

Samara Bonfante

**A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NO
PROCESSO DE REPARO DE
ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO:
estudo histológico em ratas**

SAMARA BONFANTE

**A INFLUÊNCIA DA NICOTINA NO PROCESSO DE
REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO:
Estudo histológico em ratas**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, do Campus de Araçatuba, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco

**ARAÇATUBA
2005**



Lista de Figuras

Figura 1	Aplicação da nicotina ou soro no dorso da rata.	74
Figura 2	Preparo do leito receptor. a) incisão linear na região de ângulo da mandíbula expondo o músculo masseter; b) divulsão do músculo masseter com tesoura de ponta romba.	77
Figura 3	Preparo do leito receptor. a) deslocamento do periósteo do lado medial da mandíbula juntamente com o músculo pterigóideo medial, com auxílio de um Hollenback nº. 3s; b) raspagem superficial do leito receptor para remoção do periósteo.	77
Figura 4	Afastadores especialmente desenvolvidos para adequada visualização e acesso ao leito receptor da mandíbula.	77
Figura 5	Área doadora. a) remoção do enxerto da região parietal direita com trefina; cirúrgica, sob irrigação com solução fisiológica; b) bloco ósseo removido em toda espessura da díploe.	80
Figura 6	Enxerto ósseo. a) broca $\frac{1}{2}$ posicionada no centro do enxerto ósseo para perfuração; b) perfuração do leito receptor da mandíbula com broca $\frac{1}{2}$.	80
Figura 7	Fixação do enxerto. a) fio de poliéster verde trançado nº. 5-0 transpassando o enxerto ósseo e o leito receptor da mandíbula; b) Enxerto suturado e estabilizado.	80

Figura 8 Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o tecido de granulação (TG) e o fio de sutura (FS). HE, 39X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) apresentando área de reabsorção óssea com adesão de células e fibras colágenas (seta preta) e o espaço medular (seta azul) preenchido por restos de tecido mielóide. HE, 275X; c) detalhe da formação óssea (asterisco) na superfície do enxerto com numerosos osteoblastos (seta branca). HE, 275X; d) detalhe da área da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X.

86

Figura 9 Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o tecido de granulação (TG) e o fio de sutura (FS). HE, 38X; b) detalhe da formação óssea próxima à superfície externa do enxerto (E). HE, 275X; c) detalhe da invasão da interface por tecido de granulação (TG). HE, 275X; d) detalhe da invasão do coágulo sanguíneo (estrela) por células semelhantes a fibroblastos (setas). HE, 275X.

87

Figura 10 Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) formação óssea (asterisco) associada a área de reabsorção na superfície externa do enxerto (E) com numerosos osteoblastos (seta branca) circundados por fibras colágenas recém sintetizadas (seta preta). Tricrômico de Masson, 275X; b) início da deposição de fibras colágenas (fundo levemente azulado) pelos fibroblastos em substituição ao coágulo sanguíneo (estrela) e fragmentos ósseos (F). Tricrômico de Masson, 275X; c) deposição de fina camada de tecido ósseo na superfície do leito, com inclusão de osteoblastos (seta branca) além de fibras colágenas e fibroblastos dispostos obliquamente. Tricrômico de Masson, 275X.

88

- Figura 11** Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), a rede de fibrina (estrela) e o tecido de granulação (TG) HE, 47X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto pela rede de fibrina (estrela) e a invasão por células tipo fibroblasto (seta) HE, 275X; c) detalhe da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X; d) invasão de células alongadas (seta) para a interface ocupada pelo coágulo (estrela). HE, 275X. 90
- Figura 12** Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), coágulo sanguíneo (estrela) e o tecido de granulação (TG). HE, 40X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto por restos de coágulo (estrela) e células tipo fibroblasto (seta). HE, 275X; c) detalhe das lacunas de osteócitos vazias (seta vazada) e do espaço medular (seta azul) do enxerto (E) preenchido por restos de tecido mielóide. HE, 275X; d) área da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X 91
- Figura 13** Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral do enxerto (E) e do leito (L) e da região de interface preenchida por coágulo sanguíneo (estrela) e fragmentos de matriz. Tricrômico de Masson, 87X; b) A detalhe da interface preenchida por coágulo sanguíneo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da interface apresentando vários fragmentos de matriz (F) envoltos pelo coágulo sanguíneo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X. 92
- Figura 14** Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 48X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície 95

externa do enxerto (E) apresentando área de reabsorção óssea por células gigantes multinucleadas (seta vermelha). HE, 275X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) preenchido por tecido conjuntivo (estrela) e circundado por pequenas áreas de formação óssea (asterisco). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo frouxo (estrela) e pequena formação óssea (asterisco) na superfície do leito receptor (L). HE, 275X.

Figura 15 Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L) e a interface (I). HE, 44X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto por tecido conjuntivo semelhante ao periósteo (seta preta) e tecido muscular (M). HE, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do leito (L) com inúmeros osteoblastos (seta branca) e do tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo fibroso (estrela). HE, 275X.

96

Figura 16 Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da superfície óssea do enxerto recoberta por tecido conjuntivo (estrela) e da neoformação óssea (asterisco). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) próximo a superfície do leito (L), separado por uma fina camada de tecido conjuntivo (estrela) e dos osteoblastos circundados por filetes de fibras colágenas (seta branca). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a áreas de reabsorção na superfície do enxerto (E) e do tecido conjuntivo fibroso (estrela) que separa formação óssea (estrela) recoberta por osteoblastos. Tricrômico de Masson, 275X.

97

Figura 17 Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE,

100

47X; b) detalhe da superfície externa do enxerto recoberta por tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; c) detalhe da interface com formação óssea (asterisco) exibindo fragmento de matriz (F) e interconectando as superfícies do leito (L) a do enxerto (E) e os espaços inter-trabeculares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

Figura 18 Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o fio de sutura (FS) e a formação óssea (O) na superfície do leito (L) próximo à borda anterior do enxerto (E). HE, 38X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberta por tecido conjuntivo associado a áreas de tecido de granulação (estrela). HE, 275X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) do enxerto (E) preenchido por tecido conjuntivo. HE, 275X; d) detalhe na interface de formação óssea (asterisco) na superfície do leito receptor (L) e de tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

101

Figura 19 Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da formação óssea próxima à superfície óssea do leito receptor (L) e a presença de ilhas de tecido ósseo recém produzidas, ricas em osteoblastos (setas brancas). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a fragmentos de matriz (F) com as superfícies ósseas recobertas por osteoblastos (seta branca) e tecido conjuntivo frouxo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a áreas de tecido cartilaginoso (C) e do tecido conjuntivo fibroso (estrela) intercalado a formação óssea (estrela) na superfície do enxerto (E) e do leito (L). Tricrômico de Masson, 275X.

102

Figura 20 Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e osso reacional (O) na superfície do leito. HE, 34X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície externa do enxerto envolta por tecido conjuntivo (estrela). HE, 87X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) envolto por tecido ósseo neoformado (asterisco) circundando o tecido mielóide (MO) em formação. HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido ósseo (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L) e os espaços entre as trabéculas ocupados por tecido mielóide (MO) em neoformação. HE, 275X.

105

Figura 21 Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e osso reacional (O) na superfície do leito. HE, 40X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do leito (L) próximo à borda do enxerto (E) formada por uma cortical (asterisco) circundando o tecido mielóide (MO). HE, 87X. c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L) associado a áreas de reabsorção (setas). HE, 275X; d) detalhe do tecido ósseo mais compacto (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L). HE, 275X.

106

106

Figura 22 Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 40X; b) detalhe do tecido conjuntivo semelhante ao perióstio (estrela) recobrindo a superfície externa do enxerto (E) e o tecido muscular (M). HE, 275X. c) detalhe do tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do leito e do tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da reabsorção óssea (seta) e do tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do leito (L) e da fina camada de tecido conjuntivo

107

(estrela) separando o enxerto (E) do tecido ósseo (asterisco). HE, 275X.

Figura 23 Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) detalhe do tecido ósseo (asterisco) na superfície do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) no interior do espaço medular do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) no espaço da interface intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L). Tricrômico de Masson, 275X.

108

Figura 24 Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), osso reacional (O) na superfície do leito e o tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do enxerto. HE, 40X; b) neoformação óssea (asterisco) no interior dos espaços medulares (asterisco) e de tecido conjuntivo (estrela). HE, 87X; c) detalhe de um canal medular da figura anterior apresentando preenchimento por tecido ósseo (asterisco) e conjuntivo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da formação óssea na interface junto à superfície do leito receptor (L) e do enxerto (E) intercalado por tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X.

111

Figura 25 Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 40X; b) aspecto geral do tecido conjuntivo fibroso (estrela) recobrendo o enxerto (E) e preenchendo os espaços medulares. HE, 87X. c) detalhe da interface mostrando a formação óssea (asterisco) com aprisionamento de fragmentos de matriz (F) e o tecido conjuntivo (estrela) na interface. HE, 275X; d) detalhe de ilha de formação óssea (asterisco) na interface e do tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

112

Figura 26 Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o

113

leito receptor (L), a interface (I) e osso reacional (O) na superfície do leito. HE, 38X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) no interior dos espaços medulares (asterisco) e do tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; c-d) detalhe da formação óssea (asterisco) na superfície do enxerto com aprisionamento de fragmentos de matriz (F) e do leito receptor com a presença de tecido conjuntivo (estrela) ricamente vascularizado nos espaços inter-trabeculares. HE, 275X.

Figura 27 Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 87X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) e do tecido conjuntivo (estrela) no interior do espaço medular (seta azul) do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) na superfície do enxerto (E) e do leito (L) e o preenchimento de espaço restante por tecido conjuntivo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X.



Lista de abreviaturas

BMP	Proteína Óssea Morfogenética
C	tecido cartilaginoso
CID	Código Internacional de Doenças
DFDBA	Enxerto ósseo alógeno desmineralizado seco congelado
E	enxerto
F	fragmentos de matriz óssea
FS	fio de sutura
HE	Hematoxilina-eosina de Harris e Lison
I	interface
ITI	International Team for Implantology
L	leito receptor
M	tecido muscular
MO	tecido mielóide
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/kg/dia	miligrama por quilograma por dia
mg/l	miligrama por litro
mg/ml	miligrama por mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
ng/ml	nanograma por mililitro
O	formação óssea
O ₂	oxigênio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PKa	potencial de dissociação
PTFE-e	politetrafluoretileno expandido
RPM	rotação por minuto
TG	tecido de granulação

TGF- β	Fator de Crescimento de Transformação β
$\mu\text{g/kg/min}$	micrograma por quilograma por minuto
$\mu\text{g/ml}$	micrograma por mililitro
μM	micromolar



1	Introdução	30
2	Revisão da Literatura	35
3	Proposição	70
4	Material e Método	72
5	Resultado	83
6	Discussão	115
7	Conclusão	130
	Referências	132
	Anexo	147

A horizontal rectangular inset showing a histological section of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue shows various cellular structures and fibers in shades of pink and purple.

1 Introdução

1 Introdução

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado, composto de células e material intercelular calcificado. Possui as funções primordiais de suporte estrutural e reservatório de cálcio. Existem basicamente 2 tipos de ossificação, a intramembranosa a partir de membranas conjuntivas e a endocondral a partir de uma cartilagem (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). No entanto, Hollinger et al. (1999b) relataram não existir evidências bioquímicas, funcionais ou morfológicas entre os ossos de diferentes origens.

A estrutura óssea pode ser classificada quanto a sua densidade em osso cortical ou lamelar constituído por uma estrutura contínua, densa e compacta, com pouca atividade metabólica e poucas células, e osso medular ou esponjoso que tem por função receber cargas e responder rapidamente às necessidades fisiológicas (HOLLINGER et al., 1999b).

Após a exodontia, o processo alveolar perde a sua função de sustentar os dentes, levando ao longo dos anos a um processo de reabsorção (ASHMAN; BRUINS, 1985; ATWOOD, 1971; BHASKAR, 1978; TALLGREN, 1972). Essa reabsorção caracteriza-se por ser mais intensa nos primeiros 6 meses, ocorrendo de maneira crônica, progressiva, irreversível, cumulativa e contínua durante toda a vida do paciente (ATWOOD, 1971; HJORTING – HANSEN et al., 1983).

Atualmente, tem sido grande o interesse da odontologia em substituir os dentes perdidos por implantes osteointegrados. Contudo, a redução da massa óssea normalmente limita ou até mesmo impede sua colocação. Assim, com o intuito de reverter esta situação, surgiram diversas opções para reconstrução do

rebordo alveolar, utilizando-se de osso autógeno, assim como de materiais alógenos e aloplásticos que tenham a capacidade osteogênica, de osteoindução ou osteocondução (BOYNE; JAMES, 1980; RAGHOEBAR et al., 1993).

Apesar da busca incessante de alternativas para simplificar o procedimento cirúrgico e eliminar a morbidade cirúrgica da área doadora, até o presente momento, os enxertos ósseos autógenos são definidos como o “padrão ouro” dos enxertos e considerados a escolha preeminente para corrigir defeitos ósseos crânio-maxilares e mandibulares devido à qualidade e a previsibilidade relativamente alta de resultados bem sucedidos (FERNANDES et al., 1998; KARRING et al, 1999; THALLER, 1991).

Em 1964, Anderson et al., descreveram 4 estágios do processo de reparo do enxerto ósseo: revascularização, incorporação, substituição e remodelação. A revascularização ocorre em um período de duas semanas, através dos vasos sanguíneos no interior dos espaços medulares do enxerto. Na incorporação, dá-se o processo de união do enxerto ao osso hospedeiro. O osso doador, às vezes, não modifica suas características físicas. Na substituição, o enxerto ósseo é reabsorvido e substituído por osso novo. Na remodelação, os processos osteoclásticos e osteoblásticos levam à reabsorção do enxerto ósseo e devolução da arquitetura do osso hospedeiro. Burchardt e Enneking, em 1978, relataram que o processo de reparo do enxerto ósseo traduz-se na reabsorção paulatina do enxerto ósseo necrosado e substituição do mesmo por novo osso viável e que este processo está relacionado à revascularização do enxerto.

A neoformação óssea pode ocorrer a partir de três estádios: osteogênese, osteoindução e osteocondução. No caso do osso autógeno, eles ocorrem como uma sobreposição de eventos, permitindo uma formação óssea mais

rápida (GARG, 1999). Em 1983, Burchardt descreveu a biologia de reparo dos enxertos ósseos e relatou que a integração depende do íntimo contato com o enxerto, da seqüência de eventos e do equilíbrio dos processos que compreendem: proliferação de células osteoprogenitoras, diferenciação em osteoblastos, osteoindução, osteocondução e propriedades biomecânicas do enxerto.

Dada a complexidade das etapas envolvidas no processo de reparo, convém ressaltar que vários são os fatores locais e/ou sistêmicos que atuam retardando ou acelerando o tempo necessário para a completa reparação. Entre esses fatores, pode-se citar o tabagismo. Das inúmeras substâncias encontradas no cigarro tem-se a nicotina, situada entre as drogas mais nocivas à saúde e as mais universalmente consumidas, cujos efeitos podem ser expressos tanto sistêmica quanto topicamente.

A nicotina causa, entre outros efeitos, vasoconstrição periférica (FEITELSON et al., 2003; RIEBEL, et al., 1995; SILCOX et al., 1995; TAYLOR, 2001), isquemia tecidual (JONES e TRIPLETT, 1992) e diminui a tensão de oxigênio (JENSEN et al., 1991). Além disso, reduz a atividade do fibroblasto (ALPAR et al., 1998; HANES et al., 1991; TANUR et al., 2000; TIPTON e DABBOUS, 1995) e do osteoblasto (FANG et al., 1991; ROHN e RAMP, 1987; YUHARA et al., 1999), atrasa o processo de reparo de alvéolo de extração, interferindo na angiogênese e reepitelização do mesmo (PINTO et al., 2002) e é o principal fator patofisiológico que causa morbidade do enxerto ósseo e compromete a cicatrização óssea (DAFTARI et al., 1994; HOLLINGER et al., 1999a; NOCITI JÚNIOR et al., 2002a; SALDANHA, et al., 2004; UENG et al., 1997).

O intenso efeito vasoconstritor sobre a microvascularização, pode inibir a resposta angioblástica durante a revascularização na cicatrização dos enxertos ósseos (DAFTARI et al., 1994).

Assim, frente ao elevado número de pacientes fumantes e que necessitam de procedimentos cirúrgicos regenerativos, mais precisamente de enxertos ósseos autógenos, a fim de possibilitar posterior reabilitação com próteses implanto-suportadas, é relevante estudar os efeitos da nicotina, considerada uma das principais substâncias tóxicas do cigarro, sobre o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco.

A rectangular area with a pink and white marbled pattern, serving as a background for the title.

2 Revisão da Literatura

2.1 Enxerto ósseo autógeno

O tecido ósseo é definido como um tecido conjuntivo especializado, composto de células e material intercelular calcificado (matriz óssea); macroscopicamente classificado quanto à densidade em osso cortical ou lamelar, constituído por uma estrutura densa e compacta com pouca atividade metabólica e poucas células, e em osso medular ou esponjoso que responde rapidamente às necessidades fisiológicas (HOLLINGER et al., 1999b). Histologicamente é classificado em osso imaturo ou primário, com fibras colágenas dispostas irregularmente e sem orientação definida, e em osso secundário ou lamelar, altamente organizado apresentando lamelas que podem formar sistemas de Havers (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

O osso é uma estrutura altamente organizada, composta de matriz orgânica que confere resiliência e estabilidade e mineral inorgânico que confere rigidez, resistência e estabilidade (GROSS, 1997). Para exercer sua função de suporte e metabolismo, este responde a um complexo conjunto de fatores mecânicos, que primariamente controlam a formação óssea e fatores químicos que controlam a reabsorção óssea. A vascularização frente à densidade do osso compacto representa um desafio para o suporte neurovascular dos osteócitos internos e, para contornar essa situação, o suprimento neurovascular do osso compacto é organizado em canais Harvesianos dispostos longitudinalmente e canais de Volkmann, dispostos horizontalmente. Lamelas ósseas concêntricas se formam ao redor dos feixes neurovasculares, constituindo os osteons ou sistema de Havers. Esses sistemas fornecem uma circulação colateral que é altamente tortuosa e facilmente comprometida por trauma cirúrgico e/ou inflamação pós-operatória.

Assim, os vasos do periósteo são a principal fonte de nutrientes para o osso cortical. Quando o periósteo é removido, a camada osteogênica imediatamente adjacente à superfície óssea é destruída e o suprimento sanguíneo do osso compacto subjacente é comprometido (ROBERTS et al., 1987).

A implantodontia frente à perda óssea alveolar indica a utilização de biomateriais que está diretamente relacionada à adequação em altura, espessura e qualidade óssea do rebordo alveolar (CARVALHO et al., 2002). Seguindo este raciocínio, na colocação de implantes, os enxertos ósseos desempenham importante papel quando são necessários suporte estrutural e funcional (GARG, 2001; GROSS, 1997).

Enxertos são usados para fornecer um arcabouço para regeneração óssea, para promover união de fraturas e osteotomia, para restaurar defeitos resultantes de doença periodontal, de traumas, de patologias ou cirurgias, para preencher áreas de extração e/ou preservar, aumentar e/ou reconstruir o rebordo alveolar (GARG, 2001; GROSS, 1997; HISLOP et al., 1993). Estes têm sido realizados para melhorar os resultados dos implantes não somente quanto à preservação e aumento do rebordo alveolar e no reparo de defeitos ósseos, mas também nos procedimentos de levantamento do seio maxilar e preenchimento da lacuna óssea quando realizada osteotomia durante a cirurgia de implante (GROSS, 1997).

Existem 3 formas primárias de material de enxerto. A origem e composição dos materiais de enxerto normalmente determinam o mecanismo pelo qual eles atuam (MISCH; DIETSH, 1993). Assim estes podem ser classificados em: 1) autógeno, é um material orgânico capaz de formar novo osso através dos processos de osteogênese, osteoindução e osteocondução; 2) alógeno, pode ser de

natureza cortical ou trabecular, capaz de atuar como osteocondutores e osteoindutores, mas não são osteogênicos e 3) aloplástico, que pode ser natural ou sintético e são tipicamente osteocondutores (GARG, 1999; GROSS, 1997).

Apesar da busca incessante de alternativas para simplificar o procedimento cirúrgico e eliminar a morbidade cirúrgica da área doadora, até o presente momento, os enxertos ósseos autógenos são definidos como o “padrão ouro” dos enxertos ósseos e são considerados como primeira escolha para corrigir defeitos ósseos crânio-maxilares e mandibulares devido à qualidade e a previsibilidade relativamente alta de resultados bem sucedidos (FERNANDES et al., 1998; GROSS, 1997; KARRING et al., 1999; PIKOS, 2000; THALLER, 1991).

O enxerto ósseo autógeno é o material de escolha devido às suas propriedades osteogênicas que permitem que o osso se forme mais rapidamente e em áreas que requerem um aumento ou reparo ósseo significativo. É o único material capaz de neoformar osso a partir de uma sobreposição de eventos de osteogênese, osteoindução e osteocondução, permitindo uma formação óssea mais rápida (GARG, 1999, 2001; GROSS, 1997; MISCH; DIETSH, 1993).

Três diferentes processos estão associados ao sucesso dos enxertos ósseos: a osteogênese, osteoindução e osteocondução. Osteogênese é o processo pelo qual se processa o crescimento e desenvolvimento ósseo derivado de células viáveis, transferidas dentro de um enxerto. Um enxerto osteogênico é um material orgânico derivado de ou composto de tecidos vivos envolvidos no crescimento natural ou de reparo ósseo. Células osteogênicas podem incitar a formação óssea em tecidos moles ou ativar crescimento ósseo mais rápido em áreas ósseas. Osteoindução é o processo de estimulação da osteogênese. À medida que as células transplantadas morrem, as células ósseas do leito receptor remodelam o

enxerto por meio de reabsorção osteoclástica. As proteínas indutoras e os fatores de crescimento são liberados pelo osso transplantado, induzindo células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos e produzir novo osso. Enxertos osteoindutores podem ser usados para aumentar a regeneração óssea e pode até mesmo fazer com que tecido ósseo cresça ou se estenda para áreas onde normalmente não seria encontrado. Osteocondução consiste no fornecimento de uma matriz física ou arcabouço apropriado para deposição de novo osso. Enxertos osteocondutores contribuem para o crescimento ósseo e permitem aposição óssea a partir do osso pré-existente, mas não são capazes de produzir osso quando colocados no interior do tecido mole, portanto, para promover crescimento ósseo, um enxerto osteocondutor necessita da presença de osso pré-existente ou de células mesenquimais indiferenciadas (CARVALHO et al., 2002; GARG, 1999, 2001; GROSS, 1997; MISCH; DIETSH, 1993).

O processo de reparo de enxerto ósseo ocorre obedecendo, sequencialmente, as fases de revascularização a partir dos vasos sanguíneos presentes no interior dos espaços medulares do leito receptor; a de incorporação que resulta na união do enxerto ao leito receptor; a da substituição que consiste na reabsorção e substituição por osso neoformado e a da remodelação, caracterizada pelos processos osteoclásticos e osteoblásticos com o intuito de devolver a arquitetura do leito receptor (ANDERSON et al., 1964).

Deleu e Trueta (1965) compararam as características da revascularização de enxertos ósseos autógenos medulares e corticais de cobaias. Os autores observaram revascularização do enxerto medular como um todo, além de alta atividade de remodelação após o 8º dia. Os enxertos corticais, no 10º dia, demonstraram certa resistência, com conseqüente atraso na penetração inicial de

vasos sanguíneos nos canais Harvesianos, apesar de neste período já ter ocorrido início de deposição de tecido ósseo neoformado ao redor do enxerto. Apenas no 15º dia pode ser observada a revascularização quase completa dos canais Harvesianos e alta atividade de remodelação.

Em 1908, Barth (apud BURCHARDT; ENNEKING, 1978) determinou que grande parte do enxerto sofria necrose e que um reparo bem sucedido dependia do íntimo contato do enxerto com o leito vascular hospedeiro.

Burchardt e Enneking (1978) utilizaram o termo *creeping substitution* para descrever uma substituição gradual do enxerto ósseo, abrangendo processo de cicatrização e sua dinâmica reconstrutiva. Este processo consiste na substituição paulatina de osso velho necrótico por novo osso viável.

Os enxertos ósseos autógenos corticais e esponjosos apresentam características histológicas similares de reparo durante as duas primeiras semanas. Na primeira semana, áreas de coágulo sanguíneo são evidentes no leito receptor e uma intensa resposta inflamatória se faz presente com numerosos vasos e células. Na segunda semana, o tecido de granulação torna-se fibroso e ocupa todo o espaço do leito, notando-se redução do número de células inflamatórias e aumento da atividade osteoclástica. No interior do enxerto notam-se lacunas de osteócitos vazias (ABBOT et al., 1947; ALBEE, 1923; ENNEKING et al., 1975). A diferença histológica mais evidente do reparo de enxerto esponjoso e cortical é a taxa de revascularização deste último. Geralmente a revascularização dos enxertos corticais requer pelo menos duas vezes maior espaço de tempo que os enxertos esponjosos. Este prejuízo na revascularização pode ser atribuído à estrutura óssea cortical, uma vez que a penetração vascular do enxerto é o resultado primário da reabsorção

osteoclástica periférica e da infiltração vascular dos canais de Volkmann e Haversianos (ABBOT et al., 1947; ENNEKING et al., 1975).

A sequência do reparo de enxertos ósseos corticais ocorre pela revascularização inicial dos canais de Havers, reabsorção da matriz óssea, resultando em um aumento da porosidade e redução da radiodensidade e resistência. Posteriormente à união, ocorre diminuição da porosidade e retorno da resistência devido à neoformação óssea (ENNEKING et al., 1980).

Em 1980, Stroud et al., descreveram o reparo de enxerto ósseo autógeno interposicional cortico-esponjoso obtido da crista ilíaca após osteotomia total da maxila de macacas (*Macaca fascicularis*). Na 1ª semana, as áreas ao redor do enxerto estavam hipervascularizadas. O enxerto se apresentava praticamente íntegro, com áreas de neoformação óssea tanto no enxerto quanto no leito e com raros osteoclastos. Na 2ª semana observou-se a fase inicial da revascularização do enxerto, remodelação osteoclástica e neoformação óssea com algumas áreas de fusão leito enxerto além da presença de um tecido conjuntivo mais organizado. Na 4ª semana, fase tardia de revascularização do enxerto, com tecido conjuntivo maduro ao redor do enxerto e união óssea evidente, com numerosos osteoblastos ao redor do enxerto e das trabéculas ósseas indicando intensa atividade formadora. No 2º mês, a vascularização ao redor do enxerto estava completa, semelhante ao período pré-operatório. A remodelação interna e externa se fazia seguindo um padrão trabecular, com numerosos vasos penetrando no interior do enxerto. Uma união óssea evidente ocorria entre o enxerto e o leito. No 3º mês, observou-se união óssea e/ou fibrosa, adquirindo um padrão trabecular revestido de osteoblastos. Sequencialmente, no 6º mês, o quadro histológico mostrou-se semelhante ao encontrado no 3º mês.

A seqüência do processo de reparo apresenta as seguintes fases: inflamação que ocorre após minutos ou horas, a resposta osteoblástica que ocorre após horas ou dias, a osteoindução, após dias ou semanas e a osteocondução após meses ou anos. As mudanças celulares iniciais da osteogênese são tanto proliferativas quanto degenerativas. O osso esponjoso torna-se necrótico depois de enxertado e as mudanças degenerativas são vistas microscopicamente. Enquanto a maior parte das células do enxerto morre por anoxia ou autólise, algumas sobrevivem. As células sobreviventes se proliferam, invadem a medula necrótica e migram entre a superfície do osso hospedeiro e do enxerto autógeno, ou seja, migram para o espaço da interface. Acompanhando essas células ocorre um crescimento de componentes vascular e celular a partir do leito para o interior do enxerto. O complexo de proliferação das células deposita camada de osso no interior das trabéculas. A incorporação do enxerto ocorre pela reabsorção do osso autógeno necrótico e interconexão de depósito de osso neoformado. Em estágios posteriores, o osso é formado a partir de células devido à resposta indutora do leito hospedeiro. Ocorre então a remodelação do enxerto e do osso neoformado. A revascularização é essencial para os eventos de cicatrização do enxerto ósseo. No processo descrito da osteogênese, a revascularização inicial é importante para fornecer nutrição para as células sobreviventes da porção periférica do enxerto. Quando um suprimento sangüíneo é estabelecido precocemente, mais células sobrevivem e uma grande fonte de células é fornecida a partir do endóstio da medula óssea do enxerto esponjoso (BURWELL, 1985; URIST, 1980).

Logo após a realização do enxerto ósseo autógeno, o espaço da interface está preenchido por coágulo sangüíneo que será invadido pela vasculatura acompanhado de células osteoprogenitoras perivasculares que se diferenciarão para

formar tecido ósseo (BOYNE, 1966). No enxerto, existem também osteoblastos sobreviventes e pré-osteoblastos que se tornarão células formadoras de osso. Tal formação óssea a partir de osteoblastos é uma pequena parte do processo osteoindutivo. A indução óssea então, pode vir a partir do material do enxerto e dos próprios osteoblastos sobreviventes, da indução de células multipotenciais, ou pela indução de células primitivas oriundas da área medular do leito receptor. No entanto, o enxerto em bloco deve ser reabsorvido e este processo se inicia diversas semanas após a colocação do mesmo. A reabsorção completa leva anos e a substituição do bloco por osso lamelar é dependente dos mecanismos de remodelação (CAPELLI, 2003).

A cicatrização e a revascularização de enxerto ósseo autógeno *onlay* e enxerto alógeno liofilizado de costela, foram estudados em maxilas edêntulas de macacas. Os dados foram analisados após 8 meses. Os autores relataram que o padrão de revascularização foi similar, no entanto, a reabsorção do enxerto alógeno ocorreu aproximadamente 3 meses mais tarde quando comparado ao enxerto autógeno (MALETTA et al., 1983).

Burchardt em 1983 relatou que enxertos ósseos autógenos corticais e esponjosos apresentam histologicamente, três diferenças: 1) enxertos esponjosos são revascularizados mais rápido e completamente que enxertos corticais; 2) a substituição gradual do osso esponjoso envolve inicialmente uma fase de formação óssea aposicional, seguida de uma fase de reabsorção, ao passo em que enxertos corticais passam por um processo de substituição reverso; 3) enxertos corticais tendem a permanecer com uma mistura de osso necrótico e viável. Independentemente do tipo de enxerto, o processo de incorporação do enxerto é uma função do leito receptor e depende do íntimo contato com o tecido doador, da

seqüência de tempos e do equilíbrio dos processos interdependentes da: proliferação de células osteoprogenitoras, diferenciação de osteoblastos, osteoindução, osteocondução e propriedades biomecânicas do enxerto. O processo de remodelação é muito mais rápido nos enxertos esponjosos que nos corticais, e na porção esponjosa dos enxertos corticais.

O processo de angiogênese, tecido perivascular e células osteoprogenitoras a partir do leito receptor para o interior do enxerto são denominados de osteocondução e que em enxertos ósseos viáveis, é facilitado pelos processos osteoindutivos e, portanto ocorre mais rapidamente que em materiais não viáveis ou não biológicos (URIST, 1972).

Estudos sugerem que enxertos ósseos intramembranosos demonstram menor reabsorção que enxertos ósseos endocondrais. Apesar do enxerto esponjoso revascularizar mais rapidamente que o enxerto cortical, enxertos corticais intramembranosos revascularizam mais rapidamente que enxertos ósseos endocondrais com um componente esponjoso mais espesso. A revascularização mais rápida de enxertos ósseos intramembranosos em bloco é uma possível explicação para melhor manutenção do volume do enxerto, (HAMMACK; ENNEKING, 1960; KUSIAK et al., 1985; PIKOS, 2000; SMITH; ABRAMSON, 1974; ZINS, 1983) e que permite uma reabertura para colocação do implante após 4 meses, comparada aos 6 meses quando se usa enxertos endocondrais (WILLIAMSON, 1996).

O início do processo de reparo de enxertos ósseos pode ser incitado pela liberação de mediadores químicos do próprio enxerto necrosado, com conseqüente estimulação das células mesenquimais indiferenciadas que estão ao redor. Esses mediadores químicos são principalmente proteínas ósseas

morfogenéticas (BMP) que estão presentes na matriz óssea e, uma vez liberadas, estimulam a formação óssea local (SPRINGFIELD, 1992).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) foram primeiramente descritas por Urist em 1965, quando o mesmo observou a formação de um ossículo após implantação de matriz óssea desmineralizada no músculo de ratos e denominou este fenômeno de princípio da indução óssea e, posteriormente identificou uma proteína responsável por esse efeito. As BMPs são consideradas a “subfamília” da “superfamília” dos fatores de crescimento de transformação- β (TGF- β) (HOLLINGER; WONG, 1996). Até 2002, foram identificadas 13 moléculas individuais, destas, as BMPs 2, 4 e 7 são conhecidas por exercer um importante papel na cicatrização óssea devido à sua habilidade em estimular a diferenciação de células mesenquimais em uma linhagem osteocondroblástica, além de incitar o crescimento celular e formação óssea (LIEBERMAN et al., 2002).

Assim, sequencialmente, diversos estudos clínicos e experimentais foram realizados. Diferentes técnicas e áreas doadoras de enxertos ósseos foram avaliadas quanto ao processo de reparo e quanto à possibilidade ou não de instalação de implantes osteointegrados.

A técnica de enxerto ósseo autógeno em bloco obtido da sínfise mandibular foi descrita por Misch et al. em 1992, para tratar pacientes com defeitos ósseos alveolares localizados na maxila. Após 4 meses, os autores observaram uma completa incorporação do enxerto com volume ósseo suficiente para posterior colocação de implantes, além de mínima reabsorção e maior densidade óssea.

Em 1995, Misch e Misch utilizaram essa mesma técnica para reparação de defeitos ósseos alveolares severos e observaram melhor densidade

óssea e menor tempo de cicatrização quando comparado às técnicas de regeneração óssea guiada.

Jensen et al., 1995 utilizaram a borda inferior da mandíbula de cães com a intenção de avaliar o aumento vertical do rebordo com diferentes enxertos ósseos associados a implantes. Os materiais estudados foram: enxerto ósseo alógeno desmineralizado seco congelado (DFDBA) com ou sem irradiação para esterilização, enxerto autógeno cortico-esponjoso do íliaco, coágulo sanguíneo e controle. O enxerto autógeno foi estudado com e sem membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Os resultados demonstraram melhora no volume do enxerto ósseo incorporado e no contato da interface osso-implante com o uso de membranas. O enxerto autógeno demonstrou melhor desempenho que o enxerto alógeno e a irradiação pareceu não interferir no desempenho do enxerto alógeno.

Raghoobar et al., em 1996, avaliaram o aumento de rebordo alveolar maxilar estreito, obtendo enxertos ósseos autógenos intra-orais para a inserção de implantes para substituição por elementos dentários isolados. Para isso, selecionaram 27 pacientes com defeitos locais na região anterior da maxila. Os enxertos monocorticais intra-orais foram coletados do mento (12), da tuberosidade maxilar (8) ou da área retromolar da mandíbula (7). Passados 3 meses, as áreas enxertadas apresentaram volume ósseo suficiente para a colocação de 23 implantes Branemark e 8 ITI. Após aproximadamente 37 meses, todos os implantes estavam osteointegrados e funcionando bem. Os autores concluíram que enxerto ósseo autógeno intra-oral para tratar defeitos alveolares locais na maxila, parece ser um modelo confiável que possibilita a colocação de implantes.

Williamsom (1996) realizou um estudo prospectivo com o intuito de desenvolver um protocolo para reabilitação de maxila e mandíbula reabsorvida utilizando enxerto ósseo autógeno removido da crista ilíaca, costela ou mandíbula. Apenas um paciente recebeu enxerto alógeno congelado da cabeça do fêmur. Assim, 114 implantes foram colocados em 30 pacientes nas áreas que receberam o enxerto. Doze implantes foram removidos de 3 pacientes, sendo que um deles era fumante. Vinte e oito pacientes receberam próteses fixas implanto-suportadas e dois receberam sobredentaduras. Estes resultados representaram uma taxa de sucesso de 100% na mandíbula e 86% na maxila.

Buser et al., em 1996 avaliaram a previsibilidade e resultado do tratamento com enxertos ósseos autógenos associados à membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e) para um aumento lateral de rebordo de pacientes parcialmente edêntulos. Quarenta pacientes foram consecutivamente tratados e após 7 a 13 meses as áreas foram reabertas para remoção da membrana e colocação dos implantes. Trinta e oito pacientes exibiram excelente aumento de rebordo. As mensurações realizadas antes e após os procedimentos de enxerto, mostraram um aumento da largura da crista do rebordo de uma média de 3,5mm, para 7,1mm e que possibilitou posterior colocação de implantes nos 40 pacientes. Os autores concluíram que o tratamento combinado utilizado é previsível e resulta em um aumento da crista óssea alveolar em pacientes parcialmente edêntulos. O enxerto autógeno sustenta a membrana e ativa a formação óssea com suas propriedades osteocondutoras e osteoindutoras. A membrana atua como uma barreira física evitando a penetração de células não osteogênicas e protege o enxerto contra reabsorção durante a cicatrização.

Kahnberg, em 1998, utilizaram o coelho como modelo experimental para estudar a cicatrização de enxertos ósseos *onlay*, descrevendo o aspecto histológico após 6 semanas e 6 meses. Um bloco de osso autógeno foi removido do rádio e fixado com dois parafusos de titânio na base inferior da mandíbula. Após 6 semanas a reabsorção e neoformação foi observada na área receptora em contato com o enxerto. Atividade de remodelação foi notada na porção cortical do enxerto. Após 6 meses, a reabsorção continuou e estava concentrada nas bordas, ou seja, na camada cortical do enxerto. Os autores concluíram que o coelho é um modelo animal útil para estudar a cicatrização de enxertos ósseos *onlay* e a interação de implantes com os enxertos ósseos.

Merkx et al., em 1999a avaliaram a resposta regenerativa de 3 tipos de enxertos ósseos em bloco, sendo 2 autógenos, um cortical e outro esponjoso. O terceiro enxerto, ósseo foi xenógeno mineral reabsorvível comercialmente disponível (Bio-Oss®). Os enxertos foram colocados em 4 defeitos ósseos críticos, padronizados no osso frontal, sobrejacente ao seio paranasal de 15 cabras. Esses defeitos foram preenchidos ou com osso cortical, ou esponjoso, ou osso mineral reabsorvível (Bio-Oss®), ou foram mantidos vazios. Marcadores ósseos de fluorocromo foram injetados subcutaneamente 1 e 5 semanas após a realização do enxerto e 1 semana antes da eutanásia, que foi realizada após 3, 6, 12 e 24 semanas pós-cirúrgica. Os dados histológicos mostraram melhor aceitação e incorporação dos enxertos ósseos autógenos. Já o osso mineral reabsorvível foi gradualmente reabsorvido por células multinucleadas semelhantes a osteoclastos.

Em um outro estudo, Merkx et al. (1999b) utilizando a mesma metodologia, compararam a resposta regenerativa do osso autógeno particulado cortical e esponjoso e do osso mineral reabsorvível particulado (Bio-Oss®) entre si e

com os resultados obtidos dos enxertos em bloco realizados no estudo anterior. Os autores concluíram que o osso esponjoso particulado é o material de escolha para defeitos ósseos maxilofaciais, onde não existe necessidade de resistência mecânica, e cicatrizam da mesma maneira que os enxertos ósseos autógenos esponjosos em bloco. Comparativamente, o osso particulado cortical não deveria ser usado como o único material frente a essas condições. O bloco cortical utilizado como único material, ofereceu melhores resultados. Já o uso de osso mineral reabsorvível em defeitos de tamanho crítico, não estimularam a osteocondução, mas aumentaram a atividade osteoclástica.

Pikos (2000) usou de enxertos ósseos autógenos em bloco para reconstrução da parte posterior da mandíbula, salientando a importância do preparo do leito receptor e de se aguardar o tempo necessário da cicatrização do enxerto para posterior colocação de implantes. A colocação de implantes na porção posterior de mandíbulas edêntulas representa um desafio devido a deficiências na qualidade e quantidade óssea. Desta maneira, enxertos ósseos autógenos mandibulares em bloco podem ser usados de maneira previsível para aumentar o volume e a densidade óssea, permitindo a colocação de implantes de diâmetro largo, facilitando a distribuição do estresse e aumentando a longevidade dos mesmos.

Carvalho et al., (2000), estudaram a influência do preparo do leito receptor na incorporação de enxertos ósseos autógenos em cães. Os enxertos foram removidos da área posterior da mandíbula e fixados com parafusos na região de pré-molares em 3 diferentes leitos receptores: 1) cortical; 2) perfurado; 3) decorticalizado. Os resultados foram avaliados aos 45 dias tomando-se como parâmetro as áreas de integração associadas às áreas de interposição de tecido conjuntivo na interface, além de reabsorção clinicamente detectável; áreas de

integração leito/enxerto constituídas de osso primário com amplos espaços medulares e integração total do enxerto ao leito. Os melhores resultados foram obtidos principalmente nos grupos que tiveram os leitos perfurados e decorticalizados e que provavelmente se atribui a uma revascularização mais rápida, mantendo a vitalidade dos enxertos. Assim, os autores concluíram que o resultado do enxerto ósseo difere de acordo com o tipo de preparo da área receptora.

Jardini (2001) avaliou em ratos, o processo de reparo de enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Sessenta ratos machos foram igualmente divididos em dois grupos. Um grupo que recebeu enxerto associado à membrana (M) e outro que recebeu somente o enxerto (E). O osso autógeno em bloco foi coletado da calvária do animal e fixado, com ou sem membrana, próximo ao ângulo da mandíbula. Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 0 hora, 7, 14, 21 e 45 dias. A análise histológica descritiva do processo de reparo no período de zero hora demonstrou, em ambos os grupos, interface com superfícies regulares, presença de coágulo sangüíneo e raras esquírolas ósseas. No período de 7 dias, no grupo E, a superfície externa do enxerto mostrou-se discretamente irregular, indicando reabsorção/aposição óssea associadas a formação de alguma trabéculas ósseas imaturas. O espaço da interface exibiu algumas áreas de osso imaturo neoformado proveniente da superfície do leito receptor, estabelecendo união com o enxerto; no grupo ME foi observado típico tecido de granulação entre o enxerto e o leito com algumas áreas associadas ao coágulo sangüíneo, além da neoformação óssea, unindo o leito ao enxerto em algumas áreas. No período de 14 dias, o grupo E exibiu áreas de osso imaturo formando “pontes” de união entre o enxerto e o leito, assim como áreas de tecido conjuntivo interposto; no grupo ME, havia formação de

“pontes” unindo não só o enxerto ao leito como as bordas laterais do enxerto sob a membrana. Aos 21 dias, no grupo E, grande parte da interface apresentou ligação entre leito receptor e enxerto. No grupo ME a interface exibiu áreas de integração do enxerto ao leito, além de neoformação óssea no leito além dos limites da borda lateral do enxerto ainda sob a membrana. Por fim, aos 45 dias, o grupo E demonstrou fusão total do enxerto ao leito, exibindo maior reabsorção das bordas laterais; o grupo ME, apresentou maior parte do enxerto integrado ao leito, condição esta também observada na borda lateral do enxerto. Desta forma, a autora concluiu que o reparo aos 7 e 14 dias foram semelhantes para ambos os grupos. No entanto, após 21 dias, enxerto ósseo autógeno sem membrana apresenta uma reabsorção significativa, enquanto que a associação do uso da membrana proporcionou neoformação óssea adicional preenchendo o espaço subjacente à membrana.

Azem em 2002, realizou um estudo seguindo a metodologia empregada por Jardini (2001), no entanto teve por objetivo descrever a revascularização do enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de PTFE-e. Trinta ratos foram igualmente divididos em grupo enxerto autógeno (E) e grupo enxerto autógeno associado à membrana (ME). Os animais foram submetidos à eutanásia nos períodos de 0 hora, 3, 7, 14 e 21 dias. A autora concluiu que a revascularização do grupo E foi a partir de vasos oriundos do leito receptor e do tecido conjuntivo circunjacente, ao passo em que no grupo ME, esta teve origem somente a partir do leito receptor. Assim, observou-se que a revascularização ocorreu de maneira mais intensa e extensa no grupo E.

A perda de dentes e a doença periodontal com frequência resultam em um volume ósseo inadequado para a colocação de implantes. Capelli em 2003 relatou que enxertos ósseos autógenos intra-orais oferecem uma opção de

tratamento bem-sucedida para a recuperação do volume ósseo original. O autor descreve a técnica para uma fácil obtenção de enxertos ósseos autógenos da área retromolar e o processo de cicatrização, concluindo que este tipo de enxerto oferece diversas vantagens na reconstrução de rebordo alveolar para colocação de implantes, entre elas, curto período de cicatrização (4-6 meses), mínima reabsorção, além de qualidade óssea associada à alta densidade e alta estabilidade primária para implantes.

Orsini et al., em 2003 avaliaram os resultados histológicos de enxertos ósseos autógenos da calvária para reconstrução maxilar antes da colocação de implantes em dois pacientes. Assim, passados 4 meses da realização do enxerto, os dois pacientes foram submetidos à biópsia nas regiões aumentadas e os implantes posicionados. Os resultados mostraram incorporação do enxerto, além de características de tecido ósseo compacto e maduro. A análise dos implantes com carga após 15 meses exibiu estabilidade e osteointegração. Os autores concluíram que enxertos *onlay* da calvária pode ser um método previsível e bem sucedido para aumento maxilar, permitindo adequado posicionamento de implantes e restaurações protéticas estáveis.

Nystrom et al., em 2004 realizaram um estudo prospectivo de acompanhamento de enxertos ósseos *onlay* e implantes em maxilas severamente reabsorvidas. Trinta pacientes nas condições supracitadas foram encaminhados para tratamento com implantes. Neste contexto, foi necessário um aumento da crista alveolar com enxerto ósseo removido da crista ilíaca associado à colocação de implantes. Exames clínicos e radiográficos foram realizados de 6 em 6 meses nos primeiros 5 anos e anualmente após o 5º ano. A taxa de sucesso dos implantes foi de 83,1%. O autor observou uma grande quantidade de aumento ósseo frente à

utilização de enxertos autógenos nos pacientes com a maxila severamente reabsorvida.

2.2 Nicotina

A OMS estima que haja 1,1 bilhão de fumantes no mundo, sendo que, destes, 88 milhões vivem em países em desenvolvimento. Esta estimativa gerou uma expectativa de 10 milhões de mortes em 2003, sendo que 70% delas seriam nos países em desenvolvimento.

Dentre as mais de 4000 substâncias tóxicas encontradas no cigarro, podemos destacar, entre outras, compondo a fase gasosa, o monóxido e dióxido de carbono, o cianidro de hidrogênio, radicais oxigenados, acetona, formaldeído, acroleína, amônia. Compondo a fase particulada (ou líquida), entre outras temos a nicotina, o alcatrão, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, níquel. (CATTANEO et al., 2000; SHERWIN; GASTWIRTH, 1990; TONETTI, 1998).

A OMS classifica a nicotina como uma droga psicoativa que causa dependência e, por esse motivo, o tabagismo é classificado pelo Código Internacional de Doenças (CID-10) dentro do grupo das substâncias psicoativas que causam transtornos mentais e de comportamento.

A nicotina é o principal alcalóide das folhas do tabaco (*Nicotiana tabacum*), trata-se de uma base volátil ($PK_a=8,5$), inodora, incolor, que fica acastanhada e adquire odor do tabaco quando exposta ao ar (TAYLOR, 2001). É uma das drogas mais nocivas à saúde e a mais universalmente consumida, sendo de considerável importância medicinal dada a sua alta toxicidade. É considerada responsável basicamente por dois fatores: vasoconstrição e dependência. (READ, 1984).

A nicotina absorvida pelo organismo é rapidamente convertida em cotinina, seu principal metabólito (MOROZUMI et al., 2004). Seus níveis são relatados por permanecer relativamente constantes em fumantes ativos por longos

períodos de tempo. A nicotina apresenta meia-vida sérica de aproximadamente 1-2 horas (MCGUIRE et al., 1989), ao passo em que a da cotinina é de 20 horas (SCOTT et al., 2001).

Os possíveis mecanismos pelos quais a nicotina pode influenciar a cicatrização de feridas são: 1) redução da proliferação de células vermelhas, fibroblastos e macrófagos; 2) aumento da adesividade plaquetária, com conseqüente formação de microcoágulos, redução da microperfusão e eventual isquemia tecidual; 3) vasoconstrição cutânea que resulta na liberação de catecolaminas adrenal e periférica com conseqüente aumento dos batimentos cardíacos, da pressão sangüínea e da demanda de oxigênio (KWIATKOWSKI et al., 1996), além da produção de hormônios denominados calonas que retardam a epitelização (SILVERSTEIN, 1992).

Várias têm sido as maneiras de se investigar os efeitos da nicotina sobre a biologia dos tecidos vivos. Assim, Murrin et al. (1987) fizeram considerações metodológicas sobre diferentes formas de administração de nicotina em ratos. Quando a droga era administrada na água de beber contendo 0,02%, 0,1% ou 0,2%, consideraram não ser um método satisfatório, visto que os animais passaram a consumir menor quantidade de água (50%) quando comparado ao controle. A administração em uma dieta líquida, embora melhor que o anterior, resultou em menor ganho de peso dos animais, sugerindo interferência da nicotina na absorção de alguns nutrientes. Já o uso de mini-bombas osmóticas foi, comparativamente, o melhor método, sem interferências no consumo de água e ganho de peso, além de resultar em níveis plasmáticos de nicotina e cotinina similares ao relatado em humanos. Sipe et al., (2000) desenvolveram um protocolo experimental de administração de nicotina em coelhos, utilizando-se de adesivos de nicotina ou

vaporizador nasal. A droga foi administrada em três diferentes doses: 2,5, 5 ou 10mg. Os níveis sistêmicos de nicotina e cotinina foram avaliados nos períodos de zero hora e após 15 minutos, 8 e 24 horas. Os coelhos tratados com os adesivos exibiram os níveis séricos significativamente mais altos e consistentes com o nível médio diário encontrado em pacientes fumantes (5 – 25ng/ml).

O fibroblasto, considerado a principal célula responsável pela produção, manutenção e integridade do tecido conjuntivo, tem suas funções alteradas pela nicotina, rompendo os processos metabólicos normais, síntese de colágeno e produção de proteína, e as respostas normais de cicatrização da ferida, dificultando desta forma a manutenção da integridade tecidual e estimulando a destruição (HANES et al., 1991; TIPTON; DABBOUS, 1995;).

Diversos estudos relataram resultados semelhantes dos efeitos da nicotina sobre as várias funções de fibroblastos, dentre as quais podemos citar a diminuição ou inibição da proliferação celular (ALPAR et al., 1998; GIANNOPOULOU et al., 1999; JAMES et al., 1999; TANUR et al., 2000; TIPTON; DABBOUS, 1995), da adesão celular (GIANNOPOULOU et al., 1999; JAMES et al., 1999; RAULIN et al., 1988; TANUR et al., 2000) e da migração celular (GIANNOPOULOU et al., 1999). Além da inibição da produção de fibronectina, de colágeno tipo I e do aumento da collagenase (TIPTON; DABBOUS, 1995) temos também a inibição da produção de fosfatase alcalina (GIANNOPOULOU et al., 1999).

Coletando amostras de saliva e fluido sulcular de pacientes fumantes e não-fumantes e avaliando através da técnica de cromatografia, McGuire et al. (1989) relataram que os níveis de cotinina apresentavam-se elevados, principalmente a concentração média oriunda do fluido sulcular (2457ng/ml), que foi comparativamente 5 a 6 vezes maior que a concentração média encontrada na

saliva (424ng/ml). Estes dados levaram os autores a acreditar que a presença da cotinina no fluido sulcular e na saliva refletem a extensa distribuição sistêmica da nicotina em fumantes, além de ser um efetivo marcador bioquímico.

Hanes et al. (1991) avaliaram a ligação, absorção e liberação de nicotina (radioativamente marcada em concentrações de 0.1 μ M e 10 μ M) pelos fibroblastos gengivais e se essa ligação observada era ou não de natureza específica. Os autores puderam observar que a nicotina ligava-se ao fibroblasto e era absorvida de maneira rápida e contínua por 4 horas. Contudo, dos produtos excretados pelos fibroblastos, um terço era de nicotina não metabolizada, sugerindo que altos índices de nicotina intracelular poderiam interferir com as funções celulares normais.

Em 1993, Peacock et al., examinaram o efeito de diferentes concentrações de nicotina (0.025, 0.05, 0.1, 0.2 e 0.4 μ M) sobre a reprodução e inserção de fibroblastos gengivais *in vitro*. Os autores, diferentemente dos trabalhos encontrados na literatura, observaram que a adesão de fibroblastos gengivais às placas de cultura foi diretamente proporcional às concentrações de nicotina, enquanto a reprodução celular foi estimulada somente frente às baixas concentrações. Segundo os autores, existem outras substâncias presentes no tabaco além da nicotina, que podem ser responsáveis pelos efeitos nocivos frente às respostas teciduais. Seguindo esta linha de raciocínio, encontramos no trabalho de Cattaneo et al. (2000) que os fibroblastos gengivais humanos frente aos componentes voláteis do cigarro, tais como a acroleína e o acetaldeído, apresentaram inibição da inserção e proliferação de maneira dose-dependente *in vitro*.

Tipton e Dabbous (1995) examinaram os efeitos da nicotina sobre as funções dos fibroblastos nos processos de proliferação, produção e degradação de colágeno e produção de fibronectina, empregando concentrações de 0,075% a 0,001% de nicotina que corresponde a concentrações maiores que as utilizadas por Peacock et al. (1993), no entanto, eram semelhantes às detectadas na saliva de fumantes (0.001% a 0.075% ou 0.06mM a 5mM). Os resultados demonstraram inibição da proliferação celular, da produção de fibronectina e de colágeno tipo I, além de induzir a formação de vacúolos transitórios. Em doses maiores causou morte celular e aumento da produção de colagenase. Esses resultados sugeriram que a nicotina pode prejudicar a habilidade dos fibroblastos em manter a integridade do tecido conjuntivo gengival, ou mesmo de repará-lo, por promover a destruição da matriz pelo aumento da atividade da colagenase.

Alpar et al. em 1998 estudaram a citotoxicidade da nicotina (0.48mM a 62mM) em fibroblastos gengivais e do ligamento periodontal de humanos. As células expostas à nicotina apresentaram-se com formato atípico (arredondado) e com vacúolos. Concentrações maiores que 3.9mM mostraram redução na proliferação além de mudanças morfológicas e estruturais com os filamentos desordenados e maiores que 7.8mM, redução na síntese de proteína. Os autores concluíram que esses efeitos prejudiciais da nicotina podem ocorrer *in vivo* e consequentemente prejudicar o potencial reparativo e regenerativo dos tecidos periodontais de indivíduos que fazem uso de produtos do tabaco.

Os efeitos da nicotina e cotinina sobre a inserção e proliferação de fibroblastos humanos do ligamento periodontal *in vitro* foram investigados por James et al. (1999). Para tal, foram utilizadas 14 concentrações de nicotina (de 5ng/ml até 10mg/ml) e 10 concentrações de cotinina (de 0.5ng/ml até 10µg/ml). A proliferação e

aderência celular foram inibidas pela nicotina em concentrações maiores que 1mg/ml, no entanto, a cotinina só inibiu na concentração mais alta de 10µg/ml. Os autores sugeriram que o atraso observado no processo de reparo em fumantes pode ser decorrente da inibição direta das funções reparadoras dos fibroblastos pela nicotina e cotinina.

Tanur et al. em 2000 estudaram os efeitos da nicotina sobre a força de adesão de fibroblastos gengivais humanos em superfícies radiculares de dentes livres de doença periodontal e em superfícies de vidro. Após cultura das células, os fibroblastos foram incubados com os substratos na presença das seguintes concentrações de nicotina: zero (controle), 25, 50 e 100ng/ml (experimentais). Após incubação (48 horas) ambos os grupos (controle e experimental) foram submetidos a forças rotacionais de 100, 150 e 200 RPM, durante 30 minutos e então avaliadas por microscopia de luz e varredura. O grupo controle apresentou um arranjo de células achatadas e geralmente uniformes, exibindo alinhamento paralelo e com um mínimo de sobreposição. O grupo experimental exibiu orientação desordenada com sobreposições freqüentes. Os autores conjecturaram que a nicotina afeta diretamente a inserção de fibroblastos em níveis associados àqueles rotineiramente encontrado em fumantes (22,6 a 73ng/ml – HILL et al.,1983) e que em locais onde a cicatrização é crítica, a nicotina pode ser um fator desfavorável na determinação do resultado do reparo.

Neste mister, muitos trabalhos e relatos clínicos têm mostrado efeitos adversos da nicotina no processo de cicatrização de feridas.

Mosely e Finseth (1977) apresentaram o caso de um paciente, fumante inveterado, com uma úlcera na extremidade do dedo da mão que não cicatrizava. Através de arteriografia, foi possível verificar os efeitos da nicotina na

vasoconstrição, sendo restabelecida a circulação após o paciente ter deixado de fumar e a cicatrização ocorreu normalmente. Mosely et al., em 1978 conjecturaram que o uso do tabaco poderia levar a uma vasoconstrição que por sua vez afetaria a cicatrização de ferida. Para isso confeccionaram feridas quadradas (2X2) na orelha de coelhos, que foram divididos em grupo controle e grupo experimental. O grupo experimental recebeu doses de nicotina intraperitonealmente na dosagem de 2mg/kg, duas vezes ao dia, iniciando 5 dias antes e indo até 21 dias após a confecção das feridas. Os autores observaram prejuízo na cicatrização de feridas do sexto ao décimo dia e chegaram à conclusão que a nicotina afeta a cicatrização, mas não é capaz de impedi-la.

Reus et al. (1984) fizeram um estudo com o intuito de determinar os efeitos agudos do cigarro sobre o fluxo sanguíneo na micro-circulação cutânea da orelha de ratos. As arteríolas terminais de 11 a 15 mm de diâmetro foram selecionadas e observadas durante e 15 minutos após a inalação da fumaça do cigarro. Os autores notaram uma vasoconstrição arterial em resposta à inalação da fumaça do cigarro. Quando comparado com os valores aferidos prévios à inalação, o diâmetro dos vasos diminuiu para 92% e retornou gradualmente ao normal.

Lawrence et al. (1984) expondo um grupo de 10 ratos à fumaça do cigarro, equivalendo a aproximadamente 25 cigarros por dia durante 5 dias após a realização de um retalho de McFarlane (10X4cm) rebatido no dorso dos animais, relataram uma taxa de apenas 40% de sobrevivência de retalhos expostos à fumaça do cigarro.

Craig e Rees (1985) também relataram prejuízo no processo de cicatrização de retalhos de 4cm² realizados no dorso de hamsters, quando os mesmos eram expostos à inalação da fumaça do cigarro, correspondente àquela

encontrada em fumantes inveterados (2 maços/dia). Trinta hamsters foram divididos em 3 grupos, sendo um controle, um que inalou a fumaça do cigarro 6 semanas antes da cirurgia e outro que inalou 6 semanas antes e 2 semanas após a realização do retalho no dorso. Os resultados obtidos levaram os autores concluírem que o efeito nocivo do fumo sobre a cicatrização de feridas pode ser reduzido de maneira significativa se o hábito de fumar for cessado no período pós-operatório.

Nolan et al., (1985) avaliaram os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre a cicatrização de retalhos tipo McFarlane realizados no dorso de ratos. Os autores encontraram aumento da isquemia tecidual com conseqüente risco de necrose parcial e/ou total do retalho.

Richardson (1987) avaliou em humanos, a velocidade do fluxo sanguíneo e o diâmetro de capilares na cutícula, após o consumo de 3 cigarros com 0,50, 0,98 ou 1,90mg de nicotina. Apesar de ter-se encontrado uma redução significativa do fluxo sanguíneo, esta não estava relacionada aos diferentes conteúdos de nicotina. O autor conjecturou que este não é um método tão sensível para essa mensuração quanto o da artéria digital utilizado em um estudo em 1986 por ele realizado.

Em 1991, Jensen et al., encontraram uma brusca redução na tensão de oxigênio no tecido subcutâneo de humanos em resposta ao fumo. O declínio inicial da tensão de O_2 ocorreu 10 minutos após iniciado o consumo do cigarro. Os autores sugeriram que a vasoconstrição periférica induzida pelos efeitos adrenérgicos da nicotina poderiam ter contribuído para a redução observada. Esta redução parece, no estudo de Benowitz, (1988) estar coincidente com o pico do nível sanguíneo de nicotina.

Os produtos do cigarro, além dos problemas já mencionados, parecem também interferir na parte óssea.

O tabaco é um relevante fator de risco para a diminuição do conteúdo mineral ósseo (BENSON; SHULMAN, 2004; FUNG et al., 1999), da densidade óssea (SPARROW et al., 1982); dos níveis de vitamina D (FUNG et al., 1999), da aposição óssea e formação de matriz mineralizada (FUNG et al., 1999; GALVIN et al., 1988; PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991; ROHN; RAMP, 1987; VERNEJOUL et al., 1983) e do crescimento e diferenciação de células ósseas (FANG et al. 1991; PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991; YUHARA et al., 1999), além de alterações na morfologia celular óssea tais como arredondamento e formação de vacúolos (PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991).

McDermott e Witte (1988) avaliaram a massa óssea de 70 pacientes dos quais 35 eram fumantes e 35 não-fumantes. Todos os indivíduos foram agrupados quanto ao gênero, idade, massa corporal, altura, nível de cálcio e para o gênero feminino histórico de menopausa e reposição de estrógeno. Os pesquisadores não encontraram qualquer diferença entre fumantes e não fumantes, concluindo que o fumo não tem efeito direto sobre a massa óssea. Contudo, poderia ter influência indireta no processo de perda óssea, quando associado a fatores tais como idade/menopausa, massa corporal, dieta e possivelmente à atividade física. Neste contexto, Rapuri et al. (2000) relataram uma possível associação entre o fumo e a osteoporose por terem encontrado uma redução da densidade óssea mineral em mulheres idosas pós-menopausa e fumantes.

Sherwin e Gastwirth (1990) fizeram uma revisão sobre os efeitos nocivos do cigarro e seus constituintes. Relataram que a nicotina e o monóxido de carbono foram os principais componentes do cigarro que pareceram influenciar a

cicatrização de feridas, inibindo a epitelização, danificando componentes celulares sanguíneos e gerando hipóxia celular. Frente a esses relatos, os autores recomendaram a cessação do fumo no período peri-operatório, a fim de evitar as consequências nocivas na cicatrização de feridas.

Pinto et al. em 2002 puderam concluir que a nicotina diluída na concentração de 5mg/kg, e dosagem de 3mg/kg injetada no subcutâneo de ratos, foram capazes de promover um atraso no processo de reparo de alvéolo de extração dental, interferindo na angiogênese e reepitelização do mesmo. Esta redução na reepitelização, de acordo com Peacock e Van Winkle, (1976) estaria associada a catecolaminas que atuam como co-fatores na formação de hormônios denominados calonas, conhecidos por inibir a epitelização.

Jones e Triplett (1992) avaliaram pacientes fumantes e não fumantes submetidos a enxerto ósseo autógeno e simultânea colocação de implante. Dos casos que apresentaram deiscências e/ou infecções no pós-operatório, com conseqüente perda de osso e/ou do implante, 80% eram fumantes.

Investigando a hipótese da nicotina oriunda da fumaça do cigarro inibir a vascularização de enxertos ósseos autógenos devido à sua ação farmacológica sobre a microvascularização, Daftari et al. (1994) estudaram os efeitos da droga na implantação de um enxerto ósseo autógeno esponjoso da crista ilíaca, na câmara anterior do olho de coelhos. Os 24 animais foram equitativamente divididos em dois grupos. Esses dois grupos foram subdivididos em tratado (n=6) e placebo (n=6) e então submetidos à eutanásia aos 16 e 30 dias pós-cirúrgico. O grupo tratado caracterizou-se por receber a dosagem de 6µg/kg/min, que resultava em níveis séricos de 10-70ng/mL que corresponde àquele encontrado em humanos após fumar, de acordo com Benowitz e Jacobs (1984). O grupo placebo

caracterizou-se por receber albumina. Ambas as administrações foram feitas de maneira contínua e por intermédio de mini-bombas osmóticas implantadas subcutaneamente. Os autores concluíram que a nicotina inibe a resposta angioblástica, contudo não impede a revascularização do enxerto.

Riebel et al., (1995) avaliaram em coelhos, o efeito da nicotina sobre os processos de revascularização e incorporação de enxerto ósseo autógeno da crista ilíaca, implantado em um defeito lateral distal do fêmur. O grau de revascularização foi determinado por um sistema de análise de imagem semi-automatizado. Os resultados demonstraram que dosagens uniformes de nicotina através de mini-bomba osmótica de liberação contínua implantada no subcutâneo dos animais, reduziram a revascularização do enxerto e que esses efeitos foram reversíveis após 2 semanas sem nicotina.

Com a intenção de determinar a função constritora e/ou dilatadora da nicotina sobre os vasos que regulam o fluxo sanguíneo para ossos intactos, Feitelson et al. (2003) aplicaram, em ratos machos maduros, nicotina (1.7 mg/kg/dia) ou solução salina, subcutaneamente, através de mini-bombas osmóticas, durante duas semanas. Os resultados demonstraram que a nicotina aumentou seletivamente a resposta constritora da vascularização óssea em resposta à norepinefrina exógena, concluindo que esse aumento da constrição poderia levar a uma redução crônica do fluxo sanguíneo para o tecido ósseo. Esta ação vasoativa da nicotina já foi relatada em 1976 por Cryer et al. em que o fumo induz a liberação de norepinefrina e epinefrina resultando em vasoconstrição e redução da perfusão tecidual.

Estudos em ortopedia foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da inalação intermitente da fumaça do cigarro sobre a regeneração óssea de

tíbias de coelho submetidas à distração osteogênica. Em um dos estudos, Ueng et al. (1997), observaram que a substituição do tecido de granulação, formação óssea e remodelação foram prejudicadas, nos animais que inalaram a fumaça do cigarro. Em um outro estudo dois anos mais tarde, Ueng et al. seguindo a mesma metodologia, relataram que a utilização da terapia com oxigênio hiperbárico atenuou os efeitos adversos provocados pelo cigarro sobre a cicatrização óssea.

Estudos também têm sido realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da nicotina sobre o tecido esquelético. Em 1999, Syversein et al., realizaram um estudo sobre os efeitos deletérios da inalação de nicotina sobre a densidade óssea mineral e propriedades mecânicas do tecido ósseo de ratas. Os animais foram expostos ao vapor de nicotina 20 horas por dia, 5 dias da semana durante 2 anos, propiciando uma concentração plasmática de nicotina de aproximadamente 100ng/ml. Esta concentração, segundo os autores não afetou o bem estar dos animais. Considerando os parâmetros avaliados, os autores não detectaram qualquer efeito negativo da inalação da nicotina sobre a densidade óssea mineral e as propriedades mecânicas do tecido ósseo.

Em 2000, Iwaniec et al., avaliaram os efeitos da nicotina sobre o conteúdo mineral, densidade e resistência óssea de ratas em crescimento. Os animais receberam subcutaneamente via mini-bombas osmóticas: soro (controle), 3mg/kg/dia ou 4,5mg/kg/dia de nicotina durante 2 e 3 meses. Os autores concluíram que apesar das concentrações séricas terem sido superiores àquelas encontradas em fumantes, a mesma não demonstrou efeitos nocivos sobre a massa, volume ou resistência óssea de ratas em crescimento.

Em 2001, Iwaniec et al., seguindo os objetivos do estudo supracitado, utilizaram ratas de 7 meses que receberam subcutaneamente via mini-

bombas osmóticas: soro (controle), 4,5mg/kg/dia ou 6mg/kg/dia durante 3 meses. Os autores concluíram que apesar da concentração sérica de nicotina ter sido 2,5 vezes maior que a concentração média encontrada em fumantes, a nicotina demonstrou efeitos nocivos limitados sobre o tecido ósseo nas ratas saudáveis, isto é, apenas o fator resistência apresentou resultados inferiores nas ratas tratadas com nicotina.

Akhter et al. (2003) investigaram os efeitos da nicotina sobre a massa óssea e propriedades biomecânicas em ratas de 8 meses de idade que foram submetidas a ovariectomia ou à simulação cirúrgica deste procedimento (controle). Após 12 semanas da ovariectomia ou simulação, os animais receberam um dos três tratamentos a seguir: solução salina, 6mg/kg/dia ou 9mg/kg/dia de nicotina via mini-bombas osmóticas durante 12 semanas. Os autores relataram que os níveis séricos de nicotina encontrados foram 1,5 a 4,5 vezes maiores que aqueles observados em fumantes inveterados e que apesar disto, nenhum efeito negativo da nicotina foi observado. Os resultados sugerem que outros agentes do tabaco que não a nicotina seriam responsáveis pela redução da densidade óssea e do aumento do risco de fraturas como o observado em fumantes.

Através destes estudos, parece que a nicotina não exerce efeitos nocivos sobre o esqueleto, devendo segundo Iwaniec et al. (2000), ser estudada a ação da nicotina no tecido ósseo que sofreu algum tipo de injúria.

Neste contexto, diversos investigadores que estudaram o reparo ósseo em coelhos, relataram que a vascularização do enxerto ósseo e a formação óssea subsequente foram reduzidas frente ao tratamento com nicotina (DAFTARI et al., 1994; RIEBEL et al., 1995; SILCOX et al., 1995; SILCOX et al., 1998).

Em 1999a, Hollinger et al. desenvolveram um modelo experimental em ratos com o intuito de confirmar os efeitos da nicotina no processo de

cicatrização óssea. Utilizando-se de 60 ratos machos de 35 dias, um defeito de 4 mm de diâmetro foi criado bilateralmente nos ossos parietais dos animais. Neste experimento, incluiu uma ferida para cicatrização espontânea e uma área receptora para enxerto autógeno no osso parietal contralateral. A nicotina foi administrada em diferentes doses (12.5, 25 e 50mg/l) e em diferentes períodos de tempo (pré e pós-operatório). A análise dos resultados foi radiomorfométrica, histológica e histomorfométrica. Os resultados puderam demonstrar que as diferentes dosagens e tempos promoveram diferentes respostas nos defeitos de cicatrização espontânea. Mais especificamente, quanto mais perto da dose zero de nicotina e do menor período de administração da droga, maior era a quantidade de nova formação óssea.

Com o número crescente de instalação de implantes osteointegrados na substituição de dentes perdidos, tem se tornado evidente a preocupação com o processo de reparo em pacientes fumantes.

Nociti Júnior et al., em 2002b investigaram os efeitos da administração diária de nicotina sobre a densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbia de coelhos. Os autores dividiram aleatoriamente os 32 coelhos para cada um dos quatro grupos a seguir: solução salina, 0,37mg, 0,57mg ou 0,93mg de nicotina/kg injetadas diariamente no subcutâneo. Dos implantes inseridos, dois eram de superfície jateada com óxido de alumínio e dois de superfície usinada. Os resultados não revelaram diferenças significativas na densidade óssea entre os subgrupos de nicotina e solução salina, nem tampouco entre as diferentes superfícies de implantes. Seguindo a mesma metodologia supracitada, Stefani et al. (2002) investigaram a porcentagem do contato ósseo com a superfície do implante e a área óssea entre as roscas dos implantes. Os autores notaram que embora não

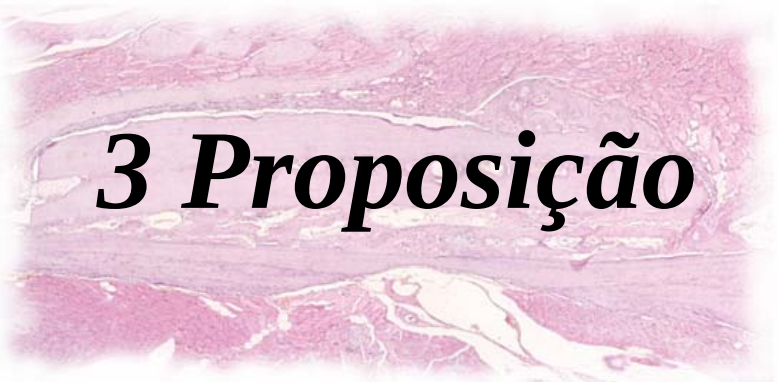
tenha sido observado qualquer efeito da nicotina sobre a cicatrização ao redor de implantes, foi detectada uma influência significativa da superfície do implante sobre o grau de contato osso implante nos grupos tratados com 0,57 e 0,93mg de nicotina/Kg.

Nociti Júnior et al. em 2002a, avaliaram a influência da inalação da fumaça do cigarro na cicatrização óssea ao redor de implantes de titânio, mais especificamente a osteointegração e área óssea dentro dos limites das roscas dos implantes. Para isso, utilizaram 40 ratos macho divididos em 2 grupos: controle e inalação da fumaça do cigarro. Os implantes de titânio foram instalados bilateralmente na tíbia dos animais. Os autores detectaram uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos parâmetros avaliados, e concluíram que a inalação intermitente da fumaça do cigarro pode resultar em baixa qualidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em ratos.

Para investigar o impacto da administração de nicotina e da inalação da fumaça do cigarro sobre a cicatrização ao redor de implantes, César-Neto et al. (2003) utilizaram 45 ratos machos Wistar distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: 1)controle (n=19), 2)inalação intermitente da fumaça do cigarro, 1.3mg de nicotina, três vezes ao dia (n=15) e 3) injeção subcutânea de nicotina, 3mg/kg duas vezes ao dia (n=11). Por meio de histometria, foram mensurados o grau de contato osso – implante (COI) e a área óssea (AO) dentro dos limites das roscas dos implantes divididas em zona A (cortical) e zona B (esponjoso). Na zona A, o grupo 2 apresentou uma influência negativa sobre o COI e AO. Na zona B o grupo 2 também apresentou uma diminuição na porcentagem de COI comparado ao controle. Já a AO diminuiu significativamente nos grupos 2 e 3 quando comparadas ao controle. Os autores concluíram que o impacto negativo do cigarro sobre o resultado dos

implantes, pode estar relacionado a mais de uma substância presente no cigarro e a nicotina parece contribuir parcialmente, especialmente no osso esponjoso.

Saldanha et al. (2004) investigaram o impacto da nicotina sobre a cicatrização óssea após R.O.G. (regeneração óssea guiada) em cães. Após 3 meses de realizada a exodontia dos 1^{os}, 2^{os} e 3^{os} molares inferiores, um defeito ósseo retangular foi criado cirurgicamente e bilateralmente, na área dos dentes previamente extraídos. Os defeitos que receberiam ou não a membrana de politetrafluoretileno - expandido (PTFE-e) foram selecionados aleatoriamente. No dia seguinte à realização do defeito, os animais receberam doses de 4mg/kg de nicotina, injetadas no subcutâneo, 2 vezes ao dia, durante os 4 meses experimentais. Os autores relataram que a administração de nicotina influenciou de forma negativa e significativa a formação de tecido mineralizado nos defeitos protegidos ou não pela membrana quando comparados ao controle.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and a prominent blood vessel. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), giving it a pinkish-purple hue. The image is used as a background for the title.

3 Proposição

3 Proposição

Este estudo teve por objetivo do ponto de vista histológico, o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos realizados em ratas tratadas ou não com nicotina.

A rectangular inset image showing a microscopic view of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue shows various cellular structures and fibers in shades of pink and purple.

4 Material e Método

4 Material e Método

Estando de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, o projeto inicial da presente pesquisa, protocolo nº. 33/03, foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba.

Para o presente estudo foram utilizadas 48 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com idade de 12 meses e peso corporal variando entre 350 e 400 gramas. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, onde foram criados para fins de ensino e pesquisa. Todos 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), e receberam água e ração *ad libitum* durante todo o período experimental.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, Experimental e Controle com 24 animais cada. As ratas do grupo experimental foram tratadas com aplicações diárias de solução de hemissulfato de nicotina, enquanto as ratas do grupo controle foram tratadas com aplicações diárias de solução fisiológica de cloreto de sódio.

Todos os animais, transcorridos 30 dias de tratamento com as referidas soluções (PINTO et al., 2002), receberam enxerto ósseo autógeno na mandíbula, doado da calvária.

Cada grupo foi subdividido em 3 subgrupos contendo 8 animais os quais sofreram eutanásia nos tempos de 7, 14 e 28 dias, após o procedimento de enxerto ósseo, conforme expresso o quadro a seguir:

	7 dias	14 dias	28 dias
Grupo Experimental	8 animais	8 animais	8 animais
Grupo Controle	8 animais	8 animais	8 animais

4.1 Preparo da nicotina

O hemissulfato de nicotina* foi diluído em solução fisiológica na concentração de 5mg/ml, sendo administrada para cada rata um volume de solução diluída, na dosagem de 3mg/kg de peso (PINTO et al., 2002).

4.1.1 Administração das soluções

As ratas do grupo experimental e grupo controle foram tratadas respectivamente com aplicações da solução de hemissulfato de nicotina e solução fisiológica de cloreto de sódio, duas vezes ao dia, em horário pré-estabelecido, alternando-se o local de aplicação no dorso do animal (fig. 1). As aplicações foram iniciadas 30 dias antes do procedimento cirúrgico envolvendo o enxerto ósseo, cessadas apenas no dia da cirurgia e retomadas durante todo o período pós-operatório do experimento até a eutanásia.



Figura 1. Aplicação da nicotina ou soro no dorso da rata.

* Sigma – Aldrich Co., USA

4.2 Procedimento operatório de enxerto ósseo autógeno em bloco

No 31º dia, depois de iniciada as aplicações das soluções de hemissulfato de nicotina ou fisiológica de cloreto de sódio, as ratas apresentavam-se preparadas para o início do experimento envolvendo o enxerto ósseo.

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

Para a realização do experimento, os animais receberam anestesia geral intramuscular. Primeiramente foi administrado cloridrato de Xilazina* na dosagem de 0,03ml para 100 gramas de peso corporal, com o objetivo de promover um relaxamento muscular. Na seqüência utilizou-se o cloridrato de Ketamina** na dosagem de 0,07ml por 100 gramas de peso corporal, para obtenção do efeito anestésico.

Após anestesia, foi realizada tricotomia das regiões temporal e parotídea-massetérica, bem como da região fronto-parietal, seguida de uma vigorosa antissepsia, por meio de fricção com gaze estéril embebida em solução de digluconato de clorexidina a 0,2%*** destas áreas.

4.2.1 Preparo do leito receptor

Após o isolamento da área cirúrgica, com auxílio de uma 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 (Fig. 2-a). Este, com

* Anasedan – Agribrands, Campinas, SP.

** Dopalen – Agribrands, Campinas, SP.

*** Farmácia Específica, Bauru, SP.

**** Embramac, Itapira, SP.

auxílio de uma tesoura de ponta romba, foi divulsionado até atingir a tábua óssea mandibular (Fig. 2-b). O periósteo do lado medial da mandíbula, juntamente com o músculo pterigóideo medial, foi descolado com auxílio de uma espátula tipo Hollenback nº. 3s (Fig. 3-a). Com o mesmo instrumental, a região foi raspada superficialmente para assegurar completa remoção do periósteo (Fig. 3-b). Para promover um adequado afastamento dos tecidos e conseqüente exposição do leito receptor da mandíbula, instrumentos foram especialmente desenvolvidos para esse fim, permitindo melhor visualização e acesso à área (Fig. 4).

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. Em seguida, com espátula do tipo Molt nº. 2-4, um retalho de espessura total foi elevado, expondo amplamente a cortical óssea da região.

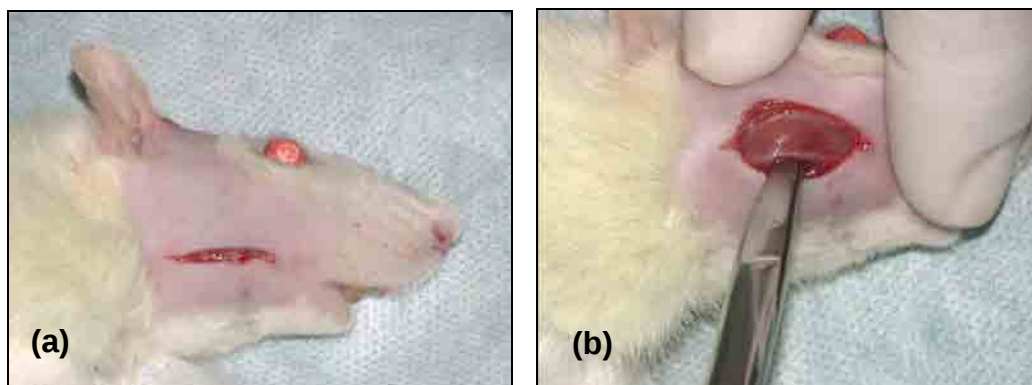


Figura 2. Preparo do leito receptor. a) incisão linear na região de ângulo da mandíbula expondo o músculo masseter; b) divulsão do músculo masseter com tesoura de ponta romba.

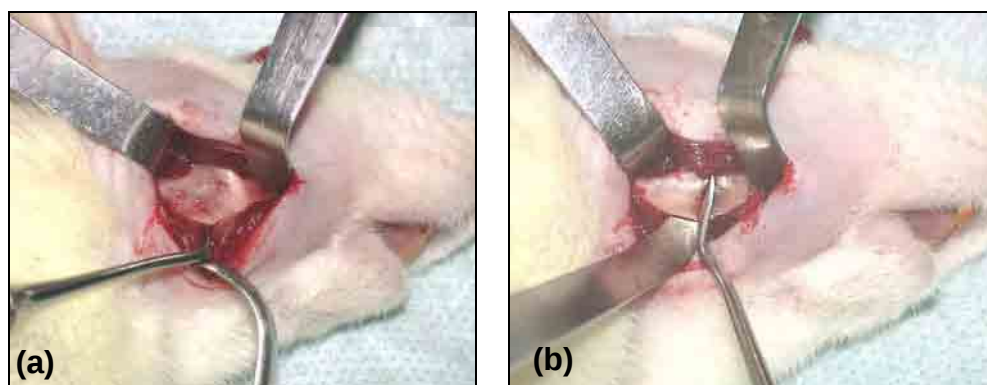


Figura 3. Preparo do leito receptor. a) deslocamento do periósteo do lado medial da mandíbula juntamente com o músculo pterigóideo medial, com auxílio de um Hollenback nº.3s; b) raspagem superficial do leito receptor para remoção do periósteo.



Figura 4. Afastadores especialmente desenvolvidos para adequada visualização e acesso ao leito receptor da mandíbula.

Com uma trefina cirúrgica*, de diâmetro interno de 3,8mm, montada em um motor cirúrgico, com velocidade constante de 800 RPM e sob irrigação contínua e abundante de solução fisiológica (Fig. 5-a), foi retirado o bloco ósseo da região parietal direita, abrangendo toda a espessura da cúpula (Fig. 5-b). O bloco ósseo foi temporariamente mantido em uma cuba contendo soro fisiológico estéril. Em seguida, os retalhos do tegumento foram reposicionados juntamente com o perióstio e suturados com fio de seda preta 4-0**.

4.2.3 Fixação do Enxerto Ósseo

Após a remoção, com auxílio de uma broca carbide ψ^{***} adaptada ao motor anteriormente citado e sob irrigação contínua e abundante com solução fisiológica, foi realizada uma perfuração na porção central do enxerto ósseo (Fig. 6-a). O mesmo foi novamente mantido na cuba contendo soro fisiológico estéril.

Da mesma maneira, a área receptora recebeu uma perfuração na proximidade do ângulo da mandíbula, distando aproximadamente 3 mm da borda inferior (Fig. 6-b). Estas perfurações permitiram a transpassagem de um fio de sutura 5-0 de poliéster verde trançado**** pelo bloco ósseo e pela mandíbula (Fig. 7-a). 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 (Fig. 7-b).

* Prudent, Lins, SP.

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

*** Sorensen, São Paulo, SP.

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

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

Cada animal recebeu, no pós-operatório imediato, dose única de antibiótico penicilina G benzatina** (administração intramuscular na dosagem de 0,02ml/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 animais em gaiolas maiores.

* Vycril, Johnson & Johnson, S. J. dos Campos, SP.

** Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP.

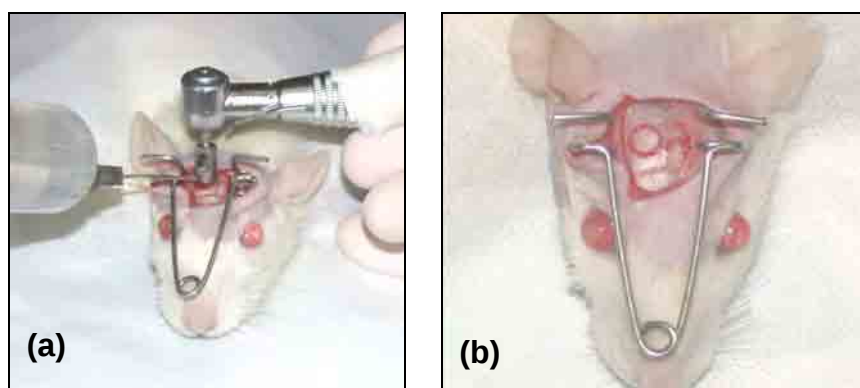


Figura 5. Área doadora. a) remoção do enxerto da região parietal direita com trefina; cirúrgica, sob irrigação com solução fisiológica. b) bloco ósseo removido em toda espessura da díploe.

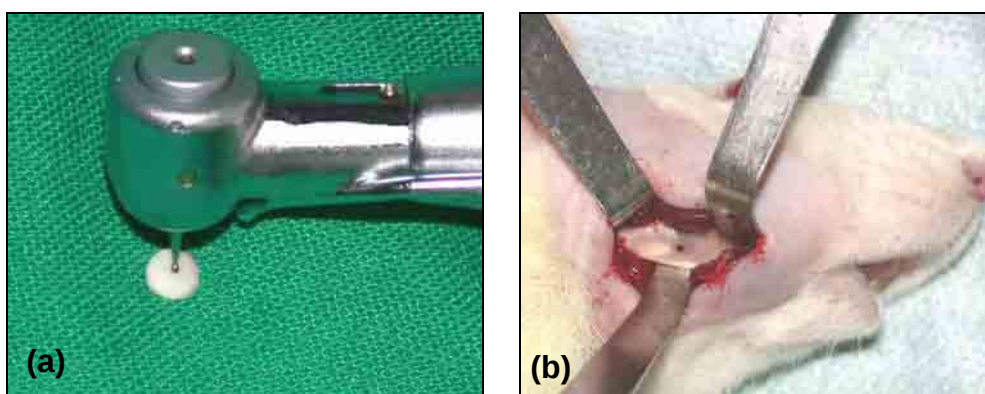


Figura 6. Enxerto ósseo. a) broca ψ posicionada no centro do enxerto ósseo para perfuração; b) perfuração do leito receptor da mandíbula com broca ψ .

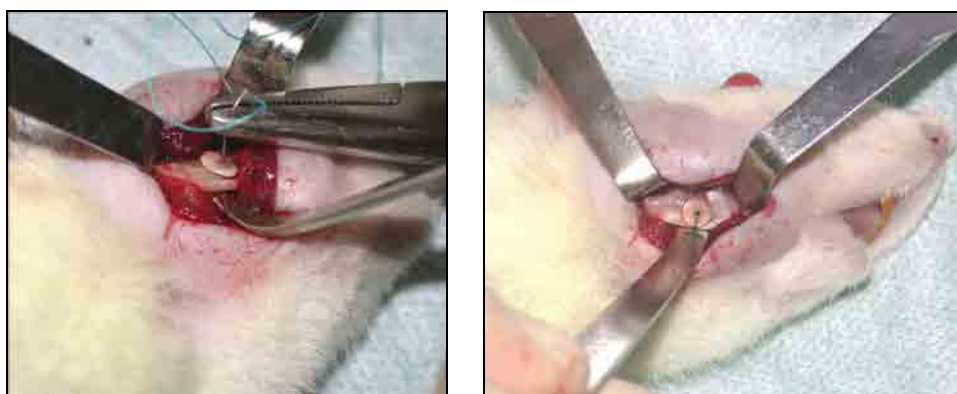


Figura 7. Fixação do enxerto. a) fio de poliéster verde trançado nº.5-0 transpassando o enxerto ósseo e o leito receptor da mandíbula. b) Enxerto suturado e estabilizado.

4.3 Eutanásia

Decorridos 7, 14 e 28 dias do ato operatório de fixação do enxerto ósseo, os animais foram submetidos a eutanásia por inalação excessiva de éter etílico. Após decapitação do animal, o osso da hemi-mandíbula direita foi coletado e dissecado, conservando 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 histotécnico do material

Sequencialmente, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas, submetidos ao processo de descalcificação em solução de etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18%, por um período aproximado de 40 dias, com troca da solução a cada 7 dias. Após descalcificação, as peças foram desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina, de maneira a obter cortes semi-seriados com 6 micrometros de espessura. Os cortes 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 micrômetros de distância, por toda a extensão do enxerto.

Para a avaliação, foram selecionados os 6 cortes mais centrais, excluindo-se a área da perfuração, os quais foram corados, alternadamente, pelos métodos de Hematoxilina-eosina de Harris e Lison (HE) e de Tricrômico de Masson, para análise microscópica.

4.5 Análise microscópica dos resultados

Para análise microscópica, foram utilizados os 6 cortes corados de cada espécime, totalizando 48 cortes para cada tempo de cada grupo.

Os cortes foram examinados em microscopia de luz e os seguintes aspectos criteriosamente descritos: características gerais do enxerto, do leito receptor e da interface leito-enxerto. Áreas de reabsorção e neoformação de tecido ósseo, bem como característica dos tecidos da interface e que circundavam o enxerto.

As imagens apresentadas nos resultados foram obtidas a partir do microscópio Axiocópio (Carl Zeiss) e câmera fotográfica MC 200 chip (Carl Zeiss).

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and a prominent blood vessel. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), giving it a pinkish-purple hue. The image is used as a background for the section header.

5 Resultado

5 Resultados

GRUPO CONTROLE 7 DIAS

De uma maneira geral todos os espécimes exibiram o enxerto satisfatoriamente coaptado ao leito receptor apresentando um pequeno espaço de interface. Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos por tecido de granulação e, raramente por restos de coágulo sanguíneo (Figs. 8a e 9a).

Os enxertos apresentaram-se praticamente íntegros (Figs. 8a e 9a), com alguns osteócitos presentes no interior da matriz (Fig. 8b-c) e os espaços medulares preenchidos por restos de tecido mielóide (Fig. 8b). Já, a superfície externa apresentava áreas pontuais de reabsorção com formação de pequenos núcleos ocupados por células semelhantes a osteoblastos e fibras dispostas perpendicularmente à superfície do enxerto (Fig. 8b). Algumas áreas já exibiam pequenas formações de tecido ósseo primário (Fig. 8c, 9a-b e 10a), cujas superfícies apresentavam-se ricamente povoadas por osteoblastos em diferentes graus de diferenciação (Fig. 8c e 10a) e fibras colágenas recém sintetizadas (Fig. 10a).

A região da interface mostrou-se ocupada por restos de coágulo sanguíneo e alguns fragmentos de matriz óssea (Fig. 8d e 10b) oriundos do procedimento cirúrgico. Próximo às bordas dos enxertos, a interface mostrou-se invadida pelo tecido de granulação que os circundava, caracterizado pela presença de poucas fibras, numerosos fibroblastos e vasos sanguíneos (Fig. 9c). Este tecido

substituiu gradualmente o coágulo (Fig. 9c-d e 10b). Algumas regiões da superfície externa dos leitos e interna dos enxertos apresentaram tênues sinais de reabsorção, sendo que, na superfície externa dos leitos havia início da deposição de uma fina camada de tecido ósseo com inclusão de osteócitos e inserção de inúmeras fibras colágenas dispostas obliquamente (Fig.10c).

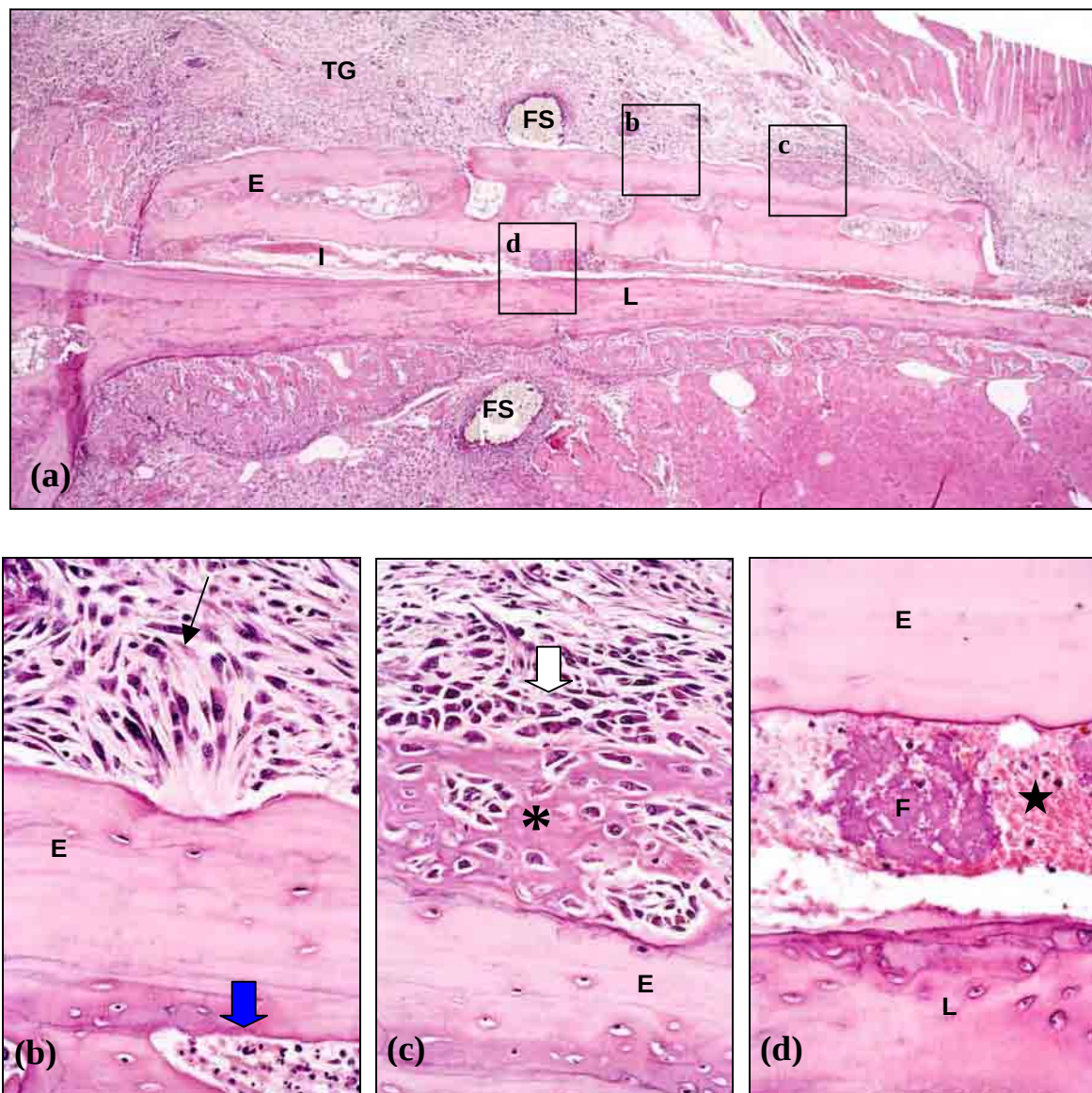


Figura 8. Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o tecido de granulação (TG) e o fio de sutura (FS). HE, 39X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) apresentando área de reabsorção óssea com adesão de células e fibras colágenas (seta preta) e o espaço medular (seta azul) preenchido por restos de tecido mielóide. HE, 275X; c) detalhe da formação óssea (asterisco) na superfície do enxerto com numerosos osteoblastos (seta branca). HE, 275X; d) detalhe da área da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X.

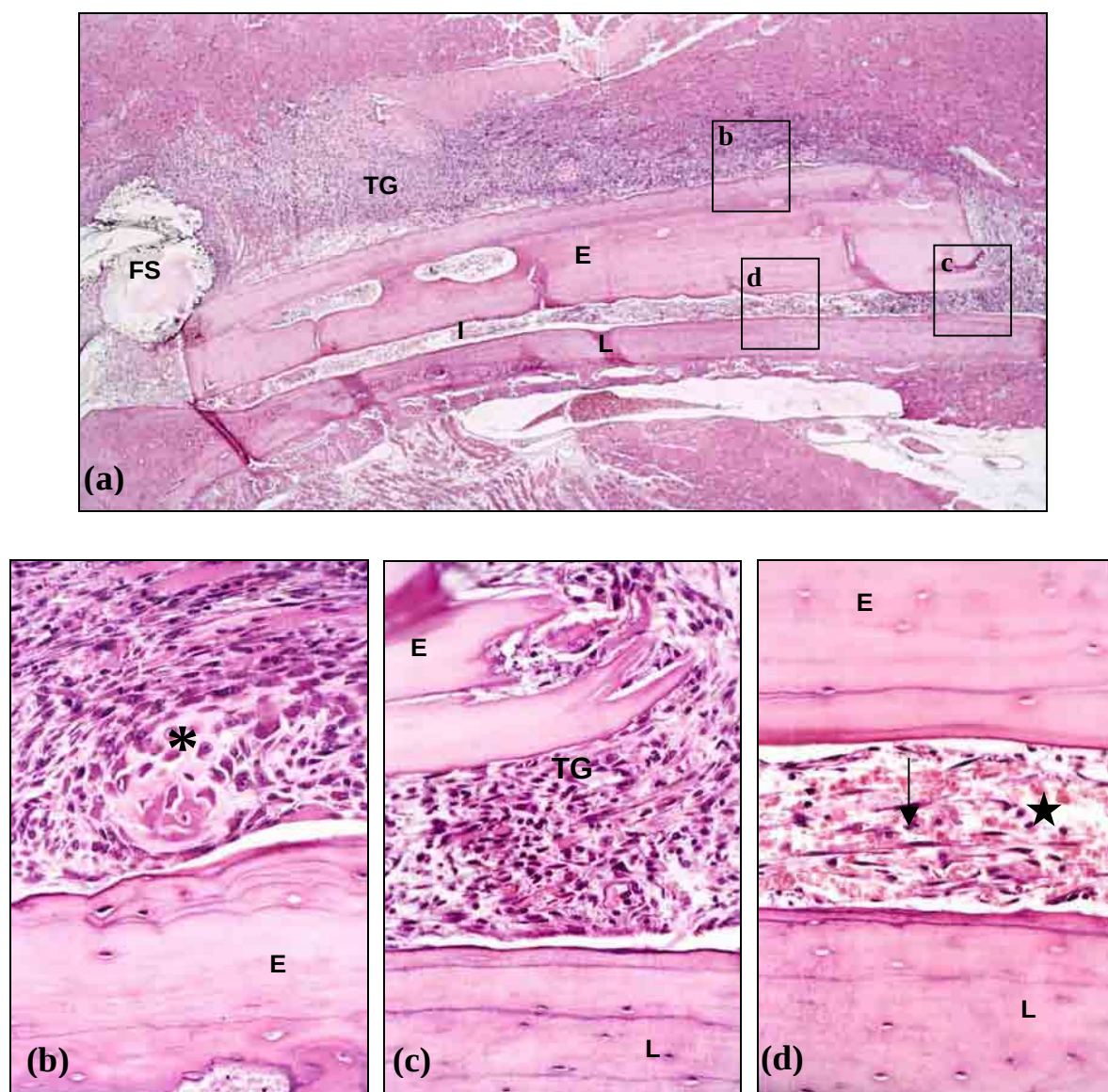


Figura 9. Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o tecido de granulação (TG) e o fio de sutura (FS). HE, 38X; b) detalhe da formação óssea próxima à superfície externa do enxerto (E). HE, 275X; c) detalhe da invasão da interface por tecido de granulação (TG). HE, 275X; d) detalhe da invasão do coágulo sanguíneo (estrela) por células semelhantes a fibroblastos (setas). HE, 275X.

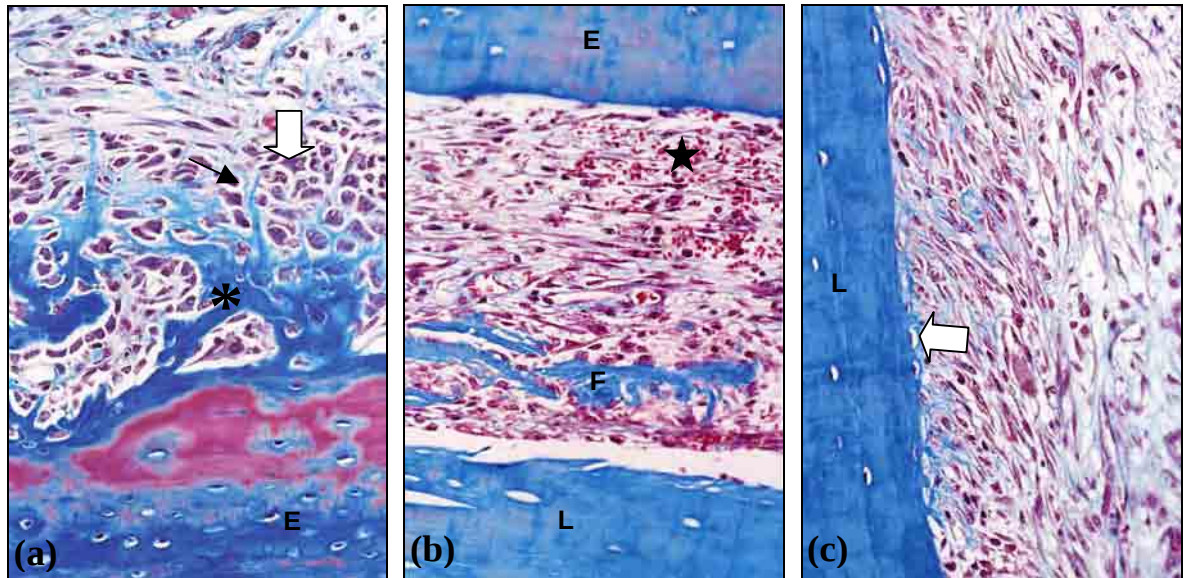


Figura 10. Grupo controle. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) formação óssea (asterisco) associada a área de reabsorção na superfície externa do enxerto (E) com numerosos osteoblastos (seta branca) circundados por fibras colágenas recém sintetizadas (seta preta). Tricrômico de Masson, 275X; b) início da deposição de fibras colágenas (fundo levemente azulado) pelos fibroblastos em substituição ao coágulo sanguíneo (estrela) e fragmentos ósseos (F). Tricrômico de Masson, 275X; c) deposição de fina camada de tecido ósseo na superfície do leito, com inclusão de osteoblastos (seta branca) além de fibras colágenas e fibroblastos dispostos obliquamente. Tricrômico de Masson, 275X.

GRUPO EXPERIMENTAL 7 DIAS

Todos os enxertos estavam satisfatoriamente coaptados ao leito receptor apresentando um pequeno espaço de interface (Figs. 11a e 12a), porém, o quadro histológico mostrou-se levemente atrasado em relação ao controle.

Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos pela rede de fibrina e algumas células sanguíneas em apoptose (Fig. 11b). Envolvendo a rede de fibrina havia a presença de tecido de granulação ainda imaturo, caracterizado pela presença de células tipo fibroblastos e raras fibras colágenas imersas (Fig. 12b).

Os enxertos apresentaram-se praticamente íntegros (Figs. 11a e 12a), mas com maior número de lacunas de osteócitos vazias em relação ao grupo controle (comparar Fig. 8b com 12c). Os espaços medulares preenchidos por restos de tecido mielóide (Fig. 12c). Já, a superfície externa não apresentava áreas de reabsorção e sinais de formação de tecido ósseo primário. Em apenas um caso, a superfície externa estava recoberta por tecido de granulação e apresentou pequenas áreas de neoformação óssea, semelhante ao observado no grupo controle.

A interface enxerto-leito mostrou-se ocupada quase que na sua totalidade por restos de coágulo sanguíneo e fragmentos de matriz óssea (Figs. 11c, 12d, 13a) oriundos do procedimento cirúrgico. Próximo às bordas do enxerto, somente algumas células alongadas semelhantes a fibroblastos pareciam migrar para a região de interface em meio ao coágulo sanguíneo (Fig. 11d). Praticamente não foi observada a presença de fibroblastos e fibras colágenas na interface (Figs. 13b-c).

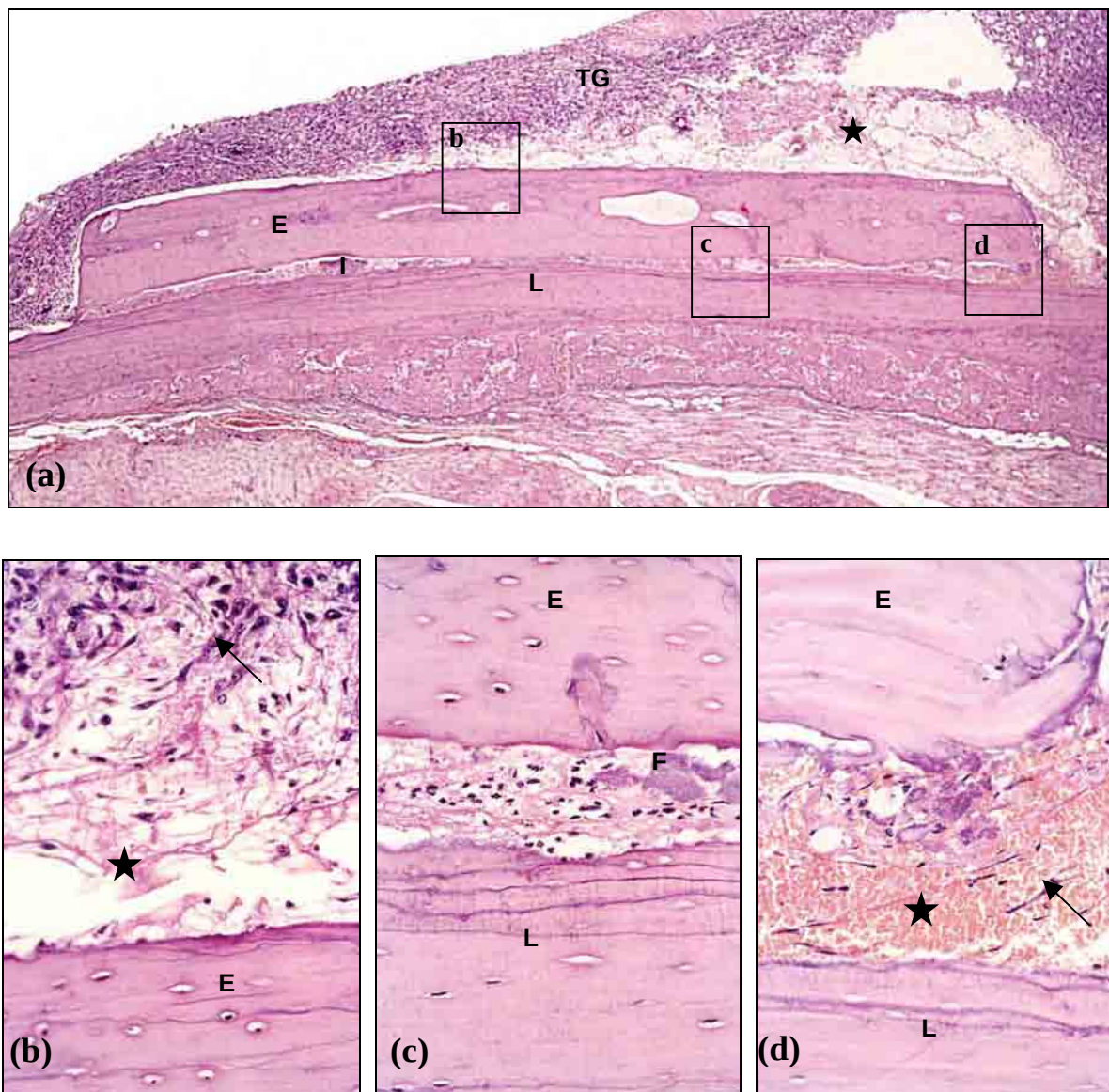


Figura 11. Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), a rede de fibrina (estrela) e o tecido de granulação (TG) HE, 47X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto pela rede de fibrina (estrela) e a invasão por células tipo fibroblasto (seta) HE, 275X; c) detalhe da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X; d) invasão de células alongadas (seta) para a interface ocupada pelo coágulo (estrela). HE, 275X.

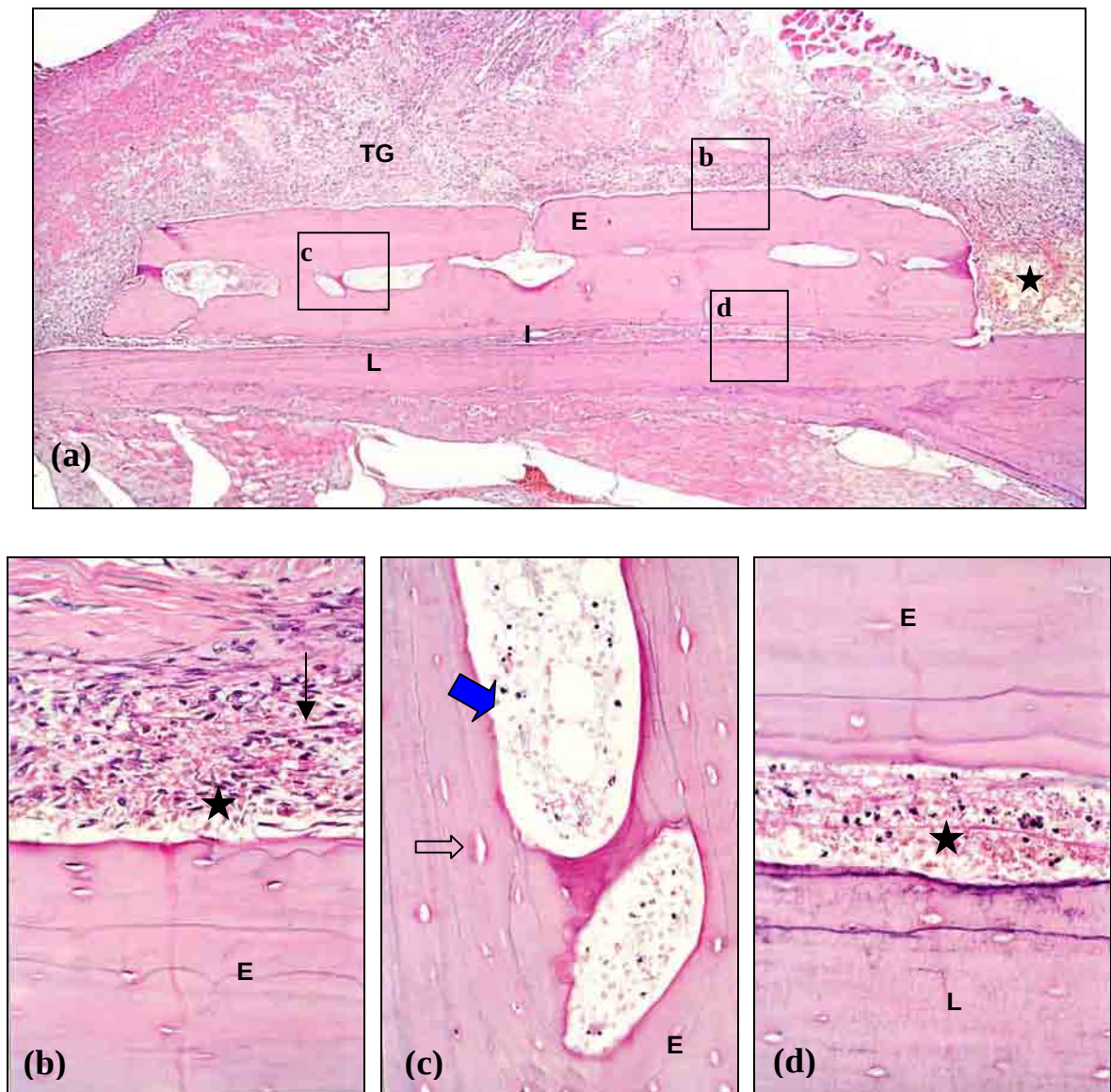


Figura 12. Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), coágulo sanguíneo (estrela) e o tecido de granulação (TG). HE, 40X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto por restos de coágulo (estrela) e células tipo fibroblasto (seta). HE, 275X; c) detalhe das lacunas de osteócitos vazias (seta vazada) e do espaço medular (seta azul) do enxerto (E) preenchido por restos de tecido mielóide. HE, 275X; d) área da interface ocupada por restos de coágulo (estrela) e fragmentos de matriz óssea (F). HE, 275X.

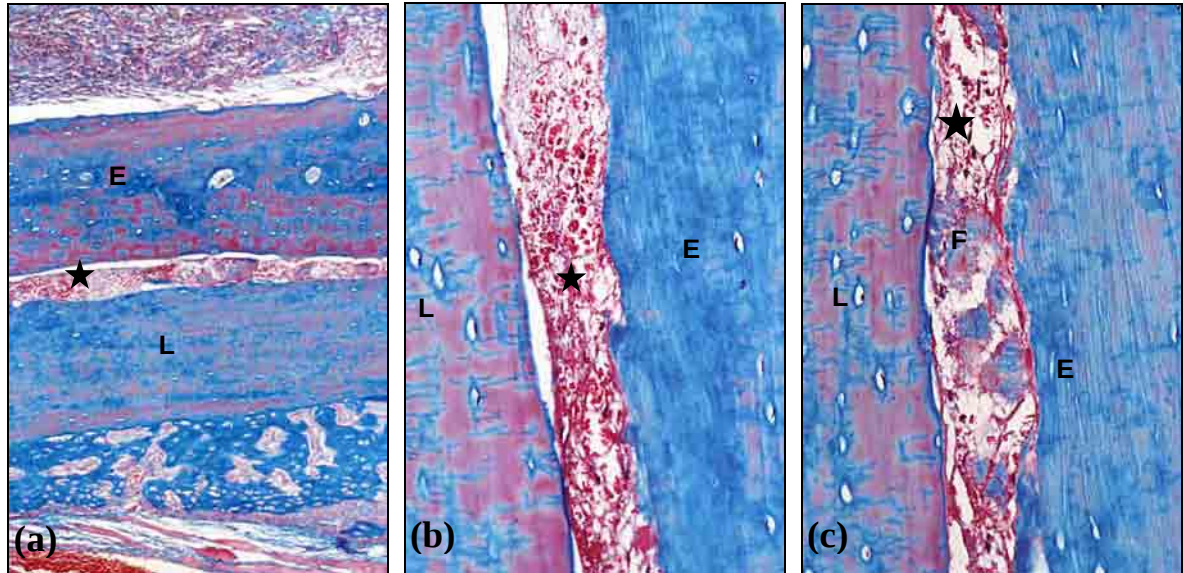


Figura 13. Grupo experimental. Período de 7 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral do enxerto (E) e do leito (L) e da região de interface preenchida por coágulo sanguíneo (estrela) e fragmentos de matriz. Tricrômico de Masson, 275X; b) A detalhe da interface preenchida por coágulo sanguíneo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da interface apresentando vários fragmentos de matriz (F) envoltos pelo coágulo sanguíneo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X.

GRUPO CONTROLE 14 DIAS

De uma maneira geral todos os espécimes exibiram o enxerto satisfatoriamente coaptado ao leito receptor com um espaço de interface levemente maior em relação aos do período de 7 dias. Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos por um tecido semelhante ao perióstio, ou seja, formado por uma fina camada de tecido conjuntivo fibroso e inúmeras células na superfície óssea (Fig. 15a). Em apenas um caso, o tecido conjuntivo estava recobrindo extensa área de tecido ósseo neoformado já em remodelação (Fig. 14a).

Os enxertos estavam praticamente íntegros, com alguns sinais de reabsorção tanto na sua superfície externa quanto no interior dos canais nutritivos e dos espaços medulares. Na superfície externa do enxerto, de um caso em que o processo de reparo apresentava-se mais atrasado, o tecido ósseo neoformado semelhante a um “calo” apresentava sinais de reabsorção por osteoclastos (Fig. 14b). Neste caso, algumas áreas sugeriam a ocorrência de substituição do tecido ósseo neoformado por tecido conjuntivo semelhante ao perióstio (Fig. 16a). Na maioria dos espécimes, a superfície externa não exibia formação óssea e estava recoberta por um tecido semelhante ao perióstio (Fig. 15b). Alguns espaços medulares ainda apresentavam restos de tecido mielóide e outros já exibiam preenchimento por tecido conjuntivo rico em vasos e células, além de pequena neoformação óssea na sua superfície (Fig. 14c).

Em apenas 2 casos, ocorreu formação de tecido ósseo de arranjo trabecular na superfície do leito tanto na porção posterior ao do enxerto quanto na da anterior.

A região da interface estava, no caso mais atrasado, preenchida por tecido conjuntivo frouxo rico em vasos, poucos fibroblastos e fibras dispersas (Fig. 14d) e, com algumas áreas ainda ocupadas por tecido de granulação; formação óssea pontual era observada na superfície do leito receptor (Fig. 14d). Nos demais casos, ocorreram intensa formação de tecido ósseo primário ocupando grande parte da interface principalmente na sua porção mediana (Fig. 15a e c). Esse tecido ósseo neoformado mostrava-se recoberto por numerosos osteoblastos intercalados a pequenos feixes de fibras colágenas, indicando a continuidade da neoformação (Fig. 16b). Já, na superfície do enxerto a formação óssea ficou restrita a pequenas áreas de reabsorção (Fig. 16c). O restante da interface apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 15d e 16b-c).

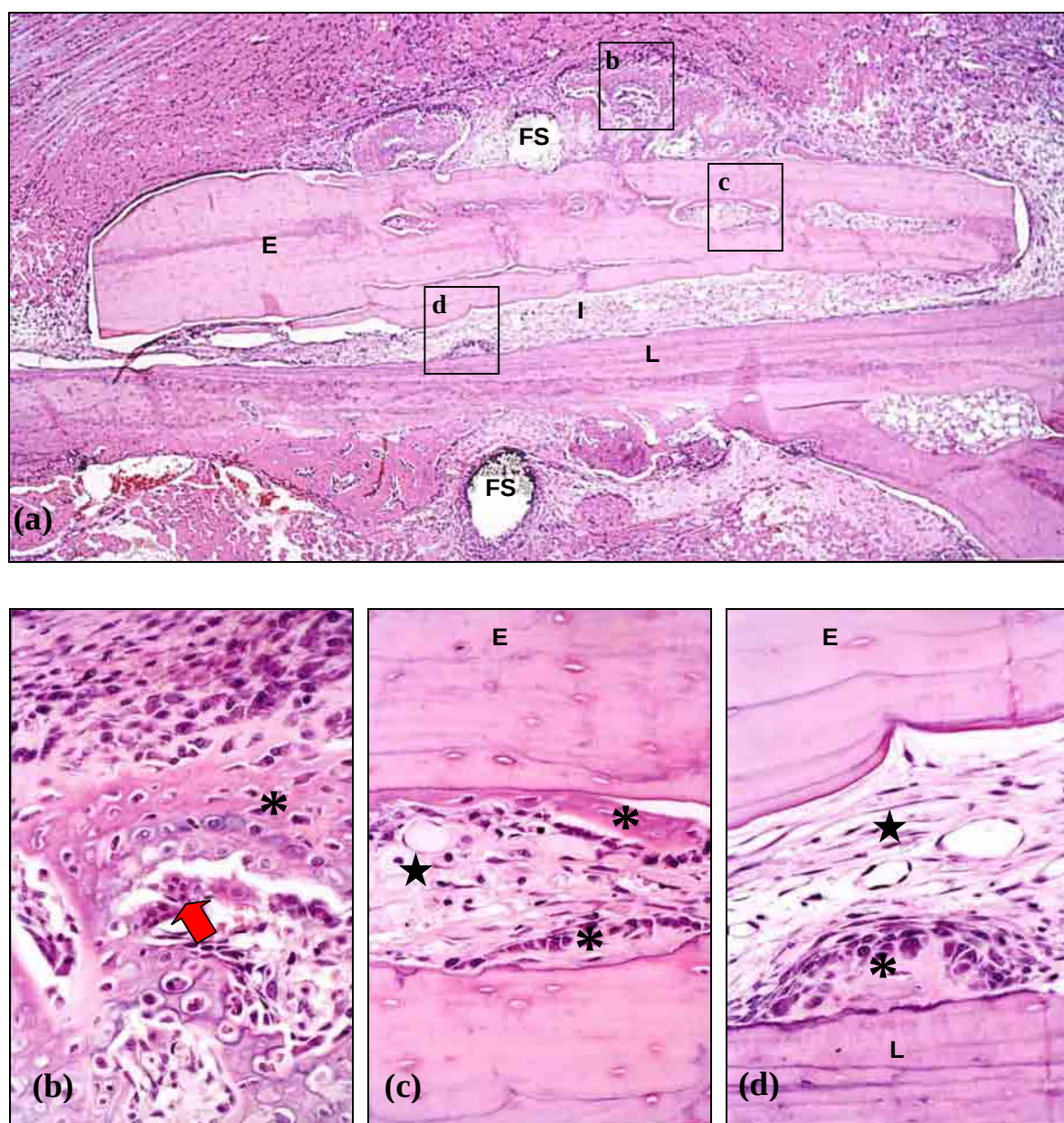


Figura 14. Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 48X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície externa do enxerto (E) apresentando área de reabsorção óssea por células gigantes multinucleadas (seta vermelha). HE, 275X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) preenchido por tecido conjuntivo (estrela) e circundado por pequenas áreas de formação óssea (asterisco). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo frouxo (estrela) e pequena formação óssea (asterisco) na superfície do leito receptor (L). HE, 275X.

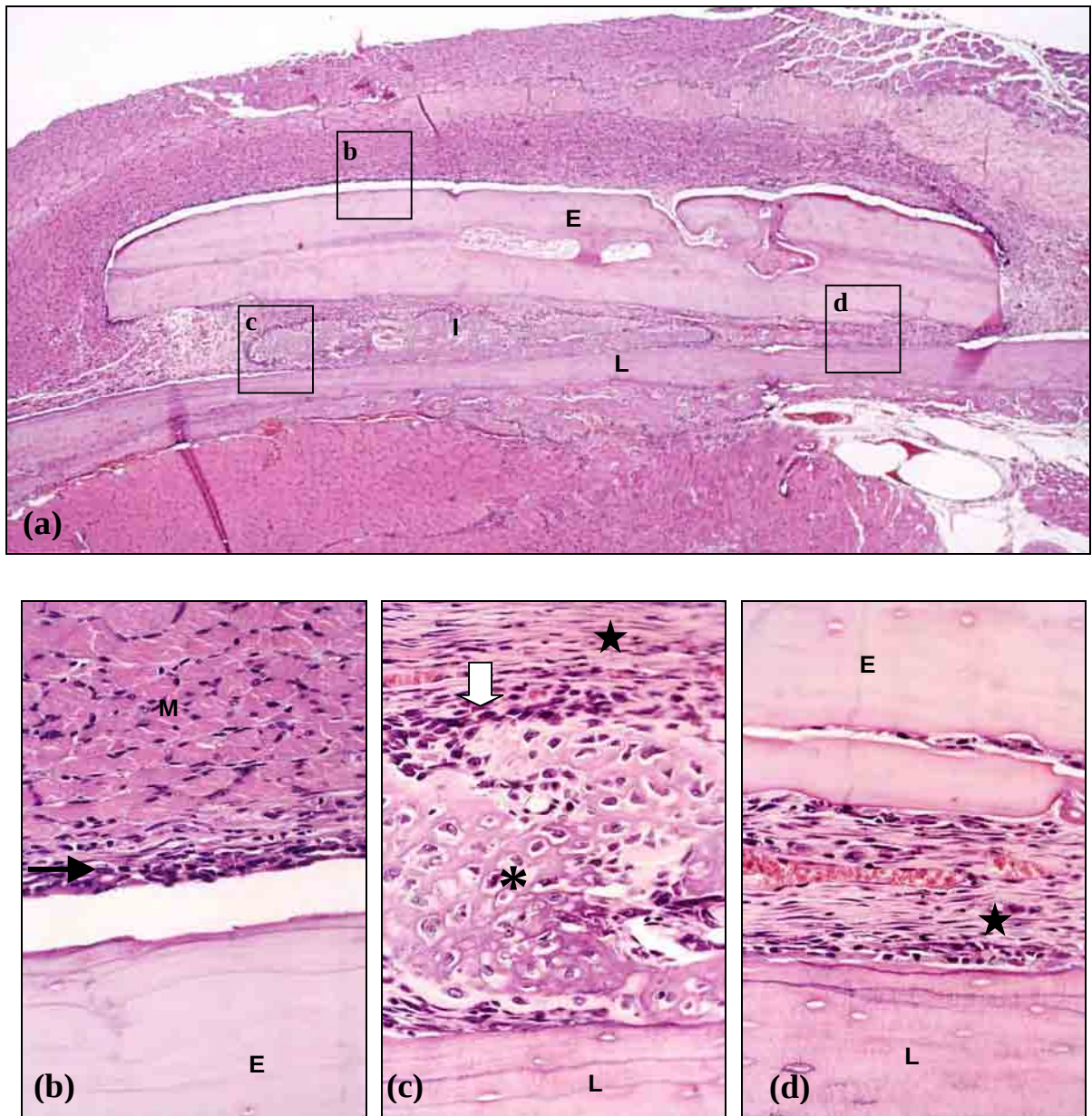


Figura 15. Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L) e a interface (I). HE, 44X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberto por tecido conjuntivo semelhante ao periósteo (seta preta) e tecido muscular (M). HE, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do leito (L) com inúmeros osteoblastos (seta branca) e do tecido conjuntivo fibroso (estrela). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo fibroso (estrela). HE, 275X.

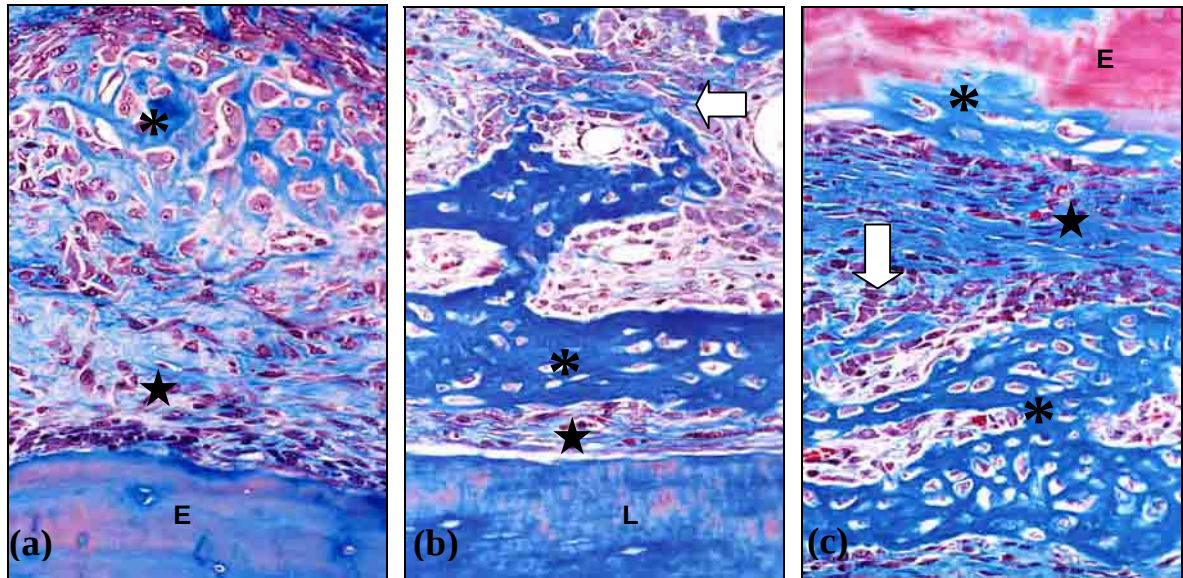


Figura 16. Grupo controle. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da superfície óssea do enxerto recoberta por tecido conjuntivo (estrela) e da neoformação óssea (asterisco). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) próximo a superfície do leito (L), separado por uma fina camada de tecido conjuntivo (estrela) e dos osteoblastos circundados por filetes de fibras colágenas (seta branca). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a áreas de reabsorção na superfície do enxerto (E) e do tecido conjuntivo fibroso (estrela) que separa formação óssea (estrela) recoberta por osteoblastos. Tricrômico de Masson, 275X.

GRUPO EXPERIMENTAL 14 DIAS

Geralmente todos os enxertos estavam satisfatoriamente coaptado ao leito receptor apresentando um espaço de interface levemente maior em relação aos do período anterior. Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos por espesso e amplo tecido conjuntivo, mais imaturo em relação ao grupo controle, ricamente celularizado e vascularizado e com algumas áreas ainda associadas ao tecido de granulação (Fig. 17b e 18b).

Os enxertos praticamente íntegros apresentaram alguns sinais de reabsorção tanto na superfície externa quanto no interior dos canais nutritivos e espaços medulares. Na maioria dos casos, a superfície externa não exibiu formação óssea e estava recoberta por tecido conjuntivo (Fig. 17b e 18b). Alguns espaços medulares ainda apresentavam restos de tecido mielóide e outros já exibiam preenchimento por tecido conjuntivo rico em vasos e células (Fig. 18c), além de pequena neoformação óssea na sua superfície.

À semelhança do observado no grupo controle, apenas em 2 casos, ocorreu formação de tecido ósseo de arranjo trabecular na superfície do leito receptor tanto na porção posterior quanto na anterior ao enxerto (Fig. 18a).

A interface mostrou-se, na maioria dos casos, preenchida por tecido conjuntivo frouxo com poucos fibroblastos e fibras dispersas (Fig. 18d) e, algumas áreas de tecido de granulação e restos de coágulo sanguíneo. Nestes casos, a formação óssea mostrou-se pontual na superfície do leito receptor (Fig. 18d) e/ou associado a fragmentos de matriz. Em apenas 2 casos, ocorreu intensa formação de tecido ósseo primário (19a) ocupando grande parte da interface principalmente a porção mediana, interligando-o a superfície do leito (Fig. 17a e c) e seqüestrando

alguns fragmentos de matriz (Fig. 17c e 19b). Nestes casos o restante da interface apresentava-se preenchido por tecido conjuntivo bastante frouxo (Fig. 17d e 19b) indicando um atraso em relação ao controle. Já, na superfície do enxerto a formação óssea ficou restrita a pequenas áreas de reabsorção.

Em um caso, na região da interface próxima a borda anterior do enxerto ocorreu formação de tecido ósseo associado a tecido cartilaginoso e a presença de tecido conjuntivo fibroso (Fig. 19c) indicando áreas de formação óssea endocondral.

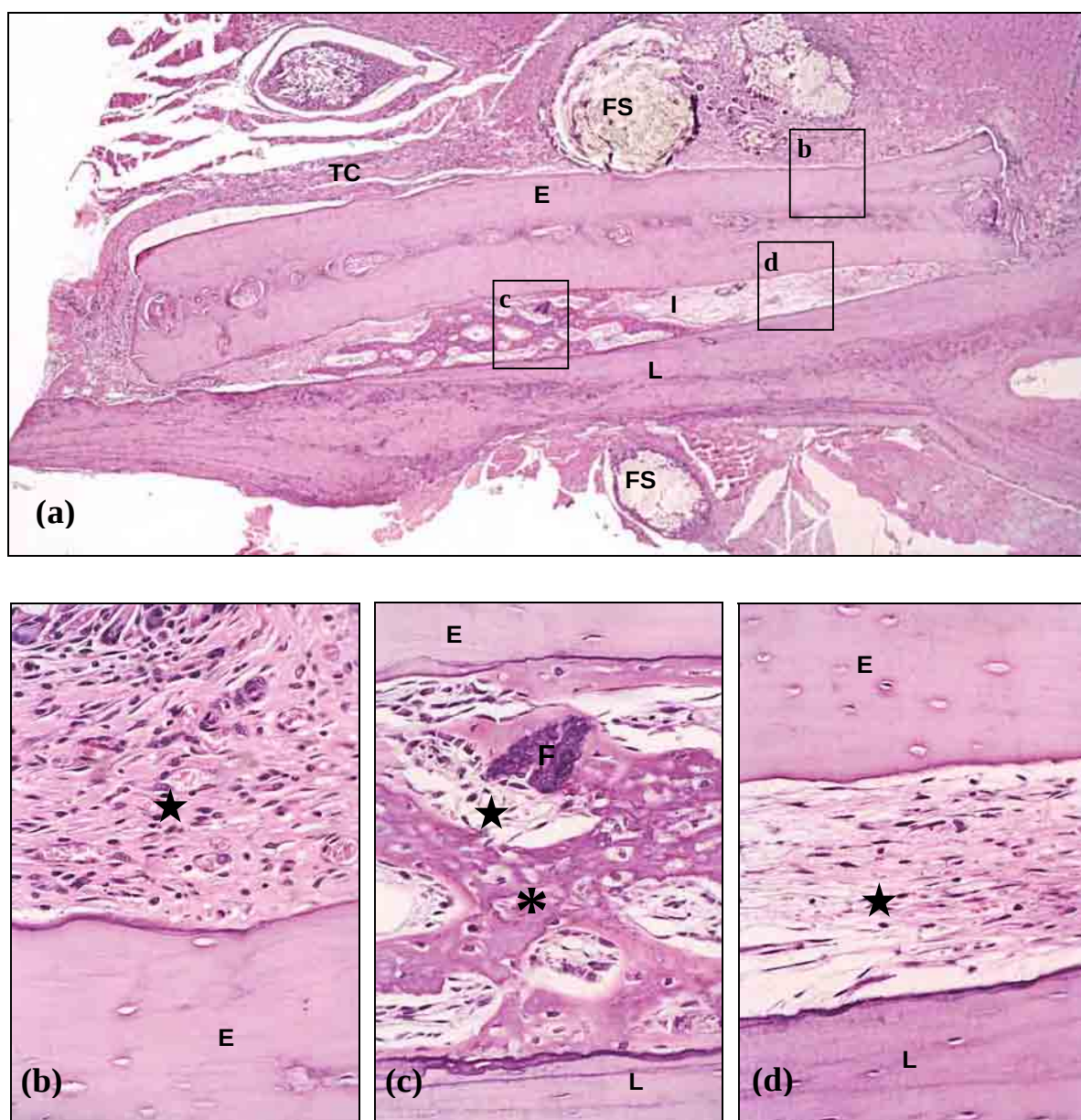


Figura 17. Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 47X; b) detalhe da superfície externa do enxerto recoberta por tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; c) detalhe da interface com formação óssea (asterisco) exibindo fragmento de matriz (F) e interconectando as superfícies do leito (L) a do enxerto (E) e os espaços inter-trabeculares preenchidos por tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

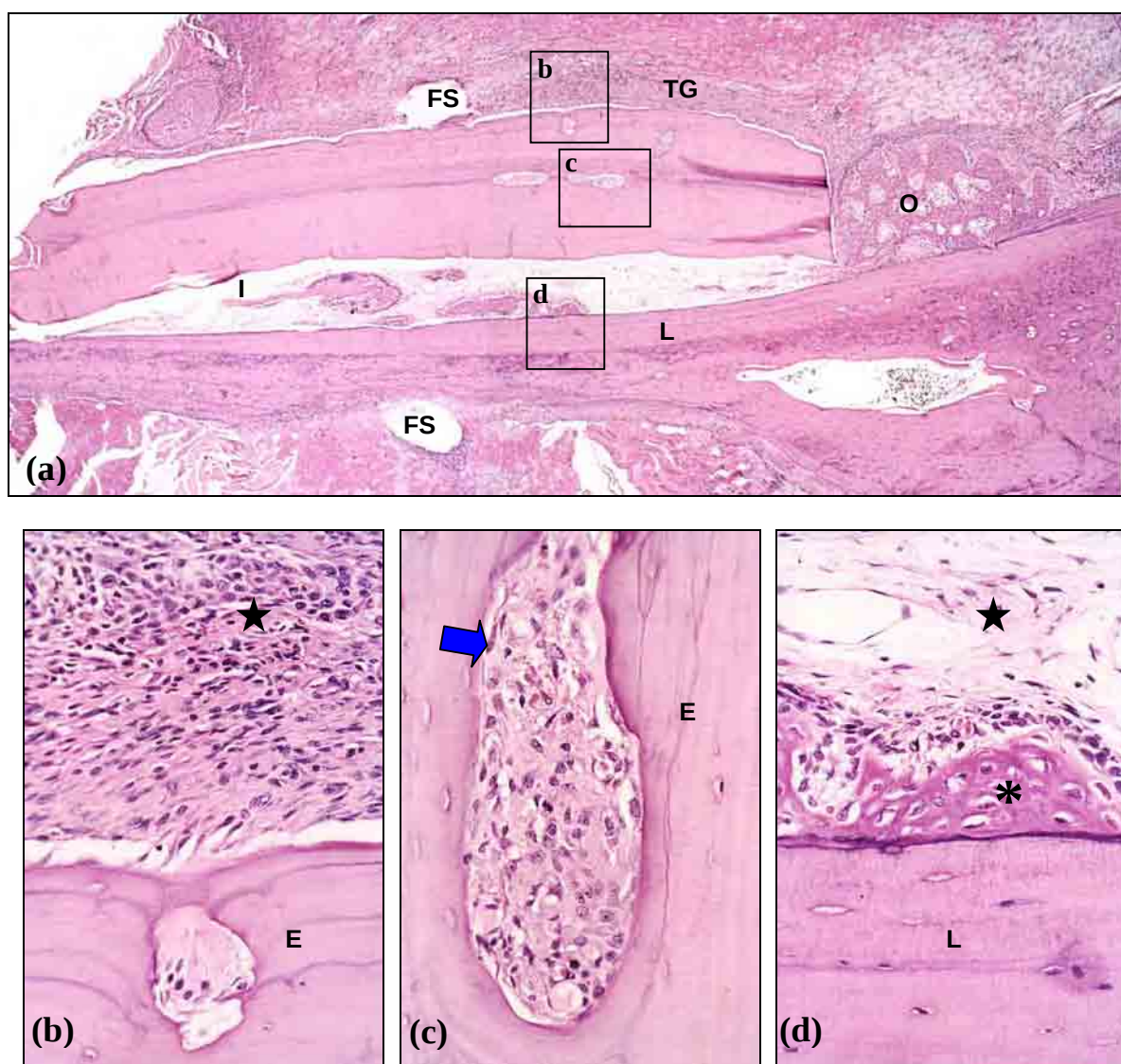


Figura 18. Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), o fio de sutura (FS) e a formação óssea (O) na superfície do leito (L) próximo a borda anterior do enxerto (E). HE, 38X; b) detalhe da superfície externa do enxerto (E) recoberta por tecido conjuntivo associado a áreas de tecido de granulação (estrela). HE, 275X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) do enxerto (E) preenchido por tecido conjuntivo. HE, 275X; d) detalhe na interface de formação óssea (asterisco) na superfície do leito receptor (L) e de tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

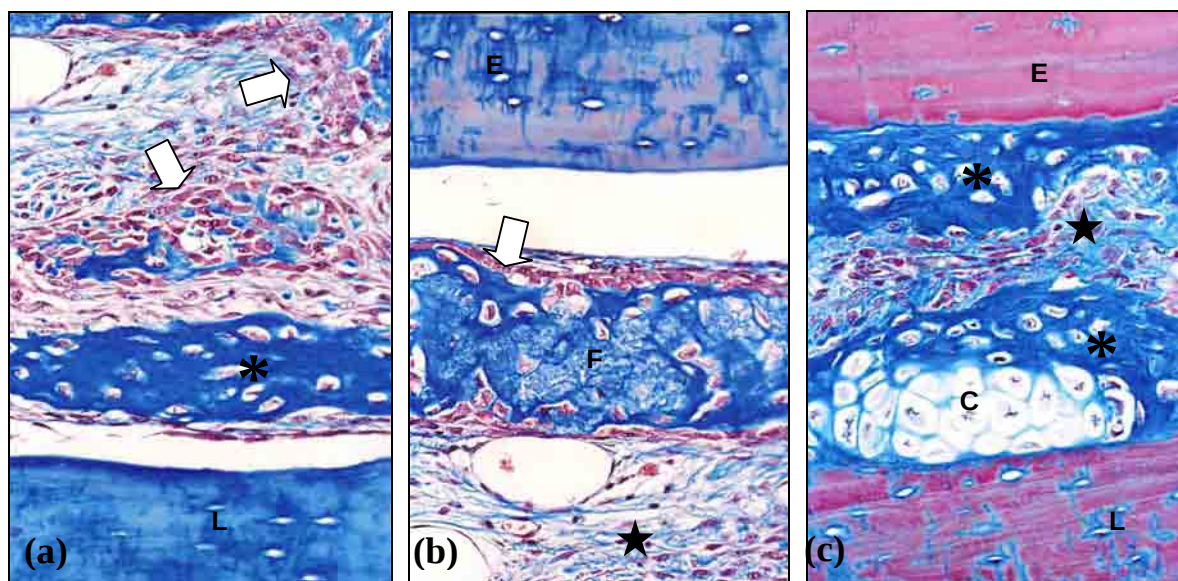


Figura 19. Grupo experimental. Período de 14 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da formação óssea próxima à superfície óssea do leito receptor (L) e a presença de ilhas de tecido ósseo recém produzidas ricas em osteoblastos (setas brancas). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a fragmentos de matriz (F) com as superfícies ósseas recobertas por osteoblastos (seta branca) e tecido conjuntivo frouxo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe da neoformação óssea (asterisco) associada a áreas de tecido cartilaginoso (C) e do tecido conjuntivo fibroso (estrela) intercalado a formação óssea (estrela) na superfície do enxerto (E) e do leito (L). Tricrômico de Masson, 275X.

GRUPO CONTROLE 28 DIAS

Geralmente todos os espécimes exibiram o enxerto satisfatoriamente coaptado ao leito receptor com um espaço semelhante ao observado no período anterior. Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos por um tecido semelhante ao perióstio. Em um caso, houve a formação de uma pequena área de tecido ósseo já em remodelação (Fig. 20b) que estava recoberta por tecido conjuntivo.

Os enxertos estavam menos íntegros em relação ao período anterior, com áreas de reabsorção mais acentuadas na superfície externa (Fig. 21a e 22a). No caso em que ocorreu formação de um calo ósseo, este não exibia sinais aparentes de reabsorção e apresentava-se envolto por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 20b e 23a). Nos demais casos, a superfície não exibia formação óssea e estava recoberta por um tecido semelhante ao perióstio (Fig. 22b). Já, os espaços medulares apresentavam-se preenchidos, em maior ou menor quantidade, por tecido ósseo neoformado com áreas centrais ocupadas por tecido mielóide em formação (Fig. 20c e 23b) e raras vezes por tecido conjuntivo.

Em 3 casos, ocorreu uma extensa área de formação óssea no leito receptor próximo à borda do enxerto, sendo formada por tecido ósseo imaturo e as demais já circundadas por uma cortical óssea e preenchidas internamente por tecido mielóide (Fig. 20a e 21a-b).

Na região da interface, em 3 casos ocorreu intensa formação de tecido ósseo trabecular interconectando o enxerto ao leito (Figs. 20d, 21c-d, 23c) sendo que, em algumas regiões estava associada a áreas de reabsorção tanto no enxerto quanto no leito (Fig. 21c). A maioria dos espaços entre as trabéculas ósseas

mostrava-se, preenchida por tecido mielóide em estágio inicial de formação (Fig. 20d). Nos demais 5 casos, ocorreram áreas em que essa interconexão não estava presente sendo a neoformação óssea restrita à superfície do enxerto e do leito, separados por uma fina camada de tecido conjuntivo (Fig. 22c; d), indicando a ocorrência de um leve atraso na neoformação óssea.

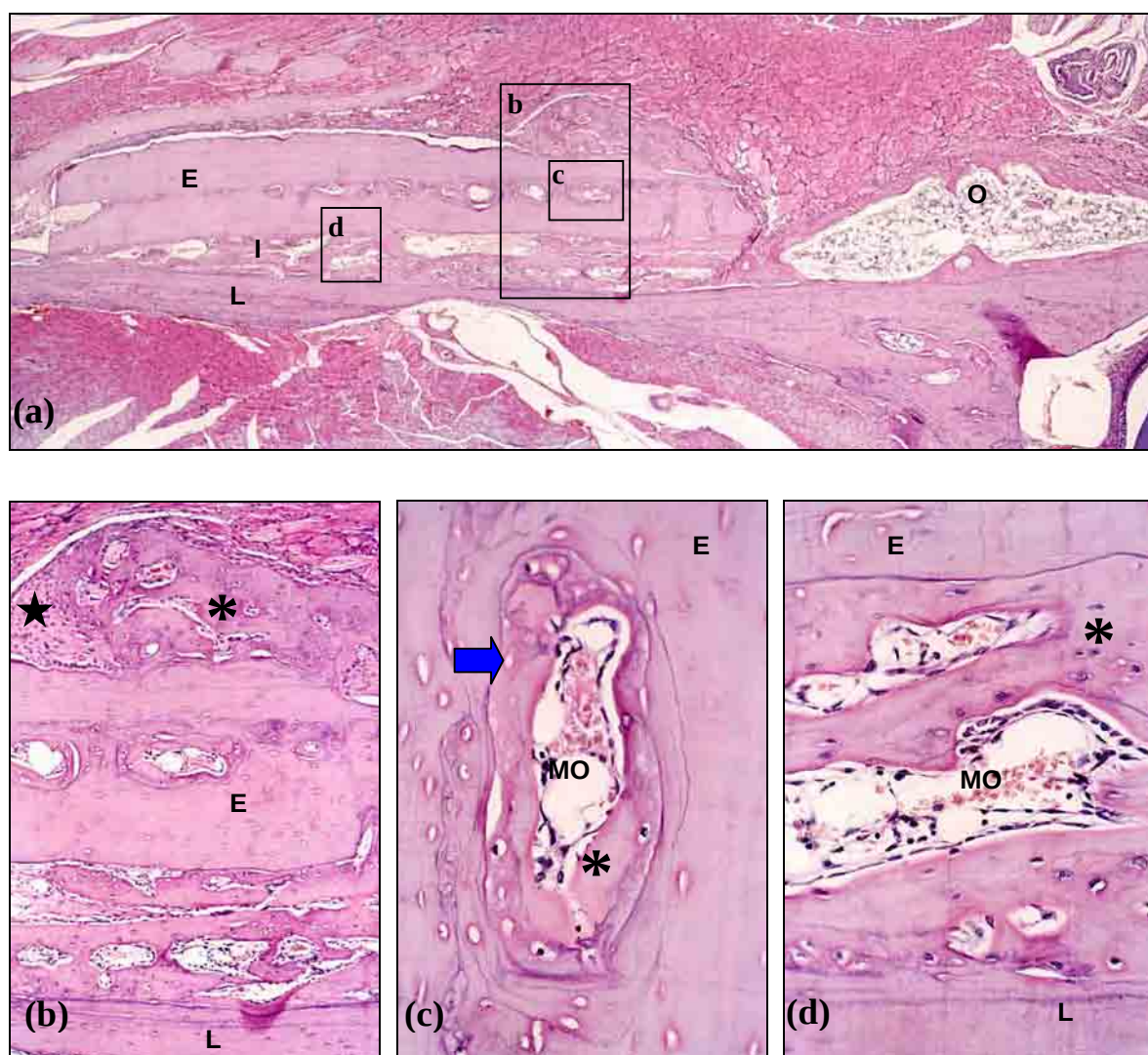


Figura 20. Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e osso reacional (O) na superfície do leito. HE, 34X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície externa do enxerto envolta por tecido conjuntivo (estrela). HE, 87X; c) detalhe do espaço medular (seta azul) envolto por tecido ósseo neoformado (asterisco) circundando o tecido mielóide (MO) em formação HE, 275X; d) detalhe da interface preenchida por tecido ósseo (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L) e os espaços entre as trabéculas ocupados por tecido mielóide (MO) em neoformação. HE, 275X.

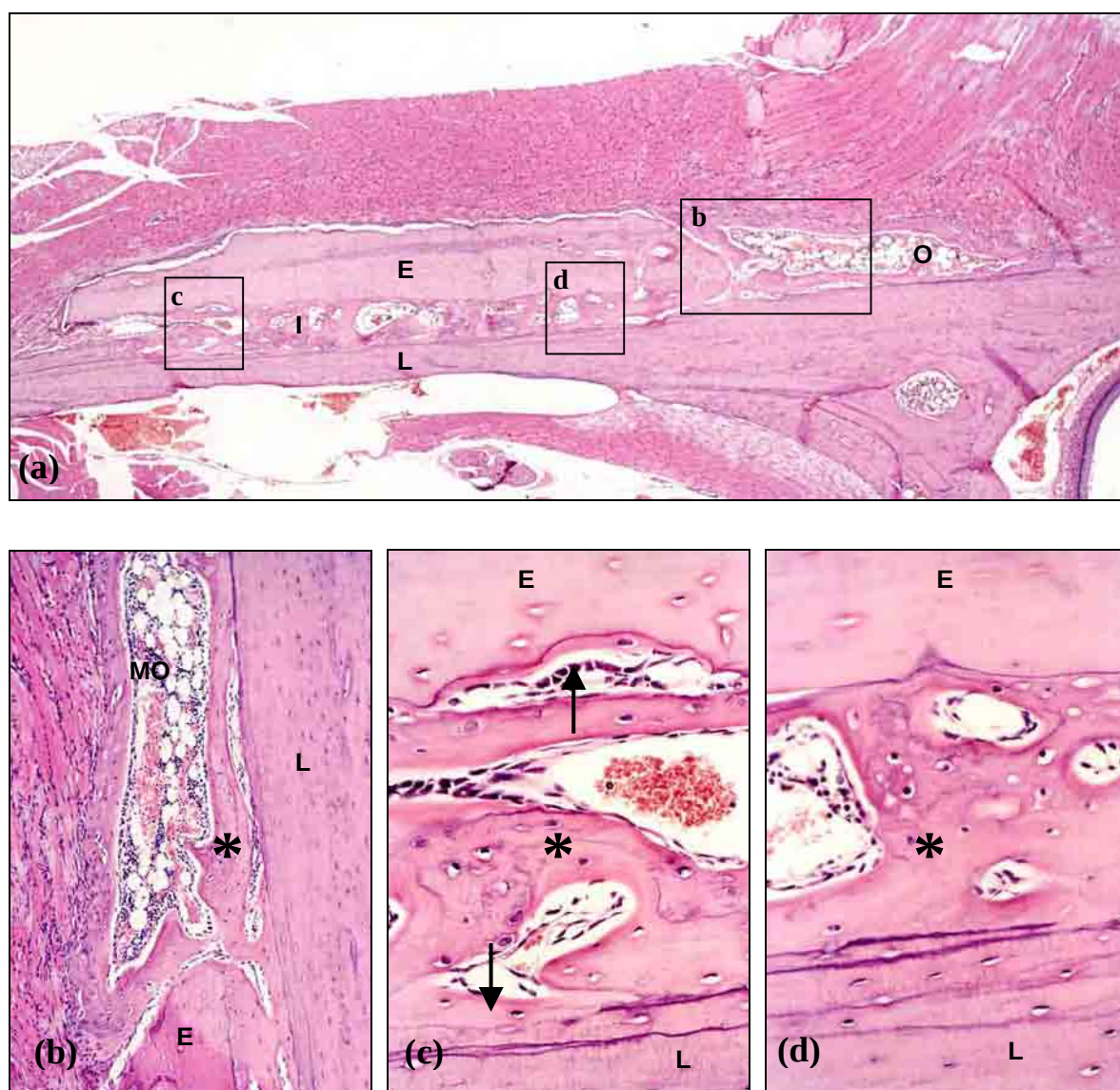


Figura 21. Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e a formação óssea reacional (O) na superfície do leito. HE, 40X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do leito (L) próximo a borda do enxerto (E) formada por uma cortical (asterisco) circundando o tecido mielóide (MO). HE, 87X; c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L) associado a áreas de reabsorção (setas). HE, 275X; d) detalhe do tecido ósseo mais compacto (asterisco) intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L). HE, 275X.

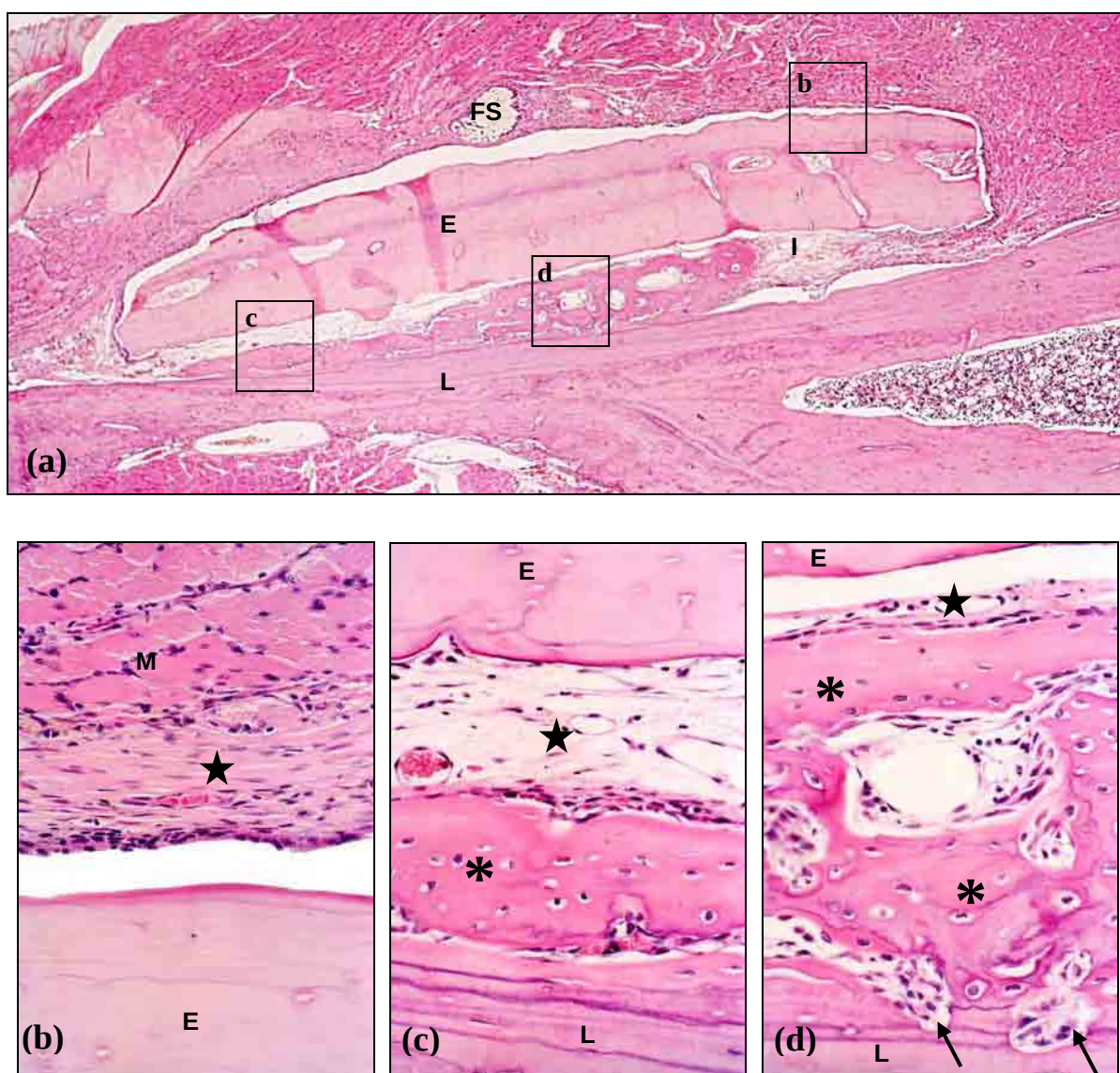


Figura 22. Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE,40X; b) detalhe do tecido conjuntivo semelhante ao periósteo (estrela) recobrindo a superfície externa do enxerto (E) e o tecido muscular (M). HE,275X. c) detalhe do tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do leito e do tecido conjuntivo (estrela). HE,275X; d) detalhe da reabsorção óssea (seta) e do tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do leito (L) e da fina camada de tecido conjuntivo (estrela) separando o enxerto (E) do tecido ósseo (asterisco). HE,275X.

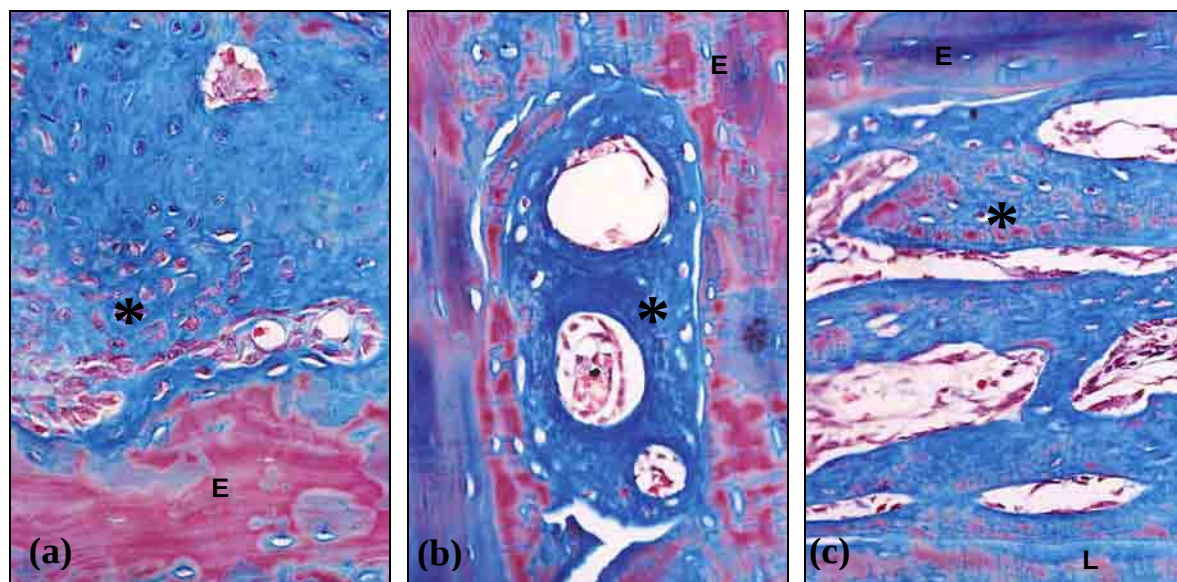


Figura 23. Grupo controle. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) detalhe do tecido ósseo (asterisco) na superfície do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) no interior do espaço medular do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) no espaço da interface intercomunicando o enxerto (E) com o leito (L). Tricrômico de Masson, 275X.

GRUPO EXPERIMENTAL 28 DIAS

Em geral todos os enxertos estavam satisfatoriamente coaptados ao leito receptor apresentando um espaço semelhante ao observado no período anterior. Externamente, os enxertos mostraram-se envoltos por um tecido semelhante ao perióstio. Em apenas um caso, houve neoformação de extensa área de tecido ósseo recoberta por tecido conjuntivo (Fig. 24a).

Os enxertos apresentaram-se menos íntegros em relação ao período de 14 dias, com áreas de reabsorção mais acentuadas na superfície externa. No caso em que ocorreu formação óssea, o tecido neoformado estava associado a áreas de reabsorção e recobertas por tecido conjuntivo fibroso (Fig. 27a). Nos demais casos, a superfície não exibia formação óssea e estava revestida por um tecido semelhante ao perióstio (Fig. 25b). Já, os espaços medulares estavam preenchidos por maior ou menor quantidade de osso neoformado, exibindo grandes áreas ocupadas por tecido conjuntivo e raras por tecido mielóide em formação (Figs. 24b-c, 25b, 26b e 27b).

Em 2 casos, havia uma extensa área de osso neoformado na superfície do leito próximo a borda posterior do enxerto, constituída ainda de tecido ósseo imaturo (Fig. 26a).

Na interface, em 2 casos ocorreu intensa formação de tecido ósseo de arranjo trabecular exibindo alguns fragmentos de matriz óssea aprisionados em seu interior interligando o enxerto ao leito receptor (Figs. 26a e d). Os espaços intertrabeculares mostravam-se, na sua maioria, preenchidos por tecido conjuntivo rico em vasos (Fig. 26c-d). Em um caso ocorreu o fusionamento da borda posterior do enxerto com leito por um tecido ósseo compacto, enquanto que, a borda anterior

apresentava-se separada por um filete de tecido conjuntivo fibroso que também ocupava toda a região mediana da interface (Fig. 24a-d). Nos demais 4 casos, a interface apresentava-se quase que totalmente preenchida por tecido conjuntivo frouxo, com pequenas áreas de formação óssea (Fig. 25d e 27c) indicando um atraso expressivo na integração enxerto-leito receptor.

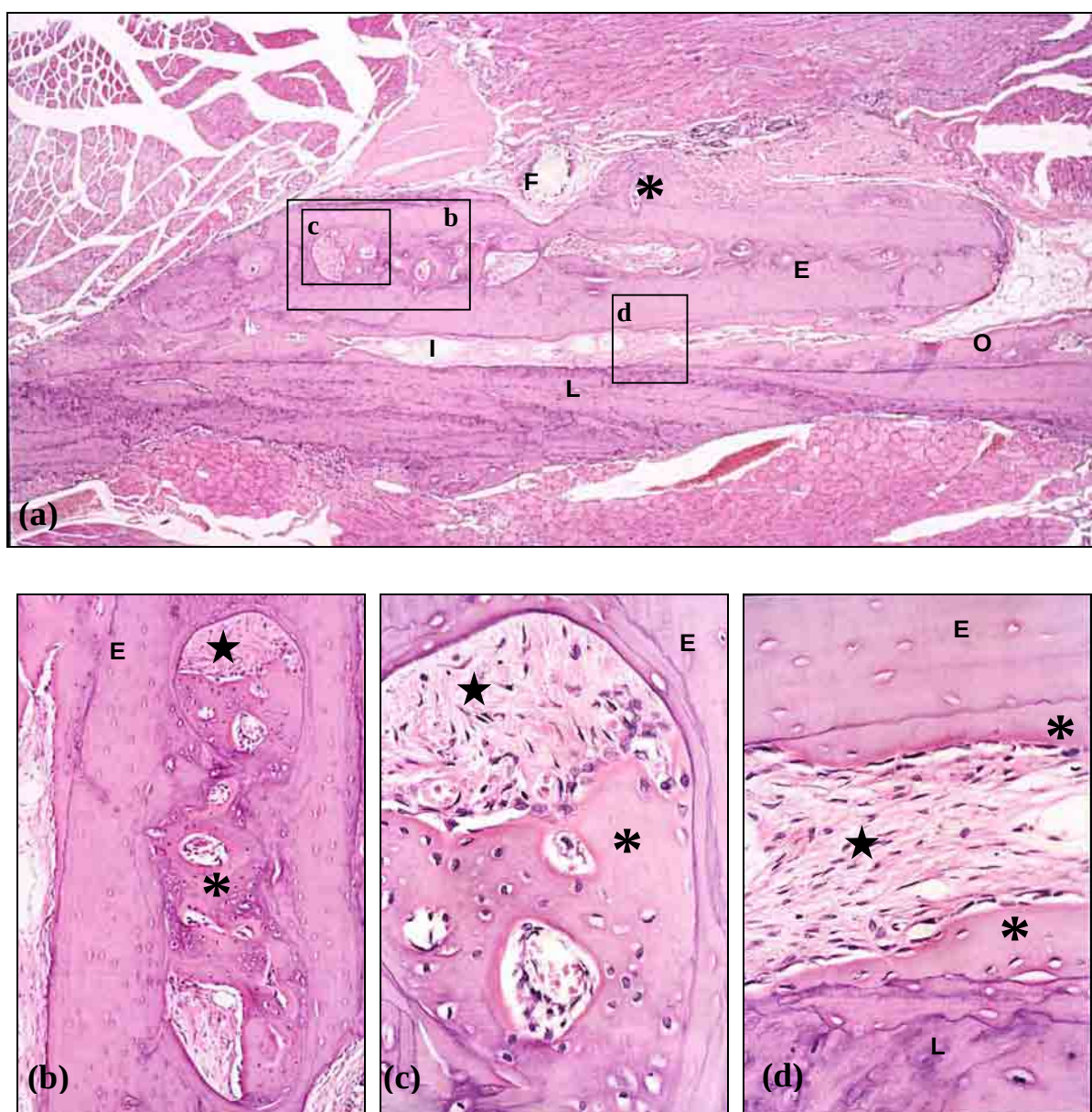


Figura 24. Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I), osso reacional (O) na superfície do leito e o tecido ósseo neoformado (asterisco) na superfície do enxerto. HE, 40X; b) neoformação óssea (asterisco) no interior dos espaços medulares (asterisco) e de tecido conjuntivo (estrela). HE, 87X; c) detalhe de um canal medular da figura anterior apresentando preenchimento por tecido ósseo (asterisco) e conjuntivo (estrela). HE, 275X; d) detalhe da formação óssea na interface junto a superfície do leito receptor (L) e do enxerto (E) intercalado por tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X.

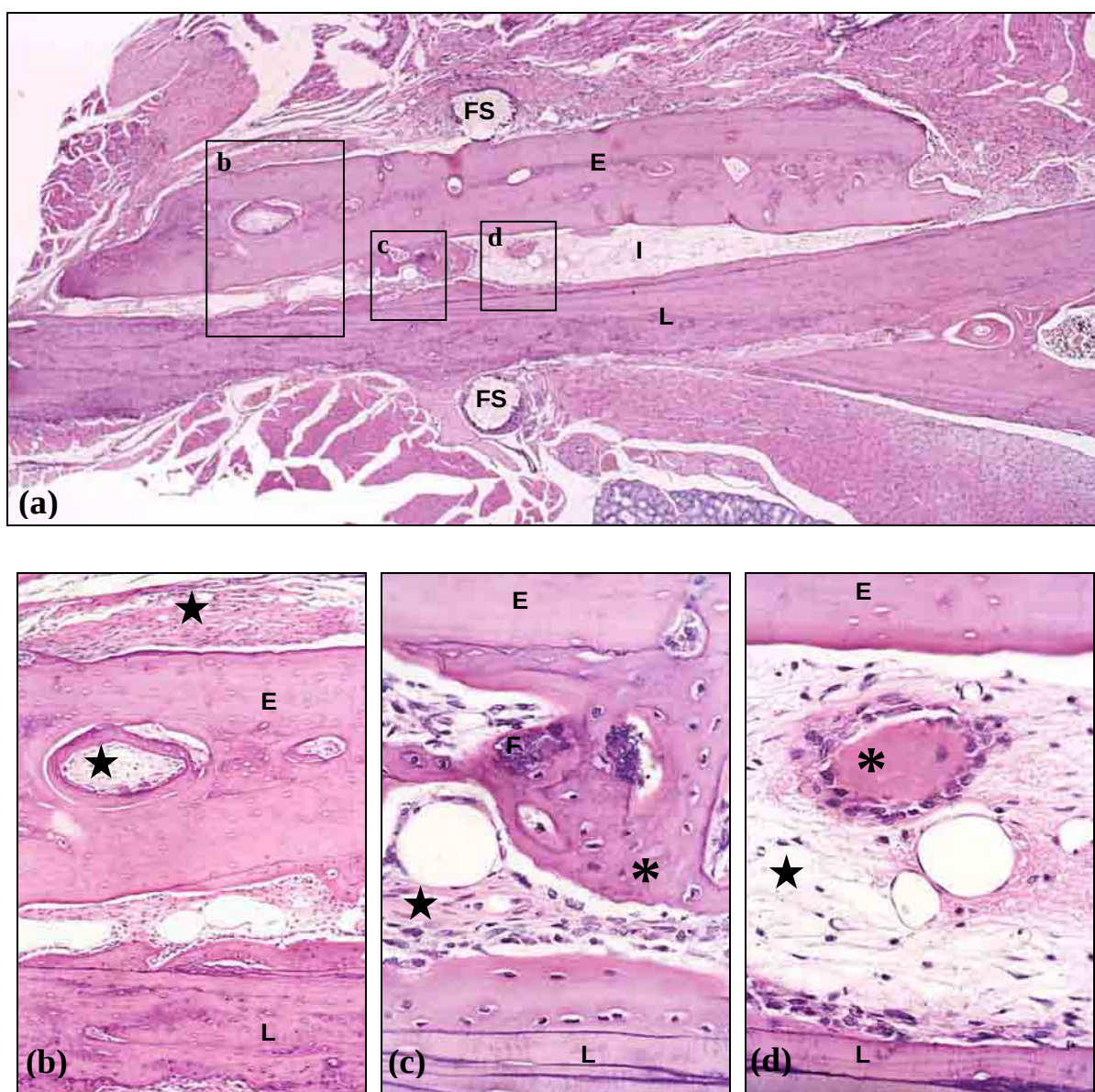


Figura 25. Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e o fio de sutura (FS). HE, 40X; b) aspecto geral do tecido conjuntivo fibroso (estrela) recobrindo o enxerto (E) e preenchendo os espaços medulares. HE, 87X; c) detalhe da interface mostrando a formação óssea (asterisco) com aprisionamento de fragmentos de matriz (F) e o tecido conjuntivo (estrela) na interface. HE, 275X; d) detalhe de ilha de formação óssea (asterisco) na interface e do tecido conjuntivo frouxo (estrela). HE, 275X.

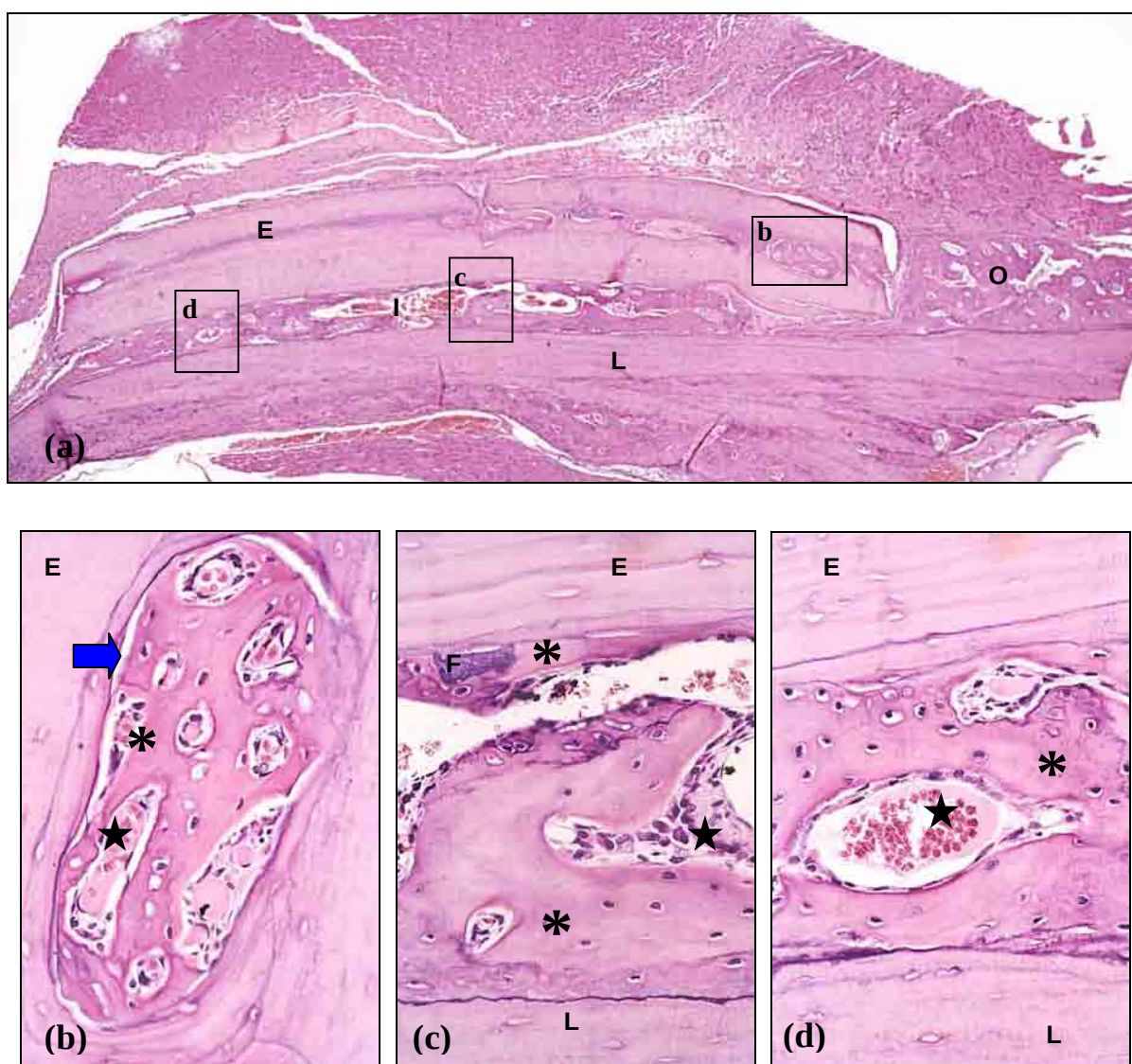


Figura 26. Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) aspecto geral da área do enxerto mostrando o enxerto (E), o leito receptor (L), a interface (I) e osso reacional (O) na superfície do leito. HE, 38X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) no interior dos espaços medulares (asterisco) e do tecido conjuntivo (estrela). HE, 275X; c-d) detalhe da formação óssea (asterisco) na superfície do enxerto com aprisionamento de fragmentos de matriz (F) e do leito receptor com a presença de tecido conjuntivo (estrela) ricamente vascularizado nos espaços inter-trabeculares. HE, 275X.

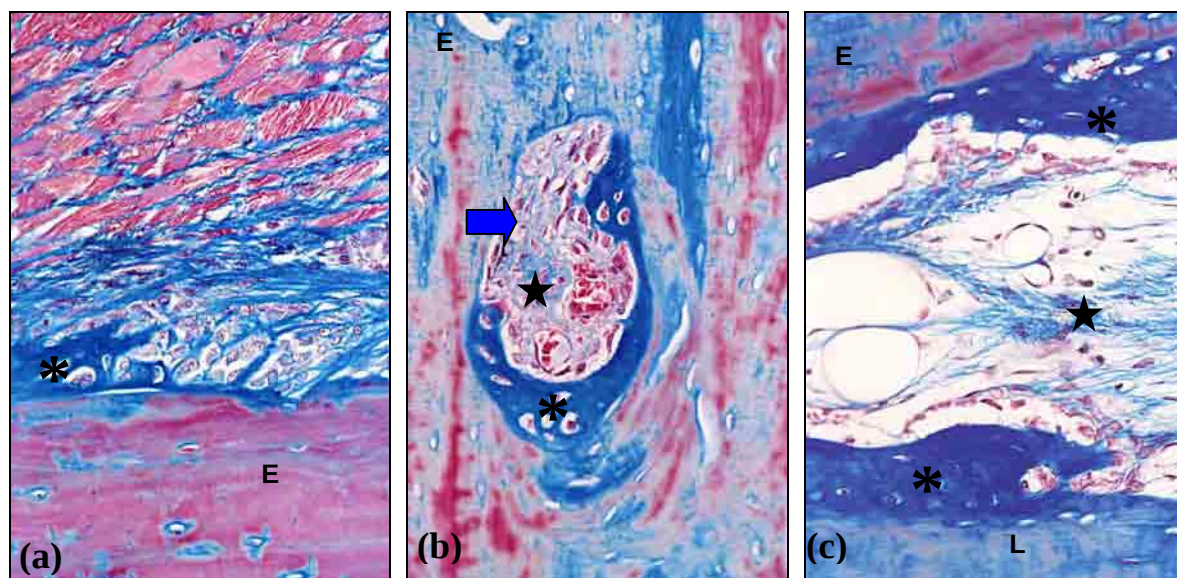


Figura 27. Grupo experimental. Período de 28 dias pós-cirúrgico: a) detalhe da neoformação óssea (asterisco) na superfície do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 87X; b) detalhe da neoformação óssea (asterisco) e do tecido conjuntivo (estrela) no interior do espaço medular (seta azul) do enxerto (E). Tricrômico de Masson, 275X; c) detalhe do tecido ósseo (asterisco) na superfície do enxerto (E) e do leito (L) e o preenchimento de espaço restante por tecido conjuntivo (estrela). Tricrômico de Masson, 275X.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and a prominent blood vessel. The tissue is stained with hematoxylin and eosin (H&E), giving it a pinkish-purple hue. The image is used as a background for the chapter title.

6 Discussão

6 Discussão

Este trabalho constitui a seqüência de uma linha de pesquisa da disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, que teve início com o trabalho realizado por Pinto et al., em 2002 em que avaliou os efeitos da nicotina administrada, subcutaneamente, no processo de reparo de feridas de extração dental. Outras formas de aplicação da nicotina têm sido empregadas. A utilização de mini bombas osmóticas implantadas no subcutâneo que, embora tenha como vantagem a eliminação do estresse diário associado às injeções, apresenta o inconveniente de cirurgias para a substituição da mesma entre 14 e 30 dias. Um outro inconveniente e que consideramos de maior relevância seria o possível descontrole da dosagem, considerando-se que ocorre um declínio dos níveis sistêmicos da droga ao longo do tempo. Outro fator seria o da exposição constante à droga, simulando condições diferentes das encontradas em fumantes, uma vez que durante o sono o indivíduo não fuma (AKHTER et al., 2003; FUNG et al., 1999; RIEBEL et al., 1995; SILCOX et al., 1995; SILCOX et al., 1998).

A administração de nicotina na água de beber e em uma dieta líquida, resulta, respectivamente, em menor consumo de água e menor ganho de peso dos animais, sugerindo interferência da nicotina na absorção de alguns nutrientes (MURRIN et al., 1987). A inalação da fumaça do cigarro simula de uma maneira mais próxima à condição observada em fumantes humanos, embora este método não avalie a nicotina como um único fator (HOLLINGER et al., 1999a; UENG et al., 1997). Segundo, Benowitz et al., (1982) as doses intermitentes administradas através de injeções, simulam a variação diurna da exposição de nicotina observada em fumantes, apesar de

não demonstrarem efeitos cumulativos (SALDANHA et al. 2004). Esta forma injetável, na dosagem aplicada no presente estudo, está correlacionada aos níveis sistêmicos de indivíduos que consomem de 10 a 20 cigarros por dia (GONZALEZ et al., 1996).

Dentro da metodologia empregada no presente experimento, outros cuidados foram tomados quanto as aplicações da nicotina iniciando-as 30 dias antes do procedimento cirúrgico do enxerto ósseo. Este fato condiz mais com a realidade, visto que o organismo já havia sido exposto previamente à droga, uma vez que os pacientes não começam a fumar imediatamente após o procedimento cirúrgico (CRAIG; REES, 1985; HOLLINGER et al., 1999a; MOSELY et al., 1978; NOLAN et al., 1985; PINTO et al., 2002), diferentemente de outros estudos que iniciaram as administrações de nicotina e/ou inalação da fumaça do cigarro imediatamente após o procedimento cirúrgico (CÉSAR-NETO et al., 2003; LAWRENCE et al., 1984; NOCITI JÚNIOR et al., 2002a, 2002b; RIEBEL et al., 1995; STEFANI et al., 2002; SALDANHA et al., 2004).

A utilização do rato como modelo experimental, se deve ao fato de sua fácil acomodação e manuseio, baixo custo e de acomodar um maior número de animais em cada grupo experimental, possibilitando uma análise mais fidedigna dos enxertos estudados.

A metodologia do procedimento de enxerto de osso autógeno em bloco foi baseada no trabalho desenvolvido por Jardini em 2001, desenvolvida, na Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, com o intuito de contribuir para o conhecimento dos mecanismos biológicos e da seqüência temporal dos eventos de reparação óssea.

Desta maneira, considerando-se o elevado número de pacientes fumantes que necessitam de procedimentos de enxertos ósseos autógenos para um

aumento em espessura e/ou altura de rebordo (GROSS, 1997), de maneira a permitir a posterior colocação de implantes, é relevante conhecer os mecanismos biológicos e a cronologia dos eventos, além de salientar e discutir as principais diferenças obtidas no processo de reparação tecidual frente à administração da nicotina.

A utilização do osso autógeno, freqüentemente relatado como o “padrão ouro” dos enxertos ósseos, não deixa dúvidas quanto a alta previsibilidade e o grande índice de sucesso. Conseqüentemente permite a reabilitação de pacientes que necessitam de próteses implanto suportadas, as quais, sem osso, estariam impossibilitadas (BUSER et al., 1996; CAPELLI, 2003; MERKX et al., 1999a; MISCH et al., 1992; MISCH; MISCH 1995; NYSTROM et al., 2004; ORSINI et al., 2003; PIKOS, 2000; RAGHOEBAR et al., 1996; WILLIAMSOM, 1996).

A origem e composição dos materiais de enxertos ósseos, normalmente determinam o mecanismo de ação pelo qual eles atuam (MISCH; DIETSH, 1993). O material de enxerto utilizado no presente experimento, classificado como autógeno, constitui o único material orgânico capaz de formar novo osso através dos processos de osteogênese, osteoindução e osteocondução a partir de uma sobreposição de eventos (GARG, 1999, 2001; GROSS, 1997; MISCH; DIETSH, 1993).

Apesar da busca incessante de alternativas para simplificar o procedimento cirúrgico e eliminar a morbidade cirúrgica da área doadora, até o presente momento, os enxertos ósseos autógenos são definidos como o “padrão ouro” dos enxertos, além de ser a primeira escolha devido às suas propriedades osteogênicas que resultam numa formação óssea mais rápida. (FERNANDES et al., 1998; GARG, 1999, 2001; GROSS, 1997; KARRING et al., 1999; MISCH; DIETSH, 1993; PIKOS, 2000; THALLER, 1991).

No presente estudo, o osso parietal foi selecionado como área doadora e a mandíbula como leito receptor, sendo ambos de origem embriológica intramembranosa. Considerando-se a origem embriológica de diferentes áreas doadoras e/ou receptoras de enxertos ósseos autógenos, existem estudos sugerindo que enxertos ósseos intramembranosos reabsorvem menos que enxertos ósseos endocondrais, e a revascularização inicial mais rápida do enxerto ósseo intramembranosos é uma possível explicação para melhor manutenção do volume do enxerto (HAMMACK; ENNEKING, 1960; KUSIAK et al., 1985; PIKOS, 2000; SMITH; ABRAMSON, 1974; ZINS, 1983). No entanto, segundo Hollinger et al. (1999b) não existem evidências bioquímicas, funcionais ou morfológicas entre os ossos de diferentes origens.

Um enxerto osteogênico é um material orgânico derivado de/ou composto de tecidos vivos envolvidos no crescimento natural ou de reparo ósseo. No grupo controle aos 7 dias pôde ser observado áreas pontuais de reabsorção além de áreas exibindo pequenas formações de tecido ósseo primário, ricamente povoadas por osteoblastos em diferentes graus de diferenciação. No trabalho de Azem (2002), no 3º dia já pôde ser observado brotos vasculares provenientes do leito receptor. Assim, podemos correlacionar com os dados do estudo de BOYNE (1966) quando relatou que o espaço da interface, ocupado por coágulo sangüíneo, será invadido por vasos e acompanhado de células osteoprogenitoras perivasculares que se diferenciarão em osteoblastos para formar tecido ósseo. Este fenômeno de penetração vascular em toda a periferia do enxerto, com vasos oriundos do leito receptor e do tecido conjuntivo circunjacente, foi observado por Azem (2002) aos 7 dias. A revascularização, essencial para os eventos de cicatrização do enxerto ósseo, fornece nutrição para as células

sobreviventes da porção periférica do enxerto (BURCHARDT, 1983; BURWELL, 1985; CAPELLI, 2003; URIST, 1980). Esta se inicia pelos canais de Havers, seguida de reabsorção da matriz óssea, com conseqüente aumento da porosidade (ENNEKING et al., 1980). Após aumento da porosidade, inicia-se uma fase de neoformação óssea aposicional (BURCHARDT, 1983). Consequentemente, mediadores químicos, principalmente BMPs que estão presentes na matriz óssea são liberados pelo enxerto, induzindo células mesenquimais indiferenciadas a se diferenciarem em osteoblastos e produzir novo osso (CARVALHO et al., 2002; GARG, 1999, 2001; GROSS, 1997; HOLLINGER; NONG, 1996; LIEBERMAN et al., 2002; MISCH; DIETSH, 1993; SPRINGFIELD, 1992). O processo de osteoindução pode vir a partir do material do enxerto e dos próprios osteoblastos sobreviventes, da indução de células multipotenciais, ou pela indução de células primitivas oriundas da área medular do leito receptor. A partir de então, ocorre a remodelação do enxerto e do osso neoformado (BURCHARDT, 1983; BURWELL, 1985; CAPELLI, 2003; URIST, 1980).

A penetração vascular do enxerto influencia diretamente a dinâmica de substituição do enxerto (JARDINI, 2001; AZEM, 2002). Esta dinâmica de substituição denominada de *creeping substitution* por Burchardt e Enneking, (1978) que seria uma substituição gradual do tecido ósseo enxertado.

Neste contexto, no presente estudo, o grupo controle aos 7 dias mostrou o espaço da interface, invadido por tecido de granulação, com numerosas células semelhantes a fibroblastos, vasos sangüíneos e poucas fibras além de deposição inicial de uma fina camada de tecido ósseo com inclusão de osteócitos e inserção de inúmeras fibras colágenas dispostas obliquamente. Resultados semelhantes, embora demonstrando um estágio mais avançado no processo de reparo,

foram encontrados por Jardini (2001), demonstrando interposição de tecido conjuntivo e formação de trabéculas de osso imaturo oriundas do leito receptor, com algumas formações de pontes de união entre o enxerto e o leito. Esta diferença poderia ser atribuída à idade dos animais utilizados, visto que no presente estudo as ratas eram bem mais velhas, apresentando 12 meses de idade.

Um aspecto importante no processo de revascularização parece estar relacionado ao preparo do leito receptor. Em 2000, Carvalho et al. relataram que o mesmo desempenha um papel fundamental, uma vez que leitos perfurados e decorticalizados demonstraram melhores resultados. Os autores atribuíram estes resultados a uma revascularização mais rápida. No presente estudo, dada a espessura delgada do leito receptor da mandíbula, não foi possível realizar decorticalização ou perfuração do leito receptor, permitindo apenas uma raspagem superficial da cortical garantindo a remoção do periósteo.

Aos 7 dias, o grupo experimental, comparativamente ao grupo controle, demonstrou um atraso em todos os aspectos avaliados do processo de reparo. O tecido de granulação encontrava-se ainda imaturo circundando o enxerto, e o espaço da interface, na maior parte estava preenchido por restos de coágulo sangüíneo e consequentemente menor migração celular. Nenhum sinal de diferenciação celular e/ou deposição de osteóide foi encontrado neste grupo. Dentre outras fases importantes do processo de reparo, a inflamatória pode ser atrasada pelo efeito inibitório da nicotina sobre a capacidade proliferativa de precursores de eritrócitos, bem como sobre eritrócitos maduros (MOSELY et al., 1978). Este efeito pode estar relacionado a um aumento da combinação do monóxido de carbono à hemoglobina, que poderia resultar

em um transporte deficiente de oxigênio para os vários órgãos e tecidos do organismo (LAWRENCE et al. 1984).

Um fator considerado como relevante no atraso do processo de reparo é o fluxo sangüíneo, que poderia estar reduzido pelas propriedades vasoconstritoras da nicotina. Esta também é responsável pela estimulação de gânglios simpáticos e da medula adrenal, gerando um aumento na descarga de catecolaminas: epinefrina e norepinefrina que acaba por ativar quimiorreceptores localizados na aorta e carótida na produção da vasoconstrição periférica e diminuição da perfusão tecidual (CRYER, 1976; REUS et al., 1984; TAYLOR, 2001). É possível que ocorra um aumento da resposta vascular constritora em resposta a norepinefrina podendo resultar numa redução crônica do fluxo sangüíneo para o tecido ósseo (FEITELSON et al., 2003). A vasoconstrição gerada pelo fumo com conseqüente redução do fluxo sangüíneo pode ser observada após fumar um único cigarro e, portanto é acentuada em fumantes habituais que consomem de 1 a 2 maços por dia (REUS, 1984).

A nicotina atua diretamente sobre pequenos vasos (ISAAC; RAND, 1969), assim como interfere com a revascularização inicial, essencial para nutrição das células sobreviventes da porção periférica do enxerto (BURWELL, 1985). Um intenso efeito vasoconstritor sobre a microvasculatura pode também inibir a resposta angioblástica durante a revascularização na cicatrização dos enxertos ósseos (DAFTARI et al., 1994) e de uma maneira geral nas áreas de cicatrização (SALDANHA et al., 2004). Neste contexto, pode-se presumir que o retardo observado no grupo experimental e o maior número de lacunas de osteócitos vazias no interior do enxerto se devem aos efeitos da nicotina. Embora Riebel et al., 1995 relataram que os efeitos referentes à inibição ou prejuízo na revascularização de enxerto ósseo foram mais

evidentes na fase inicial de revascularização observando-se menor quantidade de vasos invadindo o enxerto ósseo, os nossos resultados mostraram atraso em todos os tempos estudados.

Aos 14 dias, ambos os grupos demonstraram sinais de reabsorção tanto na superfície externa quanto no interior dos espaços medulares e dos canais nutritivos, sendo que alguns destes espaços já exibiam preenchimento por tecido conjuntivo rico em vasos e células, além de pequena neoformação óssea na sua superfície. No grupo controle, ao considerar o espaço da interface, notou-se intensa formação de tecido ósseo primário ocupando grande parte do mesmo, principalmente em sua porção mediana, e o restante estava preenchido por tecido conjuntivo fibroso. Estes dados podem ser corroborados aos achados de Azem (2002) a qual mostrou penetração de vasos em toda a periferia do enxerto, alcançando variáveis extensões no interior do mesmo. Além disso, estes aspectos evidenciam o processo de remodelação e neoformação óssea, confirmando a nutrição e viabilidade, assim, o enxerto demonstra a sua capacidade osteoindutora e osteocondutora. Contudo, no grupo experimental, notou-se um atraso no processo de reparo onde o revestimento da superfície externa do enxerto se fazia por tecido conjuntivo mais imaturo assim como o preenchimento do espaço da interface se fazia por um tecido conjuntivo bastante frouxo. Em alguns casos este tecido conjuntivo estava associado à formação óssea pontual na superfície do leito receptor e/ou associado a fragmentos de matriz óssea do enxerto ou do leito receptor.

As possíveis causas do retardo da cronologia dos eventos do processo de reparo, associados à nicotina, poderia também estar relacionado ao prejuízo da função de osteoblastos bem como da orientação celular.

Desta forma, os eventos do processo de reparo tornar-se-iam reduzidos não somente pela vasoconstrição periférica, mas também pela diminuição da atividade dos osteoblastos, com conseqüente redução da formação óssea (DAFTARI et al., 1994; FANG et al., 1991; FUNG et al., 1999; PAYNE et al., 1996; RIEBEL et al., 1995; SILCOX et al., 1995; VERNEJOUL et al., 1983;). Em 1991, Ramp et al., relataram uma marcante inibição da atividade da enzima ALPase, em células semelhantes a osteoblastos, sugerindo um efeito da nicotina sobre as funções sintetizadoras, uma vez que esta enzima está associada ao crescimento ósseo e atividade osteoblástica. A vasoconstrição periférica do leito receptor reduz o potencial das células progenitoras e produz um ambiente inóspito, prejudicando o reparo ósseo e a sobrevivência do enxerto (HOLLINGER et al., 1999a).

A redução da síntese do colágeno ósseo e a inibição do metabolismo ósseo podem ser causadas não somente pela nicotina, mas também por outros componentes ainda não identificados, presentes no tabaco (GALVIN et al., 1988).

Uma menor produção de matriz óssea parece ser influenciada pela nicotina, sugerindo que o efeito primário é vascular, podendo assim indicar que nos ossos com vascularização limitada, a reabsorção do enxerto ocorre em um nível mais lento devido à reduzida habilidade em reabsorver trabéculas necróticas (RIEBEL et al., 1995).

A nicotina e o cigarro têm sido relacionados a um aumento da adesividade plaquetária, com resultante aumento da incidência de oclusão microvascular e subseqüente isquemia tecidual (MOSELY; FINSETH, 1977).

Uma possível redução na tensão de oxigênio em resposta ao fumo, foi relacionada à vasoconstrição periférica induzida pelos efeitos adrenérgicos da nicotina

(JENSEN et al., 1991) e, segundo Benowitz, (1988) parece coincidir com o pico do nível sanguíneo de nicotina.

O aumento da combinação do monóxido de carbono à hemoglobina, também causada pela nicotina (MOSELY et al., 1978) pode resultar na redução da quantidade de oxigênio disponível para perfusão tecidual (NOLAN et al., 1985; REES, 1985). Logo, a disponibilidade de oxigênio poderia não somente estar relacionada à quantidade de oxigênio ligada à hemoglobina, mas também ao oxigênio que é transportado, e não efetivamente liberado para ser usado na respiração celular. Isto resultaria em hipóxia ou anoxia celular (SHERWIN; GASTWIRTH, 1990). Seguindo esse raciocínio, nos resultados do grupo experimental aos 14 dias, onde um caso mostrou formação de tecido ósseo associado ao tecido cartilaginoso, indicando áreas de formação óssea endocondral, poderia ser atribuída ao fato de que células cartilaginosas exigem um menor suprimento vascular, portanto se adaptam muito bem em ambientes com baixa tensão de oxigênio, o que levou seu aparecimento em local de osso de origem intramembranosa (RAJPUROHIT et al., 1996).

A presença de um tecido conjuntivo mais frouxo, mais pobre em células e com menor quantidade de fibras colágenas no grupo experimental pode ser atribuída à diminuição ou inibição da proliferação celular (ALPAR et al., 1998; GIANNINOPOULOU et al., 1999; JAMES et al., 1999; TANUR et al., 2000; TIPTON; DABBOUS, 1995) e da migração celular (GIANNINOPOULOU et al., 1999), além da inibição da produção de fibronectina, de colágeno tipo I (TIPTON; DABBOUS, 1995).

Esses achados são atribuídos a uma possível penetração da nicotina no fibroblasto. De acordo com Tipton e Dabbous (1995), esses efeitos são exercidos intracelularmente. A ligação da nicotina à membrana celular prejudicaria importantes

funções das células, tais como inserção e transporte de substâncias entre os espaços extra e intracelular com conseqüentes efeitos danosos sobre o potencial reparativo e regenerativo dos tecidos (ALPAR et al., 1998; HANES et al., 1991).

Tanto a ligação quanto a absorção de nicotina pelo fibroblasto ocorre rapidamente. A presença da nicotina provavelmente rompe o processo metabólico celular normal, tais como síntese de colágeno e secreção de proteínas, podendo resultar no rompimento da resposta normal da cicatrização de feridas (Hanes et al., 1991). De acordo com Tipton e Dabbous, (1995) a liberação da nicotina ocorre na forma não metabolizada, sugerindo que o prejuízo pode estar relacionado ao tempo necessário para o “empacotamento” da nicotina e seus metabólitos em vacúolos antes de serem liberados pela célula. Raulin et al. (1988) associaram a presença de vacúolos à captação e armazenamento de nicotina ou simplesmente uma resposta à injúria, uma vez que a vacuolização é um achado comum em células que estão “sofrendo” injúria. Desta maneira, as funções reparativas dos fibroblastos, mais especificamente a migração e divisão celular e a síntese de uma variedade de moléculas extracelulares inibidas pela nicotina e cotinina, poderiam, ao interferir em qualquer uma dessas funções, acarretar um prejuízo da cicatrização de feridas (JAMES et al., 1999).

No período de 28 dias, ambos os grupos apresentaram áreas de reabsorções mais acentuadas dos enxertos que nos períodos anteriores. Os enxertos encontravam-se envoltos por um tecido conjuntivo semelhante ao periósteo, o que poderia justificar, pelo menos em parte a maior reabsorção da superfície dos mesmos, relatados por Jardini (2001) no grupo não protegido pelo uso da membrana. Os espaços medulares apresentaram-se similares em ambos os grupos. No grupo controle eles estavam preenchidos por maior quantidade de tecido mielóide e raras vezes por

tecido conjuntivo, enquanto o inverso ocorreu no grupo experimental. A mais avançada fase de reparo do grupo controle, neste período, deve estar associada a uma mais rápida revascularização, uma vez que Azem (2002) relatou que aos 21 dias, os enxertos apresentavam-se revascularizados em toda a sua extensão, exibindo grande quantidade de vasos no seu interior, oriundos do leito receptor e do tecido conjuntivo circunjacente.

O espaço da interface no grupo controle, aos 28 dias, apresentou-se preenchido em 3 casos por tecido ósseo de arranjo trabecular interconectando o enxerto ao leito receptor, entremeados por tecido mielóide em estágio inicial de formação. Nos demais 5 casos a interconexão não estava presente e a neoformação óssea estava restrita à superfície do enxerto e do leito receptor, separada por uma fina camada de tecido conjuntivo. No grupo experimental, o espaço da interface apresentou-se preenchido em aproximadamente 2 casos por tecido ósseo de arranjo trabecular interconectando o enxerto ao leito receptor, entremeados por tecido conjuntivo bastante vascularizado. Os demais 6 casos, apresentaram-se quase que totalmente preenchidos por tecido conjuntivo frouxo com pequenas áreas de formação óssea associada à superfície do enxerto e do leito receptor, indicando um nítido atraso na integração ao leito receptor quando comparado ao grupo controle. Ao compararmos os nossos resultados tanto do grupo controle quanto experimental na interface enxerto/leito receptor aos encontrados por Azem (2002), pudemos verificar um menor preenchimento ósseo desta área, que mais uma vez poderia estar relacionado à idade dos animais, assim como por ter usado membrana que teve como objetivo barrar a migração de tecido conjuntivo das regiões vizinhas.

Embora Ueng et al., 1997 tenham utilizado um modelo experimental diferente, onde realizou distração osteogênica em coelhos submetidos à inalação da fumaça do cigarro, os autores descreveram prejuízo no processo de substituição do tecido de granulação, na formação e remodelação óssea quando comparados ao grupo controle, semelhantes ao encontrado no presente experimento. De maneira relevante, esses efeitos adversos no processo de reparo foram mitigados quando os animais foram submetidos a terapia de oxigênio hiperbárico (UENG et al., 1999).

Apesar de não ser encontrado efeitos nocivos do cigarro sobre a massa óssea corporal (IWANIEC et al., 2000 e 2001; MCDERMOTT; WITTE 1988; SYVERSEIN et al., 1999), quando os estudos têm por objetivo avaliar o processo de reparo, a literatura não deixa dúvidas quanto aos potenciais efeitos nocivos do hábito de fumar, em especial da nicotina, demonstrando uma redução da aposição óssea e formação de matriz mineralizada (FUNG et al., 1999; GALVIN et al., 1988; PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991; ROHN; RAMP, 1987; VERNEJOUL et al., 1983), redução do crescimento e diferenciação de células ósseas (FANG et al. 1991; PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991; YUHARA et al., 1999;), além de alterações na morfologia celular óssea tais como arredondamento e formação de vacúolos citoplasmáticos (PEREIRA et al., 2003; RAMP et al., 1991).

Embora os resultados do presente estudo não possam ser diretamente extrapolados para os enxertos ósseos empregados em seres humanos, uma vez que outros agentes presentes no tabaco poderiam interferir no reparo ósseo (AKHTER et al. 2003, CÉSAR-NETO et al. 2003, NOCITI JÚNIOR et al., 2002b, STEFANI et al., 2002) Estes resultados sugerem que a nicotina, apesar de ser somente uma das mais de 4000 substâncias tóxicas presentes nos produtos do tabaco (CATTANEO et al., 2000;

SHERWIN; GASTWIRTH, 1990; TONETTI, 1998), foi responsável por retardar a cronologia dos eventos do processo de reparo de enxerto ósseo autógeno. Vale ressaltar a necessidade da realização de novos estudos que utilizem uma quantidade mais representativa das substâncias tóxicas originadas da combustão do cigarro, para se avaliar o processo de reparo de enxertos ósseos.

A microscopic image of tissue, likely a histological section, showing various cellular structures and staining. The image is used as a background for the chapter title.

7 Conclusão

7 Conclusão

De acordo com a metodologia empregada no presente estudo e das condições experimentais, nos parece lícito concluir que:

- A nicotina altera o processo de reparo de enxertos ósseos autógenos, retardando a cronologia dos eventos, no entanto, não foi capaz de impedi-lo;

- A ação da nicotina não se restringe somente ao retardo da osteogênese na interface enxerto-leito, como também na formação inicial do tecido de granulação em substituição ao coágulo sangüíneo, denotando-se menor invasão vascular e celular, além da neoformação óssea e restabelecimento do tecido mielóide no interior dos espaços medulares do enxerto.

A rectangular inset image showing a microscopic view of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). The tissue shows various cellular structures and fibers in shades of pink and purple.

Referências

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

AKHTER, M. P. et al. Effects of nicotine on bone mass and strength in aged female rats. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 21, n. 1, p. 14-19, Jan, 2003.

ALBEE, J. H. Fundamentals in bone transplantation. **JAMA**, Chicago, v. 81, n. 17, p. 1429-1432, Oct. 1923.

ALPAR, B. et al. Nicotine-induced alterations in human primary periodontal ligament and gingiva fibroblast cultures. **Clin. Oral. Investig.**, Berlin, v. 2, n. 1, p. 40-46, Mar. 1998.

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

ASHMAN, A.; BRUINS, P. Prevention of alveolar bone loss post-extraction with HTR grafting material. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 60, n. 2, p. 146-153, Aug. 1985.

ATWOOD, D. A. Reduction of residual ridges: a major oral disease entity. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 26, n. 3, p. 266-279, Sept. 1971.

AZEM A. C. Revascularização de enxerto ósseo autógeno em bloco associado ou não à membrana de PTFE-e. 2002. 57 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BENOWITZ, N. L.; JACOB, P. 3rd Daily intake of nicotine during cigarette smoking. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 35, n. 4, p. 499-504, Apr. 1984.

BENOWITZ, N. L. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addition. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 319, n. 20, p. 1318-1330, Nov. 1988.

BENOWITZ, N. L.; KUYT, F.; JACOB, P. 3RD. Circadian blood nicotine concentrations during cigarette smoking. **Clin. Pharmacol. Ther.**, St. Louis, v. 32, n. 6, p. 758-764, Dec. 1982.

BENSON, B. W.; SHULMAN, J. D. Inclusion of tobacco exposure as a predictive factor for decreased bone mineral content. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, MO, v. 97, n. 2, p. 266-267, Feb. 2004.

BHASKAR, S. N. Maxila e mandíbula (apófise alveolar). In: ORBAN, B. J.; BHASKAR, S. N. **Histologia e embriologia oral de Orban**. 8 ed., São Paulo: Artes Médicas, 1978. p. 239-258.

BOYNE, P. J. Histologic response of bone to sectioning by high-speed rotary instruments. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 45, n. 2, p. 270-276, Mar./Apr. 1966.

BOYNE, P. J.; JAMES, R. A. Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 38, n. 8, p. 613-616, Aug. 1980.

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

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

BURWELL, R. G. The function of bone marrow in the incorporation of a bone graft. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n. 200, p. 125-141, Nov. 1985.

BUSER, D. et al. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 54, n. 4, p. 420-432, Apr. 1996.

CAPELLI, M. Autogenous bone graft from the mandibular ramus: a technique for bone augmentation. **Int. J. Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 23, n. 3, p. 277-285, June 2003.

CARVALHO, P. S. P.; LUPPINO, F.; MENDES, V. C. Histofisiologia óssea e os biomateriais aplicados à implantodontia. In: BEZERRA, F. J. B.; LENHARO, A. **Terapia clínica avançada em implantodontia**. São Paulo, Artes Médicas, 2002.

CARVALHO, P. S.; VASCONCELLOS, 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, Jul./Aug. 2000.

CATTANEO, V. et al. Volatile components of cigarette smoke: effect of acrolein and acetaldehyde on human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 425-432, Mar. 2000.

CESAR-NETO, J. B. et al. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 74, n. 10, p. 1454-1459, Oct. 2003.

CRAIG, S.; REES, T.D. The effects of smoking on experimental skin flaps in hamsters. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 75, n. 6, p. 842-846, June 1985.

CRYER, P. E. et al. Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 295, n. 11, p. 573-577, Sep. 1976.

DAFTARI, T. K. et al. Nicotine on the revascularization of bone graft. An experimental study in rabbits. **Spine**, Philadelphia, v. 19, n. 8, p. 904-911, Apr. 1994.

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

ENNEKING, W. F.; EADY, J. L.; BURCHARDT, H. Autogenous cortical bone grafts in the reconstruction of segmental skeletal defects. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 62, n. 7, p. 1039-1058, Oct. 1980.

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.

FANG, M. A. et al. Effects of nicotine on cellular function in UMR 106-01 osteoblast-like cells. **Bone**, Elmsford, v. 12, n. 4, p.283-286, 1991.

FEITELSON, J. B. et al. Two week nicotine treatment selectively increases bone vascular constriction in response to norepinephrine. **J. Orthop. Res.**, New York, v. 21, n. 3, p. 497-502, May 2003.

FERNANDES, N. I.; MACHADO, I. G.; MINELLO, L. F. Enxertos com osso autógeno e xenógeno. **RGO**, Porto Alegre, v. 46, n. 3, p. 162-168, jul./set. 1998.

FUNG, Y. K. et al. Long-term effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in adult female rats. **Pharmacol. Toxicol.**, Copenhagen, v. 85, n. 4, p. 181-187, Oct. 1999.

GALVIN, R. J.; RAMP, W. K.; LENZ, L. G. Smokeless tobacco contains a nonnicotine inhibitor of bone metabolism. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 95, n. 2, p. 292-300, Sept. 1988.

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

GARG A. K. Preservation, augmentation, and reconstruction of the alveolar ridge. **Dent. Implantol. Update.**, Atlanta, v. 12, n. 11, p. 81-85, Nov. 2001.

GIANNOPOULOU, C.; GEINOZ, A.; CIMASONI, G. Effects of nicotine on periodontal ligament fibroblasts in vitro. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 26, n. 1, p. 49-55, Jan. 1999.

GONZALEZ, Y. M. et al. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 796-802, Feb. 1996.

GROSS J. S. Bone grafting materials for dental applications: a practical guide. **Compend. Contin. Educ. Dent.**, Jamesburg, v. 18, n. 10, p. 1013-1024, Oct. 1997.

HAMMACK, B. L.; ENNEKING, W. F. Comparative vascularization of autogenous and homogenous-bone transplants. **Am. J. Orthop.**, Houston, v. 42-A, p. 811-817, Jul. 1960.

HANES, P. J.; SCHUSTER, G. S.; LUBAS, S. Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 62, n. 2, p. 147-152, Feb. 1991.

HILL, P.; HALEY, N. J.; WYNDER E. L. Cigarette smoking: carboxyhemoglobin, plasma nicotine, cotinine and thiocyanate vs self-reported smoking data and cardiovascular disease. **J. Chronic Dis.**, St. Louis, v. 36, n. 6, p. 439-449, 1983.

HISLOP, W. S., FINLAY, P. M., MOOS, K. F. A preliminary study into the uses of anorganic bone in oral and maxillofacial surgery. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 31, n. 3, p. 149-153, June 1993.

HJORTING-HANSEN, E.; ADAWY, A. M.; HILLERUP, S. The pattern of postoperative bone resorption following mandibular vestibulolingual sulcoplasty with free skin graft. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Stuttgart, v. 41, n. 6, p. 358-364, June. 1983.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 82, n. 6, p. 594-606, Dec. 1996.

HOLLINGER, J. O. et al. Impact of nicotine on bone healing. **J. Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 45, n. 4, p. 294-301, June 1999a.

HOLLINGER, J. O.; BUCK, D. C.; BRUDER, S. P. Biology of bone healing; its impact on therapy. In: LYNCH, S. E.; GENCO, R. J.; MARXS, R. E. **Tissue engeneering: application in maxillofacial surgery and periodontics**. Chicago: Quintessence Books, 1999b, p. 17-53.

ISAAC, P. F.; RAND, M. J. Blood levels of nicotine and physiological effects after inhalation of tobacco smoke. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 269-283, Dec. 1969.

IWANIEC, U. T. et al. Effects of nicotine on bone and calciotropic hormones in growing female rats. **Calcif. Tissue Int.**, Berlin, v. 67, n. 1, p. 68-74, Jul. 2000.

IWANIEC, U. T. et al. Effects of nicotine on bone mass, turnover, and strength in adult female rats. **Calcif. Tissue Int.**, Berlin, v. 68, n. 6, p. 358-364, June 2001.

JAMES, J. A. et al. Effects of tobacco products on the attachment and growth of periodontal ligament fibroblasts. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 70, n. 5, p. 518-525, May 1999.

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. 74 f. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

JENSEN, J. A. et al. Cigarette smoking decreases tissue oxygen. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 126, n. 9, p. 1131-1134, Sept. 1991.

JENSEN, O. T. et al. Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 10, n. 3, p. 335-344, May/June 1995.

JONES, J. K.; TRIPLETT, R. G. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. **J.**

Oral Maxillofac. Surg., Philadelphia, v. 50, n. 3, p. 237-240, Mar. 1992. Discussion p. 239-240.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In:_____ **Histologia básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995, p. 108-126.

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

KARRING, T.; LINDHE, J.; CORTELLINE, P. Tratamento Periodontal Regenerativo. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 428-462, 3. ed., 1999.

KUSIAK, J. F.; ZINS, J. E.; WHITAKER, L. A., The early revascularization of membranous bone. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 76, n. 4, p. 510-516, Oct. 1985.

KWIATKOWSKI, T. C.; HANLEY JÚNIOR, E. N.; RAMP, W. K. Cigarette smoking and its orthopedic consequences. **Am. J. Orthop.**, Houston, v. 25, n. 9, p. 590-597, Sept. 1996.

LAWRENCE, W. T. et al. The detrimental effect of cigarette smoking on flap survival: an experimental study in the rat. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 37, n. 2, p. 216-219, Apr. 1984.

LIEBERMAN, J. R.; DALUISKI, A.; EINHORN, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. **J. Bone Joint Surg. Am.**, Boston, v. 84-A, n. 6, p. 1032-1044, June 2002.

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

MCDERMOTT, M. T.; WITTE, M. C. Bone mineral content in smokers. **South Med. J.**, Birmingham, v. 81, n. 4, p. 477-480, Apr. 1988.

MCGUIRE, J. R. et al. Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 60, n. 4, p. 176-181, Apr. 1989.

MERKX, M. A. et al. Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, Guilford, v. 20, n. 7, p. 639-645, Apr. 1999a.

MERKX, M. A. et al. Incorporation of particulated bone implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, Guilford, v. 20, n. 21, p. 2029-2035, Nov. 1999b.

MISCH, C. E.; DIETSH F. Bone-grafting materials in implant dentistry. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 2, n. 3, p. 158-167, 1993.

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, 1992.

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, 1995.

MOROZUMI, T. et al. Smoking cessation increases gingival blood flow and gingival crevicular fluid. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 267-272, Apr. 2004.

MOSELY, L. H.; FINSETH, F. Cigarette smoking: impairment of digital blood flow and wound healing in the hand. **Hand**, Essex, v. 9, n. 2, p. 97-101, June 1977.

MOSELY, L. H.; FINSETH, F.; GOODY, M. Nicotine and its effect on wound healing. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 61, n. 4, p. 570-575, Apr. 1978.

MURRIN, L. C. et al. Nicotine administration to rats: methodological considerations. **Life. Sci.**, Oxford, v. 40, n. 17, p. 1699-1708, Apr. 1987.

NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 9, p. 982-987, 2002a.

NOCITI JÚNIOR, F. H. et al. Nicotine and bone density around titanium implants: a histometric study in rabbits. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 11, n. 2, p. 176-182, 2002b.

NOLAN, J. et al. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 544-549, Apr. 1985.

NYSTROM, E. et al. 10-year follow-up of onlay bone grafts and implants in severely resorbed maxillae. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 33, n. 3, p. 258-262, Apr. 2004.

ORSINI, G. et al. Histologic evaluation of autogenous calvarial bone in maxillary onlay bone grafts: a report of 2 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 18, n. 4, p. 594-598, July/Aug. 2003.

PAYNE, J. B. et al. Nicotine effects on PGE2 and IL-1 beta release by LPS-treated human monocytes. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 31, n. 2, p. 99-104, Feb. 1996.

PEACOCK, E.; VAN WINKLE, W. Wound repair. 2. ed. Philadelphia: Saunders, 1976.

PEACOCK, M. E. et al. The effect of nicotine on reproduction and attachment of human gingival fibroblasts in vitro, **J. Periodontol.**, Chicago, v. 64, n. 7, p. 658-665, Jul. 1993.

PEREIRA M. L.; COSTA M. A.; FERNANDES M. H. Nicotine Impairs in Vitro Mineralization, **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, Munksgaard, v. 30, Suppl. 4, p. 26, 2003.

PIKOS, M. A., Block autografts for localized ridge augmentation: Part II. The posterior mandible. **Implant. Dent.**, Baltimore, v. 9, n. 1, p. 67-75, 2000.

PINTO, J. R. et al. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 1, p. 3-9, 2002.

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. 1996.

RAJPUROHIT, R., et al. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, v. 168, n. 2, p. 424-432, Aug. 1996.

RAMP, W.K.; LENZ, L. G.; GALVIN, R. J. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, Malden, v. 197, n. 1, p. 36-43, May 1991.

RAPURI, P. B. et al. Smoking and bone metabolism in elderly women. **Bone**, Elmsford, v. 27, n. 3, p. 429-436, Sep. 2000.

RAULIN, L. A. et al. The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 59, n. 5, p. 318-325, May 1988.

READ, R. C. Systemic effects of smoking. **Am. J. Surg.**, New York, v. 148, n. 6, p. 706-711, Dec. 1984.

REES, T. D. The acute effects of cigarette smoke exposure on experimental skin flaps: a discussion. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 75, n. 4, p. 550-551, Apr. 1985.

REUS, W. F. et al. Acute effects of tobacco smoking on blood flow in the cutaneous micro-circulation. **Br. J. Plast. Surg.**, Edinburgh, v. 37, n. 2, p. 213-215, Apr. 1984.

RICHARDSON, D. Effects of tobacco smoke inhalation on capillary blood flow in human skin. **Arch. Environ. Health**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 19-25, Jan./Feb. 1987.

RICHARDSON, D. Acute and long-term effects of cigarette smoke on blood flow distribution in human skin. **Proc. International Symposium on Smoking and Cardiovascular Function (in press)**. Apud RICHARDSON, D. Effects of tobacco smoke inhalation on capillary blood flow in human skin, **Arch. Environ. Health**, Chicago, v. 42, n. 1, p. 19-25, Jan-Feb. 1987.

RIEBEL, G. D. et al. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. **Spine**, Hagerstown, v. 20, n. 20, p. 2198-2202, Oct. 1995.

ROBERTS, W. E., et al. Implants: Bone physiology and metabolism. **CDA J.**, Los Angeles, v. 15, n. 10, p. 54-61, Oct., 1987.

ROHN, J. M.; RAMP W. K. Nicotine Inhibits Bone Growth in Ovo. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 66, mesp., p. 220, 1987. Abstract n. 909.

SALDANHA, J. B. et al. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 75, n. 4, p. 565-571, Apr. 2004.

SCOTT, D. A.; PALMER, R. M.; STAPLETON, J. A. Validation of smoking status in clinical research into inflammatory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 28, n. 8, p. 715-722, Aug. 2001.

SHERWIN, M. A.; GASTWIRTH, C. M. Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. **J. Foot Surg.**, Birmingham, v. 29, n. 1, p. 84-87, Jan./Feb. 1990.

SILCOX, D. H. 3RD et al. The effect of nicotine on spinal fusion. **Spine**, Philadelphia, v. 20, n. 14, p. 1549-1553, July 1995.

SILCOX, D. H. 3RD et al. Reversing the inhibitory effect of nicotine on spinal fusion using an osteoinductive protein extract. **Spine**, Philadelphia, v. 23, n. 3, p. 291-297, Feb. 1998.

SIPE, R. V. 3RD; BUCK, D. C.; HOLLINGER, J. O. Nicotine administration in rabbits using Habitrol nicotine patches and nicotine nasal spray. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 480-482, July 2000.

SILVERSTEIN, P. Smoking and wound healing. **Am. J. Med.**, New York, v. 93, n. 1A, p. 22S-24S, July 1992.

SMITH; J. D.; ABRAMSON, M. Membranous vs endochondrial bone autografts. **Arch. Otolaryngol.**, Chicago, v. 99, n. 3, p. 203-205, Mar. 1974.

SPARROW, D. et al. The influence of cigarette smoking and age on bone loss in men. **Arch. Environ. Health**, Chicago, v. 37, n. 4, p. 246-249, July/Aug., 1982.

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

STEFANI, C. M. et al. Influence of nicotine administration on different implant surfaces: a histometric study in rabbits. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n. 2, p. 206-212, Feb. 2002.

STROUD, S. W. et al. Healing of interpositional autologous bone grafts after total maxillary osteotomy. **J. Oral Surg.**, Chicago, v. 38, n. 12, p. 878-885, Dec. 1980.

SYVERSEN, U. et al. Effect of lifelong nicotine inhalation on bone mass and mechanical properties in female rat femurs. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 65, n. 3, p. 246-249, Sep. 1999.

TALLGREN, A. The continuing reduction of the residual alveolar ridge in complete denture wearers: a mixed-longitudinal study covering 25 years. **J. Prosthet. Dent.**, St. Louis, v. 27, n. 2, p. 120-132, Feb. 1972.

TANUR, E. et al. Effects of nicotine on the strength of attachment of gingival fibroblasts to glass and non-diseased human root surfaces. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, n. 5, p. 717-722, May 2000.

TAYLOR, P. Agents acting at the neuromuscular junction and autonomic ganglia. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman's – the pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill (Ed), 2001. Chapter 9.

THALLER, S. Immediate bone grafting in craniofacial trauma. In: MANSON, P. editor. **Cranio-maxillofacial trauma**, Philadelphia: W.B. Saunders, p. 408-419, 1991.

TIPTON, D. A.; DABBOUS, M. K. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 66, n. 12, p. 1056-1064, Dec. 1995.

TONETTI, M. S. Cigarette smoking and periodontal diseases: etiology and management of disease. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v. 3, n. 1, p. 88-101, July 1998.

UENG, S. W. et al. Hyperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing of tibial lengthening: an experimental study on rabbits. **J. Trauma**, Baltimore, v. 47, n. 4, p. 752-759, Oct. 1999.

UENG, S. W. et al. Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. **J. Trauma**, Baltimore, v. 42, n. 2, p. 231-238, Feb. 1997

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

URIST, M. R. Osteoinduction in undemineralized bone implants modified by chemical inhibitors of endogenous matrix enzymes. A preliminary report. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, v. 87, p. 132-137, Sept. 1972.

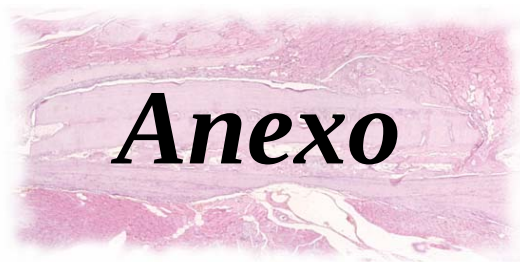
URIST, M. R. Bone transplants and implants. In: URIST M., (Ed.) **Fundamental and clinical bone physiology**. Philadelphia: Lippincott, 1980.

VERNEJOUL, M. C. et al. Evidence for defective osteoblastic function. A role for alcohol and tobacco consumption in osteoporosis in middle-aged men. **Clin. Orthop.**, Philadelphia, n. 179, p. 107-115, Oct. 1983.

WILLIAMSON, 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, July/Aug. 1996.

YUHARA, S. et al. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 383, n. 3, p. 387-393, Nov. 1999.

ZINS, J. E.; WHITAKER, L. A. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore v. 72, n. 6, p. 778-785, Dec. 1983.



Anexo

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

(CEEA)

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Projeto “**A influência da nicotina no processo de reparo de enxerto ósseo autógeno. Estudo histológico e histométrico em ratas**” sob responsabilidade do **Prof. Dr. ALVARO FRANCISCO BOSCO, SAMARA BONFANTE, DANIELLE SHIMA LUIZE 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 33/03.

Araçatuba, 12 de maio de 2003.



Profª. Ass. Dra. Adelina Maria da Silva

Presidente