



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

DANIELLA VICENSOTTO BERNARDO

**INFLUÊNCIA DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO NO
REPARO DE ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS *ONLAY*
EM RATAS OVARECTOMIZADAS: estudo histomorfométrico**

2016

DANIELLA VICENSOTTO BERNARDO

**INFLUÊNCIA DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO NO REPARO
DE ENXERTOS ÓSSEOS AUTÓGENOS *ONLAY* EM RATAS
OVARECTOMIZADAS: estudo histomorfométrico**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós- Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Microbiologia / Imunologia.

Orientadora: Prof^a Adjunta Maria Aparecida Neves Jardimi

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

Bernardo, Daniella Vicensotto

Influência da inalação da fumaça de cigarro no reparo de enxertos
ósseos autógenos onlay em ratas ovariectomizadas: estudo
histomorfométrico / Daniella Vicensotto Bernardo. - São José dos
Campos : [s.n.], 2016.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.

Orientadora: Maria Aparecida Neves Jardim.

1. Regeneração óssea. 2. Transplante ósseo. 3. Osteoporose. 4.
Tabaco. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. Instituto de
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 12 de janeiro de 2016
E-mail: daniella.bernardo@ict.unesp.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Milton Santamaria Jr.

Fundação Hermínio Ometto
Uniararas

Profa. Dra. Luana M. R. de Vasconcelos

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 12 de janeiro de 2016.

Dedicatória

Á Deus por sempre me abençoar.

À minha mãe Jeannette, por todo seu amor, carinho, por ter me educado e ajudado muito durante a graduação e pós-graduação.

Ao meu pai Nelson (in memorian), por me ensinar a importância de ser uma pessoa honesta e trabalhadora.

Ao meu irmão Danilo, pelo seu amor incondicional , por sempre ter acreditado em mim, por todos os seus ensinamentos e por ser o exemplo ao qual sigo.

À minha avó Maria (in memorian), por ter sido a melhor avó do mundo e por todo seu amor.

À minha tia Zilda, por todo seu amor, carinho e ajuda.

À minha cunhada Tatiana, que considero como irmã e serei eternamente grata pela sua ajuda.

Agradecimento

À professora Ucha, minha orientadora, por dar-me a oportunidade de realizar este trabalho, pela convivência que tive nesse período e pela amizade.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” por fornecer a toda minha formação acadêmica com ótima qualidade e, por mais uma vez, me receber de braços abertos para realização do mestrado.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Ao Professor Dr. Mauro Pedrine Santamaria por todo seu apoio e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

À Prof. Dra. Andréa Carvalho de Marco por sempre estar à disposição de ajudar e pelo companheirismo por estes dois anos.

Às minhas amigas Camila Lopes e Camilla Magnoni pela amizade, apoio, carinho, sem a ajuda e companheirismo delas, tudo seria mais difícil.

Aos meus amigos da periodontia Marcus, Naira , Nídia, Stefani, Felipe, Camilinha, Thiago, Marcelo, Vinícius e Cassia pela amizade por estes 2 anos.

Ao meu amigo Walter, pois, além de ser um grande profissional, me ajudou muito na realização deste trabalho

À todos que me acompanharam e torceram por mim durante esta jornada.

"Determinação coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho."

(Dalai Lama)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Estrogênio e a osteoporose.....	17
2.2 Tabagismo.....	18
2.3 Remodelação óssea.....	20
2.4 Enxerto ósseo autógeno <i>onlay</i>	21
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Delineamento experimental	24
4.2 Primeiro procedimento cirúrgico – ovariectomia e ovariectomia simulada bilateral.....	26
4.3 Exposição à fumaça de cigarro	27
4.4 Segundo procedimento cirúrgico – enxerto autógeno <i>onlay</i>	29
4.5 Sacrifício	32
4.6 Processamento histológico	33
4.7 Análise histomorfométrica.....	33
4.7.1 Padronização da medição.....	35

4.7.2 Análise histomorfométrica da integração do enxerto ao leito receptor.....	35
4.7.3 Análise histomorfométrica da altura do enxerto.....	36
4.7.4 Análise histomorfométrica da largura do enxerto.....	37
4.8 Análise estatística.....	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Integração do enxerto.....	39
5.2 Altura do enxerto.....	40
5.3 Largura do enxerto.....	41
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS.....	50
9 ANEXO	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma representando a distribuição dos animais.....	25
Figura 2-	Ovarectomia.....	27
Figura 3-	Representação da sequência operacional dos grupos expostos à fumaça de cigarro.....	28
Figura 4-	Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça de cigarro.....	29
Figura 5-	Área doadora do enxerto.....	30
Figura 6-	Área receptora e enxerto.....	32
Figura 7-	Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C+ nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	34
Figura 8-	Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Fum nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	34
Figura 9-	Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Ovx nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	34
Figura 10-	Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Fum+Ovx nos períodos 21, 45 e 60 dias...	34

Figura 11-	Medição da integração na interface leito- enxerto.....	36
Figura 12-	Medição da altura do enxerto.....	37
Figura 13-	Medição da largura do enxerto.....	38
Figura 14-	Gráfico dos valores médios e desvio padrão na integração do enxerto ao leito receptor.....	40
Figura 15-	Gráfico dos valores médios e desvio padrão da altura do enxerto.....	41
Figura 16-	Gráfico dos valores médios e desvio padrão da largura do enxerto.....	42

Bernardo D.V. Influência da inalação da fumaça de cigarro no reparo de enxertos ósseos autógenos *onlay* em ratas ovariectomizadas: estudo histomorfométrico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

O consumo do cigarro pode afetar negativamente o reparo ósseo. A deficiência estrogênica leva à remodelação óssea desproporcional, aumentando a reabsorção mais do que a formação óssea. O objetivo do estudo foi avaliar a influência da fumaça de cigarro, da ovariectomia e das duas situações associadas no reparo de enxertos ósseos autógenos *onlay* nas mandíbulas de ratas. Foram utilizadas 120 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) divididas aleatoriamente em dois grupos contendo 60 animais cada, compreendidos em Sham e Ovariectomizadas (Ovx). Os grupos Sham e Ovx foram divididos em 2 subgrupos contendo 30 animais cada, constituídos pela ausência ou presença da inalação de fumaça de cigarro, descritos como: Controle positivo (C+) - ratas que não receberam inalação da fumaça de cigarro e não foram ovariectomizadas; (Fum) - ratas que receberam inalação da fumaça de cigarro e não foram ovariectomizadas; (Ovx) - ratas que não receberam inalação da fumaça de cigarro e foram ovariectomizadas; (Fum+Ovx) - ratas que receberam inalação da fumaça de cigarro e foram ovariectomizadas. Em cada subgrupo, os animais foram sacrificados por perfusão cardíaca em três períodos distintos (n=10), entre 21, 45 e 60 dias após a realização da cirurgia de enxerto na hemi mandíbula direita. A análise histomorfométrica foi realizada e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Shapiro-Wilk, ambos com nível de significância convencional de 5%. Os resultados mostraram que houve um aumento na integração do enxerto ao leito receptor nos períodos 21 e 45 dias em todos os subgrupos. Concluiu-se, dentro dos limites do presente estudo que a exposição à fumaça de cigarro não interferiu na reparação dos enxertos ósseos autógenos *onlay* em ratas ovariectomizadas.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Transplante ósseo. Osteoporose. Tabaco.

Bernardo D.V. Influence of inhalation of cigarette smoke in the repair of autogenous onlay bone grafts in ovariectomized rats: histomorphometric study [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Cigarette consumption can adversely affect bone repair. The estrogen deficiency leads to bone remodeling disproportionately increasing the resorption rather than bone formation. The aim of the study was to evaluate the influence of cigarette smoke, the ovariectomy and the two situations associated with the repair of bone autogenous onlay grafts in rats jaws. 120 adult rats were used (*Rattus norvegicus*, Albinus variation, Wistar) *alheatoriamente* divided in two groups of 60 animals each, understood in Sham and ovariectomized (OVX). The Sham and Ovx groups were divided into two subgroups containing 30 animals each, constituted by the absence or presence of inhalation of cigarette smoke, described as positive control (C +) - rats not receiving inhalation of cigarette smoke and were not ovariectomized; (Fum) - rats given inhalation of cigarette smoke and were not ovariectomized; (Ovx) - rats not receiving inhalation of cigarette smoke and were ovariectomized; (Fum + Ovx) - rats given inhalation of cigarette smoke and were ovariectomized. In each subgroup, the animals were sacrificed by cardiac infusion at three different periods (n = 10) among 21, 45 and 60 days after the graft surgery on right hemi jaw. Histomorphometric analysis was performed and the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Shapiro-Wilk test, both with conventional significance level of 5%. The results showed an increase in the integration of the graft recipient bed during the periods 21 and 45 days in all subgroups. It was concluded within the limits of this study that exposure to cigarette smoke did not affect the repair of bone autogenous onlay grafts in ovariectomized rats

Keywords: Bone regeneration. Bone transplantation. Osteoporosis. Tobacco.

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida associado ao envelhecimento da população, observa-se uma maior demanda por procedimentos estéticos e funcionais reabilitadores, tais como os enxertos ósseos. Por mais de uma década o índice de sucesso desta abordagem terapêutica é observado e aplicado em várias situações na Odontologia. Apesar disso, fatores locais e sistêmicos do paciente podem interferir no processo de osseointegração, comprometendo o sucesso do procedimento (Soares et al., 2010). Dentre as condições sistêmicas mais importantes que vem sendo amplamente discutidas, destaca-se o fumo (Cesar Neto et al., 2003).

O tabagismo é um problema de saúde pública mundial que acarreta, a cada ano, em muitas mortes devido ao seu uso. Segundo dados da World Health Organization (WHO), 2010, é estimado que 10 milhões de mortes ocorrerão até 2020 decorrentes de doenças associadas ao tabaco, sendo que, 70 % destes casos serão observados em países desenvolvidos.

Na Odontologia, o tabagismo também tem sido relacionado à dificuldade na reparação de enxertos ósseos (Jones, Triplett, 1992; Kan et al., 1999), inadequado preenchimento sanguíneo dos alvéolos dentários pós-extração (Meechan et al., 1988), menor taxa de sucesso de implantes de titânio (Bain, Moy, 1993; De Bruyn, Collaert, 1994 ; Nociti et al., 2002b), maior perda óssea ao redor de implantes já osseointegrados (Haas et al., 1996; Lindquist et al., 1997), redução na produção de colágeno e comprometimento da função dos leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (Strietzel et al., 2007). Esse conjunto de falhas compõe a limitação da implantologia atual frente à necessidade da

realização de enxertos ósseos, para viabilizar a reabilitação protética de pacientes fumantes (Correa et al., 2009).

A osteoporose é definida como uma doença crônica, multifatorial, determinada por interações entre fatores ambientais e genéticos, provenientes de uma desordem na remodelação óssea que promove fragilidade nos ossos pela redução de sua massa. Tal desordem acarreta no comprometimento da resistência e alteração da microarquitetura do osso que, em conjunto, vão contribuir para uma maior propensão de fraturas ao mínimo trauma (Giampietro et al., 2010 ; Gao et al., 2011).

Para que haja saúde óssea é necessário que exista um equilíbrio no processo de remodelação do osso (McCormick et al., 2007). O estrogênio, principal hormônio regulador desse processo, exerce influência tanto sobre as células osteoblásticas, como as osteoclásticas, além disso, outros hormônios e fatores ambientais são capazes de influenciar esse complexo processo (Young, 2003).

Múltiplos fatores demográficos e ambientais foram avaliados para a contribuição e o desenvolvimento da osteoporose e/ou baixa densidade mineral óssea com resultados contraditórios. Estes incluem tabagismo, excesso de álcool, baixa ingestão de cálcio, insuficiência de vitamina D, baixo índice de massa corporal (IMC), hiperparatireoidismo, raça caucasiana, sexo feminino, e história prévia de fratura (Giampietro et al., 2010). A WHO (2010) classificou o fumo como um fator de risco para fraturas ósseas.

Estudos recentes têm avaliado o efeito do processo da menopausa, que ocorre naturalmente no organismo de mulheres e que, como consequência, pode gerar osteoporose, em associação ao fumo (Kim et al., 2013 ; Tawfik et al., 2015). Ajiro et al. (2010), que avaliaram o impacto do fumo passivo em relação à osteoporose, sugere que essa associação promove um efeito deletério no tecido ósseo uma vez que a redução do fluxo sanguíneo para osso pode gerar um impacto negativo

sobre seu metabolismo. Hapidin et al. (2007), revelaram que a exposição do organismo à nicotina afeta o metabolismo ósseo pela modulação da proliferação de osteoblastos e formação de citocinas de reabsorção óssea IL1 e IL6 em elevados níveis.

Em relação à osteoporose, Kanis et al. (2005) e Lee et al. (2006), revelaram que mulheres fumantes entram no processo de menopausa antes daquelas que não têm esse hábito e estão sujeitas à infertilidade, mostrando que pode ser um indício de que o fumo aumenta o catabolismo do estrogênio. Além disso, os autores ressaltam que há um menor índice de massa corporal nestas mulheres e que os efeitos protetores promovidos pelo tecido adiposo e pelo metabolismo do estrógeno periférico são prejudicados.

Law e Hackshaw, (1997), relatam que o efeito do fumo na densidade mineral óssea (DMO) aumenta cumulativamente com a idade, tanto que existe um efeito tóxico direto sobre o osso quando o organismo fica exposto à nicotina.

Os resultados clínicos favoráveis obtidos com o uso dos implantes osseointegrados e os resultados documentados sobre a integração tecidual tornaram seu uso confiável no tratamento dos pacientes. Entretanto, um dos principais requisitos para o sítio que receberá o implante é o adequado volume de osso alveolar (Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008).

A técnica do enxerto ósseo autógeno requer remoção de tecido ósseo do próprio paciente e tem sido considerada como “*gold standard*” das técnicas de ganho de tecido ósseo por ser imunologicamente compatível e osteogênico (Jardini et al., 2005; Khan et al., 2005).

A regeneração e a incorporação do enxerto ósseo envolvem a interação entre o enxerto e o leito receptor por meio de um complexo processo de proliferação celular, migração, diferenciação e revascularização (Adeyemo et al., 2008). Levando-se em consideração o

aumento da demanda pelas reabilitações com implantes osseointegrados e procedimentos reconstrutivos, o presente estudo tem como objetivo avaliar por meio da histomorfometria a influência da inalação da fumaça de cigarro no reparo de enxertos autógenos em bloco na mandíbula de ratas com deficiência estrogênica e normais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrogênio e a osteoporose

O estrogênio é o principal hormônio regulador da remodelação óssea, importante tanto para a mulher como para o homem. Ele limita a perda óssea através de seus efeitos sobre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (Kalaitzidis, Gilmore, 2005).

A deficiência estrogênica leva à remodelação óssea desproporcional, aumentando a reabsorção mais do que a formação óssea (Turner et al., 1994; Weitzmann, Pacifici, 2006). Além de predisposição para doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e do esqueleto, a deficiência estrogênica aumenta a disfunção metabólica de predisposição para a obesidade e diabetes do tipo 2 (Xu et al., 2015). O aumento da variabilidade da DMO induzida pela deficiência estrogênica pode comprometer a estabilidade mecânica do osso alveolar de suporte dos dentes (Ames et al., 2010).

Para simular a deficiência estrogênica gerada no período de pós-menopausa em humanos, muitos estudos têm utilizado a ovariectomia em modelo animal (Carvalho et al., 2006; Luize et al., 2008; Nascimento et al., 2009; Tera et al., 2014ab).

A osteoporose é definida como uma doença crônica, multifatorial, determinada por interações entre fatores ambientais e genéticos, provenientes de uma desordem esquelética que promove uma fragilidade óssea pela redução de sua massa (Gao et al., 2011). Tal desordem acarreta no comprometimento da resistência óssea e alteração da microarquitetura do osso que, em conjunto, vão contribuir para uma

maior propensão de fraturas ósseas ao mínimo trauma (Giampietro et al., 2010 ; Gao et al., 2011).

A osteoporose, ocasionada pela redução dos níveis de estrógeno, afeta a mandíbula e a maxila assim como atinge os ossos longos (Munakata et al., 2011).

A prevenção da osteoporose deve começar muito antes da menopausa. Nutrição deficiente nos períodos de pico de massa óssea pode resultar no aumento do risco de fraturas em idade avançada (Miquel et al., 2006).

2.2 Tabagismo

Não há dúvida de que fumar é prejudicial e afeta todos os sistemas do corpo. Até agora, está firmemente estabelecido que o tabagismo é um importante fator de risco para doenças crônicas graves, incluindo doenças cardiovasculares, doença pulmonar e câncer (Fleischer et al., 2012).

O tabagismo foi associado com uma diminuição de massa óssea e, no entanto, considera-se um fator de risco para o surgimento da osteoporose (Ortego-Centeno et al., 1997; Cornuz et al., 1999; Kanis et al., 2005; Coleman et al., 2010).

Segundo Yuhara et al. (1999), o tabaco está associado a perda óssea alveolar pelo fato de seu principal componente, a nicotina, atuar sobre a regulação da atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio. Por isso, muitos autores investigam a influência do cigarro sobre a falha e perda prematura de implantes osseointegrados (Esposito et al., 1998), além de outras complicações que, cientificamente, estão relacionadas ao seu uso. Dentre essas complicações estão a diminuição da DMO (Hollenbach et al., 1993; Ortego-Centeno et al., 1997; Ward,

Klesges, 2001), aumento na incidência de osteoporose, osteopenia (Hollenbach et al., 1993; Ward, Klesges, 2001; Gullihorn et al., 2005), maior risco à fraturas (Kanis et al., 2005; Rothem et al., 2009) e prejuízo no processo de reparo ósseo (Javed et al., 2012).

O cigarro é composto de uma grande variedade de substâncias tóxicas (Nociti et al., 2002ab ; Rothem et al., 2009), das quais o dióxido de carbono, oxigênio, carbono e respondem por 85 %. Nicotina, que é um dos componentes de dependência de tabaco, é um alcalóide altamente tóxico e tem sido o foco de diversos estudos avaliando a relação entre os componentes dos cigarros e o metabolismo ósseo (Giorgetti et al., 2010).

Um estudo realizado por Cesar-Neto et al. (2003), mostrou que quando o uso da nicotina por si só foi comparado à exposição à fumaça do cigarro, observou-se que o último foi mais prejudicial para o metabolismo do osso sugerindo que os constituintes da fumaça de cigarro (por exemplo, metais pesados tóxicos, bifenilos policlorados, dioxinas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), diferentes da nicotina, podem ser responsáveis pelo impacto negativo de fumar sobre o osso.

Os efeitos fisiopatológicos são multidimensionais e incluem a vasoconstrição arteriolar, hipóxia celular, desmineralização do osso e o atraso na revascularização (Cesar- Neto et al., 2003; Gullihorn et al., 2005; Strietzel et al., 2007; Rothem et al., 2009). Dentre outros importantes efeitos negativos do tabagismo estão às elevadas taxas de insucesso em procedimentos clínicos, necrose dos tecidos e formação de hematoma (Rothem et al., 2009). Além disso, as complicações pós-operatórias, com infecção da ferida, necrose parcial e perda do enxerto (Saldanha et al., 2004; Bosco et al., 2007; Javed et al., 2012).

2.3 Remodelação óssea

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado que apresenta quatro tipos de células; os osteoblastos, células de revestimento do osso, osteócitos e osteoclastos (Buckwalter et al., 1996; Downey, Siegel 2006).

Os osteoblastos são células cubóides que estão localizadas ao longo da superfície do osso que compreende 4-6 % das células ósseas residentes totais e são em grande parte conhecidas pela função de formação óssea (Capulli et al., 2014). Células de revestimento do osso são osteoblastos planos em forma quiescentes que cobrem a superfície óssea, onde não ocorre reabsorção e nem formação óssea (Miller et al., 1989). Os osteócitos compreendem 90-95 % das células ósseas totais (Franz-Odenaal et al., 2006) e tem-se reconhecido que os osteócitos desempenham várias funções importantes no osso, como organizar a remodelação óssea através da regulação de ambas as atividades osteoclásticas e osteoblásticas e também funcionar como uma célula endócrina (Bonewald, 2011). Os osteoclastos são células multinucleadas diferenciadas que se originam a partir de células mononucleares da linhagem de células-tronco hematopoéticas, sob a influência de vários fatores (Florencio-Silva et al., 2015). Entre estes, o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), secretados por células mesenquimais osteoprogenitoras e osteoblastos (Boyce et al., 1999), e ligante RANK, secretados pelos osteoblastos, osteócitos, e células estromais (Crockett et al., 2011). Em conjunto, estes fatores promovem a ativação de fatores de transcrição (Boyce et al., 1999; Yavropoulou, Yovos, 2008) e a expressão gênica em osteoclastos (Lee et al., 2006; Takayanagi 2007).

Apesar de sua aparência inerte, o osso é um órgão altamente dinâmico, que é continuamente reabsorvido pelos osteoclastos

e neoformadas por osteoblastos (Florencio-Silva et al., 2015). Há evidências de que os osteócitos atuam como mecanosensor e organizador do processo de remodelação óssea (Teitelbaum, 2007; Clarke, 2008; Karsenty et al., 2009; Bonewald, 2011).

A saúde óssea é mantida pelo balanço do processo de remodelação (Young, 2003; Cao et al., 2005; Lerner, 2006; McCormick, 2007), que garante a reposição contínua de osso velho, fragilizado por microfraturas, por osso novo (Lerner, 2006; McCormick, 2007).

Falhas no processo de remodelação podem levar à perda de tecido ósseo, e é observada em condições patológicas como osteoporose, periodontite, osteíte periapical, osteomielite, perda de próteses ortopédicas, metástase de câncer (Young, 2003; Lerner, 2006).

2.4 Enxerto ósseo autógeno *onlay*

Após exodontias, a reabsorção alveolar óssea altera a altura e espessura do rebordo remanescente (Mecall, Rosenfeld, 1991). Muitos procedimentos foram sugeridos para a reconstrução anatômica das cristas alveolares severamente reabsorvidas e o enxerto ósseo autógeno *onlay* tem sido documentada com boa previsibilidade (Block, Baughman, 2005; Sbordone et al., 2009). Tratando-se de reabilitações ósseas alveolares, o cirurgião dentista tem várias opções a escolher, como os biomateriais e várias técnicas que podem conduzir a neoformação óssea (Bastos et al., 2014). No entanto, o enxerto ósseo autógeno continua sendo a técnica “padrão ouro” para o procedimento de reconstrução óssea, incluindo aumento ósseo antes da colocação do implante, com base na sua osteocondução, osteoindução, e sua capacidade de osteogênese (Jardini et al., 2005; Barone, Covani, 2007; Bastos et al., 2014; Milinkovic, Cordaro, 2014).

Há poucos estudos sobre os efeitos do tabagismo, deficiência estrogênica e destes eventos concomitantemente, no processo de integração de enxertos ósseos autógenos *onlay*. No entanto, este estudo teve com objetivo avaliar a influência de fumaça de cigarro e deficiência estrogênica no processo de integração de enxertos ósseos autógenos *onlay* nestas condições.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da fumaça de cigarro, da ovariectomia e das duas situações associadas no reparo de enxertos ósseos autógenos *onlay* nas mandíbulas de ratas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra constituiu de 120 ratas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com noventa dias de idade, pesando em torno de 300 gramas, mantidas em gaiolas à temperatura ambiente, alimentadas com ração da marca Guabi Nutrilabor® e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP, Curso de Odontologia e com a aprovação da Comissão de Ética em Experimentos com Animais do ICT – UNESP. Protocolo nº10/2012-PA/CEP.

4.1 Delineamento experimental

As 120 ratas foram divididas aleatoriamente em dois grupos contendo 60 animais cada, compreendidos em Sham e Ovariectomizadas (Ovx).

Os grupos Sham e Ovx foram divididos em 2 subgrupos contendo 30 animais cada, constituídos pela ausência ou presença da inalação de fumaça de cigarro, como descrito a seguir:

- a) controle positivo (C+): ratas que não receberam inalação de fumaça de cigarro e não foram ovariectomizadas;
- b) inalação da fumaça (Fum): ratas que receberam inalação da fumaça de cigarro e não foram ovariectomizadas;

- c) ovariectomizadas (Ovx): ratas que não receberam inalação de fumaça de cigarro e foram ovariectomizadas;
- d) inalação da fumaça e ovariectomizadas (Fum+Ovx): ratas que receberam inalação da fumaça de cigarro e foram ovariectomizadas.

Em cada subgrupo, os animais foram sacrificados em três períodos distintos (n=10), entre 21, 45 e 60 dias após a realização da cirurgia de enxerto, como ilustrado no fluxograma abaixo (Figura1).

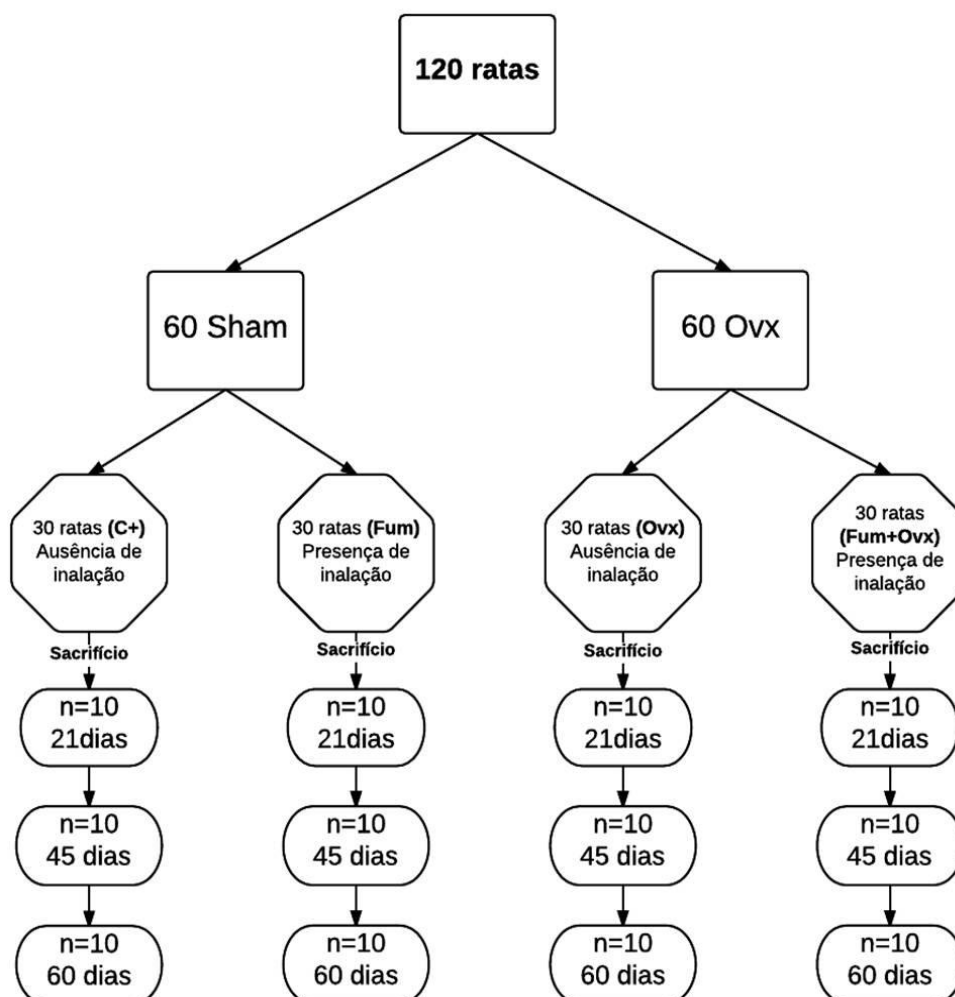


Figura 1 - Fluxograma representando a distribuição dos animais.

4.2 Primeiro procedimento cirúrgico - ovariectomia e ovariectomia simulada bilateral

Para a realização das cirurgias de ovariectomia e ovariectomia simulada bilateral, os animais foram anestesiados com uma solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum – Bayer® do Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil), anestésico geral, via intramuscular. Após a administração da anestesia foi mensurado e anotado o peso de cada rata.

Os animais foram posicionados em decúbito lateral para obter visualização e fácil acesso ao flanco lateral. Em seguida, foi realizada a tricotomia da região com lâminas de barbear (Gillete® Brasil) e, após a anti-sepsia da região logo abaixo da costela com solução de digluconato de clorexidina a 0,2 %, foi feita uma incisão longitudinal de 1 cm na pele com a lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo de bisturi BardParker. O tecido subcutâneo foi divulsionado e o muscular incisionado para acessar a cavidade abdominal. Com o auxílio de uma pinça, o ovário foi tracionado para fora da cavidade abdominal e, após a amarra da vasculatura local com fio de sutura, realizou-se a excisão. Em seguida, a região foi suturada tanto da camada muscular com fio de sutura 5,0 absorvível de poligalactina 910 (ETHICON – Johnson & Johnson®) quanto da pele com fio de seda 4.0 (ETHICON – Johnson & Johnson®). O procedimento descrito foi realizado primeiramente no decúbito lateral direito e depois no esquerdo (Figura 2).

Nos animais do grupo Sham, foram realizadas a ovariectomia simulada apenas tracionando-se os ovários para fora da

cavidade abdominal, devolvendo-os na mesma posição e a sutura foi realizada como descrito acima. Executou-se esse procedimento para que os animais do grupo controle tivessem as mesmas condições de estresse que os animais do grupo teste.

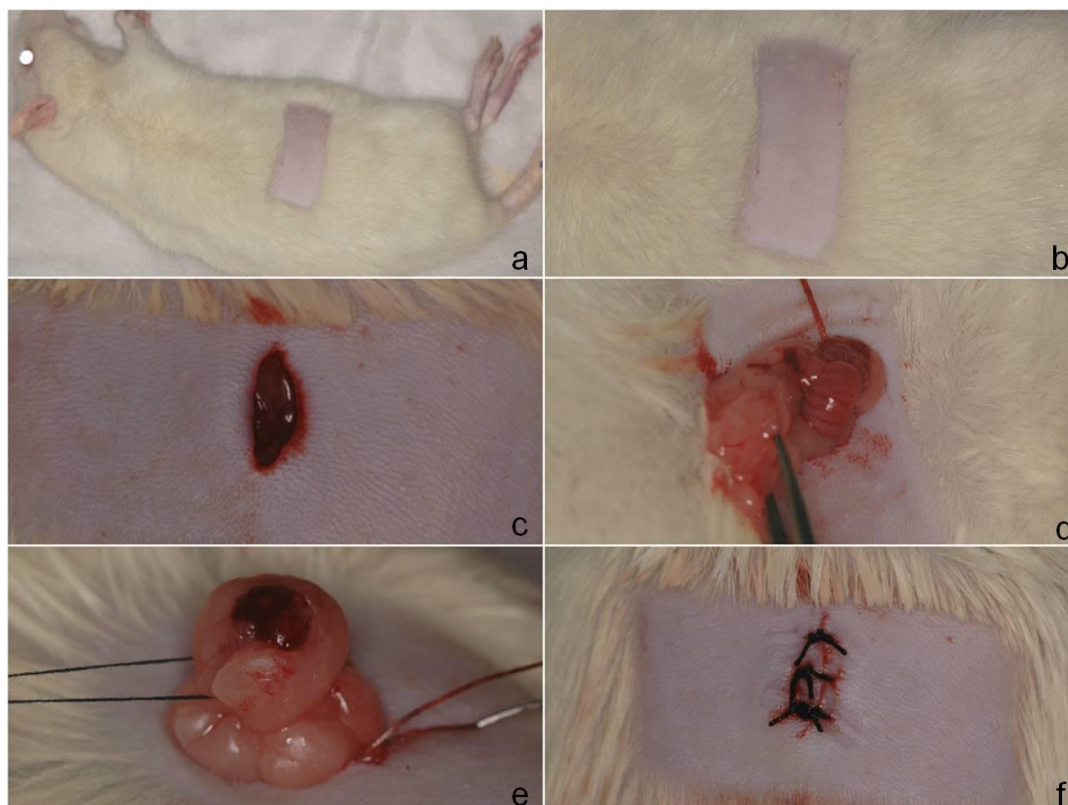


Figura 2 – Ovariectomia: a-b) posição em decúbito lateral, tricotomia e assepsia da região abdominal; c) incisão linear; d) tracionamento e exposição do ovário; e) amarração da vasculatura local para excisão do ovário; f) sutura.

4.3 Exposição à fumaça de cigarro

A exposição dos subgrupos submetidos à inalação da fumaça de cigarro (Fum e Fum+Ovx) foi iniciada 15 dias após a cirurgia de ovariectomia e ovariectomia simulada.

A figura 3 representa a sequência operacional dos grupos expostos à fumaça de cigarro:



Figura 3 – Representação da sequência operacional dos animais expostos à fumaça de cigarro.

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por (Le Mesurier et al. 1981) e modificada no laboratório de pneumologia da Escola Paulista de Medicina (Cendon et al., 1997). Esta metodologia foi adaptada por (Nociti et al. 2002a). Observou-se em estudos prévios que ela promovia níveis séricos de cotinina semelhantes aos observados em fumantes que consomem cerca de 20 cigarros por dia (César-Neto et al., 2003).

Este modelo utiliza um recipiente de acrílico (45x25x20 cm), onde 5 animais de cada vez foram expostos à fumaça de 10 cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono por três períodos diários de 8 minutos cada durante cinco dias da semana. O recipiente é composto por 2 câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos. Nesta parte há também uma entrada onde é bombeado ar, formando uma corrente que leva a fumaça para a segunda câmara, onde ficam os animais. Na segunda câmara há outro orifício que dá vazão ao ar bombeado (Figura 4).

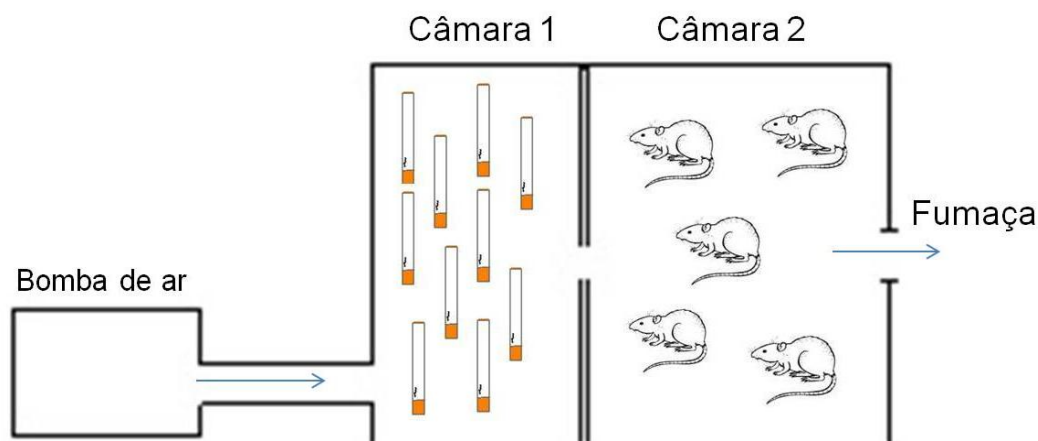


Figura 4 - Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça de cigarro. Uma bomba de ar foi acoplada à câmara 1. Na câmara 1 os dez cigarros foram acesos e posicionados e a bomba de ar conectada nela formava uma corrente levando a fumaça para câmara 2. Na câmara 2, cinco animais ficaram expostos à fumaça de cigarro, durante 8 minutos, 3 vezes ao dia, cinco dias da semana.

4.4 Segundo procedimento cirúrgico - enxerto autógeno *onlay*

Para a realização das cirurgias de enxertia, os animais foram anestesiados com uma solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum – Bayer® - Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® - Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

Após anestesia, as regiões dos ossos temporal, parotídeo-massetérica, parietal e frontal bilaterais foram tricotomizadas utilizando-se lâminas de barbear (Gillete® - Brasil) e a anti-sepsia foi realizada com solução de gluconato de clorexidina 0,2 %. O osso parietal foi a área doadora de osso autógeno.

Para a remoção do enxerto ósseo da área doadora e para a realização da enxertia na área receptora, foi utilizado o contra ângulo redutor 20:1 Kavo Konzept e o motor elétrico (Driller BLM 600 Plus) com

velocidade controlada em 600 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

Para obtenção do enxerto ósseo, uma incisão linear de aproximadamente 2,0 cm no centro da calvária do animal foi realizada, expondo o osso parietal. O bloco de enxerto foi retirado com o auxílio de uma broca tipo trefina com diâmetro externo de 4,1 mm (Neodent – Brasil) sob abundante irrigação com solução fisiológica. Após a remoção, este bloco foi perfurado no seu centro com uma broca helicoidal de diâmetro 1,2 mm (Neodent® – Brasil) em baixa rotação, refrigerada com soro fisiológico visando à futura fixação do mesmo no leito receptor. Em seguida, a incisão foi suturada com fio de seda 4.0 (ETHICON – Johnson & Johnson®) e os blocos ficaram armazenados temporariamente em uma cuba contendo soro fisiológico (Figura 5).

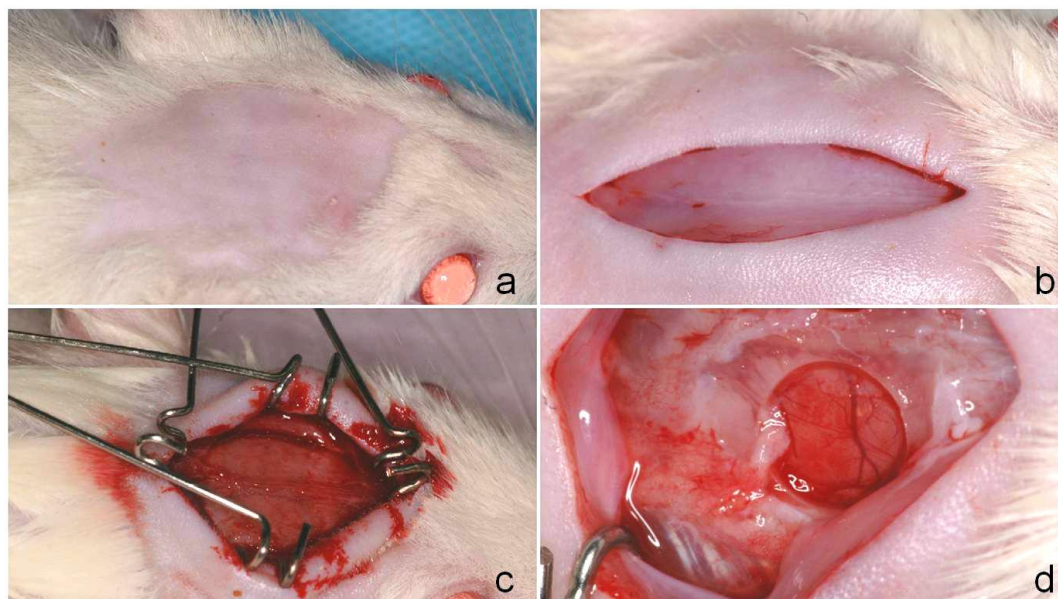


Figura 5 - Área doadora do enxerto: a) tricotomia , assepsia local; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) área doadora do enxerto.

Após a obtenção do enxerto, iniciou-se o preparo da área receptora, a mandíbula do lado direito. Realizou-se uma incisão linear na pele, de extensão aproximada de 1,5 cm, paralela ao arco zigomático.

Desta forma, podê-se visualizar o músculo masséter, que foi divulsionado, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até atingir-se a face lateral da mandíbula. No passo seguinte deslocou-se às estruturas anatômicas linguais até a exposição da face medial mandibular, com o auxílio de uma espátula, desenhada para esta finalidade, a fim de permitir a fixação do enxerto ósseo (Jardini et al., 2005).

Neste momento, foi realizada a perfuração com broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro e fresa helicoidal de 1,2 mm de diâmetro em baixa rotação, na área receptora sob abundante refrigeração com soro fisiológico. O mini-implante de titânio de 1,5 mm de diâmetro de cabeça, 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento (Conexão Sistemas de Prótese® - Brasil) foi parafusado na perfuração do enxerto e mandíbula para permitir o posicionamento do enxerto em íntimo contato com a superfície óssea mandibular, estabilizando-os.

As suturas foram realizadas por planos na área experimental, suturando-se primeiramente a camada muscular, com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (ETHICON – Johnson & Johnson®) e posteriormente a pele com fio de seda 4.0 (ETHICON – Johnson & Johnson®).

Para finalizar foi realizada a limpeza das regiões operadas com solução de clorexidina 0,2 % (Figura 6).

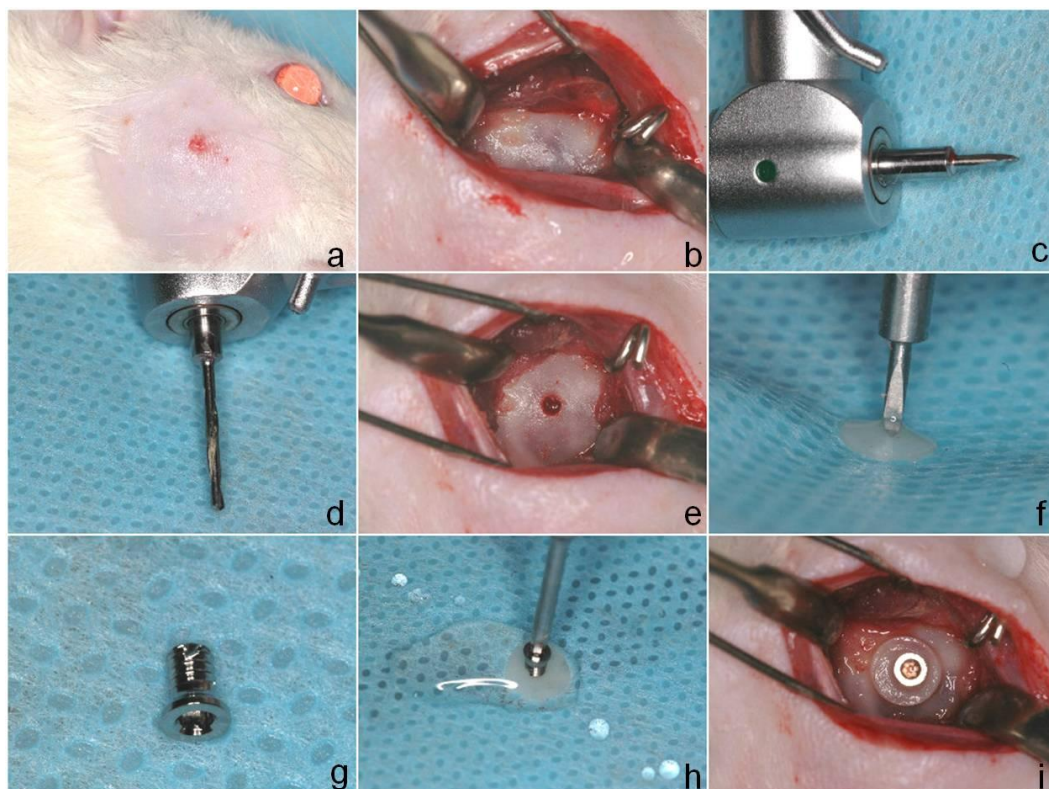


Figura 6 – Área receptora e enxerto: a) tricotomia e assepsia local; b) incisão e divulsão muscular; c) broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro; d) fresa helicoidal de 1,2 mm de diâmetro; e) região receptora preparada para receber o enxerto; f) perfuração do enxerto; g) mini-implante de titânio de 1,5 mm de diâmetro de cabeça, 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento; h) encaixe do mini-implante ao enxerto; i) enxerto parafusado na área receptora.

Após os procedimentos cirúrgicos para a realização dos enxertos ósseos, todos os animais receberam dose única de 1 mg de antibiótico/Kg de peso no animal (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge).

4.5 Sacrifício

Os animais foram anestesiados com a solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum – Bayer® - Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas,

além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® - Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

Os animais foram sacrificados por perfusão cardíaca nos períodos 21, 45 e 60 dias. Para cada período, 10 animais foram sacrificados por subgrupo experimental.

4.6 Processamento histológico

As hemi mandíbulas direitas foram removidas e armazenadas para fixação em solução de formaldeído 10 %, tamponado, durante um período mínimo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado.

As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA 10 %, pH 7,8. Cada fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em bloco de parafina e obtenção de cortes seriados com 5 µm de espessura, que foram submetidos a processamento histológico de rotina. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE – Merck & Co, Inc.) e a análise histomorfométrica realizou-se em microscopia de luz.

4.7 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi feita com utilização do programa computacional NIH Image J 1.31, de domínio público a partir das imagens capturadas dos cortes com o microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) acoplado a câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o

programa computacional AxioVision Release 4.7.2 (Figuras 7-8-9 e 10).

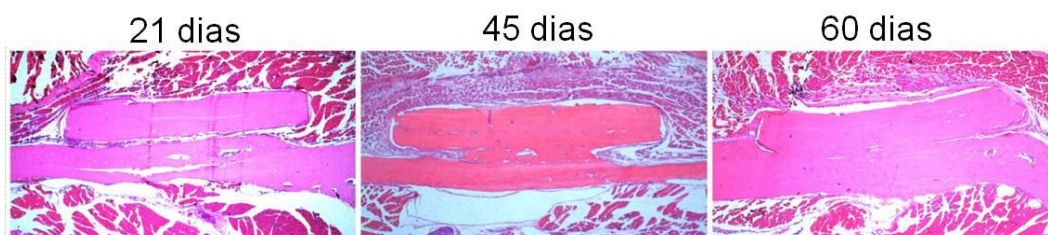


Figura 7 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C+ nos períodos 21, 45 e 60 dias.

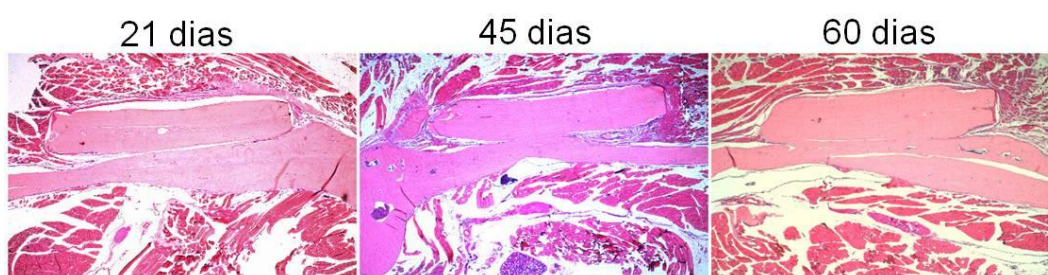


Figura 8 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Fum nos períodos 21, 45 e 60 dias.

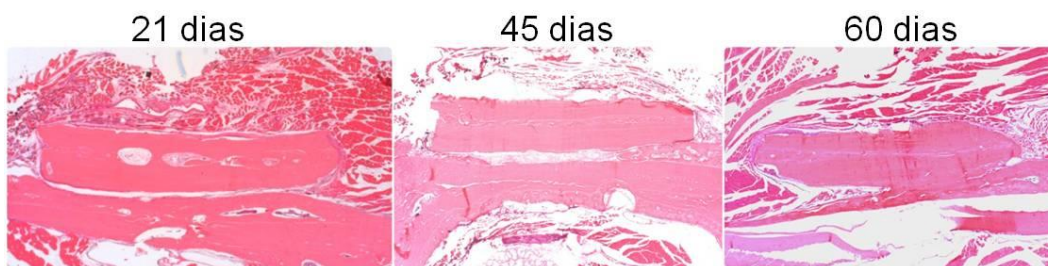


Figura 9 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Ovx nos períodos 21, 45 e 60 dias.

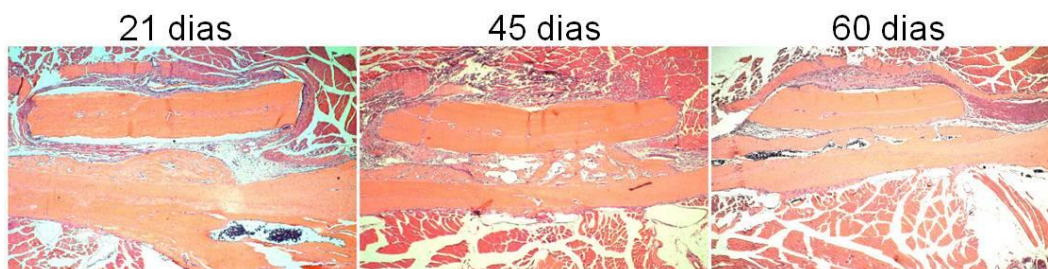


Figura 10 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo Fum+Ovx nos períodos 21, 45 e 60 dias.

4.7.1 Padronização da medição

Para a padronização da medição, utilizou-se a escala em barra no comprimento de 500 μm , obtida e calibrada pelo programa computacional AxioVision Release 4.7.2. Por meio do programa computacional NIH Image J 1.35s com a ferramenta “Straight line selection” selecionou-se uma linha sobre a barra da escala na distância de 500 μm , deste modo, obteve-se a distância em pixel padronizada de 239.9303, calibrando a ferramenta em 0,4799 pixel/ μm .

Antes de realizar as medições oficiais, o examinador foi avaliado para verificar a validade e a confiabilidade dos resultados. A determinação de concordância intraexaminador descrita por Eklund et al. (1993) foi realizada e o coeficiente de correlação de Pearson foi aplicado em medições testes.

O examinador mensurou vinte lâminas, duas vezes em dias sucessivos e o valor coeficiente de correlação de Pearson foi 0,924, o que demonstrou forte correlação entre as mensurações, pois o valor foi bem próximo a 1.

A partir dessa padronização, todas as medições histomorfométricas foram feitas.

4.7.2 Análise histomorfométrica da integração do enxerto ao leito receptor

Para a avaliação da integração da interface leito - enxerto foram realizadas fotos no aumento (25X), tendo-se a visão panorâmica de todo enxerto (Figura 11).

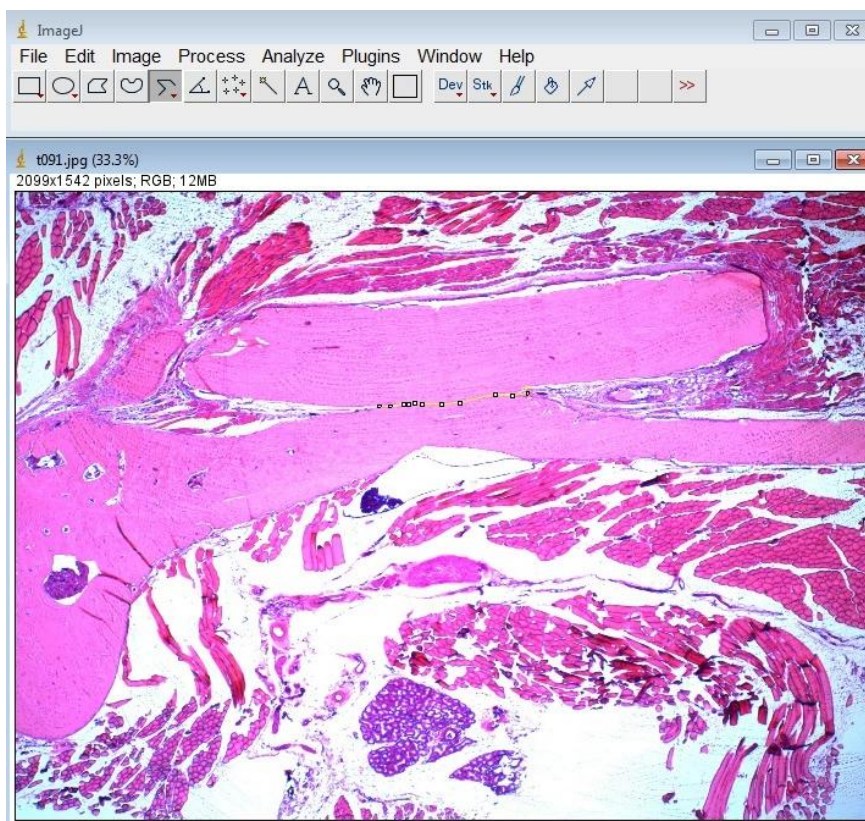


Figura 11 – Medição da integração na interface leito-enxerto.

4.7.3 Análise histomorfométrica da altura do enxerto

A altura do enxerto foi medida nas fotos dos cortes histológicos padronizando uma linha perpendicular da superfície até a base, no centro do enxerto. Os resultados foram tabelados e submetidos à análise estatística (Figura 12).

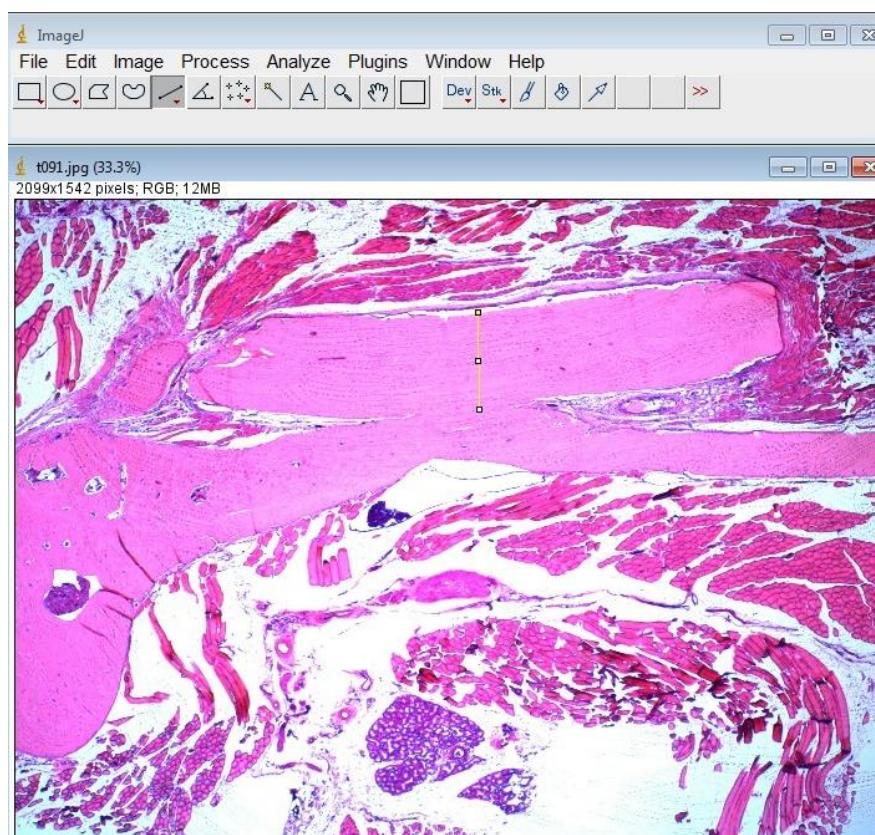


Figura 12 – Medição da altura do enxerto.

4.7.4 Análise histomorfométrica da largura do enxerto

A largura do enxerto foi medida nas fotos dos cortes histológicos padronizando uma linha perpendicular nas laterais do enxerto. Os resultados foram tabelados e submetidos à análise estatística (Figura 13).

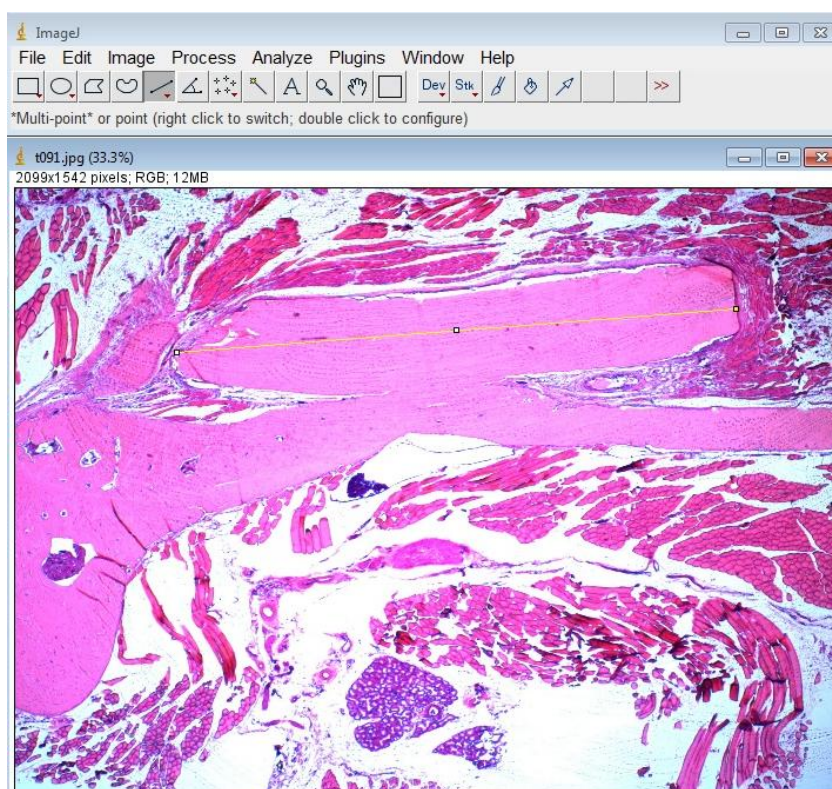


Figura 13 – Medição da largura do enxerto.

4.8 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio do programa computacional: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004). A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto que a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) 2 fatores e teste de Shapiro-Wilk, ambos ao nível de significância convencional de 5 %. O estudo do efeito na interação condição x período de eutanásia e foi conduzido por meio do gráfico de médias realizado no programa computacional excel.

5 RESULTADOS

5.1 Integração do enxerto

Os dados da estatística descritiva (média±desvio padrão) obtidos da mensuração da integração do enxerto ao leito receptor estão apresentados na tabela 1, mostrada a seguir:

Tabela 1 - Média e desvio padrão da integração leito receptor e enxerto

TEMPO/ CONDIÇÃO	21 dias	45 dias	60 dias
C+	816±620	1304±1018	881±803
Fum	480±593	1041±830	824±891
Ovx	741±824	1100±883	856±957
Fum+Ovx	582±720	1190±671	820±756

O gráfico abaixo (Figura 14) referente aos valores médios e desvio padrão da integração do enxerto, apresenta uma diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo nos quatro subgrupos entre os periodos 21 e 45 dias, pois, houve um aumento na integração do enxerto ao leito receptor.

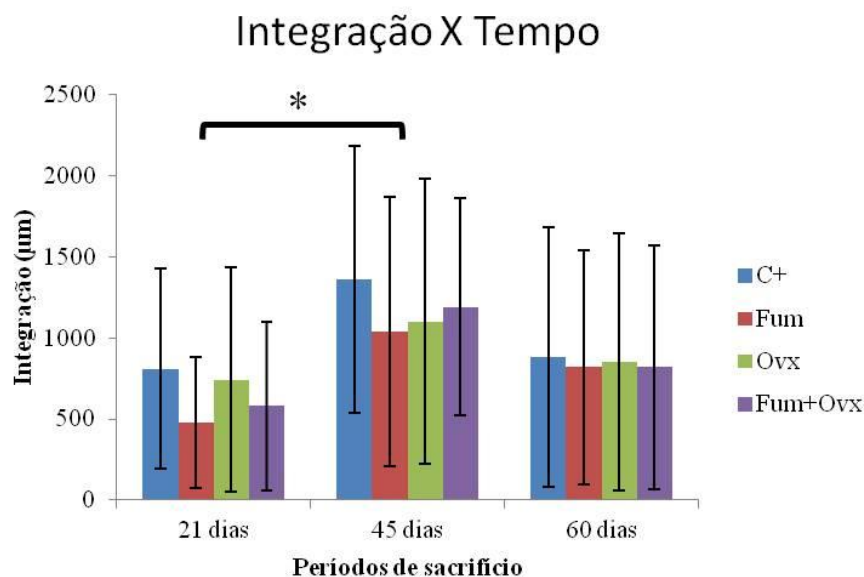


Figura 14 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão na integração do enxerto ao leito receptor. * Diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo nos quatro subgrupos entre os períodos 21 e 45 dias.

5.2 Altura do enxerto

Os dados da estatística descritiva (média±desvio padrão) obtidos na mensuração da altura do enxerto estão apresentados na tabela 2, mostrada a seguir.

Tabela 2 - Média e desvio padrão da altura dos enxertos

TEMPO/ CONDIÇÃO	21 dias	45 dias	60 dias
C+	510±60	550±90	460±90
Fum	450±60	480±160	450±160
Ovx	470±140	440±160	450±200
Fum+Ovx	460±190	480±210	450±190

O gráfico abaixo (Figura15) referente aos valores médios e desvio padrão da altura do enxerto não apresenta diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo e intersubgrupo.

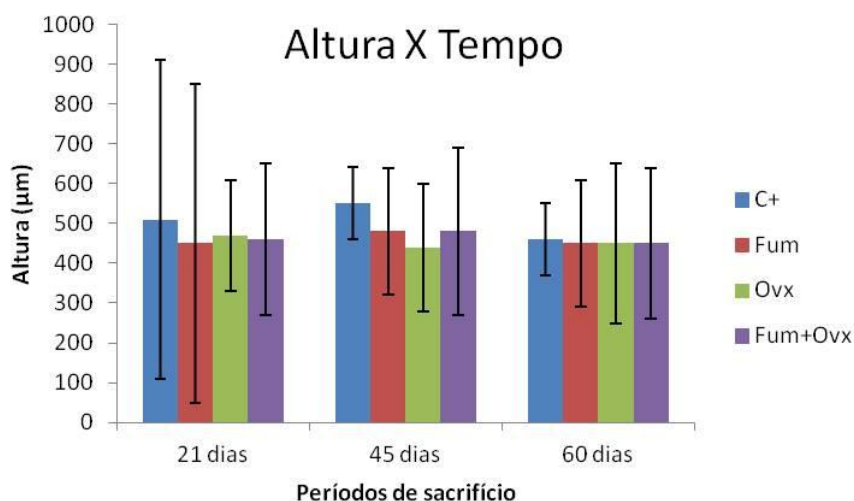


Figura 15 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão da altura do enxerto. Não houve diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo e intersubgrupo.

5.3 Largura do enxerto

Os dados da estatística descritiva (média±desvio padrão) obtidos da largura do enxerto estão apresentados na tabela 3, mostrada a seguir.

Tabela 3 - Média e desvio padrão da largura dos enxertos

TEMPO/ CONDIÇÃO	21 dias	45 dias	60 dias
C+	3060±390	3100±150	2950±370
Fum	3090±1420	2790±310	2870±910
Ovx	2770±980	2950±1210	2750±280
Fum+Ovx	2980±1230	2940±410	2650±440

O gráfico abaixo (Figura 16) referente aos valores médios e desvio padrão da largura do enxerto não apresenta diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo e intersubgrupo.

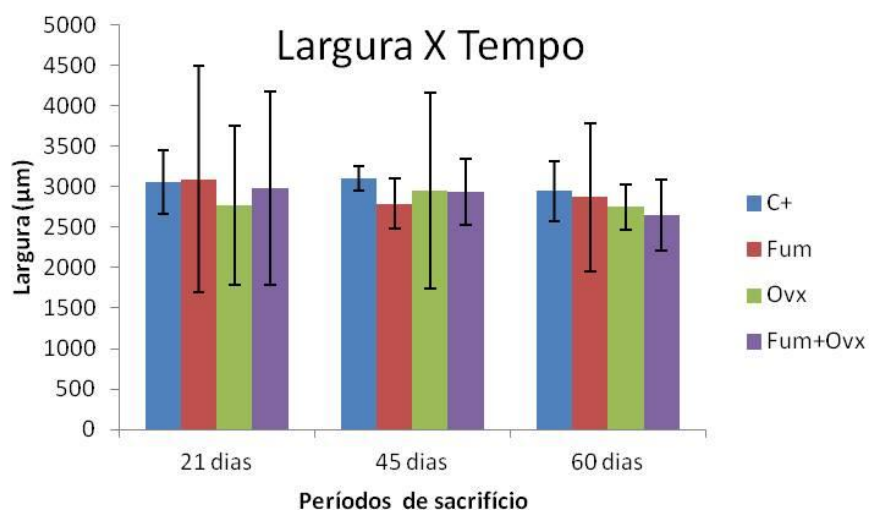


Figura 16 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão da largura do enxerto. Não houve diferença estatisticamente significativa intrasubgrupo e intersubgrupo.

6 DISCUSSÃO

Considerando a importância da osteoporose e o hábito de fumar na saúde pública, o aumento da expectativa de vida da população, bem como, a procura por procedimentos orais reabilitadores, o presente estudo buscou avaliar, por meio da análise histomorfométrica a influência fumaça de cigarro e da deficiência estrogênica no processo de integração de enxertos ósseos autógenos *onlay*.

Tratando-se de reabilitações ósseas alveolares, o cirurgião dentista tem várias opções a escolher, como os biomateriais e várias técnicas que podem conduzir a neoformação óssea (Bastos et al., 2014). No entanto, o osso autógeno tem se comportado como o material de maior índice de sucesso (Zeiss et al., 1960; Raghoobar et al., 1993), sendo considerado o “padrão ouro” dos enxertos (Springfield, 1992; Jardini et al., 2005; Barone, Covani, 2007; Bastos et al., 2014; Milinkovic et al., 2014).

O modelo experimental utilizando o enxerto ósseo autógeno *onlay* retirados da calvária craniana de ratos e fixados em sua mandíbula, idealizado por (Jardini et al., 2005) e posteriormente empregado por outros pesquisadores (Bonfante et al., 2008; Luize et al., 2008; Nascimento et al., 2009; De Marco et al., 2012; Tera et al., 2014ab; Bernardo et al., 2015) já se apresenta um método bem estabelecido.

Os enxertos ósseos de origem intramembranosa, tais como a calvária e mandíbula, utilizado na reconstrução do esqueleto craniofacial sofrem uma menor reabsorção do que aqueles de origem endocondral, tais como a crista ílica (Dado, Izquierdo, 1989; Carvalho et al., 2006). O osso intramembranoso, que segundo a literatura (Buser et

al., 1996; Serletti, Moran, 1998), tem maior potencial osteogênico do que o osso endocondral.

No que diz respeito à microarquitetura, estudos de Hardesty e Marsh (1990), Donovan et al. (1993) e Chen et al. (1994), comparando enxertos que possuem mais osso cortical com os mais trabeculares, puderam observar que houve mais reabsorção nos trabeculares (72 % a 85 %), em contrapartida nos corticais esta reabsorção foi menor (32 % a 34 %).

Estudos experimentais em animais utilizaram nicotina adicionada à água potável (Hollinger et al., 1999), nicotina em adesivos e sprays nasais (Sipe et al., 2000), nicotina administrada por via subcutânea através de minibombas osmóticas durante 3 meses (Iwaniec et al., 2001) e nicotina administrada por meio de injeção subcutânea, produzindo níveis séricos semelhantes aos de humanos fumantes que consomem cerca de 20 cigarros / dia (Bonfante et al., 2008).

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier et al. (1981) e modificada no laboratório de pneumologia da Escola Paulista de Medicina (Cendon et al., 1997). Esta metodologia foi adaptada por Nociti et al. (2002a). Observou-se em estudos prévios que ela promovia níveis séricos de cotinina semelhantes aos observados em fumantes que consomem cerca de 20 cigarros por dia (César-Neto et al., 2003).

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

Kalu, em 1991, designou os modelos baseados em ratas de 3 meses como modelo de rata madura. O termo maduro foi utilizado

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

Na literatura já foi relatado a influência da nicotina no reparo de enxertos ósseos autógenos *onlay* em ratos (Bonfante et al., 2008) e da deficiência estrogênica em ratas (Luize et al., 2008; Nascimento et al., 2009; Tera et al., 2014ab), ou seja, apenas de forma isolada. No entanto, o presente estudo objetivou analisar a influência da exposição à fumaça de cigarro, a deficiência estrogênica e as duas condições concomitantemente no processo de reparação óssea do enxerto ao leito receptor.

Bonfante et al. (2008) utilizaram a mesma técnica cirúrgica de enxerto em ratos que o nosso estudo, administraram nicotina por via subcutânea e avaliaram a influência da nicotina na reparação do enxerto ósseo autógeno ao leito receptor nos períodos 7, 14 e 28 dias e concluíram que a nicotina pode comprometer o processo de reparação do enxerto ósseo autógeno *onlay* ao leito receptor, mas não o impede. Porém, no presente estudo, os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos nos períodos 21, 45 e 60 dias. Isso pode ser explicado devido a nossa análise ter sido numa fase mais tardia de integração. No entanto, comparações devem ser feitas com cautela devido a diferenças no metabolismo da nicotina entre os seres humanos e ratos (Bonfante et al., 2008).

Em relação à deficiência estrogênica, Luize et al.(2008) avaliaram a reparação os enxertos ósseos autógenos *onlay* nos períodos 7, 14 e 28 dias em ratas ovariectomizadas e concluíram que a deficiência de estrógeno, decorrente da ovariectomia, atrasou o processo de reparo do enxerto ao leito receptor, mas embora tenha ocorrido atraso neste

processo, havia indícios que este evento poderia completar-se em períodos mais longos. Nascimento et al. (2009) avaliaram a reparação do enxerto ósseo autógeno *onlay* ao leito receptor nos períodos 21, 45 e 60 dias em ratas com deficiência estrogênica e mostraram que a deficiência de estrógeno não interferiu negativamente a integração.

Tera et al. (2014a) avaliaram os marcadores das proteínas RANK, RANK-L e Osteoprotegerina, por meio da técnica imunoistoquímica, nos períodos 0, 7, 21, 45 e 60 dias presentes na reparação do enxerto ao leito receptor e sugeriram que a expressão destes marcadores independem da presença ou ausência do estrógeno. Estas proteínas apresentam um papel fundamental no processo de osteoclastogênese e na regulação da modelação óssea (Cao et al., 2005). Em outro trabalho, referente à reparação do enxerto ao leito receptor nos períodos 0, 7, 21, 45 e 60 dias, Tera et al. (2014b) analisaram, por meio da técnica imunoistoquímica, os marcadores de sialoproteína óssea, osteonectina e osteocalcina, que são proteínas presentes nos períodos iniciais da formação óssea e os resultados apontaram que a deficiência estrogênica não afetou negativamente a expressão destes marcadores de formação óssea nestes períodos.

Assim, os estudos citados corroboram com os nossos achados, pois no presente estudo, a deficiência de estrógeno não interferiu na reparação do enxerto ao leito receptor.

Carvalho et al. (2006) avaliaram a influência da fumaça de cigarro juntamente com a deficiência estrogênica sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio e concluíram que, dentro dos limites do estudo realizado, a exposição à fumaça de cigarro amplificou os efeitos da deficiência estrogênica, prejudicando a qualidade e o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas mas não impediu este evento.

Machado et al. (2010) avaliaram os efeitos da nicotina e ovariectomia sobre a regeneração óssea alveolar após exodontias em

ratos e os resultados indicaram que a nicotina potencializou o efeito da deficiência estrogênica sobre a regeneração óssea. No presente estudo, os animais que foram expostos à fumaça de cigarro em conjunto com a indução à deficiência estrogênica (subgrupo Fum+Ovx) não tiveram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos outros subgrupos.

Considerando a integração do enxerto ao leito receptor em relação ao tempo, o presente estudo apontou diferença nos períodos de 21 e 45 dias para todos os subgrupos, ou seja, (C+, Fum, Ovx, Fum+Ovx) tiveram um aumento significativo na integração do enxerto ao leito receptor nesses períodos. Isto se justifica pelo processo de revascularização do enxerto ao leito receptor, promovendo a osteogênese (Roberts et al., 1987). Há tempo a literatura enfatiza a importância do suprimento sanguíneo quando se realiza um enxerto para promover o crescimento ósseo, assim como o fato de existir íntima relação entre a penetração vascular nos enxertos ósseos e a sua incorporação ao respectivo leito (Albee, 1921; Stringa, 1957; Springfield, 1993; De Marco et al., 2012). O sucesso da reparação dos enxertos é dependente do íntimo contato do enxerto com o tecido vascular (Burchardt, Enneking, 1978).

Burchardt (1983) ao descrever a biologia da reparação dos enxertos ósseos, destacou que o processo de integração é função do leito receptor e depende do íntimo contato com o tecido da área doadora, da sequência de eventos e do equilíbrio dos processos que seguem: a) proliferação de células osteoprogenitoras, b) diferenciação em osteoblastos, c) osteoindução, d) osteocondução e e) propriedades biomecânicas do enxerto.

Encontramos na literatura estudos que avaliam reparação de enxertos ósseos autógenos *onlay* em animais sob influência da nicotina ou deficiência estrogênica, porém, não há relatos quando estas duas situações estão associadas.

Assim, consideramos que novos estudos devem ser realizados nesta linha de pesquisa, para que se possa compreender com mais profundidade e clareza a influência do cigarro e da deficiência estrogênica no reparo de enxertos ósseos autógenos *onlay*.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se, dentro dos limites do presente estudo, que a exposição à fumaça de cigarro e a ovariectomia não influenciaram na integração dos enxertos ósseos autógenos *onlay* em ratas.

8 REFERÊNCIAS*

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fischer JH, Zöller JE, et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(7):651-9. doi: 10.1016/j.ijom.2008.02.005.

Ajiro Y, Tokuhashi Y, Matsuzaki H, Nakajima S, Ogawa T. Impact of passive smoking on the bones of rats. *Orthopedics*. 2010;33(2):90-5. doi: 10.3928/01477447-20100104-14.

Albee FH. Certain fundamental laws underlying the surgical use of the bone graft. *Ann Surg*. 1921;74(2):196-205.

Ames MS, Hong S, Lee HR, Fields HW, Johnston WM, Kim DG. Estrogen deficiency increases variability of tissue mineral density of alveolar bone surrounding teeth. *Arch Oral Biol*. 2010 Aug;55(8):599-605. doi: 10.1016/j.archoralbio.2010.05.011.

Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1993;8(6):609-15.

Barone A, Covani U. Maxillary alveolar ridge reconstruction with nonvascularized autogenous block bone: clinical results. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Oct;65(10):2039-46.

Bastos AS, Spin-Neto R, Conte-Neto N, Galina K, Boeck-Neto RJ, Marcantonio C, et al. Calvarial autogenous bone graft for maxillary ridge and sinus reconstruction for rehabilitation with dental implants. *J Oral Implantol*. 2014;40(4):469-78. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-11-00090.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 20 ago 2013; acesso em 25 out 2014]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bernardo DV, Tera TM, De Marco AC, Melo Filho AB, Santamaria MP, Jardini MAN. Osteoclastin expression during autogenous onlay bone grafts with or without resorbable collagen membrane in diabetic rats. *Braz Dent Sci.* 2015;18(2):73-81.

Block MS, Baughman DG. Reconstruction of severe anterior maxillary defects using distraction osteogenesis, bone grafts, and implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Mar;63(3):291-7.

Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011 Feb;26(2):229-38. doi: 10.1002/jbmr.320.

Bonfante S, Bosco AF, Luize DS, de Almeida JM, Cestari TM, Taga R. Influence of nicotine on healing process of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 May-Jun;23(3):437-44.

Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):527-32.

Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases [review]. *Lab Invest.* 1999;79(2):83-94.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect.* 1996;45:371-86.

Burchardt H, Enneking WF. Transplantation of bone. *Surg Clin North Am.* 1978;58(2):403-27.

Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clin Orthop Relat Res.* 1983 Apr;(174):28-42.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Apr;54(4):420-32. [discussion 32-3].

Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P, et al. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res.* 2005 Jan;20(1):30-40.

Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov;561:3-12. doi: 10.1016/j.abb.2014.05.003.

Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti FH, da Rocha Nogueira Filho G, Casati MZ, et al. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):599-605.

Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceição GM, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997 Oct;30(10):1241-7.

César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1454-9.

Chen NT, Glowacki J, Bucky LP, Hong HZ, Kim WK, Yaremchuk MJ. The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plast Reconstr Surg*. 1994 Apr;93(4):714-22. [discussion 723-4].

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology [review]. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3(Suppl 3):S131-9.

Coleman AL, Seitzman RL, Cummings SR, Yu F, Cauley JA, Ensrud KE, et al. The association of smoking and alcohol use with age-related macular degeneration in the oldest old: the study of osteoporotic fractures. *Am J Ophthalmol*. 2010 Jan;149(1):160-9. doi: 10.1016/j.ajo.2009.07.025.

Cornuz J, Feskanich D, Willett WC, Colditz GA. Smoking, smoking cessation, and risk of hip fracture in women. *Am J Med*. 1999 Mar;106(3):311-4.

Correa MG, Gomes Campos ML, César-Neto JB, Casati MZ, Nociti FH, Sallum EA. Histometric evaluation of bone around titanium implants with different surface treatments in rats exposed to cigarette smoke inhalation. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Jun;20(6):588-93. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01695.x.

Crockett JC, Mellis DJ, Scott DI, Helfrich MH. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporos Int*. 2011 Jan;22(1):1-20.

Dado DV, Izquierdo R. Absorption of onlay bone grafts in immature rabbits: membranous versus enchondral bone and bone struts versus paste. *Ann Plast Surg*. 1989 Jul;23(1):39-48.

De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res*. 1994 Dec;5(4):260-4.

de Carvalho PS, Vasconcellos LW, Pi J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2000 Jul-Aug;15(4):565-70.

De Marco AC, Jardini MA, Modolo F, Nunes FD, de Lima LA. Immunolocalization of bone morphogenetic protein 2 during the early healing events after guided bone regeneration. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Apr;113(4):533-41. doi: 10.1016/j.oooo.2011.09.016.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. *Clin Oral Implants Res*. 2002 Apr;13(2):185-91.

Donovan MG, Dickerson NC, Hellstein JW, Hanson LJ. Autologous calvarial and iliac onlay bone grafts in miniature swine. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993 Aug;51(8):898-903.

Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther*. 2006 Jan;86(1):77-91.

Eklund SA, Moller IJ, Leclercq MH. Calibration of examiners for oral health epidemiological surveys. World Health Organization. Geneva: WHO; 1993.

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (I). Success criteria and epidemiology. *Eur J Oral Sci*. 1998 Feb;106(1):527-51.

Fleischer NL, Diez Roux AV, Hubbard AE. Inequalities in body mass index and smoking behavior in 70 countries: evidence for a social transition in chronic disease risk. *Am J Epidemiol*. 2012 Feb;175(3):167-76. doi: 10.1093/aje/kwr314.

Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.doi: 10.1155/2015/421746.

Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006 Jan;235(1):176-90.

Gao SG, Li KH, Xu M, Jiang W, Shen H, Luo W, et al. Bone turnover in passive smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC Musculoskelet Disord.* 2011 Jun 11;12:131.doi: 10.1186/1471-2474-12-131.

Giampietro PF, McCarty C, Mukesh B, McKiernan F, Wilson D, Shuldiner A, et al. The role of cigarette smoking and statins in the development of postmenopausal osteoporosis: a pilot study utilizing the Marshfield Clinic Personalized Medicine Cohort. *Osteoporos Int.* 2010 Mar;21(3):467-77. doi: 10.1007/s00198-009-0981-3.

Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010 Oct;110(4):447-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.02.029.

Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. *J Orthop Trauma.* 2005 Jan;19(1):17-22.

Haas R, Haimböck W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent.* 1996 Dec;76(6):592-6.

Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA, Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(2):93-8.

Hardesty RA, Marsh JL. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Jan;85(1):5-14; discussion 5.

Hollenbach KA, Barrett-Connor E, Edelstein SL, Holbrook T. Cigarette smoking and bone mineral density in older men and women. *Am J Public Health.* 1993 Sep;83(9):1265-70.

Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, Soleymani P, Buck D. Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res.* 1999 Jun;45(4):294-301.

Iwaniec UT, Fung YK, Akhter MP, Haven MC, Nespor S, Haynatzki GR, et al. Effects of nicotine on bone mass, turnover, and strength in adult female rats. *Calcif Tissue Int.* 2001 Jun;68(6):358-64.

Jardini MA, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: a histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Dec;100(6):666-73.

Javed F, Al-Rasheed A, Almas K, Romanos GE, Al-Hezaimi K. Effect of cigarette smoking on the clinical outcomes of periodontal surgical procedures. *Am J Med Sci.* 2012 Jan;343(1):78-84.doi: 10.1097/MAJ.0b013e318228283b.

Jones JK, Triplett RG. The relationship of cigarette smoking to impaired intraoral wound healing: a review of evidence and implications for patient care. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Mar;50(3):237-9;[discussion 239-40].

Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB. *Trends Endocrinol Metab.* 2005 Mar;16(2):46-52.

Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.* 1991 Dec;15(3):175-91.

Kan JY, Rungcharassaeng K, Lozada JL, Goodacre CJ. Effects of smoking on implant success in grafted maxillary sinuses. *J Prosthet Dent.* 1999 Sep;82(3):307-11.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, Johansson H, De Laet C, Eisman JA, et al. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2005 Feb;16(2):155-62.

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48.doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113308.

Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.

Kim KH, Lee CM, Park SM, Cho B, Chang Y, Park SG, et al. Secondhand smoke exposure and osteoporosis in never-smoking postmenopausal women: the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Osteoporos Int.* 2013 Feb;24(2):523-32.doi: 10.1007/s00198-012-1987-9.

Law MR, Hackshaw AK. A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ.* 1997 Oct 4;315(7112):841-6.

Le Mesurier SM, Stewart BW, Lykke AW. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Res.* 1981 Feb;24(1):207-17.

Lee SH, Rho J, Jeong D, Sul JY, Kim T, Kim N, et al. v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation. *Nat Med.* 2006 Dec;12(12):1403-9.

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006 Jul;85(7):584-95.

Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. Association between marginal bone loss around osseointegrated mandibular implants and smoking habits: a 10-year follow-up study. *J Dent Res.* 1997 Oct;76(10):1667-74.

Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2008 Mar-Apr;23(2):207-14.

Machado GJ, Dias SM, Bosco AF, Okamoto T, Bedran de Castro JC, Dornelles RC. Action of nicotine and ovariectomy on bone regeneration after tooth extraction in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Nov;68(11):2675-81.

McCormick RK. Osteoporosis: integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev.* 2007 Jun;12(2):113-45.

Mecall RA, Rosenfeld AL. Influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. 1. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1991;11(1):8-23.

Meechan JG, Macgregor ID, Rogers SN, Hobson RS, Bate JP, Dennison M. The effect of smoking on immediate post-extraction socket filling with blood and on the incidence of painful socket. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1988 Oct;26(5):402-9.

Milinkovic I, Cordaro L. Are there specific indications for the different alveolar bone augmentation procedures for implant placement? A systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 May;43(5):606-25. doi: 10.1016/j.ijom.2013.12.004.

Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman BM, Jee WS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microsc*. 1989 Sep;3(3):953-60; [discussion 960-1].

Miquel J, Ramírez-Boscá A, Ramírez-Bosca JV, Alperi JD. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*. 2006 May-Jul;42(3):289-306.

Munakata M, Tachikawa N, Honda E, Shiota M, Kasugai S. Influence of menopause on mandibular bone quantity and quality in Japanese women receiving dental implants. *Arch Osteoporos*. 2011;6:51-7. doi: 10.1007/s11657-011-0058-8.

Nascimento RD, Cardoso PE, De Marco AC, de Lima LA, Jardini MA. Influence of osteopenia in autogenous bone graft healing with or without expanded polytetrafluoroethylene membranes: histologic and histomorphometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec;24(6):1074-82.

Nociti FH Jr, César NJ, Carvalho MD, Sallum EA. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002a May-Jun;17(3):347-52

Nociti Júnior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002b Sep;73(9):982-7.

Ortego-Centeno N, Muñoz-Torres M, Jódar E, Hernández-Quero J, Jurado-Duce A, de la Higuera Torres-Puchol J. Effect of tobacco consumption on bone mineral density in healthy young males. *Calcif Tissue Int*. 1997 Jun;60(6):496-500.

Raghoobar GM, Brouwer TJ, Reintsema H, Van Oort RP. Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993 Nov;51(11):1198-203; [discussion 1203-5].

Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Implants: Bone physiology and metabolism. *CDA J*. 1987 Oct;15(10):54-61.

Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. *J Bone Miner Metab.* 2009;27(5):555-61. doi: 10.1007/s00774-009-0075-5.

Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH. Histologic evaluation of the effect of nicotine administration on bone regeneration. A study in dogs. *Braz Oral Res.* 2004 Oct-Dec;18(4):345-9.

Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris GB, Sbordone C, Piombino P, Guidetti F. Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Oct;38(10):1059-65. doi: 10.1016/j.ijom.2009.06.024.

Serletti JM, Moran SL. The combined use of the TRAM and expanders/implants in breast reconstruction. *Ann Plast Surg.* 1998 May;40(5):510-4.

Sipe RV 3rd, Buck DC, Hollinger JO. Nicotine administration in rabbits using Habitrol nicotine patches and nicotine nasal spray. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000 Jul;27(7):480-2.

Soares EV, Fávaro WJ, Cagnon VH, Bertran CA, Camilli JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(1):101-7. doi: 10.1007/s00774-009-0115-1.

Springfield DS. Autogenous bone grafts: nonvascular and vascular. *Orthopedics.* 1992 Oct;15(10):1237-41.

Springfield DS. Surgical wound healing. *Cancer Treat Res.* 1993;67:81-98

Strietzel FP, Reichart PA, Kale A, Kulkarni M, Wegner B, Kuchler I. Smoking interferes with the prognosis of dental implant treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2007 Jun;34(6):523-44.

Stringa G. Studies of the vascularisation of bone grafts. *J Bone Joint Surg Br.* 1957 May;39-B(2):395-420.

Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol.* 2007 Apr;7(4):292-304.

Tawfik H, Kline J, Jacobson J, Tehranifar P, Protacio A, Flom JD, et al. Life course exposure to smoke and early menopause and menopausal transition. *Menopause*. 2015 Oct;22(10):1076-83. doi: 10.1097/GME.0000000000000444.

Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*. 2007 Feb;170(2):427-35.

Tera TM, Prado RF, De Marco AC, Santamaria MP, Jardini MA. The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res*. 2014a;28. pii: S1806-83242014000100261.

Tera TM, Nascimento RD, Prado RF, Santamaria MP, Jardini MA. Immunolocalization of markers for bone formation during guided bone regeneration in osteopenic rats. *J Appl Oral Sci*. 2014b Nov-Dec;22(6):541-53. doi: 10.1590/1678-775720140190.

Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev*. 1994 Jun;15(3):275-300.

Ward KD, Klesges RC. A meta-analysis of the effects of cigarette smoking on bone mineral density. *Calcif Tissue Int*. 2001 May;68(5):259-70.

Weitzmann MN, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1186-94.

World Health Organization. Framework Convention on Tobacco Control. Governments celebrate five years of anti-tobacco convention [Internet]. Geneva: WHO / FCTC; s/d [cited 18 out 2015. Disponível a partir de: <http://www.who.int/fctc/press.pdf>.

Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM. Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*. 1988a;43(3):179-83.

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

Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int*. 1989 Dec;45(6):360-6.

Xu B, Lovre D, Mauvais-Jarvis F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie*. 2015 Jun 29. pii: S0300-9084(15)00197-2. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.018.

Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2008 Jul-Sep;8(3):204-16.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int*. 2003 Jan;72(1):2-4.

Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggest that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. 1999 Nov 3;383(3):387-93.

Zeiss IM, Nisbet NW, Heslop BF. Studies on transference of bone. 2. Vascularization of autologous and homologous implants of cortical bone in rats. *Br J Exp Pathol*. 1960 Aug;41:345-63.

ANEXO – Certificado do comitê de ética

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Domus
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9628
Fax (12) 3947-9010 / yamunic@foc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **10/2012-PA/CEP**, sobre
"Influência da inalação da fumaça de cigarro no reparo de enxertos
ósseos autógenos onlay recobertos ou não por membrana colágena
reabsorvível: Estudo Histológico e Histométrico em ratos)", sob a
responsabilidade de **MARIA APARECIDA NEVES JARDINI**, está de
acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado
pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal – CONCEA e Lei
Arouca nº 11.794 de 08/10/2008 e foi aprovado por este Comitê de Ética

São José dos Campos, 14 de dezembro de 2012.

Prof.Assist.Dr. RUBENS NISIE TANGO
Coordenador