórea delgada (COOPER; MELTON, 1996) e história de osteoporose familiar, sendo que mulheres asiáticas e caucasianas apresentam maior risco que as afro-americanas (KELLIE; BODY, 1990). Fatores modificáveis que contribuem para perda da massa óssea

incluem: ingestão insuficiente de cálcio (HOLBROOK et al., 1988), falta de exercício, fumo e álcool (HEMENWAY et al., 1988). Certas medicações, tais como os córtico-esteróides, irão alterar o balanço entre formação e reabsorção óssea, resultando em perda da massa óssea. Finalmente, ossos fragilizados e uma propensão à queda, propiciam fraturas acidentais ou espontâneas no indivíduo osteoporótico (COOPER; MELTON, 1996).

A morbidade que está associada com osteoporose não deve ser subestimada. Enquanto a perda de massa óssea, por si, não causa sintomas, uma vez ocorrida uma fratura, determina-se um quadro de dor, perda de função e deformidades em muitos casos. Por esta razão, a osteoporose quando não é acompanhada de fratura é definida como uma “doença silenciosa”.

2.2.2 Estrogênio e remodelação óssea.

O estrogênio, além das variadas funções no desenvolvimento sexual, aumenta a intensidade de crescimento de todos os ossos longos durante a puberdade e atua unindo as epífises às diáfises dos ossos longos, pela ossificação da cartilagem de conjugação. Este hormônio causa ainda maior atividade osteoblástica, com efeito anabólico sobre o sistema esquelético, atuando, dentre outras formas, no metabolismo ósseo (BERNICK; ERSHOFF, 1963; ERIKSEN et al., 1988; GUYTON; HALL, 1998). De especial interesse neste trabalho, destacam-se as interações com os processos de remodelação óssea.

Osteoblastos e osteoclastos são os principais efetores na remodelação óssea, produzindo o tecido osteóide, futura matriz a ser mineralizada e posteriormente reabsorvida. Do balanço entre esses dois processos, resulta o estado de homeostasia do osso em determinado momento (GASS; KAPLAN, 1987; HAGEL-BRADWAY; DZIAK, 1989; MEGHJI, 1992).

Para manter sua estrutura mecânica e a regulação da homeostase mineral, o osso altera-se constantemente em resposta a estímulos como o crescimento, estresse mecânico e regulação hormonal. O metabolismo ósseo, em resposta à atuação de fatores locais e sistêmicos, envolve uma interação dos processos fisiológicos de formação e reabsorção. Em estados patológicos ocorre um desequilíbrio, prevalecendo um dos processos. As células ósseas são mediadas, dentre outros fatores, por hormônios como a calcitonina, paratormônio e hormônios sexuais, a exemplo do estrogênio (GASS; KAPLAN, 1987; HAGEL-BRADWAY; DZIAK, 1989; MEGHJI, 1992).

De acordo com Garnero e Delmas, em 1999, a deficiência de hormônios sexuais é, sem dúvida, o fator mais importante que influencia a perda óssea. Este papel central na patogênese da perda óssea no período pós-menopausa está fortemente suportado pela maior prevalência de osteoporose em mulheres do que em homens, a existência de uma íntima relação entre níveis de estrógeno e taxas de perda óssea (SLEMENDA et al., 1987) e o efeito protetor da perda óssea por meio de reposição hormonal (GORDAN et al., 1973; KANIS et al., 1992).

O mecanismo pelo qual o estrógeno previne a perda óssea está principalmente relacionado com a sua habilidade de bloquear a reabsorção, apesar de

que ainda pode haver uma contribuição pela estimulação da formação óssea (BAIN et al., 1993; CHOW et al., 1992). A inibição da reabsorção óssea, estrógeno-dependente, ocorre devido a dois fatores: diminuição da osteoclastogênese e diminuição da atividade reabsortiva de osteoclastos maduros. O ataque dos osteoclastos à matriz, via ligantes tais como as integrinas, resulta em um compartimento extracelular selado, que é acidificado nas vilosidades da sua membrana. Enzimas lisossômicas são secretadas neste ambiente ácido, ocorrendo então a degradação da fase orgânica da matriz óssea. A complexa regulação da função do osteoclasto é mediada por vários fatores, incluindo a família do fator de crescimento transformante- β (TGF- β), outros fatores de crescimento e hormônios esteróides, tendo o estrógeno merecido destaque (HARRIS et al., 1996).

O mecanismo de ação do estrógeno ainda é controverso. A descoberta de receptores de estrogênio em osteoblastos, células osteoprogenitoras, e osteoclastos maduros sugerem que pode haver um efeito direto desse hormônio sobre o osso e medula (OURSLER et al., 1996). No entanto, não está esclarecido quais destas células são primeiramente atingidas pelo estrógeno *in vivo*. Existem evidências de que o estrógeno pode mediar efeitos indiretos por meio de estimulação da liberação de fatores de crescimento, tais como TGF- β (que tem demonstrado, em condições experimentais específicas, ter um efeito de diminuição da atividade reabsortiva e recrutamento de osteoclastos) e/ou por meio da inibição da secreção de potentes citocinas de reabsorção óssea, tais como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 β (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF) (GARNERO; DELMAS, 1999).

Diversos estudos têm mostrado que a menopausa, natural ou cirúrgica,

está associada com aumento da produção de IL-1 e TNF a partir de monócitos do sangue periférico e medula óssea (MCKANE et al., 1994; PACIFICI et al., 1993). A cultura de monócitos de mulheres no período pós-menopausa demonstrou maior atividade de reabsorção óssea *in vitro* comparada à cultura de monócitos de mulheres no período pré-menopausa ou pós-menopausa tratadas com estrógeno, sugerindo uma conexão direta entre produção monocítica aumentada de citocinas e aumento da reabsorção óssea no período pós-menopausa (COHEN-SOLAL et al., 1993).

Além disso, o estrógeno ainda tem efeitos diretos sobre osteoclastos, podendo promover sua apoptose. Por outro lado, a deficiência de estrógeno aumenta a produção de prostaglandina da série E *in vivo* (GARNERO; DELMAS, 1999). Esta citocina, por sua vez, é um potente estimulador da atividade osteoclástica.

Estudos histomorfométricos de biópsias da crista ilíaca sugerem que a perda óssea no período pós-menopausa é devida a uma alteração no balanço entre reabsorção e formação óssea na unidade de remodelação (por meio de um aumento da atividade de osteoclastos e/ou diminuição da atividade de osteoblastos) e devida a um aumento na frequência de ativação de unidades de remodelação por unidade de tempo e espaço. Desta forma, a remodelação óssea geral está aumentada devida à deficiência de estrógeno (EBELING et al., 1993).

2.2.3 Deficiência de estrógeno e reparo de feridas ósseas.

Na tentativa de simular a deficiência de estrógeno no período pós-menopausa em humanas, muitos estudos têm utilizado modelo de animais ovariectomizados, para demonstrar que existe uma influência negativa da deficiência de estrógeno no tecido ósseo ao redor de implantes inseridos nesses animais. O efeito deletério parece resultar em menor área de contato metal-osso, quantidade e qualidade óssea ao redor de implantes bem como menor resistência ao torque de remoção (DUARTE et al., 2003; LUGERO et al., 2000; YAMAZAKI et al., 1999).

Diversos estudos em ratas ovariectomizadas têm sido realizados com o intuito de elucidar o efeito do estrogênio sobre a capacidade de reparo ósseo em alvéolos de extração dentária (HSIEH et al., 1995; LI; NISHIMURA, 1994; SALOMÃO et al., 1974). Estes estudos constataram um atraso no processo de reparo, caracterizado pelo retardo tanto na proliferação celular quanto na formação da matriz orgânica e na mineralização.

Estudos que examinaram o processo de reparo de fraturas em osso osteoporótico são limitados. Namkung-Matthai et al., em 2001, produziram um modelo de rata osteoporótica por meio de ovariectomia (“ovx”) e manutenção de dieta pobre em cálcio para avaliar a influência da osteoporose no reparo de fraturas. A formação e resistência do calo ósseo foram monitoradas por um período de 3 semanas por avaliação histológica e biomecânica. Dados coletados simultaneamente de um grupo de ratas submetidas à simulação do procedimento de ovariectomia (“sham”)

foram utilizados para comparação. Uma redução de 40% na área da fratura referente ao calo e uma redução de 23% na densidade óssea mineral no fêmur cicatrizado das ratas “ovx” foram observadas no 21º dia após a fratura, quando comparadas ao grupo “sham” ($p < 0.01$). Dados biomecânicos do fêmur cicatrizado das ratas “ovx” revelaram uma diminuição de cinco vezes na energia requerida para fraturar o calo ósseo na área da fratura, de três vezes no pico de carga, de duas vezes na dureza e de três vezes no estresse quando comparado ao grupo “sham” ($p < 0.01$). A análise histomorfológica revelou um atraso na cicatrização do calo ósseo, com pobre desenvolvimento de osso maduro nas ratas “ovx”. Este estudo demonstrou evidências físicas do reparo alterado em áreas de fratura em osso osteoporótico, que podem ter importantes implicações na avaliação dos efeitos de novos tratamentos para osteoporose no reparo de fraturas.

A influência da idade e da ovariectomia no reparo de fraturas de fêmur foi estudado por Meyer Junior et al., em 2001. Para o estudo foram utilizadas ratas fêmeas de 8, 32 e 50 semanas de idade quando realizada a fratura. Nos dois grupos de ratas mais velhas, cirurgia de ovariectomia (“ovx”) ou simulação de ovariectomia, com acesso cirúrgico sem a remoção dos ovários (“sham”), foi realizada às 26 semanas de idade e o grupo mais jovem serviu como controle. Na fratura, todas as ratas receberam um pino intramedular unilateral em um fêmur e uma fratura. Cargas de rigidez e de fratura aplicadas ao fêmur foram avaliadas em tempos de até 24 semanas após a fratura. A densidade óssea mineral foi mensurada por absorciometria. Os autores concluíram que tanto a ovariectomia quanto a idade, prejudicam o processo de reparo de fraturas.

Embora esteja bem estabelecida a influência negativa da deficiência de estrógeno no processo de remodelação do tecido ósseo em animais ovariectomizados, não encontramos relatos dos efeitos deletérios dessa deficiência sobre a incorporação e remodelação de enxertos ósseos.

2.3 Caracterização do rato como modelo experimental.

Um modelo animal de perda óssea no período pós-menopausa pode ser definido como um animal no qual podem ser estudadas as características da perda óssea espontânea ou induzida devido à deficiência do hormônio ovariano, e no qual essas características de perda óssea e suas seqüelas assemelhem-se às encontradas em mulheres no período pós-menopausa (KALU, 1991).

O conhecimento do grau de semelhança e diferença morfofisiológica entre o homem e a espécie animal escolhida, consiste no primeiro passo para a correta extrapolação dos dados obtidos na experimentação para a clínica. Observa-se, na literatura, uma preferência dos autores pelo rato como modelo experimental na avaliação das conseqüências ósseas relativas à deficiência de estrógeno. Além do baixo custo do animal, alguns aspectos que elegem roedores como modelo animal são:

- Tanto o ser humano do sexo feminino quanto pequenos roedores possuem ovulação espontânea, com interações hormonais semelhantes. Nas ratas, ocorrem as mesmas interações dos hormônios ovarianos sob a regulação da hipófise. Nestes animais, as alterações cíclicas são denominadas de ciclo estral, que dura em

torno de 5 dias, constituindo-se de 4 períodos: 1) diestro, com duração de 68 horas, 2) proestro, com ação visível do estrogênio sobre o epitélio vaginal, com duração de 12 horas, 3) estro, período que dura 24 horas, no qual a fêmea aceita a cópula e 4) metaestro, correspondendo a 12 horas de fase luteinizante (MONTES; LUQUE, 1988).

- Tanto nas ratas quanto nas mulheres, os ciclos iniciam-se irregulares, atingem uma certa regularidade e tornam-se novamente irregulares em idades mais avançadas. A idade exata em que isso ocorre nos roedores varia conforme a espécie, condições da colônia de origem, quantidade de filhotes e de animal para animal (GASS; KAPLAN, 1987).

- A remoção dos ovários de ratas, procedimento denominado de ovariectomia ou ooforectomia, leva a uma cascata de alterações patofisiológicas, semelhante à que ocorre na mulher (GASS; KAPLAN, 1987).

A perda óssea trabecular ocorre rapidamente em resposta à deficiência de estrogênio tanto em mulheres quanto em roedores. O rato como modelo animal para osteoporose apresenta semelhanças dessa patologia óssea em relação a mulheres na menopausa. A deficiência dos hormônios ovarianos resulta em perda de massa óssea, principalmente no osso trabecular. Essas similaridades indicam que o modelo do rato pode ser adequado, porém não idêntico, para elucidar o mecanismo do estrogênio sobre o metabolismo e remodelação óssea (TURNER et al., 1988).

Os efeitos deletérios da menopausa no osso geralmente estão associados à perda óssea decorrente do processo de envelhecimento. Neste aspecto, o rato como modelo revela-se interessante por produzir quantidades consideráveis de estrógeno com a idade, permanecendo com equilíbrio ósseo por grande parte de sua

meia vida, com perda óssea ocorrendo somente no animal bem mais velho. Conseqüentemente, a rata adulta ovariectomizada pode ser usada para buscar os fatores etiológicos envolvidos na patogênese da perda óssea decorrente, especificamente, da deficiência ovariana, desvinculados de outros fatores relacionados com a idade (COTCHIN; ROE, 1967; GASS; KAPLAN, 1987).

Os resultados do trabalho de Wronsky et al., em 1988a, e de outros realizados pelo mesmo autor e colaboradores (WRONSKI et al., 1988b; 1989), revelam muitas similaridades quantitativas existentes entre os efeitos da deficiência de estrogênio e do tratamento hormonal em ratas e humanos, sugerindo que o modelo animal de ovariectomia utilizando-se o rato deve ser útil para avaliações iniciais de tratamentos ou processos fisiológicos no tecido ósseo.

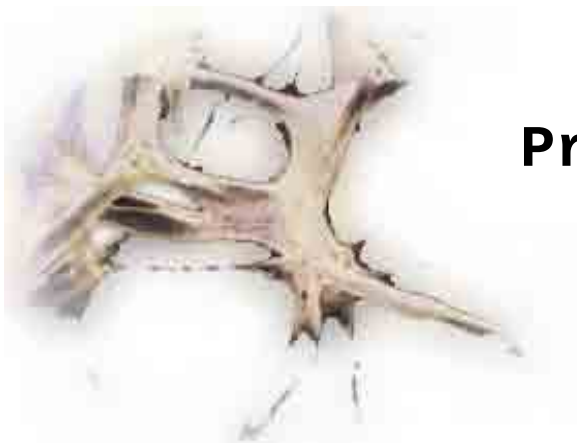
O tipo e o grau de resposta hormonal é influenciado, principalmente, pela espécie e idade do animal utilizado na experimentação (COTCHIN; ROE, 1967). Existem controvérsias quanto à definição da idade, diferindo em dias e até meses na designação de animais jovens, maduros e senis. A idade de ratas utilizadas para estudar a perda óssea decorrente de ovariectomia varia entre 3 a 24 meses (IBBOTSON et al., 1989). O uso de ratas de 3 meses é prejudicado pelo acentuado processo de modelação, remodelação e crescimento esquelético que está ocorrendo neste período. Ratas de 24 meses estão próximas da fase anovulatória e apresenta um aumento na incidência de doenças decorrentes da idade (LU et al., 1979). Desta forma, a idade apropriada se enquadra entre esses dois extremos.

Kalu, em 1991, designaram os modelos baseados em ratas de 3 meses como modelo de rata madura. O termo maduro foi utilizado para enfatizar que estes

animais encontram-se em fase reprodutiva, sexualmente maduros, sendo capazes de responder apropriadamente à deficiência do hormônio sexual e às seqüelas decorrentes da ovariectomia. Pela facilidade de obtenção e pela similaridade das características da perda óssea, ratas nesta idade são amplamente utilizadas para estudar a deficiência do hormônio ovariano.

No entanto, Kalu et al., em 1989, apresentaram um modelo de “aged rat” para o estudo da perda óssea devido à deficiência de hormônio ovariano. Segundo os autores, dois fortes motivos levaram à busca da idade adequada para este fim, que são: 1º) para assegurar que o animal apresente-se esquelotalmente maduro, visto que a perda óssea no período pós-menopausa em humanos inicia-se após a obtenção da maturidade esquelética, e 2º) para assegurar que a perda óssea induzida pela ovariectomia não seja afetada por doenças ou perda óssea específica da idade. Neste estudo, foi realizada a caracterização do padrão de crescimento ósseo em ratas fêmeas *Wistar*. As ratas entre 1 e 3 meses de idade apresentaram uma rápida taxa de aumento no comprimento, peso, densidade e conteúdo de cálcio do fêmur, sendo que, subsequente, a taxa de aumento foi mais gradual até os 6 meses. A partir dos 6 meses, mudanças na densidade de cálcio do fêmur foram mínimas, ao passo que aos 12 meses, todos os parâmetros ósseos medidos haviam alcançado níveis estáveis, com nenhuma mudança significativa até os 24 meses de idade. Com base nestes resultados, os autores concluíram que a idade de 12 meses seria a mais adequada para o modelo de “aged rat”. Este modelo foi chamado de “aged” não pelo fato dos animais serem senis, mas devido às suas características esqueléticas estarem estabilizadas em nível próximo dos animais mais velhos. Segundo os autores, visto que as características do fêmur

estão estáveis de 6 a 24 meses de idade, o uso de animais de 12 meses assegura que as mudanças esqueléticas observadas, seguidas de ovariectomia no modelo de “aged rat”, são primariamente devido à deficiência do hormônio ovariano, evitando a perda óssea própria da idade, além de evitar o crescimento ósseo acelerado que ocorre em animais jovens.



Proposição



3 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio da análise histológica, a influência da ovariectomia (depleção de estrógeno) no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco, na mandíbula de ratas adultas.



Material e Método



2 Material e Método

Previamente à realização do experimento, o Projeto de Pesquisa com a devida metodologia foi enviado para apreciação e aprovado pelo COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba–UNESP (Anexo A).

Para o presente estudo foram utilizadas 36 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com idade de 12 meses e com peso corporal variando entre 350 a 400 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, onde são criados para fins de ensino e pesquisa. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), com água e ração¹ *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 2 grupos (controle e experimental) de 18 animais cada. As ratas do grupo experimental foram submetidas à cirurgia de ovariectomia, enquanto as ratas do grupo controle foram submetidas à simulação do mesmo procedimento cirúrgico (estresse) sem a remoção dos ovários.

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam anestesia geral intramuscular. Primeiramente foi administrado cloridrato de xilazina² na dose de 0,03ml/100g de peso corporal, com o objetivo de promover um

¹ Mogiana Alimentos S.A.

² Anasedan, AgriBrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP.

relaxamento muscular. Na seqüência, utilizou-se o cloridrato de ketamina³ na dose de 0,07ml/100g de peso corporal, para a obtenção do efeito anestésico.

Transcorridos 30 dias da ovariectomia ou “sham”, todos os animais receberam enxerto ósseo autógeno na mandíbula, tendo como área doadora o osso parietal direito da calvária.

Os animais de cada grupo (controle e experimental) foram divididos em subgrupos de 6 animais, os quais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 7, 14 e 28 dias, após a realização do enxerto ósseo.

4.1 Procedimento cirúrgico para realização da ovariectomia

4.1.1 Ovariectomia

Após a anestesia, foi realizada a tricotomia na região ventre-lateral direita e esquerda, e anti-sepsia vigorosa da área com solução de digluconato de clorexidina a 0,2%⁴ (Figura 1).

Após o isolamento da área cirúrgica, com campo cirúrgico especialmente desenvolvido para este fim, com auxílio de lâmina de bisturi nº 15⁵ montada em cabo Bard Parker nº 3, incisões bilaterais de aproximadamente 1cm foram realizadas no sentido transversal ao longo eixo do corpo do animal e distanciando em torno de 3cm da linha dorsal. Seguida à incisão da pele, foi realizada divulsão da

³ Dopalen, AgriBrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP.

⁴ Farmácia Específica, Bauru, SP.

⁵ EMBRAMAC International, Itapira, SP.

musculatura subjacente, para se obter acesso à cavidade abdominal (Figura 2). Subseqüentemente, os ovários direito e esquerdo foram localizados, tracionados (Figura 3) e, com auxílio de tesoura Goldman Fox, foram removidos juntamente com pequenos segmentos de trompa uterina a fim de assegurar a total remoção do tecido ovariano (Figura 4). Uma vez removidos os ovários, foram realizadas suturas em plano profundo com fio 5-0 de poliglactina 910⁶ e da pele com fio de seda preta 4-0⁷ (Figura 5).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina⁸ (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Decorridos 7 dias de pós-operatório, o sucesso da ovariectomia foi confirmado por meio da verificação da ausência do ciclo estral das ratas, de acordo com Montes e Luque (1988), enquanto análise confirmou o ciclo estral das ratas do grupo controle. Para isso, foi realizada a coleta da secreção vaginal das ratas diariamente, durante 15 dias, seguido da análise microscópica imediata do material coletado (citologia esfoliativa).

4.1.2 Simulação da ovariectomia

As ratas do grupo controle foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico descrito anteriormente, porém sem a remoção dos ovários, simulando as

⁶ Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, S. J. dos Campos, SP.

⁷ Ethicon, Johnson & Johnson, S. J. dos Campos, SP.

⁸ Pentabiótico Veterinário, Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, SP.

mesmas condições de estresse do organismo durante o ato cirúrgico e no pós-operatório.



FIGURA 1- Tricotomia bilateral ao ventre.



FIGURA 2- Acesso ao ovário.



FIGURA 3- Procedimento de ovariectomia.



FIGURA 4- Ovário removido.



FIGURA 5- Sutura externa.

4.2 Procedimento operatório de enxerto ósseo autógeno em bloco

No 31º dia após a cirurgia de ovariectomia ou “sham”, as ratas apresentavam-se preparadas para o início do experimento envolvendo o enxerto ósseo.

A metodologia empregada para realização do enxerto autógeno na mandíbula dos animais foi baseada na descrição de Jardini, em 2001.

Após anestesia, foi realizada tricotomia das regiões temporal e parotídeo-massetérica direita, bem como da região fronto-parietal, seguida de uma vigorosa anti-sepsia com solução de digluconato de clorexidina a 0,2% destas áreas (Figura 6).

4.2.1 Preparo do leito receptor

Após o isolamento da área cirúrgica (Figura 7), com lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo Bard Parker nº 3, foi realizada uma incisão linear na pele, na região do ângulo da mandíbula do lado direito, paralela ao processo zigomático, permitindo a visualização do músculo masseter (Figura 8). Este, com auxílio de uma tesoura de ponta romba, foi divulsionado até atingir a tábua óssea mandibular (Figura 9). O perióstio do lado medial da mandíbula, juntamente com o músculo pterigóideo medial, foi descolado com auxílio de uma espátula do tipo Hollembach 3S (Figura 10). A região foi raspada superficialmente, com auxílio do Hollembach 3S, para assegurar a completa remoção do perióstio (Figura 11). O osso da mandíbula pôde ser mantido

exposto utilizando-se de instrumentos especialmente desenvolvidos, a fim de permitir a visualização e manter o acesso à área receptora (Figura 12).



FIGURA 6- Anti-sepsia do campo operatório.



FIGURA 7- Isolamento da área cirúrgica.



FIGURA 8- Incisão linear na pele, expondo o músculo masseter.



FIGURA 9- Divulsão do músculo masseter.



FIGURA 10- Acesso à porção medial da mandíbula.



FIGURA 11- Raspagem do leito receptor, com espátula Hollemback.



FIGURA 12- Osso mandibular exposto.

4.2.2 Obtenção do enxerto ósseo

Com auxílio de lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo Bard Parker nº 3, foi realizada uma incisão em formato de meia-lua, no tegumento de revestimento do crânio (Figura 13). Em seguida, com espátula do tipo Molt 2-4, o retalho de espessura total foi elevado, expondo amplamente a cortical óssea da região (Figura 14).

Com uma trefina cirúrgica⁹, com diâmetro interno de 3,8mm montada em um motor elétrico cirúrgico¹⁰, com velocidade constante de 800 rotações por minuto, e sob irrigação contínua e abundante com solução fisiológica (Figura 15), foi retirado o bloco ósseo da região parietal direita, abrangendo toda a espessura da díploie (Figura 16). O bloco ósseo foi armazenado temporariamente em uma cuba contendo soro fisiológico estéril.

Em seguida, os retalhos de tegumento foram reposicionados juntamente com o periósteo e suturados com fio de seda preta 4-0 (Figura 17).

⁹ Prudent, Lins, SP.

¹⁰ modelo BLM 600 *plus*, VK Driller Equipamentos Elétricos, São Paulo, SP.



FIGURA 13- Incisão em meia-lua no tegumento de revestimento do crânio.



FIGURA 14- Exposição do osso parietal.

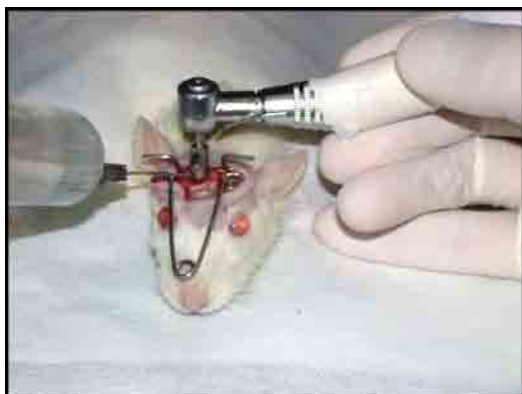


FIGURA 15- Osteotomia para remoção do bloco ósseo com trefina cirúrgica.



FIGURA 16- Remoção do bloco



FIGURA 17- Sutura do

4.2.3 Fixação do enxerto ósseo

Após a remoção, com auxílio de uma broca carbide $\frac{1}{2}$ ¹¹ adaptada ao mesmo motor já citado anteriormente e sob irrigação contínua e abundante com solução fisiológica, foi realizada uma perfuração na região central do enxerto ósseo (Figura 18). O mesmo foi novamente armazenado em uma cuba contendo soro fisiológico estéril.

Da mesma maneira, a área receptora recebeu uma perfuração na proximidade do ângulo da mandíbula, distanciando em torno de 3mm da borda inferior (Figura 19). Estas perfurações permitiram a transpassagem de um fio de sutura 5,0 de poliéster verde trançado¹² através do bloco ósseo e da mandíbula (Figura 20). Uma vez atado o nó na borda inferior da mandíbula, o enxerto foi estabilizado, permitindo um íntimo contato entre a superfície óssea mandibular e o enxerto ósseo (Figura 21).

Em ato contínuo à fixação do enxerto ósseo, o músculo masseter foi suturado com fio 5-0 de poliglactina 910 (Figura 22), e a pele com fio de seda preta 4-0 (Figura 23).

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Nas primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração triturada e água *ad libitum*. Após esse período, os animais foram agrupados em número de 5 em gaiolas maiores.

¹¹ Sorensen, São Paulo, SP.

¹² Ethicon, Johnson & Johnson, S. J. dos Campos, SP.

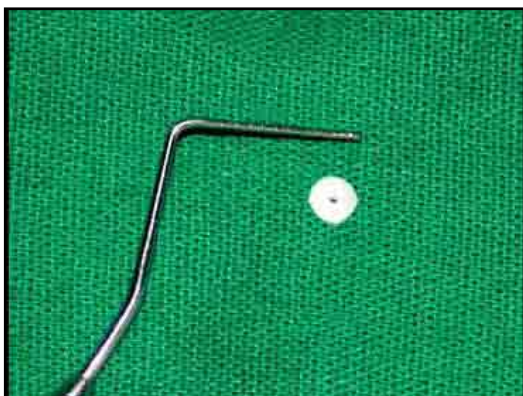


FIGURA 18- Bloco ósseo



FIGURA 19- Perfuração da área



FIGURA 20- Transpassagem do fio pelo bloco e osso mandibular.



FIGURA 21- Bloco ósseo estabilizado na mandíbula.



FIGURA 22- Sutura da musculatura.



FIGURA 23- Sutura externa da pele.

4.3 Eutanásia

Decorridos 7, 14 e 28 dias da realização dos enxertos ósseos, os animais foram submetidos à eutanásia por inalação excessiva de éter etílico. Após a decapitação do animal, o osso da hemi-mandíbula direita foi colhido e dissecado conservando-se uma fina camada do músculo masseter sobrejacente ao enxerto ósseo e parte do músculo pterigóideo medial. Cada espécime foi catalogado e mantido em formalina a 10% tamponada por 48 horas.

4.4 Processamento laboratorial

Após o período de fixação, as peças foram lavadas em água corrente por 24 horas para, em seguida serem submetidas ao processo de descalcificação em solução de etilenodiaminotetracetatodissódico (EDTA) a 18%, por aproximadamente 40 dias, com troca da solução a cada 7 dias. Após a descalcificação, as peças receberam tratamento laboratorial de rotina e foram incluídas em parafina, de maneira a obter cortes com 6 micrometros de espessura. Os cortes histológicos foram realizados no sentido transversal ao plano de justaposição do enxerto ao leito receptor, a partir da borda inferior da mandíbula, abrangendo o enxerto ósseo e o osso da

mandíbula. Foram obtidos cortes semi-seriados, a cada 100 micrometros de distância, por toda a extensão do enxerto.

Os 6 cortes mais centrais, excluindo-se a área da perfuração, foram corados, alternadamente, pelo método de hematoxilina-eosina de Harris e Lison (H.E.), e pelo Tricrômico de Masson (T.M.), para análise histológica microscópica.

4.5 Análise histológica dos resultados

Para a análise histológica, foram utilizados os 6 cortes corados de cada espécime, totalizando 36 cortes para cada tempo de cada grupo.

A análise histológica foi realizada com auxílio de microscópio de luz, visando observar a qualidade do tecido ósseo e/ou conjuntivo formado na interface leito receptor e enxerto ósseo, assim como pelo osso formado na face externa, incluindo as bordas do enxerto ósseo.

Para a obtenção das imagens, foi utilizado Fotomicroscópio Carl Zeiss, acoplado à lente Optovar 1.25x, lente de projeção 3.2x e objetivas planoapocromáticas de 2.5x, 6.3x e 25x, conferindo aumento original das imagens de 10:1, 25:1 e 100:1, respectivamente.

A análise histológica descritiva foi realizada, sistematicamente, avaliando-se os seguintes aspectos histológicos, nos 3 períodos experimentais:

I- Presença de tecido de granulação na interface enxerto-leito receptor e na periferia do enxerto, avaliando-se o nível de organização do coágulo, proliferação fibroblástica e angiogênese.

II- Osteogênese na interface enxerto-leito receptor, avaliando-se o nível da atividade osteogênica e o grau de integração do enxerto.

III- Osteogênese nos espaços medulares do enxerto ósseo, avaliando-se o nível da atividade osteogênica.

IV- Osteogênese na superfície livre do enxerto, avaliando-se o nível da atividade osteogênica.

V- Atividade osteoclástica (reabsorção óssea) na interface enxerto-leito receptor e na face externa do enxerto, incluindo as bordas.



Resultado



5 Resultado

Clinicamente, tanto durante o ato operatório quanto no pós-operatório, não foram observadas quaisquer intercorrências, tais como morte de animais, infecções ou deiscência de sutura que pudesse interferir ou prejudicar os resultados do presente trabalho.

5.1 Análise Histológica Descritiva

A Figura 24 representa a adaptação do enxerto (E) obtido da calvária do animal no leito receptor (LR). Interposta a estas estruturas observa-se uma interface (IN), principal alvo desse estudo. A face externa do enxerto (FE) apresenta-se voltada para a parte superior da figura, recoberta pelo músculo masseter (MM).

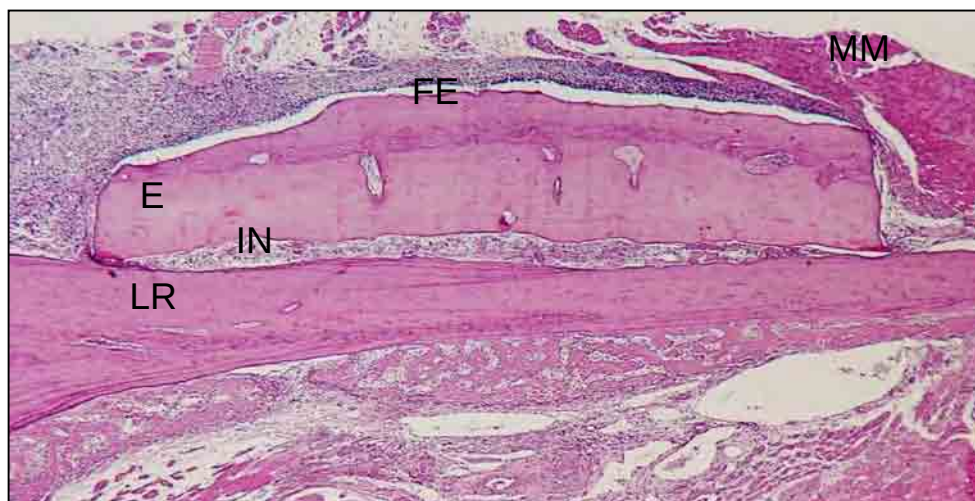


FIGURA 24- Fotomicrografia representativa da adaptação do enxerto ao leito receptor para todos os grupos. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, MM=músculo masseter. Coloração H.E. Aumento original 10:1.

PERÍODO DE 7 DIAS

GRUPO CONTROLE

Observou-se um típico tecido de granulação (TG) envolvendo toda a periferia do enxerto, bem como interposto entre o enxerto e o leito receptor (Figura 25). Este tecido apresentou nítida angiogênese, caracterizada por grande quantidade de capilares sanguíneos (C). Neste período notou-se também grande quantidade de células alongadas de citoplasma e núcleo basófilos, com características de fibroblastos (F), e discreto infiltrado inflamatório neutrofílico ao redor do enxerto.

Remanescentes de coágulo sanguíneo (CO) foram observados nas bordas laterais, adjacentes ao enxerto (Figura 26), e em pequenas áreas da interface enxerto-leito receptor. Nestas áreas, o coágulo apresentou-se bem organizado, evidenciado pela presença de uma rede de fibrina, com migração de células da linhagem fibroblástica, leucócitos (LE) e presença de capilares sanguíneos (Figura 27).

Na porção mais central da interface enxerto-leito receptor, observou-se discreta atividade osteogênica, com a formação de blastemas ósseos (BO) (Figuras 28a), caracterizados pela presença de numerosas e volumosas células com citoplasma basófilo, com morfologia típica de osteoblastos (OB), além de osteócitos entremeados por matriz óssea neoformada (MO) (Figura 29).

A superfície óssea do leito receptor voltada para o enxerto mostrou-se, em algumas áreas, discretamente recoberta por células com características de osteoblastos e discreta síntese de matriz óssea.

As faces livres do enxerto mostraram-se discretamente irregulares, apresentando lacunas de reabsorção, com a presença de poucas células multinucleadas, com morfologia de osteoclastos. Essa atividade osteoclástica apresentou-se mais nítida nas bordas laterais do enxerto.

Os espaços medulares (EM), delimitados pela estrutura díploe do osso enxertado, apresentaram-se preenchidos estritamente por células degeneradas, caracterizadas pelo citoplasma aumentado (edema intracelular) e núcleo extremamente condensado (picnose nuclear) ou núcleo todo fragmentado (cariorexis).

Observou-se, em alguns pontos, o estabelecimento de canais de vascularização, comunicando a superfície externa do enxerto e os espaços medulares. Estes canais já se apresentaram, nesta fase, sendo repovoados por capilares, fibroblastos e células osteoprogenitoras. Além disso, fibras colágenas e pequenos blastemas ósseos puderam ser observados aderidos à face externa do enxerto, principalmente relacionados aos canais de Volkmann (Figura 28b).

Também foram encontradas esquírolas ósseas na interface enxerto-leito receptor e na periferia do enxerto.

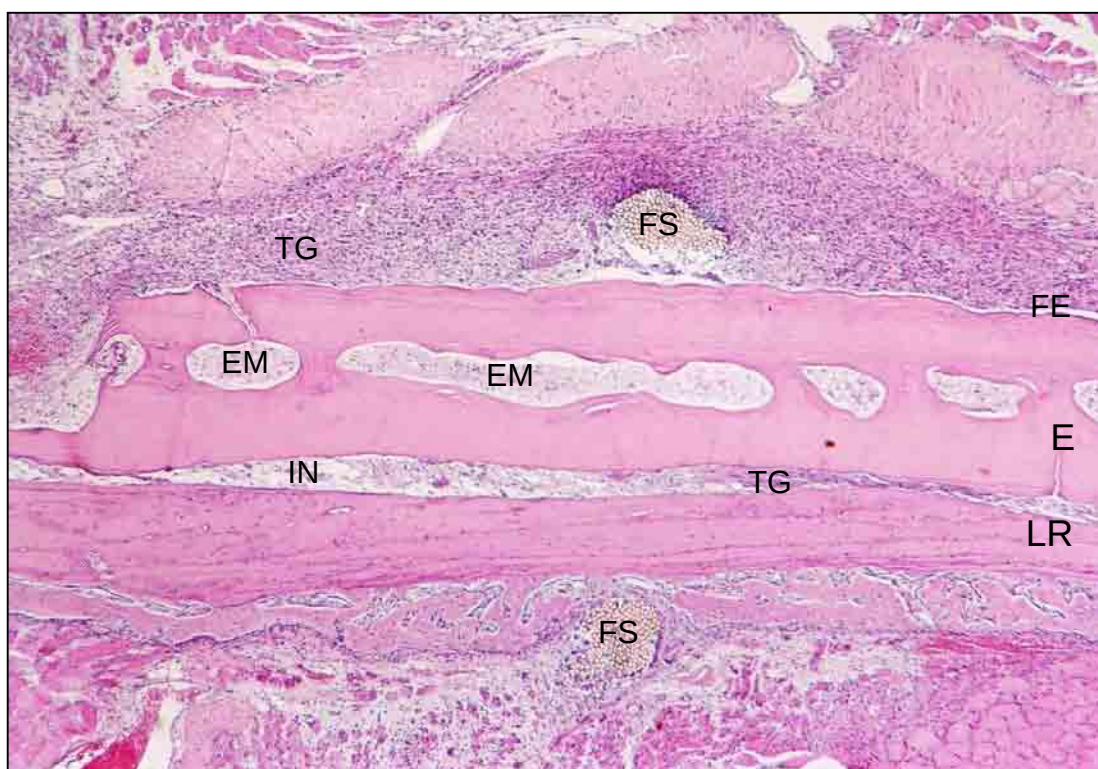


FIGURA 25- Grupo controle (7 dias). Visão panorâmica de um espécime deste grupo. Nota-se tecido de granulação (TG) envolvendo todo o enxerto, bem como na interface entre o enxerto e o leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS= fio de sutura. Coloração H.E. Aumento original 10:1.

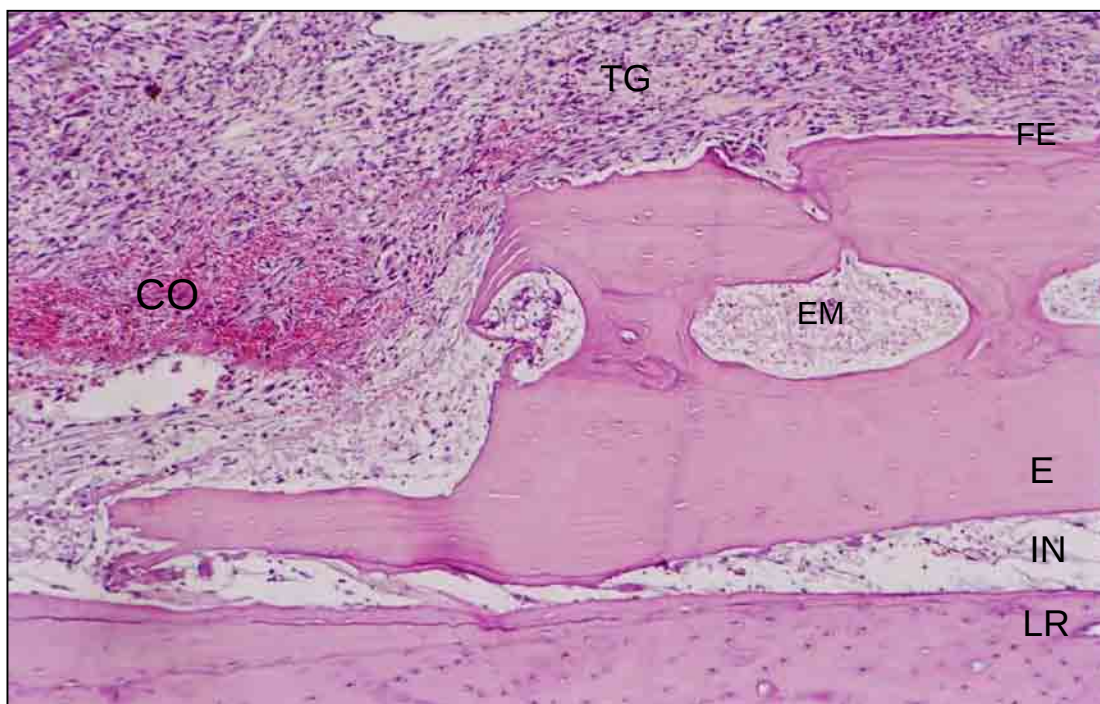


FIGURA 26- Grupo controle (7 dias). Maior aumento da Figura 25. Observa-se a presença de remanescentes de coágulo sanguíneo (CO) lateralmente à borda do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, TG= tecido de granulação. Coloração H.E. Aumento original 25:1.

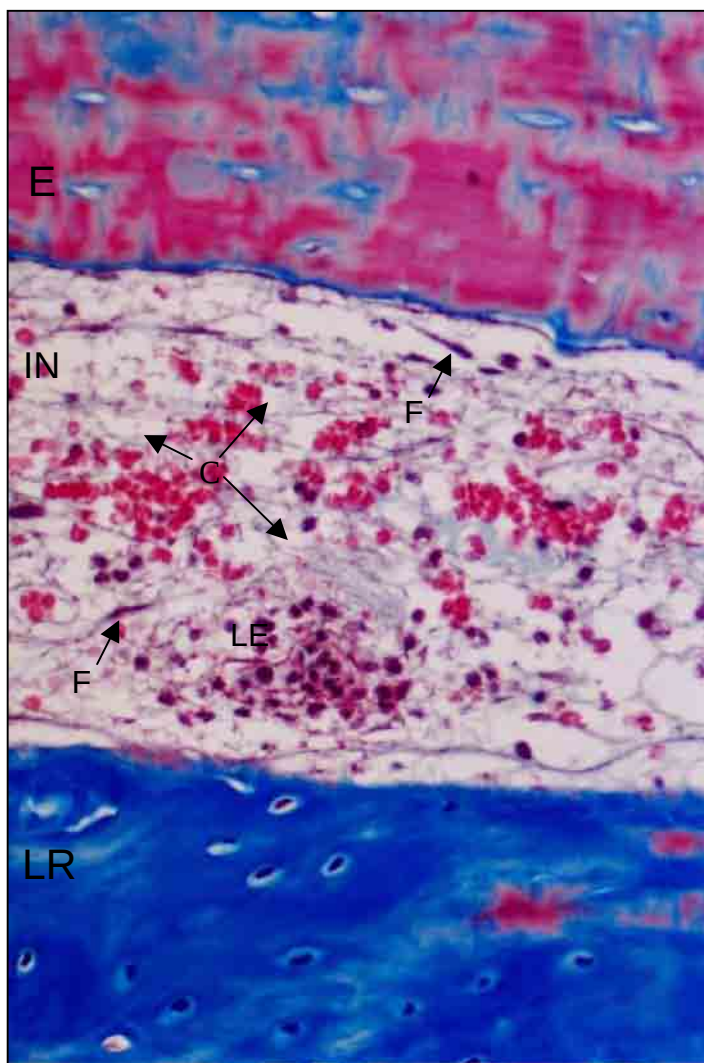


FIGURA 27- Grupo controle (7 dias). Observa-se, na interface, a rede de fibrina com presença de fibroblastos (F), leucócitos (LE) e capilares sanguíneos (C). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1.

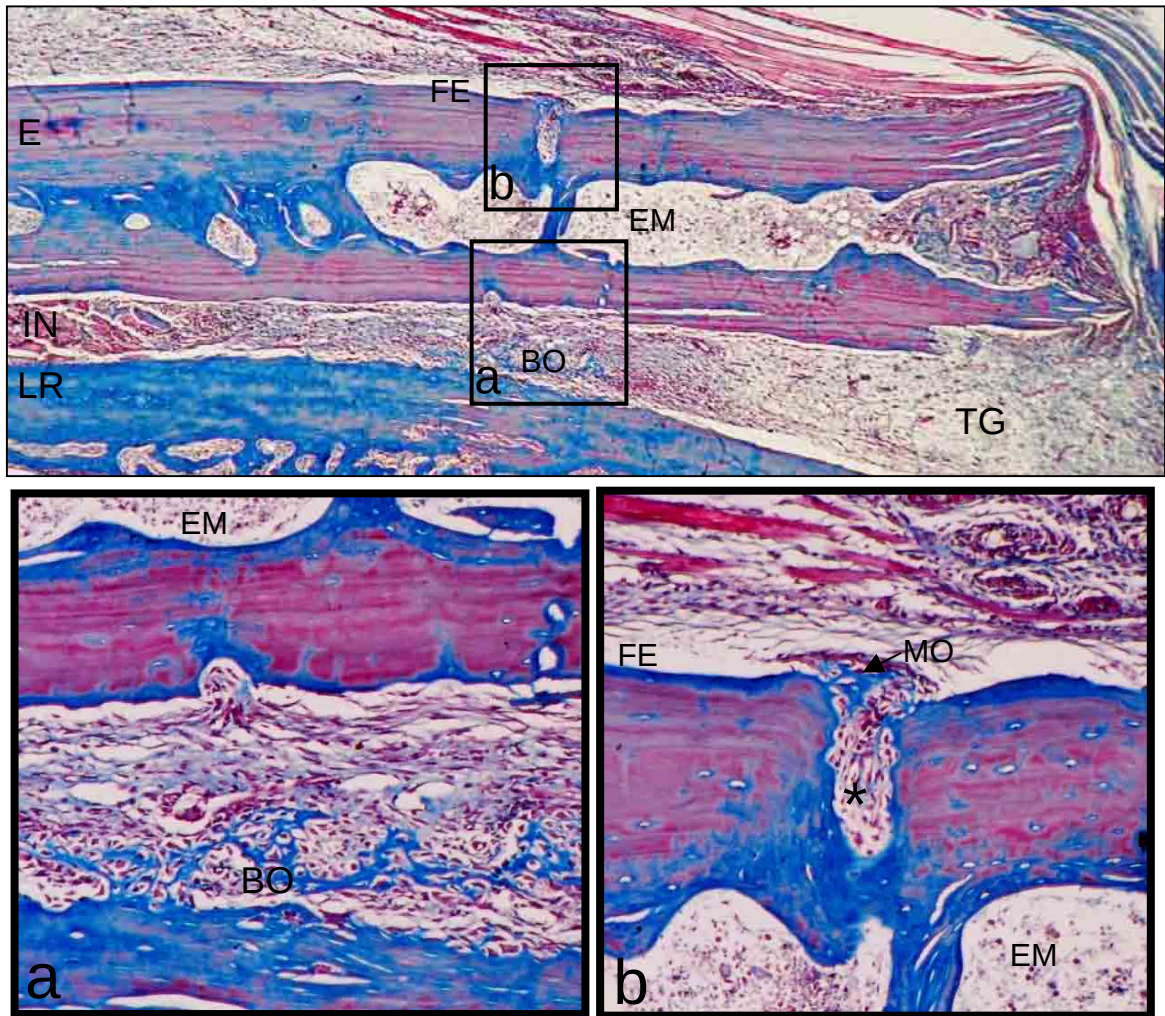


FIGURA 28- Grupo controle (7 dias). Vista panorâmica. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, TG= tecido de granulação. Coloração T.M. Aumento original 10:1. (a) Maior aumento do mesmo espécime. Nota-se a presença de blastemas ósseos (BO) na porção mais central da interface. Coloração T.M. Aumento original 25:1. (b) Maior aumento do mesmo espécime. Matriz óssea neoformada (MO) relacionada ao Canal de Volkmann (*).Coloração T.M. Aumento original 25:1.

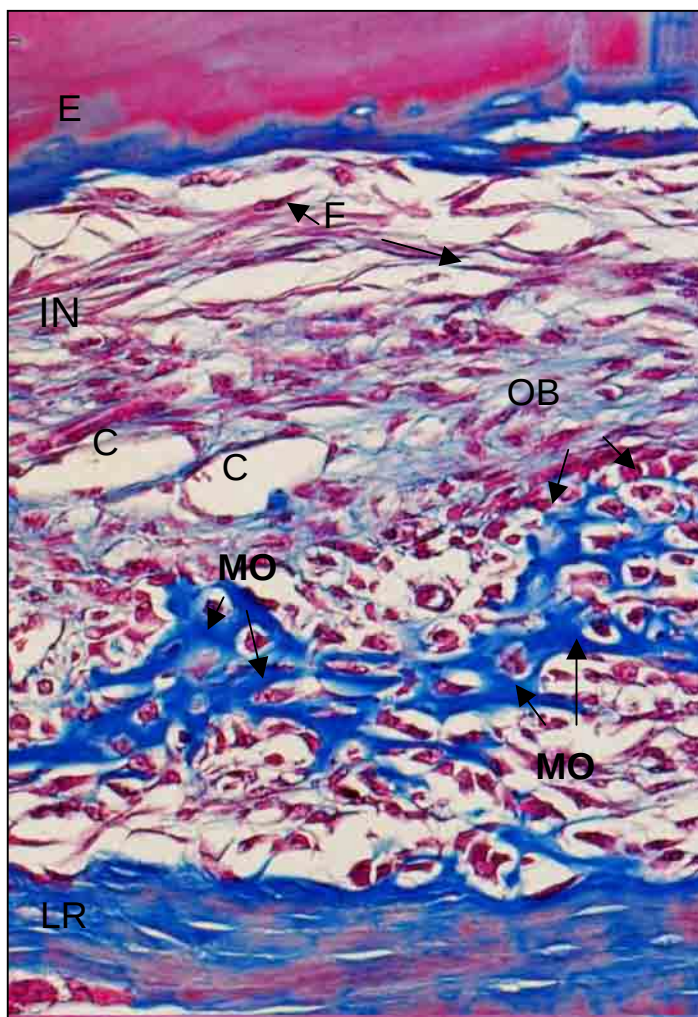


FIGURA 29- Grupo controle (7 dias). Blastema ósseo. Observa-se matriz óssea neoformada (MO) circundada por osteoblastos (OB), além da presença de fibroblastos (F) e capilares (C). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1.

GRUPO EXPERIMENTAL

A periferia do enxerto apresentou-se ocupada por um tecido de granulação em organização (Figura 30), caracterizado pela proliferação fibroblástica e discreta angiogênese. Infiltrado inflamatório neutrofílico com discreta atividade macrofágica e remanescentes de coágulo sanguíneo puderam ser observados nesta área.

Na interface enxerto-leito receptor, também observou-se um tecido de granulação em organização (Figura 30), colonizado por células da linhagem fibroblástica e grande quantidade de capilares sanguíneos. No entanto, entre o leito receptor e o enxerto, verificou-se ainda a presença de coágulo sanguíneo e um tecido de granulação pouco organizado, com quantidade marcante de hemácias, fibroblastos e capilares (Figura 32). Não foi observada atividade osteogênica nesta fase (Figura 30).

Esquírolas ósseas puderam ser encontradas na interface enxerto-leito receptor ou fora dela (Figura 30).

Espaços medulares amplos, delimitados pelas corticais do enxerto, apresentaram-se preenchidos estritamente por células degeneradas. Foram observados, em alguns pontos da superfície óssea do enxerto, o estabelecimento de canais de vascularização com finalidade de comunicar a superfície externa do enxerto e os espaços medulares (Figura 31).

As faces livres do enxerto mostraram-se discretamente irregulares, apresentando lacunas de reabsorção, com a presença de poucos osteoclastos. Essa

atividade osteoclástica apresentou-se mais nítida nas bordas laterais do enxerto (Figura 31).

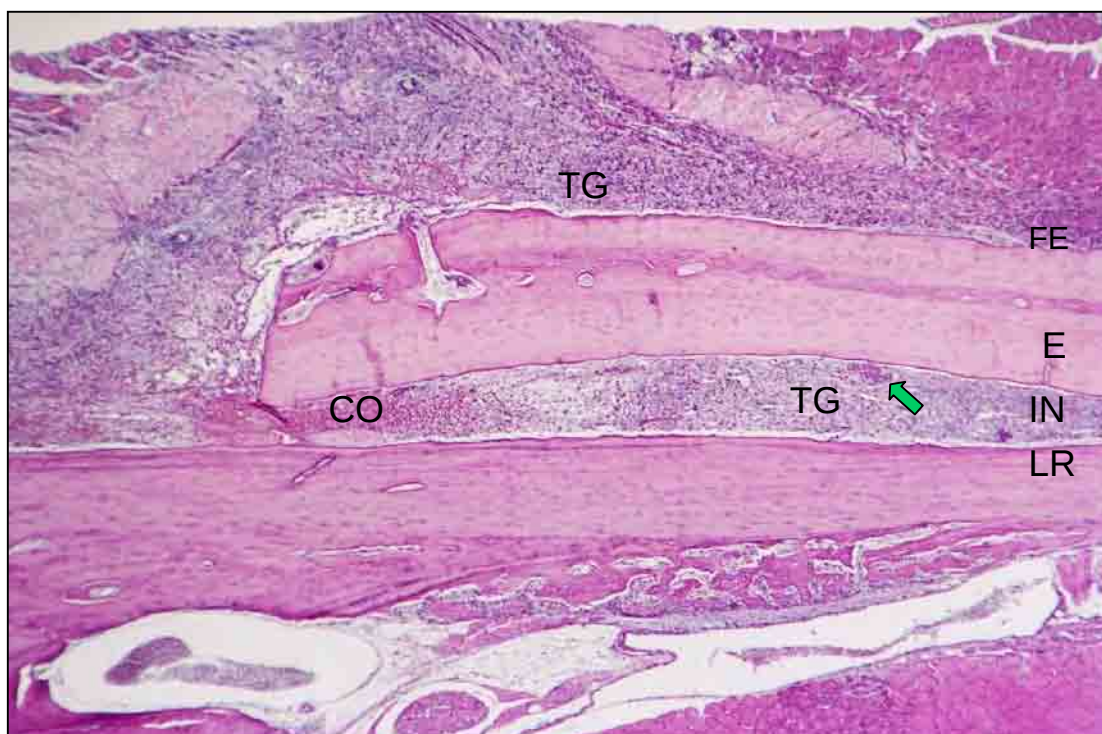


FIGURA 30- Grupo experimental (7 dias). Nota-se a presença de remanescentes de coágulo (CO) na periferia do enxerto e interface. Observa-se a presença de tecido de granulação (TG) na periferia do enxerto e na interface, além de esquirolas ósseas na interface (seta verde). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, TG=tecido de granulação. Coloração T.M. Aumento original 10:1.

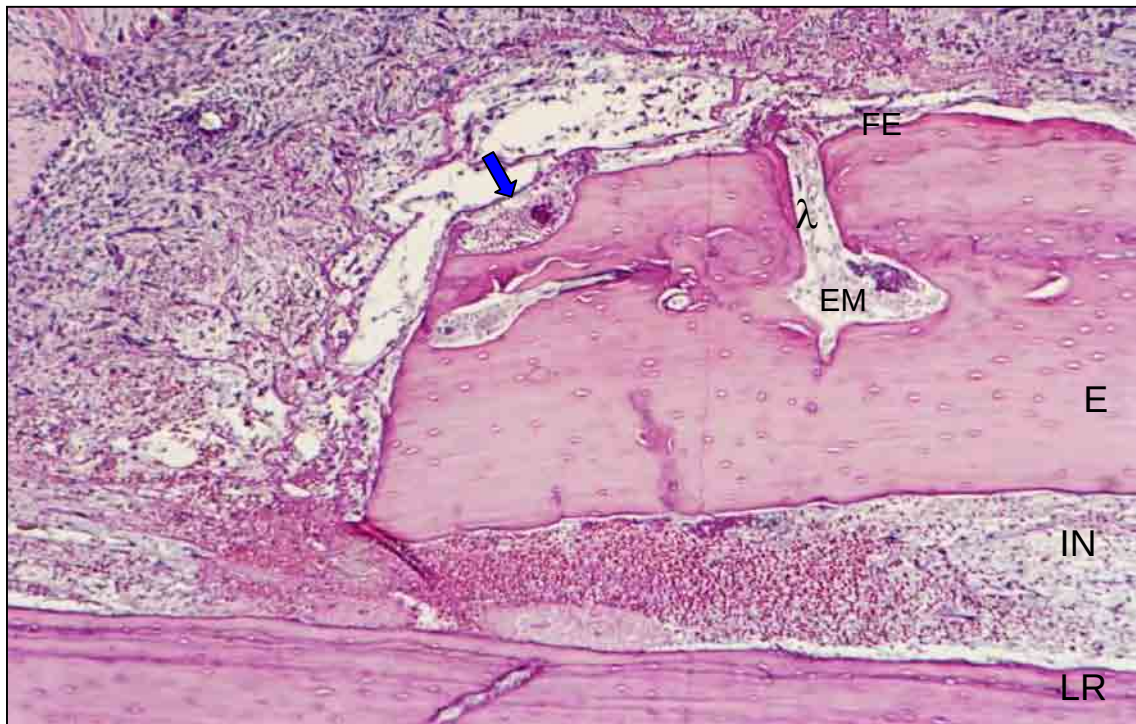


FIGURA 31- Grupo experimental (7 dias). Maior aumento da Figura 30. Observa-se Canal de Volkmann (λ) comunicando a superfície externa e espaço medular, além de lacunas de reabsorção (seta azul) nas bordas do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1.

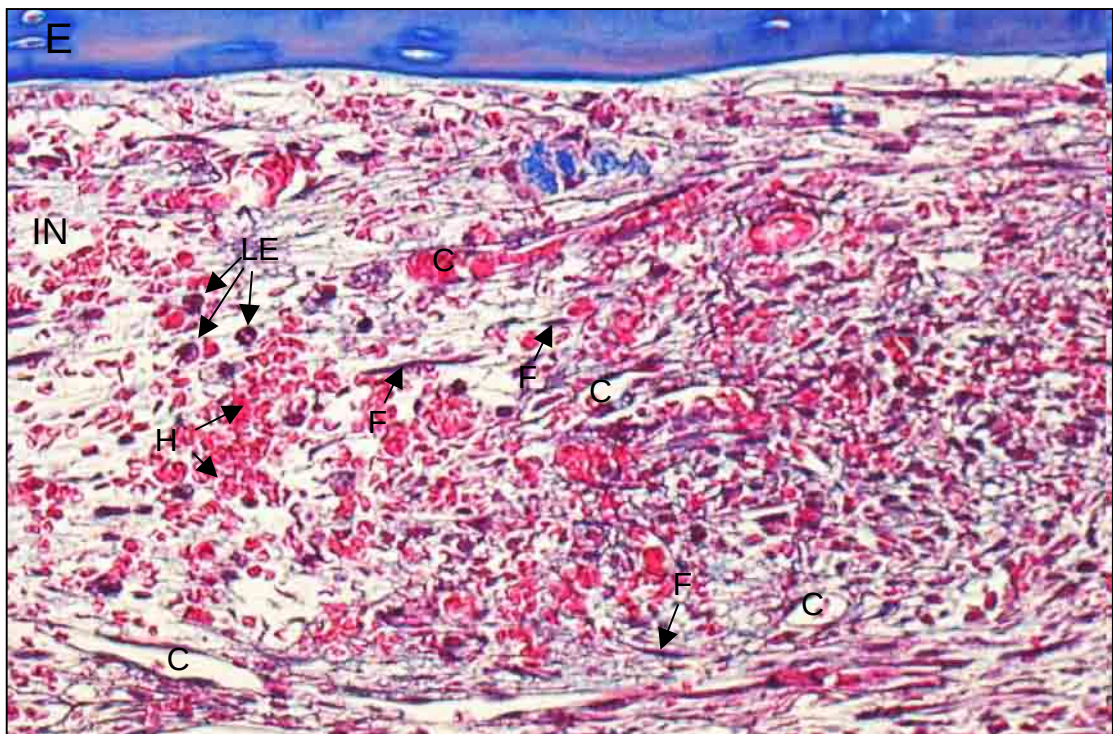


FIGURA 32- Grupo experimental (7 dias). Observa-se, na interface, coágulo sanguíneo imaturo, com presença marcante de hemácias (H), fibroblastos (F), capilares sanguíneos (C) e alguns leucócitos (LE). E=enxerto, IN=interface. Coloração T.M. Aumento original 100:1.

PERÍODO DE 14 DIAS

GRUPO CONTROLE

Esta fase caracterizou-se por apresentar moderada osteogênese na interface enxerto-leito receptor. A interface apresentou-se parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada, estabelecendo uma união do enxerto ao leito receptor (Figura 33). Observou-se a formação de trabéculas ósseas imaturas não-lamelares, contendo numerosos e volumosos osteócitos e circundadas por osteoblastos (Figura 33a).

Nas bordas da interface, ainda foram observados resíduos de tecido de granulação. Nestas áreas, as superfícies ósseas do leito receptor e do enxerto voltadas

para a interface mostraram-se recobertas por osteoblastos com discreta síntese de matriz óssea.

Neste período, moderada osteogênese foi observada na maioria dos espaços medulares do enxerto. Notou-se a presença de uma matriz óssea neoformada preenchendo parcialmente a maioria dos espaços medulares, contendo osteócitos e circundada por numerosos osteoblastos (Figura 33b). Os demais espaços medulares apresentaram-se repovoados por células da linhagem fibroblástica e osteoprogenitoras, além de nítida angiogênese, caracterizada pela presença de grande quantidade de capilares sanguíneos. Não foi verificada a presença de células degeneradas nos espaços medulares.

Na face externa do enxerto também se observou moderada atividade osteogênica, com a formação de matriz óssea contendo osteócitos em estreita faixa sobre a superfície do enxerto (Figura 34). Células achatadas e organizadas paralelamente ao tecido ósseo sugerem a formação de perióstio sobre a face externa do enxerto. Além disso, puderam ser observadas linhas de reversão na superfície livre do enxerto, denotando-se áreas onde a reabsorção cessou e iniciou a neoformação de matriz óssea, com inserção de fibras colágenas ao osso neoformado (Figura 35).

Lacunas de Howship, com osteoclastos presentes, foram observadas nas bordas e na face externa do enxerto, indicando discreta atividade de reabsorção.

Na periferia do enxerto, observou-se ainda remanescentes do tecido de granulação com acentuado nível de organização, tendendo ao fibrosamento.

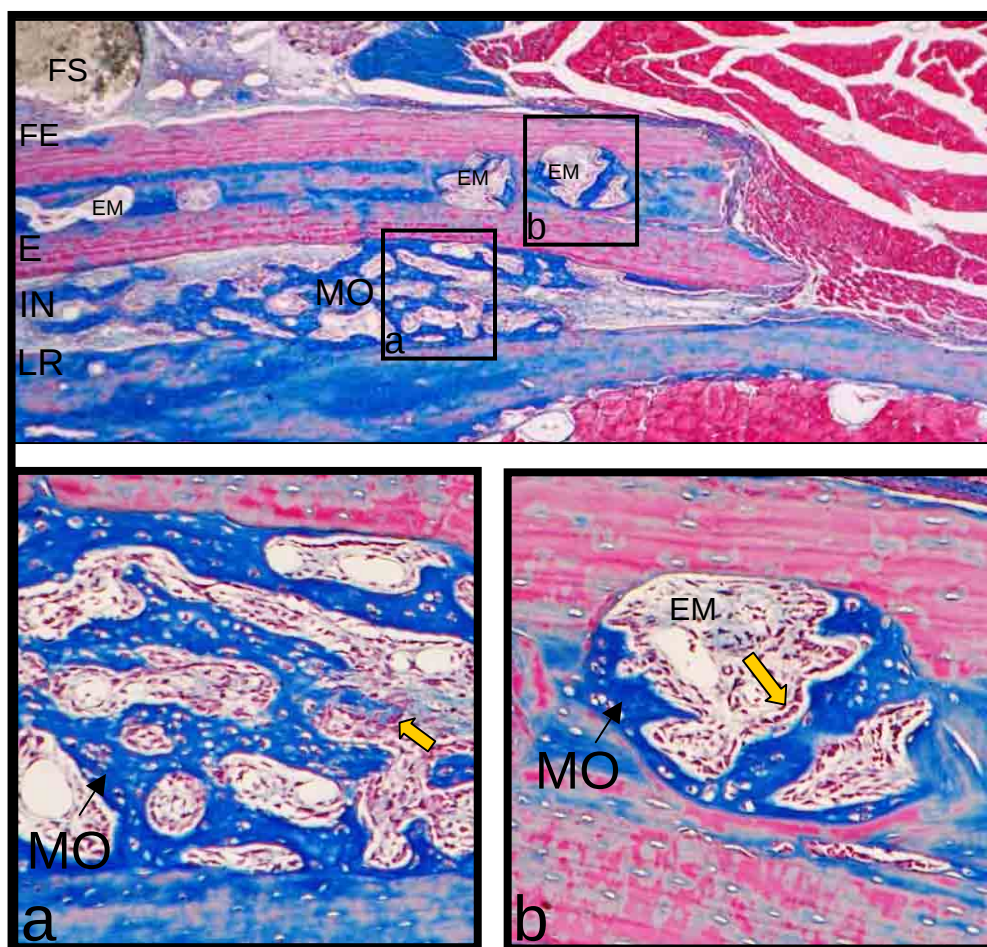


FIGURA 33- Grupo controle (14 dias). Vista panorâmica. Observa-se a interface parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada (MO). E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS=fio de sutura. Coloração T.M. Aumento original 10:1. (a) Maior aumento do mesmo espécime. Trabéculas ósseas imaturas, circundadas por osteoblastos (seta amarela). Coloração T.M. Aumento original 25:1. (b) Maior aumento do mesmo espécime. Matriz óssea, circundada por osteoblastos (seta amarela), preenchendo parcialmente os espaços medulares. Coloração T.M. Aumento original 25:1.

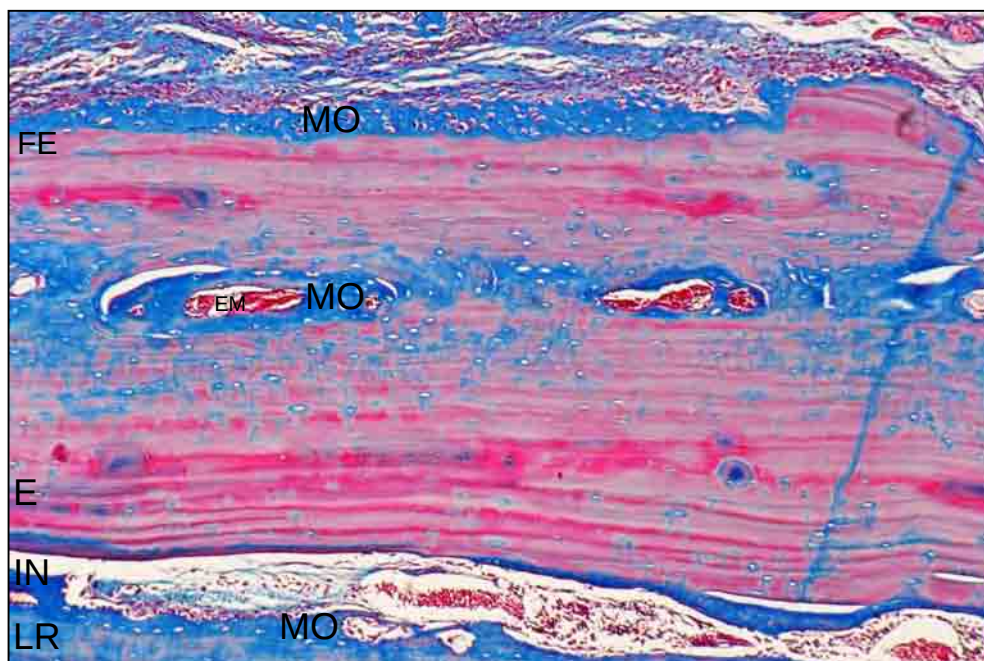


FIGURA 34- Grupo controle (14 dias). Observa-se a face externa do enxerto com estreita faixa de matriz óssea neoformada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração T.M. Aumento original 25:1.

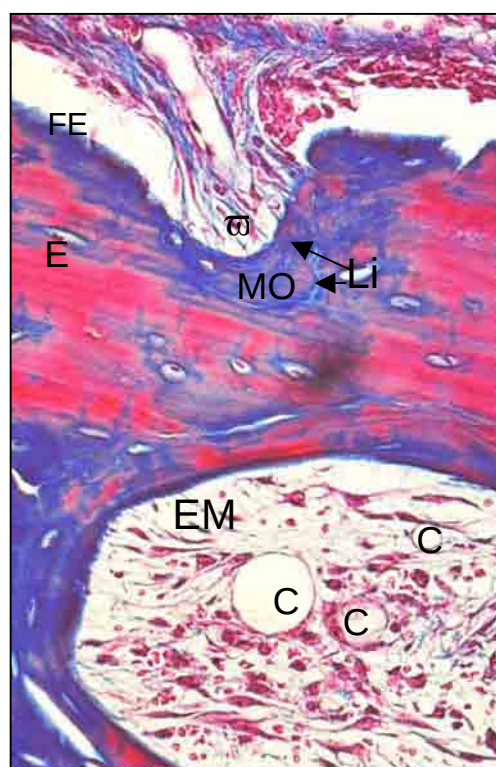


FIGURA 35- Grupo controle (14 dias). Observam-se linhas de reversão (Li) na face externa do enxerto, com inserção de fibras colágenas (ϖ) ao osso neoformado. E=enxerto, FE=face

GRUPO EXPERIMENTAL

A interface enxerto-leito receptor apresentou, nesta fase, discreta atividade osteogênica (Figura 36), com neoformação de matriz óssea circunscrita por osteoblastos em algumas áreas (Figura 37). A maior parte da interface encontrou-se preenchida por um típico tecido de granulação com nítida angiogênese.

Da mesma forma, extensas áreas de tecido de granulação foram observadas na periferia do enxerto (Figura 36).

Grande parte dos espaços medulares encontrou-se parcialmente recolonizados por células da linhagem fibroblástica e células osteoprogenitoras. No entanto, observou-se ainda a persistência de algumas células degeneradas (Figura 38). Poucos espaços medulares apresentaram discreta osteogênese.

A superfície óssea da face externa do enxerto apresentou-se irregular, com atividade osteoclástica em vários pontos, incluindo as bordas laterais, caracterizada pela presença de Lacunas de Howship associadas a células multinucleadas com morfologia típica de osteoclastos.

Osteogênese muito discreta pôde ser observada em pontos isolados da face externa do enxerto (Figura 38).

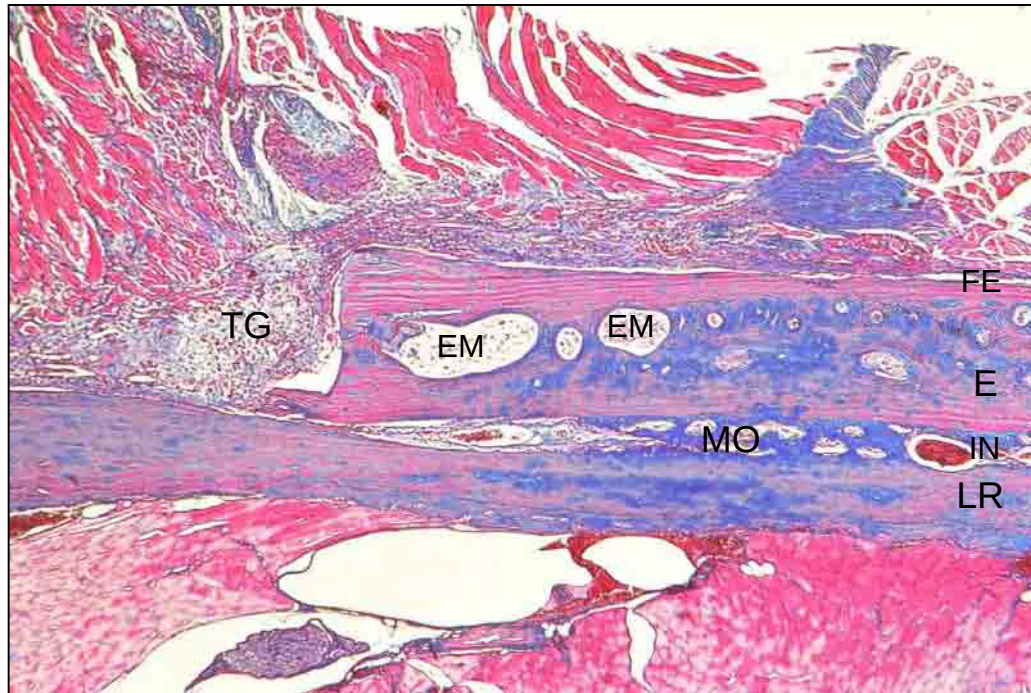


FIGURA 36- Grupo experimental (14 dias). Observa-se discreta atividade osteogênica na interface, com a presença de matriz óssea neoformada (MO) e tecido de granulação (TG) na periferia do enxerto. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face



FIGURA 37- Grupo experimental (14 dias). Maior aumento da Figura 36. Observa-se, na interface, matriz óssea neoformada (MO) circundada por osteoblastos (seta amarela) em algumas áreas. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1.

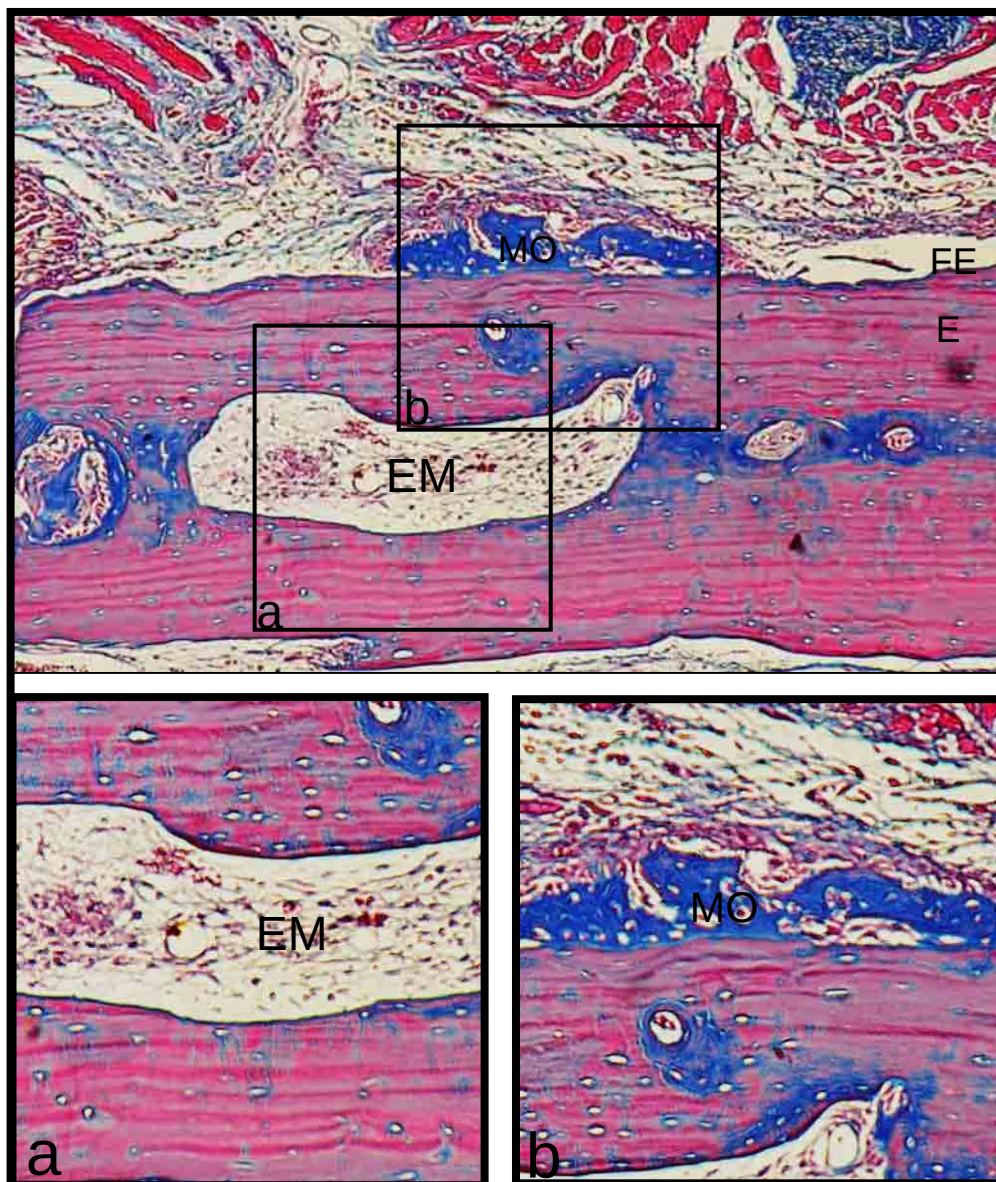


FIGURA 38- Grupo experimental (14 dias). Vista do enxerto. E=enxerto, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração T.M. Aumento original 25:1. (a) Ampliação da imagem superior. Observam-se espaços medulares parcialmente recolonizados por células. Ainda persistem células degeneradas. (b) Ampliação da imagem superior. Osteogênese discreta em pontos isolados da face externa.

PERÍODO DE 28 DIAS

GRUPO CONTROLE

A área correspondente à interface enxerto-leito receptor mostrou, nesta fase, acentuada atividade osteogênica (Figura 39). Grande quantidade de matriz óssea neoformada pôde ser observada em toda a extensão da interface unindo o enxerto ao leito receptor (Figura 39), com a presença de grandes vasos sanguíneos no interior da matriz óssea neoformada, bem como lacunas preenchidas por osteócitos.

Observou-se também moderada neoformação óssea além dos limites do enxerto, preenchendo parte da área adjacente às bordas do enxerto. Além disso, acentuada osteogênese foi observada na face externa do enxerto (Figura 39).

Estas características demonstram que o enxerto, nesta fase, está histologicamente integrado ao leito receptor (Figura 40).

O enxerto mostrou lacunas de reabsorção em locais isolados em sua face externa, resultando em irregularidades na superfície externa (Figura 41a). Um perióstio bem organizado foi observado envolvendo toda a extensão do enxerto, caracterizado pela presença de células achatadas, dispostas paralelamente ao tecido ósseo.

A maioria dos espaços medulares apresentou-se totalmente preenchida por matriz óssea neoformada, com a presença de vasos sanguíneos no seu interior (Figura 41b).

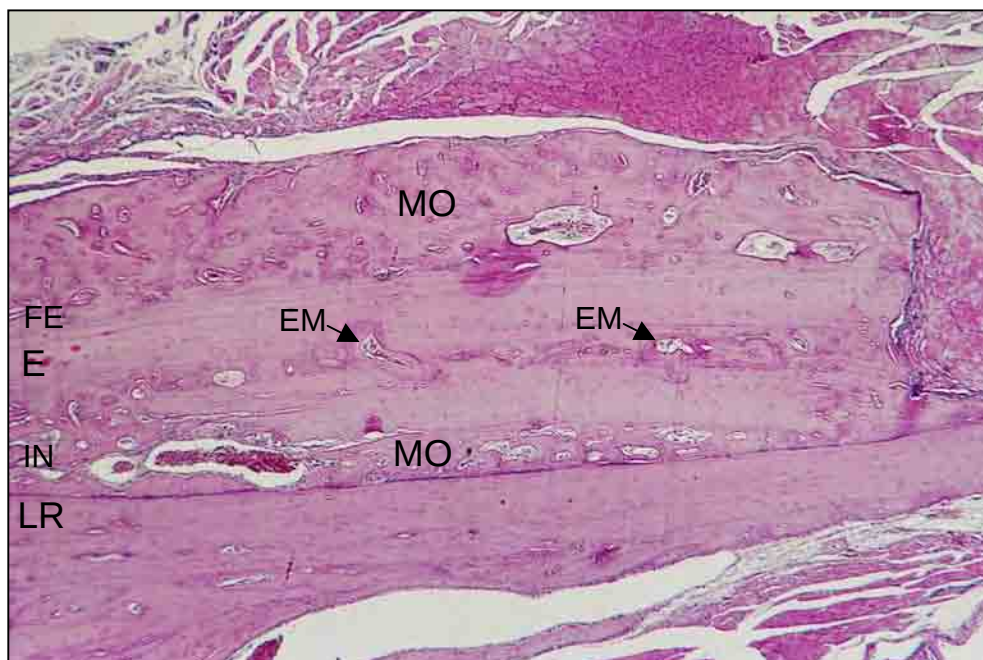


FIGURA 39- Grupo controle (28 dias). Observa-se acentuada atividade osteogênica neste período, com grande quantidade de matriz óssea neoformada (MO) preenchendo toda a interface. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa,

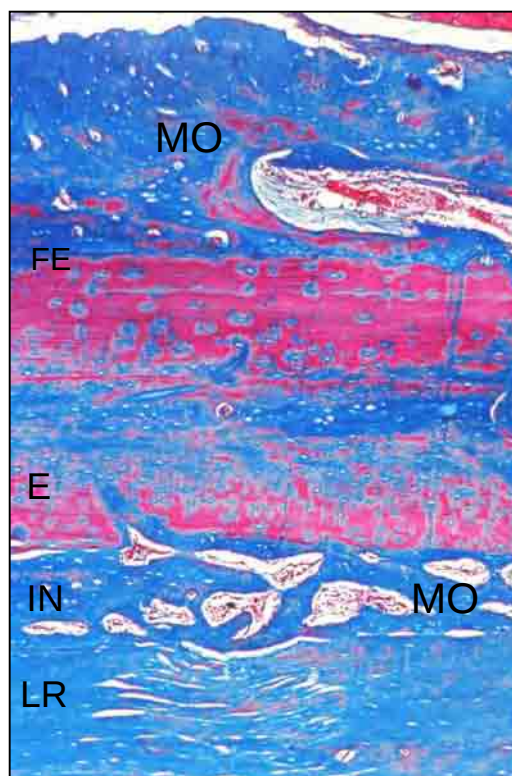


FIGURA 40- Grupo controle (28 dias). Observa-se que o enxerto apresenta-se histologicamente integrado ao leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, MO=matriz

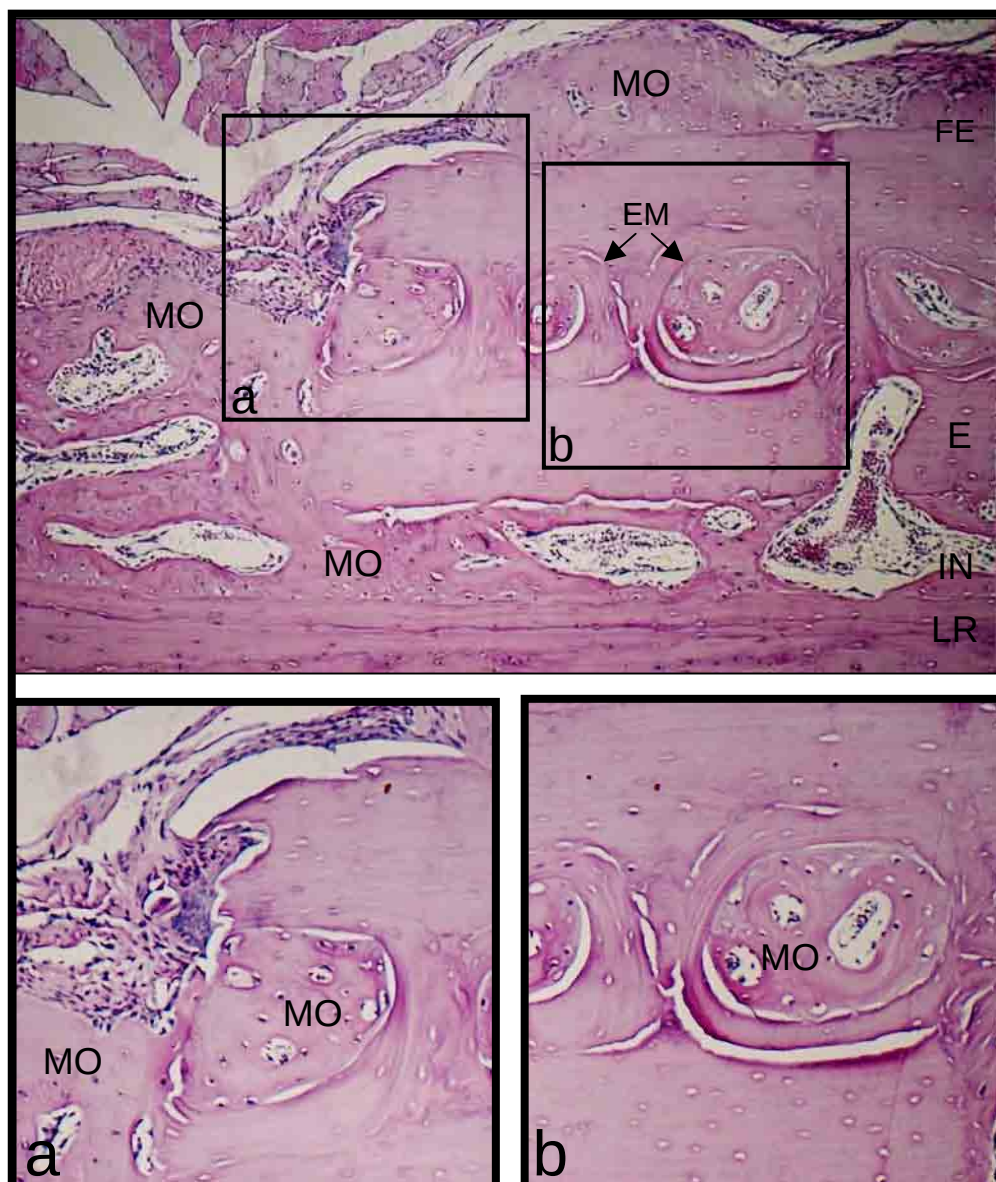


FIGURA 41- Grupo controle (28 dias). Observa-se extensa neoformação de matriz óssea (MO) generalizada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular. Coloração H.E. Aumento original 25:1. (a) Ampliação da imagem superior. Observa-se neoformação óssea na face externa e

GRUPO EXPERIMENTAL

Observou-se moderada atividade osteogênica na interface enxerto-leito receptor. A interface apresentou-se parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada (Figura 42), rodeada por volumosos e numerosos osteoblastos. Encontraram-se também áreas de tecido conjuntivo entre o enxerto e o leito receptor (Figura 43).

Discreta atividade osteogênica foi observada em alguns pontos na superfície livre do enxerto, com neoformação de matriz óssea em estreita camada sobre o enxerto (Figura 44a).

Nas porções adjacentes às bordas do enxerto observou-se discreta síntese de matriz óssea recoberta por osteoblastos. Pequenas áreas de tecido de granulação foram observadas na periferia do enxerto.

Neste período, moderada osteogênese foi observada na maioria dos espaços medulares do enxerto. Matriz óssea neoformada circundada por osteoblastos foi observada preenchendo parcialmente a maioria dos espaços medulares (Figura 44b). Poucos espaços medulares apresentaram-se totalmente ocluídos e alguns deles sem atividade osteogênica.

O enxerto mostrou lacunas de reabsorção em diversos pontos em sua face externa e nas bordas, resultando em um contorno irregular.

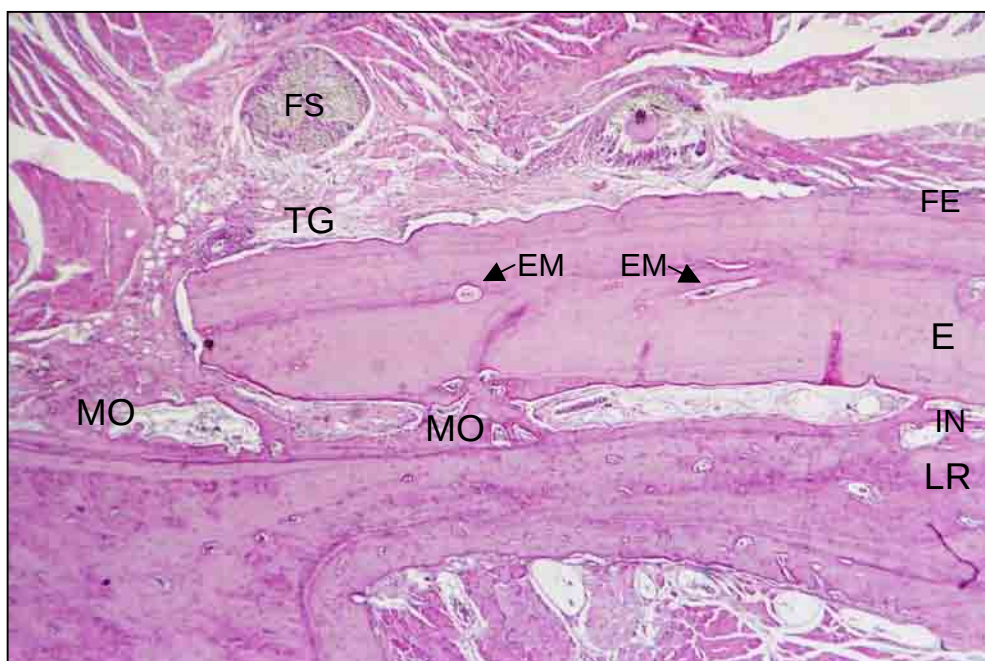


FIGURA 42- Grupo experimental (28 dias). Observa-se moderada atividade osteogênica, com preenchimento parcial da interface com matriz óssea neoformada (MO), além de remanescentes de

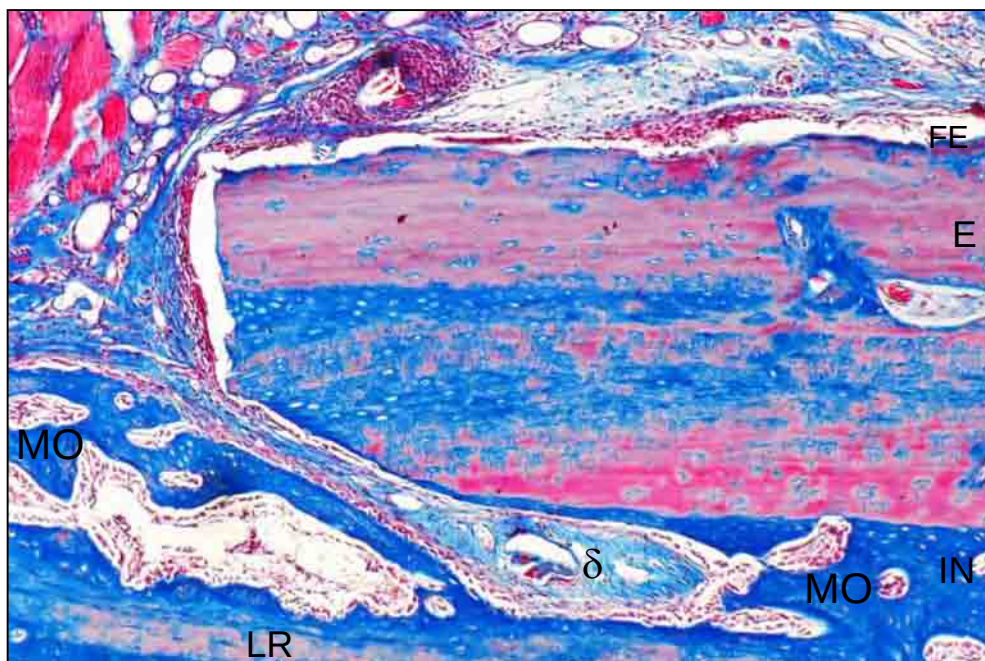


FIGURA 43- Grupo experimental (28 dias). Observa-se a presença de tecido conjuntivo (δ) interposto entre o enxerto e o leito receptor. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa,

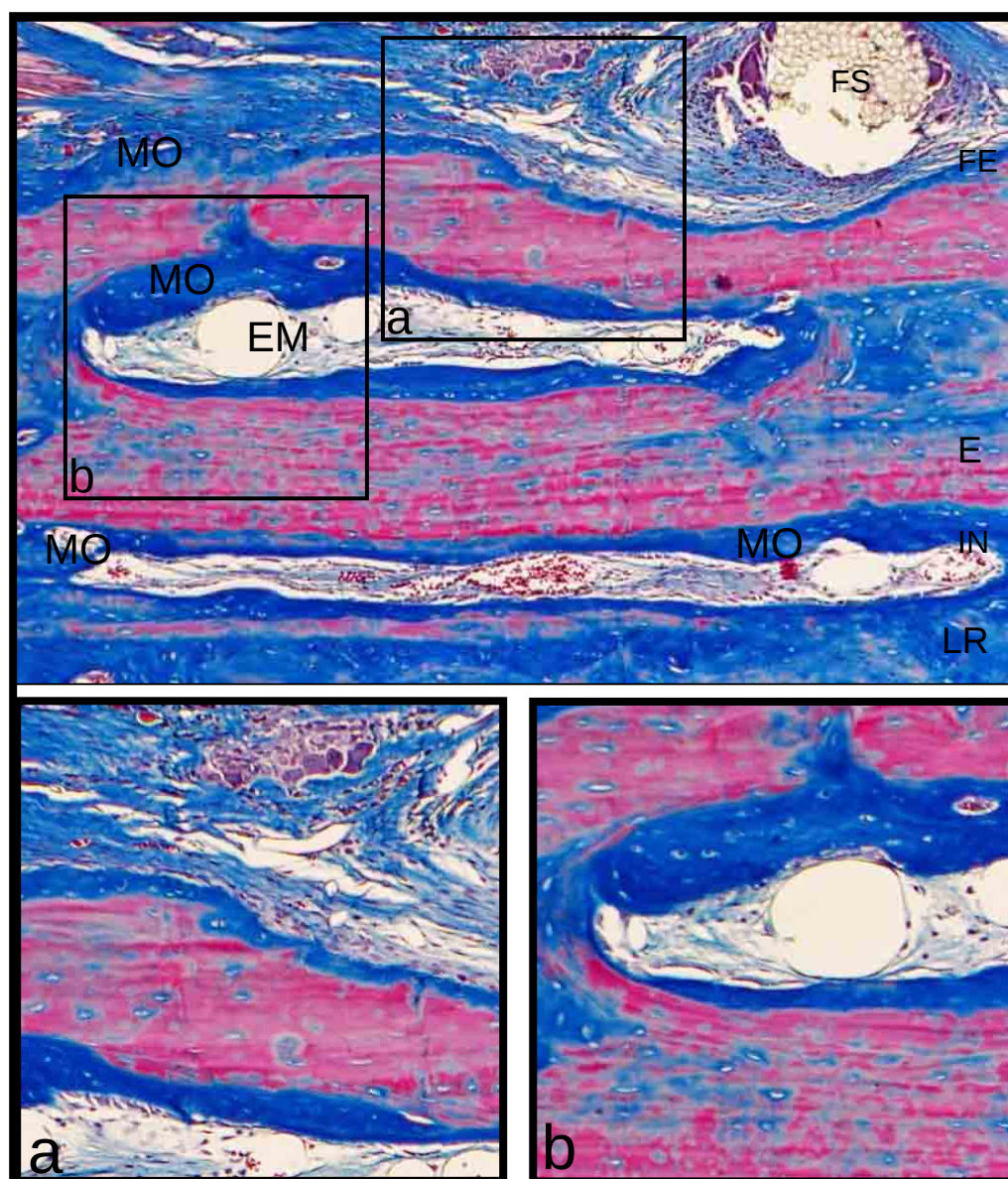


FIGURA 44- Grupo experimental (28 dias). Observa-se moderada neoformação de matriz óssea (MO) generalizada. E=enxerto, LR=leito receptor, IN=interface, FE=face externa, EM=espaço medular, FS=fio de sutura. Coloração T.M. Aumento original



Discussão



6 Discussão

Este trabalho procurou verificar se o processo de reparo do enxerto autógeno pode ser prejudicado pela deficiência de estrógeno, decorrente de ovariectomia, em ratas de 12 meses de idade. Desta forma, a deficiência hormonal foi provocada em um animal esqueleticamente maduro, com o intuito de tornar os resultados os mais parecidos possíveis com a situação clínica de uma paciente do sexo feminino de meia idade ($\pm$ 55 anos), no estágio da menopausa sem reposição hormonal, que necessita de cirurgia de enxerto ósseo para instalação de implantes osseointegrados.

Com o sucesso do modelo experimental implantado por Jardini, em 2001, para estudar o padrão de reparação de enxerto ósseo em bloco em mandíbula de ratos e reproduzido por Azem, em 2002, para estudar a revascularização do enxerto ósseo, foi proposto estudar, no presente trabalho, o efeito da ovariectomia no mesmo modelo, enfatizando a seqüência temporal dos eventos que culminam com a incorporação do enxerto ao leito receptor.

A escolha de ratas de 12 meses de idade baseia-se no trabalho realizado por Kalu et al. (1989), que sugeriu que nesta idade as ratas podem ser consideradas esqueleticamente maduras, simulando as mesmas características fisiológicas do organismo de uma mulher de meia idade. De acordo com o padrão de crescimento ósseo analisado pelos autores, a partir do sexto mês as características do fêmur estão praticamente estáveis no rato. Sendo assim, os autores asseguraram que ratas a partir

dos 12 meses de idade não apresentam mais mudanças esqueléticas significativas, tendendo ao declínio dessas mudanças, razão pela qual considera-se esta faixa etária propícia para o propósito do presente trabalho. Além disso, os autores asseguraram que as mudanças esqueléticas observadas, em seguida de ovariectomia, são primariamente devidas à deficiência do hormônio ovariano, evitando a perda óssea própria de idades mais avançadas e o crescimento ósseo acelerado que ocorre em animais jovens.

O trabalho desenvolvido com ratas nesta idade tornou os resultados obtidos mais fidedignamente transferíveis para a clínica. Muitos estudos clínicos retrospectivos avaliaram o sucesso de enxertos ósseos autógenos “onlay” (WILLIAMSON, 1996; KELLER et al., 1999), tendo mulheres na maior parte da amostra e com idade variando de 39 a 52 anos. No trabalho realizado por Williamson, em 1996, de 114 implantes instalados em área de enxerto ósseo autógeno, 8 falharam em pacientes do sexo feminino, sendo que uma delas se apresentava com quadro de osteoporose.

Alguns estudos sugerem um efeito negativo da osteoporose decorrente da deficiência de estrogênio sobre o processo de osseointegração (DUARTE et al., 2003; LUGERO et al., 2000; YAMAZAKI et al., 1999), porém não se sabe se áreas ósseas enxertadas tornam-se mais vulneráveis quando sob influência da deficiência de estrógeno.

Os resultados obtidos no presente trabalho possibilitaram demonstrar que houve um atraso no processo de reparo e integração dos enxertos ósseos aplicados às ratas ovariectomizadas quando comparados aos do grupo controle. No grupo controle, no período de 7 dias, observou-se na porção mais central da interface

enxerto-leito receptor a formação de blastemas ósseos circundados por numerosos osteoblastos, indicando discreta atividade osteogênica, enquanto que no grupo experimental, a interface mostrou-se preenchida por um tecido de granulação em organização, ainda com remanescentes de coágulo sanguíneo e marcante quantidade de hemácias, demonstrando um nítido atraso no processo de reparo. Contudo, ao analisarmos o trabalho de Jardini (2001) no mesmo período, em que utilizou a mesma metodologia de obtenção e fixação do enxerto ósseo, notamos que o nosso grupo controle também apresentava, comparativamente, um evidente atraso, uma vez que em seu trabalho já havia uma intensa formação de tecido ósseo resultando em pontes de união entre o enxerto e o leito receptor. Estes achados poderiam, então, estar relacionados ao fato de ter sido utilizado ratos machos e jovens, justificando que a idade por si só possa ter influência na cronologia do reparo.

Uma discreta atividade osteoclástica foi observada em ambos os grupos, sendo mais nítida nas bordas do enxerto, corroborando os achados de Enneking et al. (1975) de que a penetração vascular no enxerto cortical é primariamente o resultado de uma reabsorção osteoclástica e infiltração vascular pelos canais de Volkmann. Contudo, o fenômeno de recolonização dos canais de Volkmann por capilares, fibroblastos e células osteoprogenitoras, inclusive com presença de matriz óssea relacionada a esses canais, só foi evidente no grupo controle.

No período de 14 dias, o grupo controle apresentou moderada atividade osteogênica, com preenchimento parcial da interface com matriz óssea neoformada, estabelecendo uma união do enxerto ao leito receptor. Já no grupo experimental, a maior parte da interface encontrou-se preenchida ainda por um típico tecido de

granulação, com formação de matriz óssea circunscrita por osteoblastos em algumas áreas, caracterizando uma discreta atividade osteogênica para este grupo, nesta fase. Neste período, Azem (2002) observou a penetração de vasos em toda a periferia do enxerto, alcançando extensões variáveis no interior do mesmo, demonstrando um estágio avançado na integração do enxerto ao leito receptor. Ao serem extrapolados estes resultados aos obtidos no grupo controle deste estudo, onde os canais de Volkmann encontravam-se totalmente recolonizados por células e capilares, é possível acreditar que esteja ocorrendo um processo de reparo mais avançado em comparação ao grupo experimental, onde poucos canais encontravam-se na mesma condição.

Conseqüentemente, esta provável diferença na revascularização justifica a presença, no grupo controle, de espaços medulares parcialmente preenchidos por matriz óssea neoformada, enquanto que este fenômeno não foi verificado no grupo experimental. Neste grupo, grande parte dos espaços medulares encontrou-se preenchida somente por células da linhagem fibroblástica e células osteoprogenitoras, com persistência ainda de algumas células degeneradas. Esta nítida diferença indica um atraso no processo de revascularização e nutrição do enxerto no grupo experimental, fato este que pode estar relacionado à depleção hormonal.

Observações experimentais em osteoblastos, durante o processo de reparo ósseo, têm demonstrado que os esteróides gonadais, principalmente o estrógeno, atuam como biomolécula estimuladora para que essas células produzam vários fatores de crescimento (HARRIS et al., 1996). Alguns destes fatores são importantes para o estímulo da angiogênese. Sob a ação do estrógeno, o osteoblasto produz FGF e TGF β que são mitogênicos para células osteoprogenitoras, induzem a

síntese de matriz orgânica pelos osteoblastos e a rápida proliferação endotelial; o que proporcionará uma eficiente angiogênese no local do reparo ósseo (HARRIS et al., 1996; HURLEY; FLORKIEWICZ, 1996). Assim, a discreta angiogênese e o retardo nos processos de reparo do enxerto ósseo nas ratas ovariectomizadas, observados neste trabalho de pesquisa, podem estar relacionados aos baixos níveis sanguíneos do estrôgenio, decorrente da ablação da gônada. É importante salientar também que o estrógeno por si só, atua diretamente sobre a vasculogênese em locais onde ocorrem processo de reparo (BRANDI et al., 1993; LOSORDO; ISNER, 2001).

Aos 14 dias, ambos os grupos do presente trabalho apresentaram áreas de reabsorção com osteoclastos ativos em lacunas de Howship tornando, em alguns pontos, a face externa do enxerto e as bordas irregulares. Porém, no grupo controle, puderam ser observadas áreas onde a reabsorção já havia cessado e dado início a neoformação de matriz óssea, caracterizada por formação de linhas de reversão na superfície livre do enxerto. Este resultado sugere que a seqüência temporal dos eventos está mais adiantada no grupo controle comparado ao grupo experimental.

Aos 28 dias, no grupo controle, o enxerto apresentou-se histologicamente integrado ao leito receptor com matriz óssea neoformada em toda a extensão da interface. Por outro lado, no grupo experimental, a interface apresentou-se parcialmente preenchida por matriz óssea neoformada, com áreas de interposição de tecido conjuntivo.

Alguns sinais iniciais de incorporação associados à integração do enxerto ao leito receptor, foram observados no grupo controle aos 28 dias. Burchardt (1983) definiu esta incorporação do enxerto como um processo que engloba um

complexo de osso desvitalizado com novo osso viável, o qual se desenvolve através da reabsorção do primeiro e substituição pelo segundo, descrito na literatura por *creeping substitution*. De acordo com Enneking et al. (1975) o *creeping substitution* ocorre rapidamente após revascularização completa do enxerto via canais de Volkmann ou após o processo de reabsorção.

Os resultados aqui apresentados estão de acordo com os obtidos por Deleu e Trueta (1965), que observaram a revascularização completa do enxerto ósseo cortical, em cobaias e ratos, após 4 a 8 semanas. Os resultados de Jardini (2001) mostraram sinais de incorporação desde o período de 21 dias, iniciando-se pela periferia do enxerto.

Pode-se considerar que, embora os eventos associados ao processo de reparo estejam atrasados no grupo experimental, há indícios de que este processo tende a continuar em períodos mais longos, podendo até mesmo alcançar um nivelamento entre os grupos. Não foi notada diferença marcante quanto à atividade osteoclástica entre os grupos nestes períodos de avaliação. Além disso, 28 dias não foram suficientes para avaliarmos a dinâmica de uma completa substituição do enxerto, chamada de *creeping substitution*, já notada no trabalho de Jardini (2001) aos 21 dias e observada mais claramente aos 45 dias. É importante ressaltar que esta autora utilizou em sua pesquisa ratos machos, jovens.

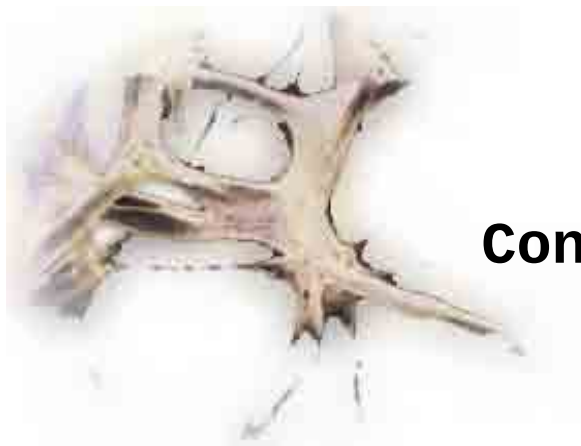
É preciso salientar a dificuldade técnica enfrentada neste estudo para padronizar a adaptação do enxerto na mandíbula, devido às variações na anatomia da área receptora. Apesar da adequada imobilização do enxerto, a área correspondente à interface variou de animal para animal. No entanto, este fato não prejudicou a

verificação dos eventos celulares envolvidos com o processo de reparação óssea. A completa imobilização do enxerto e a preparação do leito por meio de decorticalização ou perfurações têm sido consideradas ponto fundamental na pega do enxerto (CARVALHO et al., 2000). Isto explica o fato de ter sido encontrada maior neoformação óssea na porção mais central da interface, próximo à área da perfuração central, local da transpassagem do fio de sutura para fixação do enxerto ao leito. Estes achados podem indicar que a perfuração do leito e do enxerto pode ter facilitado a proliferação vascular e o acesso de células originárias do endóstio, favorecendo a neoformação óssea nas porções mais próximas à perfuração. Neste estudo não foram realizadas perfurações no leito receptor, como descrito por Buser et al. (1995) e Misch e Misch (1995), devido à fina espessura da cortical da mandíbula, o que poderia fragilizá-la. Em contrapartida, realizou-se uma suave raspagem no leito receptor para assegurar a remoção completa do perióstio, o que poderia favorecer a incorporação do enxerto ósseo.

Apesar de não ser possível extrapolar diretamente estes resultados para humanos, o presente trabalho oferece, no entanto, fortes evidências de que a deficiência de estrógeno pode atrasar o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco em mulheres de meia idade, com sinais clínicos da menopausa, onde a síntese deste hormônio ovariano já se mostra comprometida. Desta forma, o sucesso e a longevidade de implantes osseointegrados em áreas enxertadas, poderiam conseqüentemente apresentar algum grau de comprometimento ou um certo atraso no processo de osseointegração, em decorrência destas alterações hormonais.

Portanto, pode-se sugerir aos cirurgiões-dentistas que sejam cautelosos

na realização de procedimentos de enxertia óssea em pacientes osteoporóticos, que não estejam sendo submetidos à terapia de reposição hormonal. Certamente, mais estudos em outras espécies de animais e em diferentes idades, analisando o efeito da deficiência estrogênica sobre a incorporação de enxertos ósseos autógenos em bloco, poderiam incrementar os conhecimentos para uma mais segura aplicação deste procedimento em seres humanos nestas mesmas condições sistêmicas.



Conclusão



7 Conclusão

Dentro dos limites deste trabalho, podemos concluir, com base na análise histológica realizada, que:

- A deficiência de estrógeno, decorrente da ovariectomia, atrasou o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco em mandíbula de ratas adultas;
- Embora tenha havido atraso no processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos em bloco, decorrente da ovariectomia, havia indícios de que este poderia completar-se em períodos mais longos.



Referências



Referências

ABBOTT, L. C. et al. The evaluation of cortical and cancellous bone as grafting material: A clinical and experimental study. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 29, n. 2, p. 381-414, Apr. 1947.

ALBEE, F. H. Fundamentals in bone transplantation: Experiences in three thousand bone graft operations. **J.A.M.A.**, v. 81, p. 1429, 1923.

ANDERSON, K. J. et al. End-point results of processed heterogenous, autogenous and homogenous bone transplants in the human: a histologic study. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 33, p. 220-236, Mar./Apr. 1964.

ASSESSMENT of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. **World Health Organ. Tech. Rep. Ser.**, Geneva, v. 843, p. 1-129, 1994.

AZEM, A. C. **Revascularização de enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de PTFE-e**. 2002. 59f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BAHAT, O. Interrelations of soft and hard tissues for osseointegrated implants. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Jamesburg, v. 17, n. 12, p. 1161-1168, Dec. 1996.

BAIN, S. D. et al. High-dose estrogen inhibits bone resorption and stimulates bone formation in the ovariectomized mouse. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 8, n. 4, p. 435-442, Apr. 1993.

BERNICK, S.; ERSHOFF, B. H. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 42, n. 2, p. 981-999, July/Aug. 1963.

BRANDI, M. L. et al. Bone endothelial cells as estrogen targets. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 53, n. 5, p. 312-317, Nov. 1993.

BRÅNEMARK, P. I. Introduction to osseointegration. In: BRÅNEMARK, P. I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. **Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985. p. 41-49.

BRÅNEMARK, P. I. et al. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v. 3, n. 2, p. 81-100, 1969.

BRÅNEMARK, P. I. et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v. 16, p. 1-132, 1977.

BRAS, J. et al. Radiographic interpretation of the mandibular angular cortex: a diagnostic tool in metabolic bone loos. Part II. Renal osteodystrophy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 53, n. 6, p. 647-650, June 1982.

BREINE, U.; BRÅNEMARK, P. I. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and performed autologous bone graft in combination with osteointegrated implants. **Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.**, Stockholm, v. 14, n. 1, p. 23-48, 1980.

BORSTLAP, W. A. et al. Early secondary bone grafting of alveolar cleft defects: a comparison between chin and rib grafts. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 18, n. 5, p. 201-205, July 1990.

BURCHARDT, H. The biology of bone graft repair. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n. 174, p. 28-42, Apr. 1983.

BURCHARDT, H.; ENNEKING, W. F. Transplantation of bone. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 58, n. 2, p. 403-427, Apr. 1978.

BUSER, D. et al. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 10-29, Feb. 1995.

CARVALHO, P. S. P.; VASCONCELOS, L. W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 15, n. 4, p. 565-570, July/Aug. 2000.

CHOW, J. et al. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 89, n. 1, p. 74-78, Jan. 1992.

COHEN-SOLAL, M. E. et al. Peripheral monocyte culture supernatants of menopausal women can induce bone resorption: involvement of cytokines. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v. 77, n. 6, p. 1648-1653, Dec. 1993.

COOPER, C. MELTON, L. J. Magnitude and impact of osteoporosis and fractures. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996. p. 419-434.

COTCHIN, E.; ROE, F. J. C. **Pathology of laboratory rats and mice**. Oxford: Blackwell, 1967.

DELEU, J.; TRUETA, J. Vascularisation of bone grafts in the anterior chamber of the eye. **J. Bone Joint Surg. Br.**, London, v. 47, n. 2, p. 319-329, May 1965.

DONOVAN, M. G. et al. Maxillary and mandibular reconstruction using calvarial bone grafts and Brånemark implants: a preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 52, n. 6, p. 588-594, June 1994.

DUARTE, P. M. et al. Effect of estrogen and calcitonin therapies on bone density in a lateral area adjacent to implants placed in the tibiae of ovariectomized rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 11, p. 1618-1624, Nov. 2003.

EBELING, P. R. et al. Short-term effects of recombinant human insulin-like growth factor I on bone turnover in normal women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Baltimore, v.77, n. 5, p. 1384-1387, Nov. 1993.

ENNEKING, W. F. et al. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v.57, n. 2, p.237-252, Mar. 1975.

ERIKSEN, E. F. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. **Science**, Washington, v. 241, n. 4861, p. 84-86, July 1988.

FELSON, D. T. et al. The effect of postmenopausal estrogen therapy on bone density in elderly women. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v. 329, n. 16, p. 1141-1146, Oct. 1993.

GARG, A. K. Grafting materials in repair and restoration. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. **Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics**. Chicago: Quintessence, 1999. p. 83-101.

GARNERO, P.; DELMAS, P. D. Laboratory assessment of postmenopausal osteoporosis. In: SEIBEL, M. J.; ROBINS, S. P.; BILEZIKIAN, J. P. **Dynamics of bone and cartilage metabolism**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 465-477.

GASS, G. H.; KAPLAN, H. M. **Handbook of endocrinology**. Flórida: CRC, 1987. 2v.

GORDAN, G. S.; PICCHI, J.; ROOF, B. S. Antifracture efficacy of long-term estrogens for osteoporosis. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, Philadelphia, v. 86, p. 326-332, 1973.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Fisiologia humana e mecanismos das doenças**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 566-596.

HAGEL-BRADWAY, S.; DZIAK, R. Regulation of bone cell metabolism. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 18, n. 6, p. 344-351, July 1989.

HARRIS, S. A. et al. Estrogen and Progestins. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**, San Diego: Academic Press, 1996. p. 507-520.

HARSHA, B. C.; TURVEY, T. A.; POWERS, S. K. Use of autogenous cranial bone grafts in maxillofacial surgery: a preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 44, n. 1, p. 11-15, Jan. 1986.

HEMENWAY, D. et al. Fractures and lifestyle: effect of cigarette smoking, alcohol intake, and relative weight on the risk of hip and forearm fractures in middle-age women. **Am. J. Public Health**, Washington, v. 78, n. 12, p. 1154-1158, Dec. 1988.

HOLBROOK, T. L.; BARRET-CONNOR, E.; WINGARD, D. L. Dietary calcium and risk of hip fracture: 14-year prospective population study. **Lancet**, London, v. 2, n. 8619, p. 1046-1049, Nov. 1988.

HOLLINGER, J. O.; BUCK, D. C.; BRUDER, S. P. Biology of bone healing: its impact on clinical therapy. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARX, R. E. **Tissue**

engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics. Chicago: Quintessence, 1999. p. 17-53.

HSIEH, Y. D.; DEVLIN, H.; MCCORD, F. The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 529-531, June 1995.

HURLEY, M. M.; FLORKIEWICZ, R. Z. Fibroblast Growth factor and vascular endothelial cell growth factor families. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; RODAN, G. A. **Principles of bone biology**, San Diego: Academic Press, 1996. p. 627-645.

IBBOTSON, K. J. et al. Contrasting effects of parathyroid hormone and insulin-like growth factor I in an aged ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 7, n. 4, p. 425-432, Apr. 1989.

JARDINI, M. A. N. **Padrão de reparação do enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de PTFE-e: estudo histológico em ratos.** 2001. 74f. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

JEFFCOAT, M. K.; CHESNUT, C. H. Systemic osteoporosis and oral bone loss: evidence shows increased risk factors. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 124, n. 11, p. 49-56, Nov. 1993.

JENSEN, J.; SINDET-PEDERSEN, S. Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 49, n. 12, p. 1277-1287, Dec. 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KAHNBERG, K. E.; RASMUSSEN, L.; MOHAMMADI, S. An experimental rabbit model for studying the healing of onlay bone grafts. **Swed. Dent. J.**, Jonkoping, v. 22, n. 1/2, p. 15-21, 1998.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, Limerick, v. 15, n. 3, p. 175-192, Dec. 1991.

KALU, D. N. et al. The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. **Endocrinology**, Baltimore, v. 124, n. 1, p. 7-16, Jan. 1989.

KANIS, J. A. et al. Evidence for efficacy of drugs affecting bone metabolism in preventing hip fracture. **B. M. J.**, London, v. 305, n. 6862, p. 1124-1128, Nov. 1992.

KAWAMOTO, S.; NAGAOKA, E. The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. **J. Oral Rehabil.**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 587-594, July 2000.

KAWAMOTO, S. et al. Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 47, n. 1, p.67-73, Jan. 2002.

KELLER, E. E. et al. Prosthetic-surgical reconstruction of the severely resorbed maxilla with iliac bone grafting and tissue-integrated prostheses. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 2, n. 3, p. 155-165, 1987.

KELLER, E. E.; TOLMAN, D. E.; ECKERT, S. Surgical-prosthetic reconstruction of advanced maxillary bone compromise with autogenous onlay block bone grafts and osseointegrated endosseous implants: a 12-year study of 32 consecutive patients. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 14, n. 2, p. 197-209, Mar./Apr. 1999.

KELLIE, S. E.; BODY, J. A. Sex-specific and race-specific hip fracture rates. **Am. J. Public Health**, Washington, v. 80, n. 3, p. 326-328, Mar. 1990.

KLINE, S. N.; RIMER, S. R. Reconstruction of osseous defects with freeze-dried allogeneic and autogenous bone: clinical and histologic assessment. **Am. J. Surg.**, New York, v. 146, n. 4, p. 471-473, Oct. 1983.

KOOLE, R.; BOSKER, H.; VAN DER DUSSEN, F. N. Late secondary autogenous bone grafting in cleft patients comparing mandibular (ectomesenchymal) and iliac crest (mesenchymal) grafts. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Stullgart, v. 17, suppl. 1, p. 28-30, Dec. 1989.

KRIBBS, P. J.; SMITH, D. E.; CHESNUT, C. H. Oral findings in osteoporosis. Part II: relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 50, n. 5, p. 719-724, Nov. 1983.

KRIBBS, P. J. et al. Relationship between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 62, n. 6, p.703-707, Dec. 1989.

LANE, J. M. Bone graft substitutes. **West. J. Med.**, San Francisco, v. 163, n. 6, p. 565-566, Dec. 1995.

LEKHOLM, U.; ZARB, G. A. Patient selection and preparation. In: BRÅNEMARK, P.-I.; ZARB, G. A.; ALBREKTSSON, T. **Tissue-integrated prostheses: osseointegration in clinical dentistry**. Chicago: Quintessence, 1985, p. 199-209.

LI, X.; NISHIMURA, I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 72, n. 3, p. 324-330, Sept. 1994.

LINDSAY, R. Estrogens, bone mass and osteoporotic fracture. **Am. J. Med.**, Barcelona, v. 91, n. 5B, p. 10S-13S, Nov. 1991.

LISTROM, R. D.; SYMINGTON, J. M. Osseointegrated dental implants in conjunction with bone grafts. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 17, n. 2, p. 116-118, Apr. 1988.

LOSORDO, D. W.; ISNER, J. W. Estrogen and angiogenesis: a review. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, Baltimore, v. 21, n. 1, p. 6-12, Jan. 2001.

LU, K. H. et al. Chronologic changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. **Biol. Reprod.**, Madison, v. 21, n. 1, p. 193-203, Aug. 1979.

LUGERO, G. G. et al. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 9, n. 4, p. 303-309, 2000.

LUNDGREN, S. et al. Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 11, n. 6, p. 760-766, Nov./Dec. 1996.

MALLETA, J. A. et al. Comparison of the healing and revascularization of onlayed autologous and lyophilized allogeneic rib grafts to edentulous maxilla. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 41, n. 8, p. 487-499, Aug. 1983.

MARQUES, K. P. Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas. 1998. 119f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade da Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1998.

MARX, R. E.; SAUNDERS, T. R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R. J.; DAVIS, W. H. **Reconstructive Preprosthetic Oral and Maxillofacial Surgery**. Philadelphia: WB Saunders, 1995. p. 347-428.

MCKANE, W. R. et al. Circulating levels of cytokines that modulate bone resorption: effects of age and menopause in women. **J. Bone Miner. Res.**, Washington, v. 9, n. 8, p. 1313-1318, Aug. 1994.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br. Dent. J.**, London, v. 172, n. 6, p. 235-242, Mar. 1992.

MEYER JÚNIOR, R. A. et al. Age and ovariectomy impair both the normatization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 19, n. 3, p. 428-435, May 2001.

MISCH, C. M. Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 12, n. 6, p. 767-776, Nov./Dec. 1997.

MISCH, C. M.; MISCH, C. E. The repair of localized severe ridge defects for implant placement using mandibular bone grafts. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 4, n. 4, p. 261-267, Winter 1995.

MISCH, C. M. et al. Reconstruction of maxillary alveolar defects with mandibular symphysis grafts for dental implants: a preliminary procedural report. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 7, n. 3, p. 360-366, Fall 1992.

MONTES, G. S.; LUQUE, E. H. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. **Acta Anat.**, Basel, v. 133, n. 3, p. 192-199, 1988.

NAMKUNG-MATTHAI, H. et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. **Bone**, New York, v. 28, n. 1, p. 80-86, Jan. 2001.

- NISHIMURA, I.; HOSOKAWA, R.; ATWOOD, D. A. The knife-edge tendency in mandibular residual ridges in women. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 67, n. 6, p. 820-826, June 1992.
- OURSLER, M. J.; KASSEM, M.; TURNER, R.; RIGGS, B. L.; SPELSBERG, T. C. Regulation of bone cell function by gonadal steroids. In: MARCUS, R.; FELDMAN, D.; KELSEY, J. **Osteoporosis**. San Diego: Academic Press, 1996.
- PACIFICI, R. et al. Monocytic secretion of interleukine-1 receptor antagonist in normal and osteoporotic women: effects of menopause and estrogen/progesterone therapy. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, Bethesda, v. 77, n. 5, p. 1135-1141, Nov. 1993.
- RAGHOEBAR, G. M. et al. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 51, n. 11, p. 1198-1203, Nov. 1993.
- RAISZ, L. G. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. **N. Engl. J. Med.** Waltham, v. 318, n. 13, p. 818-828, Mar. 1988.
- RIGGS, B. L. et al. Changes in bone mineral density of the proximal femur and spine with aging. **J. Clin. Invest.**, Thorofare, v. 70, n. 4, p. 716-723, Oct. 1982.
- ROBERTS, W. E. et al. Implants: bone physiology and metabolism. **C. D. A.**, Ottawa, v. 15, n. 10, p. 54-61, Oct. 1987.
- SALOMÃO, J. I. S.; GRANDINI, S. A.; OKAMOTO, T. Processo de reparo em feridas de extração dental em ratas ooforectomizadas. **Rev. Fac. Odont. Araçatuba**, Araçatuba, v. 3, n. 2, p. 183-195, 1974.
- SHIMIZU, M. et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. **J. Electron. Microsc.**, Tokyo, v. 47, n. 5, p. 517-526, 1998.

SHIMIZU, M. et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. **Anat. Rec.**, New York, v. 259, n. 1, p. 76-85, May 2000.

SHULMAN, L. B. Surgical considerations in implant dentistry. **J. Dent. Educ.**, Washington, v. 52, n. 12, p. 712-720, Dec. 1988.

SLEMENDA, C. et al. Sex steroids and bone mass: a study of changes about the time of menopause. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 80, n. 5, p. 1261-1269, Nov. 1987.

SPRINGFIELD, D. S. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. **Orthopedics**, Thonofare, v. 15, n. 10, p. 1237-1241, Oct. 1992.

STRINGA, G. Studies of the vascularization of bone grafts. **J. Bone Joint Surg.**, Boston, v. 39B, n. 2, p. 395-420, May 1957.

TANAKA, S. et al. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. **Anat. Rec.**, New York, v. 262, n. 2, p. 203-212, Feb. 2001.

TEN CATE, A. R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 101-122.

TOLMAN, D. E. Reconstructive procedures with endosseous implants in grafted bone: a review of the literature. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 10, n. 3, p. 275-294, May/June 1995.

TURNER, R. T. et al. Tamoxifen inhibits osteoclast-mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone-deficient rats. **Endocrinology**, Baltimore, v. 122, n. 3, p. 1146-1150, Mar. 1988.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, n. 698, p. 893-899, Nov. 1965.

VICO, L. et al. Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. **Osteoporosis Int.**, London, v. 2, n. 3, p. 153-158, May 1992.

VON WOWER, N.; KOLLERUP, G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 67, n. 5, p. 656-660, May 1992.

WILLIAMSSON, R. A. Rehabilitation of the resorbed maxilla and mandible using autogenous bone grafts and osseointegrated implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 11, n. 4, p. 476-488, Jul./Aug. 1996.

WRONSKI, T. J.; CINTRON, M.; DANN, L. M. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 43, n. 3, p. 179-183, Sept. 1988a.

WRONSKI, T. J. et al. Estrogen treatment prevents osteopenia and depresses bone turnover in ovariectomized rats. **Endocrinology**, Baltimore, v. 123, n. 2, p. 681-666, Aug. 1988b.

WRONSKI, T. J. et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 45, n. 6, p. 360-366, Dec. 1989.

YAMAZAKI, M. et al. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 87, n. 4, p. 411-418, Apr. 1999.

ZEISS, I. M.; NISBET, N. W.; HESLOP, B. F. Studies on transference of bone. II. Vascularization of autologous and homologous implants of cortical bone in rats. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 41, p. 345-352, 1960.



Anexo A

Anexo A

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
CAMPUS DE ARAÇATUBA – FACULDADE DE ODONTOLOGIA
CURSOS DE ODONTOLOGIA E DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
(CEEAA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeito da ovariectomia no processo de reparo de enxerto autógeno em bloco na mandíbula. Avaliação histológica e histométrica em ratas com menopausa induzida” sob responsabilidade do Prof. Dr. ALVARO FRANCISCO BOSCO, DANIELLE SHIMA LUIZE, SAMARA BONFANTE e GISCARD JOSÉ RIBEIRO MACHADO está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em reunião de 12/05/2003, de acordo com o protocolo nº 34/03.

Araçatuba, 12 de maio de 2003.



Profª. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente