

Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Área de Concentração Periodontia

**Maria Bibiana Bartolomei Grassi**

O EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NO  
PREENCHIMENTO DE DEFEITOS ÓSSEOS TRATADOS OU  
NÃO COM UM BIOMATERIAL. ESTUDO RADIOGRÁFICO  
EM RATAS

Curitiba

2009

Maria Bibiana Bartolomei Grassi

O EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NO  
PREENCHIMENTO DE DEFEITOS ÓSSEOS TRATADOS OU  
NÃO COM UM BIOMATERIAL. ESTUDO RADIOGRÁFICO  
EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia  
Universidade Católica do Paraná como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Mestre em  
Odontologia, área de Concentração Periodontia  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Sônia Mara Luczyszyn



PUCPR

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

**PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

CEUA PUCPR

**Registro do projeto no CEUA:** 310

**Data do parecer:** 13/03/2008

**Título do Projeto:**

O efeito da deficiência de estrógeno no preenchimento de defeitos ósseos tratados ou não com Bone Ceramic®. Estudo em ratas

**Pesquisador responsável:**

Maria Bibiana Bartolomei Grassi

**Equipe da pesquisa:**

Sônia Mara Luczyszyn

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - B**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Ratas Novergicus albinus	Fêmea	2 meses	80

O colegiado do CEUA em reunião no dia 13/03/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

O EFEITO DA DEFICIÊNCIA DE ESTRÓGENO NO  
PREENCHIMENTO DE DEFEITOS ÓSSEOS TRATADOS OU NÃO  
COM UM BIOMATERIAL SINTÉTICO.  
ESTUDO RADIOGRÁFICO EM RATAS

Autores para correspondência:

Maria Bibiana Bartolomei Grassi

Aluna de Mestrado em Odontologia, área de Concentração Periodontia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

R. Vereador Ângelo Burbello 2591, Umbará , Curitiba-Paraná-Brasil

Fone: 55(41)3015-6800

e-mail: [mbibianag@hotmail.com](mailto:mbibianag@hotmail.com)

Sônia Mara Luczyszyn

Professora do Curso de Odontologia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Rua Imaculada Conceição 1155, Prado Velho 80215-901, Curitiba-Paraná-Brasil

Fone:55(41)33227531

e-mail: [sonia.luczyszyn@pucpr.br](mailto:sonia.luczyszyn@pucpr.br)

## DEDICATÓRIA

À Deus, amor verdadeiro.

Muitas vezes agradei baixinho, mas aqui tenho a oportunidade de compartilhar com outras pessoas toda a sua grandeza.

Obrigada meu Deus, pela minha vida e tudo que junto a ela o senhor me ofereceu.

Pela oportunidade de participar deste programa de pós-graduação, enquanto muitas pessoas ainda nem aprenderam a ler e nunca entraram em uma escola.

Obrigada pelas minhas mãos maravilhosas que escreveram esta dissertação.

Obrigada pelos professores e as pessoas que o Senhor colocou em meu caminho.

Obrigada pela força e determinação em busca de um ideal, que mesmo diante das dificuldades, o Senhor nunca me deixou faltar à esperança. Fazendo-me pensar sempre que eu não era diferente das pessoas vitoriosas, lembrando-me que me destes a mesma inteligência que deu a seus outros filhos, porém tudo dependeria de minha força de vontade.

E principalmente, obrigada pela família maravilhosa que me destes, que além do conhecimento é com certeza meu bem maior.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria de Fátima e Carlos Augusto que me deram a vida, me cuidando com amor, carinho, dando conselhos e todos os ensinamentos para a construção de minha pessoa.

Ao meu filho Francisco, criança doce e amorosa, que talvez apesar de seu tamanho, me proporcionou os maiores ensinamentos da vida. Não existe sentimento mais puro e sincero que os sentimentos de uma criança. Aprendi que a maternidade é a maior realização que uma mulher pode ter.

Ao meu querido esposo Francisco, pelo carinho, amor, paciência, pelos cuidados comigo desde quando começamos a namorar até hoje, e principalmente obrigado pelo filho que me deu.

Aos meus irmãos Carlos Augusto e Pedro Emílio pela amizade, amor, pelas nossas recordações da infância que estarão sempre presentes na memória.

Ao meu avô Santo e avó Branca (*in memoriam*), que me ensinaram muito sobre a vida, deram exemplo de conquista e realização, mostrando principalmente que somos capazes de alcançar nossos objetivos quando trabalhamos com determinação.

À dona Maria, que cuidou de meu filho para que eu conseguisse me dedicar aos estudos.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sônia Mara Luczyszyn, pela sua alegria e otimismo, pelo seu incentivo, pelos seus ensinamentos, e pelo exemplo de mulher batalhadora.

À minha amiga e parceira Maria de Fátima, obrigada pelo companheirismo, carinho e amizade, que com certeza levarei por toda a vida.

Ao Professor Dr. Sung Hyun Kim pela confiança, pelos ensinamentos, pelo seu perfeccionismo, pelo seu jeito querido e cuidadoso ao operar nossos pacientes.

Ao Professor Dr. Vinícius Augusto Tramontina, professor querido, simples, amigo, sempre pronto a ajudar. Transmitiu sempre a essência da vida: o SER e não o TER.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vula Papalexiou pela coragem, sua prontidão em ajudar, pelos ensinamentos e determinação.

À amiga Rosângela, prestativa em toda hora e pela sua ajuda na minha pesquisa

Aos colegas de mestrado Fábio, Camila, Renata, Ítalo, Virgínea, pela amizade, risadas, pelas ajudas e companheirismo principalmente nas horas das fotografias de nossas cirurgias, pelos seminários e dois anos de boa convivência e amizade.

Ao Professor Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, pela ajuda e conhecimento na área de histopatologia.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia de Noronha, pela atenção e conhecimentos na área de patologia.

Ao Professor Dr. Sérgio Vieira, diretor do programa de pós-graduação em odontologia da PUC-Pr, homem trabalhador que faz tudo acontecer.

Ao Professor Sérgio Aparecido Ignácio, pela análise estatística.

A todos (as) os professores(as) do programa de pós-graduação em Odontologia da PUC-PR que contribuíram com seus conhecimentos.

À secretária do programa de pós-graduação Neide Reis Borges pelo auxílio nos processos burocráticos.

Ao amigo Daniel, funcionário da Anatomia da PUCPR, que me ajudou em todos os procedimentos com os animais desta pesquisa.

Aos funcionários da técnica operatória Misael e Álvaro, sempre prestativos em nossos experimentos em animais.

A Célia e Silvana, funcionárias da clínica de graduação, pela sua colaboração.

Aos funcionários do biotério, pelos cuidados com os animais.

Ao amigo Mario Ricardo do Amaral, pelos seus conhecimentos na área de bioquímica.

À Ana Paula, do laboratório de Patologia PUCPR, pela colaboração.

Ao comitê de Ética da PUCPR pela confiança nesta pesquisa.

A Maria Fernanda, do biotério da Unicamp Curitiba- PR pelas informações e trocas de informações.

Ao pacientes, que confiaram em nosso trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Paula de Moura, a Ana Carolina e aos funcionários do laboratório Radiocenter Curitiba, onde foram realizadas as radiografias.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
LISTA DE FIGURAS .....	12
LISTA DE TABELAS .....	13
INTRODUÇÃO.....	14
MATERIAL E MÉTODO .....	17
RESULTADOS .....	27
DISCUSSÃO .....	310
CONCLUSÃO.....	343
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	354
ANEXO I – Termo de aprovação do comitê de ética.....	387
ANEXO II – Análise estatística e gráficos.....	38

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar radiograficamente o preenchimento ósseo de defeitos criados em tíbia de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas, preenchidos por coágulo ou com material substituto ósseo. Foram utilizadas 30 ratas *wistar*, sendo que 15 foram ovariectomizadas (grupo OV) e 15 ratas não receberam ovariectomia (grupo NOV). Decorridos 60 dias da cirurgia de ovariectomia, ambos os grupos foram submetidos à cirurgia para confecção de defeitos ósseos nas tíbias. A tíbia direita foi preenchida por coágulo e a esquerda, com biomaterial sintético (Bone Ceramic®), formando os seguintes grupos: grupos não ovariectomizados com defeitos preenchidos por coágulo (grupo NOV/C) ou com biomaterial (grupo NOV/B) e grupos ovariectomizados com defeitos preenchidos por coágulo (grupo OV/C) ou com biomaterial (grupo OV/B). Decorridos 60 dias da cirurgia de confecção dos defeitos e seus preenchimentos, as ratas foram mortas e suas tíbias removidas. A densidade óssea das tíbias foi avaliada em radiografias digitais e as imagens foram analisadas no programa de imagem Image J por examinador único. Utilizou-se para a análise estatística o teste Anova a dois critérios multifatorial completo com  $\alpha < 0,05$ . A percentagem média de preenchimento ósseo para cada grupo foi: grupo NOV/C 71,55%; grupo NOV/B 70,44%; grupo OV/C 21,03% e grupo OV/B 58,93%. Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que a deficiência de estrógeno interferiu no grau de preenchimento ósseo em defeitos cirurgicamente criados em tíbias de ratas, com ou sem o uso de um biomaterial.

**Palavras chave:** Ovariectomia, biomateriais, densidade óssea.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate radiographic filled bone by surgically defects created in ovariectomized and non ovariectomized tibiae rats. Defects were fill with coagulum and synthetic bone graft. Thirty female *Wistar* rats were divided into two groups: fifteen rats received ovariectomy (group OVX) and fifteen didn't (group NOVX). After 60 days of ovariectomy surgery both groups were submit to osteotomy surgery for bone defect creation in tibiae. The right tibiae were filled with coagulum and left one with bone substitute graft (Bone Ceramic®). The groups of study were: Group non ovariectomized with defects filled for coagulum (group NOV/C) or with biomaterial (group NOV/B) and group ovariectomized with defects filled for coagulum (group OV/C) or biomaterial (group OV/B). After 120 days the rats were die and their tibiae removed. The bone density was evaluated by digital radiograph and the images were analyzed by ImageJ program. Anova test was applied for the statistical analysis  $\alpha < 0,05$ . The fill bone mean percent for each group were: group NOV/C 71, 55%; group NOV/B 70, 44%; group OV/C 21, 03% and group OV/B 58, 93%. Based on the results obtained could be conclude that estrogen deficiency interfered on fill bone that surgically defects in tibiae rats, with or without use of the biomaterial.

**Key word: Ovariectomy, biomaterial, bone density**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

B- Biomaterial substituto ósseo sintético

$\beta$ -FT – Beta fosfato tricálcio

C- Coágulo

DFDBA- Osso humano desidratado por congelamento e desmineralizado

DMO- Densidade de massa óssea

FCB – Fosfato de cálcio bifásico

FDBA- Osso desidratado por congelamento

Fig. – Figura(s)

Grupo NOV/C- Grupo não ovariectomizado com defeito preenchido com coágulo

Grupo NOV/B – Grupo não ovariectomizado com defeito preenchido com biomaterial

GrupoNOV- Grupo não ovariectomizado

Grupo OV- Grupo ovariectomizado

Grupo OV/B- Grupo ovariectomizado com defeito preenchido com biomaterial

Grupo OV/C – Grupo ovariectomizado com defeito preenchido com coágulo

HA- hidroxiapatita

IL – Interleucina

OB- osteoblastos

OC- Osteoclastos

FDO- Fator de diferenciação de osteoclastos

OPG- Osteoprotegerina

RANK- fator nuclear ativador do receptor K

RANKL- fator nuclear ativador do receptor K ligante

ROG- Regeneração óssea guiada

TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$  receptor ativador de NF- $\kappa$ B ( RANK)

TGF- $\beta$  – Fator de crescimento transformador

UMB- Unidade multicelular básica de remodelamento

## LISTA DE FIGURAS

**Fig. 1:** Incisão inicial da região abdominal, para acesso aos ovários.

Fig.2: Remoção dos ovários que foram amarrados e removidos bilateralmente durante cirurgia de ovariectomia.

Fig.3: Ovários direito e esquerdo removidos após ovariectomia.

Fig.4: Sutura da musculatura abdominal com fio reabsorvível 4.0 durante a cirurgia de ovariectomia.

Fig.5: Sutura final à cirurgia de ovariectomia com fio de mononylon 4.0.

Fig. 6: Mensuração da tíbia com sonda periodontal para a confecção do defeito ósseo.

Fig.7: Confecção da cavidade óssea com broca esférica, sob irrigação com soro fisiológico.

Fig.8: Cavidade óssea preenchida por coágulo.

Fig.9: Preenchimento da cavidade com material aloplástico

Fig.10: Representa a forma como foi delimitado o defeito ósseo no programa de imagem Image J.

Fig.11: Representa a forma como foi preenchido o defeito com escala de vermelho para se obter valores de preenchimento ósseo compatível com preenchimento ósseo total do defeito.

Fig.12: Representa a forma que obtido o preenchimento do defeito em escala de vermelho no Programa Image J, para se obter valores referentes ao preenchimento ósseo do defeito para o período de 60 dias.

Fig.13: Imagem radiografia de tíbia do grupo NOV/C.

Fig.14: Imagem radiográfica de tíbia do grupo OV/C.

Fig.15: Imagem radiografia de tíbia do grupo NOV/B.

Fig.16: Imagem radiográfica de tíbia do grupo OV/B.

## **LISTA DE TABELAS**

**Tab. 1** - Representa a média de preenchimento ósseo dos defeitos, quando comparados grupo OV com grupo NOV.

**Tab. 2:** - Representa a percentagem média de preenchimento ósseo segundo ao tipo de preenchimento (coágulo x biomaterial).

## INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido extremamente ativo. No esqueleto em desenvolvimento, essa atividade é primariamente voltada para o crescimento e modelação óssea, processos pelos quais o osso atinge sua forma e seu tamanho. No adulto, a atividade metabólica envolve predominantemente a remodelação, que é responsável pela manutenção deste tecido. Na presença de injúrias, o tecido ósseo é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais, com a formação de novo tecido, com a mesma organização estrutural do tecido anterior, sem a formação de cicatriz<sup>1,2</sup>.

Uma importante função estrutural do tecido ósseo é a ancoragem dos dentes nos maxilares<sup>3</sup>. Os processos de remodelação e reparo ósseos envolvem uma cascata complexa de respostas biológicas. Eles também são afetados por fatores locais e externos, sendo regulado pela interação de diferentes mecanismos<sup>4</sup>. A participação dos hormônios sobre os mecanismos bioquímicos no controle e ajuste da remodelação óssea tem sido descrita em vários trabalhos<sup>3,5</sup>. Dentro deste contexto, o estrógeno, pertencente à família de hormônio sexuais<sup>6</sup>, participa no ciclo de remodelação óssea<sup>7</sup> (processo pelo qual ocorre a renovação constante do tecido ósseo, onde a matriz osteoide mineralizada é reabsorvida e substituída por tecido ósseo neoformado) e exibe atividade de estimulação dos osteoblastos<sup>8</sup>.

A deficiência de estrógeno é considerada um dos fatores patogênicos dominantes para a osteoporose em mulheres. Ocorre também decréscimo na absorção de cálcio da dieta e um aumento dos níveis de cálcio na urina<sup>9</sup>. A osteoporose instalada, por sua vez, caracteriza-se pela redução da massa óssea e pela deterioração da microarquitetura tanto do osso cortical como do osso trabecular, resultante do desequilíbrio entre a reabsorção e a aposição no ciclo fisiológico de remodelação óssea<sup>3</sup>.

Diversos estudos clínicos relatam que a qualidade e quantidade óssea sistêmica são reduzidas em mulheres pós-menopausa em decorrência da deficiência de estrógeno<sup>3,10,11,12</sup> e ainda, tem sido sugerido que essa diminuição da função ovariana na menopausa, pode ser associada inclusive com a diminuição da densidade de massa óssea pós-cranial e bucal<sup>13,14</sup>. Evidências sugerem que a deficiência de estrógeno pode reduzir a densidade óssea dos maxilares, reforçando a hipótese de que, semelhante ao osso esquelético, o osso bucal também pode ser afetado<sup>3</sup>. Pallos *et al*<sup>15</sup> (2006) evidenciaram radiograficamente que a osteoporose em mulheres pós-menopausa

influenciou negativamente o osso alveolar, com decréscimo da massa óssea, demonstrando que a perda óssea generalizada devido à osteoporose torna a maxila suscetível à aceleração na reabsorção de osso alveolar<sup>15</sup>.

Diversas formas de tratamento têm sido investigadas na tentativa de obter-se a regeneração do tecido ósseo alveolar, especialmente no que se refere às áreas da Periodontia, Implantodontia e Prótese, que requerem altura e espessura de rebordos alveolares para que sejam realizadas reabilitações protéticas e/ou a instalação de implantes dentários, com o objetivo de restabelecer a função e também a estética.

Dentre as alternativas de tratamento podemos citar os enxertos autógenos (do próprio indivíduo), os materiais homogêneos (FDBA - osso humano desidratado por congelamento e DFDBA - osso humano desidratado por congelamento e desmineralizado), os materiais heterogêneos (obtidos a partir de osso bovino) e os materiais aloplásticos ou sintéticos. Vários estudos demonstram que tanto os enxertos autógenos, quanto outros materiais, podem favorecer a formação óssea<sup>16,17,18,19</sup>. Os enxertos ósseos têm sido empregados na Odontologia com diversos objetivos, dentre eles, a regeneração óssea guiada (ROG).

Os enxertos autógenos são considerados padrão-ouro dos enxertos ósseos, por possuírem propriedades de osteoindução (processo no qual novo osso é induzido a se formar através de fatores de indução contidos no osso, como proteínas ou fatores de crescimento) e osteocondução (processo no qual o enxerto age como arcabouço para que novo osso do hospedeiro possa ser formado)<sup>20</sup>. Porém, a necessidade de uma segunda área cirúrgica doadora e a limitação da quantidade de enxerto, muitas vezes dificulta a utilização de enxertos autógenos na Periodontia e Implantodontia. Dentro deste contexto, tem aumentado progressivamente o desenvolvimento de materiais utilizados como substitutos ósseos.

Os substitutos ósseos devem ser biocompatíveis com os tecidos bucais, possuir propriedades osteocondutoras e favorecer a neoformação óssea. Assim, enxertos de diferentes biomateriais como osso bovino, hidroxiapatita, fosfato tricálcio, vidro bioativo, dentre outros, tem sido investigados<sup>21,22,23,24</sup>. No entanto, o desenvolvimento de materiais sintéticos pela indústria de materiais odontológicos tem aumentado progressivamente, visando não apenas oferecer maior quantidade de material para a enxertia, mas principalmente substituir os materiais de origem animal devido aos riscos que estes podem apresentar em relação à transmissão de doenças e possíveis rejeições<sup>25</sup>.

O fosfato de cálcio bifásico (FBC) é um substituto ósseo, totalmente sintético, composto por 60% de hidroxiapatita (HA) e 40% de beta- fosfato tricálcio ( $\beta$ -FT), com partículas que variam de 400 a 700  $\mu$ m. Os biomateriais que fazem parte da composição deste enxerto ósseo sintético já foram pesquisados e estão sendo largamente utilizados como substitutos ósseos tanto na Periodontia, como na área da Implantodontia<sup>26,27</sup>. Este material apresenta propriedades de osteocondução, é biocompatível, reabsorvível e substituído por tecido ósseo vital durante o processo de remodelação óssea. Essa combinação de HA e  $\beta$ -FT proporciona a este biomaterial sua principal característica, a de ser parcialmente reabsorvível, sendo que o  $\beta$ -FC é rapidamente reabsorvido e a HA permanece por tempos prolongados, o que favorece a manutenção de espaço para nova formação óssea. Resultados de estudos realizados com este biomaterial mostraram que o mesmo não produz ação inflamatória e não tem ação local tóxica<sup>28</sup>. Histologicamente, verificou-se que os poros de FCB favorecem o crescimento ósseo. O tamanho das partículas e a densidade dos poros, bem como sua composição, determinam a tendência para o crescimento ósseo no interior destes poros e o envolvimento do material pelo tecido, com sua subsequente reabsorção. Os poros do FCB parecem melhorar e favorecer a osteocondução, devido a sua controlada reabsorção<sup>28</sup>.

O uso de modelos animais para verificar o reparo ósseo é bem descrito na literatura. Diversos trabalhos têm investigado a interferência de alguns aspectos, dentre os quais, tabagismo, deficiências hormonais, medicamentos e também o efeito de alguns biomateriais sobre o processo de reparo ósseo em defeitos cirurgicamente criados em tíbias de animais<sup>29,30,31</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar, radiograficamente, a influência da deficiência de estrógeno no preenchimento ósseo de defeitos cirurgicamente criados em tíbias de ratas ovariectomizadas ou não, e o comportamento de um biomaterial substituto ósseo no preenchimento destes defeitos.

## MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Núcleo de Bioética, Comitê de Ética no uso de animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Registro do projeto número 310.

Para o estudo, foram utilizadas 30 ratas *Wistar* com peso aproximado de 250g e com 30 dias de idade, fornecidas pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. As ratas foram mantidas em gaiolas individuais com água *ad libitum* e ração\* durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em dois grandes grupos: 15 ratas ovariectomizadas (grupo OV) e 15 ratas não ovariectomizadas (grupo NOV). Foram realizadas duas intervenções, a primeira para ovariectomia (grupo OV), e a segunda, após sessenta dias, para a confecção e preenchimento dos defeitos ósseos com biomaterial sintético (B).

Para cada grupo (grupo OV e grupo NOV) foram criados defeitos ósseos cirúrgicos nas tíbias. A tíbia direita foi preenchida por coágulo (C) e a esquerda, preenchida com biomaterial substituto ósseo sintético† (B).

Alguns animais foram perdidos durante o experimento. Desta forma, os seguintes grupos foram designados:

Grupo NOV/C- Grupo não ovariectomizado, com defeito ósseo preenchido por C (n=11).

Grupo NOV/B- Grupo não ovariectomizado, com defeito ósseo preenchido com B (n=11).

Grupo OV/C- Grupo ovariectomizado, com defeito ósseo preenchido por C (n=13).

Grupo OV/B- Grupo ovariectomizado, com defeito ósseo preenchido com B (n=13).

Para todas as cirurgias, a pré-anestesia foi realizada com cloridrato de tiazina‡ a 2% (5mg/kg) no músculo bíceps femural da pata traseira. Após a constatação do início do relaxamento muscular e ligeira sedação, os animais foram anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de ketamina§ 10% (10mg/kg), no músculo bíceps femural da pata traseira.

---

\* Libina® - fabricante: Purina®.

† Bone Ceramic®, fabricante Strumann®.

‡ Rompun® - fabricante: Bayer®.

§ Dopalen® - fabricante: Agribands®.

Na primeira intervenção (grupos OV/C e OV/B), após tricotomia da região abdominal lateral, a pele e a musculatura foram incisadas com lâmina de bisturi nº. 15\*\* (Fig. 1) até o acesso aos ovários, que foram retirados bilateralmente (Fig. 2 e 3).

A musculatura abdominal foi suturada com fio reabsorvível†† (Fig. 4) e a pele, com fio de nylon 4.0‡‡ (Fig. 5).



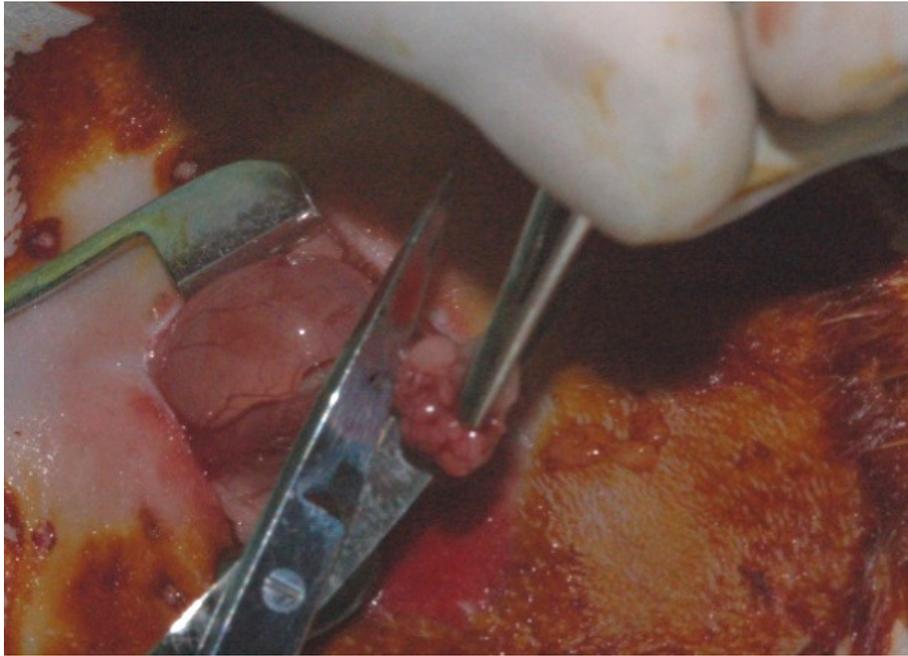
**Fig. 1:** Incisão inicial da região abdominal, para acesso aos ovários.

---

\*\* Sovereign ®- fabricante: Paramount surgimed®

†† Vicryl 4.0- fabricante: Ethicon ® Jonhson & Jonhson®

‡‡‡‡ Fio mononylon 4.0 - fabricante: Ethicon ® Jonhson & Jonhson®



**Fig. 2:** Remoção dos ovários que foram amarrados e removidos bilateralmente.



**Fig. 3:** Ovários direito e esquerdo removidos.



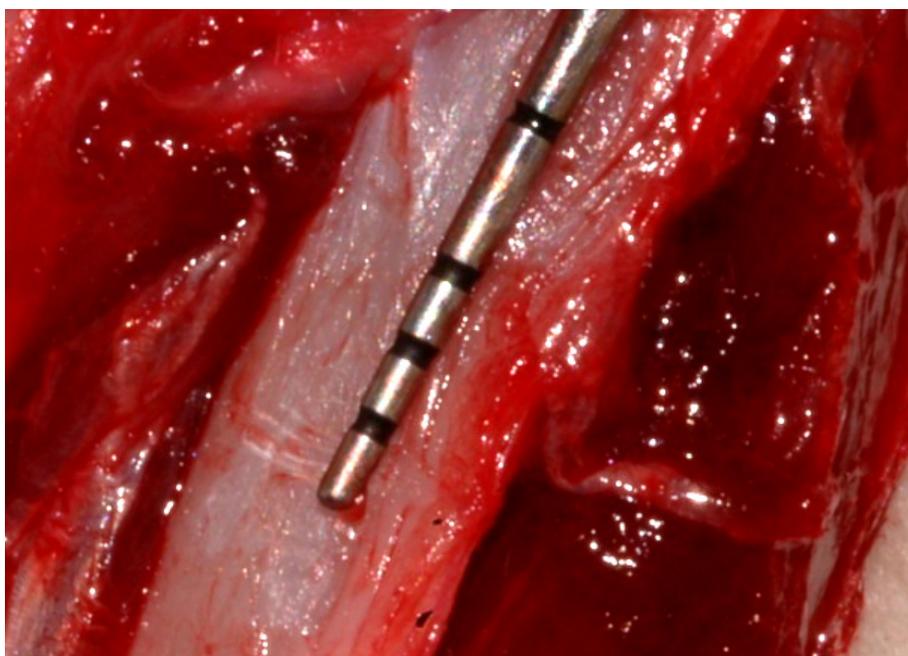
**Fig. 4:** Sutura da musculatura abdominal com fio reabsorvível.



**Fig. 5:** Sutura final com fio não-reabsorvível.

Como medicação pós-operatória foi administrado antibiótico Enrofloxacina 4,0 mg, duas vezes ao dia, por 5 dias. Também foi administrado antiinflamatório Dexametasona 2,0 mg, duas vezes ao dia, por cinco dias. Como analgésico, utilizou-se Bupremorfina 1,0 mg, duas vezes ao dia, por dois dias.

Decorridos 60 dias após a cirurgia de ovariectomia, foi realizada a segunda intervenção cirúrgica para a confecção dos defeitos ósseos nas tíbias, em ambos os grupos de ratas que receberam ou não a cirurgia de ovariectomia. Após anestesia, foi feita tricotomia da região e limpeza com solução de iodo povidine. Uma incisão de aproximadamente 3 cm foi confeccionada com lâmina de bisturi 15<sup>§§</sup> e a superfície óssea da tíbia foi exposta para mensuração e confecção do defeito (Fig. 6).



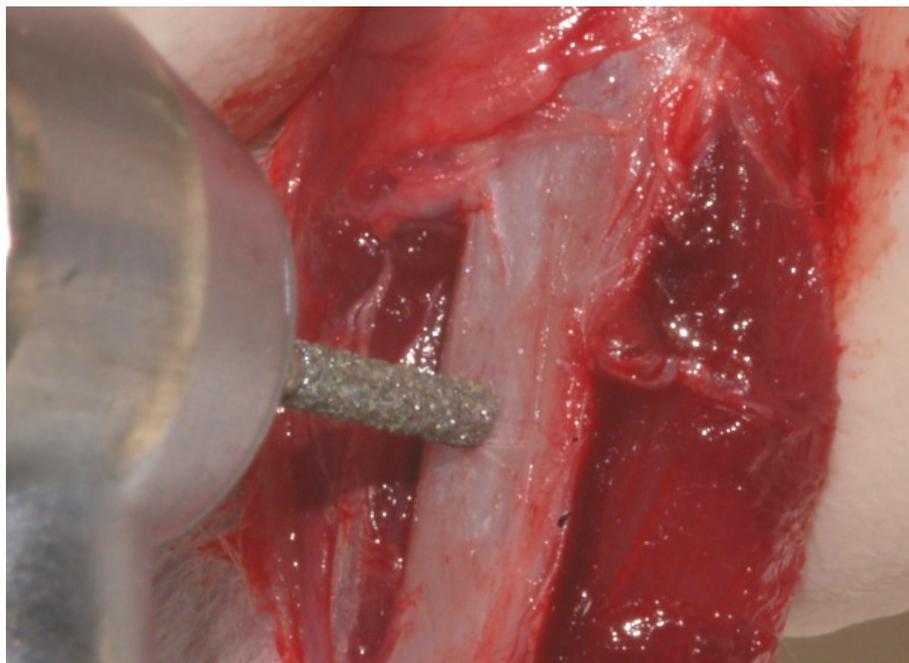
**Fig. 6:** Mensuração da tíbia com sonda periodontal Williams para a confecção do defeito ósseo.

Com o uso de uma broca diamantada número 3100<sup>\*\*\*</sup>, devidamente selecionada para padronização dos defeitos, e sob irrigação constante com soro fisiológico, os defeitos ósseos foram criados (Fig. 7) com as dimensões de 2,5 mm de diâmetro por 1,5 mm de profundidade, sendo um em cada tíbia do animal.

---

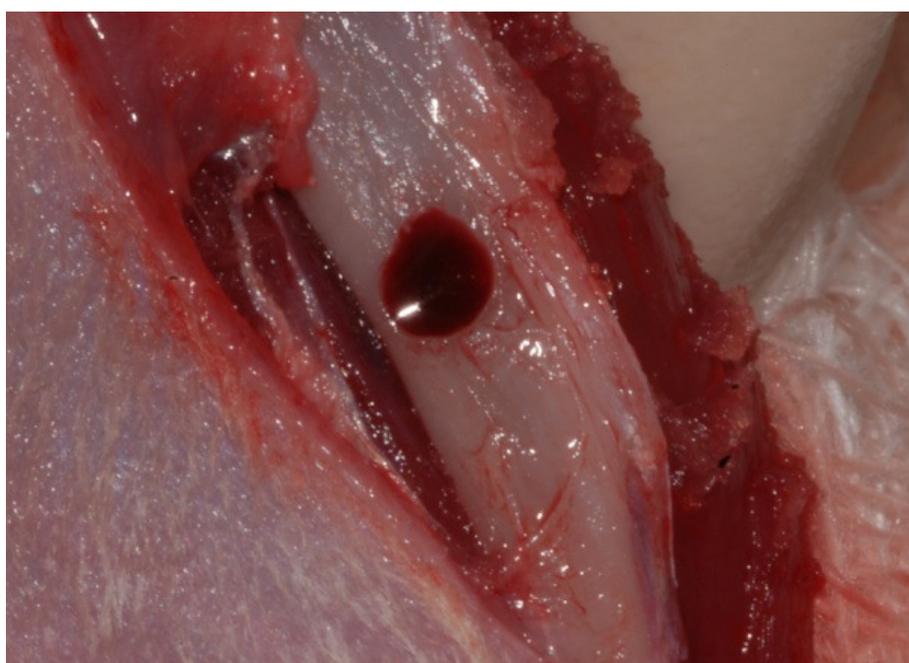
<sup>§§</sup> Sovereign® fabricante: Paramount surgimed®.

<sup>\*\*\*</sup> Microdont®- fabricante :Micridont LTDA.



**Fig. 7:** Confeção da cavidade com broca cilíndrica e irrigação com soro fisiológico.

Na tíbia direita, o defeito foi preenchido por coágulo (Fig. 8) e na tíbia esquerda o defeito foi preenchido com B<sup>†††</sup> (Fig. 09). Previamente ao preenchimento da tíbia esquerda, o biomaterial foi hidratado em soro fisiológico por 10 minutos e então inserido no defeito, preenchendo este por completo.



**Fig. 8:** Cavidade preenchida por coágulo.

---

<sup>†††</sup> Bone Ceramic® - fabricante : Strumann®.



**Fig. 09:** Preenchimento da cavidade com biomaterial.

Ao final, os tecidos foram reposicionados e suturados com fio reabsorvível 4.0<sup>†††</sup> na musculatura e fio mononylon 4.0<sup>§§§</sup> para a pele. A medicação pós-operatória seguiu o mesmo protocolo da cirurgia de ovariectomia.

Decorridos 60 dias da cirurgia de confecção das cavidades óssea e seus respectivos preenchimentos, os animais foram mortos com overdose de cloridrato de Ketamina. As tíbias foram expostas seccionadas e fixadas em solução de formol a 10 %

Foram realizadas radiografias digitais de todas as tíbias com o uso do aparelho Kodak Digital K2200, utilizando-se o tempo de exposição de 2 segundos. Para a tomada das radiografias, as tíbias foram colocadas sobre um guia especialmente confeccionado para padronizar o posicionamento das peças e a incidência do raio. As imagens foram

---

<sup>†††</sup> Vicryl 4.0 – Ethicon®, fabricante:Jonhson & Jonhson.

<sup>§§§</sup> Fio mononylon 4.0- Ethicon®, fabricante: Jonhson & Jonhson.

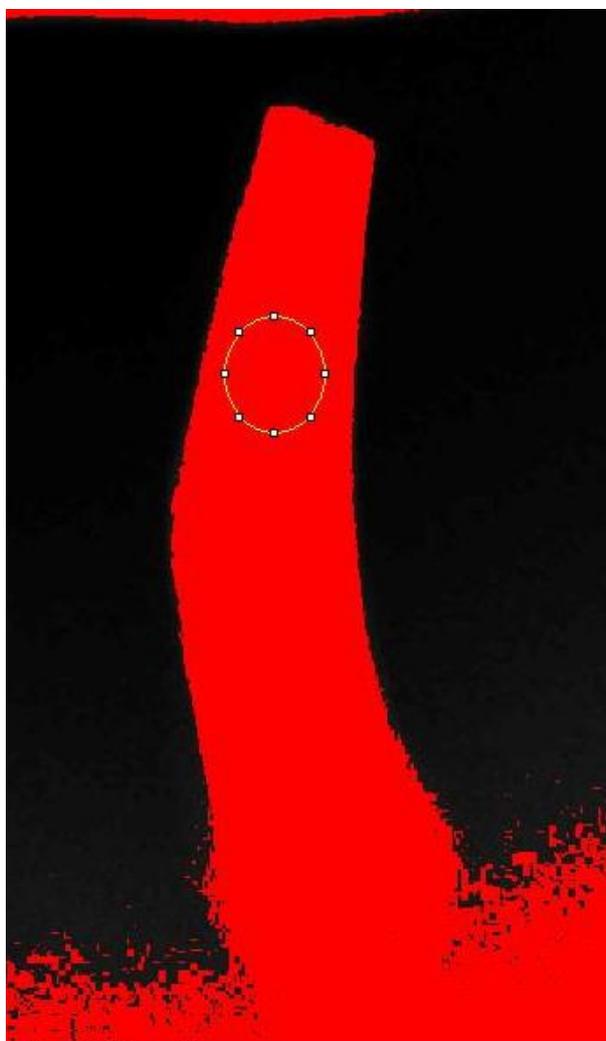
analisadas através de um programa de imagem (Image J)<sup>\*\*\*\*</sup> para avaliação do preenchimento ósseo. As imagens foram analisadas por um único examinador, devidamente treinado e calibrado. Primeiramente, foi delimitada a área do defeito ósseo (Fig. 10) e então esta área foi preenchida totalmente com escala de vermelho para obtenção de valores compatíveis com o preenchimento total do defeito; a este valor obtido foi atribuído 100% de preenchimento ósseo (Fig. 11). Posteriormente, por meio de ferramentas do próprio programa, e na mesma escala de vermelho, foi obtido o valor de preenchimento ósseo resultante após o período de 60 dias de pós-operatório da cirurgia de confecção das cavidades ósseas e seus preenchimentos. (Fig.12). Os valores finais referentes ao preenchimento ósseo foram transferidos para o programa Excel, através do qual foi obtido o resultado, representando a percentagem final de preenchimento ósseo.



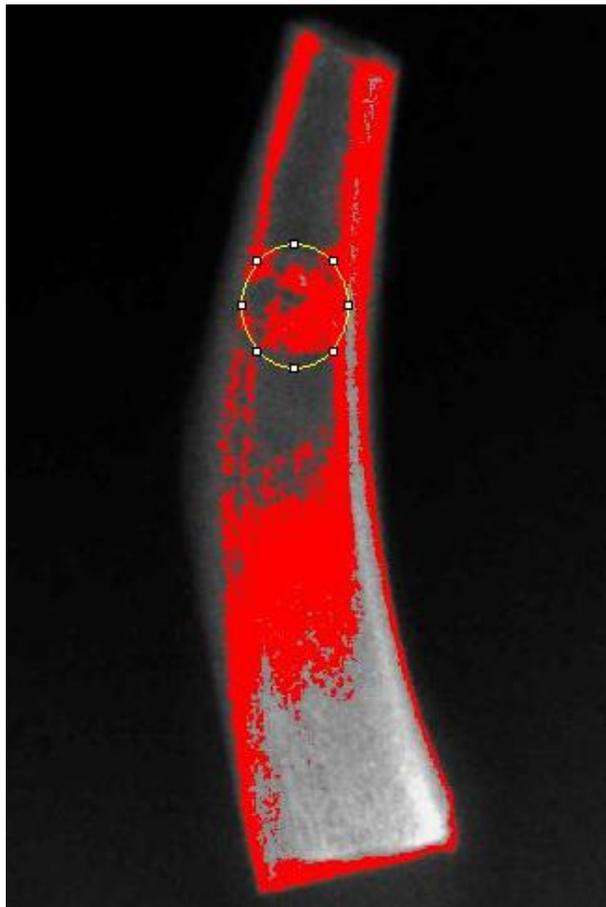
---

<sup>\*\*\*\*</sup> Image-J Processing®, programa de análise de imagens digitalizadas de domínio publico JAVA. Programa inspirado por NIH image

**Fig. 10** – Representa a forma como foi delimitado o defeito ósseo no programa de Image J.



**Fig. 11** – Representa a forma como foi preenchido o defeito com escala de vermelho para se obter valores de preenchimento ósseo compatível com preenchimento ósseo total do defeito.



**Fig. 12** – Representa a forma de preenchimento do defeito em escala de vermelho no Programa Image J, para se obter valores referentes ao preenchimento ósseo do defeito para o período de 60 dias de pós-operatório.

Para análise estatística, foi avaliada a normalidade, através do teste Kolmogorov Smirnov, que indicou haver uma distribuição normal, uma vez que  $p > 0,05$ . Para se avaliar a homogeneidade da amostra, foi utilizado o teste de variância de Levene, que indicou haver homogeneidade uma vez que  $p > 0,05$ . A distribuição da amostra apresentou normalidade e homogeneidade e o teste estatístico aplicado foi Anova a dois critérios multifatorial completo, que indicou existir diferenças nos valores médios entre grupo, tipo de preenchimento, mostrando ainda existir interação entre os dois fatores, uma vez que  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Análise radiográfica descritiva

Radiograficamente, as tíbias do grupo NOV (grupo NOV/C e grupo NOV/B - representados pelas (Fig. 13, 15) apresentaram maior radiopacidade que as do grupo OV (grupo OV/C e grupo OV/B - representado pelas Fig. 14, 16), respectivamente. Também foi observada imagem radiográfica circunscrita radiopaca nas margens dos defeitos preenchidos por coágulo no grupo NOV (Fig. 13- indicado pela seta vermelha). No grupo OV observou-se áreas predominantemente radiolúcidas nos defeitos preenchidos por coágulo (grupo OV/C - Fig. 14) e no grupo OV/B foram observados espaços radiolúcidos circundando o biomaterial radiopaco (Fig. 16 - indicado pela seta vermelha).



Fig.13: Imagem radiográfica de tíbia do grupo NOV/C

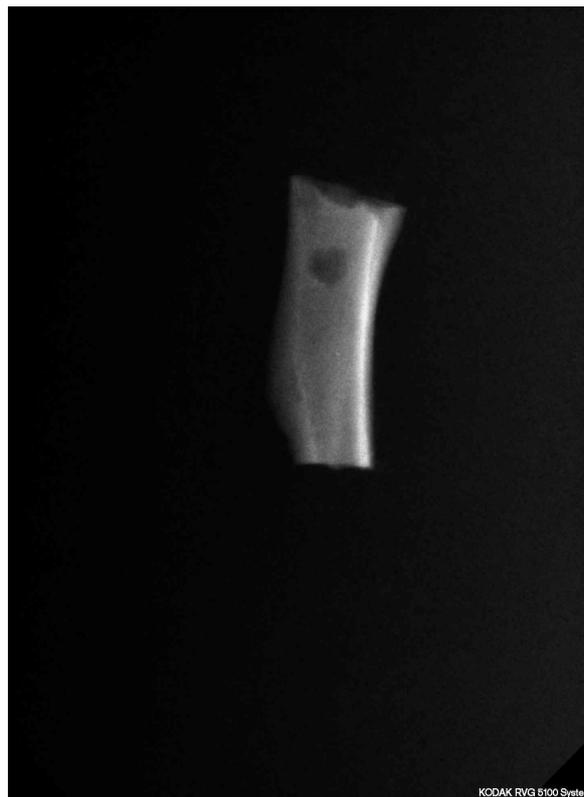


Fig.14: Imagem radiográfica de tibia do grupo OV/C

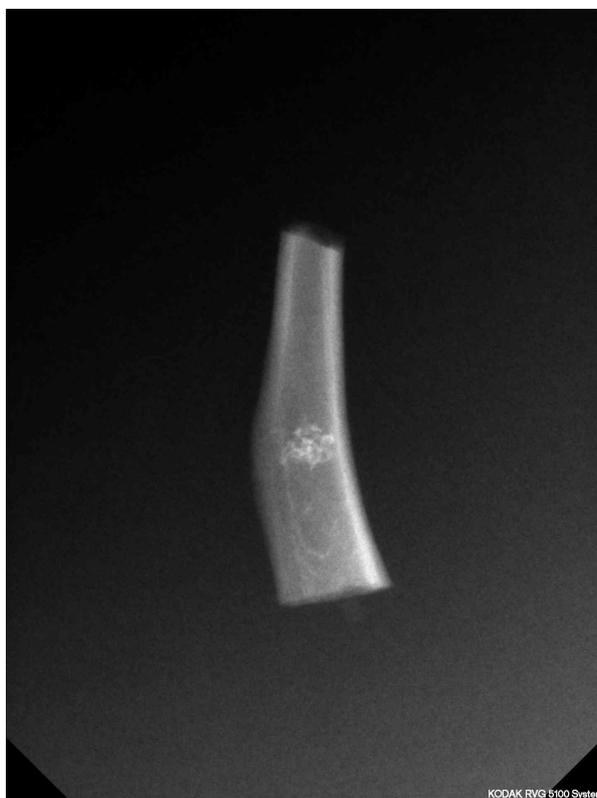


Fig.15: Imagem radiográfica de tibia do grupo NOV/B

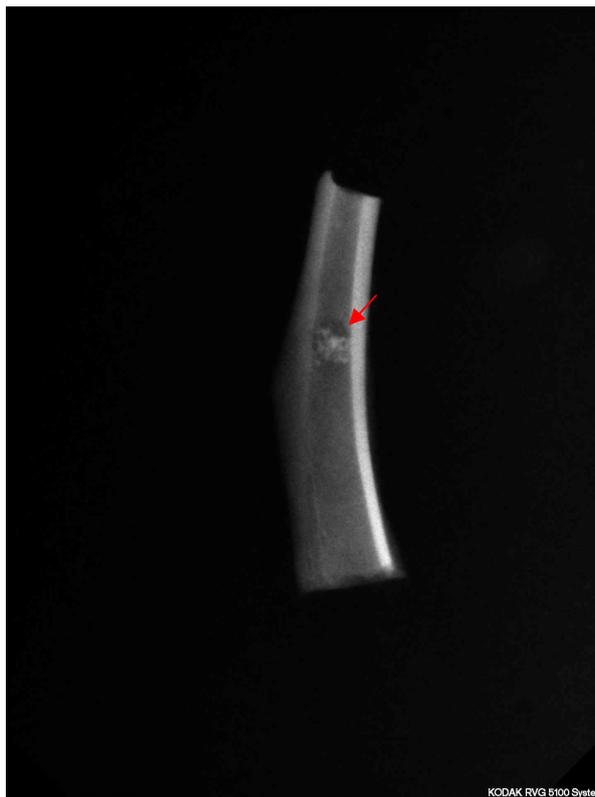


Fig.16: Imagem radiográfica de tíbia do grupo OV/B

### Análise do preenchimento ósseo:

As médias de preenchimento ósseo estão representadas nas tabelas 1 e 2.

**Tab. 1:** Representa a percentagem média de preenchimento ósseo, quando comparados grupo OV com grupo NOV.

<b>Grupo NOV/C (71,55%)</b>	
X	<b><math>P = 0,000^*</math></b>
<b>Grupo OV/C (21,03%)</b>	
<b>Grupo NOV/B (70,44%)</b>	
X	<b><math>P = 0,023^*</math></b>
<b>Grupo OV/B (58,93%)</b>	

**Tab. 2-** Representa a média de preenchimento ósseo dos defeitos, segundo o tipo de preenchimento (coágulo x biomaterial).

<b>Grupo NOV/C (71,55%)</b>	
X	<b><math>P = 0,9924</math></b>
<b>Grupo NOV/B (70,44%)</b>	
<b>Grupo OV/C (21,03%)</b>	
X	<b><math>P = 0,000^*</math></b>
<b>Grupo OV/B (58,93%)</b>	

## DISCUSSÃO

Diversos estudos em mulheres pós-menopausa, com quadros de osteopenia/osteoporose, evidenciaram que a deficiência de estrogênio acelera o processo de perda óssea, diminuindo o conteúdo ósseo mineral e reduz a densidade de massa óssea tornando o tecido ósseo fragilizado. Nos maxilares, foram relatadas perda de processo alveolar e redução na densidade óssea mandibular. Mohajery *et al* (1992)<sup>32</sup> observaram que mulheres com deficiência de estrogênio apresentaram, além da redução da densidade óssea sistêmica, diminuição da densidade óssea bucal. O estrogênio estimula a síntese e secreção de osteoprotegerina (OPG), uma proteína secretada por osteoblastos, prevenindo a união do fator de diferenciação de osteoclasto (FDO, também conhecido como RANKL) ao receptor ativador de NF- $\kappa$ B (RANK), inibindo a formação de osteoclastos<sup>33</sup>. O estrogênio regula positivamente o TGF- $\beta$ , um potente inibidor da reabsorção óssea<sup>34, 35</sup>.

Para avaliar a deficiência de estrogênio, a técnica da ovariectomia em ratas tem sido descrita como um modelo confiável de estudo, promovendo condições similares ao que foi observado em mulheres com idade avançada, acometidas por osteoporose<sup>36, 37, 38</sup>. Estudos incluindo estes animais demonstraram que o método é preciso<sup>39</sup>. Existem similaridades entre ratos e humanos a respeito da resposta à deficiência de estrogênio, como uma rápida perda óssea no período inicial à ovariectomia e um aumento na média de remodelamento ósseo. Estes aspectos promovem suporte científico para o uso da ovariectomia em ratas como um modelo para avaliar a diminuição óssea após a menopausa ou outras condições de deficiência de estrogênio<sup>40, 41, 42</sup>.

Neste trabalho, o período experimental de 120 dias pareceu adequado, segundo os dados da análise, para evidenciar os efeitos da deficiência de estrogênio em tíbias de ratas ovariectomizadas. Com relação à ovariectomia, existem divergências na literatura sobre a definição do tempo necessário entre a ovariectomia e a constatação dos prováveis efeitos da deficiência de estrogênio no tecido ósseo. Com o período de 60 dias pós-ovariectomia em ratas, Tanaka *et al.*(2002)<sup>43</sup> detectaram alteração no osso mandibular na região de septo interradicular de primeiros molares, uma maior separação trabecular, menor volume ósseo e redução do número de trabeculares. Kuroda *et al.* (2003)<sup>44</sup> observaram mudanças na densidade óssea mineral mandibular de ratas ovariectomizadas após um período de 109 dias de experimento, enquanto Paz *et*

*al.*(2001)<sup>45</sup> analisaram ossos longos e obtiveram resultados de diminuição de massa óssea em 6 semanas pós ovariectomia<sup>39</sup>. Elovic *et al.*(1995)<sup>46</sup> investigaram a densidade da mandíbula de ratas ovariectomizadas nos períodos de 14, 114 e 200 dias, e não encontraram mudanças na densidade de massa óssea, sugerindo que a função mastigatória pode promover resistência à perda óssea. Em outro experimento, Tanaka *et al.*<sup>47</sup> (1998) usando o período de 60 dias pós ovariectomia, não observaram mudanças significantes na densidade de massa óssea de côndilos mandibulares entre ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas.

No presente estudo, quando se avaliou o efeito da deficiência de estrógeno, observou-se que a ovariectomia promoveu uma menor percentagem de preenchimento ósseo, visto radiograficamente, no reparo dos defeitos ósseos para ambos os tipos de preenchimento avaliados (coágulo ou biomaterial). No grupo OV/B foram observados espaços radiolúcidos circundando o FCB radiopaco, sugerindo menor preenchimento dos defeitos quando comparados ao grupo NOV/B, onde estas áreas radiolúcidas não foram tão visíveis. Desta forma, pode-se sugerir que a deficiência de estrógeno induzida neste experimento afetou o grau de preenchimento dos defeitos. De fato, Orrico *et al.* (1992)<sup>40</sup> observaram que a ovariectomia diminuiu a densidade óssea mineral e acelerou a perda óssea em ratas. Duarte *et al.* (2005)<sup>38</sup> relataram que a ovariectomia em ratas afetou a formação óssea ao redor de implantes e também do osso pré-existente.

A remodelação ou *turnover* ósseo é o processo pelo qual a matriz osteóide está continuamente se renovando, com remoção localizada de osso antigo e substituição por osso recém formado, através de uma ação coordenada por osteoblastos (OB) e osteoclastos (OC). As atividades de OB e OC são combinadas em definidos espaços anatômicos chamados unidade multicelular básica de remodelação óssea (UMB) e, em condições normais, existe um equilíbrio entre os processos de osteogênese e osteoclastogênese. Com a diminuição da secreção de estrógenos na menopausa, tem-se como consequência maior atividade metabólica óssea, com maior ritmo na remodelação óssea. Na deficiência de estrógeno, ocorre um aumento de IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ , que são as mais potentes citocinas estimuladoras da reabsorção óssea e inibidoras da formação óssea<sup>48, 49</sup>. Além disso, ocorre um aumento da taxa de formação de osteoclastos bem como o aumento do recrutamento de osteoclastos para a superfície a ser remodelada<sup>50</sup>, com predomínio da atividade de reabsorção óssea sobre a de formação. Baseados nestas informações pode-se sugerir que este processo de reabsorção aumentada tenha seu reflexo nas imagens radiográficas avaliadas neste estudo, onde observou-se um

predomínio de áreas radiolúcidas em radiografias de tíbias de ratas ovariectomizadas, durante o processo de cicatrização dos defeitos confeccionados.

Quando se comparou tipos de preenchimento ósseo, não houve diferenças estatisticamente significativas na percentagem de preenchimento ósseo visto radiograficamente no grupo NOV (grupo NOV/C e grupo NOV/B), sugerindo que níveis normais de estrógeno podem ter favorecido o preenchimento de defeitos cirurgicamente criados, vistos radiograficamente, mesmo no grupo que não recebeu o biomaterial. Em contrapartida, no grupo OV (grupo OV/C e grupo OV/B) houve diferenças significativas na percentagem de preenchimento ósseo. Conforme o esperado, o grupo que recebeu preenchimento com FCB evidenciou um melhor preenchimento radiográfico do que o grupo que recebeu preenchimento por coágulo<sup>51</sup>. Isso pode ser devido às propriedades radiopacas do FCB, cujas partículas foram vistas radiograficamente no interior do defeito ósseo em processo de cicatrização.

Na grande maioria dos estudos com uso de biomateriais são testadas as propriedades destes e seus respectivos resultados clínicos em indivíduos saudáveis. Neste estudo, procurou-se avaliar se, frente à deficiência de estrógeno, o uso de um biomaterial poderia interferir no preenchimento ósseo, visto radiograficamente.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

1. A deficiência de estrógeno interferiu no grau de preenchimento ósseo em defeitos cirurgicamente criados em tíbias de ratas, com ou sem o uso de um biomaterial.
2. O fosfato de cálcio bifásico favoreceu o preenchimento dos defeitos ósseos, no grupo ovariectomizado.
3. O preenchimento ósseo obtido no grupo não ovariectomizado não diferiu entre os defeitos que receberam ou não o biomaterial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Katchburian E, Arana V. Tecido ósseo: In Histologia básica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 1999. Cap. 8:11-128.
- 2 Shenk R,K. Regeneration: Biologic Basis. In: Buser D, Dahlin C, Schenk R, K. Guided bone regeneration implant dentistry. Chicago: Quintessence Books, 1994;3:49-100.
- 3 Lerner .U.H. Bone remodeling in post menopausal osteoporosis. *Journal of Dental Research* 2006;85(7):584-593
- 4 Amadei U.A, Silveira V.A.S, Pereira C, A, Carvalho Y.A, Rocha R.F. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab* 2006;42(1):5-12.
- 5 Chow J, Tobias J.H, Colston K.W, Chambers; Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only suppression of bone resorption but stimulation of bone formation. *J Clin. Invest* 1992;89:74-78
- 6 Willians C.L, Stangel G.M, Estrogenos e progestênios. In:Goodman G. As bases farmacológicas da terapêutica.9 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw Hill, 1996;57(1045-67).
- 7 Compton J.E. Sex steroids and bone. *Physiological Reviews*, 2001;81(1):419-447.
- 8 Hill PA, Orth M. Bone remodeling. *Br Orthod* 1998;25(2)101-107.
- 9 Pallos D,Ceschin A,Victor GA,Bulhões RC, Quirino MRS; Menopause: a risk factor for periodontal disease?.*Rev.Bras Ginec Obstet* 2006;28 (5): 292-7.
- 10 Kribbs P.J, Chesnut C.H, Ott S.M,Kilcoyne R.F. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent* 1989;62:703-707.
- 11 Payne J.B, Reinhardt R.A, Nummikoski P.V, Dunning D.G, Patil K.D. The association of cigarette smoking with alveolar bone loss in postmenopausal females. *J Clin Periodontol* 2000;27:658-664.
- 12 Taguchi A, Tanimoto K, Sueti Y, Wada T. Tooth loss and mandibular osteopenia. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:127-132.
- 13 Von Wowern N, Klausen B, Kollerup G. Osteoporosis: a risk factor in periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:1134-1138.
- 14 Von Wower N. Bone mineral content of mandibles; normal references values- rate of age-related bone loss. *Calcif Tissue Int* 1988; 43:193-198.
- 15 Pallos D,Ceschin A,Victor GA,Bulhões RC, Quirino MRS; Menopause: a risk factor for periodontal disease?.*Rev.Bras Ginec Obstet* 2006;28 (5): 292-7.
- 16 Bagambisa FB, Kappert HF, Schilli W. Interfacial reactions of osteoblasts to dental implant materials. *J Oral Maxillofac Surg*1994;52(1):52-56.
- 17 Trombelli L, Annunziata M, Berlardo RF, Scabbia A, Guida L. Autogenous bone graft in conjunction with enamel matrix derivative in the treatment of deep periodontal intra-osseous defects: a report of 13 consecutively treated patients. *J Clin Periodontol* 2006;33:69-75.
- 18 Froum SJ,Ortiz M,Wiffitt WC. Bone blending: a technique for osseous implants. *J Periodontol* 1972;43(4): 295-305.
- 19 Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnellHT, Cochran DL. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Clin Periodontol* 1999;26(7):421-428.
- 20 Mellning J.T. Periodontal Regeneration: Bone grafts. In: Nevins M & Melloning J.T. Periodontal Therapy- Clinical Approaches and evidence of success- vol1.1ed. Chicago: Quintessence;1998:233-248.

- 21 Camargo P.M, Weinlaender M, Madzarevic M, Lenovic V, Vasilic N, Kenney E.B. *The Inter. J of Periodontics e Rest. Dentistry* 2005; 25(1):49-50.
- 22 Galgut P.N, Wait I.M, Brookshaw J.D, Kingston C.P. A 4-year controlled clinical study into the use of a ceramic hydroxyapatite implant material for the treatment of periodontal bone defects. *J Clin Periodontol* 1992;19:570-577.
- 23 Bowers G.M, Vargo J.W, Levy B, Emerson J.R, Begquist J.J. Histologic observations following the placement of Tricalcium Phosphate Implants in human intrabony defects. *J Periodontol* 1986;57(5):286-287.
- 24 Anton S, Malgorzata P, Arweiler N.B, Auschill T.M, Nemcovsky C. Four-year results of a prospective-controlled clinical study evaluating healing of intra-bony defects following treatment with an enamel matrix protein derivative alone or combined with a bioactive glass. *J. Clin Periodontol* 2007; 34: 507-513.
- 25 Carson E.R, Marx R.E, Buck B.E. The potential for HIV transmission through allergenic bone. A review of risk and safety. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:17-23.
- 26 Bowers G.M, Vargo J.W, Levy B, Emerson R, Berbiquist J.J. Histometric observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. *J Periodontol* 1986;57(5):286-287.
- 27 Kenney EB, Lekovic V, Sá Ferreira JC, Han T, Dimitrijevic B, Carranza Jr, FA. Bone formation within hydroxyapatite implants in human periodontal defects. *J Periodontol* 1986;57(2):76-83.
- 28 Ellinger RF, Nery EB, Lynch KL. Histological assessment of periodontal defects following implantation of hydroxyapatite and biphasic calcium Phosphate ceramics: A case report. *Int J Periodontics Res Dent* 1986;3:23-33.
- 29 Bouxsein M.L, et al 2005. Ovariectomy-induced bone loss varies among inbred strains of mice. *J Bone Res* 2005: 1085-1092.
- 30 Carvalho M.D, Benatti B.B, Neto C.J.B, Nociti F.H Jr, Filho G.R.N, Casati M.Z, Sallum E.A. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: A histometric study in rats. *J Periodontol* 2006; 77: 599-605.
- 31 Wronsky T.J, Lowry P.L, Walsh C.C, Ignaszewski L.A. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1985;37:324-328.
- 32 Mohajery M, Brooks S.L. Oral radiographs in the detection of early signs of osteoporosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod* 1992;73:112-117.
- 33 Bolon B, Carter C, Daris M, Monory S, Capparelli C, Hsieh A, Mao M, Kostenuik P, Dunstan C.R, Lacey D.L, Sheng J.Z. Adenoviral Delivery of Osteoprotegerin in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Molecular Therapy* 2001;3(2):197-205.
- 34 Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *End Rev* 2000;21:115-137.
- 35 Pacifici R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11:1043-1051.
- 36 Hutton J.E, Heath R.M, Chain JY, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1995;10:33-42.
- 37 Sims N.A, Morris H.A, Moore R.J, Durbridge T.C. Estradiol treatment transiently increases trabecular bone volume in ovariectomized rats. *Bone* 1996;19:355-461.
- 38 Duarte P, Gonsalves P.F, Casati M.Z, Sallum E.A, Nociti Jr F.H. Age-related and surgically induced estrogen deficiencies may differently affect bone around titanium implants in rats. *J Periodontol* 2005;76:1496-1501.

- 39 Orrico S.R.P, Gonsalves D, Galeazzi S.T, Giro G, Takayama L, Pereira R.M.R. The influence of loss bone mass on induced periodontal disease: A radiographic and densitometric study of female rats. *J Periodontol* 2005;76:1436-1442.
- 40 Orrico S.R.P, Giro G, Gonsalves D, Takayama L, Pereira R.M.R. Influence of the period after ovariectomy on femoral and mandibular bone density and on influenced periodontal disease. *J Periodontol* 2007;78:164-169.
- 41 Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann M.N, Toraldo G, Isaia G, Pacifici R. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*. *PNAS* 2001;98(24):13960-13965.
- 42 Chow J, Tobias J.H, Chambers T.J. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 1992;8: 74-78.
- 43 Tanaka M, Ejiri S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rats alveolar bone. *J Periodontal Res* 2002;37:161-165.
- 44 Kuroda S, Mukohyama H, Kondo K, et al. Bone mineral density of mandible in ovariectomized rats: Analyses using dual energy x-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. *Oral Dis* 2003;9:24-28.
- 45 Paz L.H.B.C, Falco V, Teng N.C, Reis L.M, Pereira R.M.R, Jorgetti V.. Effect of 17 $\beta$ -estradiol or alendronate on the densitometry, bone metabolism of ovariectomized rats. *Braz J Med Biol Res* 2001;34:1015-1022.
- 46 Elovic R.P, Hipp J.A, Hayenes W.C. Ovariectomy decreases the bone area fraction of the rat mandible. *Calcif Tissue Int* 1995;56:305-310.
- 47 Tanaka M, Ejiri S, Kohno S, Ozawa H. The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *J Prosthet Dent* 1998;79:685-690.
- 48 Cochran D.L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:1569-1576.
- 49 Grave D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79:1585-1591.
- 50 Weitzmann N.M, Pacifici R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *The J. Clin Invest* 2006;116:1186-1194.
- 51 Crespi R, Cappare P, Gherlone E. Magnesium-enriched hydroxyapatite compared to calcium sulfate in the healing of human extraction sockets: radiographic and histomorphometric evaluation at 3 months. *J Periodontol* 2009;80:210-218.

## ANEXO I – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PUCPR

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

NÚCLEO DE BIOÉTICA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

CEUA PUCPR

Registro do projeto no CEUA: 310

Data do parecer: 13/03/2008

**Título do Projeto:**

O efeito da deficiência de estrógeno no preenchimento de defeitos ósseos tratados ou não com Bone Ceramic®. Estudo em ratas

**Pesquisador responsável:**

Maria Bibiana Bartolomei Grassi

**Equipe da pesquisa:**

Sônia Mara Luczyszyn

**Instituição:**

PUCPR

**Categoria do Experimento - B**

Espécie de Animal	Sexo	Idade ou peso	Quantidade
Ratas Novergicus albinus	Fêmea	2 meses	80

O colegiado do CEUA em reunião no dia 13/03/2008, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

## ANEXO II – ANÁLISE ESTATÍSTICA E GRÁFICOS

ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA PERCENTAGEM DE PREENCHIMENTO ÓSSEO SEGUNDO TIPO DE PREENCHIMENTO

Tipo de Preenchimento	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
Coágulo	24	44,19	32,15	26,54
Boné	24	64,07	64,00	13,00

ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS DA PERCENTAGEM DE PREENCHIMENTO ÓSSEO SEGUNDO GRUPO X TIPO DE PREENCHIMENTO

Grupo x Tipo de Preenchimento	n	Média	Mediana	Desvio Padrão
Controle Coágulo	11	71,55	71,55	6,52
Controle Boné	11	70,41	67,75	8,77
Teste Coágulo	13	21,03	19,60	6,85
Teste Boné	13	58,70	60,93	13,84

TESTE DE NORMALIDADE DE KOLMOGOROV-SMIRNOV PARA A VARIÁVEL PERCENTAGEM DE PREENCHIMENTO SEGUNDO GRUPO X TIPO DE PREENCHIMENTO

Grupo x Tipo de Preenchimento	Estatística	G.L.	Valor p
Controle Coágulo	0,19681	11	0,20000
Controle Boné	0,21525	11	0,16375
Teste Coágulo	0,13596	13	0,20000
Teste Bone	0,17746	13	0,20000

CONCLUSÃO:TODOS OS TRATAMENTOS APRESENTAM DIST. NORMAL, UMA VEZ QUE  $P < 0,05$

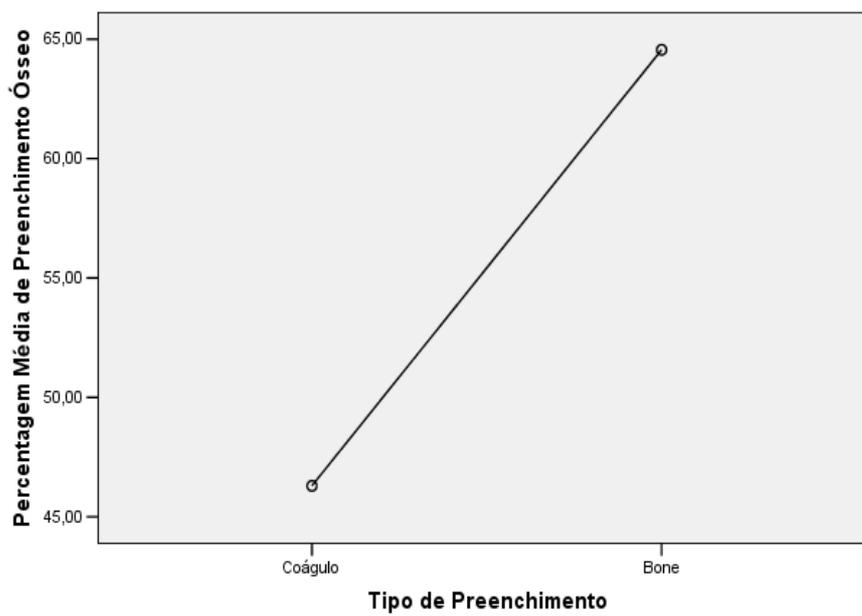
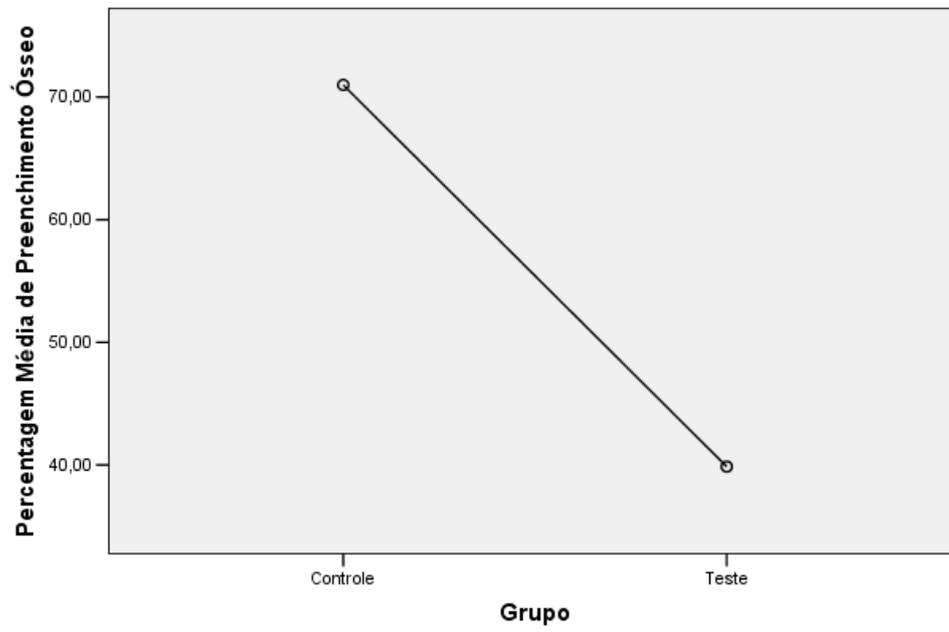
TESTE DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS DE LEVENE PARA A VARIÁVEL PERCENTAGEM DE PREENCHIMENTO SEGUNDO GRUPO X TIPO DE PREENCHIMENTO

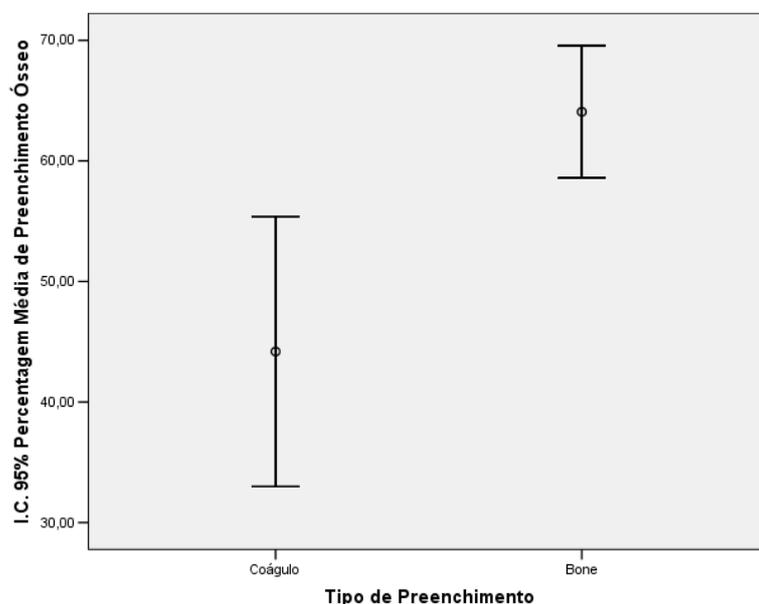
Estatística	G.L.1	G.L.2	Valor p
2,573774399	3	44	0,06600

CONCLUSÃO:EXISTE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS ENTRE OS TRATAMENTOS, UMA VEZ QUE  $P > 0,05$

Tests of Between-Subjects Effects						
Dependent Variable: Percentagem de Preenchimento Ósseo						
Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Valor p	Obs.Power
Corrected Model	20769,1261	3	6923,042	75,08575	0,0000	1,00000
Intercept	146423,99	1	146424	1588,081	0,0000	1,00000
Grupo	11538,9879	1	11538,99	125,1492	0,0000	1,00000
TipoPreenchimento	3975,36443	1	3975,364	43,1159	0,0000	1,00000
Grupo * TipoPreenchimento	4486,78551	1	4486,786	48,66266	0,0000	1,00000
Error	4056,87987	44	92,20182			
Total	165455,965	48				
Corrected Total	24826,006	47				

R Squared = ,837 (Adjusted R Squared = ,825)





Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Percentagem de Preenchimento Ósseo						
Tukey HSD						
(I) Grupo x Tipo de Preenchimento	(J) Grupo x Tipo de Preenchimento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Valor p	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Controle Coágulo	Controle Bone	1,14	4,094382	0,9924	-9,793	12,071
	Teste Coágulo	50,5	3,933755	0,0000	40,018	61,025
	Teste Bone	12,9	3,933755	0,0109	2,3498	23,356
Controle Bone	Controle Coágulo	-1,1	4,094382	0,9924	-12,07	9,7927
	Teste Coágulo	49,4	3,933755	0,0000	38,879	59,885
	Teste Bone	11,7	3,933755	0,0235	1,2105	22,217
Teste Coágulo	Controle Coágulo	-51	3,933755	0,0000	-61,02	40,018
	Controle Bone	-49	3,933755	0,0000	-59,89	38,879
	Teste Bone	-38	3,766284	0,0000	-47,72	27,613
Teste Bone	Controle Coágulo	-13	3,933755	0,0109	-23,36	2,3498
	Controle Bone	-12	3,933755	0,0235	-22,22	1,2105
	Teste Coágulo	37,7	3,766284	0,0000	27,613	47,725

Percentagem de Preenchimento Ósseo  
Tukey HSD

Grupo x Tipo de Preenchimento	N	Grupos		
		1	2	3
Teste Coágulo	13	21,03		
Teste Bone	13		58,70	
Controle Bone	11			70,41
Controle Coágulo	11			71,55
Valor p		1,0000	1,0000	0,9914

