

Ana Cristina Murakawa

*Imunomarcacão da PECAM-1 e da osteocalcina no
processo de reparo de enxerto ósseo autógeno em
bloco em ratas ovariectomizadas jovens e senis.*

Estudo histométrico e imunoistoquímico

Ana Cristina Murakawa

**IMUNOMARCAÇÃO DA PECAM-1 E DA OSTEOCALCINA NO
PROCESSO DE REPARO DE ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM
BLOCO EM RATAS OVARIETOMIZADAS JOVENS E SENIS**

Estudo histométrico e imunoistoquímico

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do grau de “Mestre em Odontologia” – Área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco
Co-orientadora: Prof. Dra. Roberta Okamoto

Araçatuba
2009

Dados Curriculares

Ana Cristina Murakawa

Nascimento: 26/02/1983 – Birigui-SP

Filiação: Hissao Murakawa
Mariza Hideko Aoki Murakawa

2001-2004 Curso de graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

2006-2007 Curso de Aperfeiçoamento em Implantodontia
APCD – Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas
Araçatuba-SP

2007-2008 Curso de Pós-Graduação em Odontologia
(Área de concentração em Periodontia), nível de mestrado,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

2008-2009 Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia Avançada para
Implantodontia
IEO – Instituto de Especialidades Odontológicas
Bauru-SP



Dedicatória

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Hissao e Mariza,

Esse trabalho não teria a mesma importância se não fosse para dedicá-lo a vocês! Sou muito grata por ter pais tão maravilhosos! Pelas pessoas que são, por tudo o que me ensinaram durante toda minha vida. Por enfatizarem a importância de estudar e buscar os objetivos, sempre com honestidade e integridade. Vocês são grandes exemplos pra mim!

Pai, busco seguir sempre seus conselhos porque sei que são embasados em uma vida de luta, trabalho e muitas conquistas. Obrigada por pensar em meus planos e sonhos antes de pensar nos seus!

Mãe, obrigada por toda a atenção e carinho que dedica a mim, por todo o cuidado e amor. Você é muito importante na minha vida!

Obrigada por acreditarem em mim e fazerem possível a realização desse sonho!

Amo vocês demais!

“Com o tempo, você aprende que...

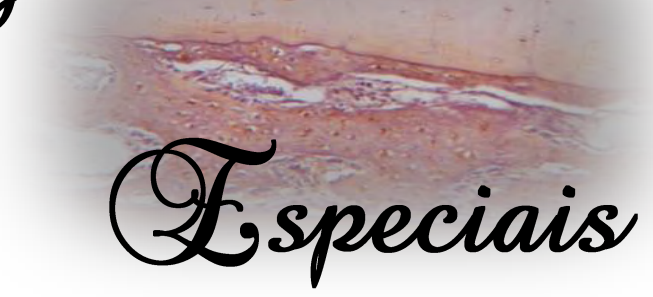
Há mais dos seus pais em você do que você supunha...”

William Shakespeare

Ao meu irmão, Ricardo,

Tivemos a mesma educação, compartilhamos infância, juventude e maturidade... Em cada fase dessas, lembranças de companheirismo e irmandade entre nós. Sempre acompanhando um ao outro, apoiando e mostrando exemplos de superação, que há em quem se confiar. Torço muito pela sua felicidade e sucesso em todas as escolhas que ainda for tomar, lembrando que sempre terá uma irmã que te admira muito e continuará acompanhando seus passos por toda a vida.

Agradecimentos Especiais



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Deus

Quantas vezes me perguntei o porquê de certas coisas não terem acontecido no momento que eu desejava, mas agora entendo Tuas respostas. Entendo que foi para acalmar-me, proteger-me, guiar-me ao caminho certo... Hoje, tenho muito a agradecer... E assim sigo, confiando na Tua palavra.

Agradeço por iluminar meus caminhos em todos os momentos. Nos momentos de dificuldades e de conquistas, de medos e de alegrias, sempre senti Tua presença a abençoar-me.

Muito obrigada, Senhor!

Ao Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco

Grande Mestre, grande Orientador! É impossível lembrar-se do senhor sem destacar sua extrema competência e simplicidade! Aprender Periodontia e Pesquisa com sua orientação é especial... é muito bom saber e vivenciar o ser humano que és, além do grande profissional, professor e clínico . Esses anos de pós-graduação trouxeram-me valores além da odontologia! Tornei-me além de orientada, uma fã e admiradora do seu amor pelo que faz.

Agradeço muito por tê-lo como orientador. Serei eternamente grata pelos ensinamentos e oportunidade de convívio!

"O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente"

Texto Zen-Budista

À Prof. Dra. Roberta Okamoto

Pela paciência e atenção dispensada, por me aceitar como co-orientada. Por ser essa pessoa maravilhosa, meiga, um misto de simpatia e competência. Sua dedicação é incrível. Torço muito pela sua felicidade e sucesso! Muito obrigada pelos ensinamentos e amizade!

Ao Prof. Dr. Valdir Gouveia Garcia

São poucos os professores que conseguem deixar transparecer o coração que possuem. O Sr. é um desses poucos professores! Mestre, grande incentivador, grande pesquisador, continue sempre com as palavras certas em todos os momentos, motivando seus alunos e sendo um grande exemplo a ser seguido! Muito obrigada pelos valiosos conselhos e ensinamentos!

À Prof. Dra. Maria José Hitomi Nagata

Pelos ensinamentos desde a graduação, pela sua dedicação à Pós-graduação e à Disciplina de Periodontia, sempre visando a melhoria do curso e o melhor para nós, alunos. Obrigada pelo convívio e valiosos ensinamentos!

“O mestre que caminha à sombra do tempo, rodeado de discípulos, não dá sua sabedoria, mas sim sua fé e sua ternura. Se ele for verdadeiramente sábio, não te convidará a entrar na imensidão de seu saber, mas antes te conduzirá ao limiar de tua própria mente.”

Gibran Khalil Gibran

Ao Dirley Fujioka de Campos,

Pelo amor e apoio incondicional. Foram muitos os momentos de ausência física e saudades, mas apesar da distância, sempre tive você comigo, e sempre estive com você também, espiritualmente. Obrigada pelo carinho e por fazer de cada reencontro, uma nova conquista e de cada partida, a certeza de que não iríamos nos afastar.

Você é uma raridade...

Obrigada por estar em minha vida!

À Danielle Shima Luize e Samara Bonfante,

Na vida, deparamos com pessoas que se fizeram especiais, pela capacidade de conviver, criando laços de afeto e amizade. A Pós-graduação deu-me oportunidade de conviver e trabalhar com vocês, a amizade e o dia-a-dia deu-me oportunidade de conhecê-las de verdade e aprender com a paixão comum pela Periodontia. Amigas das quais sinto saudades, deixo meu agradecimento pela dedicação dessas que dividiram comigo rotina, trabalho, angústias, frustrações e alegrias. Muito obrigada!

Aos amigos da Pós-Graduação em Periodontia:

Juliano Milanezi de Almeida,

Thiago Marchi Martins,

Leandro Araújo Fernandes,

Ricardo Oliveira de Moraes e

Erivan Clementino Gualberto Jr.

Pelas inúmeras vezes que pude contar com vocês, tanto nas cirurgias experimentais como no processamento laboratorial e atendimento de pacientes. Apreendi muito e torço pelo sucesso de cada um.

Muito obrigada!

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, nas pessoas dos ex-diretores *Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin* e vice-diretor *Prof. Dr. Célia Percinoto*, e atuais diretor *Prof. Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé* e vice-diretora *Prof. Dra. Ana Maria Pires Soubhia* por proporcionar a realização deste trabalho e pelos anos de graduação e pós-graduação.

Ao meu avô e padrinho *Naogi Murakawa*, à minha avó *Marta Kazuy Aoki*, aos meus tios e tias, primos e primas pelo incentivo e torcida constantes.

Ao *Prof. Dr. Tetuo Okamoto*, pela grande ajuda nas análises histológicas dos trabalhos, pelo seu carinho, atenção e disponibilidade.

Ao *Prof. Dr. Roberto Holland* e *Dra. Sueli Satomi Murata*, por todo o carinho e incentivo.

Aos colegas de pós-graduação em Periodontia, *Danielle Shima Luize*, *Erivan Clementino Gualberto Júnior*, *Juliano Milanezi de Almeida*, *Leandro Araújo Fernandes*, *Luciana Gasparini*, *Luiz Augusto Esper*, *Michel Reis Messoria*, *Michyele Cristhiane Sbrana*, *Natália de Campos*, *Natália Marcumini Pola*, *Ricardo Oliveira de Moraes*, *Samara Bonfante*, *Thiago Marchi Martins* e *Valmir Campos Macarini*, pela convivência e amizade.

Aos estagiários da disciplina de Periodontia, *Luana Rodrigues Carmona*, *Paula Lazilha Faleiros*, *Murillo Rezende Santos*, *Karen Vaz Ayub*, pela ajuda constante na execução das pesquisas, pelo carinho e confiança.

Aos estagiários da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, *Thalyta Ribeiro Neves da Cruz (Talytinha)*, *Alexandre Freire*, *Pâmela Letícia de Souza* e *Paula Eruolino da Silva*, pela ajuda nas reações de imunoistoquímica.

Aos colegas de pós-graduação em Odontologia, em especial ao *Abrahão Cavalcante*, *Eloá Rodrigues Luvizutto*, *Fátima Regina Nunes*, *Heloísa Fonseca Marão*, *Bruno Machado*, *Juliana Aparecida Delben*, *Rafael Akira Murayama*, *Elizane Ferreira Hamanaka*, pelo companheirismo, troca de conhecimentos, respeito e amizade. Torço pelo sucesso de cada um de vocês!

As amigas *Ana Laura Polizel Ranieri*, *Ana Lúcia Lima Martins*, *Vanessa Rahal* e *Yeda Regina Ramos* pelo estímulo e amizade. Torço muito por vocês!

Aos amigos de profissão, *Marcel Massaro Haramoto*, *Carina Noronha Abrão*, *Marcelo Germani Vieira*, *Douglas Umeno Watanabe*, *Maria Cristina Aranha* e *Vanessa Barbosa* pelas experiências trocadas, respeito, pelos momentos de convívio e descontração e pela amizade!

Aos amigos desde a minha graduação, *Aline Gonçalves Andrade*, *Ana Carolina Prado Ribeiro*, *Clodoaldo Dias Pompermayer*, *Cristiane Saddi Becker*, *Luciana Estevam Simonato*, *Suzi Fortuna Sabotto*, *Tiago Franziote Tihara*, *Valéria Cecília Albertoni Duraõ* e *William Dalmoro*. Como é bom acompanhar o crescimento de vocês!

Ao funcionário da disciplina de Periodontia, *Odair Vicente*, pela grande pessoa que é, pelo auxílio no manejo dos animais experimentais e no departamento. Muito obrigada por tudo!

Aos funcionários do Biotério, em especial aos funcionários *Camilo e João Batista*, que ofereceram suporte para a obtenção dos animais utilizados neste trabalho.

Aos secretários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, *Paula e Cleide Lemes da Silva*, pela disponibilidade de sempre, pela ajuda durante toda a pós-graduação.

Aos funcionários da Pós-graduação, *Diogo, Marina e Valéria*, pela paciência, disponibilidade, alegria e competência de sempre.

Aos alunos do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pelo respeito, credibilidade e confiança depositados aos alunos da pós-graduação, permitindo-nos realizar nosso grande sonho de atividade acadêmica.

Aos Docentes da Disciplina de Histologia, *Professores (as) Doutores (as) Edilson Evolino, Raelf Justino Cruz Rizzolo e Alaíde Gonçalves*, pela disponibilidade e auxílio na utilização do microscópio de captura de imagens.

Aos funcionários do Laboratório de Cirurgia, *Bernadete Maria Nunes Kimura, Maria Dirce Colli Boatto e Gilmar Martins de Oliveira* pela ajuda em diversas etapas da dissertação, pelo carinho, paciência, compreensão e agradáveis momentos compartilhados.

Aos funcionários da Biblioteca: *Cláudio, Fernando, Ivone, Izamar, Júnior, Luzia, Maria Cláudia* pela disponibilidade e carinho.

À funcionária da Biblioteca *Ana Cláudia Martins Grieger Manzatti*, valiosa ajuda na correção da dissertação e pela atenção e carinho dispensados.

À *Johnson & Johnson® Comércio e Distribuição Ltda.*, pela doação dos fios de sutura utilizados nessa pesquisa.

À *CAPEES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, pela concessão da Bolsa de Mestrado que viabilizou e possibilitou a execução desse trabalho.

À *Fundunesp – Fundação para o Desenvolvimento da Unesp*, pelo auxílio recebido que possibilitou a execução da parte laboratorial da pesquisa.

Aos *animais experimentais*, meu profundo respeito.

Agradeço a **todos** que de alguma forma colaboraram para a realização do presente trabalho.



Epígrafe

“Quando amamos e acreditamos do fundo da nossa alma em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos a decisão certa, na hora exata, e quando atingimos nosso objetivo ficamos surpresos com nossa própria capacidade.”

Paula Coelho



Resumo

RESUMO

MURAKAWA, A. C. **Imunomarcção da PECAM-1 e da osteocalcina no processo de reparo de enxerto ósseo autógeno em bloco em ratas ovariectomizadas jovens e senis.** Araçatuba, 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de concentração: Periodontia). Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2009.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da ovariectomia (depleção de estrógeno), no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco por meio da imunomarcção da PECAM-1 e osteocalcina (OCN), em ratas jovens e senis. **Material e Métodos:** Foram utilizadas 96 ratas (Wistar) fêmeas, sendo 48 ratas com idade de 3 meses, divididas em subgrupo Ovx, submetidas a cirurgia de ovariectomia e subgrupo Sham submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico sem a remoção dos ovários; e 48 ratas com idade de 12 meses, também divididas em subgrupos Ovx e Sham. Transcorridos 30 dias da Ovx ou "sham", todos os animais receberam enxerto ósseo autógeno em bloco na mandíbula, tendo como área doadora o osso parietal da calvária. Os animais foram submetidos a eutanásia em 7, 14 e 28 dias. As peças foram submetidas à análises histométrica e imunoistoquímica. Esta foi realizada de forma semi-quantitativa, visando analisar as imunomarcações contra PECAM-1 e osteocalcina, avaliando-se a interferência do estrógeno neste processo. **Resultados:** Durante os períodos analisados, os subgrupos Sham apresentaram marcações da osteocalcina mais intensas quando comparadas com os subgrupos Ovx, independente da idade do animal. As marcações de PECAM-1 foram mais intensas nos subgrupos Sham aos 7 e 14 dias. **Conclusão:** Dentro dos limites deste estudo, concluímos que a depleção de estrógeno afeta negativamente o processo inicial da angiogênese e diminui a mineralização óssea.

Palavras-chave: regeneração óssea; osteocalcina; estrogênios; imunoistoquímica; ovariectomia.



Abstract

ABSTRACT

MURAKAWA, A. C. **Immunocolocalization of PECAM-1 and osteocalcin on healing of autogenous bone block in ovariectomized aged and young rat model.** Araçatuba, 2009. 98 f. Dissertation (Master in Dentistry – Periodontics) Araçatuba School of Dentistry. São Paulo State University “Julio de Mesquita Filho”.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the influence of the ovariectomy (estrogen depletion), on healing process of autogenous bone block grafts in young and aged rats, through the immunocolocalization of the PECAM-1 and osteocalcin (OC). **Material and Methods:** 96 female rats (Wistar) were used, being 48 rats with 3 months-old, divided in subgroups: Ovx, submitted the ovariectomy surgery and Sham, submitted to the same surgical procedure without the removal of the ovaries; and 48 female rats with 12 months-old, also divided in Ovx and Sham subgroups. After 30 days of Ovx or "sham" operation, all the animals received autogenous bone block graft in the jaw, harvested from the calvaria. The animals were euthanized in 7, 14 and 28 days postoperatively. The specimens were submitted to histometric and immunohistochemistry analysis. This was accomplished in a semi-quantitative way, to analyze the immunolocalizations against PECAM-1 and osteocalcin, evaluating the interference of the estrogen in this process. **Results:** During the analyzed periods, the Sham subgroups presented more intenser demarcations of osteocalcin when compared with the subgroups Ovx, regardless of age. The demarcations of PECAM-1 were more intenser in the "sham" subgroups to the 7 and 14 days. **Conclusion:** Within the limits of this study, the estrogen depletion affects the initial process of angiogenesis negatively and it reduces bone mineralization.

Keywords: bone regeneration; osteocalcin; estrogens; immunohistochemistry; ovariectomy.

A microscopic image of tissue, possibly a histological section, showing various cellular structures and colors. The word "Listas" is overlaid in a large, black, cursive font.

Listas

Lista de Figuras

Figura 1 – AON em todos os grupos experimentais (grupos Jovens e Senis; subgrupos Sham e Ovx) nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 73**

Figura 2 – Gráficos da análise semi-quantitativa das imunomarcações de PECAM-1 e OCN nos períodos analisados (7, 14 e 28 dias pós-operatórios). (a) Grupo Jovens – PECAM-1; (b) Grupo Senis – PECAM-1; (c) Grupo Jovens – OCN; (d) Grupo Senis – OCN. **p. 74**

Figura 3 – Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina dos grupos Jovens e Senis aos 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 75**

Figura 4 – Cortes histológicos corados com Tricrômico de Masson dos grupos Jovens e Senis aos 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 76**

Figura 5 – Imunomarcação de PECAM-1 na região da interface enxerto-ósseo – leito receptor no grupo Jovens, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 77**

Figura 6 – Imunomarcação de PECAM-1 na região da interface enxerto-ósseo – leito receptor no grupo Senis, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 78**

Figura 7 – Imunomarcação de OCN na região da interface enxerto-ósseo – leito receptor no grupo Jovens, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 79**

Figura 8 – Imunomarcação de OCN na região da interface enxerto-ósseo – leito receptor no grupo Senis, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 80**

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão da quantidade do tecido ósseo neoformado, dos grupos Jovens e Senis, aos 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 70**

Tabela 2 – Imunomarcações medidas em porcentagens de PECAM-1 e OCN dos grupos Jovens e Senis, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 71**

Tabela 3 – Imunomarcações medidas em escores obtidos a partir das porcentagens de PECAM-1 e OCN, dos grupos Jovens e Senis, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios. **p. 72**

Lista de Anexos

Anexo A – Resultados semi-quantitativos das imunomarcações de PECAM-1 e OCN em todos os grupos e períodos experimentais.	p. 82
Anexo B – Protocolo de imunoistoquímica Técnica da imunoperoxidase.	p. 84
Anexo C – Ilustração do procedimento cirúrgico.	p. 88
Anexo D – Ilustração da análise histométrica.	p. 90
Anexo E – Normas para publicação “Clinical Oral Implants Research”	p. 92
Anexo F – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal.	p. 98

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANOVA	Análise de variância
AON	Área de osso neoformado
AT	Área total
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
G	Enxerto ósseo em bloco
HE	Hematoxilina Eosina
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IN	Interface enxerto ósseo-leito receptor
NFB	Tecido ósseo neoformado
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Ovariectomia
PBS	Solução salina tamponada com fosfato a 0,1M
PBS + Tx	Solução tamponada com fosfato a 0,1M associado ao triton X100
PECAM-1	Molécula de adesão plaquetas-células endoteliais
RANKL	Receptor ativador de NF-Kappa B ligante
RB	Leito receptor
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

Lista de Símbolos

%	por cento
μm	Micrometro
g	Grama
°C	Graus Celsius
X	vezes
kg	quilograma
mg	miligrama
μl	microlitro

Sumário

Introdução	33
Material e Métodos	37
Resultados	46
Discussão	50
Referências	58
Anexos	81

Manuscrito para publicação
segundo as normas do Periódico
“Clinical Oral Implants Research”

Imunomarcção de PECAM-1 e osteocalcina no processo de reparo de enxerto ósseo autógeno em bloco em ratas ovariectomizadas jovens e senis.

Ana Cristina Murakawa

Alvaro Francisco Bosco

Roberta Okamoto

Disciplina de Periodontia

Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Universidade Estadual Paulista. Araçatuba



Introdução

INTRODUÇÃO

Sob a ótica reabilitadora, os enxertos ósseos para reconstrução de rebordos ósseos deficientes para instalação de implantes osseointegrados, proporcionam ao paciente inúmeras vantagens, não só do ponto de vista biomecânico como também estético e, por isso, tem-se intensificado tanto o seu emprego na Odontologia. Paralelamente, inúmeras pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de aprimorar os materiais e as técnicas cirúrgicas que envolvem os procedimentos de enxertia óssea.

No crescimento ou no reparo ósseo, células progenitoras de osteoblastos necessitam se proliferar para abastecer as células perdidas. Um grande número de fatores de crescimento locais e sistêmicos tem potencial de aumentar a replicação celular óssea. Muitos destes fatores atuam em células-alvo como as células precursoras de osteoblastos, enquanto outros atuam diretamente nos osteoblastos diferenciados e outros fatores dirigem o processo de diferenciação (Almeida 2004).

Os fatores que podem alterar esse processo de reparo ósseo podem ser locais ou sistêmicos, dentre eles os níveis dos hormônios sexuais. Com o avanço da idade, ocorrem diversas alterações no equilíbrio sistêmico, sendo que o osso é um dos tecidos geralmente afetados, principalmente em mulheres no período pós-menopausa, quando a produção do hormônio estrógeno diminui ou cai praticamente a zero (Guyton & Hall 1998).

De acordo com diversos estudos realizados, a deficiência de estrógeno provoca diminuição na densidade óssea mandibular (Bras et al. 1982; Kribbs et al. 1983,1989; Nishimura et al. 1992; von Wowern & Kollerup 1992), induz a osteoclastogênese no periodonto de ratas (Kawamoto et al. 2002), acentua as dinâmicas do osso alveolar induzida pelo trauma oclusal (Kawamoto et al. 2000) e interfere na morfologia óssea alveolar (Marques 1998). No reparo alveolar pós-exodontia, a deficiência estrogênica provoca significativa alteração no metabolismo ósseo

retardando a formação e mineralização óssea (Shimizu et al. 1998, 2000; Hsieh et al. 1995; Tanaka et al. 2001), assim como a diminuição da densidade óssea ao redor de implantes de titânio (Nociti et al. 2002). Portanto, é de suma importância o conhecimento dos principais eventos no processo de neoformação óssea e da angiogênese. A angiogênese, definida como um processo em que novos vasos sanguíneos são formados a partir de vasos sanguíneos já estabelecidos é crucial na formação e remodelação óssea. Uma vascularização apropriada é um pré-requisito para o desenvolvimento e regeneração do tecido ósseo e realmente parece haver uma reciprocidade entre vasculatura e osteoblastos (Carano & Filvaroff 2003; Kleinheinz et al. 2005). É reconhecido que a medula óssea abriga células capazes de se diferenciarem em células endoteliais e células osteoprogenitoras (Reyes et al. 2002).

Numerosas citocinas e fatores de crescimento estão envolvidos na regulação da angiogênese. No entanto, o agente mais potente que age especificamente no endotélio vascular é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Becit et al. 2001; Lantieri et al. 1998) e um marcador deste evento em nível celular é a molécula de adesão plaquetas-células endoteliais (PECAM-1). O VEGF é um fator de crescimento endotelial específico que aumenta potencialmente a permeabilidade microvascular, estimula a proliferação de células endoteliais, induz a expressão da enzima proteolítica e a migração de células endoteliais, monócitos e osteoblastos, todos esses essenciais para angiogênese (Dvorak et al. 1995; Connolly 1991; Sakuta et al. 2001). A PECAM-1 é uma glicoproteína integral da membrana altamente expressa em células endoteliais e em níveis moderados na superfície de plaquetas e leucócitos (Newman 1997). Está envolvida em funções vasculares incluindo a formação inicial do contato entre as células endoteliais, permeabilidade vascular, angiogênese, migração celular e migração trans-endotelial (Springer 1994; Piedboeuf et al. 1998).

A osteocalcina (OCN), uma proteína da matriz óssea, é predominantemente sintetizada por osteoblastos (Bronckers et al. 1985) e tem um papel importante na neoformação e mineralização óssea (Ducy et al. 1996; Garnero & Delmas 1998). Esta proteína extracelular exibe atividade quimioatrativa para células progenitoras de osteoblastos e monócitos sanguíneos periféricos (Chenu et al. 1994; Glowacki & Lian 1987). Níveis sorológicos elevados de osteocalcina têm sido encontrados em situações de rápido turnover ósseo, como osteoporose, mieloma múltiplo e reparo de fraturas (Slovik et al. 1984). A presença de osteocalcina é um marcador válido de turnover ósseo quando reabsorção e formação estão unidas, e um marcador específico de formação óssea quando formação e reabsorção não estão no mesmo nível (Delmas et al. 1986; Ducy et al. 1996).

As imunomarcações contra o PECAM-1 e OCN são realizadas com o intuito de trazer informações a respeito da neoformação vascular e da mineralização óssea, sendo esses fatores essenciais para o processo de reparo de enxertos.

Com base nas considerações apresentadas e na relevância do assunto, consideramos importante avaliar a influência da depleção de estrógeno no processo de reparo de enxertos ósseos autógenos em bloco por meio da imunomarcação da PECAM-1 e da osteocalcina em ratas jovens e senis.

Material e Métodos

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foram utilizadas 96 ratas fêmeas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) com idade de 3 meses (n=48) e 12 meses (n=48), com peso corporal variando entre 350 a 400 gramas. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, onde são criados para fins de ensino e pesquisa. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da referida instituição (no. 2007-004081). Todos os animais foram mantidos num ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), com água e ração *ad libitum*.

Desses animais, as 48 ratas com idade de 3 meses (grupo Jovens) foram divididas em subgrupo Ovx submetidas a cirurgia de ovariectomia (Ovx) e subgrupo Sham submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico (estresse) sem a remoção dos ovários; e outras 48 ratas com idade de 12 meses (grupo Senis), também divididas em subgrupos Ovx e Sham.

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

Grupos:

- Grupo Jovens – Subgrupo Ovx – ratas ovariectomizadas de 3 meses de idade (n=24);
 - Subgrupo Sham – ratas "sham" de 3 meses de idade (n=24);
- Grupo Senis – Subgrupo Ovx – ratas ovariectomizadas de 12 meses de idade (n=24);
 - Subgrupo Sham – ratas "sham" de 12 meses de idade (n=24).

Procedimentos cirúrgicos

Para todos os procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de cloridrato de ketamina (0,7ml/ 100 g peso corporal) associado ao cloridrato de xilazina (0,3ml/ 100g peso corporal) e cada animal recebeu, nos pós-operatórios imediatos, dose única de antibiótico penicilina G benzatina (administração intramuscular de 0,2ml/animal).

Procedimento cirúrgico para realização da ovariectomia

As ratas dos subgrupos Ovx foram submetidas a ovariectomia bilateral, visando induzir o quadro de menopausa.

Foi realizada a tricotomia bilateral ao ventre e a assepsia vigorosa com solução de digluconato de clorexidina a 0,12% na área.

Após o isolamento da área cirúrgica, com auxílio de lâmina de bisturi nº 10, incisões bilaterais de aproximadamente 1cm foram realizadas, para se obter acesso aos ovários e, através das quais foram realizados os procedimentos cirúrgicos que envolvem a remoção dos ovários. As suturas internas foram realizadas com fio absorvível Vicryl 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon) e as suturas externas com fio de Seda 4-0 (Johnson & Johnson / Ethicon).

As ratas dos subgrupos Sham foram submetidas ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a remoção dos ovários, simulando as mesmas condições de estresse previamente e durante o ato cirúrgico, além da condição do organismo que sofreu procedimento cirúrgico no pós-operatório.

No 31º dia após a cirurgia “sham” ou a ovariectomia, ou seja, no dia zero do experimento (D0), as ratas estavam preparadas para o início do experimento envolvendo o enxerto ósseo.

Após o procedimento de ovariectomia, o sucesso de tal procedimento foi confirmado pelo ciclo estral. A fase diestro, que consiste principalmente em leucócitos e muitas células epiteliais, se

manteve inalterada em todos os animais OVX. Os animais do grupo Sham apresentaram mudanças nos tipos celulares no esfregaço vaginal, demonstrando claramente os quatro estágios do ciclo estral (estro, metaestro, diestro e proestro).

Enxerto ósseo autógeno em bloco

A metodologia empregada para realização do enxerto autógeno na mandíbula dos animais foi baseada nas descrições de Jardini et al. (2005), De Marco et al. (2005), Luize et al. (2008) e Bonfante et al. (2008). Após tricotomia, anti-sepsia e isolamento das regiões temporal e parotídeo-massetérica direita e da região fronto-parietal, foi realizada uma incisão linear na pele, na região do ângulo da mandíbula do lado direito, paralela ao processo zigomático, permitindo a visualização do músculo masseter. Este, com auxílio de uma tesoura de ponta romba, foi divulsionado até atingir a tábua óssea mandibular. O periósteo do lado medial da mandíbula, juntamente com o músculo pterigóideo medial, foi descolado com auxílio de uma espátula do tipo Hollembach 3S. A região foi raspada superficialmente, com auxílio do Hollembach 3S, para assegurar a completa remoção do periósteo (Anexo C).

Obtenção do enxerto ósseo

Foi realizada uma incisão em formato de meia-lua, no tegumento de revestimento do crânio e um retalho de espessura total foi elevado. Com uma trefina cirúrgica (Prudent, Lins, São Paulo, Brasil) com diâmetro interno de 3,8mm montada em um motor elétrico cirúrgico (VK Driller Equipamentos Elétricos, São Paulo, SP), com velocidade constante de 800 RPM, e sob irrigação contínua e abundante com solução fisiológica, foi retirado o bloco ósseo da região parietal direita, abrangendo toda a espessura da cúpula. O bloco ósseo foi armazenado temporariamente

em uma cuba contendo soro fisiológico estéril. Em seguida, os retalhos de tegumento foram reposicionados juntamente com o periósteo e suturados com fio de seda preta 4-0 (Anexo C).

Fixação do enxerto ósseo

Com auxílio de uma broca carbide 0,5mm (KG Sorensen, Barueri, São Paulo, Brasil) adaptada ao mesmo motor já citado anteriormente, foi realizada uma perfuração na região central do enxerto ósseo. Da mesma maneira, a área receptora recebeu uma perfuração na proximidade do ângulo da mandíbula, distanciando em torno de 3mm da borda inferior.

O enxerto foi fixado através da transpassagem de um fio de sutura 5,0 de poliéster verde trançado (Johnson & Johnson/Ethicon, Somerville, NJ) através do bloco ósseo e da mandíbula (Anexo C). Uma vez atado o nó na borda inferior da mandíbula, o enxerto foi estabilizado, permitindo um íntimo contato entre a superfície óssea mandibular e o enxerto ósseo. O músculo masseter foi suturado com fio 5-0 de poliglactina 910 (Vicryl; Johnson & Johnson/Ethicon) e a pele com fio de seda preta 4-0 (Johnson & Johnson/Ethicon). Nas primeiras 48 horas após as intervenções cirúrgicas, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e receberam ração triturada e água *ad libitum*.

Processamento laboratorial

A eutanásia dos animais foi realizada aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios por injeção de dose excessiva de anestésico tiopental sódico (150 mg/kg peso corporal) (Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil). As áreas de interesse foram removidas e as peças obtidas foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, lavadas e descalcificadas em solução de etilenodiaminotetracetatodissódico (EDTA) a 18%, por aproximadamente 40 dias,

com troca da solução a cada 7 dias. Após a descalcificação, as peças receberam tratamento laboratorial de rotina e foram incluídas em parafina, de maneira a obter cortes com 6 micrometros de espessura. Os cortes histológicos foram realizados no sentido transversal ao plano de justaposição do enxerto ao leito receptor, a partir da borda inferior da mandíbula, abrangendo o enxerto ósseo e o osso da mandíbula. Foram obtidos cortes semi-seriados, a cada 100 micrometros de distância, por toda a extensão do enxerto. Os 6 cortes mais centrais, excluindo-se a área da perfuração, foram corados, alternadamente, com hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson, para análise histométrica.

Análise imunoistoquímica

As reações foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo Fapesp 04/07562-5).

Algumas lâminas foram separadas e destinadas à análise imunoistoquímica. Foram selecionadas três lâminas de cada espécime, para reação contra PECAM-1, OCN e controle negativo, excluindo-se as lâminas da área da perfuração. Realizou-se a inibição da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, a recuperação antigênica com tampão citrato a 60°C por 20 minutos, e o bloqueio das reações inespecíficas com leite desnatado e albumina bovina durante as incubações dos anticorpos.

Foram utilizados os anticorpos primários contra PECAM-1 e OCN (Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, USA), anticorpo secundário biotinilado (Pierce Biotechnology®, Illinois, USA), o sinal da reação imunoistoquímica foi amplificado com o sistema avidina-biotina (kit DAKO, Glostrup, Dinamarca) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB, DAKO Co.,

Califórnia, USA) como cromógeno, que dá uma cor marrom-acastanhada às marcações. Ao término das reações, realizou-se a contra-coloração dos cortes com Hematoxilina de Harris (Merck®, Darmstadt, Alemanha) e as lâminas passaram pelas etapas de desidratação para montagem das lâminulas de Permount. Foram realizados controles negativos (pela omissão dos anticorpos primários) para evitar a análise de falsos positivos.

Para a realização da análise foi utilizado um microscópio óptico com objetiva de aumento 160X Leica Aristoplan Microsystems (Leitz, Bensheim, Alemanha) acoplado a uma câmera de captura de imagem (Leica DFC 300FX, Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas (Leica Câmera Software Box, Leica Imaging Manager – IM50 Demo Software). Três imagens foram obtidas de cada lâmina para análise. Para efeito comparativo da densidade das imunomarcações entre os grupos experimentais, foi criado um escore onde as imunomarcações foram classificadas em uma escala de 6 graus, que variavam de ausentes a intensas (Anexo A e Tabela 03). Esses escores foram transformados em porcentagens e submetidos à análise estatística.

Análise dos resultados

A análise histométrica foi realizada com auxílio de microscópio de luz, visando analisar a quantidade do tecido ósseo formado na interface leito receptor e enxerto ósseo.

A análise imunoistoquímica foi realizada de forma semi-quantitativa e com auxílio de microscópio de luz, visando analisar as imunomarcações contra PECAM-1 nas células endoteliais, como um marcador de neovascularização. Foram analisadas também as imunomarcações contra osteocalcina, proteína da matriz óssea, relacionada ao processo de

mineralização óssea, apresentando-se expressa em osteoblastos, osteócitos e células de revestimento ósseo.

Análise histométrica

O software Imagelab 2000 (Diracon Bioinformática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil) foi usado para análise dos dados quantitativos nos períodos de 14 e 28 dias. Não observou-se formação óssea no período de 7 dias, por isso não foi realizada análise histométrica em ambos os grupos.

Foram selecionados dois cortes mais centrais de cada espécime, excluindo-se as da região perfurada. Cada corte foi fotografado com uma câmera digital (Olympus DP 10, Olympus Optical) conectada a um microscópio de luz (Olympus BX 50 F4, Olympus Optical) e então salvos como uma imagem digitalizada no computador. Não foi possível capturar toda a interface em uma única imagem no nível de magnificação utilizado. Então, foi criada uma imagem digital composta por 3 imagens menores.

Após calibração, as medidas histométricas da área total da interface e da área de osso neoformado foram obtidas em mm^2 utilizando uma régua histológica. Os seguintes critérios foram usados para padronizar a análise histométrica (Luize et al. 2008; Bonfante et al. 2008):

- A área total da interface foi delineada correspondendo ao espaço entre o bloco ósseo e o leito receptor. Este foi considerado 100% da área a ser analisada.
- A área de osso neoformado dentro da área total foi calculada pelo delineamento de cada unidade óssea separadamente, e então o somatório dessas unidades (Anexo D).

As porcentagens foram calculadas (taxa de osso neoformado / área da interface) e submetidas à análise estatística.

Análise estatística

A análise estatística dos dados histométricos obtidos foi realizado pelo software Bioestat 3.0 (Bioestat Windows 1995 Sonopress; Manaus, Amazonas, Brasil). A significância das diferenças entre grupos em relação às porcentagens de tecido ósseo neoformado na interface foi determinada pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Os dados imunoistoquímicos foram submetidos ao teste Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Resultados

RESULTADOS

Análise quantitativa (HE) (Tabela 1 e Figuras 3 e 4)

14 dias

A análise histométrica revelou que a quantidade de tecido ósseo neoformado na região da interface enxerto ósseo-leito receptor foi menor nos espécimes do subgrupo Ovx (44,75% no grupo Jovens e 32,89% no grupo Senis) que nos espécimes do subgrupo Sham (62,37% no grupo Jovens e 54,21% no grupo Senis), em ambas as idades dos animais.

28 dias

Aos 28 dias, houve aumento na quantidade de osso neoformado na região da interface, em todos os grupos, quando comparados com os grupos do período de 14 dias. Nas ratas jovens, a quantidade de tecido ósseo neoformado foi de 79,58% no subgrupo Sham e 60,09% no subgrupo Ovx, sendo esta diferença estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu nas ratas senis, que apresentou 73,65% no subgrupo Sham e 53,09% no Subgrupo Ovx.

Análise Semi-quantitativa (Tabelas 02 e 03)

PECAM-1 (Figuras 5 e 6)

Aos 7 dias, houve ligeira diferença entre as marcações dos subgrupos Sham e Ovx, tanto nas ratas jovens quanto nas senis. No grupo jovens, as marcações foram discretas no subgrupo Sham (24%) e muito discretas no subgrupo Ovx (20%); no grupo senis, as marcações foram muito

discretas em ambos os subgrupos (16% no subgrupo Sham e 16% no subgrupo Ovx), tanto nas bordas quanto na região central da interface enxerto ósseo-leito receptor, ao redor dos capilares sanguíneos, marcando as células endoteliais do tecido conjuntivo desta região.

Aos 14 dias notou-se maior marcação da PECAM-1 quando comparada aos demais períodos experimentais. Nas ratas jovens, a expressão foi pouco intensa no subgrupo Sham (72%) e moderada no subgrupo Ovx (52%), sendo esta diferença estatisticamente significativa, enquanto nas ratas senis, houve marcações pouco intensas no subgrupo Sham (68%) e discretas no subgrupo Ovx (28%), sendo também estatisticamente significativa, localizadas nas células endoteliais presentes no tecido conjuntivo e nos espaços medulares, em toda extensão da interface enxerto ósseo-leito receptor.

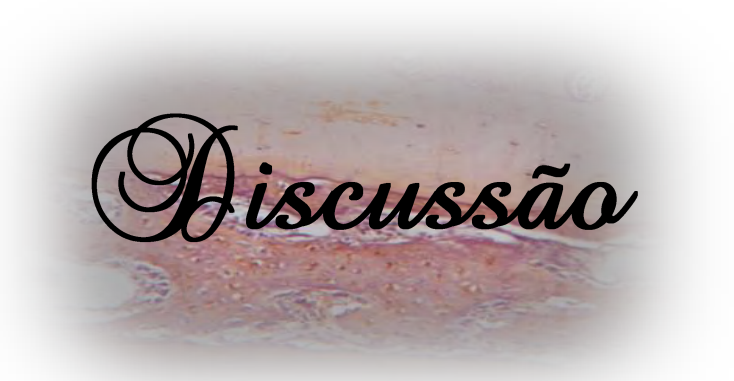
No período de 28 dias, as ratas Sham tanto do grupo Jovens quanto do grupo Senis apresentaram marcações moderadas desta molécula de adesão (48% nos dois grupos). No subgrupo Ovx, as marcações foram discretas tanto nas ratas jovens quanto nas ratas senis (40% e 32%, respectivamente), expressa principalmente nos espaços medulares, ao redor do tecido ósseo neoformado da região da interface, sendo que no Grupo Senis houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos Ovx e Sham.

OCN (Figuras 7 e 8)

Aos 7 dias, as imunomarcações foram discretas para esta proteína, no subgrupo Sham das ratas jovens (24%) e muito discretas no subgrupo Ovx da mesma idade (12%). No grupo senis, houve marcações muito discretas em ambos os subgrupos experimentais (8% no subgrupo Sham e 4% no subgrupo Ovx). Todas essas marcações estavam localizadas em algumas áreas do tecido conjuntivo, principalmente na região central da interface.

Aos 14 dias houve marcações imunopositivas para osteocalcina em todos os subgrupos, sendo notadas também regiões de tecido ósseo neoformado na interface enxerto ósseo-leito receptor, principalmente na região central, com certo grau de maturação. Nos subgrupos Sham foram encontrados tecido ósseo com maior grau de maturação, expressando-se mais intensamente quando comparadas com o subgrupo Ovx, sendo que foram pouco intensas no subgrupo Sham do grupo Jovens (68%) e moderadas no subgrupo Ovx nos animais da mesma idade (48%), ao passo que foram moderadas no subgrupo Sham (44%) e discretas no subgrupo Ovx (32%) das ratas do grupo Senis. As marcações apresentaram-se nas células da linhagem osteoblástica, sendo incorporadas pelo tecido ósseo em formação.

Nos grupos de 28 dias, houve maior formação de tecido ósseo na interface quando comparado ao período anterior, assim como maior grau de mineralização deste tecido. As imunomarcações foram intensas no subgrupo Sham (88%) e moderadas no subgrupo Ovx (60%) nas ratas jovens e pouco intensas no subgrupo Sham (68%) e moderadas no subgrupo Ovx (44%) nas ratas senis. Destaca-se que os osteócitos e as células de revestimento ósseo apresentaram-se imunopositivas para a osteocalcina, sendo que houve diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos e ambas idades.



Discussão

Discussão

Embora a perda óssea pós-menopausa seja um fator de risco importante para a osteopenia e osteoporose, pouco se sabe sobre a contribuição do declínio do estrógeno versus idade para o desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea que ocorre durante e após a meia-idade (Bradsher & McKinlay 2000).

A ovariectomia em ratas é um modelo experimental já bem estabelecido e recomendado pela FDA para pesquisa de osteoporose extrapolada para humanos (Bauss et al. 2002). No presente estudo, foram utilizadas ratas com idades de 3 e 12 meses (chamadas de grupo Jovens e Senis, respectivamente) com o intuito de investigar os efeitos da ovariectomia e conseqüente perda óssea com o decorrer do processo de envelhecimento. As ratas de 3 meses de idade apresentam acentuado processo de remodelação e crescimento esquelético, encontram-se em fase reprodutiva, sexualmente maduras, sendo capazes de responder apropriadamente à deficiência do hormônio sexual e às seqüelas decorrentes da ovariectomia (Kalu 1991). O uso de animais de 12 meses de idade, já esqueleticamente maduros, assegura que as mudanças esqueléticas observadas, seguidas da ovariectomia, sejam primariamente devido à deficiência do hormônio ovariano associada a perda óssea própria da idade, sem influência do crescimento ósseo acelerado que ocorre em animais jovens.

O osso autógeno, material utilizado neste trabalho, continua sendo material padrão ouro (Boyne & James 1980; Tatum 1986; Misch 1987) para a reconstrução dos defeitos causados por patologias e traumas (Tessier et al. 2005) e, principalmente, para a reconstrução dos rebordos possibilitando a instalação de implantes de titânio (Proussaefs & Lozada 2005; Wada et al. 2001; Esposito et al. 2006; Branemark et al. 1975). As propriedades osteoindutoras e osteocondutoras, a biocompatibilidade e a impossibilidade de transmissão de doenças são as características

diferenciais do osso autógeno que conferem um alto índice de sucesso (Triplett & Schow 1996; Hirsch & Ericsson 1991; Lundgren et al. 1996; Raghoobar et al. 1993; Wood & Moore 1998).

De acordo com os dados histométricos obtidos no presente estudo, houve tendência a menor formação óssea nas ratas do Grupo Senis, mas não houve significância estatística, o que também foi observado em outros estudos que demonstraram redução da massa óssea com o decorrer da idade (Kiebzak et al. 1988; Kimmel et al. 1993; Meyer et al. 2001). Segundo Meyer et al. (2001) isto é devido a alterações do estado hormonal, nutrição alterada, presença de outras condições patológicas e diminuição de células precursoras de osteoblastos.

Quanto à formação óssea na região da interface enxerto ósseo-leito receptor, houve menor quantidade de tecido ósseo neoformado nos subgrupos de ratas Ovx quando comparadas aos subgrupos Sham, em ambas as idades. Isto provavelmente seja devido ao papel do estrógeno na regulação do turnover ósseo, em que a sua ausência causa um desequilíbrio na remodelação óssea e o grau de absorção excede o da formação deste tecido (Turner et al. 1994; Vaananen & Harkonen 1996; Garnero & Delmas 1999)

Muitos estudos sobre os mecanismos envolvidos na regulação do estrógeno no metabolismo ósseo tem sido realizados. Estudos clínicos que avaliam osteoporose nos maxilares tem reportado que a redução da massa esquelética total é diretamente relacionada à densidade óssea mandibular em mulheres com deficiência de estrógeno (Von Wöhrn 1988; Von Wöhrn et al. 1994). Na menopausa, a deficiência de estrógeno induz tanto perda óssea cortical como medular. Em nível celular, o estrógeno inibe a diferenciação de osteoclastos, causando diminuição do seu número e a quantidade de unidades de remodelação ativas (Turner et al. 1994). Em nível molecular, o estrógeno regula a expressão de interleucinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) e citocinas que regulam a reabsorção óssea (Pacifci 1992; Girasole et al. 1995). Sabe-se que a interleucina-6, interleucina-

1 (Pacifici 1992; Girasole et al. 1995) e duas moléculas ósseas, RANKL (nuclear factor kappa-b ligand) e OPG (osteoprotegerina) controlam a reabsorção osteoclástica durante a deficiência de estrógeno. Em síntese, a reabsorção óssea é reduzida significativamente pela inibição da função da RANKL e seu receptor chamariz, OPG. Quanto ao mecanismo que a reabsorção óssea age sobre a OPG, tem sido sugerido que a deficiência de estrógeno induz um desequilíbrio no sistema RANKL/OPG, favorecendo a diferenciação osteoclástica. Em adição a este efeito indireto do estrógeno sobre osteoclastos (Lindberg et al. 2001; Pacifici 1992; Girasole et al. 1995), há evidências que o estrógeno também pode também modular diretamente os osteoclastos (Eriksen et al. 1988).

A manutenção do volume de enxertos ósseos “onlay” é altamente dependente do balanço entre deposição óssea e absorção, enquanto que a revascularização parece ter um papel importante na viabilidade do enxerto, particularmente nas atividades osteoblásticas e osteoclásticas (Chen et al. 1994).

No presente trabalho, o subgrupo Ovx claramente apresentou uma diminuição da expressão da OCN aos 28 dias sugerindo que a deficiência de estrógeno contribuiu para o retardo do processo de reparo alterando o turnover da matriz extracelular. Os subgrupos Ovx apresentaram tendência a diminuição da expressão da OCN no período de 14 dias e diminuição estatisticamente significativa no período de 28 dias, tanto nas ratas jovens quanto nas ratas senis. Este estudo está de acordo com Zecchin et al. (2005) que apresentou uma diminuição estatisticamente significativa das atividades gelatinolíticas e da expressão de MMP-2 e -9 e do colágeno tipo I e III em ratas ovariectomizadas. O declínio de estrógeno induzido pela ovariectomia afeta o turnover ósseo após extração dental com aumento da reabsorção óssea e redução da formação (Elovic et al. 1995; Shimizu et al. 1995; Shimizu et al. 2000; Hsieh et al. 1995; Jahangiri et al.

1997; Teófilo et al. 2004), assim como aumenta a perda óssea em periodontites induzidas por ligaduras (Duarte et al. 2004a; Duarte et al. 2004b), afeta negativamente o tecido ósseo de sustentação dental (Duarte et al. 2006) e diminui o reparo ósseo e sua densidade ao redor de implantes de titânio (Nociti et al. 2002).

O grau de proliferação de células endoteliais e de maturação dos osteoblastos no tecido formado durante o processo de reparo ósseo foi avaliado através de reações imunoistoquímicas contra a molécula de adesão plaquetas-células endoteliais (PECAM-1) e a proteína OCN com o intuito de trazer informações a respeito da neoformação vascular e da mineralização óssea nos procedimentos de enxertia. A imunoistoquímica permite a análise das respostas celulares preservando a estrutura tecidual favorecendo a sua comparação aos eventos teciduais descritos pela análise da coloração por hematoxilina e eosina.

O processo de mineralização, que se constitui na etapa final do processo de reparo, se dá pela deposição de cálcio sobre a matriz de colágeno, constituinte principal da matriz orgânica do tecido ósseo. Com relação ao processo de deposição de cálcio, considera-se efetiva a participação de proteínas da matriz óssea não colagenosas e sintetizadas pelos osteoblastos, principal componente celular do tecido ósseo. Dentre as proteínas não colagenosas presentes no tecido ósseo, destacamos a osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea como sendo importantes para o processo de mineralização (Oliveira et al. 2003; Shyng et al. 1999).

A osteocalcina deve ser destacada, uma vez que dentre as proteínas não colagenosas da matriz, é a que se expressa em maior quantidade (Gerstenfeld et al. 1987). Além disso, é um produto dos osteoblastos considerado um marcador da formação óssea (Brown et al. 1984). Contudo, a osteocalcina é liberada da matriz óssea para a corrente sanguínea durante o processo de

reabsorção óssea, sugerindo que ela também seja um marcador do turnover ósseo (Di Carlo et al. 2007; Kim et al. 2006; Ivaska et al. 2004; Page et al. 1993; Delmas et al. 1990).

No presente estudo, no grupo Jovens, houve menor marcação de osteocalcina no subgrupo Ovx, em todos os períodos experimentais, comparados com o subgrupo Sham, sendo que o grau de intensidade aumentou com o decorrer do tempo. Isto também ocorreu no grupo Senis, porém com marcações menos intensas quando comparadas com as do grupo Jovens.

Vale destacar que a maioria dos trabalhos na literatura analisa a osteocalcina no soro e não sua expressão diretamente no tecido ósseo (Kim et al. 2006; Di Carlo et al. 2007). A técnica de imunoistoquímica permite a preservação da citoarquitetura do tecido analisado, aspecto importante a ser considerado, pois a osteocalcina, um indicador do turnover ósseo, é sintetizada por osteoblastos e incorporada na matriz óssea pela ligação da hidroxiapatita por uma reação cálcio-dependente (Dickson 1993). Somente uma pequena porção desta proteína é liberada na corrente sanguínea (Price et al. 1980). A sua marcação diretamente no tecido ósseo permite uma melhor análise do seu papel desempenhado junto à precipitação do cálcio sobre a matriz orgânica do tecido.

Quanto às imunomarcações da PECAM-1, elas foram mais intensas nos subgrupos Sham, sendo mais evidentes no período de 14 dias, quando comparados aos subgrupos Ovx, que apresentaram menos marcações independentemente da idade dos animais. Com relação aos grupos de ratas Jovens e Senis, notou-se marcações mais intensas no primeiro grupo. Estes achados provavelmente são devido ao fato de o estradiol aumentar a proliferação e migração endotelial (Morales et al. 1995) mediada pelo receptor clássico de estrógeno, que se expressa em células endoteliais (Venkov et al. 1996; Kim-Schulze et al. 1996). Este efeito provê um mecanismo para o efeito angiogênico do estradiol.

O estudo de Brandi et al. (1993) mostrou a presença de receptores funcionais de estrógeno em células endoteliais ósseas in vitro, sugerindo um papel dos estrógenos na angiogênese e no processo de remodelação óssea.

Alterações mediadas pelo estrógeno na expressão de certas moléculas de adesão tem sido mostradas em células endoteliais (Cid et al. 1994; Caulin-Glaser et al. 1996) e outros tipos celulares (Frazier-Jessen et al. 1995; Kovacs et al. 1996; Li et al. 1995; Suzuki et al. 1997). A importância do mecanismo desses efeitos são refletidos em estudos em humanos e animais, notando a associação entre alterações nos hormônios sexuais, mudanças nos padrões de expressão das moléculas de adesão e proteínas da matriz, e modificação da atividade angiogênica (Iruela-Arispe et al. 1996; Horak et al. 1992; Morales et al. 1995; Lewis et al. 1995).

Pouca capilarização está geralmente considerada como um sinal de vitalidade reduzida em atividades ósseas biológicas, como achados de que o fluxo sanguíneo no tecido ósseo está intimamente associado com a taxa de trabalho das unidades multicelulares individuais básicas do osso trabecular (Reeve et al. 1988).

Os resultados imunoistoquímicos do presente trabalho estão em concordância com os resultados histométricos, já que a osteocalcina apresentou maior marcação com o decorrer dos períodos experimentais, sendo mais evidentes nos subgrupos Sham, mostrando que o processo de mineralização óssea é afetado com a depleção de estrógeno. Portanto, os subgrupos Ovx apresentaram menor formação óssea na região da interface, podendo ser devido à menor vascularização marcada pela PECAM-1, sendo que a angiogênese é considerada um fator essencial para nutrição do enxerto ósseo e decorrente neoformação óssea (De Marco et al. 2005). Dentro dos limites deste estudo, é possível concluir que a deficiência de estrógeno afeta negativamente o processo inicial da angiogênese e provoca uma diminuição da mineralização

óssea, tanto em ratas jovens quanto senis, sendo que esses efeitos foram mais negativos nos grupos de ratas de 12 meses de idade.

A circular inset showing a microscopic view of tissue, likely a histological section, with various cellular structures and colors (pink, purple, brown) visible.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Almeida, T. E. (2004) *Insulina semelhante a fator de crescimento na reparação óssea*. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo.
- Bauss, F., Wagner, M. & Hothorn, L.H. (2002) Total administered dose of ibandronate determines its effects on bone mass and architecture in ovariectomized aged rats. *Journal of Rheumatology* 29: 990-998.
- Becit, N., Ceviz, M., Koçak, H., Yekeler I, Unlü Y, Celenk, C. & Akin, Y. (2001) The effect of vascular endothelial growth factor on angiogenesis. An experimental study. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 22: 310-316.
- Bonfante, S., Bosco, A. F., Luize, D. S., Almeida, J. M., Cestari, T. M. & Taga, R. (2008) Influence of nicotine on healing processo of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in rats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 23:437-444.
- Boyne, P. J. & James, R. A (1980). Grafting of the maxillary sinus floor with autogenous marrow and bone. *Journal of Oral Surgery* 38: 613-616.
- Bradsher, J.E. & McKinlay, S. M. (2000) Distinguishing the effects of age from those of menopause. In: Lobo, R. A., Kelsey, J., Marcus, R., eds. *Menopause Biology and Pathobiology*, 1st edition, p. 203-211. San Diego: Academic Press.
- Brandi, M. L., Crescioli, C., Tanini, A., Frediani, U., Agnusdei, D. & Gennari, C. (1993) Bone endothelial cells as estrogen targets. *Calcified Tissue International* 53:312-317.
- Brånemark, P. I., Lindstrom, J., Hallen, O., Breine, U., Jeppson, P. H. & Ohman, A. (1975) Reconstruction of the defective mandible. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery* 9:116-128. .
- Bras, J., Van Ooji, C. P., Abraham-Inpijin, L., Kusen, G. J. & Wilminsk, J. M. (1982) Radiographic interpretation of the mandibular angular cortex: a diagnostic tool in metabolic bone loss. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 53: 647-650.
- Bronckers, A. L., Gay, S., Dimuzio, M. T. & Butler, W. T. (1985) Immunolocalization of gamma-carboxyglutamic acid containing proteins in developing rat bones. *Collagen and Related Research* 5: 273-281.

- Brown, J. P., Delmas, P. D., Malaval, L., Edouard, C., Chapuy, M. C. & Meunier, P. J. (1984) Serum bone Gla-protein: a specific marker for bone formation in postmenopausal osteoporosis. *Lancet* 19; 1(8386): 1091-3.
- Carano, R. A. & Filvaroff, E. H. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discovery Today* 8:980-989.
- Caulin-Glaser, T., Watson, C. A., Pardi, R. & Bender, J. R. (1996) Effects of 17 β -estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *The Journal of Clinical Investigation* 98:36-42.
- Chen, N. T., Glowacki, J., Bucky, L. P., Hong, H. Z., Kim, W. K. & Yaremchuk, M. J. (1994) The roles of revascularization and resorption on endurance of craniofacial onlay bone grafts in the rabbit. *Plastic and Reconstructive Surgery* 93: 714-722.
- Chenu, C., Colucci, S., Grano, M., Zigrino, P., Baratoolo, R., Zambonin, G., Baldini, N., Vergnaud, P., Delmas, P. D. & Zallone, A. Z. (1994) Osteocalcin induces chemotaxis, secretion of matrix proteins, and calcium-mediated intracellular signaling in human osteoclast-like cells. *The Journal of Cell Biology* 127:1149-1158.
- Christiansen, C., Christensen, M. S., Larsen, N. E. & Transbol, I. B. (1982) Pathophysiological mechanisms of estrogen effect on bone metabolism. Dose-response relationships in early postmenopausal women. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 55: 1124-1130.
- Cid, M. C., Kleinman, H. K., Grant, D. S., Schnaper, H. W., Fauci, A. S. & Hoffman, G. S. (1994) Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1 and vascular cell adhesion molecule type1. *Journal of Cell Science* 93:17-25.
- Connolly, D. T. (1991) Vascular permeability factor. A unique regulator of blood vessel function. *Journal of Cellular Biochemistry* 47:219-223.
- De Marco, A. C., Jardini, M. A. & Lima, L. A. P. A. (2005) Revascularization of autogenous block grafts with or without na e-PTFE membranes. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 20:867-874.
- Delmas, P. D., Demiaux, B., Malaval, L., Chapuy, M. C., Edouard, C. & Meunier, P. J. (1986) Serum bone gamma carboxyglutamic acid-containing protein in primary hyperparathyroidism

and in malignant hypercalcemia. Comparison with bone histomorphometry. *The Journal of Clinical Investigation* 77: 985-991.

Delmas, P. D., Price, P. A. & Mann, K. G. (1990) Validation of the bone Gla protein (osteocalcin) assay. *Journal of Bone and Mineral Research* 5: 3-4.

Di Carlo, C., Tommaselli, G. A., Gargano, V., Sammartino, A., Bifulco, G., Tauchmanova, L., Colao, A. & Nappi, C. (2007) Effects of estrogen-progestin therapy on serum levels of RANKL, osteoprotegerin, osteocalcin, leptin, and ghrelin in postmenopausal women. *Menopause* 14: 38-44.

Dickson, I. R. (1993). Bone. In: Royce, P., Steinmann, B, eds. *Connective tissue and its heritable disorders*, 1st edition, p. 249-285, New York: Wiley-Liss.

Duarte, M. P., de Assis, D. R., Casati, M. Z., Sallum, A. W., Sallum, E. A., Nociti, F. H. Jr. (2004) Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. *Journal of Periodontology* 75:1196-202.

Duarte, P. M., Gonçalves, P. F., Casati, M. Z., de Toledo, S., Sallum, E. A. & Nociti, F. H. Jr. (2006) Estrogen and alendronate therapies may prevent the influence of estrogen deficiency on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *Journal of Periodontal Research* 41:541-546.

Duarte, P. M., Gonçalves, P. F., Sallum, A. W., Sallum, E. A., Casati, M. Z. & Nociti, F. H. Jr. (2004) Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from a experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research* 39:107-110.

Ducy, P., Desbois, C., Boyce, B., Pinero, G., Story, B., Dunstan, C., Smith, E., Bonadio, J., Goldstein, S., Gundberg, C., Bradley, A. & Karsenty, G. (1996) Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448-452.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M. & Dvorak, A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology* 146: 1029-39.

Elovic, R. P., Hipp, J. A. & Hayes, W. C. (1995) Maxillary molar extraction causes increased bone loss in the mandible of ovariectomized rats. *Journal of Bone and Mineral Research* 10: 1087-1093.

- Eriksen, E. F., Colvard, D. S., Berg, N. J., Graham, M. L., Mann, K. G., Spelsberg, T. C & Riggs, B. L. (1988) Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 241: 84-86.
- Esposito, M., Grusovin, M. G., Coulthard, P. & Worthington, H. V. (2006) The efficacy of various bone augmentation procedures for dental implants: a Cochrane systematic review of randomized controlled clinical trials. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 21:696-710.
- Frazier-Jessen, M. R. & Kovacs, E. J. (1995) Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophage. *Journal of Immunology* 154:1838-1845.
- Garnero, P. & Delmas, P. D. (1988) Biochemical markers of bone turnover. Applications for osteoporosis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 27: 303-33.
- Garnero, P. & Delmas, P. D. (1999) Laboratory assessment of postmenopausal osteoporosis. In: Seibel, M. J., Robins, S. P. & Bilezikian, J. P. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*, 1st edition, p. 465-477. San Diego: Academic Press.
- Gerstenfeld, L. C., Chipman, S. D., Glowacki, J. & Lian, J. B. (1987) Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Developmental Biology* 122: 49-60.
- Girasole, G., Passeri, G., Pedrazzoni, M., Giuliani, N. & Passeri, M. (1995) Interleukin-6: a pathogenetic role in postmenopausal osteoporosis? *Acta bio-medica de L'Ateneo parmense* 66: 125-138.
- Glowacki, J. & Lian, J. B. (1987) Impaired recruitment and differentiation of osteoclast progenitors by osteocalcin-deplete bone implants. *Cell Differentiation* 21: 247-254.
- Guyton, A. C. & Hall, J. E. (1998) Fisiologia feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. In: *Fisiologia humana e mecanismos das doenças*. 6st.edition, p. 587-596. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Hirsch, J. M. & Ericsson, I. (1991) Maxillary sinus augmentation using mandibular bone grafts and simultaneous installation of implants. A surgical technique. *Clinical Oral Implants Research* 2:91-96.

Horak, E. R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniowska, K. & Harris, A. L. (1992) Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 340:1120-1124.

Hsieh, Y. D., Devlin, H. & Mccord, F. (1995) The effect of ovariectomy on the healing tooth socket of the rat. *Archives of Oral Biology* 40:529-531.

Iruela-Arispe, M. L., Porter, P., Bornstein, P. & Sage, E. H. (1996) Thrombospondin-1, an inhibitor of angiogenesis, is regulated by progesterone in the human endometrium. *The Journal of Clinical Investigation* 97:403-412.

Ivaska, K. K., Hentunen, T. A., Vääräniemi, J., Ylipahkala, H., Petersson, K. & Väänänen, H. K. (2004) Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 18361-18369.

Jahangiri, L., Kim, A. & Nishimura, I. (1997) Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. *Journal of Prosthetic Dentistry* 77: 435-43.

Jardini, M. A., De Marco, A. C. & Lima, L. A. (2005) Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes. A histomorphometric study in rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 100:666-673.

Kawamoto, S. & Nagaoka, E. (2000) The effect of estrogen deficiency on the alveolar bone resorption caused by traumatic occlusion. *Journal of Oral Rehabilitation* 27:587-594.

Kawamoto, S., Ejiri, S., Nagaoka, E. & Ozawa, H. (2002) Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Archives of Oral Biology* 47: 67-73.

Kim, D. J., Park, B. L., Koh, J. M., Kim, G. S., Kim, L. H., Cheong, H. S., Shin, H. D., Hong, J. M., Kim, T. H., Shin, H. I., Park, E. K. & Kim, S. Y. (2006) Methionine synthase reductase polymorphisms are associated with serum osteocalcin levels in postmenopausal women. *Experimental & Molecular Medicine* 38: 519-24.

Kim-Schulze, S., McGowan, K. A., Hubchak, S. C., Cid, M. C., Martin, M. B., Kleinman, H. K., Greene, G. J. & Schnaper, H. W. (1996) Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 94:1402-1407.

Kleinheinz, J., Stratmann, U., Joos, U. & Wiesmann, H. -P. (2005) VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 63:1310-1316.

- Kovacs, E. J., Faunce, D. E., Ramer-Quinn, D. S., Mott, F. J., Dy, P. W. W. & Frazier-Jessen, M. R. (1996) Estrogen regulation of JE/MCP-1 mRNA expression in fibroblasts. *Journal of Leukocyte Biology* 59:562-568.
- Kribbs, P. J., Chesnut, C. H., Susan, M. & Ray, F. (1989) Relationship between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *Journal of Prosthetic Dentistry* 62: 703-707.
- Kribbs, P. J., Smith, D. E. & Chesnut, C. H. (1983) Oral findings in osteoporosis. Part II: relationship between residual ridge and alveolar bone resorption and generalized skeletal osteopenia. *Journal of Prosthetic Dentistry* 50: 719-724.
- Lantieri, L. A., Martin-Garcia, N., Wechsler, J., Mitrofanoff, M., Raulo, Y. & Baruch, J. P. (1988) Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue. A possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion. *Plastic and Reconstructive Surgery* 101: 392-398.
- Lewis, C. E., Leek, R., Harris, A. & McGee, J. O. (1995) Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology* 57:747-751.
- Li, C. F., Ross, F. P., Cao, X. & Teitelbaum, S. L. (1995) Estrogen enhances alpha v beta 3 integrin expression by avian osteoclast precursors via stabilization of beta 3 integrin mRNA. *Molecular Endocrinology* 9:805-813.
- Lindberg, M. K., Erlandsson, M., Alatalo, S. L., Windahl, S., Andersson, G., Halleen, J. M., Carlsten, H., Gustafsson, J. A. & Ohlsson, C. (2001) Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *Journal of Endocrinology* 171: 425-433.
- Luize, D. S., Bosco, A. F., Bonfante, S. & Almeida, J. M. (2008) Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in a aged rat model. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 23:207-214.
- Lundgren, S., Moy, P., Johansson, C. & Nilsson, H. (1996) Augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible: a histologic and histomorphometric study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 11:760-766.
- Marques, K. P. (1998) *Avaliação microscópica das estruturas periodontais e morfologia óssea alveolar em ratas ovariectomizadas*. [Dissertação] Bauru: Universidade de São Paulo.

- Misch, C. E. (1987) Maxillary sinus augmentation for endosteal implants: organized alternative treatment plans. *International Journal of Oral Implantology* 4:49-58.
- Morales, D. E., McGowan, K. A., Grant, D. S., Maheshwari, S., Bhartiya, D., Cid, M. C., Kleinman, H. K. & Schnaper, H. W. (1995) Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 91:755-763.
- Newman, P. J. (1997). Perspective Series: cell Adhesion in vascular biology. *The Journal of Clinical Investigation* 99: 3-8.
- Newmann, P. J. (1997) The biology of PECAM-1. *Journal of Clinical Investigation* 99:3-8.
- Nishimura, I., Hosokawa, R. & Douglas, A. (1992) The knife-edge tendency in mandibular residual ridges in woman. *Journal of Prosthetic Dentistry* 67: 820-826.
- Nociti, F. H., Sallum, A. W., Sallum, E. A. & Duarte, P. M. (2002) Effect of estrogen replacement and calcitonin therapies on bone around titanium implants placed in ovariectomized rats: a histometric study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 17: 786-92.
- Oliveira, P. T., Zalzal, S. F., Irie, K. & Nanci, A. (2003) Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 51: 633-41.
- Pacifici, R. (1992) Is there a causal role for IL-1 in postmenopausal bone loss? *Calcified Tissue International* 50: 295-299.
- Page, E. A., Hayman, A. R., Andersson, L. M., Chambers, T. J. & Warburton, M. J. (1993) Degradation of bone matrix proteins by osteoclast cathepsins. *The International Journal of Biochemistry* 25: 545-50.
- Piedboeuf, B., Gamache, M., Frenette, J., Horowitz, S. & Baldwin, H. (1998) Increased endothelial cell expression of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 during hyperoxic lung injury. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 19: 543-553.
- Price, P. A., Parthemore, J. G. & Deftos, L. J. (1980) New biochemical marker for bone metabolism. *The Journal of Clinical Investigation* 66: 878-83.
- Proussaefs, P. & Lozada, J. (2005) The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 25:351-363.

- Raghoobar, G. M., Brouwer, T. J., Reintsema, H. & Van Oort, R. P. (1993) Augmentation of the maxillary sinus floor with autogenous bone for the placement of endosseous implants: a preliminary report. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 51:1198-1203.
- Reeve, J., Arlot, M., Wootton, R., Edouard, C., Tellez, M., Hesp, R., Green, J. R. & Meunier, P. J. (1988) Skeletal blood flow, iliac histomorphometry, and strontium kinetics in osteoporosis: a relationship between blood flow and corrected apposition rate. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 66:1124-1131.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H. & Verfaillie, M. (2002) Origin of endothelial progenitor cells in human postnatal bone marrow. *The Journal of Clinical Investigation* 109: 337-46.
- Sakuta, T., Matsushita, K., Yamaguchi, N., Oyama, T., Motani, R., Koga, T., Nagaoka, S., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H. & Torii, M. (2001) Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. *Journal of Medical Microbiology* 50:233-237.
- Shimizu, M., Furuya, R., Kawawa, T. & Sasaki, T. (2000) Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *The Anatomical Record* 259: 76-85.
- Shimizu, M., Sasaki, T., Ishihara, A., Furuya, R. & Kawawa, T. (1998) Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats. *Journal of Electron Microscopy* 47: 517-26.
- Shyng, Y.C., Devlin, H., Riccardi, D. & Sloan, P. (1999) Expression of cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein during healing of the rat tooth-extraction socket. *Archives of Oral Biology* 44: 751-7.
- Slovik, D. M., Gundberg, C. M., Neer, R. M. & Lian, J. B. (1984) Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 59: 228-230.
- Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-314.
- Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314.

- Suzuki, A., Mizuno, K., Asada, Y., Ino, Y., Kuwayama, T., Okada, M., Mizutani, S. & Tomoda, Y. (1997) Effects of 17 β -estradiol and progesterone on the adhesion of human monocytic THP-1 cells to human female endothelial cells exposed to minimally oxidized LDL. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 44:47-52.
- Tanaka, S., Shimizu, M., Debari, K., Furuya, R., Kawawa, T. & Sasaki, T. (2001) Acute Effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. *The Anatomical Record* 262: 203-212.
- Tatum, H. Jr. (1986) Maxillary and sinus implant reconstructions. *Dental Clinics of North America* 30:207-229.
- Teófilo, J. M., Brentegani, L. G. & Lamano-Carvalho, T. L. (2004) Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Archives of Oral Biology* 49: 755-62.
- Tessier, P., Kawamoto, H., Matthews, D., Posnick, J., Raulo, Y., Tulasne, J. F. & Wolfe, S. A. (2005) Autogenous bone grafts and bone substitutes-tools and techniques: I A 20,000 case experience in maxillofacial and craniofacial surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery* 116(5 Suppl):6S-24S.
- Triplett, R. G. & Schow, S. R. (1996) Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 54:486-494.
- Turner, R. T., Riggs, B. L. & Spelsberg, T. C. (1994) Skeletal effects of estrogen. *Endocrine Reviews* 15: 275-300.
- Vaananen, H. K. & Harkonen, P. L. (1996) Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 23:S65-S69.
- Venkov, C.D., Rankin, A. B. & Vaughan, D. E. (1996) Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. *Circulation* 94:727-733.
- Von Wowern, N. & Kollerup, G. (1992) Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *Journal of Prosthetic Dentistry* 67: 656-660.
- von Wowern, N. (1988) Bone mineral content of mandibles: normal reference values – rate of age-related bone loss. *Calcified Tissue International* 43: 193-198.
- von Wowern, N., Klausen, B. & Kollerup, G. (1994) Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *Journal of Periodontology* 65: 1134-1138.

Wada, K., Niimi, A., Watanabe, K., Sawai, T. & Ueda, M. (2001) Maxillary sinus floors augmentation in rabbits: a comparative histomorphometric study between rhBMP-2 and autogenous bone. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 21:252-263.

Wood, R. M. & Moore, D. L. (1988) Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants* 3:209-214.

Zecchin, K. G., Pereira, M. C., Coletta, R. D., Graner, E. & Jorge, J. (2005) Ovariectomy reduces the gelatinolytic activity and expression of matrix metalloproteinases and collagen in rat molar extraction wounds. *Calcified Tissue International* 76: 136-45.

Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Médias e desvios-padrão da quantidade de tecido ósseo neoformado, nos grupos Jovens e Senis, aos 14 e 28 dias pós-operatórios.

	JOVENS		SENIS	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
	Média ± desvio-padrão	Média ± desvio-padrão	Média ± desvio-padrão	Média ± desvio-padrão
14 dias	62,37 ± 6,49 Aaφ	44,75 ± 4,24 Abδ	54,21 ± 13,94 Aaφ	32,89 ± 11,78 Abδ
28 dias	79,58 ± 7,62 Baφ	60,09 ± 6,81 Bbδ	73,65 ± 15,13 Baφ	53,09 ± 19,60 Bbδ

Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatisticamente significativa intra grupos/subgrupos em períodos diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatisticamente significativa intra grupos/subgrupos no mesmo período pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

φδ Símbolos iguais nas linhas indicam que não há diferença estatisticamente significativa inter grupos, nos mesmos períodos, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0.05$).

Tabela 2 – Imunomarcações medidas em porcentagens de PECAM-1 e OCN nos grupos Jovens e Senis, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios.

	JOVENS	SENIS	JOVENS	SENIS
	PECAM	PECAM	OCN	OCN
SHAM 7 dias	24%	16%	24%	8%
OVX 7 dias	20%	16%	12%	4%
SHAM 14 dias	72%	68%	68%	44%
OVX 14 dias	52%	28%	48%	32%
SHAM 28 dias	48%	48%	88%	68%
OVX 28 dias	40%	32%	60%	44%

Tabela 3 – Imunomarcações medidas em escores obtidos a partir das porcentagens de PECAM-1 e OCN nos grupos Jovens e Senis, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios.

ESCORES:

Ausente = + (0%) / Muito discreta = ++ (1-20%) / Discreta = +++ (21-40%)

Moderada = ++++ (41-60%) / Pouco intensa = +++++ (61-80%) / Intensa = ++++++ (81-100%)

	JOVENS	SENIS	JOVENS	SENIS
	PECAM	PECAM	OCN	OCN
SHAM 7 dias	Discreta	Muito discreta	Discreta	Muito discreta
OVX 7 dias	Muito discreta	Muito discreta	Muito discreta	Muito discreta
SHAM 14 dias	Pouco intensa	Pouco intensa	Pouco intensa	Moderada
OVX 14 dias	Moderada	Discreta	Moderada	Discreta
SHAM 28 dias	Moderada	Moderada	Intensa	Pouco intensa
OVX 28 dias	Discreta	Discreta	Moderada	Moderada

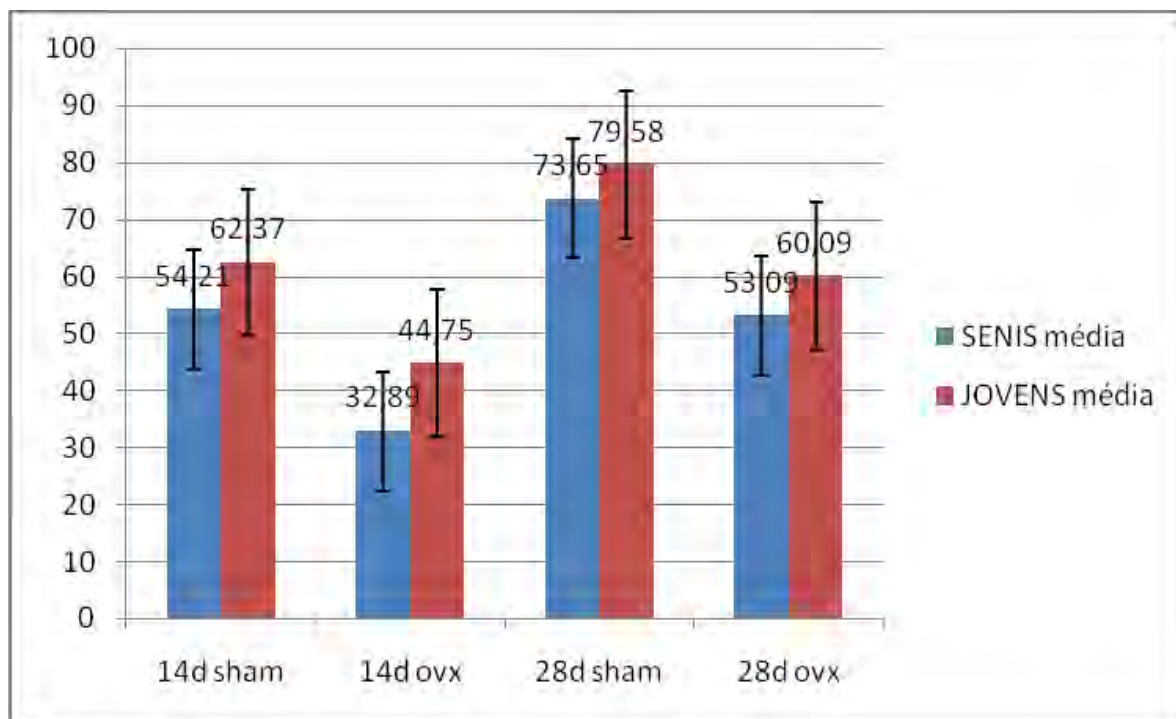


Figura 1 – AON nos grupos experimentais (Grupos Jovens e Senis; subgrupos Sham e Ovx) nos períodos de 14 e 28 dias pós-operatórios.

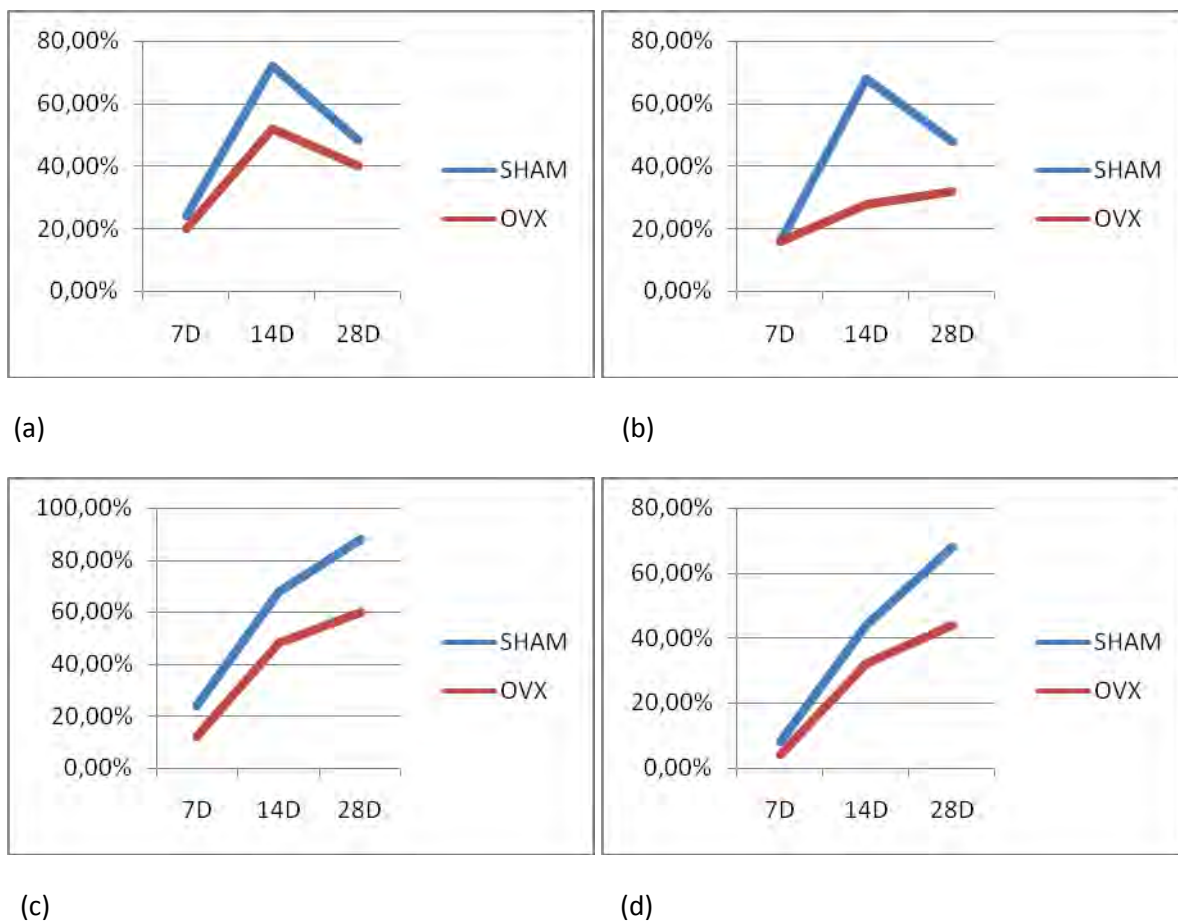


Figura 2 - Gráficos da análise semi-quantitativa das imunomarcações de PECAM-1 e OCN nos períodos analisados (7, 14 e 28 dias pós-operatórios). (a) Grupo Jovens – PECAM-1; (b) Grupo Senis – PECAM-1; (c) Grupo Jovens – OCN; (d) Grupo Senis – OCN.

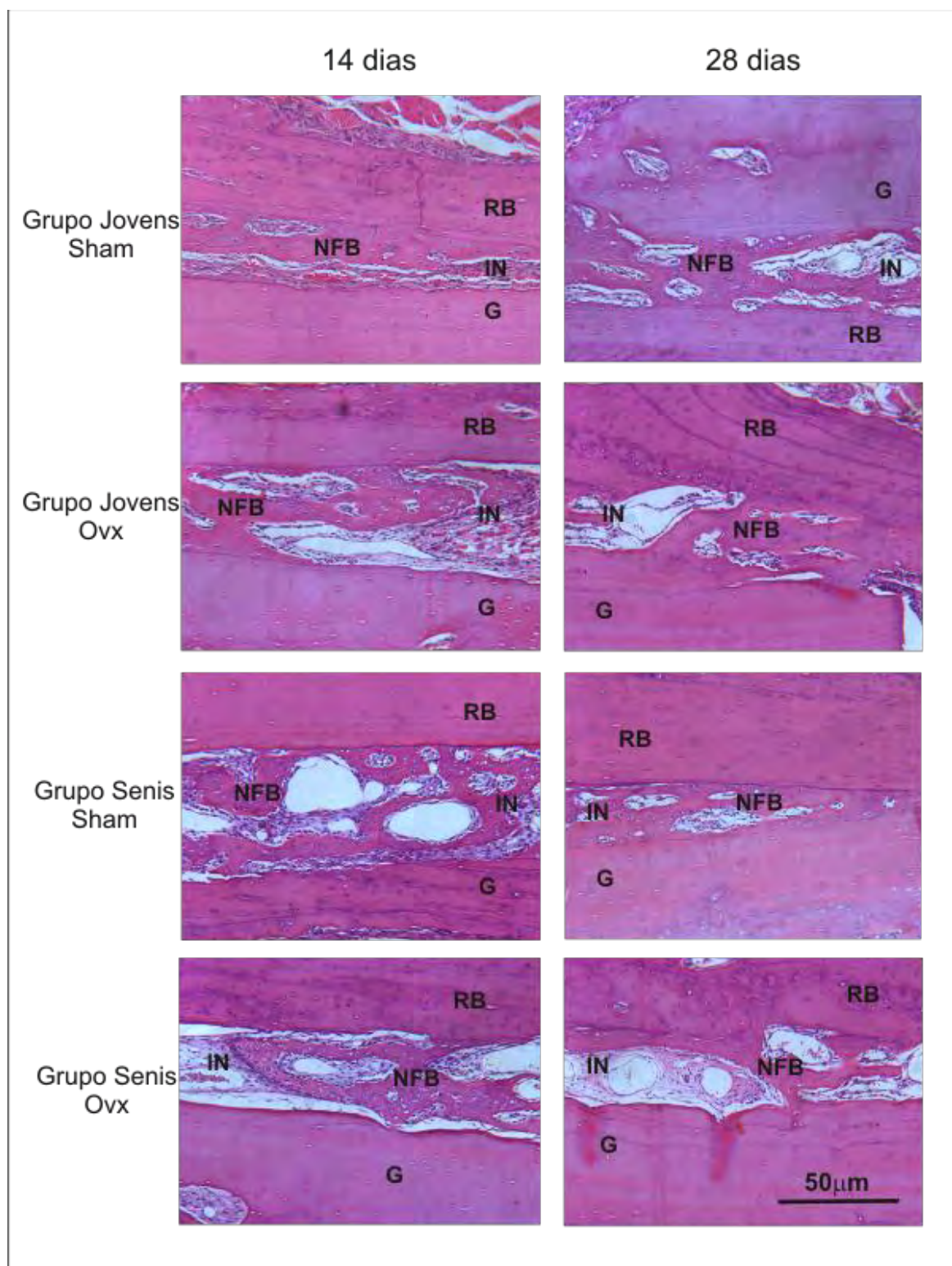


Fig. 3 - Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina dos grupos Jovens e Senis, aos 14 e 28 dias pós-operatórios (IN = interface; RB = leito receptor; NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto). Original x40.

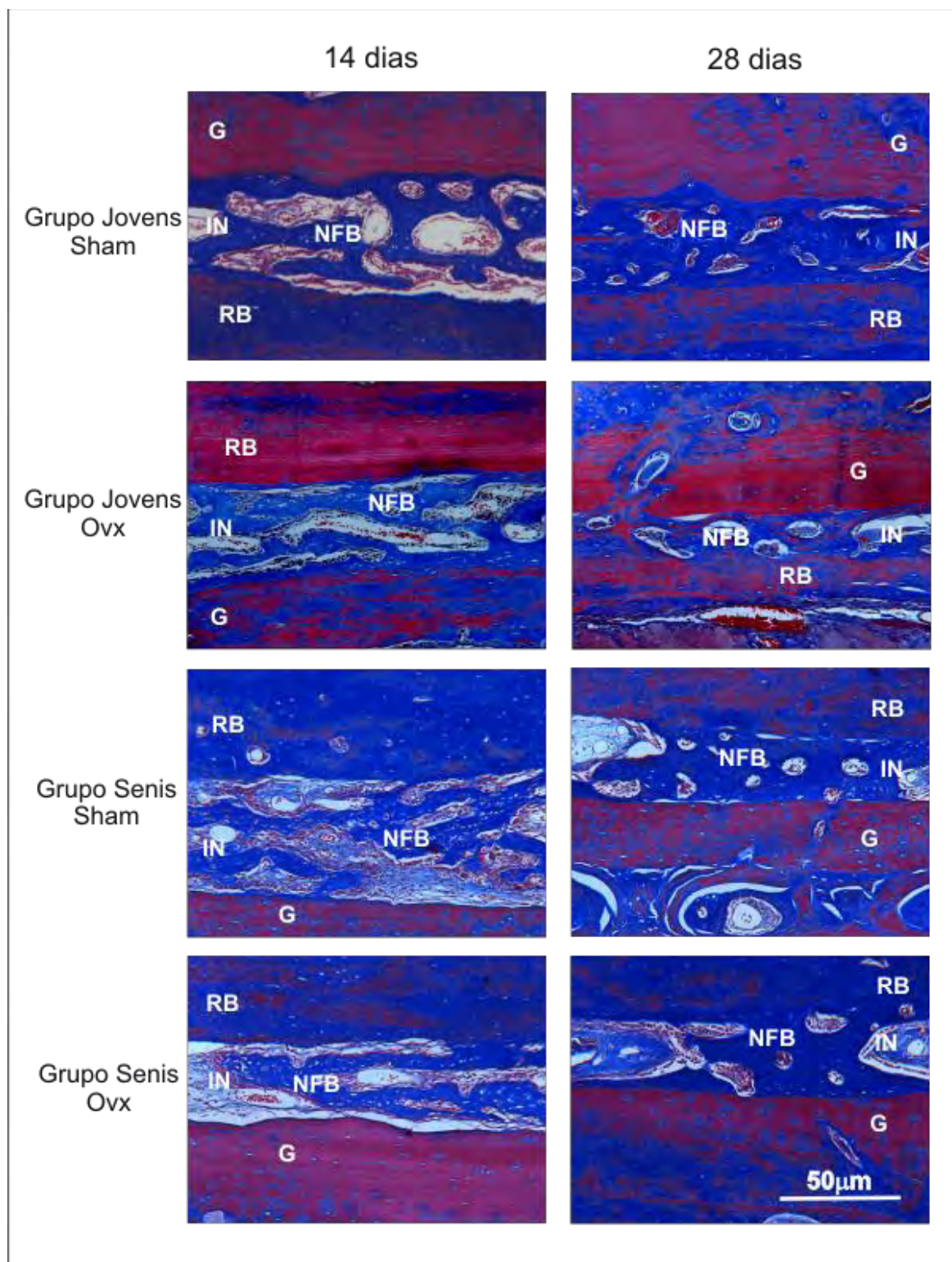


Fig. 4 - Cortes histológicos corados com Tricrômico de Masson dos grupos Jovens e Senis, aos 14 e 28 dias pós-operatórios (NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto; RB = leito receptor; IN = interface). Original x40.

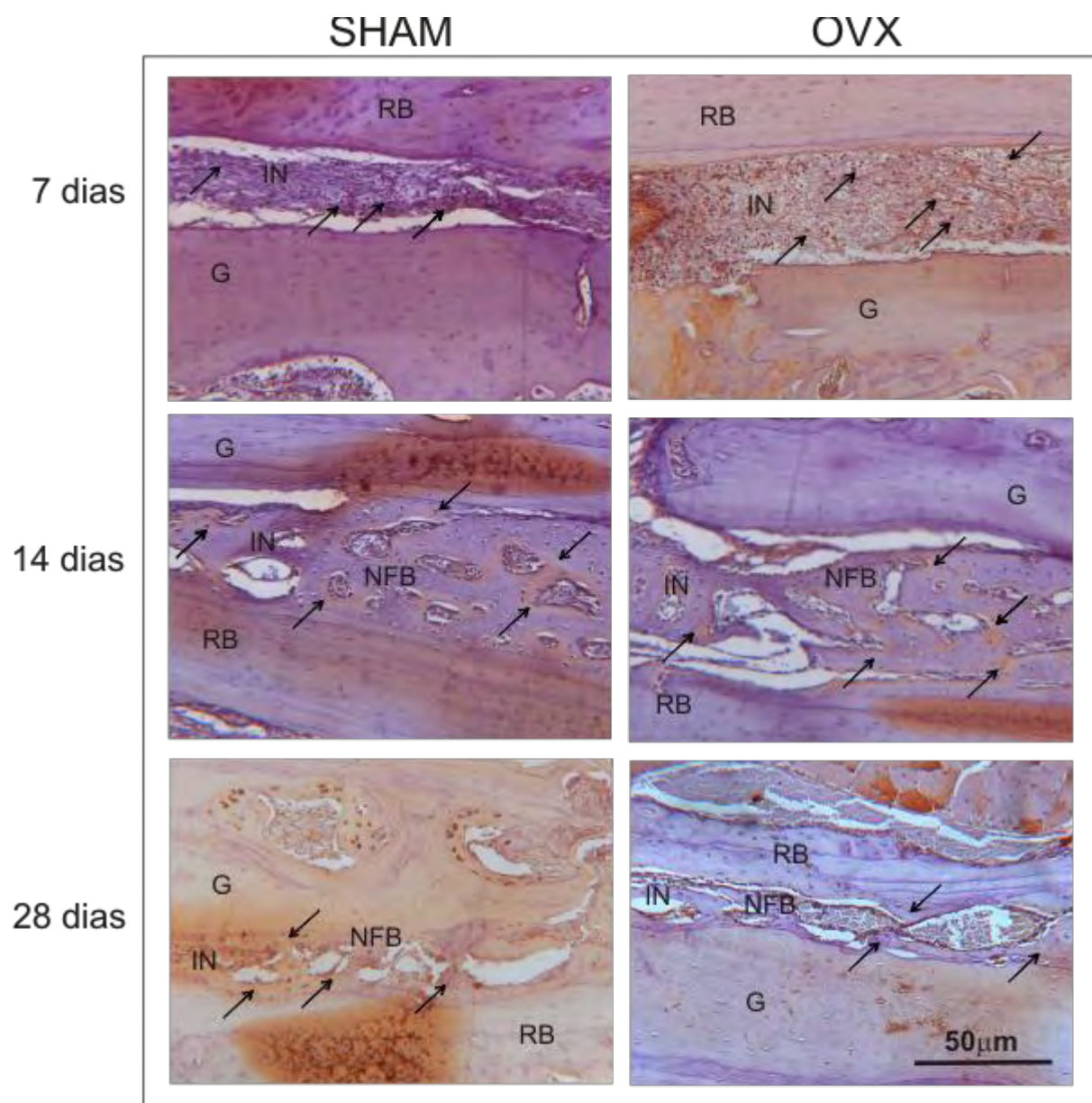


Fig. 5 - Imunomarcção de PECAM-1 na região da interface enxerto-ósseo - leito receptor no grupo Jovens, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios (IN = interface; RB = leito receptor; NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto). Original x40.

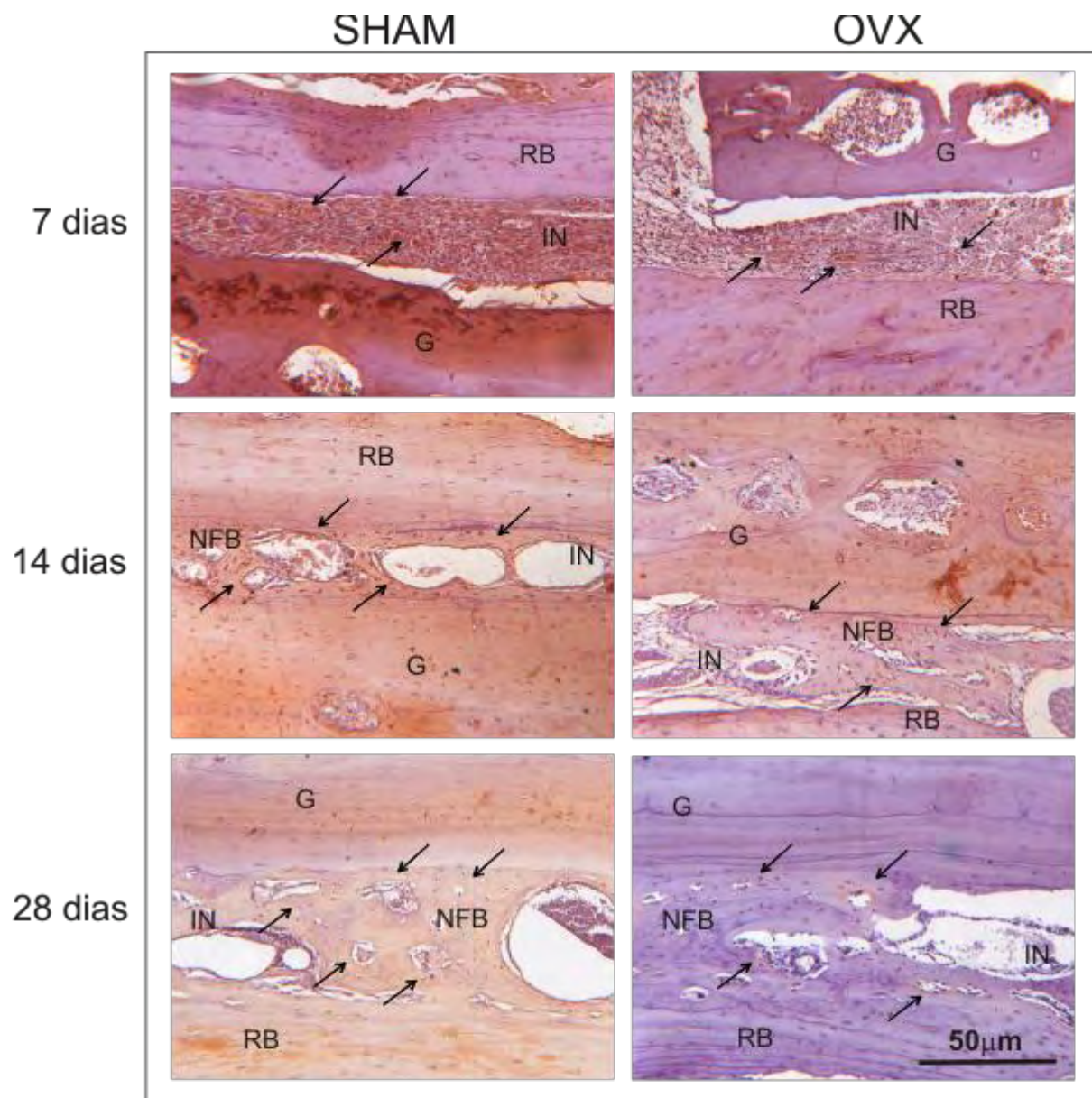


Fig. 6 - Imunomarcacão de PECAM-1 na região da interface enxerto-ósseo - leito receptor no grupo Senis, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios (IN = interface; RB = leito receptor; NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto). Original x40.

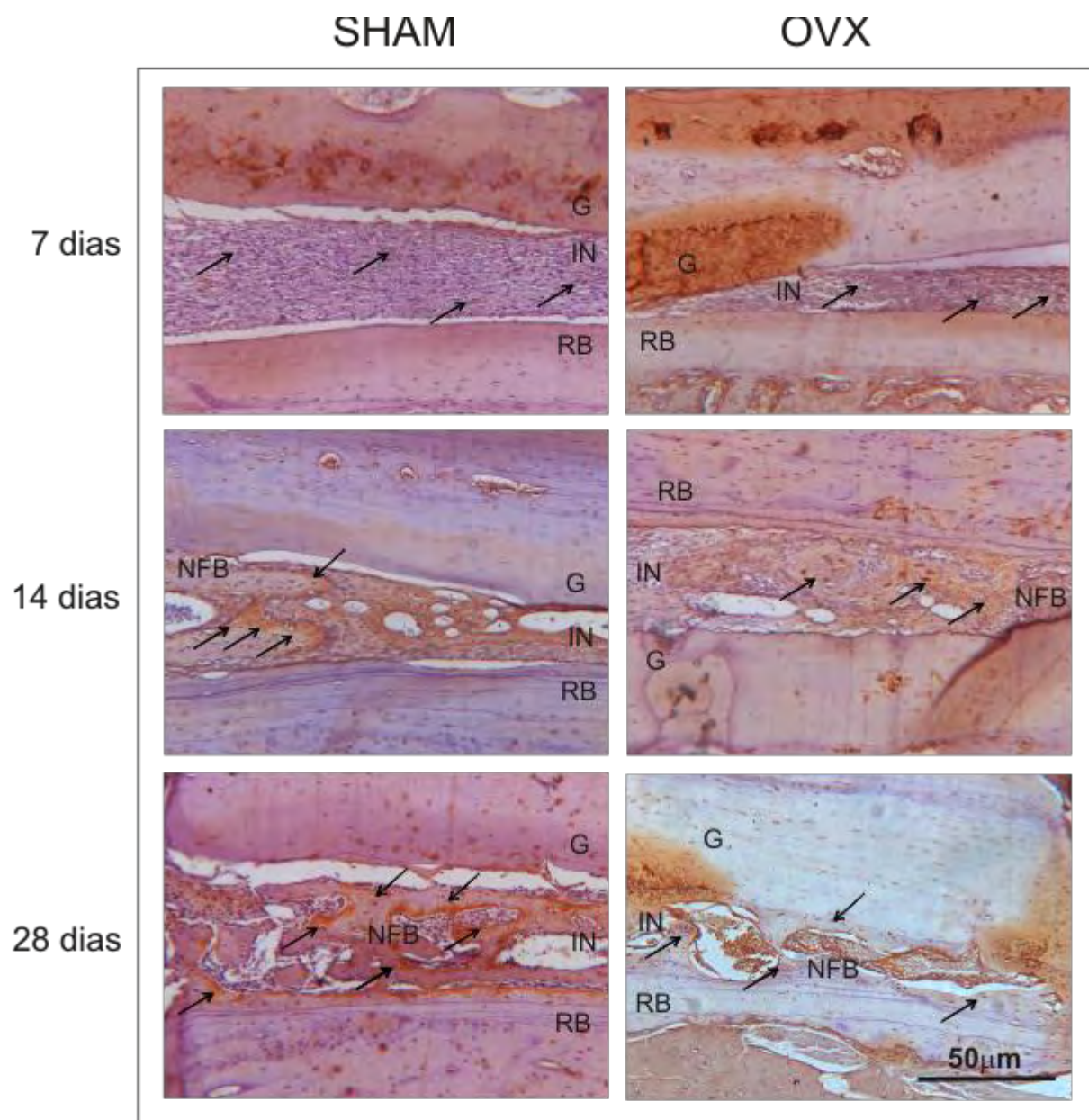


Fig. 7 - Imunomarcacão de OCN na região da interface enxerto-ósseo - leito receptor no grupo Jovens, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios (IN = interface; RB = leito receptor; NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto). Original x40.

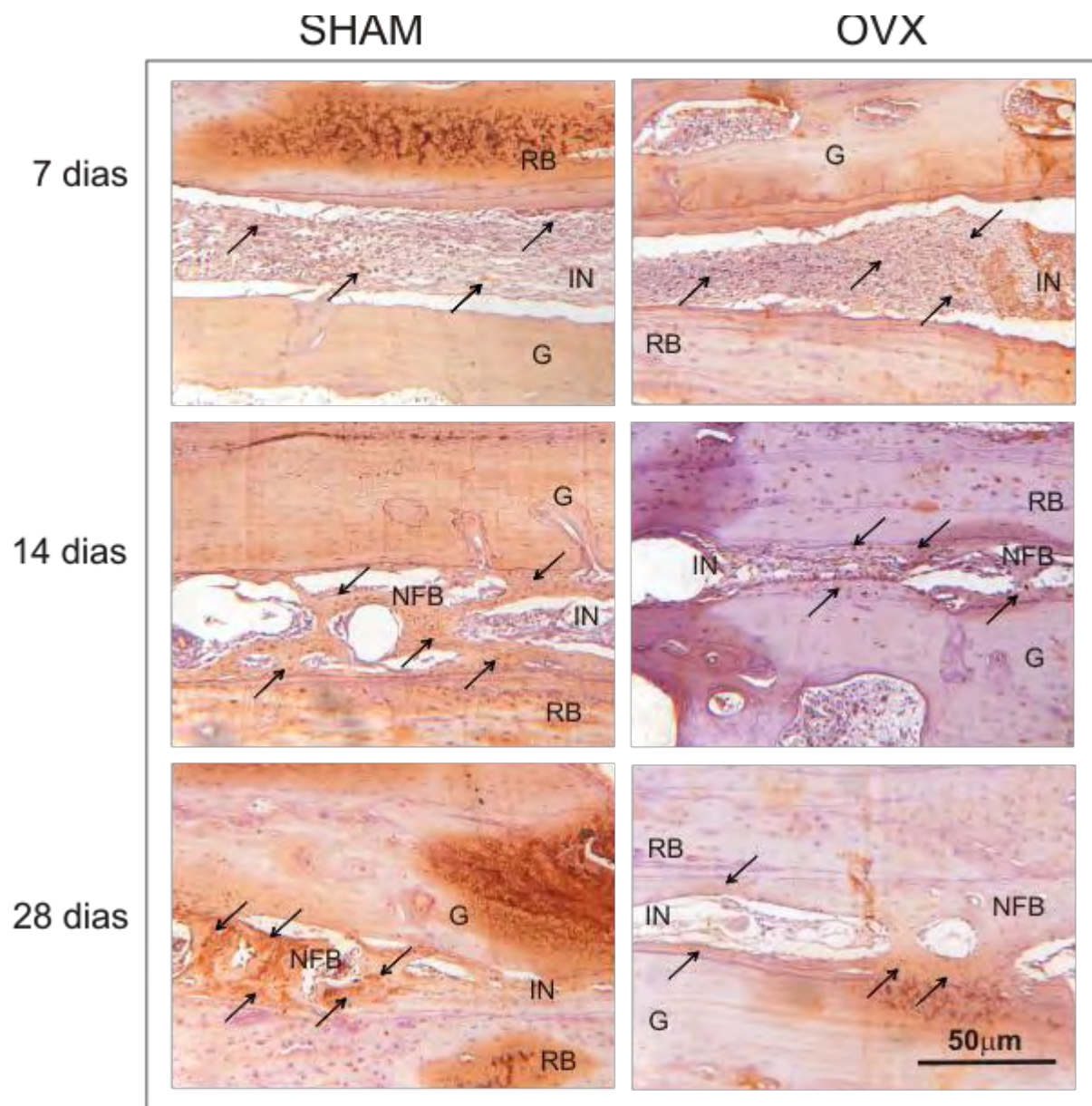
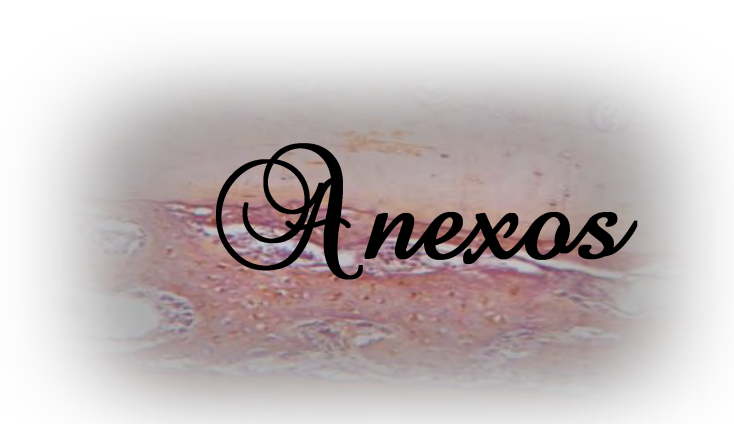


Fig. 8 - Imunomarcção de OCN na região da interface enxerto-ósseo - leito receptor no grupo Senis, subgrupos Sham e Ovx, aos 7, 14 e 28 dias pós-operatórios (IN = interface; RB = leito receptor; NFB = tecido ósseo neoformado; G = enxerto). Original x40.



Anexo A – Resultados semi-quantitativos das imunomarcações de PECAM-1 e OCN em todos os grupos e períodos experimentais.

Ratas Jovens

7 DIAS - SHAM					7 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1			RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1		
CX94R3	++	20%	++	20%	CX88R1	++	20%	++	20%
CX94R5	++	20%	+++	40%	CX88R5	+	0%	+	0%
CX95R3	+++	40%	+	0%	CX89R2	+	0%	++	20%
CX98R4	++	20%	+++	40%	CX89R3	++	20%	++	20%
CX98R5	++	20%	++	20%	CX89R5	++	20%	+++	40%
média		24%		24%	média		12%		20%

14 DIAS - SHAM					14 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1			RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1		
CX96R4	++++	60%	++++	60%	CX90R1	+++	40%	+++	40%
CX96R5	+++++	80%	+++++	80%	CX90R5	++++	60%	++++	60%
CX97R1	+++	40%	++++	60%	CX91R5	+++	40%	++++	60%
CX97R2	+++++	80%	+++++	100%	CX91R4	+++	40%	++++	60%
CX97R3	+++++	80%	++++	60%	CX91R2	++++	60%	+++	40%
média		68%		72%	média		48%		52%

28 DIAS - SHAM					28 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1			RATA	OSTEOCALCINA	PECAM-1		
BLOCO1	+++++	100%	++++	60%	BLOCO1	++++	60%	+++	40%
BLOCO2	+++++	80%	+++	40%	BLOCO2	++++	60%	+++	40%
BLOCO3	+++++	80%	+++	40%	BLOCO3	++++	60%	+++	40%
BLOCO5	+++++	100%	+++	40%	BLOCO4	+++++	80%	+++	40%
BLOCO7	+++++	80%	++++	60%	BLOCO9	+++	40%	+++	40%
média		88%		48%	média		60%		40%

Ratas Senis

7 DIAS - SHAM					7 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1		RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1	
CX3R5	+	0%	+	0%	CX2R1	++	20%	++	20%
CX9R1	++	20%	+	0%	CX21R1	+	0%	++	20%
CX9R3	++	20%	++	20%	CX21R3	+	0%	++	20%
CX9R4	+	0%	++	20%	CX22R1	+	0%	++	20%
CX18R1	+	0%	+++	40%	CX22R3	+	0%	+	0%
média		8%		16%	média		4%		16%

14 DIAS - SHAM					14 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1		RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1	
CX1R1	++++	60%	+++++	80%	CX2R4	+++	40%	++	20%
CX7R3	+++	40%	++++	60%	CX2R5	+++	40%	+++	40%
CX11R2	++	20%	+++	40%	CX6R3	++	20%	+++	40%
CX11R3	+++	40%	++++	60%	CX6R4	++	20%	++	20%
CX11R5	++++	60%	+++++	100%	CX35R4	+++	40%	++	20%
média		44%		68%	média		32%		28%

28 DIAS - SHAM					28 DIAS - OVX				
RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1		RATA	OSTEOCALCINA		PECAM-1	
CX8R2	++++	60%	+++	40%	CX1R5	++++	60%	+++	40%
CX8R4	+++++	80%	+++	40%	CX3R2	++	20%	+++	40%
CX10R1	+++++	80%	++++	60%	CX3R3	+++	40%	+++	40%
CX10R2	++++	60%	++++	60%	CX4R4	+++	40%	++	20%
CX10R4	++++	60%	+++	40%	CX5R4	++++	60%	++	20%
média		68%		48%	média		44%		32%

MARCAÇÕES	ESCORES	
ausente	+	0%
muito discreta	++	20%
discreta	+++	40%
moderada	++++	60%
pouco intensa	+++++	80%
intensa	+++++	100%

Anexo B – PROTOCOLO DE IMUNOÍSTOQUÍMICA – TÉCNICA DA IMUNOPEROXIDASE (www.erviegas.com.br)

1º dia: começar os 2 dias no mesmo horário

a- colocar as lâminas na estufa a 60° por 15 minutos para amolecer a parafina

b- colocar as lâminas na grade:

1- Passar no Xilol 1, 2, 3 (5 minutos cada)

2- Passar no Álcool absoluto 1, 2, 3 (2 minutos cada)

3- Passar no Álcool 70% por 2 minutos (hidrata)

4- Lavar em PBS: 3 banhos de 1,5 minutos cada (5 minutos no total)

PBS com Triton – para lavar (pode usar os mesmos frascos, só lavar com água corrente entre as trocas)

PBS sem Triton – para diluir o anticorpo

c- H₂O₂ a 30% (20mL) em 180mL de PBS sem Triton (a solução final fica a 3%). Fazer esta solução e deixar e deixar as lâminas por 45 minutos, no escuro, para não perder a ação (diminuir a atividade da peroxidase). Para deixar no escuro, cobrir com um tupperware de cor opaca.

d- Lavar com PBS + Triton por 5 minutos – 3 banhos de 1,5 minuto

e- Tampão citrato (preparar na hora). Não precisa ser no escuro. Aquecer antes, até atingir 95-100°. Então colocar as lâminas e deixar por 20 minutos. Depois deixar 20 minutos esfriando na bancada.

f- Não lavar as lâminas aqui. Ir para a etapa do leite mólico.

g- Colocar as lâminas no leite mólico desnatado. Preparar na hora. O leite tem muita avidina que consome a biotina endógena. **Preparo:** Misturar 8g de leite em pó com 200mL de H₂O destilada. Agitar sem medir o pH e deixar as lâminas por 20 minutos.

h- Não lavar, só secar com papel filtro. Delimitar com caneta, o corte.

- i- Pipetar em cima do corte 50 ou 100µL de anticorpo primário. **Preparo do PBS.BSA a 0,1%:** Para obtermos BSA 0,1%, coloca-se 0,1 g de BSA em 100 mL de PBS sem Triton. Então para 30mL de PBS sem Triton coloco 0,03g de BSA. **Diluição do anticorpo primário com PBS.BSA 0,1%:**

Começo sempre da menor concentração:

- 1:50
- 1:100
- 1:200
- 1:400
- 1:500 (padronizar)

Um exemplo: 1:50 = 10µL de anticorpo + 490µL PBS.BSA 0,1%. Isto corresponde a 20 µL de anticorpo primário + 980 µL de PBS.BSA 0,1%. Para fazer este cálculo faço o seguinte: 1:50 = 1000:50 = 20 µL. Esta será a quantidade de anticorpo para o restante de PBS.BSA. Ou seja, o que falta para completar 1mL (980 µL). Depois de feito isso, calculo o total de lâminas e quanto de cada anticorpo vou pipetar nos cortes, para saber qto de anticorpo diluído vou precisar (ex: se para cada corte gasto 50 µL, qdo tiver 10 cortes, gastarei 500 µL).

- j- Repousar em geladeira (ou ambiente) por 18hs, dentro de um suporte fechado com tampa.

2º dia: começar os 2 dias no mesmo horário

Observações: Controles + e -. Lavar sempre em potes separados para não contaminar com anticorpo as lâminas que estão sem anticorpo.

- Para cada reação (independente do número de lâminas e cortes) eu corro 3 lâminas separadas. Ex: 10 lâminas minhas que serão o controle positivo, ou seja, receberão anticorpo. Mais: 1 lâmina minha sem anticorpo (controle negativo), uma lâmina com tumor e anticorpo (controle positivo) e uma lâmina com tumor e sem anticorpo (controle negativo).

- a- Lavar as lâminas em PBS com Triton por 5 minutos (2,5minutos cada)
- b- Secar as lâminas com papel filtro ou lenço de papel e colocar no porta lâminas
- c- Pipetar o anticorpo secundário já diluído = 50 µL. A diluição vem descrita na bula.

- d- Deixar 1 hora em temperatura ambiente. Depois lavar por 5 minutos em PBS + Triton (3 vezes de 1,5 minuto, com total de 5 minutos).
- e- Depois de 15 minutos (faltando 45 minutos para completar 1 hora) já preparo o complexo. Preparo do complexo para 20 lâminas: Ver no kit. Geralmente são 3 soluções A + B + C (anticorpo). Pegar 10 μ L A + 10 μ L B + 1680 μ L de PBS.BSA. Pipetar o complexo sobre os cortes e deixar por 45 minutos. A quantidade de pipetagem é a mesma para os cortes. Desde o início ao fim.
- f- Lavar 5 minutos em PBS + Triton. Não secar.
- g- Aplicar a DAB (1mL de substrato + 1 gota de DAB) para 20 lâminas. Fica cor de laranja. Esta deve ser preparada na hora. Aplicar 50 μ L de cromógeno na “câmara escura” por 5 minutos.
- h- Lavar em H₂O destilada – colocar em cuba com água para paralisar a reação e pode corar imediatamente.
- i- Corar só com Hematoxilina sem Eosina, pela técnica convencional com os tempos normais para HE. Após a Hematoxilina, lava por 10 mins em água corrente, depois já passa pelos álcoois e xilol, e monta as lâminas.

Reconstituição do anticorpo secundário: Coloco 1mL de água destilada. Para calcular quanto dele uso (diluição), vejo na bula que recomenda: 2-10 μ L/mL.

Se pretendo usar 1:200, vou analisar se está dentro da faixa recomendada.

Pego a quantidade total de pó que reconstitui (1,5mg) e divido pela diluição que quero: 200. Então, $1,5\text{mg}:200 = 0,0075\text{mg}$ em 1mL. Ou seja, 7,5 $\mu\text{g/mL}$.

PREPARO DAS SOLUÇÕES DE TAMPÃO PARA IMUNO:

Tampão Fosfato Salino (PBS) – pH 7.2 a 7.4

1 Litro de água destilada

1,38g NaH₂PO₄.H₂O (fosfato monobásico de sódio monohidrato)

6,96g K₂HPO₄

7,2g NaCl (cloreto de sódio)

Conferir o pH

Para facilitar, preparar concentrado 10 vezes e diluir no momento do uso.

PBS + Triton

Para cada litro de PBS, adicionar 1mL de triton

H₂O₂ 3%

180mL de PBS sem triton

20mL de H₂O₂ 30% (estoque)

Tampão Fosfato-Citrato - pH 6.0

200mL de água destilada

1,42g de fosfato dibásico de sódio anidro

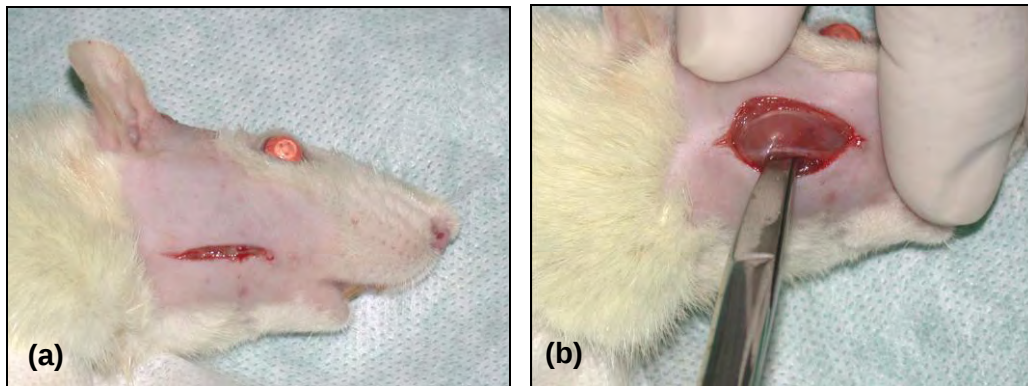
0,96g de ácido cítrico

Conferir o pH

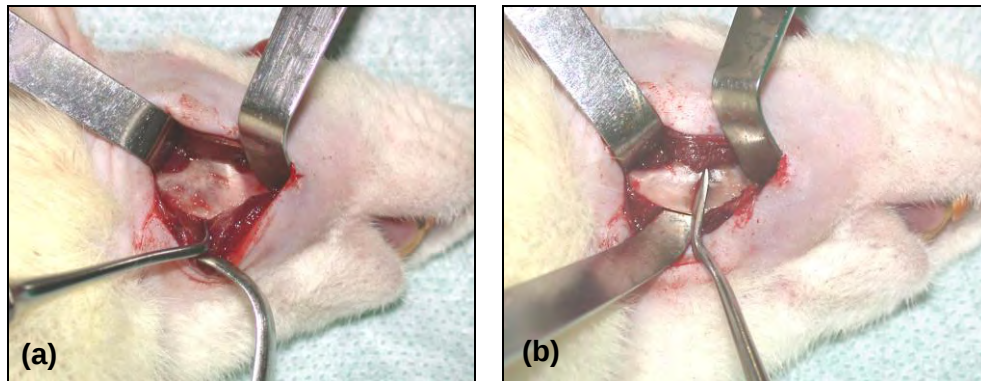
Este tampão deve começar a ser aquecido enquanto as lâminas estiverem na água oxigenada, para que no momento da incubação a solução tenha atingido a temperatura ideal.

Todas as soluções, exceto o PBS, devem ser preparadas no momento do uso. Os reagentes podem ser previamente pesados e armazenados na quantidade certa.

Anexo C- Ilustração do Procedimento Cirúrgico.



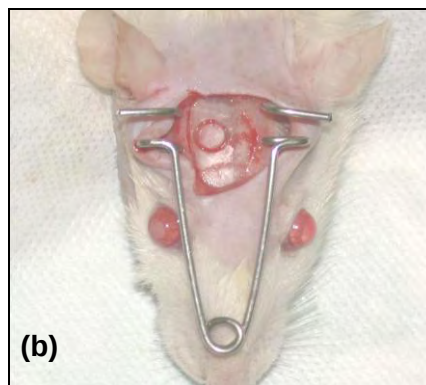
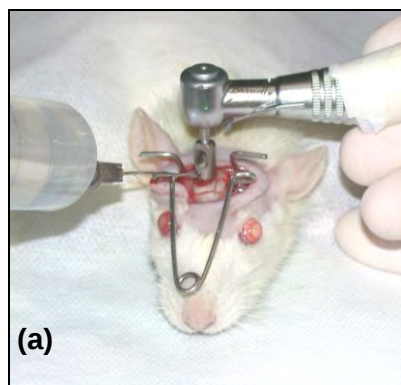
1. Preparo do leito receptor. a) incisão linear na região de ângulo da mandíbula expondo o músculo masseter; b) divulsão do músculo masseter com tesoura de ponta romba.



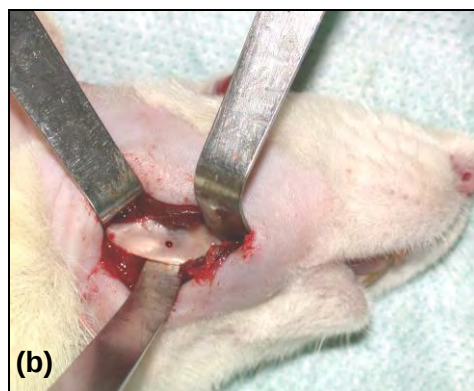
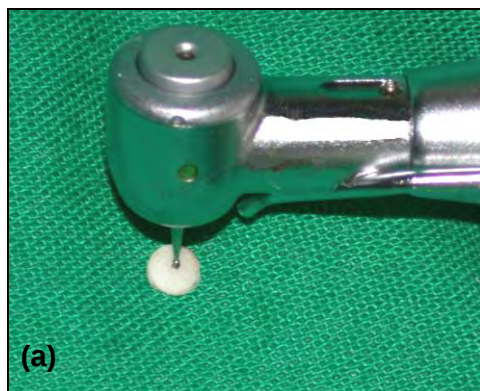
2. Preparo do leito receptor. a) deslocamento do periósteo do lado medial da mandíbula juntamente com o músculo pterigóideo medial, com auxílio de um Hollenback nº.3s; b) raspagem superficial do leito receptor para remoção do periósteo.



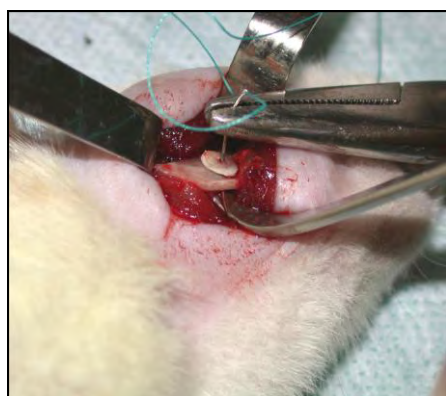
3. Afastadores especialmente desenvolvidos para adequada visualização e acesso ao leito receptor da mandíbula.



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

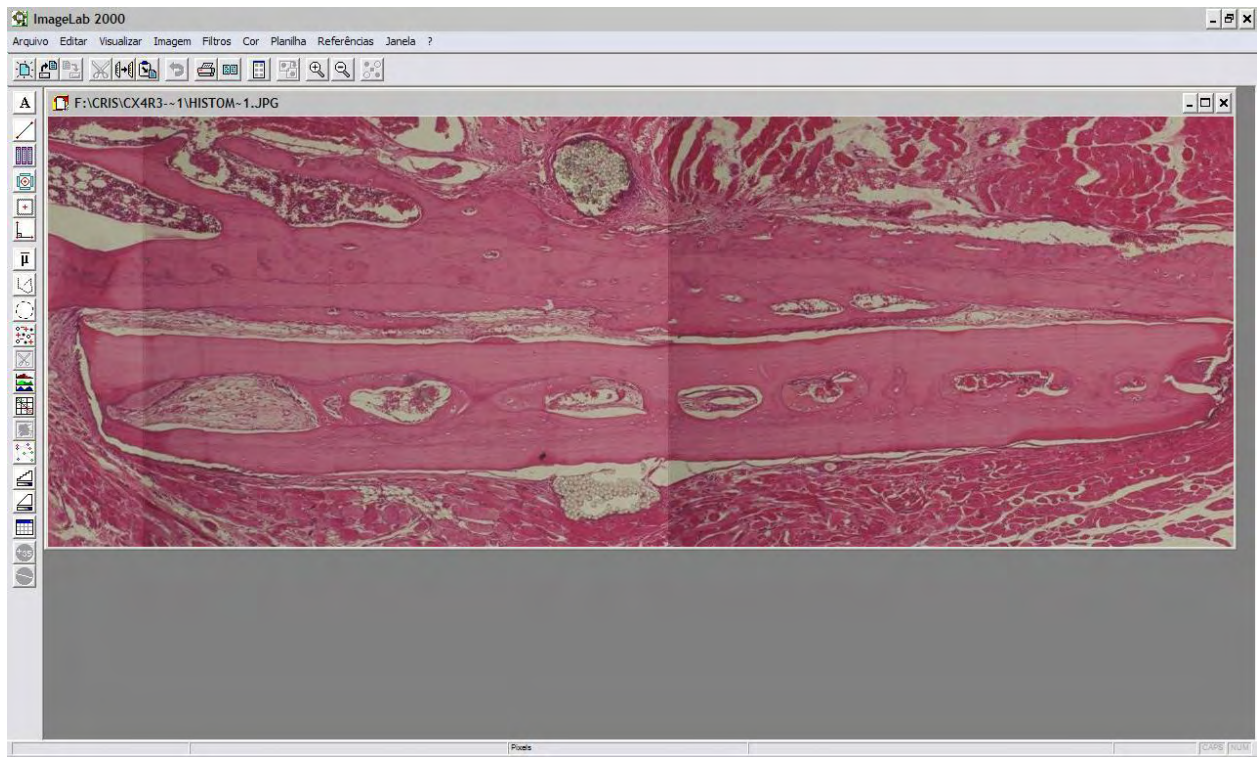


5. Enxerto ósseo. a) broca $\frac{1}{2}$ posicionada no centro do enxerto ósseo para perfuração; b) perfuração do leito receptor da mandíbula com broca $\frac{1}{2}$.

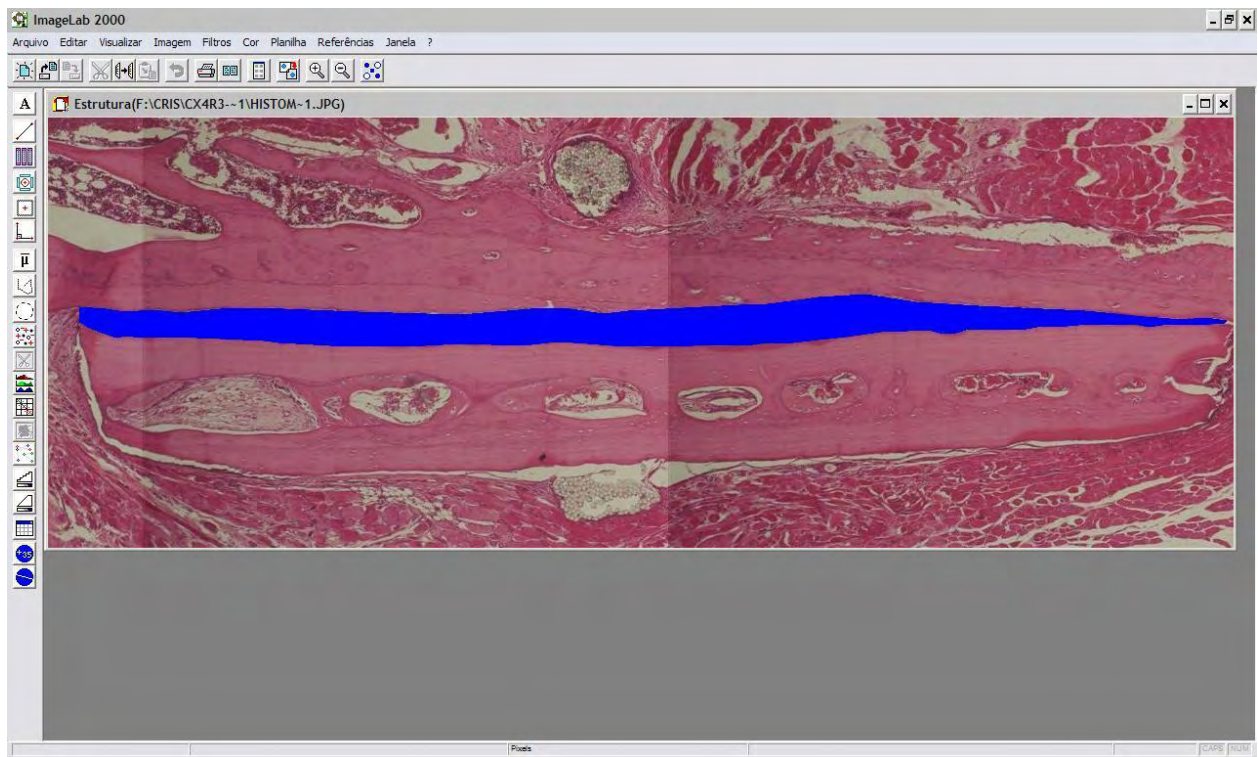


6. Fixação do enxerto. a) fio de poliéster verde trançado n°.5-0 transpassando o enxerto ósseo e o leito receptor da mandíbula. b) Enxerto suturado e estabilizado.

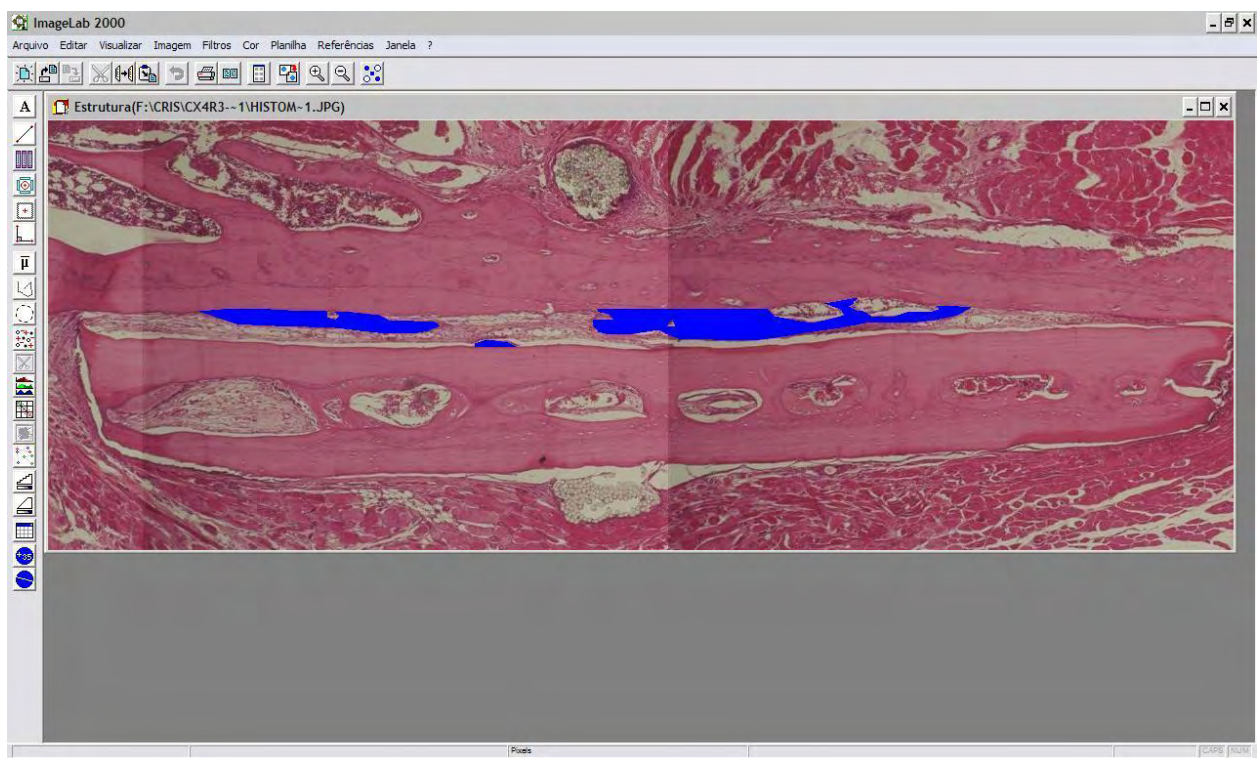
Anexo D - Ilustração da Análise histométrica.



A – Imagem selecionada para análise histométrica com o programa ImageLab 2000.



B – Delimitação da Área Total da interface enxerto ósseo-leito receptor.



C – Delimitação de cada unidade de tecido ósseo neoformado (AON) na região da interface enxerto ósseo-leito receptor.

Anexo E – Normas para publicação

CLINICAL ORAL IMPLANTS RESEARCH

Clinical Oral Implants Research

Official publication of the European Association for Osseointegration

Edited by:

Niklaus P. Lang

Print ISSN: 0905-7161

Online ISSN: 1600-0501

Frequency: Monthly

Current Volume: 19 / 2008

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2007: 9/51 (Dentistry, Oral Surgery & Medicine); 12/44 (Engineering, Biomedical)

Impact Factor: 2.148

Top **Author Guidelines**

Content of Author Guidelines: [1. General](#), [2. Ethical Guidelines](#), [3. Submission of Manuscripts](#), [4. Manuscript Types Accepted](#), [5. Manuscript Format and Structure](#), [6. After Acceptance](#).

Relevant Document: [Copyright Transfer Agreement](#)

Useful Websites: [Submission Site](#), [Articles published in *Clinical Oral Implants Research*](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

1. GENERAL

Clinical Oral Implants Research conveys scientific progress in the field of implant dentistry and its related areas to clinicians, teachers and researchers concerned with the application of this information for the benefit of patients in need of oral implants. The journal addresses itself to clinicians, general practitioners, periodontists, oral and maxillofacial surgeons and prosthodontists, as well as to teachers, academicians and scholars involved in the education of professionals and in the scientific promotion of the field of implant dentistry.

Clinical Oral Implants Research publishes:

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts.

Case reports and case series only if they provide or document new fundamental knowledge.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Clinical Oral Implants Research*. Authors are encouraged to visit [Blackwell Publishing Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

2. ETHICAL GUIDELINES

Clinical Oral Implants Research adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the manuscript have been read and approved by all authors and that all authors agree to the submission of the manuscript to the Journal. ALL named authors must have made an active contribution to the conception and design and/or analysis and interpretation of the data and/or the drafting of the paper and ALL must have critically reviewed its content and have approved the final version submitted for publication. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship.

Clinical Oral Implants Research adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on 1) substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2 and 3.

Up to 6 authors are accepted without need for justification. In the case of a specific and detailed justification of the role of every author, up to 8 authors may be mentioned. It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editor reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A [CONSORT checklist](#) should also be included in the submission material.

Clinical Oral Implants Research encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.fda.gov>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest and Source of Funding

Clinical Oral Implants Research requires that sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript be fully acknowledged, and any potential conflicts of interest noted. Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included. Information concerning conflict of interest and sources of funding should be included under Acknowledgements.

2.5 Appeal of Decision

The decision on a paper is final and cannot be appealed.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign copyright to Blackwell Publishing if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Upon acceptance of a paper, authors are required to assign the copyright to publish their paper to Blackwell Publishing. Assignment of the copyright is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. (Papers subject to government or Crown copyright are exempt from this requirement; however, the form still has to be signed). A completed Copyright Transfer Agreement must be sent to the address or email address specified below, before any manuscript can be published. Authors must send the completed Copyright Transfer Agreement

upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the Copyright Transfer Agreement at submission. Faxing or e-mailing the form does not meet requirements.

Return Address

Att.: Poh Hoon TENG
Wiley Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road, #05-01 Parkview Square
Singapore 188778
Or by fax: +65 6295 6202
Or by Email: phheng@wiley.com

For questions concerning copyright, please visit [Blackwell Publishing's Copyright FAQ](#)

3. SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. Further assistance can be obtained from the Editorial Assistant Ms. Brigitte Baur. E-mail: coir@zmk.unibe.ch

3.1. Getting Started

Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 6 or higher, Netscape 7.0, 7.1, or 7.2, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>

- Log-in or click the "Create Account" option if you are a first-time user.
- If you are creating a new account.
 - After clicking on "Create Account", enter your name and e-mail information and click "Next". Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click "Next."
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your area of expertise. Click "Finish".
- If you have an account, but have forgotten your log in details, go to Password Help on the journals online submission system <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and enter your e-mail address. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select Corresponding Author Center.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged in, click the "Submit a Manuscript" link in the menu bar.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the "Next" button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the "Browse" button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop-down menu next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the "Upload Files" button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before sending to the Journal. Click the "Submit" button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.doc) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance "Figure 1", "Figure 2" etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below. Please note that any manuscripts uploaded as Word 2007 (.docx) will be automatically rejected. Please save any .docx file as .doc before uploading.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* will be reviewed by two experts in the field. *Clinical Oral Implants Research* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suggest a Reviewer

Clinical Oral Implants Research attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, please suggest the names and current email addresses of one potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript. In addition to your choice the journal editor will choose one or two reviewers as well.

3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the "Submit" button and save it to submit later. The manuscript can then be located under "Unsubmitted Manuscripts" and you can click on "Continue Submission" to continue your submission when you choose to.

3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation email after 24 hours, please check

your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our email server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.8. Manuscript Status

You can access Manuscript Central any time to check your "Corresponding Author Center" for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit your revised manuscript, locate your manuscript under "Manuscripts with Decisions" and click on "Submit a Revision". Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original research articles of high scientific merit in the field of material sciences, physiology of wound healing, biology of tissue integration of implants, diagnosis and treatment planning, prevention of pathologic processes jeopardizing the longevity of implants, clinical trials on implant systems, stomatognathic physiology related to oral implants, new developments in therapeutic concepts and prosthetic rehabilitation.

Review articles by experts on new developments in basic sciences related to implant dentistry and clinically applied concepts. Reviews are generally by invitation only and have to be approved by the Editor-in-Chief before submission.

Case reports and case series, but only if they provide or document new fundamental knowledge and if they use language understandable to the clinician.

Novel developments if they provide a technical novelty for any implant system.

Short communications of important research findings in a concise format and for rapid publication.

Treatment rational by experts with evidence-based treatment approach.

Proceedings of international meetings may also be considered for publication at the discretion of the Editor.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 10 pages (including figures, tables and references) are subject to a charge of USD\$160 per additional page. One published page equates to approximately 3 manuscript pages or 650 words (excluding figures and tables).

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language might choose to have their manuscript professionally edited by an English speaking person before submission to make sure the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. In vitro, in vivo, in situ and other Latin expressions are to be italicised. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of Webster's third new international dictionary will be adhered to.

Scientific Names: Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined on the typescript. The full proper name (e.g., *Streptococcus sanguis*) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e.g., *S. sanguis*). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e.g., streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalised and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e.g., Ps. for *Peptostreptococcus*) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, it must be attached when the term is first used.

5.2. Structure

All manuscripts submitted to *Clinical Oral Implants Research* should include Title Page, Abstract, Main Text and Acknowledgements, Tables, Figures and Figure Legends as appropriate.

Title Page: should contain the title of the article, full name(s) of the authors (no more than 6) and institutional affiliation(s), a running title not exceeding 60 letters and spaces, and the name, telephone and fax numbers, email and complete mailing address of the author responsible for correspondence. The author must list appropriate key words for indexing purposes.

Abstract: should not exceed 250 words. This should be structured into: objectives, material and methods, results, conclusions, and no other information.

Main Text of Original Research Article should include Introduction, Material and Methods, Results and Discussion.

Introduction: Summarise the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods: Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made. Indicate the statistical methods used, if applicable.

Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all data in the tables and illustrations. The important observations should be emphasised.

Discussion: Summarise the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

Main Text of Short Communications: Short communications are limited to two printed pages including illustrations and references and need not follow the usual division into material and methods, etc., but should have an abstract.

Acknowledgements: Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support should be acknowledged.

5.3. References

References should quote the last name(s) of the author(s) and the year of publication (Black & Miller 1988). Three or more authors should always be referred to as, for example, (Fox et al. 1977).

A list of references should be given at the end of the paper and should follow the recommendations in Units, symbols and abbreviations: a guide for biological and medical editors and authors (1988), p. 52, London: The Royal Society of Medicine.

a) The arrangement of the references should be alphabetical by author's surname.

b) The order of the items in each reference should be:

(i) for journal references:

name(s) of author(s), year, title of paper, title of journal, volume number, first and last page numbers.

(ii) for book references:

name(s) of author(s), year, title of book, edition, volume, chapter and/ or page number, town of publication, publisher.

c) Author's names should be arranged thus: Daniels, J.A., Kelly, R.A. & Til, T.C.

Note the use of the ampersand and omission of comma before it. Author's names when repeated in the next reference are always spelled out in full.

d) The year of publication should be surrounded by parentheses: (1966).

e) The title of the paper should be included, without quotation marks.

f) The journal title should be written in full, italicised (single underlining on typescript), and followed by volume number in bold type (double underlining on typescript), and page numbers.

Examples:

Tonetti, M. S., Schmid, J., Hämmerle, C. H. & Lang, N. P. (1993) Intraepithelial antigen-presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. *Clinical Oral Implants Research* 4: 177-186.

Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. (1978) Some aspects of the intracellular breakdown of exogenous and endogenous proteins. In: Segal, H.S. & Doyle, D.J., eds. *Protein turnover and lysosome function*, 1st edition, p. 43. New York: Academic Press.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](http://www.endnote.com) or [Reference Manager](http://www.refman.com) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: www.endnote.com/support/enstyles.asp. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp.

5.4. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

Figures: All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single-column width (81 mm) after reduction, although in exceptional cases 120mm (double-column) and 168 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Each figure should have a legend

Preparation of Electronic Figures for Publication: Although low quality images are adequate for review purposes, print publication requires high quality images to prevent the final product being blurred or fuzzy. Submit EPS (lineart) or TIFF (halftone/photographs) files only. MS PowerPoint and Word Graphics are unsuitable for printed pictures. Do not use pixel-oriented programmes. Scans (TIFF only) should have a resolution of 300 dpi (halftone) or 600 to 1200 dpi (line drawings) in relation to the reproduction size (see below). EPS files should be saved with fonts embedded (and with a TIFF preview if possible). For scanned images, the scanning resolution (at final image size) should be as follows to ensure good reproduction: lineart: >600 dpi; half-tones

(including gel photographs): >300 dpi; figures containing both halftone and line images: >600 dpi.

Further information can be obtained at Blackwell Publishing's guidelines for figures: www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp.

Check your electronic artwork before submitting it: www.blackwellpublishing.com/bauthor/echecklist.asp

Permissions: If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html. This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within three days of receipt.

Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately. Other than in exceptional circumstances, all illustrations are retained by the publisher. Please note that the author is responsible for all statements made in his work, including changes made by the copy editor.

Articles should not normally exceed 10 printed pages, including illustrations and references. Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of USD 160 per page.

6.2 Early Online Publication Prior to Print

Clinical Oral Implants Research is covered by Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.3 Author Services

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services. Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/Bauthor/ for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

For more substantial information on the services provided for authors, please see [Blackwell Publishing Author Services](#)

6.4 Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible.

6.5 Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: Offprint.Cosprinters. If you have queries about offprints please e-mail offprint@cosprinters.com

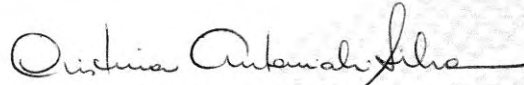
6.6 Author Services

For more substantial information on the services provided for authors, please see [Blackwell Publishing Author Services](#)

6.7 Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate

Anexo F – Certificado do Comitê de Ética em Experimentação Animal

		UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba	
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)			
CERTIFICADO			
Certificamos que o Projeto "IMUNOMARCAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL E DA OSTEOCALCINA NO PROCESSO DE REPARO DE ENXERTO ÓSSEO EM BLOCO EM RATAS OVARECTOMIZADAS" sob responsabilidade do Prof. Dr. ÁLVARO FRANCISCO BOSCO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela CEEA em 28 de setembro de 2007, de acordo com o protocolo no. 2007-004081.			
Araçatuba, 17 de outubro de 2007.			
 Profª Drª CRISTINA ANTONIALI SILVA Presidente da CEEA - FOA/UNESP			
			
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP Tel (18) 3636-3200			