



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

CAMILLA MAGNONI MORETTO NUNES

**INFLUÊNCIA DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA EM ENXERTOS AUTÓGENOS
ONLAY EM RATAS COM DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA: estudo
histomorfométrico**

2016

CAMILLA MAGNONI MORETTO NUNES

**INFLUÊNCIA DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO NA REGENERAÇÃO
ÓSSEA GUIADA EM ENXERTOS AUTÓGENOS ONLAY EM RATAS COM
DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA: 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: Profa. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim
Co orientadora: Profa.Dra.Andréa Carvalho de Marco

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.

Nunes, Camilla Magnoni Moretto

Influência da inalação da fumaça de cigarro na regeneração óssea guiada em enxertos autógenos onlay em ratas com deficiência estrogênica: estudo histomorfométrico. / Camilla Magnoni Moretto Nunes. - 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

Coorientador: Andréa Carvalho De Marco.

1. Regeneração óssea. 2. Doenças ósseas metabólicas. 3. Tabagismo. I. Jardim, Maria Aparecida Neves, orient. II. De Marco, Andréa Carvalho, coorient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual Paulista. VI. 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, 15 de abril de 2016

E-mail: camillammoretto@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

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

Prof. Dr. Mauro Pedrine Santamaria

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

Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli

UNESP – Univ Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia
Campus de Araraquara

São José dos Campos, 15 de abril de 2016.

DEDICATÓRIA

Ao meu Amado Deus, Pai cuidadoso, Amigo sempre presente. Obrigada Senhor por cada dia que me permitiu trabalhar neste projeto e por ser minha fonte de inspiração e sabedoria. Meu coração é grato por tudo o que tens feito na minha vida, por realizar cada sonho e por me guiar sempre. A Ti, meu Deus, dedico este trabalho! Toda honra e glória sejam dadas ao Senhor Jesus.

Ao meu marido, Guilherme, agradeço pelo amor, carinho, auxílio, paciência e companheirismo. Sem você tudo seria muito difícil. Obrigada pelo seu amor! Amo-te, Amore Mio.

Aos meus pais, Pedro e Cláudia, pelos ensinamentos, carinho, incentivo e força que possibilitaram alcançar meus objetivos. Meu infinito amor e gratidão!

Às minhas queridas e amadas irmãs, Marina e Gabriela, por me ajudarem e serem companheiras em tudo. Obrigada pelo carinho e pela constante presença em minha vida. Amo vocês!

À minha orientadora Prof. Dra. Maria Aparecida Neves Jardim, agradeço por me receber como orientanda, por toda a confiança e oportunidades colocadas em minhas mãos, pelos trabalhos e todo auxílio que foram fundamentais na minha formação. Obrigada por me ensinar quão libertador é o saber! Minha eterna gratidão e admiração!

AGRADECIMENTOS

Às amigas Camila Lopes e Daniella Bernardo por participarem de cada etapa junto comigo, pelo companheirismo, cumplicidade e amizade. Vocês foram fundamentais na execução e conclusão de cada detalhe deste trabalho! Minha gratidão pela amizade de vocês!

À Prof Dra Andrea Carvalho de Marco pela co-orientação e por toda ajuda e amizade. Minha gratidão!

Ao Prof Dr.Mauro Pedrine Santamaria que abriu as portas da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos para mim. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos que contribuíram muito para minha formação. Minha gratidão!

À Prof Dra Luana Marotta Reis de Vasconcellos por todo apoio técnico do laboratório de osso.

À Prof Dra Mônica Fernandes Gomes pela amizade e pelo apoio técnico do CEBAPE.

Ao Prof Dr.Luiz Rosa Blumer, por permitir a utilização do aparelho de scanner de lâminas.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” por mais esta oportunidade que tive de aprimorar meus conhecimentos técnicos e científicos através do mestrado.

Aos funcionários: Sr Toninho e André, Walter e Marcinha, que contribuíram na parte técnica deste trabalho.

Aos colegas de turma: Camila Augusto, Cássia, Felipe, Marcelo, Marcus, Naira, Nídia, Stephanie, Thiago e Vinícius agradeço pelos bons momentos de convivência e aprendizado nestes dois anos.

“Se não é desafiador, não é transformador. ”

(Geração de Valor)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Enxerto ósseo autógeno.....	18
2.2 Regeneração óssea guiada.....	19
2.3 Tabagismo e Deficiência Estrogênica.....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Delineamento experimental.....	28
4.2 Cirurgias de Ovariectomia e Ovariectomia Simulada (SHAM).....	29
4.3 Exposição à fumaça de cigarro.....	31
4.4 Cirurgia de enxerto autógeno <i>onlay</i> e recobrimento com membrana colágena.....	33
4.5 Sacrifício.....	36
4.6 Processamento Histológico.....	37
4.7 Análise Histomorfométrica.....	37
4.8 Calibração, Cegamento e Padronização das medidas histomorfométricas.....	39
4.8.1 Análise histomorfométrica da integração do enxerto ao leito receptor.....	40
4.8.2 Análise histomorfométrica da altura do enxerto.....	41
4.8.3 Análise histomorfométrica da largura do enxerto.....	42
4.9 Análise estatística.....	43
5 RESULTADOS.....	44
5.1 Integração.....	44
5.2 Altura.....	45

5.3 Largura.....	46
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÃO.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Flow-chart da organização dos animais nos grupos experimentais.....	29
Figura 2 – Cirurgia de ovariectomia.....	31
Figura 3 – Representação da sequência operacional dos grupos expostos à fumaça de cigarro.....	32
Figura 4 – Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça de cigarro.....	33
Figura 5 – Área doadora do enxerto.....	34
Figura 6 – Área receptora e enxerto.....	36
Figura 7 – Imagens escaneadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C+ nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	38
Figura 8 – Imagens escaneadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C+F nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	38
Figura 9 – Imagens escaneadas para a análise histomorfométrica do subgrupo OVZ nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	38
Figura 10 – Imagens escaneadas para a análise histomorfométrica do subgrupo OVZ+F nos períodos 21, 45 e 60 dias.....	39
Figura 11 – Padronização das medidas.....	40
Figura 12 – Imagem da captura da lâmina.....	41
Figura 13 – Análise histomorfométrica da integração leito – enxerto.....	41
Figura 14 – Análise histomorfométrica da altura do enxerto.....	42
Figura 15 – Análise histomorfométrica da largura do enxerto.....	43
Figura 16 – Gráfico dos valores médios e desvio padrão na integração do enxerto ao leito receptor.....	45

Figura 17 – Gráfico dos valores médios e desvio padrão da altura do enxerto.....	46
Figura 18 – Gráfico dos valores médios e desvio padrão da largura do enxerto.....	47

Nunes CMM. Influência da inalação da fumaça de cigarro na regeneração óssea guiada em enxertos ósseos autógenos *onlay* em ratas com deficiência estrogênica: estudo histomorfométrico [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

As perdas ósseas constituem um desafio comum na clínica diária da periodontia e implantodontia. Essas condições que podem ser resultado de doenças periodontais, traumas e fatores anatômicos ou congênitos e também do uso de próteses totais ou parciais removíveis promovem uma reabsorção contínua dos rebordos alveolares dificultando uma adequada reabilitação posterior. Os implantes osseointegrados surgiram como uma abordagem terapêutica segura e com altos índices de sucesso, no entanto, é necessária uma quantidade mínima de osso que pode ser adquirida através da Regeneração Óssea Guiada (ROG), e também devem ser observados os fatores sistêmicos e locais do paciente que podem interferir no processo de osseointegração comprometendo o tratamento. Dentre os principais exemplos desses fatores estão o tabagismo e a deficiência estrogênica. Dessa forma, o presente trabalho se propôs verificar o processo de osseointegração na regeneração óssea guiada em enxertos autógenos *onlay* em comparação com a influência da inalação de fumaça de cigarro na regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica. Para isso, foram utilizadas 120 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com 90 dias de idade, com peso em torno de 300 gramas divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais (Controle e Teste) cada um contendo 60 animais e subdivididos em dois subgrupos experimentais e organizados da seguinte maneira: C+ (n=30) ratas SHAM (submetidas à simulação da cirurgia de ovariectomia) não expostas à fumaça de cigarro; OVZ (n=30) ratas ovariectomizadas não expostas à fumaça de cigarro; C+F (n=30) ratas SHAM (submetidas à simulação da cirurgia de ovariectomia) expostas à fumaça de cigarro e OVZ+F (n=30) ratas ovariectomizadas expostas à fumaça de cigarro. Todos os animais foram submetidos à cirurgia para a colocação de enxertos na hemi-mandíbula esquerda, recobertos por membrana de colágeno reabsorvível. Os animais foram eutanasiados por perfusão cardíaca nos períodos 21, 45 e 60 dias. Os resultados revelaram que em relação à integração do enxerto ao leito receptor e o parâmetro Tempo houve um aumento significativo na integração do enxerto entre os períodos 45 dias x 21 dias ($P= 0,034$) intra subgrupo C+F. Em relação à altura do enxerto ósseo, no parâmetro Condição observou-se que a condição do fumo promoveu uma redução significativa da altura do enxerto ósseo no subgrupo C+F ($P= 0,002$) no período de 21 dias. Em relação à largura do enxerto ósseo o parâmetro Condição no período de 45 dias houve diferença significativa inter subgrupos C+ x C+F ($P= 0,014$). A análise histomorfométrica foi realizada e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) dois fatores e teste de Shapiro-Wilk, ambos com nível de significância convencional de 5%. Com os resultados pode-se concluir que o reparo da regeneração óssea guiada de enxertos ósseos autógenos *onlay* em modelo animal de inalação da fumaça de cigarro associado à ovariectomia, não foi prejudicado.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Doenças ósseas metabólicas. Tabagismo.

Nunes CMM. Influence of inhalation of cigarette smoke on guided bone regeneration of autogenous onlay bone grafts in rats with estrogen deficiency: histomorphometric study [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Bone loss are an usual challenge on daily periodontal and implantology practice. These conditions could be a result of periodontal diseases, traumas and anatomic or congenital factors and prosthesis that will promotes a continual resorption of alveolar ridge hindering a proper subsequent rehabilitation. The dental implants have arisen as a safe therapeutic approach and with high success rates; however, a minimal amount of bone is necessary that can be acquired through Guided Bone Regeneration (GBR), and patient's systemic and local factors must be observed because they may interfere with the osseointegration process compromising treatment. Among these main examples are smoking and estrogen deficiency. The nicotine found in cigarettes has shown important influence on the biological events negatively affecting bone repair and osseointegration. The estrogen deficiency, as well as cigarette, has an impact on the bone metabolism resulting in bone fragility by reducing its mass. Therewith is possible to observe in the literature that each these conditions can cause some damage to bone tissue. Thus, the present study aimed to verify the osseointegration process on guided bone regeneration in autogenous onlay grafts compared to the influence of smoking cigarette inhalation on guided bone regeneration in rats with estrogen deficiency. For this, 120 adult female rats (*Rattus norvegicus*, *Albinus* variation, *Wistar*) ninety days old, weighing around 300 grams were randomized in two experimental groups (Control and Test) each with 60 animals and divided into two experimental and organized subgroups as follows: C (n=30) SHAM rats (subjected to simulated ovariectomy surgery) unexposed to cigarette smoking; OVZ (n=30) ovariectomized and unexposed to cigarette smoking rats; C+F (n=30) SHAM rats (subjected to simulated ovariectomy surgery) exposed to cigarette smoking and OVZ+F (n=30) ovariectomized rats exposed to cigarette smoking. All the animals were undergo surgery for the placement of onlay bone grafts in the jaw left and these were coated with resorbable collagen membrane. The rats were euthanized by cardiac perfusion in periods 21, 45 and 60 days. The results showed in relation to the integration of the graft and the recipient bed Time parameter was a significant increase in graft integration between periods x 45 days 21 days ($P = 0.034$) intra subgroup C + F. In relation to the height of the bone graft, the parameter Condition was observed that the smoke condition produced a significant reduction of bone graft height in subgroup C + F ($P = 0.002$) in 21 days. In relation to the width of the bone graft condition parameter in the 45 day period there was a significant difference inter subgroups C x + C + F ($P = 0.014$). Histomorphometric analysis was performed and the data were submitted to analysis of variance (ANOVA) two factors and Shapiro-Wilk test, both with conventional significance level of 5%. With the results we can conclude that guided bone regeneration repair on autogenous bone graft onlay in an animal model of cigarette smoke inhalation associated with ovariectomy, was not jeopardized.

Keywords: Bone Regeneration. Bone metabolic disease. Smoking.

1 INTRODUÇÃO

As perdas ósseas constituem um desafio terapêutico comum na clínica diária da periodontia e implantodontia. Essas condições que podem ser resultado de doenças periodontais e periimplantares, traumas e fatores anatômicos ou congênitos, exodontias e também do uso de próteses totais ou parciais removíveis promovem uma reabsorção contínua dos rebordos alveolares dificultando uma adequada reabilitação posterior (Martins et al., 2011; Donos et al., 2015).

Para superar essa dificuldade, os implantes osseointegrados surgiram como uma abordagem terapêutica segura e com altos índices de sucesso. Entretanto, para que seja realizada esta técnica, é necessário observar se há o pré-requisito essencial, que é a quantidade mínima de osso, tanto em largura quanto em altura.

Sendo necessário, pode-se lançar mão de técnicas para a correção dos defeitos ósseos causados no rebordo alveolar, e assim promover uma reabilitação implanto suportada que seja funcional e estética para o paciente (Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008; Luize et al., 2008; Campos et al., 2009; Lindfors et al., 2010; Martins et al., 2011; Giorgetti et al., 2012; Faverani et al., 2014).

Segundo Cawood e Howell (1988), os rebordos alveolares podem ser classificados em 6 tipos, sendo que os tipos IV, V e VI são considerados críticos e, por isso, há necessidade de reconstrução com enxerto ósseo, para a posterior reabilitação protética. As técnicas para promover ganho de tecido ósseo, como a regeneração óssea guiada e o enxerto ósseo autógeno tem sido utilizadas pois permitem a colocação de implantes em áreas que não seriam possíveis (Buser et al., 1995; Buser et al., 1996; Donos et al., 2002; Mathias et al., 2003; Yilmaz et al., 2010; Martins et al., 2011; Faverani et al., 2014).

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) consiste na colocação de uma membrana com objetivo de promover o aumento do tecido ósseo (Buser et al., 1993). Esta técnica tem sido empregada em vários casos de implantes dentários em que há quantidade (volume) insuficiente de osso no local receptor do implante (Taguchi et al., 2005; Retzepi e Donos, 2010; Elgali et al., 2016).

Para o sucesso da ROG alguns requisitos devem ser seguidos, tais como: estabilização mecânica do enxerto, prevenção de infecção bacteriana, manutenção do espaço sob a membrana, separação de células osteogênicas das não-osteogênicas (Alberius et al., 1992; Donos et al., 2002), estabilidade da membrana, selamento periférico entre a membrana e o osso, e adequado suprimento sanguíneo (Lundgren et al., 1995).

Jardini et al. (2005) avaliaram o uso de membranas de PTFE-e em espécimes de enxerto autógeno e observaram perda óssea no período de cicatrização do grupo em que a membrana não foi utilizada. A partir do 21º dia, o grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo autógeno sofreu extensiva reabsorção óssea, enquanto o grupo em que os enxertos foram recobertos por membrana de PTFE-e mostrou regeneração óssea difusa além das bordas do enxerto.

Adeyemo et al. (2008) em estudo em modelo animal, demonstraram que a combinação do enxerto ósseo onlay e a ROG resultou em maior ganho ósseo em comparação com ao enxerto ósseo isoladamente. Após 4 semanas, observou-se maior formação óssea nos espécimes em que o enxerto ósseo foi recoberto por membrana colágena reabsorvível. A membrana formou um espaço que foi preenchido pelas células formadoras de osso originadas da margem do enxerto ósseo durante o processo de regeneração.

Muito embora a ROG seja um procedimento terapêutico com alto grau de sucesso para a reabilitação com implantes osseointegrados, os fatores sistêmicos do paciente, assim como os locais, podem interferir no processo de osseointegração comprometendo o tratamento (Nociti et al., 2002a).

O tabagismo é um problema de saúde pública mundial que, além de estar associado a um alto índice de morbidade decorrente do seu uso (Warnakulasuriya et al., 2005; César-Neto et al., 2012), segundo Yuhara et al. (1999), também está relacionado com a perda óssea alveolar. Esse fenômeno ocorre pelo fato da nicotina, seu principal componente, atuar sobre a regulação da atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio, diminuição da densidade óssea mineral (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), predispondo ao maior risco à fratura (Kanis et

al., 2005; Rothem et al., 2009) e prejuízo no processo de cicatrização (Javed et al., 2012).

A literatura também revela os efeitos fisiopatológicos do fumo na vasoconstrição arteriolar, hipóxia celular, desmineralização do osso e o atraso na revascularização (César-Neto et al., 2003; Gullihorn et al., 2005; Strietzel et al., 2007; Rothem et al., 2009; Giorgetti et al., 2012). Como consequência, observa-se a dificuldade na reparação de enxertos ósseos (Jones, Triplett, 1992; Kan et al., 1999), o 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; Strietzel et al., 2007), 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), ou seja, sendo responsável também por complicações pós-operatórias com infecção da ferida, necrose parcial e perda do enxerto ósseo (Saldanha et al., 2004; Bosco et al., 2007; Yamano et al., 2010; Javed et al., 2012).

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).

Assim como o fumo, a osteoporose, outra complicação sistêmica importante que afeta o reparo dos enxertos ósseos, é definida como uma doença crônica, multifatorial, determinada por interações entre fatores ambientais e genéticos. É proveniente de uma desordem esquelética que gera uma fragilidade do osso pela redução de sua massa, alterando a arquitetura e comprometendo sua resistência que, em conjunto, vão contribuir para uma maior propensão de fraturas ósseas ao mínimo trauma. (Giampietro et al., 2010; Gao et al., 2011).

O equilíbrio no processo de remodelação óssea realizado principalmente pelo estrogênio sobre as células osteoblásticas e osteoclásticas, mantém a saúde deste tecido. No entanto, outros hormônios e fatores ambientais são capazes de influenciar esse complexo processo (Vieira, 1999). Dentre os fatores ambientais que atuam sobre o metabolismo ósseo estão o excesso no consumo de álcool, baixa ingestão de cálcio, insuficiência de vitamina D, baixo índice de massa corporal,

hormônio da paratireóide elevado, homocisteína, caucasianos, gênero feminino, histórias prévias de fraturas e, principalmente o fumo (Giampietro et al., 2010).

Muitos estudos tem revelado esta associação entre a osteoporose e o fumo que pode promover um risco maior às fraturas ósseas (Wong et al., 2007; Ajiro et al., 2010) pela modulação da proliferação de osteoblastos e formação de citocinas de reabsorção óssea IL1 e IL6 em níveis elevados (Hapidin et al., 2007) e também pelo efeito cumulativo do fumo na densidade mineral óssea, gerando um efeito tóxico direto sobre o osso na presença da nicotina (Law, Hackshaw, 1997). Entretanto, ainda não existem estudos avaliando a interação dessas condições com a regeneração óssea guiada em enxertos de osso autógeno em bloco. Com o aumento da presença de pacientes no consultório odontológico exibindo algum comprometimento sistêmico e/ou tabagista e em busca de reabilitação protética, seria importante verificar o comportamento da regeneração óssea guiada na presença da fumaça de cigarro em modelo animal submetido à deficiência estrogênica. Portanto, este estudo se propôs avaliar através da histomorfometria a influência da inalação da fumaça de cigarro no reparo de enxertos autógenos *onlay* na mandíbula de ratas com deficiência estrogênica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enxerto ósseo autógeno

O osso é um tecido conjuntivo especializado capaz de sofrer modificações de formação e reabsorção ao longo da vida do indivíduo. Essas modificações podem ser exercidas principalmente a partir de forças mecânicas e por ação de hormônios.

Na cavidade oral o tecido ósseo pode ser submetido à alguns processos que acarretam em perdas ósseas, que são desafios clínicos diários na Odontologia tornando difícil a recuperação estético funcional das regiões onde ocorrem. Essas perdas são processos decorrentes da reabsorção do rebordo alveolar desdentado como consequência de exodontia, traumatismos dentoalveolares, doença periodontal, ausência dentária congênita, carga protética inadequada e infecções.

Desta forma, essas condições tornam-se fatores limitantes para a reabilitação com implantes osseointegrados devido ao volume insuficiente de osso remanescente (Nóia et al., 2009; Fardin et al., 2010; Elgali et al., 2015).

Com isso, materiais que visam a recuperação do tecido ósseo são utilizados para adequada reabilitação estética e funcional.

Esses materiais devem apresentar as seguintes características: promover a osteogênese; não apresentar resposta imunológica do hospedeiro; revascularizar rapidamente; estimular a osteoindução; promover a osteocondução; ser substituído completamente por osso em quantidade e qualidade semelhante ao do hospedeiro, sendo que o enxerto ósseo autógeno, considerado o padrão ouro nas técnicas de enxertia, contempla muitos desses requisitos (Nóia et al., 2009; Fardin et al., 2010).

Devido suas propriedades biológicas osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras, o enxerto ósseo autógeno justifica-se como material de escolha, uma vez que é removido do próprio paciente não provoca rejeição e também por ser considerado um tratamento rápido e previsível (Antoun et al., 2001; Nóia et al., 2009; Jardim et al., 2009; Fardin et al., 2010; Elgali et al., 2015).

Os enxertos ósseos autógenos podem ser obtidos de regiões intra ou extra orais como: corpo e sínfise mandibulares e tuberosidade da maxila, calota craniana, crista ilíaca, tíbia e costela.

Outro importante fator que torna o enxerto ósseo autógeno um material ideal de escolha é sua previsibilidade pois fornece ao leito receptor células capazes de induzir a neoformação óssea, bem como fatores de crescimento e também um arcabouço ósseo ao leito receptor (Jardim et al., 2009).

2.2 Regeneração Óssea Guiada

A terapia com implantes osseointegrados promove resultados clínicos de integração tecidual favoráveis tornando o uso dessa abordagem confiável no tratamento dos pacientes (Bain, 1996; Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Correa et al., 2009; Yamano et al., 2010).

As técnicas de regeneração óssea guiada e enxerto ósseo autógeno visam promover o ganho de tecido ósseo permitindo, dessa forma, a reabilitação de regiões onde não seria possível com implantes osseointegrados (Antoun et al., 2001). A técnica da regeneração óssea guiada (ROG) tem como objetivo promover o ganho ósseo através da associação do tecido ósseo com uma membrana (Buser et al., 1995; Buser et al., 1996; Donos et al., 2002; Elgali et al., 2016).

Segundo Taguchi et al. (2005), esta técnica tem sido utilizada em muitos casos de reabilitação com implantes em regiões receptoras com volume insuficiente de tecido ósseo. E para que haja sucesso, alguns requisitos devem ser observados, como: estabilização mecânica do enxerto, manutenção do espaço sob a membrana, separação das células osteogênicas das não-osteogênicas e prevenção de infecções bacterianas (Alberius et al., 1992; Donos et al., 2002). Além disso, estabilidade da membrana, selamento periférico entre o osso e a membrana e adequado suprimento sanguíneo (Lundgren et al., 1995), completam os requisitos para a aplicação desta técnica.

A membrana Bio-Gide (Bio-Gide®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland), é um biomaterial de colágeno, reabsorvível, composta por fibras colágenas tipo I e III,

de origem suína, sem a presença de componentes orgânicos ou químicos. É constituída por duas camadas, uma compacta e outra porosa. A compacta possui superfície lisa que protege a área a ser regenerada contra a infiltração do tecido conjuntivo, enquanto que a camada porosa permite a passagem de células. Embora a membrana colágena não possua proteínas específicas do tecido ósseo, suas fibras servem como um arcabouço para as células osteogênicas e também como proteção contra a invasão do tecido conjuntivo circundante nos defeitos ósseos (Taguchi et al., 2005).

A técnica do enxerto ósseo autógeno (EOA) tem sido considerada “*gold standard*” dentre as técnicas de ganho de tecido ósseo pois envolve a remoção desse tecido do próprio paciente, sendo dessa forma imunologicamente inerte e osteogênica (Jardini et al., 2005, 2013; Khan et al., 2005; Faverani et al., 2014). Apesar disso, quando essa técnica é utilizada isoladamente, Jardim et al. (2005), observaram que parte do tecido ósseo enxertado sofria reabsorção ao longo do tempo, sendo esta a principal desvantagem da técnica. Além disso, Khan et al. (2005) também relataram que a origem embriológica do osso enxertado, arquitetura, dimensão e orientação do enxerto são fatores que podem contribuir com a falha da técnica do enxerto ósseo autógeno.

Com isso, Matsuzaka et al. (2001) e Donos et al. (2002) demonstraram em seus estudos que a técnica da regeneração óssea guiada (quando utiliza-se as membranas para recobrimento do enxerto autógeno) promove um aumento na migração de células osteogênicas para a região do enxerto, na neoformação óssea e na mineralização. Isso ocorre devido a um complexo processo de proliferação celular, migração, diferenciação e revascularização quando há a incorporação do enxerto ósseo (Adeyemo et al., 2008). Sculean et al. (2008) também observaram que a associação entre o uso de membranas e enxertos promoveu um reparo tecidual superior àquele obtido através do uso isolado de cada biomaterial.

Ainda no estudo de 2002, Donos et al. avaliaram também a regeneração de enxertos ósseos autógenos em bloco com e sem recobrimento de membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e). Entre os dias 15 e 180 após a cirurgia, foram observados os processos de reabsorção e remodelação do enxerto, e a área criada pela membrana foi parcialmente ocupada pelo osso neoformado e pelo

enxerto ósseo. Após 180 dias, o enxerto recoberto por membrana estava completamente integrado no osso neoformado, dificultando a identificação da junção entre o enxerto e o osso neoformado. Comparado a esse mesmo período, o grupo em que não houve recobrimento dos enxertos pela membrana, observou-se reabsorção das bordas do enxerto.

No estudo de Jardini et al. (2013) foi avaliada a regeneração óssea com e sem o uso de membranas de PTFE-e associadas e observou-se perda óssea no período de cicatrização do grupo em que a membrana não foi utilizada. Na comparação entre os grupos, a partir do 21º dia no grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo autógeno notou-se uma significativa reabsorção óssea, enquanto que, no grupo enxerto ósseo autógeno e membrana PTFE-e houve regeneração óssea além das bordas do enxerto.

Embora o uso de biomateriais como as membranas colágenas auxiliem a formação e promovam uma melhor qualidade do enxerto, em um estudo relacionando o uso da ROG e fumo, Lindfors et al. (2010) relataram que, em pacientes fumantes ocorre a exposição precoce da membrana quando se realiza a regeneração óssea guiada. Por isso, o fumo deve ser evitado quando tais procedimentos regenerativos forem abordados devido ao grande índice de insucesso entre os pacientes fumantes. Além da exposição da membrana, tem sido relatado o aumento do processo inflamatório nos tecidos peri-implantares que, somados, tornam a regeneração óssea guiada inviável para esses pacientes.

2.3 Tabagismo e Deficiência Estrogênica

O tabagismo é reconhecido como um problema de saúde pública mundial que acarreta, a cada ano, em muitas mortes decorrentes do seu uso. Segundo dados da OMS (2010), é estimado que 10 milhões de mortes ocorrerão em 2020 decorrentes de doenças associadas ao tabaco, sendo que 70 % destes casos serão observados em países desenvolvidos (Warnakulasuriya et al., 2005; César-Neto et al., 2012).

Na Odontologia observa-se que, devido ao consumo de cigarro, dentre várias abordagens de tratamento, os procedimentos que envolvem os implantes osseointegrados tem um índice de insucesso maior quando comparados pacientes fumantes e não fumantes.

Isso ocorre, segundo os inúmeros trabalhos na literatura, devido ao relacionamento do tabagismo às dificuldades de reparação de enxertos ósseos (Jones, Triplett, 1992; Kan et al., 1999), inadequado preenchimento sanguíneo de alvéolos dentário pós extração (Meechan et al., 1988), maior perda óssea ao redor de implantes já osseointegrados (Haas et al., 1996; Lindquist et al., 1996) e menor taxa de sucesso de reabilitação com implantes (Bain, Moy, 1993; De Bruyn, Collaert, 1994).

Com isso, muitos autores concluíram que a inalação da fumaça de cigarro pode influenciar de maneira negativa a reparação do tecido ósseo (Jones, Triplett, 1992; Nociti et al., 2002a, 2002b; César-Neto et al., 2003; Saldanha et al., 2004; Kanis et al., 2005).

Em 1993, Bain e Moy realizaram um estudo que teve como objetivo comparar a taxa de sobrevida de implantes dentários osseointegrados instalados em pacientes fumantes e não fumantes. Após seis anos de acompanhamento dos pacientes, os autores observaram que a taxa de falha em geral foi de 5,92% e nos pacientes não fumantes esse valor foi de 4,76%. No entanto, em pacientes fumantes observou-se 11,28% de falha. Dessa maneira, os autores concluíram que o fumo tem um papel significativo no aumento do potencial de falhas de implantes osseointegrados.

Haas et al., em 1996, realizaram um estudo retrospectivo no qual foram avaliadas as taxas de reabsorção óssea na maxila e mandíbula entre os grupos de pacientes fumantes e não fumantes. Os resultados do estudo revelaram que houve uma maior perda óssea peri-implantar na região de maxila em pacientes fumantes. Os autores concluíram que nos pacientes fumantes a perda óssea periimplantar foi maior, bem como os índices de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem e inflamação gengival quando comparados aos pacientes não fumantes.

Assim como Haas et al. (1996), Vandeweghe e De Bruyn (2011) também concluíram em seu estudo que as perdas de implante foram maiores na maxila, isso

provavelmente ocorreu devido a menor qualidade óssea maxilar, estando assim mais suscetível aos efeitos nocivos do cigarro. Entretanto, os resultados observados no grupo de pacientes fumantes e não-fumantes não foram significantes na região posterior da mandíbula.

Em 1997, Lindquist et al. realizaram um estudo longitudinal de 10 anos no qual avaliaram a associação entre a perda óssea marginal ao redor de implantes osseointegrados e a quantidade de cigarros consumidos. Os resultados possibilitaram os autores concluir que, embora a perda óssea média ao longo de 10 anos fosse baixa, em torno de 1mm, observou-se que essa perda foi mais significativa em pacientes fumantes e estava relacionada à quantidade de cigarros consumidos. Além disso, o tabagismo foi considerado o fator mais importante que afetou a taxa de perda óssea, seguido pela higiene bucal, principalmente em pacientes fumantes. Dessa forma, o tabagismo pode ser incluído como um dos parâmetros para análise de sobrevida de implantes osseointegrados.

Em 1999, no estudo conduzido por Kan et al. foi observado que os implantes instalados nos pacientes não fumantes apresentaram uma taxa de sobrevida maior (82,7%) em relação aos pacientes fumantes (65,3%), quando comparados à taxa de sobrevida geral dos implantes (76%). No entanto, não foi observada a relação entre o sucesso dos implantes e o número de cigarros consumidos. Além disso, os autores também observaram que as substâncias tóxicas presentes na fumaça de cigarro podem reduzir significativamente a produção de células vermelhas do sangue, de macrófagos e fibroblastos. Podem promover o aumento da adesão de plaquetas, aumentando o risco de formação de trombos e vasoconstrição cutânea.

Yilmaz et al. (2010), realizaram um estudo que avaliou a capacidade de cicatrização de defeitos intraósseos através de técnicas regenerativas que combinaram o plasma rico em plaquetas associado ao enxerto xenógeno bovino em pacientes fumantes e não fumantes, portadores de periodontite crônica. Após o tratamento proposto, foram avaliados os parâmetros periodontais: índice de sangramento à sondagem, profundidade de sondagem, nível clínico de inserção, recessão marginal e nível ósseo à sondagem e radiográfico. Os dados obtidos no estudo permitiram os autores concluir que o resultado da aplicação do plasma

rico em plaquetas associado às técnicas regenerativas, em defeitos intra-ósseos, é prejudicado pelo tabagismo.

O tabagismo então pode ser considerado um fator que, dentre muitas de suas ações no organismo, prejudica significativamente o metabolismo do tecido ósseo, que é essencial como parte do processo de osseointegração e sucesso de implantes dentários. Essa importante relação pode ser observada em diversos estudos na literatura.

Em 1997, Ortego-Centeno et al. em um estudo que relacionou a quantidade de cigarros consumidos por dia e a densidade óssea mineral em pacientes do sexo masculino e jovens, observaram com os resultados, que os pacientes que fumavam mais de 2 cigarros por dia apresentaram uma menor densidade óssea nas regiões avaliadas no estudo.

Law e Hackshaw (1997) realizaram um estudo sobre os efeitos negativos componentes do tabaco sobre a densidade óssea mineral. Foram considerados 29 estudos na meta-análise realizada pelos autores, que concluíram que uma em cada oito fraturas de bacia é atribuída ao consumo de cigarro. Os resultados obtidos pelos pesquisadores permitiram concluir que o efeito do fumo na densidade mineral óssea aumenta cumulativamente com a idade, existindo um efeito tóxico direto sobre o osso quando o organismo fica exposto à nicotina. Dessa forma, pode ser evidenciada a influência do cigarro na redução da densidade óssea mineral.

Mais tarde, em 1999, Yuhara et al., realizaram um estudo para avaliar a influência da nicotina sobre o metabolismo ósseo em cultura celular. Os resultados obtidos revelaram que a nicotina promoveu a deposição de cálcio e estimulou a atividade da fosfatase alcalina na cultura de células. Apesar disso, os autores observaram que a diferenciação dos osteoblastos foi afetada pela presença da nicotina. Dessa forma, os autores concluíram que a nicotina pode exercer um efeito crítico sobre o metabolismo ósseo.

Em 2001, Ward e Klesgles também realizaram um estudo de meta-análise, com o objetivo de determinar a magnitude e os mediadores da associação entre o fumo e a densidade óssea mineral. Os pesquisadores concluíram que o fumo tem um efeito dose-dependente na perda óssea, aumentando o risco de fraturas que pode ser parcialmente revertido quando há a cessação do hábito.

Para confirmar os achados em humanos, com estudos em modelos animais, Nociti et al. (2002) e Cesar-Neto et al. (2003), observaram que a fumaça de cigarro pode interferir de maneira negativa sobre o reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio osseointegrados. Além disso, em ambos os trabalhos, os autores concluíram que a nicotina, principal componente presente na fumaça de cigarro, é responsável por parte deste efeito negativo.

Em 2007, Bosco et al. avaliaram qualitativa e quantitativamente a perda óssea em regiões de furca de ratos periodontalmente saudáveis após a administração sistêmica através de injeções subcutâneas diárias de nicotina ou solução salina. Os resultados revelaram que uma significativa perda óssea foi observada no grupo de animais que recebeu a dose diária de nicotina sistêmica. Os pesquisadores concluíram que houve uma associação próxima entre a morbidade periodontal em ratos e a nicotina, sendo o tabagismo um fator de risco para o desenvolvimento da doença periodontal.

Rothem et al. (2009), em estudos sobre a associação entre a densidade óssea mineral e o fumo, observaram que a nicotina é um dos principais componentes do cigarro responsáveis pela inibição da formação óssea provocando uma redução de 4% da densidade mineral óssea em fumantes ativos quando comparados aos não-fumantes. Esses achados estão de acordo com os estudos de Kanis et al. (2010), que mostraram que a redução da densidade óssea mineral aumenta de maneira significativa o risco de fraturas.

Em recentes estudos com modelos animais, pesquisadores observaram que a exposição desses animais à fumaça do cigarro produziu a diminuição do tamanho de osteócitos (Ajiro et al., 2010; Kim et al., 2013), redução da quantidade dos osteoblastos e células da medula óssea (Gao et al., 2011; Kim et al., 2013).

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 do osso pela redução de sua massa.

Segundo Vieira (1999), muitos fatores podem interferir no processo de equilíbrio da remodelação óssea, dentre eles estão o estrogênio, que é o principal

hormônio regulador desse processo e os fatores ambientais, como por exemplo o fumo.

Em relação ao estrogênio, Lee et al. (2002) e Kanis et al. (2005), revelaram em seus estudos que mulheres fumantes entram no processo de menopausa antes das não fumantes e estão sujeitas à infertilidade, mostrando que pode ser um indício de que o fumo aumenta o catabolismo do estrogênio. Outro fator importante observado por Kanis et al. (2005) foi um menor índice de massa corporal nestas mulheres fumantes, além do prejuízo dos efeitos protetores promovidos pelo tecido adiposo e pelo metabolismo do estrógeno periférico.

Dentre os fatores ambientais que atuam sobre o metabolismo ósseo, Giampietro et al., em 2010, observaram que estão: o excesso no consumo de álcool, baixa ingestão de cálcio, insuficiência de vitamina D, baixo índice de massa corporal, hormônio da paratireóide elevado, homocisteína, caucasianos, gênero feminino, histórias prévias de fraturas e, principalmente o fumo, que foi considerado, segundo a Organização Mundial de Saúde e observado nos trabalhos de Wong et al., 2007 e Ajiro et al., 2010, como um fator de risco para fraturas ósseas.

Portanto, quando há um distúrbio sistêmico ou ambiental no equilíbrio do metabolismo ósseo, uma desordem é provocada neste tecido acarretando no comprometimento de sua resistência e alteração de sua microarquitetura que, em conjunto, vão contribuir para uma maior propensão de fraturas ósseas ao mínimo trauma (Giampietro et al., 2010; Gao et al., 2011).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar o efeito da inalação da fumaça de cigarro e/ou deficiência estrogênica sobre a integração de enxertos ósseos autógenos *onlay* na mandíbula de ratas ovariectomizadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A amostra consistiu de 120 ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) com noventa dias de idade, pesando em torno de 250 a 300 gramas, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente, alimentadas com ração GuabiNutrilabor® 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. N0 10/2012-PA/CEP.

4.1 Delineamento experimental

Os animais foram randomizados e alocados em 2 grupos experimentais (Controle – não exposto à fumaça de cigarro e Teste – exposto à fumaça de cigarro), sendo cada um, subdividido em outros dois subgrupos (Figura 1).

Controle:

C+: 30 ratas SHAM (submetidas à simulação da cirurgia de ovariectomia) não expostas à fumaça de cigarro. Esse grupo representou o controle positivo do experimento;

OVZ: 30 ratas ovariectomizadas não expostas à fumaça de cigarro.

Teste:

C+F: 30 ratas SHAM (submetidas à simulação da cirurgia de ovariectomia) expostas à fumaça de cigarro;

OVZ+F: 30 ratas ovariectomizadas e expostas à fumaça de cigarro.

Ao longo do período experimental, cada subgrupo (n=10 animais) foi sacrificado de acordo com os diferentes períodos (21, 45 e 60 dias).

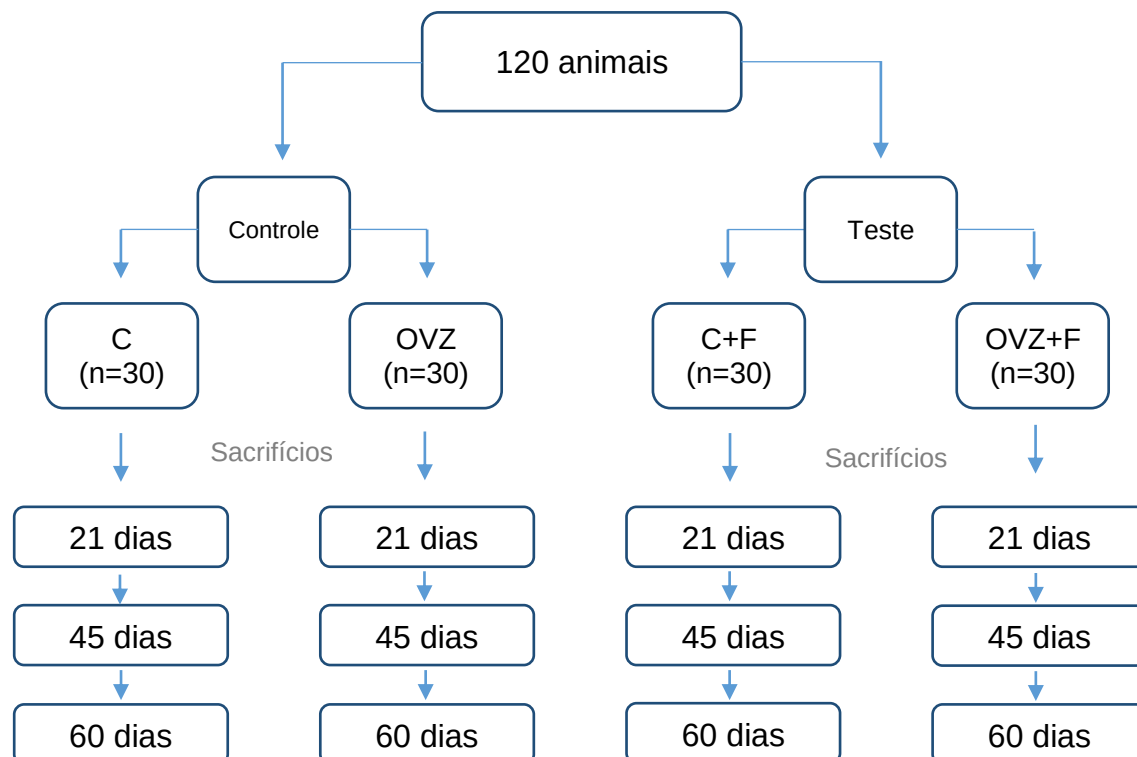


Figura 1 - Flow-chart da organização dos animais nos grupos experimentais.

4.2 Cirurgias de Ovariectomia e Ovariectomia Simulada (SHAM)

Os animais foram anestesiados com 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, associado ao relaxante muscular 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil), anestésico geral, via intramuscular. A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de determinados sinais, como: reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das alterações das frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), que sofrem modificações de acordo com os planos atingidos (profundidade da anestesia).

Previamente ao procedimento cirúrgico os animais foram pesados e os dados obtidos foram anotados. Em seguida, foram posicionados em decúbito lateral para que se tivesse a visualização e fácil acesso ao flanco lateral e realizada a tricotomia da região através de lâminas de barbear (Gillete do Brasil) e, após a anti-sepsia da região logo abaixo da costela com solução de digluconato de clorexidina a 0,2%, 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 tecido muscular incisionado para que a cavidade abdominal fosse acessada. 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, foi realizada a excisão. Em seguida, foram realizadas as suturas bilaterais 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). Foram realizados os procedimentos em ambos os lados do animal (Figura 2).

Os animais do grupo controle (C+) foram submetidos à cirurgia SHAM, na qual foi realizada uma ovariectomia simulada com o tracionamento dos ovários para fora da cavidade abdominal, sem que, no entanto, fossem excisionados. Esse procedimento foi executado para que os animais do grupo controle fossem submetidos às mesmas condições de estresse que os animais do grupo teste.

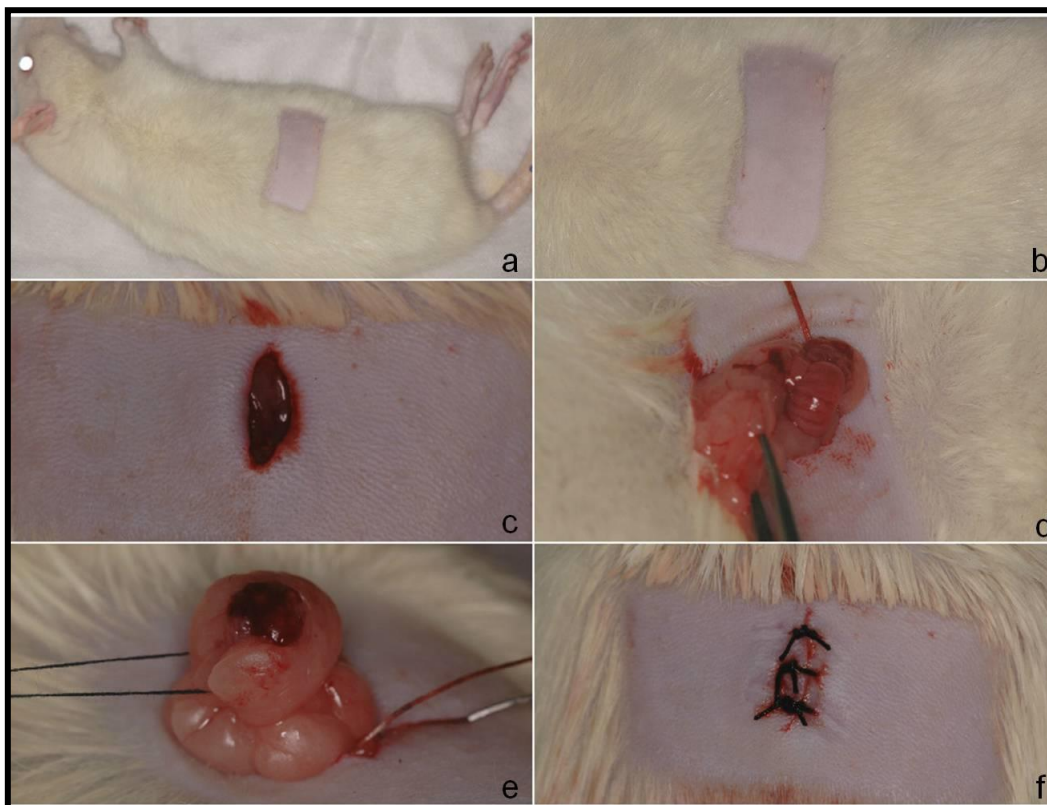


Figura 2 - Ovariectomia. a-b) posição em decúbito lateral, tricotomia e assepsia da região abdominal; c) incisão linear; d) tracionamento e exposição do ovário; e) amarra da vasculatura local para excisão do ovário; f) sutura com fio de seda.

4.3 Exposição à fumaça de cigarro

A exposição dos subgrupos submetidos à inalação da fumaça de cigarro (C+F e OVZ+F) iniciou 15 dias após a primeira cirurgia.

O fluxograma abaixo representa a sequência operacional dos grupos expostos à fumaça de cigarro (Figura 3):



Figura 3 - Fluxograma da sequência operacional dos grupos experimentais 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. (2002). 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).

Resumidamente, este modelo utiliza um recipiente de acrílico (45x 25x 20 cm), onde 5 animais de cada vez, serão 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. O recipiente é composto por 2 câmaras interligadas por um orifício. Na primeira ficam armazenados os cigarros acesos onde há uma entrada através da qual o ar é bombeado, formando, dessa maneira, 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).

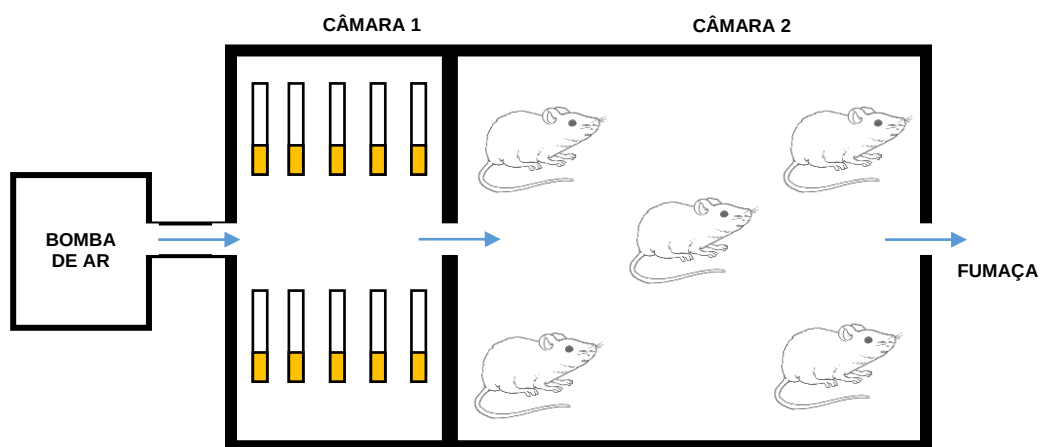


Figura 4 - Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça de cigarro. Uma bomba de ar foi acoplada à câmara 1, que continha os dez cigarros acesos e posicionados, através da qual o ar era deslocado carregando a fumaça para câmara 2, onde cinco animais ficaram expostos à essa fumaça de cigarro durante 8 minutos, 3 vezes ao dia, cinco dias da semana (César-Neto et al., 2003).

4.4 Cirurgia de enxerto autógeno onlay e recobrimento com membrana colágena

Os animais foram anestesiados com 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, associado ao relaxante muscular 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil), anestésico geral, via intramuscular. Após anestesia, as seguintes regiões: temporal, parotídeo-massetérica, parietal e frontal bilaterais foram tricotomizadas utilizando-se lâminas de barbear. A anti-sepsia dessas regiões foi realizada com solução de gluconato de clorexidina 0,2%. O osso parietal foi a área doadora de osso autógeno.

Na mandíbula foi realizada incisão linear na pele, de extensão aproximada de 1,5 cm, paralela ao arco zigomático, que se estendeu do ângulo da boca do lado esquerdo ao ângulo da mandíbula do mesmo lado. Desta maneira pode-se visualizar o músculo masséter, que foi divulsionado, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até atingir-se a face lateral da mandíbula. O

passo seguinte foi o deslocamento das 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 e da membrana colágena de acordo com o grupo experimental (Jardini et al., 2005).

Para obtenção do enxerto ósseo foi realizada incisão linear de aproximadamente 2,0 cm no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal. O 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. O bloco permaneceu armazenado temporariamente em uma cuba contendo soro fisiológico (Figura 5).

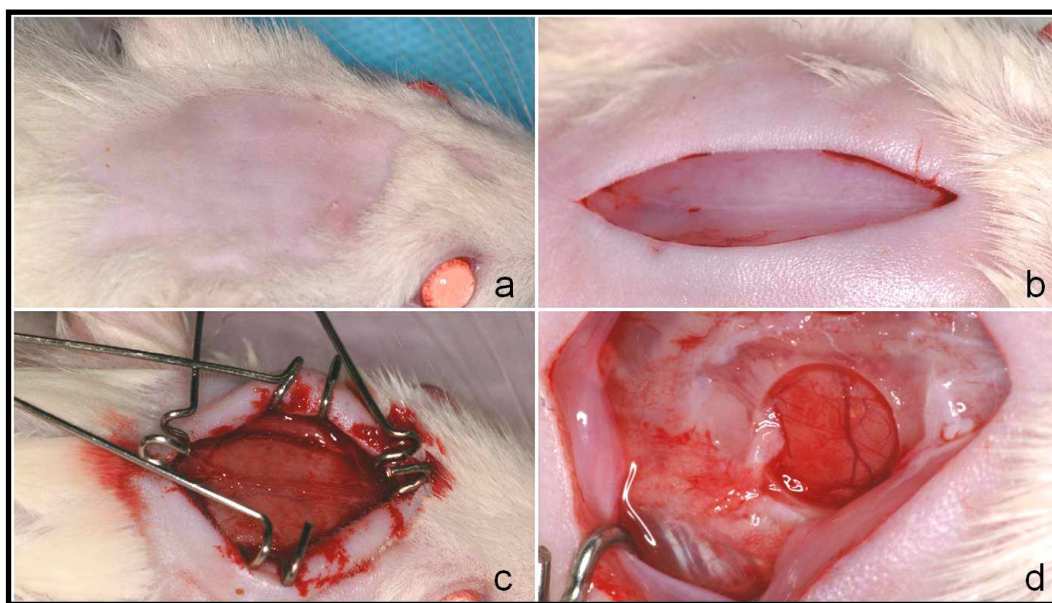


Figura 5 - Área doadora do enxerto: a) tricotomia e assepsia local; b) incisão linear; c) divulsão muscular e exposição do osso parietal; d) remoção do bloco ósseo.

Após o procedimento para a obtenção do enxerto foi realizada na área receptora a perfuração com broca 1,2 mm (Neodent – Brasil) em baixa rotação sob abundante refrigeração, que permitiu a estabilização do bloco ósseo ao leito receptor utilizando-se parafuso de fixação de titânio de 1,5 mm de diâmetro de cabeça. 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento. O conjunto composto por enxerto, membrana e parafuso de fixação foi posicionado na hemi-mandíbula

esquerda e fixado. Estes procedimentos permitiram o posicionamento do enxerto em íntimo contato com a superfície óssea mandibular, estabilizando-o. (Figura 6).

Para que houvesse uma padronização do recorte das membranas de colágeno foi utilizada uma matriz de papel medindo 5 x 5 mm.

Para a remoção do enxerto ósseo, assim como para a realização das perfurações foi utilizado um motor elétrico (Driller BLM 600 Plus) que permitiu o controle da velocidade em 960 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

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).

Em seguida foi realizada a limpeza das regiões operadas com solução de clorexidina 0,2%. Após a cirurgia, os animais receberam dose única de 1 mg/Kg de antibiótico (Pentabiótico Veterinário – Ford Dodge® por via intramuscular.

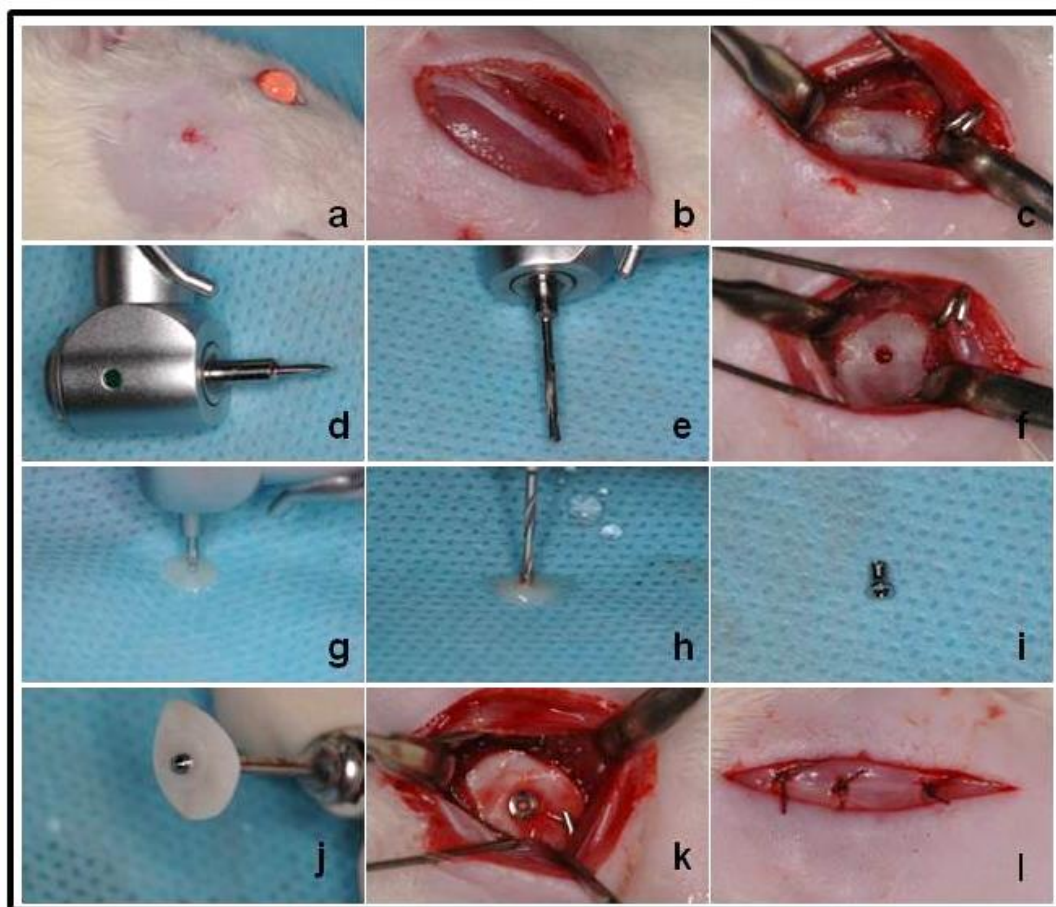


Figura 6 – Área receptora e enxerto: a) tricotomia e assepsia local; b) incisão; c) divulsão muscular; d) broca tipo lança 1,0 mm de diâmetro; e) fresa helicoidal de 1,2 mm de diâmetro; f) região receptora preparada para receber o enxerto; g, h) perfuração do enxerto; i) mini-implante de titânio de 1,5 mm de diâmetro de cabeça, 1,4 mm de diâmetro de corpo e 2,5 mm de comprimento; j) encaixe do mini-implante ao conjunto enxerto e membrana colágena; k) conjunto membrana e enxerto parafusado na área receptora; l) sutura do tecido muscular com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson).

4.5 Sacrifício

No sacrifício, os animais foram anestesiados com 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, associado ao relaxante muscular 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands® do Brasil), anestésico geral, via intramuscular. Em seguida, o peso foi novamente mensurado e anotado, e então realizada a perfusão cardíaca com formalina 4% nos seguintes

períodos: 21, 45 e 60 dias. Para cada período, 10 animais de cada um dos grupos experimentais foram sacrificados.

4.6 Processamento Histológico

As hemi-mandíbulas foram removidas, catalogadas e armazenadas para fixação em solução de formaldeído a 10%, tamponado, durante um período mínimo de 48 horas.

As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA 10%, pH 7,8, que posteriormente, foram seccionadas transversalmente na região central do enxerto ósseo.

Cada fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em bloco de parafina e realizados de cortes seriados com 5 µm de espessura que foram submetidos ao processamento histológico. A coloração utilizada foi Hematoxilina e Eosina (HE – Merck &Co, Inc.) e a análise histomorfométrica realizada em microscopia de luz.

4.7 Análise Histomorfométrica

As lâminas após o processamento histológico foram escaneadas no aparelho de scanner 3DHISTECH. A análise histomorfométrica de cada lâmina foi realizada com utilização do programa computacional NIH Image J 1.48v, de domínio público, a partir da captura das imagens das lâminas que foram escaneadas através do programa computacional Case Viewer 1.4 - 3DHISTECH (Figuras 7, 8, 9 e 10).

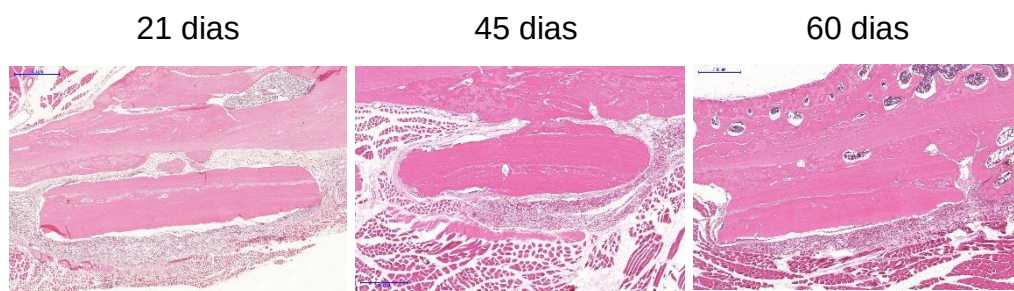


Figura 7 - Imagens escaneadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C nos períodos 21, 45 e 60 dias.

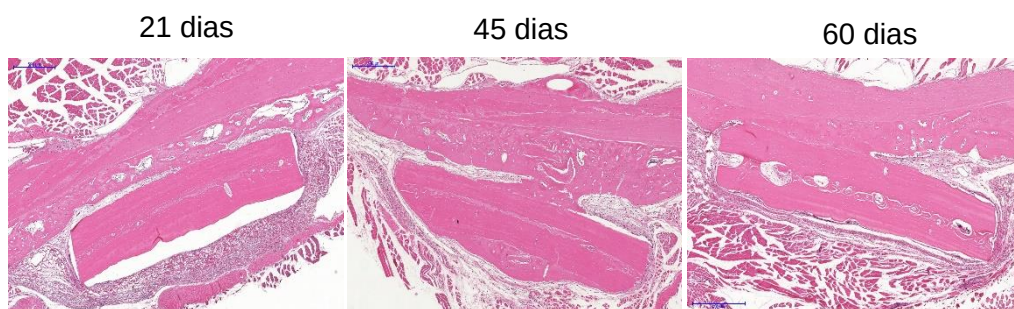


Figura 8 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo C+F nos períodos 21, 45 e 60 dias.

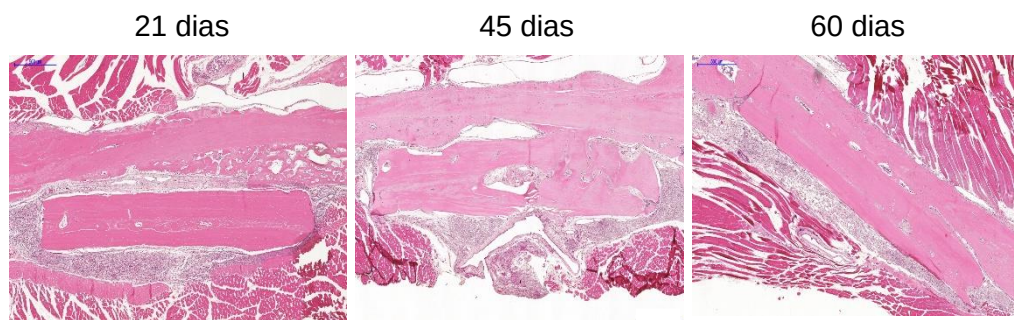


Figura 9 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo OVZ nos períodos 21, 45 e 60 dias.

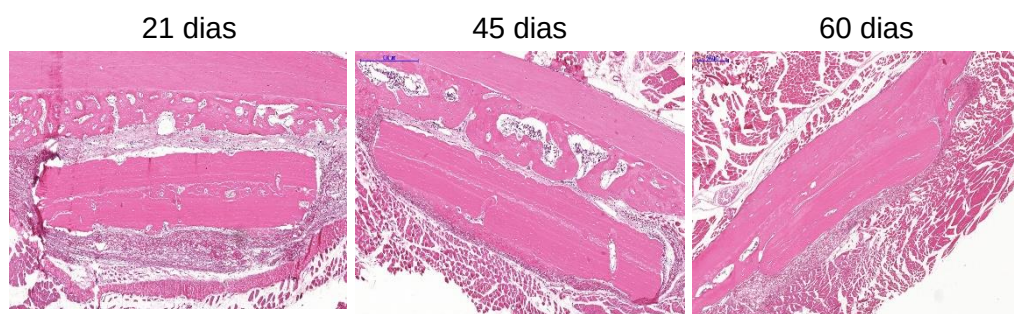


Figura 10 - Imagens capturadas para a análise histomorfométrica do subgrupo OVZ+F nos períodos 21, 45 e 60 dias.

4.8 Calibração, Cegamento e Padronização das medidas histomorfométricas

Para que as medidas seguissem um critério de padronização, a calibração do examinador foi previamente realizada. Para isso, o coordenador da pesquisa fez o cegamento das imagens escaneadas através de códigos. Em seguida, o examinador recebeu essas imagens codificadas e, através do programa computacional Image J, 1.48v, foram realizadas as mensurações em dois diferentes períodos, sendo que o intervalo entre eles foi de 24 horas. Os dados foram tabulados no programa excel e aplicado o teste de correlação de Pearson, resultando em um valor de 0,9434.

No programa Image J, 1.48v, as medidas das imagens foram padronizadas na escala de 500 μm e, a partir dessa calibração inicial, todas as mensurações foram realizadas em pixels/ μm (Figura 11).

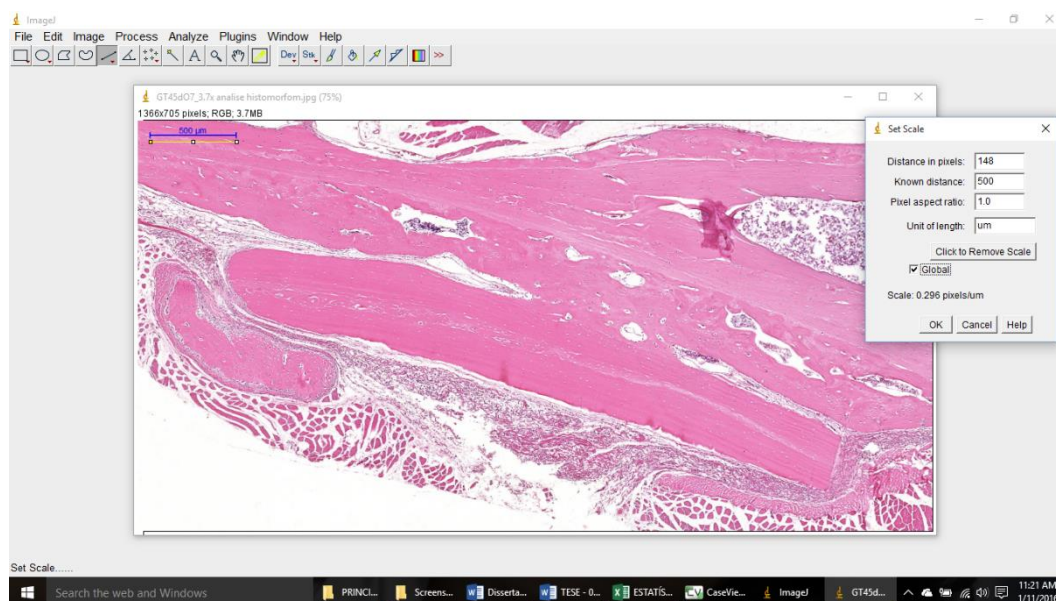


Figura 11 - Padronização das medidas no programa computacional Image J, 1.48v.

4.8.1 Análise histomorfométrica da integração do enxerto ao leito receptor

Para a análise da integração na interface leito - enxerto foram realizadas fotos das lâminas, a partir da ferramenta do programa Case Viewer, em 500 µm e 3.7 x (Figura 12), com vista panorâmica de todo enxerto e, posteriormente, com o programa Image J, 1.48v, realizada a mensuração (Figura 13).

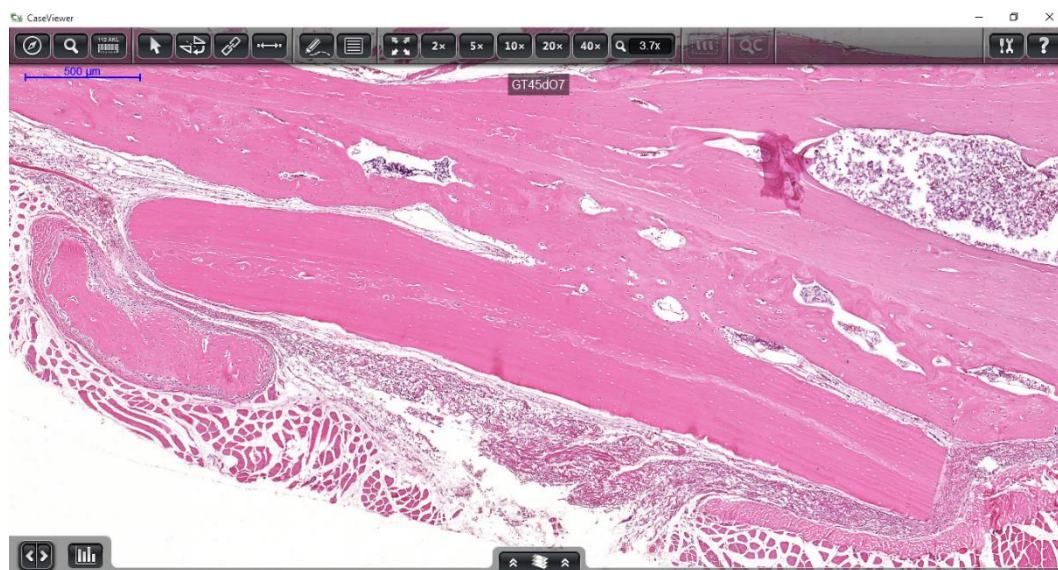


Figura 12 - Imagem da lâmina capturada a partir do programa computacional Case Viewer.

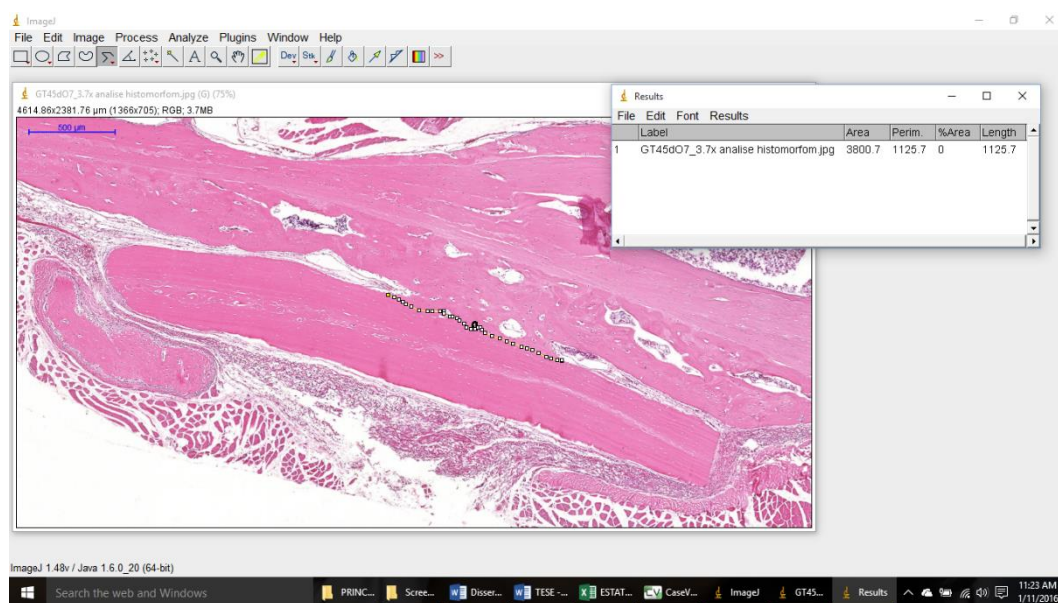


Figura 13 - Análise histomorfométrica da integração leito – enxerto no programa computacional Image J, 1.48v.

4.8.2 Análise histomorfométrica da altura do enxerto

A altura do enxerto foi medida nas imagens dos cortes histológicos, a partir do programa computacional Image J, 1.48v, padronizando uma linha

perpendicular no centro do enxerto desde a superfície até a base. Os resultados foram tabulados e submetidos à análise estatística (Figura 14).

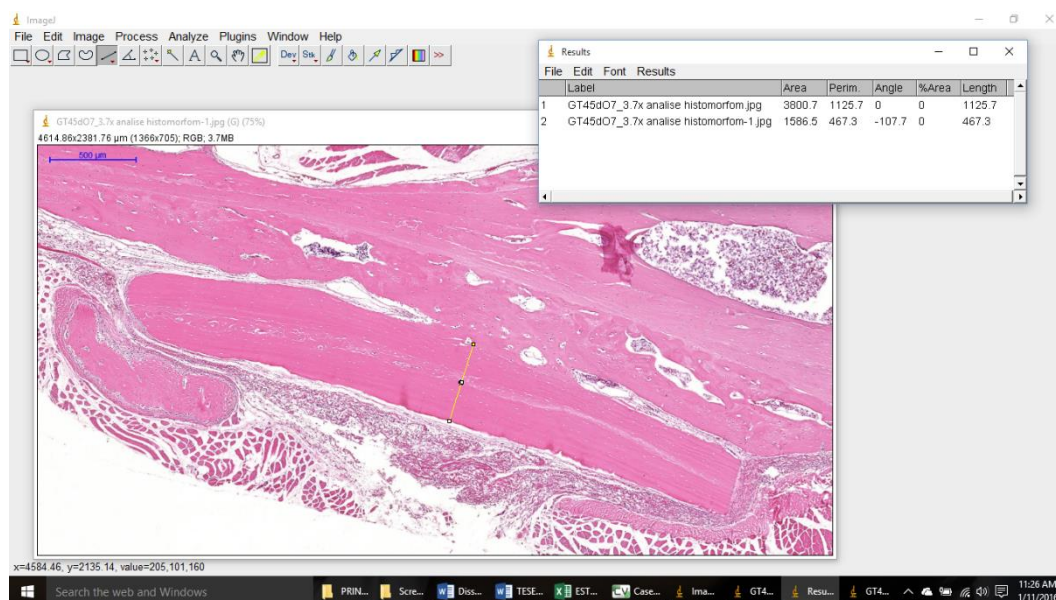


Figura 14 - Análise histomorfométrica da altura do enxerto no programa computacional Image J, 1.48v.

4.8.3 Análise histomorfométrica da largura do enxerto

A largura do enxerto foi medida nas imagens dos cortes histológicos, a partir do programa computacional Image J, 1.48v, padronizando uma linha perpendicular às laterais do enxerto. Os resultados foram tabulados e submetidos à análise estatística (Figura 15).

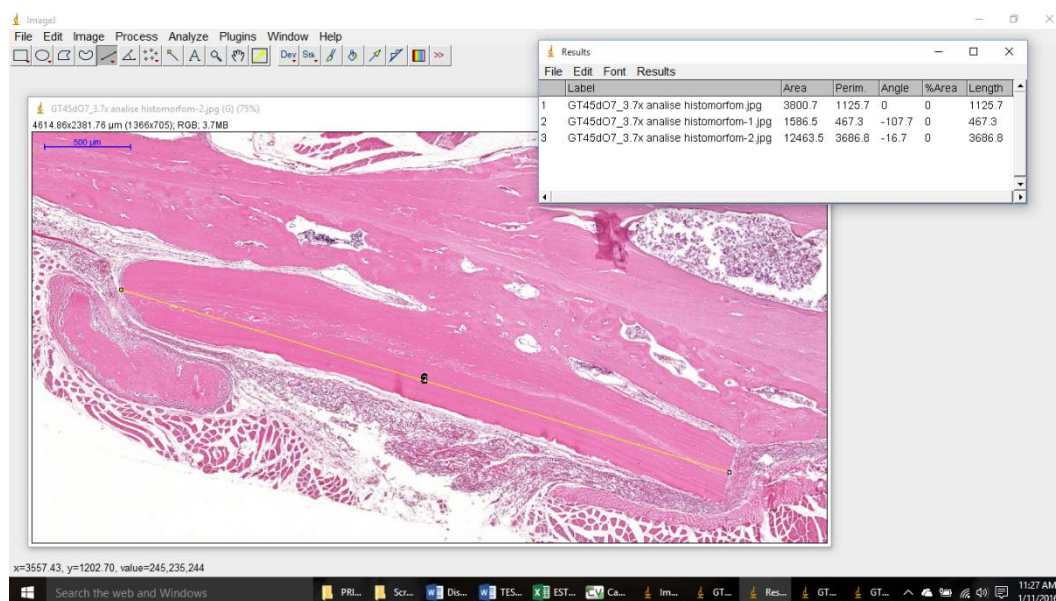


Figura 15 - Análise histomorfométrica da largura do enxerto no programa computacional Image J, 1.48v.

4.9 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística por meio dos programas computacionais: MINITAB (Minitab, version 14.12, 2004) e STATISTICA (StatSoft, version 5.5, 2000).

A estatística descritiva consistiu no cálculo de médias e desvio padrão, enquanto que a estatística inferencial foi realizada através da análise de variância (ANOVA) dois fatores e teste de Shapiro-Wilk, ambos ao nível de significância convencional de 5%. Nas diferenças estatisticamente significantes foi utilizado o método Holm-Sidak para comparações múltiplas pareadas.

O estudo do efeito interação condição x tempo 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 $\pm$ desvio-padrão) obtidos a partir 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 entre leito receptor e enxertos

TEMPO/CONDIÇÃO	21 dias	45 dias	60 dias
C+	537 $\pm$ 557	1049 $\pm$ 1163	695 $\pm$ 859
OVZ	475 $\pm$ 666	639 $\pm$ 844	510 $\pm$ 748
C+F	164 $\pm$ 345	643 $\pm$ 847	503 $\pm$ 684
OVZ+F	209 $\pm$ 352	593 $\pm$ 661	661 $\pm$ 1104

O gráfico abaixo (Figura 16) referente aos valores da Tabela 1 (média $\pm$ desvio-padrão) da integração dos enxertos de acordo com os subgrupos experimentais. Em relação à Condição não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos. No entanto, ao considerar o fator Tempo, houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,005$) entre os períodos de 21 e 45 dias intergrupos e intrasubgrupo C+F ($P=0,034$), mostrando que houve um aumento na integração do enxerto ao leito receptor entre os períodos de 21 e 45 dias.

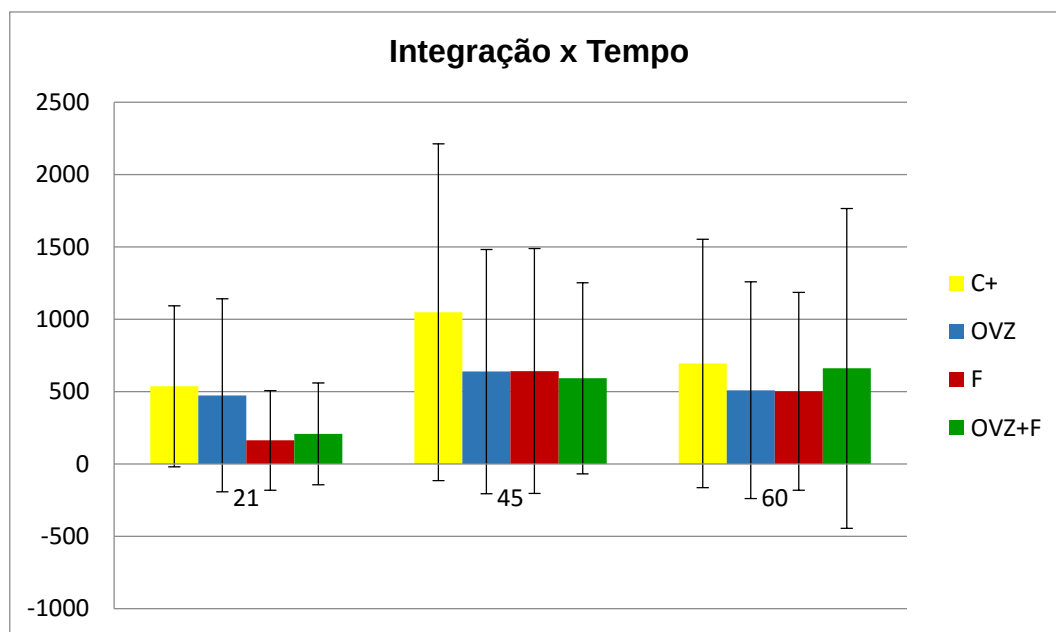


Figura 16 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão na integração do enxerto ao leito receptor.

5.2 Altura do enxerto

Os dados da estatística descritiva (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos a partir da 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+	470 $\pm$ 49	436 $\pm$ 75	464 $\pm$ 86
OVZ	301 $\pm$ 210	272 $\pm$ 208	229 $\pm$ 218
C+F	239 $\pm$ 192	230 $\pm$ 202	197 $\pm$ 208
OVZ+F	211 $\pm$ 224	195 $\pm$ 206	157 $\pm$ 202

O gráfico abaixo (Figura 17) referente aos valores da Tabela 2 (média $\pm$ desvio-padrão) da altura dos enxertos. Em relação à Condição houve diferença estatisticamente significativa intergrupos C x C+F ($P < 0,001$) e entre C x OVZ+F ($P = 0,024$), e intrasubgrupo C x C+F no período de 21 dias ($P = 0,002$). Ao considerar o fator Tempo não houve diferença estatisticamente significativa.

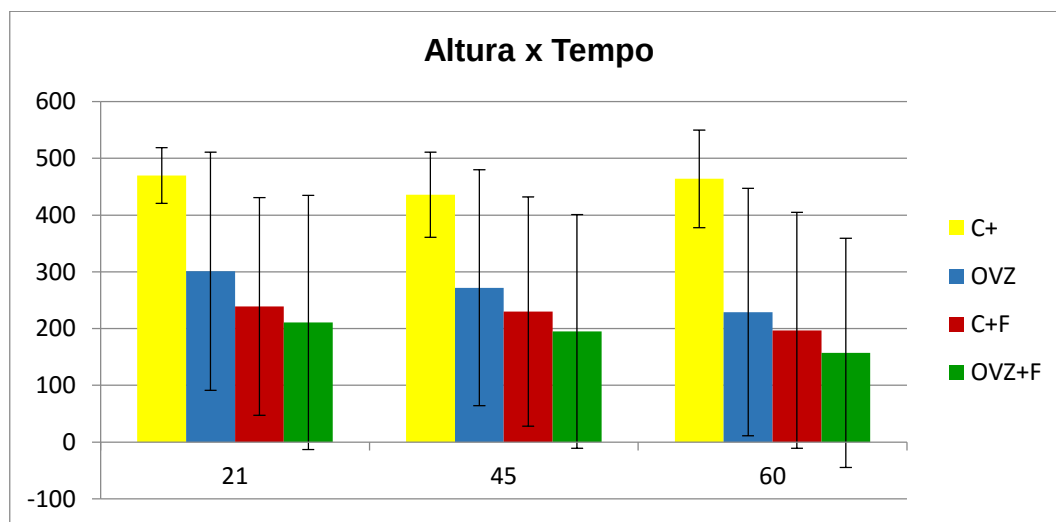


Figura 17 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão da altura do enxerto.

5.3 Largura do enxerto

Os dados da estatística descritiva (média $\pm$ desvio-padrão) obtidos a partir da mensuração 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+	3035±328	3147±595	2749±317
OVZ	2455±1304	2189±1294	2353±1121
C+F	2374±929	2308±892	1974±1393
OVZ+F	2268±1200	2124±1126	1858±1297

O gráfico abaixo (Figura 18) referente aos valores da Tabela 3 (média $\pm$ desvio-padrão) da largura dos enxertos. Ao considerar a Condição houve diferença estatisticamente significativa intergrupos C x C+F ($P=0,046$) e intrasubgrupo C x C+F no período de 45 dias ($P=0,014$). Em relação ao fator Tempo não houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos.

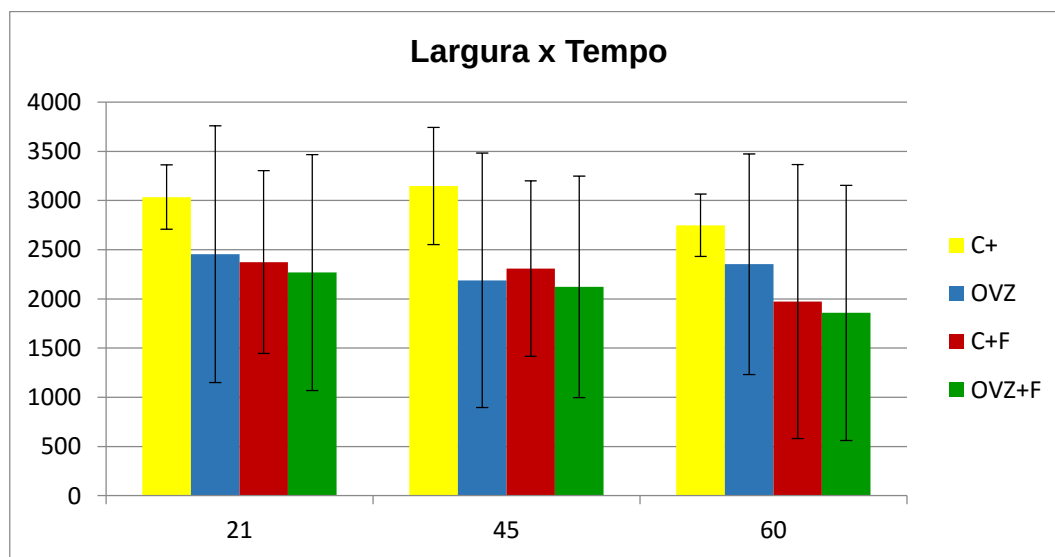


Figura 18 - Gráfico dos valores médios e desvio padrão da largura do enxerto.

6 DISCUSSÃO

Na literatura muitos trabalhos descrevem as condições de tabagismo e deficiência estrogênica sobre o tecido ósseo, porém sem associá-las à regeneração óssea guiada em enxertos ósseos autógenos *onlay*. Por isso, o presente estudo se propôs analisar através da histomorfometria a influência da exposição à fumaça de cigarro associada à deficiência estrogênica sobre o processo de regeneração óssea guiada de enxertos ósseos autógenos *onlay* na mandíbula de ratas ovariectomizadas.

É fato bem estabelecido na literatura que o cigarro e seus mais de 4.000 componentes são prejudiciais à saúde, especialmente ao tecido ósseo (Bosco et al., 2007; Nociti et al., 2015). Bain em 1996, relatou que os principais fatores responsáveis pela falha nos implantes são baixa densidade óssea (rebordo tipo IV) e o fumo que promove a redução do fluxo sanguíneo, aumenta a disfunção de leucócitos polimorfonucleares e a agregação plaquetária.

Ajiro et al. (2010) através de estudo em modelo animal de fumo passivo revelaram o impacto do fumo na estrutura óssea desses ratos para avaliar o mecanismo de associação entre o fumo e a osteoporose. Dentre os possíveis mecanismos através dos quais o cigarro prejudicou a saúde óssea envolviam efeito direto em osteoblastos, mudanças na absorção de cálcio, no metabolismo do estrógeno e também na vascularização óssea, fator importante para o osso esponjoso que é extremamente sensível às mudanças no suprimento sanguíneo. Dessa maneira, com a redução do fluxo sanguíneo há impacto do fumo no metabolismo ósseo.

A deficiência estrogênica também é alvo de muitas pesquisas na área da Odontologia envolvendo sua ação sobre o tecido ósseo (Giampietro et al., 2010; Gao et al., 2011), principalmente na osteoporose. Sabe-se que esta é uma condição sistêmica que altera a homeostase do tecido ósseo e, como consequência, altera sua arquitetura através da diminuição da massa óssea tornando esse tecido frágil e propenso à fratura ao mínimo trauma. A osteoporose pode interferir na conduta e no

plano de tratamento da reabilitação oral com implantes pois além dos ossos longos afeta também os ossos da maxila e mandíbula (Campos et al., 2009).

O modelo animal de ratas ovariectomizadas utilizado neste estudo, simula de maneira satisfatória as características da deficiência de estrógeno observada em mulheres no período pós menopausa, em um curto período de tempo (Carvalho et al., 2006; Luize et al., 2008; Campos et al., 2009; Tera et al., 2014b).

Embora essas condições sejam bem estabelecidas na literatura como fatores de risco para reabilitações protéticas implanto suportadas, os resultados obtidos em relação à integração do enxerto ósseo ao leito receptor e o parâmetro Condição não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos ($P=0,776$). Entretanto, ao considerar o fator Tempo, houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,006$), que pode ser observada intra subgrupo C+F comparando os períodos de 45 dias x 21 dias ($P=0,034$). Os dados revelam que apesar dos animais terem sido expostos à fumaça de cigarro houve um aumento significativo na integração do enxerto entre os períodos. A condição do fumo não impediu o processo de integração do enxerto ao leito receptor. Além disso, os animais dos subgrupos Ovz e Ovz+F também apresentaram integração do enxerto ao leito receptor, embora os dados não tenham sido estatisticamente significantes, a ovariectomia associada ou não à inalação da fumaça de cigarro não impediu o processo de integração.

Em relação à altura do enxerto ósseo, o parâmetro Tempo não mostrou diferenças estatisticamente significantes. No entanto, ao avaliar o parâmetro Condição observou-se diferença estatisticamente significativa ($P<0,001$) detectada inter subgrupos C+ x C+F ($P<0,001$) e intersubgrupos C+ x Ovz+F ($P=0,024$), sendo que, no período de 21 dias houve diferença significativa inter subgrupos C+ x C+F ($P=0,002$). Nesta análise, observou-se que a condição do fumo promoveu uma redução significativa da altura do enxerto ósseo em comparação ao grupo controle (C+). A inalação da fumaça de cigarro prejudicou a manutenção da altura do enxerto.

Em relação à largura do enxerto ósseo o parâmetro Tempo não mostrou diferenças estatisticamente significantes ($P=0,155$). Porém, ao considerar o fator Condição, houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,030$) detectada inter

subgrupos C x C+F ($P=0,046$), sendo que, no período de 45 dias houve diferença significativa inter subgrupos C x C+F ($P=0,014$). Além disso, os animais dos subgrupos e Ovz+F também apresentaram redução da largura do enxerto, embora os dados não tenham sido estatisticamente significantes, a ovariectomia (Ovz) apresentou redução menor da largura do bloco do enxerto em relação à ovariectomia associada ao fumo (Ovz+F).

Os resultados obtidos neste estudo também estão de acordo com o trabalho de Carvalho et al (2006) que, ao avaliarem a influência da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio em ratas ovariectomizadas, concluíram que a fumaça de cigarro associada à deficiência estrogênica prejudicou o processo do reparo ósseo ao redor dos implantes pela redução da densidade óssea e do contato entre osso e implante nestes animais. No entanto, a associação dessas condições não impediu que ocorresse a integração do tecido ósseo aos implantes. Ainda segundo Carvalho et al. (2006), os mecanismos pelos quais o cigarro e a deficiência estrogênica atuam no tecido ósseo ocorrem através da inibição tanto da proliferação de células osteoprogenitoras e sua diferenciação em osteoblastos, quanto da concentração de fibronectina e fator de crescimento derivado de plaquetas que são quimioatrativos para células osteoprogenitoras e osteoblastos.

Os resultados do trabalho de Machado et al. (2010) sobre a regeneração óssea de alvéolos pós extração submetidos ao cigarro e à deficiência estrogênica revelaram que essa associação induziu mudanças no trabeculado ósseo, tecido conjuntivo neoformado e no coágulo remanescente nos estágios iniciais da cicatrização (7 e 14 dias), promovendo atraso no processo regenerativo. No presente estudo, considerando a análise histomorfométrica da integração do enxerto observa-se que os grupos teste (C+F e Ovz+F) apresentaram os menores valores em relação aos grupos controle (C+ e Ovz) no período de 21 dias.

No trabalho de Luize et al. (2008), ao avaliarem a influência da deficiência estrogênica sobre a integração do enxerto ósseo autógeno concluíram que houve um atraso no processo de reparo no grupo ovariectomizado em relação ao grupo controle, no entanto, isso não impediu sua ocorrência. De maneira semelhante, o estudo de Nascimento et al. (2009), ao avaliarem a regeneração óssea de enxertos autógenos associados ou não às membranas de PTFE-e em animais

ovariectomizados, observaram que essa condição não interferiu no processo de integração nos grupos experimentais, como observado nos resultados desse estudo tanto na ROG e grupos controle ($C+ = 537 \mu\text{m}$ e $Ovz = 475 \mu\text{m}$) quanto em ROG e grupos teste ($C+F = 164 \mu\text{m}$ e $Ovz+F = 209 \mu\text{m}$) no período de 21 dias.

Uma possível justificativa para os achados neste estudo pode ser encontrada no trabalho conduzido por Tera et al. (2014a) que avaliaram o processo de reabsorção durante o reparo de enxertos autógenos recobertos ou não por membrana (PTFE-e) e através da técnica de imunoistoquímica revelaram que a expressão de marcadores de formação óssea não foi alterada pela deficiência de estrógeno nas ratas ovariectomizadas em ambos os grupos. Porém, na presença da membrana essa expressão foi aumentada, independentemente da condição sistêmica. Ao comparar os valores das variáveis integração do enxerto ósseo nos períodos 21, 45 e 60 dias observa-se que, embora sejam menores em relação ao grupo controle C+, os resultados obtidos no grupo Ovz mostrou que houve a formação de tecido ósseo, porém em quantidade menor.

Esses resultados também foram observados nos estudos de Jardini et al. (2005) e Nascimento et al. (2009), nos quais o uso de uma barreira cobrindo o enxerto ósseo promoveu uma menor taxa de reabsorção óssea, mesmo em animais ovariectomizados. Além disso, Donos et al., 2002 e Retzepi et al., 2010, também encontraram maior formação, maturação e menor reabsorção óssea nos enxertos ósseos recobertos por membrana em comparação àqueles sem membrana.

As possíveis justificativas observadas no trabalho de Tera et al. (2014b) que corroboram com os achados neste estudo consideram que a presença da deficiência estrogênica não alterou a expressão de marcadores de reabsorção óssea, porém essa expressão foi reduzida na presença da mesma condição sistêmica associada à membrana de PTFE-e. Apesar de ter sido utilizada neste estudo a membrana reabsorvível BioGide®, o uso de uma barreira promoveu um ambiente favorável para a formação óssea, reduzindo a taxa de reabsorção deste tecido mesmo na presença de importantes condições sistêmicas, como pode ser observado em outros estudos (Dahlin et al., 1988; Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Retzepi et al., 2010).

Com isso, mais estudos nesta linha de pesquisa são necessários para que sejam bem esclarecidos os mecanismos pelos quais a inalação da fumaça de

cigarro e a deficiência estrogênica atuam sobre o reparo na regeneração óssea guiada em animais com deficiência estrogênica.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que o reparo da regeneração óssea guiada de enxertos ósseos autógenos onlay em modelo animal de inalação da fumaça de cigarro associado à ovariectomia, não foi impedido de ocorrer.

8 REFERÊNCIAS*

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fisher JH, Zöller JE. 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 Jul;37(7):651-59. 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 Feb;33(2):90-5. doi:10.3928/01477447-20100104-14.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Aug;50(8):829-34.

Antoun H, Sitbon JM, Martinez H, Missika P. A prospective randomized study comparing two techniques of bone augmentation: onlay graft alone or associated with a membrane. *Clin Oral Impl Res.* 2001 Dec;12(6):632-9.

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.

Bain CA. Smoking and implant failure--benefits of a smoking cessation protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996 Nov-Dec;11(6):756-9.

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.

Campos MLG, Corrêa MG, Velasco FG, Sallum EA, Nociti Júnior FH, Casati MZ, et al. A deficiência de estrogênio e a osteoporose como paradigmas atuais em periodontia. *Periodontia.* 2009;19(3):64-72.

Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti Júnior FH, Casati MZ, Sallum EA. 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.

Cawood JI, Howell RA. A classification of the edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1988 Aug;17(3):232-6.

*Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2015 out; citado em 28 out.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

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 Júnior FH. 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.

César-Neto JB, Rosa EF, Pannuti CM, Romito GA. Smoking and periodontal tissues: a review. *Braz Oral Res.* 2012;26 Suppl 1:25-31.

Correa MG, Campos MLG, 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):588-593. doi:10.1111/j.1600-0501.2008.01695.x

Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988 May;81(5):672-6.

De Bruyn H, Collaert B. The effect of smoking on early implant failure. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec;5(4):260-264.

Donos N, Dereka X, Mardas N. Experimental models for guided bone regeneration in healthy and medically compromised conditions. *Periodontol* 2000. 2015 Jun;68(1):99-121. doi: 10.1111/prd.12077.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. An experimental study in the rat. *Clin Oral Impl Res.* 2002 Apr;13(12):185–91.

Elgali I, Turri A, Xia W, Norlindh B, Johansson A, Dahlin C, et al. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. *Acta Biomater.* 2016 Jan 1;29:409-23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.005>.

Fardin AC, Jardim ECG, Pereira FG, Guskuma MH, Aranega AM, Garcia Júnior IR. Enxerto ósseo em Odontologia: revisão de literatura. *Innov Implant J Biomater Esthet.* 2010 Sep-Dec;5(3):48-52.

Faverani LP; Ferreira GR; Dos Santos PH; Rocha EP; Garcia IRJ; Pastori CM, et al. Técnicas cirúrgicas para a enxertia óssea dos maxilares – revisão da literatura. *Rev Col Bras Cir.* 2014;41(1):61-7.

Gao S, Li K, Xu M, Jiang W, Shen H, Lou W, et al. Bone turnover in passive smoking female rat: relationships to change in bone mineral density. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2011;12:131. doi: 10.1186/1471-2474-12-131.

Giampietro PF, McCarty C, Mukesh B, McKiernan F, Shuldiner A, Liu J, 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):467-477. doi: 10.1007/s00198-009-0981-3.

Giorgetti APO, César-Neto JB, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. 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):447-452. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.02.029>.

Giorgetti APO, César-Neto JB, Ruiz KGS, Casati MZ, Sallum EA, Nociti Jr FH. Cigarette smoke inhalation influences bone healing of post-extraction tooth socket: A histometric study in rats. *Braz Dent J*. 2012;23(3):228-234.

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, Haimbock W, Mailath G, Watzek G. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent*. 1996 Dec;76(6):592-596.

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

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.

Jardim ECG, Santos PL, Santiago Junior JF, Jardim Júnior EG, Aranega AM, Garcia Júnior IR. Enxerto ósseo em odontologia. *Rev Odontol Araçatuba*. 2009 Jul-Dez;30(2):24-8.

Jardini MAN, 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.

Jardini M N, De Marco AC, Melo Filho AB, Nascimento RD, Kerbauy WD, Santamaria MP. Analysis of the volume of autogenous cancellous bone grafts with or without the use of PTFE-e membranes in ovariectomized rats. *Braz Dent Sci*. 2013 Jul-Sep;16(3):35-46. <http://dx.doi.org/10.14295/bds.2013.v16i3.880>.

Javed F, Al-Rasheed A, Almas K, Romanos GGE, 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.

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.

Khan SN, Cammisa FP Jr, 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 YK, Lee JY, Kim SG, Lim SC. Guided bone regeneration using demineralized allogenic bone matrix with calcium sulfate: cases 66 series. *J Adv Prosthodont*. 2013 May;5(2):167-171. <http://dx.doi.org/10.4047/jap.2013.5.2.167>.

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 LL, Lee JSC, Waldman SD, Casper RF, Grynpas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone*. 2002 Jun; 30(6):917-923.

Lindfors LT, Tervonen EAT, Sándor GKB, Ylikontiola LP. Guided bone regeneration using a titanium-reinforced ePTFE membrane and particulate autogenous bone: The effect of smoking and membrane exposure. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Jun; 109(6):825-830. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.12.035.

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):1667-1674.

Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, 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.

Lundgren D, Laurell L, Gottlow J, Rylander H, Mathisen T, Nyman S, et al. The influence of the design of two different bioresorbable barriers on the results of guided tissue regeneration therapy. An intra-individual comparative study in the monkey. *J Periodontol*. 1995 Jul;66(7):605-12.

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. doi:10.1016/j.joms.2010.04.018.

Martins V, Bonilha T, Falcón-Antenucci RM, Verri ACG, Verri FR. Osseointegração: análise de fatores clínicos de sucesso e insucesso. *Rev Odont Araçatuba*. 2011;32(1):26-31.

Mathias MVR, Bassanta AD, Ramalho SA, Saba-Chujfi E, Simone JL. Enxertos autógenos com sítios doadores na cavidade oral. *RGO*. 2003 Out;51(4):249-56.

Matsuzaka K, Shimono M, Inoue T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: observations by immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2001 Nov;42(4):225-34.

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.

Nascimento RD, Cardoso PE, De Marco AC, de Lima LA, Jardini MAN. 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, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002a;73(9):982-7.

Nociti FH Jr, Cesar Neto JB, 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*. 2002b May-Jun;17(3):347-52.

Nóia CF, Netto HDMC, Lopes RO, Rodríguez-Chessa J, Mazzonetto R. Uso de enxerto ósseo autógeno nas reconstruções da cavidade bucal. Análise retrospectiva de 07 anos. *Rev Port Estomatol, Cir Maxilofac*. 2009. 50(4):221-5.

Organização Mundial da Saúde [Internet]. Genebra: OMS; 2010 [acesso em 18 out 2010]. Disponível em: <http://www.who.int/fctc/press.pdf>.

Ortego-Centeno N, Munoz-Torres M, Jodar E, Hernandez-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;60(6):496-500.

Retzepi M, Donos N. Guided bone regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Jun;21(6):567-76. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01922.x.

Rothem DE, Rothem LL, Soundry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cell. *J Bone Miner Metab*. 2009;27(5):555-561. doi: 10.1007/s00774-009-0075-5.

Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum EA, Barbieri D, Moreno HJ, et al. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol*. 2004 Apr;75(4):565-71.

Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):106-16. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01263.x.

Strietzel FP, Reichard 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 Jan;34(6):523-544.

Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, et al. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005 Nov;26(31):6158-66.

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

Tera Tde M, Prado RF, De Marco AC, Santamaria MP, Jardini MAN. The RANK/RANKL/OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. *Braz Oral Res*. 2014b;28(1):1-9. pii: S1806-83242014000100261.

Vandeweghe S, De Bruyn H. The effect of smoking on early bone remodeling on surface modified Southern Implants®. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2011 Sep;13(3):206-14. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00198.x.

Vieira JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999 Dez;43(6):415-22. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-273019990006 00005>.

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.

Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependance. *Oral Oncol*. 2005 Mar;41(3):244-260.

Wong PKK, Christie JJ, Wark JD. The effects of smoking on bone health. *Clin Sci Lond*. 2007 Sep;113(5):233-241.

Yamano S, Berley J A, Kuo WP, Gallucci GO, Weber HP, Sukotjo C. Effects of nicotine on gene expression and osseointegration in rats. *Clin Oral Impl*. 2010 Dec;21(12):1353-9. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01955.x.

Yilmaz S, Cakar G, Ipci SD, Kuru B, Yildirim B. Regenerative treatment with platelet-rich plasma combined with a bovine-derived xenograft in smokers and non-smokers:12-months clinical and radiographic results. *J Clin Periodontol*. 2010 Jan;37(1): 80-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2009.01509.x.

Yuhara S, Kasagi S, Inoue A, Otsuka E, Hirose S, Hagiwara H. Effects of nicotine on cultured cells suggests that it can influence the formation and resorption of bone. *Eur J Pharmacol*. 1999 Nov3; 383(3):387-93.

ANEXO A - 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 Dumas
CEP: 12201-970 - F: (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / yasmin@focj.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