

**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

POLIANA MENDES DUARTE

Cirurgiã-Dentista

***EFEITO DO ESTRÓGENO E DA CALCITONINA SOBRE O REPARO E
DENSIDADE ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES DE TITÂNIO
INSERIDOS EM RATAS OVARIECTOMIZADAS.***

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica, Área
de Periodontia

Piracicaba

2002

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

POLIANA MENDES DUARTE

**EFEITO DO ESTRÓGENO E DA CALCITONINA SOBRE O REPARO E
DENSIDADE ÓSSEA AO REDOR DE IMPLANTES DE TITÂNIO
INSERIDOS EM RATAS OVARIETOMIZADAS.**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG. 02 04 03
Assinatura do Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior

Banca examinadora:

Prof. Dr. Luis Antônio Pugleisi A. de Lima

Prof. Dr. Sérgio de Toledo

Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum (suplente)

Piracicaba

2003

2003-9393

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	UNICAMP
	D85e
EX	
TOMBO BC	59161
PROC.	124103
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	05/06/03
Nº CPD	

CM00185473-7

BIB ID 293051

Ficha Catalográfica

D85e Duarte, Poliana Mendes.
 Efeito do estrógeno e da calcitonina sobre o reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em ratas ovariectomizadas. / Poliana Mendes Duarte. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 xii, 76p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Júnior.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Periodontia. 2. Implantes dentários endoósseos. 3. Hormônio. I. Nociti Júnior, Francisco Humberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 30 de Janeiro de 2003, considerou a candidata POLIANA MENDES DUARTE aprovada.

1. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR.

2. Prof. Dr. LUIS ANTONIO PUGLIESI ALVES DE LIMA

3. Prof. Dr. SERGIO DE TOLEDO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho inteiramente ao meu pai Amâncio, à minha mãe Rosa Maria e ao meu irmão Giuliano que são os alicerces de minha vida e as pessoas que mais amo nesse mundo. Agradeço a vocês pelo amor incondicional, pelo exemplo de família e pelo incalculável estímulo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

*A Deus, por ter guiado minhas mãos e meus
pensamentos para desenvolver este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Francisco Humberto Nociti Jr.**, meu orientador, pelo exemplo de dedicação e seriedade. Ao amigo **Chico** pelos papos, conselhos e imenso carinho, que se fez presente mesmo estando distante.

Ao Prof. Dr. **Antônio Wilson Sallum**, exemplo de vida e profissionalismo.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pelo carinho e por ter acompanhado meus primeiros passos de vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, pela serenidade, paciência e grande entusiasmo científico.

Ao Prof. Dr. **Márcio Zafalon Casati**, pelo incentivo, amizade e confiança e pela indispensável participação em minha banca de qualificação.

À **Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro durante o curso de mestrado.

À Profa. Dra. **Fernanda Klein Marcondes**, pelas instruções durante a parte experimental desse estudo e pelas sugestões no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. **Márcio de Moraes** por tão gentilmente ter participado do exame de qualificação.

À Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do **Magnífico Reitor Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz** e vice-reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do Diretor **Thales R. de Matos Filho** e Vice-Diretor **Oslei Paes de Almeida**.

Ao **Prof. Lourenço Corres Sobrinho**, coordenador geral dos cursos de Pós-Graduação e à **Profa. Dra. Brenda Paula F. A. Gomes**, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

À **ASTechnology Ltda**, na pessoa de **Sr. Sidival Dias**, que gentilmente forneceu os implantes utilizados neste estudo.

Ao **Sr. Wanderley Francisco Vieira**, bioterista da FOP-UNICAMP, pelos cuidados dispensados aos animais durante a pesquisa.

Ao **Feliciano**, pelo carinho e colaboração durante o período experimental desse trabalho.

A **Srta. Eliete Aparecida F. Lima**, pela indiscutível competência e amizade.

À **Srta. Heloísa Maria Ceccotti**, bibliotecária da FOP-UNICAMP, pela orientação na formação da tese.

Aos amigos **Ângela, Antonieta, Juliana, Bruno, Robert, Cris, Suzana, Renato e Fernando**, futuros mestres em periodontia, perto de quem a caminhada tornou-se mais agradável.

Aos amigos **Patfu, Marcelo e Bruno Benatti**, pela especial colaboração para realização desse estudo.

À **Luciana**, pelos momentos divertidos e energia positiva.

À **Patrícia**, minha irmã de coração, para quem não encontro palavras para expressar meus agradecimentos e de quem vou sentir muitas saudades.

Ao amigo **Getúlio**, por incentivar meus primeiros passos e pelo inacabável entusiasmo pela vida acadêmica.

Ao **Flavio** pelo carinho e amizade.

Ao **João**, por ter sido meu braço direito nesta caminhada com paciência e exemplo de amizade.

À Dra. **Marisi Aidar** pela confiança e pelo exemplo clínico em periodontia.

À **D. Irene** pelo exemplo de fé, pelo apoio e pela amizade.

Aos **amigos da graduação** que certamente estiveram torcendo pelo meu sucesso.

Ao **André**, que Deus colocou em meu caminho num momento de muita inspiração, e que de forma especial demonstrou durante todos estes anos carinho, compreensão e incentivo.

E finalmente, a todos àqueles que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos

*“As pessoas e as coisas que nos cercam
moldam o trampolim de nossas
vidas. O salto é nosso.”*

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. PROPOSIÇÃO	6
3. REVISÃO DE LITERATURA	7
3.1 Implantes dentais de titânio	7
3.1.1 Etiologia do insucesso dos implantes dentais	8
3.2 Osteoporose	10
3.2.1 Osteoporose e os tecidos orais	12
3.3 Tratamentos propostos para osteoporose	14
3.3.1 Terapia de reposição hormonal	15
3.3.2 Calcitonina	20
3.4 Implantes dentais e osteoporose	23
3.4.1 Implantes dentais e osteoporose: estudos clínicos	23
3.4.2 Implantes dentais e osteoporose: estudos em animais	25
3.5 Implantes dentais e tratamentos para osteoporose	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 Seleção dos animais	30
4.2 Ovariectomia	30
4.3 Delineamento do estudo	32
4.4 Colocação dos implantes	33
4.5 Análises séricas	35

4.6 Análises clínicas	35
4.7 Análises histométricas	36
4.8 Análise estatística	39
5. RESULTADOS	41
5.1 Avaliações clínicas	41
5.2 Análises séricas	43
5.3 Resultados histométricos	45
5.3.1 Contato direto osso/implante	45
5.3.2 Área de preenchimento ósseo dentro das roscas	46
5.3.3 Densidade óssea na região adjacente ao implante	48
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
9. ANEXOS	77

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do estrógeno (E) e da calcitonina (CT) sobre o reparo e densidade óssea ao redor de implantes inseridos em ratas ovariectomizadas (OVX). Cinquenta e oito animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo 1 (n=15): ovariectomia simulada; Grupo 2 (n=15): ovariectomia; Grupo 3 (n=14): OVX e administração subcutânea de CT, 4 dias por semana (16 IU/Kg), um dia após OVX durante todo período experimental; Grupo 4 (n=14): OVX e administração diária de 17 β estradiol (20 μ g/Kg) um dia após OVX durante todo período experimental. Vinte e um dias após a ovariectomia bilateral, cada animal recebeu um implante de titânio rosqueável por tibia. Após sessenta dias da colocação dos implantes os animais foram sacrificados e obtidas secções não-descalcificadas. Os parâmetros histométricos analisados foram: densidade óssea (DO) numa região de 500 μ m lateral ao implante, contato direto osso-implante (CD) e área óssea dentro das roscas (AO). Os resultados foram obtidos e avaliados separadamente na região cortical (zona A) e medular (zona B). Na zona A, a análise intergrupo não demonstrou diferenças estatisticamente significantes para o CD e DO ($P>0.05$). Em contraste, o grupo 4 demonstrou maior área óssea que os grupos 2 e 3 ($P<0.05$). Resultados obtidos da zona B revelaram que o estrógeno anulou o efeito negativo da ovariectomia na DO, CD e AO ($P<0.05$), enquanto a calcitonina não apresentou o mesmo efeito ($P>0.05$). Dentro dos limites desse estudo, conclui-se que a administração diária de estrógeno pode prevenir a influência negativa da deficiência do estrógeno endógeno no reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio.

PALAVRAS CHAVE: deficiência de estrógeno, implantes de titânio, calcitonina, terapia de reposição hormonal, ovariectomia.

ABSTRACT

This study evaluated whether estrogen (E) and calcitonin (CT) administration could influence bone healing and bone density around implants placed in ovariectomized rats (OVX). Twenty-one days before implant placement, bilateral ovariectomies were performed from a dorsal approach. One screw-shaped titanium implant was placed bilaterally. The animals were assigned to one of the following groups: Group 1 (n=15): sham surgeries; Group 2 (n=15): OVX rats; Group 3 (n=14): OVX rats subcutaneously administered with calcitonin (CT) 4 days/week (16 IU/Kg); Group 4 (n=14): OVX rats subcutaneously administered with 17β estradiol daily (20 μ g/Kg). After sixty days, the animals were sacrificed and undecalcified sections obtained. Bone density (BD) (the proportion of mineralized bone in a 500 μ m-wide zone lateral to the implant), bone-to-implant contact (BIC) and bone area (BA) around the implants were obtained and arranged separately for the cortical (Zone A) and cancellous (Zone B). In Zone A, intergroup analysis revealed no significant difference regarding BIC and BD ($P>0.05$). In contrast, the group 4 presented a greater bone area than groups 2 and 3 ($P<0.05$). Data from Zone B revealed that estrogen nullified the negative effect of the ovariectomy on BD, BIC and BA ($P<0.05$), while CT presented no effect ($P>0.05$). Therefore, E-therapy may prevent the influence that endogenous estrogen deficiency exerts on bone healing and bone density around titanium implants.

KEY WORDS: dental implants, calcitonin, hormone replacement therapy, estrogen deficiency and ovariectomy.

1. INTRODUÇÃO

Estudos de longa duração têm demonstrado que a reabilitação de pacientes edêntulos através de implantes osseointegráveis é um procedimento com alta taxa de sucesso, presente cada vez mais na rotina odontológica (BRANEMARK *et al.*, 1977, ADELL *et al.*, 1981 e 1990, BAIN & MOY, 1993; JONES *et al.*, 1999). Por outro lado, alguns trabalhos ainda procuram esclarecer as causas de fracasso da osseointegração, que podem estar relacionadas a fatores exógenos, relativos ao operador e ao biomaterial e; endógenos, inerentes aos hábitos e estado de saúde do paciente (ESPOSITO *et al.*, 1998). Tem sido sugerido que distúrbios hormonais, imunológicos e nutricionais, bem como doenças que alteram o metabolismo ósseo exerçam influência negativa no resultado do implante (MATUKAS, 1988; MINSK & POLSON, 1998).

Osteoporose é uma doença osteometabólica caracterizada pela presença de uma massa óssea inferior a valores pré-estabelecidos para determinada idade e sexo, aumentando a susceptibilidade do indivíduo a fraturas (ALBRIGHT, 1941). Assim como ossos longos, a doença parece atingir também os ossos da face o que poderia, segundo alguns estudos, implicar em alterações no tratamento odontológico no que diz respeito à colocação de implantes, próteses e maior risco de perdas dentárias (KRIBBS *et al.*, 1989; KRIBBS *et al.*, 1990; KRIBBS, 1990).

As causas mais comuns dessa patologia consistem em ausência de estresse físico dos ossos, desnutrição, falta de vitamina D, diminuição do nível de hormônio de crescimento, síndrome de Cushing e baixa secreção de estrógeno no período pós-menopausa (RIGGS & MELTON, 1986, GUYTON, 1992).

Na tentativa de simular a deficiência de estrógeno gerada no período pós-menopausa em humanos muitos estudos têm utilizado modelo de animais ovariectomizados. Através desse modelo, pesquisadores demonstraram que existe uma influência negativa da deficiência de estrógeno no

tecido ósseo ao redor de implantes inseridos nesses animais. O efeito deletério parece resultar em menor área de contato, quantidade e qualidade óssea ao redor de implantes bem como menor resistência ao torque. (YAMAZAKI *et al.*, 1999; HARA *et al.*, 1999, LUGERO *et al.*, 2000)

Diversos tratamentos têm sido propostos para a osteoporose com o objetivo de prevenir ou evitar a progressão da reabsorção óssea. Os tratamentos podem ser divididos em: não-farmacológicos como a prática de exercícios físicos e farmacológicos, onde são administrados agentes anti-reabsorção ou estimuladores da formação óssea. Entre os agentes anti-reabsorção existem a terapia de reposição hormonal (TRH) por estrógeno, os moduladores seletivos de receptores de estrógenos, os bisfosfonatos e a calcitonina (CT); enquanto o paratormônio é considerado um estimulador da formação óssea (NIH, 2001).

A calcitonina, isolada principalmente do salmão, tem sido prescrita para tratamento ou prevenção de desordens ósseas tanto por inibir a reabsorção do tecido ósseo (GONZÁLEZ *et al.*, 1987; NODA & KUWAHARA, 1993) como por apresentar propriedades analgésicas (LYRITIS *et al.*, 1991). Este hormônio parece reduzir transitoriamente as concentrações plasmáticas de cálcio através de um efeito imediato na diminuição da atividade osteoclástica e um efeito prolongado na diminuição da formação de osteoclastos (CHAMBERS, 1988). WRONSKI *et al.*, em 1991, demonstraram que o tratamento de ratas ovariectomizadas com calcitonina diminuiu o remodelamento ósseo e previne osteopenia.

Vários estudos têm sugerido que a TRH pode reduzir riscos de fraturas ósseas em mulheres durante a menopausa, pela reversão da deficiência de estrógeno, hormônio capaz de induzir alterações no metabolismo ósseo (MICHAELSSON *et al.*, 1998). A ausência desse hormônio parece estar relacionada a um aumento da reabsorção óssea, manifestada tanto pelo aumento do número de

osteoclastos quanto pelo aumento da atividade dessas células (VÄÄNÄNEN & HÄRKONEN, 1996). O mesmo seria capaz de interagir com células ósseas de modo a modular a secreção e atividade de fatores reguladores do metabolismo ósseo como interleucina-1, fator de necrose tumoral e interleucina-6 (GOWEN *et al.*, 1983; GIRASOLE *et al.*, 1992).

Embora esteja bem estabelecida a influência negativa da deficiência de estrógeno ao redor de implantes inseridos em animais ovariectomizados, não existem relatos na literatura se os medicamentos disponíveis para osteoporose são capazes de impedir os efeitos deletérios dessa deficiência.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, histometricamente, a influência do estrógeno e da calcitonina sobre o reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1-Implantes dentais de titânio

Diversos estudos têm demonstrado que os implantes dentais de titânio são dispositivos seguros para substituição de dentes perdidos, fazendo com que os mesmos sejam cada vez mais empregados na clínica odontológica.

Em 1969, BRANEMARK *et al.* observaram que o titânio era capaz de formar uma união resistente com o osso alveolar sem causar reações adversas neste tecido e nos demais tecidos orais. Segundo este estudo uma boa ancoragem óssea dependia de um preparo cirúrgico atraumático, de implantes mecânica e quimicamente adequados e de um período de tempo no qual o implante estaria isolado da cavidade bucal.

PARR *et al.*, em 1985, descreveram alguns pontos essenciais que tornaram o titânio o material de escolha para implantes dentais. Dentre esses estavam a alta resistência mecânica para suportar a força mastigatória; a capacidade de formação de uma camada de óxidos extremamente estável e, a ausência de corrosão galvânica quando em contato com outros metais.

Com base nestes conceitos, um estudo clínico longitudinal de 10 anos desenvolvido por BRANEMARK *et al.* em 1977, demonstrou estabilidade contínua de 99% dos casos de implantes mandibulares e 76% dos maxilares, mesmo após instalação de próteses. Após procedimentos clínicos adicionais, os índices de estabilidade aumentaram para 100% e 94% em implantes inferiores e superiores, respectivamente.

O sucesso dos implantes de titânio osseointegráveis também foi demonstrado em um estudo de ADELL *et al.*, em 1981, que acompanhou 2768 implantes por um período de 15 anos. Os autores verificaram que 81% dos implantes colocados na maxila e 91% dos colocados na mandíbula permaneceram estáveis suportando próteses dentais.

Na década de noventa, muitos outros acompanhamentos clínicos puderam demonstrar a alta previsibilidade do sucesso dos implantes de titânio, verificada pelas altas porcentagens de estabilidade durante muitos anos. ZARB & SCHMITT (1990), por exemplo, relataram que entre quatro e nove anos de observação houve cerca 89% de sucesso de implantes sob próteses. WEYANT (1994) relatou 96,1% de êxito em implantes num período de cinco anos. LINDQUIST *et al.* (1996) demonstraram 99,3%; 98,9% e 98,9% de sucesso após 1, 10 e 15 anos, respectivamente. JONES *et al.* (1999) relataram 92,8% de implantes de titânio bem sucedidos antes da instalação da prótese e 95,3% após colocação da carga protética. Mais recentemente, NAERT *et al.* (2000) encontraram uma taxa de sucesso de 93% após 11 anos de acompanhamento enquanto MERICKSE-STERN *et al.* (2001) relataram que 91,4 % de implantes em função após 10 anos de observação.

3.1.1- Etiologias do insucesso dos implantes dentais

Embora muitos trabalhos demonstrem que os implantes dentais apresentam nível de sucesso predominantemente acima de 90%, ainda existe uma porcentagem de fracassos. Por essa razão, diversos estudos objetivam esclarecer os motivos que podem levar ao insucesso de um implante e os meios para impedir que estas ocorram.

Didaticamente, a etiologia das falhas dos implantes dentais pode ser dividida em: endógena sistêmica, que diz respeito à idade, genética, estado de saúde e hábitos do paciente; endógena local que se relaciona à quantidade e qualidade óssea, localização anatômica e presença de enxertos no leito receptor; exógena que pode estar relacionada tanto à experiência e técnica do operador, como a biocompatibilidade do material, características superficiais e desenho do implante (ESPOSITO *et al.*, 1998).

MORRIS *et al.*, em 1997, sugeriram que o fracasso de implantes estava relacionado à experiência do operador demonstrando que o insucesso foi quase duas vezes maior em procedimentos realizados por profissionais que haviam feito menos de cinquenta implantes. Analisando a curva de aprendizado para a colocação de implantes, LAMBERT *et al.* (1997) observaram que a taxa de falha precoce nos nove primeiros implantes era duas vezes maior que nos colocados após este período de treinamento.

Vários experimentos têm demonstrado que a técnica utilizada, a presença de trauma cirúrgico e a contaminação bacteriana podem gerar prejuízos na reparação óssea ao redor de implantes dentais. O superaquecimento local, pela ausência de uma adequada irrigação, por exemplo, pode induzir uma área de osso necrótico diretamente relacionada ao grau de injúria promovido pelo operador. Para ocorrer reparação óssea essa porção necrótica necessita primeiramente ser reabsorvida, podendo resultar em uma menor proporção de contato osso-implante (ERIKSSON *et al.*, 1982). SMITH *et al.* (1992) observaram uma correlação positiva entre o número de implantes colocados e o risco de falhas. Os autores sugeriram que a colocação de múltiplos implantes requer um maior tempo operatório, o que poderia ocasionar em contaminação bacteriana e conseqüente diminuição dos índices de sucesso.

Entretanto, os principais fatores locais relacionados às falhas de implantes são de origem endógena e consistem basicamente na característica anatômica e na qualidade óssea do sítio receptor. JAFFIN & BERMAN (1991) encontraram 37% de falhas em implantes colocados em osso tipo IV e 3% de falhas em implantes colocados em ossos dos tipos I, II e III. FRIBERG (1994), através de estudo retrospectivo, avaliou mais de 4000 implantes e concluiu que mandíbulas com pobre qualidade óssea apresentam risco para a estabilidade inicial do implante. Em geral, as maiores taxas

de fracasso têm sido relatadas para a região posterior da maxila e mandíbula, o que pode ser parcialmente explicado pela qualidade óssea e maior força oclusal dispensada nessas regiões.

O consumo de cigarros é um fator de ordem sistêmica apontado como uma das principais causas de falhas de sucesso dos implantes osseointegráveis. JONES & TRIPLETT (1992) verificaram baixas taxas de reparo ósseo em implantes associados a enxertos em fumantes. Estudos de longa duração têm demonstrado que os paciente fumantes apresentam um maior índice de insucesso de implantes (BAIN & MOY, 1993) e que estes apresentam maior perda óssea ao redor dos implantes já osseointegrados (LINDQUIST et al., 1997).

As doenças ósseas, reumatológicas e hormonais bem como as alterações imunológicas parecem influenciar no resultado da osseointegração de forma que o comprometimento da saúde geral do paciente tem sido considerado um impacto negativo na sobrevida dos implantes (ADELL, 1992). Segundo ROBERTS *et al.* (1992) as desordens osteometabólicas que apresentam potencial para afetar pacientes implantados incluem a osteodistrofia renal, osteomalacia, doença de Paget e osteoporose, pois resultam em uma estrutura óssea desfavorável para a inserção de implantes.

3.2-Osteoporose

No período de três semanas, cerca de um a dois milhões de sítios microscópicos presentes no tecido ósseo sofrem reabsorção por células multinucleadas derivadas do tecido hematopoiético conhecidas por osteoclastos. Em aproximadamente quatro meses, os osteoblastos derivados do estroma medular reorganizam esse tecido depositando uma matriz protéica extracelular que sofre calcificação, originando novamente tecido ósseo (RODAN & MARTIN, 2000). Os processos de reabsorção e formação óssea estão em equilíbrio constante em adultos jovens e por volta da terceira

e quarta década de vida os indivíduos atingem seu pico de massa óssea. Subseqüentemente a esse período, ocorre declínio dessa massa através das alterações fisiológicas do envelhecimento, que ocorrem independente de raça, sexo ou alterações patológicas (LOZA *et al.*, 1996).

Diversas desordens ósseas resultam do desequilíbrio entre os processos de reabsorção e formação. Em 1941, ALBRIGHT *et al.*, definiram osteoporose do ponto de vista patológico como uma doença na qual há diminuição de tecido ósseo, mas o tecido remanescente encontra-se completamente calcificado, sem alteração em sua composição química. Esse fato fez com que a osteoporose pudesse ser diferenciada da osteomalacia, doença na qual ocorre o atraso na mineralização da matriz óssea, uma vez que ambas as doenças foram consideradas sinônimas por muito tempo. Observações histológicas de osso osteoporótico indicam um espaço trabecular significativamente aumentado pela presença de uma delgada e descontínua estrutura óssea e um osso cortical ligeiramente fino (CHESNUT & KRIBBS, 1982).

Osteoporose é a doença osteometabólica mais comum e consiste em uma perda gradativa do conteúdo mineral e orgânico do tecido ósseo (URIST, 1972). Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência da doença aumenta com a idade. A redução da massa óssea e deteriorização de sua microarquitetura resultam em fragilidade do tecido ósseo e conseqüente aumento da incidência de fraturas e dor. As principais fraturas relacionadas à idade e provavelmente à osteoporose ocorrem nos corpos vertebrais, fêmur e úmero proximal, antebraço distal e pelve. (MELTON & RIGGS, 1983). Estima-se que nos Estados Unidos 16,8 milhões de mulheres no período pós-menopausa perdem mais que 10% do pico de massa óssea, outros 9,4 milhões perdem mais de 25% e, 4,8 milhões já sofreram alguma fratura decorrente de osteoporose (COOPER & MELTON, 1996).

A doença pode ser classificada, de acordo com sua etiologia, em osteoporose primária e secundária. A secundária ocorre como consequência de distúrbios endócrinos, como por exemplo, hiperparatireodismo, hipertireoidismo e ingestão de glicocorticóides. A osteoporose primária, por sua vez, decorre do envelhecimento ou da diminuição dos níveis plasmáticos de estrógeno na menopausa, sendo a última a causa mais comum de osteoporose na mulher. A maioria das mulheres atinge seu pico de massa óssea na terceira década e tem o declínio dessa massa acelerado com a menopausa, perdendo cerca de 50% de osso medular e 30% de osso cortical no decorrer da vida (RIGGS & MELTON, 1986). Embora o nível estimado dessa perda diferencie de uma população para outra e de acordo com as formas de diagnóstico empregadas, tem sido reportado uma ocorrência de 0,5% a 1% de perda óssea por ano (VICO *et al.*, 1992). O risco de osteoporose pode ainda ser aumentado pela influência de outros fatores como consumo exagerado de cigarros e álcool, ausência de estresse físico dos ossos, baixa ingestão de vitamina D e cálcio e diminuição do nível de hormônio de crescimento (CHRISTIANSEN, 1993; GUYTON, 1992).

3.2.1-Osteoporose e os tecidos ósseos orais

KRIBBS *et al.*, em 1989, determinaram, através de microdensitometria, a relação entre a massa óssea da mandíbula e a massa óssea do osso rádio e das vértebras de um grupo de 85 mulheres pós-menopausa portadoras de osteoporose. Os resultados demonstraram correlação positiva entre a mandíbula e a massa esquelética em relação à espessura da cortical e altura da crista mandibular. No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores mediu a massa óssea, densidade e espessura da cortical mandibular de 50 mulheres normais com idade entre 20 e 90

anos, comparando-as com medidas tomadas na espinha dorsal e radio. Os autores encontraram correlação positiva entre a massa óssea mandibular e o total de massa óssea do esqueleto na população estudada (KRIBBS *et al.*, em 1990). KRIBBS, em 1990, comparou o osso mandibular de mulheres osteoporóticas e normais e concluiu que havia menor massa óssea e espessura de osso cortical e maior porcentagem de edentulismo em mulheres portadoras da doença. HIRAI *et al.*, em 1993, examinaram, através de radiografias laterais e frontais das vértebras, 44 pacientes idosos edêntulos portadores de osteoporose classificando-os de acordo com o grau de severidade da doença. Em seguida, a redução da altura da crista alveolar residual foi obtida através de tomadas radiográficas panorâmicas. Os autores concluíram que a altura da crista óssea residual nesses pacientes foi correlacionada com a severidade da osteoporose. Outros estudos clínicos mais recentes também têm sugerido que um maior risco de perda óssea oral em mulheres apresenta correlação com a osteoporose pós-menopausa (HILDEBOLT, 1997; JEFFCOAT, 1998).

Por outro lado, KLEMETTI *et al.* (1993), demonstraram que a densidade óssea mineral trabecular da espinha lombar e do fêmur não apresenta valores correspondentes na mandíbula. DAO *et al.*, em 1993, afirmaram que a presença de osteoporose na vértebra não está necessariamente acompanhada de um estado ósseo similar na maxila e mandíbula.

Três principais modelos de indução de osteoporose em animais têm sido propostos: administração de uma dieta com alto teor de proteínas e baixo teor de cálcio, (MARAGHI *et al.*, 1965), osteoporose induzida por esteróides (STOREY, 1963) e excisão cirúrgica bilateral dos ovários (ovariectomia), onde a depleção do nível de estrógeno resulta num quadro de osteopenia qualitativamente similar ao desenvolvida na osteoporose pós-menopausa humana (WRONSKI *et al.*, 1988; CHOW *et al.*, 1992)

SONES *et al.*, em 1986, mediram o grau de reabsorção óssea mandibular pela técnica do isótopo radioativo em ratos normais e com osteoporose induzida pelo controle da dieta. Os resultados demonstraram que houve uma redução da quantidade óssea em cerca de 17% no grupo osteoporótico em relação ao grupo saudável. LI & NISHIMURA, em 1994, demonstraram histologicamente o efeito da deficiência do estrógeno no remodelamento da crista alveolar após extração dentária, utilizando ratas ovariectomizadas. Os autores sugeriram que a deficiência sistêmica do hormônio alterou a diferenciação osteoblástica e o padrão de remodelamento ósseo. JAHANGIRI *et al.*, em 1997, analisaram em nível histológico e molecular o fenômeno de reparo no rebordo residual de ratas ovariectomizadas. Histologicamente, os animais osteoporóticos apresentaram áreas medulares mais amplas e um número aumentado de osteoclastos, indicativos de alta atividade de reabsorção. Em nível molecular o grupo teste revelou redução do nível de colágeno tipo I e II e de matrizes extracelulares primárias de tecido ósseo e cartilaginoso. Recentemente, CAO *et al.* (2001) avaliaram a associação entre a perda da função ovariana e densidade óssea mineral de mandíbulas de coelhas, 12 semanas após realização da ovariectomia, através da tomografia computadorizada. Os autores observaram diminuição da densidade óssea total e trabecular no grupo portador de osteoporose.

3.3. Tratamentos propostos para osteoporose

Diversos tratamentos têm sido propostos para a osteoporose com o objetivo de prevenir ou evitar a progressão da reabsorção óssea. Conforme descrito anteriormente, os tratamentos podem ser divididos em não-farmacológicos como a prática de exercícios físicos e o controle da dieta e,

farmacológicos com agentes anti-reabsorção ou estimuladores da formação óssea. Entre os anti-reabsorção estão a terapia de reposição hormonal (TRH), os moduladores seletivos de receptores de estrógenos (SERMS), os bisfosfonatos e a calcitonina; e entre os estimuladores da formação óssea destaca-se o paratormônio (NIH, 2001).

3.3.1- Terapia de Reposição Hormonal

Estudos em humanos demonstram que as diferenças na densidade óssea de pacientes tratados com estrógeno e grupos controle com deficiência desse hormônio aumentam com o passar do tempo (CHRISTIANSEN, 1993). De acordo com as evidências a perda óssea é causada por um aumento significativo da reabsorção em cada unidade de remodelamento onde a formação óssea local não é suficiente para compensar a reabsorção. A deficiência de estrógeno gera ainda mudanças na arquitetura interna do tecido, levando a um aumento de sua fragilidade. A maioria das alterações precoces é observada principalmente no osso trabecular pelo aumento dos espaços medulares, enquanto as alterações tardias resultam em porosidades na região cortical (VAANANEN & HARKONEN, 1996).

Diversas hipóteses patogênicas foram desenvolvidas ao longo dos anos para explicar a perda de massa óssea causada pela deficiência de estrógeno. Alguns autores sugeriram que esta é consequência de um aumento da sensibilidade ao paratormônio das células ósseas envolvidas na reabsorção (HEANEY, 1961). Outros atribuíram o aumento da reabsorção a um ajuste homeostático secundário a uma deficiência primária da síntese 1,25 di-hidroxivitamina D que limitaria a absorção intestinal de cálcio. O estrógeno agiria também na enzima 1α -hidroxilase, que é responsável pela síntese de calcitriol, principal hormônio envolvido na absorção intestinal de cálcio. Assim a

deficiência de estrógeno levaria a uma diminuição do calcitriol e conseqüentemente menor absorção de cálcio (CANIGGIA *et al.*, 1970). ARJMANDI, em 1993, demonstrou que o estrógeno age diretamente sobre o transporte intestinal de cálcio através de receptores específicos presentes no duodeno. Dessa forma, sua deficiência poderia diminuir a absorção de cálcio. Segundo STEVENSON *et al.* (1981), uma menor síntese de calcitonina poderia também participar do processo de reabsorção induzido pela deficiência de estrógeno.

Outros estudos têm demonstrado que o estrógeno também age diretamente sobre as células ósseas, inibindo a reabsorção e promovendo osteogênese, uma vez que receptores para esse hormônio têm sido encontrados em todos os principais tipos de células do tecido ósseo (ERIKSEN *et al.*, 1988, TURNER *et al.*, 1994). A deficiência de estrógeno está relacionada a um aumento do número, do tempo de vida e da quimiotaxia de osteoclastos e seus precursores. É possível que sua ação esteja associada à inibição da maturação e da atividade de reabsorção dos osteoclastos (JILKA *et al.* 1992). Existem poucas investigações sobre o efeito desse hormônio em osteócitos. Em cultura de osteoblastos, o mesmo parece estimular a proliferação e diferenciação dessas células (TURNER *et al.*, 1994).

O estrógeno pode ainda modular a produção de reguladores ósseos liberados local e sistemicamente por monócitos, macrófagos e linfócitos T (RAISZ, 1988). GIRASOLE *et al.* (1995) demonstraram o efeito do estrógeno na secreção de interleucina-6 (IL-6), derivada de células ósseas medulares, e sua relação com diferenciação osteoclástica. A IL-6 exerce importante papel no metabolismo ósseo por estimular sua reabsorção pela quimiotaxia e diferenciação de osteoclastos. (GIRASOLE, 1992). A interleucina-1 (IL-1) é o mais potente estimulador da atividade osteoclástica promovendo reabsorção óssea em estudos desenvolvidos *in vitro* (GOWEN, 1983) e *in vivo*

(LORENZO, 1998). Exerce efeito na síntese de proteínas colágenas e não-colágenas e induz as células ósseas a secretarem várias citocinas como IL-6, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF). Estas, por sua vez, regulam a proliferação de precursores osteoclásticos e sua diferenciação em osteoclastos (PACIFICI, 1992). PACIFICI *et al.*, em 1989, demonstraram que monócitos de pacientes osteoporóticos apresentaram maior atividade de IL-1 quando comparados a pacientes saudáveis. Os autores demonstraram que a atividade desta citocina aumentava após a menopausa, permanecia elevada por um período maior em mulheres portadoras de osteoporose e retornava a níveis pré-menopausa quando empregado tratamento com estrógeno. Efeito similar foi observado para o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e o GM-CSF (PACIFICI *et al.*, 1990). Os monócitos humanos secretam simultaneamente IL-1 e um inibidor de IL-1. A deficiência de estrógeno possivelmente desequilibra o nível destas substâncias, diminuindo a secreção do inibidor e elevando o nível de IL-1 (PACIFICI, 1992).

A terapia de reposição hormonal com estrógenos, administrados oralmente, de forma injetável ou através de adesivos cutâneos, tem sido considerada a principal forma de tratamento e prevenção de osteoporose pós-menopausa. Estudos têm sugerido que o desenvolvimento desta doença pode ser amplamente evitada com o uso de hormônios sintéticos ou extraídos de mulheres grávidas, se iniciado antes ou logo após o início da menopausa. A reposição hormonal origina um número menor de osteoclastos maduros disponíveis para a reabsorção das unidades de remodelamento (PACIFICI, 1992). Com base neste mecanismo, o medicamento pode ser classificado como inibidor da reabsorção óssea. Trabalhos clínicos e laboratoriais têm comprovado

que a presença do hormônio reduz significativamente o ritmo de reabsorção óssea (CHRISTIANSEN *et al.*, 1993; VAANANEN & HARKONEN, 1996).

CHRISTIANSEN *et al.*, em 1981, demonstraram que mulheres no período pós-menopausa perdiam osso quando a terapia de reposição hormonal era interrompida. HOSKING *et al.*, em 1998, demonstraram, em mulheres no período pós-menopausa inicial, que o estrógeno aumentou a densidade mineral óssea da coluna vertebral e bacia de 3 a 4%. MICHAELSSON *et al.*, em 1998, em um estudo epidemiológico retrospectivo sugeriram que a terapia de reposição hormonal pode reduzir o risco de fratura de bacia em mais 50% quando os sujeitos estão sob tratamento ou receberam o hormônio nos últimos cinco anos.

WRONSKI *et al.* (1985 e 1986) demonstraram que ratas ovariectomizadas desenvolviam osteopenia que inicialmente era caracterizada por uma perda óssea acelerada e em seguida por uma fase lenta ou de estabilização relativa. WRONSKI *et al.*, em 1988, concluíram que o tratamento de ratas ovariectomizadas com estrógeno em baixa, média ou alta dosagem promoveu completa proteção contra o desenvolvimento de osteopenia na tíbia, utilizando medidas histomorfométricas.

TAKANO-YAMAMOTO & RODAN, em 1989, estudaram histologicamente o efeito da liberação local de 17β -estradiol na região trabecular do fêmur de ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que a ovariectomia causou cerca de 50% de perda de volume ósseo trabecular, aumento do número de osteoclastos e osteoblastos e da reabsorção relativa da superfície. O hormônio restaurou o volume ósseo trabecular em 75% e 85%, em uma e três semanas de infusão local, respectivamente. O tratamento diminuiu o número de osteoclastos e a reabsorção relativa da superfície e aumentou o número de osteoblastos e osteóide.

CHOW *et al.*, em 1992, avaliaram o efeito do estrógeno no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, utilizando análise histomorfométrica. Os autores relataram que na metáfise proximal a ovariectomia causou diminuição substancial no volume ósseo, mas este foi aumentado de forma dose-dependente pela administração de estradiol.

Em 1993, WRONSKI *et al.*, estudaram o efeito da interrupção da terapia de reposição hormonal administrada durante 180 dias, através de análise histométrica de tíbias de ratas ovariectomizadas. Os autores concluíram que o efeito de proteção contra perda óssea exercido pelo estrógeno foi completamente perdido após interrupção da reposição, sugerindo que mulheres pós-menopausa que interrompem a reposição hormonal podem apresentar alto risco de perda óssea. SIMS *et al.*, em 1996 descreveram o efeito do estradiol em baixa (8µg) e alta dosagem (20µg) no fêmur de ratas ovariectomizadas. O estradiol preveniu a redução do número de trabéculas e do volume ósseo em ambas as dosagens.

Além do efeito ósseo, a terapia de reposição hormonal é capaz de proporcionar outros benefícios como a manutenção da tonicidade de pele, tecido vaginal e perineal e a prevenção de “ondas de calor”. Porém, polêmicos estudos têm demonstrado que a mesma apresenta contra-indicações e oferece riscos de sérios efeitos colaterais como aumento da incidência de neoplasias e de doenças cardiovasculares (REGAN *et al.*, 2001; WHI, 2002). Com base nessas informações terapias alternativas para a osteoporose pós-menopausa têm sido objeto de muitos estudos.

3.3.2 Calcitonina

Calcitonina é um hormônio polipeptídeo, constituído por uma cadeia de 32 aminoácidos (AUSTIN & HEATH, 1981), que apresenta entre uma e sete pontes de dissulfeto e um amino-carboxil terminal. É secretado pelas células parafoliculares da tireóide, embora sua origem em humanos tenha sido bastante questionada durante alguns anos (FOSTER *et al.*, em 1966). Independente de sua origem, estudos desenvolvidos nesta década são unânimes em demonstrar que a calcitonina exerce sobre a concentração sanguínea de íons cálcio um efeito hipocalcêmico que se traduz em uma ação exatamente oposta à exercida pelo paratormônio (PTH) (HIRSCH *et al.*, 1964, ALIAPOLIOUS *et al.*, 1966).

Embora a calcitonina também exerça efeito nos rins e intestinos, seu principal alvo é o tecido ósseo (ALIAPOLIOUS *et al.*, 1966). Em 1965, FRIEDMAN & RAIZ, através de culturas de tecido ósseo derivado de ratos, sugeriram que a calcitonina exercia seu efeito hipocalcêmico inibindo a reabsorção óssea, pois, na presença desse hormônio, a proliferação e atividade osteoclástica estimulados pelo PTH eram diminuídos. FOSTER *et al.*, em 1966, demonstraram, através de análises radiológicas e microscópicas, que na ausência do PTH, a calcitonina causava aumento da massa óssea trabecular pela redução do número de osteoclastos.

O mecanismo de ação da calcitonina sobre o tecido ósseo tem sido alvo de diversas investigações. O aumento da concentração plasmática de cálcio em cerca de 10% determina elevação da secreção de calcitonina de duas a seis vezes. Esta por sua vez atinge sua atividade máxima em menos de uma hora e reduz imediatamente as concentrações plasmáticas do cálcio, através da diminuição da atividade osteoclástica. Um efeito tardio desse hormônio consiste na diminuição da formação de osteoclastos. (GUYTON, 1992). KALLIO *et al.*, em 1972, demonstraram

que a calcitonina além de manter os osteoclastos separados da superfície óssea, provoca inibição da formação da “bordadura em escova” da membrana plasmática dessas células, estrutura fundamental em sua atividade de reabsorção. Além do efeito direto sobre a estrutura celular dos osteoclastos, FELDMAN *et al.*, em 1980, e MULDER *et al.*, em 1985, sugeriram que a calcitonina age inibindo a fusão de células monucleadas precursoras de osteoclastos.

Com base em seu mecanismo de ação, a calcitonina humana ou derivada de peixes, sobretudo o salmão, tem sido utilizada para o tratamento de osteoporose e outras desordens ósseas como a doença de Paget (HAMILTON, 1974; PATEL *et al.*, 1993) e hiperparatireoidismo primário (CHRISTENSEN & KRISTIANSEN, 1992). O hormônio encontra-se disponível na forma injetável, para aplicações subcutâneas ou intramusculares e em “spray” intranasal (RODAN & MARTIN, 2000), apresentando um custo bastante elevado (SHEN & WRONSKI, 1996).

Em 1988, CIVITELLI *et al.*, afirmaram que existe ganho de massa e menor perda óssea em pacientes osteoporóticos tratados com calcitonina. OVERGAARD *et al.* (1990) relataram que mulheres portadoras de osteoporose pós-menopausa que interromperam o tratamento com calcitonina exibiram aumento da perda óssea de forma similar às pacientes tratadas com placebo. MAZZUOLI *et al.*, (1990), num estudo clínico de doze meses, avaliaram a densidade óssea mineral de mulheres submetidas à excisão cirúrgica dos ovários que fizeram uso de calcitonina ou de um placebo. Os autores demonstraram que o grupo teste não apresentou alterações significantes na densidade óssea, concluindo que a calcitonina previne a perda óssea derivada da deficiência de estrógeno. GENNARI *et al.* (1992) demonstraram que a calcitonina intranasal administrada por um ano em 21 mulheres portadoras de osteoporose pós-menopausa foi capaz de aumentar o conteúdo ósseo vertebral.

PATEL *et al.*, em 1993 demonstraram a utilização deste hormônio para a prevenção da osteoporose, destacando suas propriedades analgésicas anteriormente discutidas por LYRITIS (1991 e 2002), uma vez que foram encontrados receptores desse hormônio em células do sistema nervoso.

WRONSKI *et al.*, em 1991, analisaram, histomorfometricamente, o efeito da calcitonina na massa óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas durante seis semanas. As ratas controle apresentaram menor volume ósseo medular em comparação às tratadas com calcitonina. Os autores sugeriram que o hormônio promove, em curto prazo, proteção contra a osteopenia desenvolvida pela deficiência de estrógeno.

Em 1996, SHEN *et al* avaliaram, através de técnicas histométricas, as alterações ósseas ocorridas em ratas ovariectomizadas tratadas por um longo período com calcitonina e as conseqüências da interrupção desse tratamento. Os resultados demonstraram que a calcitonina diminuiu o remodelamento ósseo, mas foi capaz de prevenir apenas parcialmente o desenvolvimento de osteopenia no osso trabecular. A retirada do hormônio resultou em uma rápida perda do tecido ósseo.

MOCHIZUKI & INOUE, em 2000, investigaram a ação da calcitonina em ratas ovariectomizadas mantidas com uma dieta baixa em cálcio. O trabalho demonstrou que os animais que receberam calcitonina apresentaram menor perda óssea na região vertebral. As ratas que receberam altas doses do hormônio por um longo período de tempo apresentaram uma menor perda óssea apenas na região proximal da tíbia. Esses dados sugerem que a calcitonina exerce efeito inibitório na reabsorção óssea prevenindo a progressão da osteoporose, e que esse efeito aparece de formas diferentes para cada região do corpo.

3.4- Implantes dentais e osteoporose

Muitos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de determinar as condições que afetam a qualidade e quantidade óssea, uma vez que o sucesso da osseointegração depende, em parte, do estado do leito ósseo receptor e de sua capacidade de reparo ao redor do implante. A hipótese de que a osteoporose pode vir a contra-indicar a colocação de implantes dentais se baseia no fato de que a doença afeta a mandíbula ou a maxila assim como atinge outras partes do corpo e que, o osso osteoporótico apresenta metabolismo ósseo prejudicado, que poderia reduzir o reparo ao redor de implantes (DAO *et al.*, 1993).

3.4.1- Implantes dentais e osteoporose: estudos clínicos

Em 1994, FRIEBERG relatou um caso clínico de uma paciente osteoporótica de 57 anos submetida a cirurgias para colocação de cinco implantes na maxila, cujo osso foi classificado como tipo IV (altamente poroso). Um ano após o tratamento da maxila, foram colocados seis implantes na mandíbula. Um acompanhamento de seis anos para os implantes superiores e de cinco para os inferiores revelou que a osseointegração foi estabelecida em todos os implantes com mínima perda óssea marginal, ausência de mobilidade clínica e sintomatologia. Os resultados sugeriram que osteoporose severa não é uma contra-indicação para a colocação de implantes dentais. Em 1996, FUJIMOTO *et al.*, descreveram um caso de reabilitação por implantes em uma paciente de 72 anos portadora de osteoporose severa que apresentava 77% da densidade óssea mineral normal para sua idade. Todos os implantes foram clinicamente osseointegrados após seis e doze meses de reavaliação e não houve problemas de fracasso após a colocação das próteses.

Recentemente, BECKER *et al.* (2000) desenvolveram um estudo retrospectivo controlado para avaliar a correlação entre osteoporose e fracasso de implantes. A população teste consistiu de 49 indivíduos que perderam pelo menos um implante no período de aproximadamente dois anos, enquanto a população controle consistiu em 49 pacientes que não experimentaram perdas de implantes. Inicialmente os pacientes foram submetidos a densitometria óssea (pDEXA) para estimar a densidade mineral da região distal e proximal dos ossos rádio e ulna. Através desses dados, os pacientes foram classificados de acordo com a Organização Mundial de Saúde em indivíduos normais, portadores de osteoporose e portadores de osteoporose severa. A qualidade e quantidade óssea do leito receptor de cada implante foram determinadas uma vez que poderiam ser considerados fatores de confundimento. Os resultados demonstraram que não houve diferenças para a densidade óssea periférica (p-DEXA) entre as duas populações e que a perda de implantes foi apenas substancialmente influenciada pela qualidade óssea local.

FRIBERG *et al.* (2001) analisaram, através de estudo retrospectivo, pacientes portadores de osteoporose esquelética incluindo o osso mandibular. Os indivíduos foram submetidos à colocação de implantes e acompanhados por um período de seis meses a onze anos, com média de três anos e quatro meses. Os autores demonstraram que mesmo pacientes com média de densidade óssea baixa na coluna vertebral e quadril, bem como pobre textura óssea local, podem apresentar sucesso na osseointegração por muitos anos.

AUGUST *et al.* (2001), num estudo retrospectivo, testaram a hipótese de que as mulheres no período pós-menopausa apresentam menor nível de osseointegração quando comparadas às mulheres no período pré-menopausa ou homens. Segundo os resultados, o fracasso de implantes na maxila de mulheres que não receberam reposição de estradiol foi significativamente maior (13,6%)

que mulheres pré-menopausa (6,3%) e homens (7,6%). Não houve diferenças estatisticamente significantes para o fracasso de implantes mandibulares entre os grupos. Com base nesses dados, os autores sugeriram que a deficiência de estrógeno pode ser considerada um fator de risco para o sucesso de implantes osseointegráveis na maxila.

3.4.2 Implantes dentais e osteoporose: estudos em animais

Utilizando ovariectomia para induzir osteoporose, HAYASHI *et al.*, em 1994, investigaram a porcentagem de contato da tibia de três grupos de ratas (normais, ovariectomizadas, ovariectomizadas e neurectomizadas) em cilindros de titânio e cilindros de titânio revestido por hidroxiapatita. O índice de contato foi expresso, em porcentagem, de acordo com a extensão de osso depositado diretamente sobre o implante dividido pelo total da extensão do implante. Os resultados demonstraram que o contato do titânio com tibia normal foi maior em relação à tibia de ratas ovariectomizadas e ovariectomizadas/ neurectomizadas, e que não houve diferenças significativas para o tipo de implante.

Em 1997, MORI *et al.* realizaram um estudo experimental em coelhos para primariamente estabelecer um modelo animal de baixa densidade mineral óssea e em seguida investigar a reação deste osso com implantes dentais. Os animais foram divididos em três grupos (ovariectomia, ovariectomia e dieta pobre em cálcio e ovariectomia simulada) e tiveram sua densidade óssea mineral medida um, três e seis meses após as cirurgias. Os resultados demonstraram que o grupo ovariectomizado mantido com dieta especial apresentou menor densidade após um mês, sendo este o grupo escolhido para a colocação dos implantes. Medidas histométricas e microrradiográficas forneceram a porcentagem de contato osso/implante na região cortical e medular 2, 4, 8 e 12

semanas após cirurgias de implante. Embora a porcentagem de contato do grupo teste fosse sempre inferior ao controle não houve diferenças estatísticas entre ambos, sugerindo que neste modelo experimental a osteoporose não prejudicou a osseointegração durante os períodos avaliados.

MOTOHASHI *et al.*, em 1999, investigaram as alterações histológicas ao redor de implantes de titânio revestidos por hidroxiapatita inseridos em tibia de ratas três semanas após ovariectomia. Foram realizadas análises histológicas, microrradiográficas e histométricas de 7, 14, 28, 56, 84 e 164 dias após colocação dos implantes. Em todos os períodos a distribuição de tecido ósseo neoformado ao redor de implantes na região medular no grupo teste e controle foi similar, mas a quantidade óssea foi menor para o grupo teste. Os resultados sugeriram que a deficiência de estrógeno não afetou severamente o reparo ao redor de implantes na região cortical, mas reduziu o contato osso/implante e o volume ósseo na área medular.

Em 1999, YAMAZAKI *et al* estudaram o comportamento do tecido ósseo ao redor de implantes de titânio comercialmente puro inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas 168 dias após cirurgia para excisão dos ovários. Análises histomorfométricas verificaram a porcentagem de osso e a taxa de contato osso/implante na região medular e cortical em 7, 14, 28 e 56 dias após inserção dos implantes. Os resultados demonstraram que a diminuição da massa óssea induzida pela deficiência de estrógeno causou redução da área de contato e da quantidade de osso ao redor de implantes de titânio, principalmente na área medular.

HARA *et al.*, em 1999, inseriram um implante de titânio revestido por hidroxiapatita no fêmur direito e um implante sem revestimento no fêmur esquerdo de ratas ovariectomizadas. Após teste de força os resultados demonstraram que implantes de titânio revestidos por hidroxiapatita

apresentaram melhor fixação óssea quando comparados aos não revestidos, embora a presença da osteoporose tenha limitado a magnitude desse benefício.

LUGERO *et al.*, em 2000, utilizou implantes cilíndricos e rosqueáveis em coelhas ovariectomizadas, cujo grau de perda óssea foi monitorado por análises ósseas densiométricas. Os autores demonstraram, através de análise histomorfométrica, que a formação óssea foi menor nos animais osteoporóticos e que estes possuíam maior quantidade de matriz osteóide e menor taxa de mineralização óssea. Neste estudo, os implantes rosqueáveis apresentaram maior formação óssea que os cilíndricos em ambos os grupos.

PAN *et al.* (2000), examinaram o efeito da deficiência de estrógeno no reparo ósseo de implantes inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas. Ao contrário da maioria dos trabalhos, primeiramente foram colocados implantes de titânio revestidos por hidroxiapatita e após 168 dias foram realizadas as excisões dos ovários. Os autores concluíram que a deficiência desse hormônio resulta numa delgada espessura de osso, principalmente na região trabecular ao redor dos implantes.

Um trabalho recente, desenvolvido por FINI *et al.* (2002), realizaram histomorfometria no tecido ósseo ao redor de implantes de titânio (Ti6Al4V) inseridos em animais saudáveis e osteoporóticos (ratos e ovelhas). Os autores demonstraram que a formação óssea ao redor desses implantes não esteve associada a uma completa maturação óssea em animais saudáveis e que em caso de osteopenia tanto a formação quanto à maturação foram prejudicadas. Esses resultados sugerem maiores investigações no campo de biomaterias para serem utilizados em ossos osteopênicos.

OZAWA *et al.*, 2002 examinaram a interferência da ovariectomia na osseointegração de dois tipos de implantes de superfície tratada em nível molecular, histomorfométrico e biomecânico. Os autores verificaram que aos 14 dias o grupo ovariectomizado apresentou menor área óssea e cerca de metade do valor da resistência ao teste biomecânico quando comparado ao controle. Essa diferença demonstrou tendência em diminuir aos 28 dias, sugerindo que a deficiência de estrógeno pode interferir temporariamente o processo de osseointegração.

3.5- Implantes dentais e tratamentos para osteoporose

Poucos estudos em animais ou em humanos têm investigado a influencia dos diversos tratamentos para osteoporose nos tecidos ósseos ao redor de implantes. MINSK & POLSON (1998), não encontraram correlação entre a taxa de sucesso dos implantes dentais em mulheres pós-menopausa recebendo ou não reposição hormonal. AUGUST *et al.*, em 2001, compararam o sucesso da osseointegração em mulheres pós-menopausa sem terapia de reposição hormonal, com terapia de reposição hormonal, pré-menopausa, homens com menos de cinquenta anos e homens com mais de 50 anos. Mulheres sem terapia de reposição hormonal tiveram nível de fracasso maxilar significativamente maior (13,6%) que mulheres pré-menopausa (6,3%) e homens com mais de 50 anos (7,6%). Mulheres tratadas tiveram menor taxa de insucesso quando comparada às não tratadas, mas essa diferença não foi estatisticamente significante (8,1%). Os autores sugeriram que a deficiência de estrógeno resulta em alterações ósseas que podem resultar em fracasso de implantes na maxila.

JANUARIO *et al.* (2001) estudaram o efeito da calcitonina em implantes de titânio inseridos em tíbias de coelhos saudáveis para verificar se o hormônio era capaz de aumentar o processo de maturação óssea. Análises histométricas de 6, 8, 12 e 18 semanas após colocação dos implantes demonstram que a calcitonina é capaz de aumentar a massa óssea ao redor de implantes de titânio nos estágios tardios do processo de reparo. Porém, esse estudo, foi desenvolvido em animais saudáveis e objetivava observar o efeito da calcitonina na formação óssea e não na prevenção de sua reabsorção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Seleção dos Animais

Foram utilizadas sessenta (60) ratas Wistars, adultas (90 dias), com peso entre 250 e 300g. Os animais foram mantidos durante todo período experimental em gaiolas plásticas sob as mesmas condições ambientais e água *ad libitum*. Houve restrição alimentar para grupo de ratas ovariectomizadas a fim de prevenir o aumento de peso induzido pela diminuição do estrógeno (WRONSKI *et al.*, 1985, 1986). O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (protocolo 243-1, em anexo).

4.2- Ovariectomia

Todos os animais foram pesados e receberam, via intramuscular, uma solução de 1ml/Kg de cloridrato de ketamina (Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P, Brasil) e 0,1ml/kg de cloridrato de xilazina (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P, Brasil). Em seguida, foi realizada a tricotomia das regiões laterais ao dorso e anti-sepsia local com álcool iodado. Quarenta e cinco ratas foram submetidas à ovariectomia (OVX), através de incisões cutâneas bilaterais com lâmina de bisturi nº 15, divulsão do tecido muscular e excisão dos ovários (FIG. 1 e 2). Outras quinze ratas foram submetidas aos mesmos procedimentos, mas tiveram seus ovários intactos recolocados na posição original com o objetivo de simular o estresse cirúrgico pelo qual passariam todos os outros animais. Para sutura cutânea foram usados pontos interrompidos de fio mononylon 4-0 (Ethicon[®], Johnsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil). Em seguida, os animais receberam aplicação única de 1ml/kg de antibiótico via

intramuscular (Pentabiótico pequeno porte, Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil).

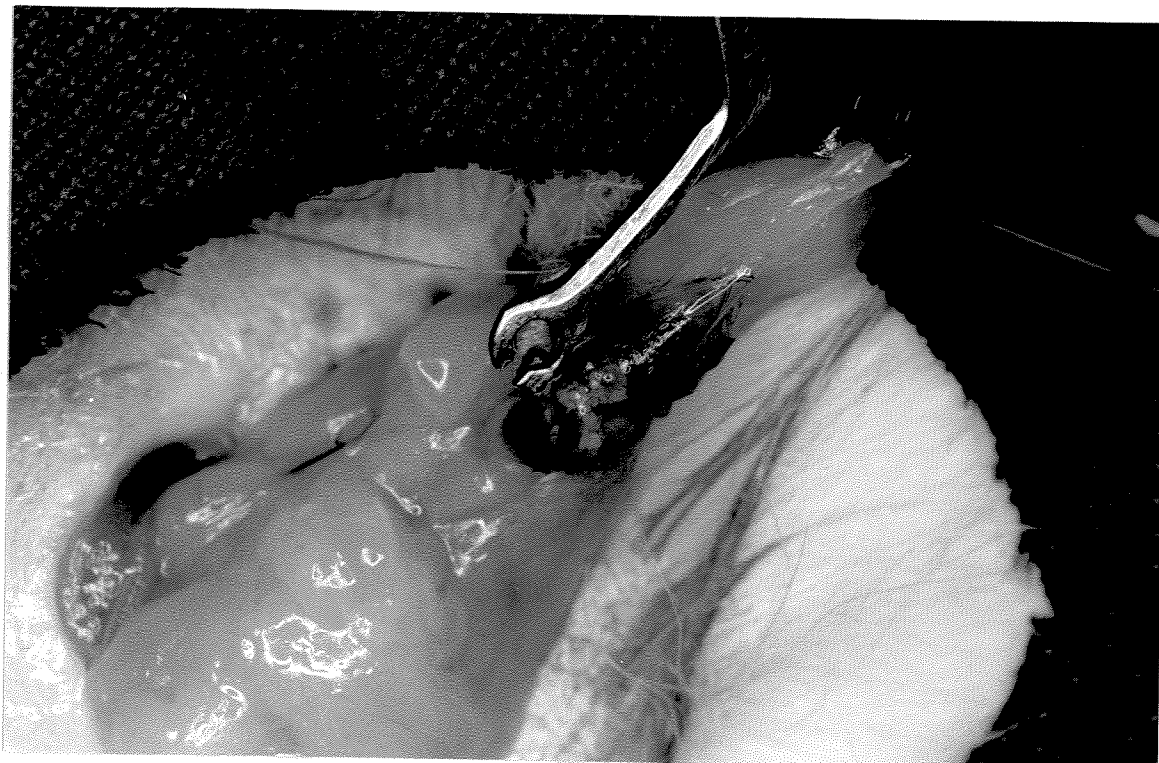


Figura 1: Identificação do ovário, estrutura avermelhada apontada pela seta, para realização do procedimento de ovariectomia.

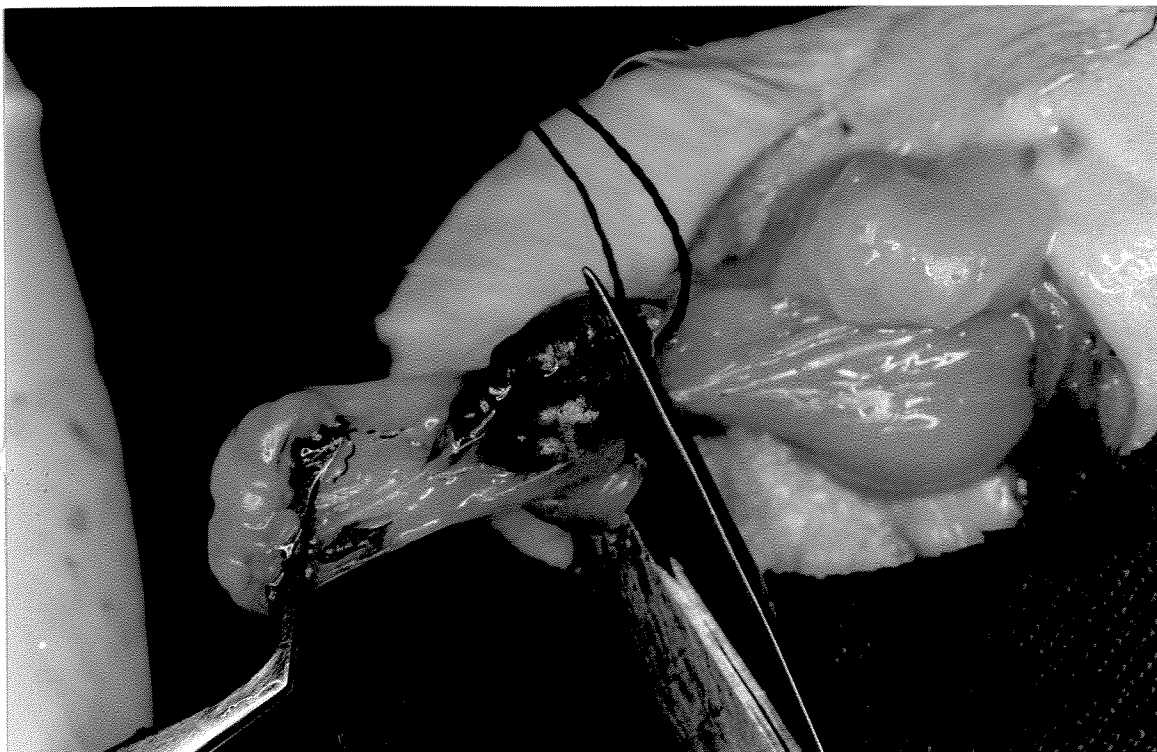


Figura 2: Ovário amarrado com fio de sutura sendo excisado com uma tesoura.

4.3- Delineamento do estudo

Após a ovariectomia os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo 1 (n =15): ovariectomia simulada (controle negativo);

Grupo 2 (n =15): ovariectomia (controle positivo);

Grupo 3 (n =15): ovariectomia e administração subcutânea de 16 IU/kg (SHEN *et al.*, 1996) de calcitonina sintética de salmão (Miacalcic®, Sandoz A.G., Fertigung Schützenstrasse, Ravenburg, Germany), 4 dias por semana durante todo período experimental;

Grupo 4 (n=15): ovariectomia e administração subcutânea de 20µg/Kg (SIMS *et al.*, 1996) de 17β estradiol (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA), dissolvido em etanol 100% e diluído em óleo mineral , diariamente durante todo período experimental.

As administrações foram realizadas um dia após a ovariectomia até o sacrifício dos animais.

4.4- Colocação dos implantes

Foram utilizados 120 implantes de titânio comercialmente puro, de superfície usinada, do tipo osseointegrável, rosqueável, com 4,0 mm de comprimento por 2,2 mm de diâmetro (Titanium Fix®, AS Technology Ltda., São José dos Campos, SP, Brasil).

Vinte e um dias após ovariectomia os animais foram submetidos à colocação de implantes. As ratas foram anestesiadas segundo protocolo previamente descrito. Em seguida foram realizadas tricotomia e anti-sepsia local das tíbias com álcool iodado. Com uma lâmina de bisturi nº 15, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1cm proporcionando livre acesso à superfície óssea da tibia. Sob irrigação constante com uma solução salina, foi preparado um leito bicortical por tibia de rato, através de motor elétrico, contra-ângulo redutor 16:1 (1000 rpm) e broca tipo lança (FIG.3). Os implantes foram posicionados e rosqueados manualmente até que estivessem completamente introduzidos nas corticais (FIG.4). Finalmente, os tecidos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos de fio de mononylon 4-0 (Ethicon®, Johnsons do Brasil SA, São José dos Campos, SP, Brasil). Os animais receberam dose única de 1ml/kg de antibiótico via intramuscular (Pentabiótico pequeno porte, Laboratórios Wyeth-Whitehall Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Nenhuma restrição de movimentação foi imposta aos animais após a cirurgia, os quais foram mantidos em grupos de cinco durante todo o período experimental.

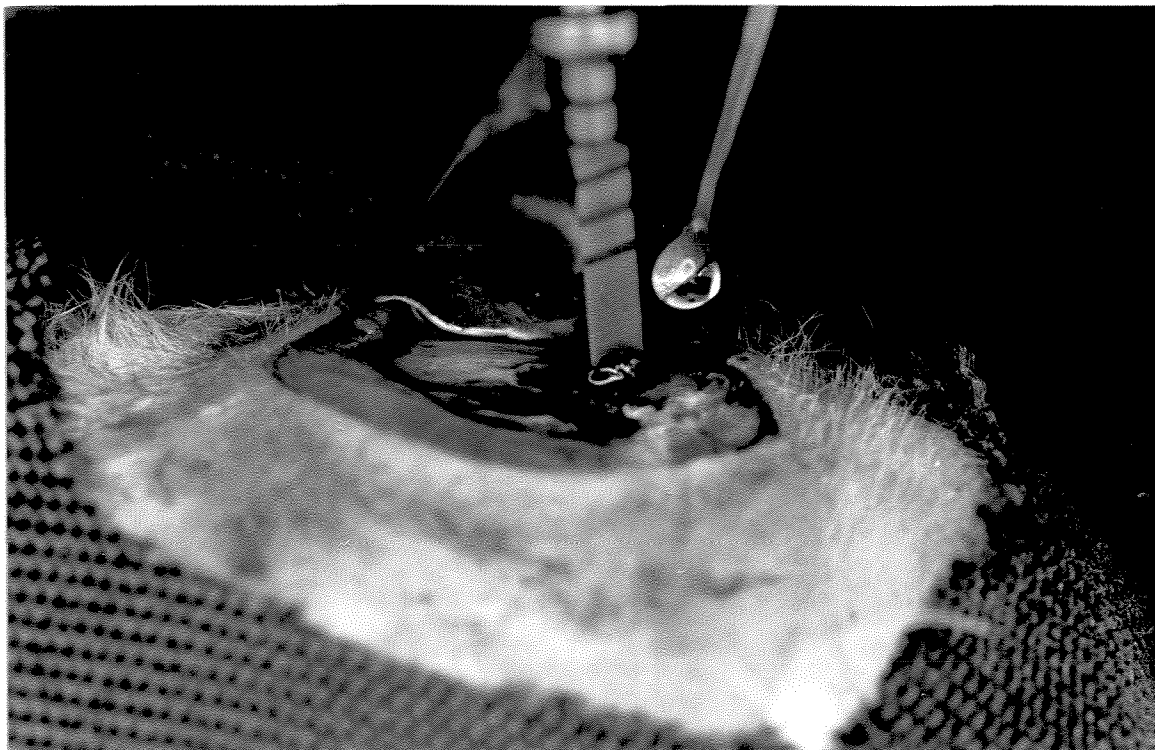


Figura 3: Preparo do leito bicortical através de broca tipo lança sob irrigação constante

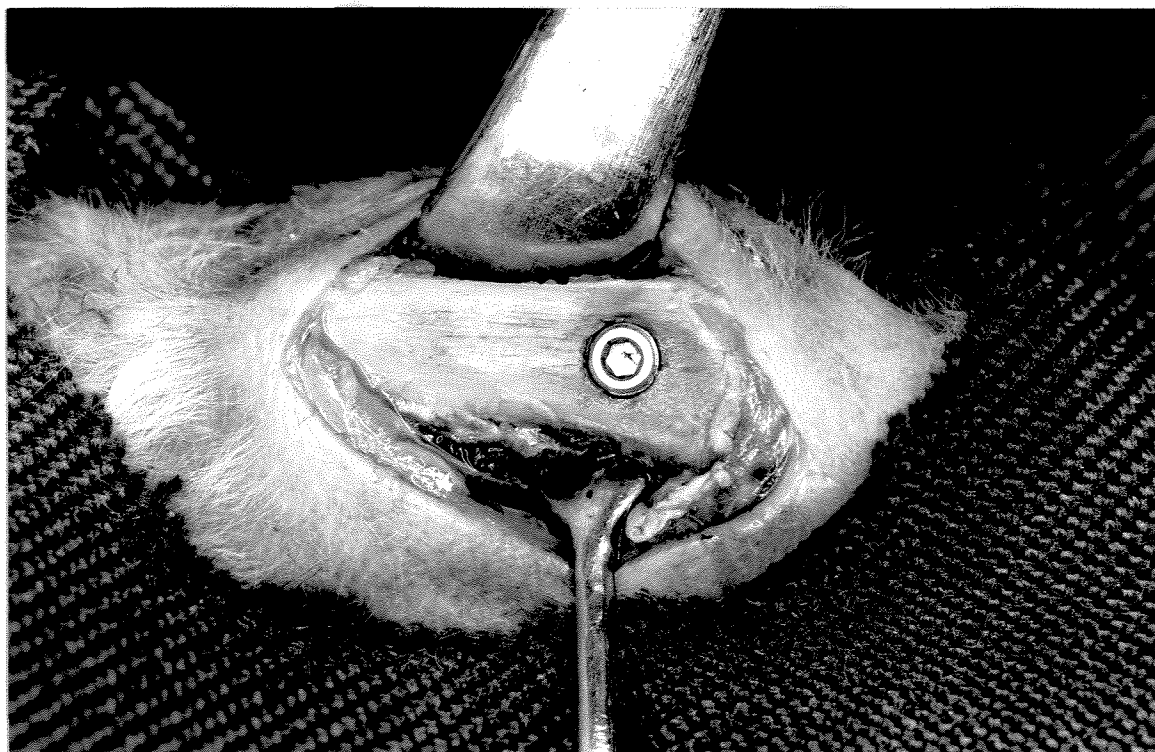


Figura 4: Implante de titânio bicortical de 2,2mm de diâmetro por 4,0 mm de comprimento em posição.

4.5- Análises Séricas

Antes do sacrifício foi realizada a coleta de sangue para obtenção do soro e posterior análise laboratorial dos níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico. Os animais foram sedados com halotano e tiveram a extremidade da cauda excisada para que o sangue escoasse pela superfície de um esponsor. O material obtido foi centrifugado para retirada do soro que foi imediatamente congelado. A atividade de fosfatase alcalina foi obtida pelo teste colorimétrico (Gold Analisa Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil) enquanto o nível de cálcio foi obtido pelo método eletrodo seletivo (AVL Scientific Corporation, Roswell, GA, EUA).

4.6- Análises clínicas

Duas semanas após a ovariectomia, para confirmar o sucesso da mesma, todos os animais foram submetidos a um exame do ciclo estral através da coleta de líquido vaginal durante cinco dias consecutivos. Para isso, uma pequena quantidade de solução salina foi dispensada no interior da vagina da rata com o auxílio de uma pipeta e rapidamente aspirada. Este líquido por sua vez foi transferido para uma lâmina e imediatamente encaminhado para uma análise através de microscopia ótica.

O ciclo estral é dividido em quatro estágios que relacionam o tipo de célula predominante no esfregaço vaginal e o nível de hormônios sexuais presente no animal. Leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes aparecem no metaestro. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. O número de células epiteliais nucleadas aumenta durante o proestro enquanto os leucócitos praticamente desaparecem. Ocorre, então, o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona na noite desta fase. Durante o estro aparecem basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno

retorna a seus valores basais. O estágio diestro consiste basicamente de leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno (HOAR & HICKMAN, 1975; MARCONDES *et al.*, 2002). Dessa forma, animais submetidos a ovariectomia sem tratamento com estradiol apresentam-se somente na fase diestro.

O sucesso da ovariectomia também foi confirmado no momento da necropsia pela análise do útero dos animais. Após o sacrifício, foi feita uma incisão abdominal em cada animal e localização dos respectivos cornos uterinos. Este, na presença de hormônio apresenta-se róseo, volumoso e totalmente preenchido por fluido, enquanto que na deficiência do mesmo, apresenta-se fino, atrófico e anêmico.

4.7-Análise Histométrica

Após sessenta dias da colocação dos implantes, os animais foram sacrificados pelo aprofundamento da anestesia com halotano. As tíbias foram removidas e seccionadas em blocos contendo os implantes, que foram colocados em formol neutro tamponado a 4% por 48 horas. Após o processo de fixação e posterior lavagem em água destilada, os espécimes foram desidratados em uma série de solução de álcool etílico (60-100%) sob constante agitação.

Em seguida, as peças foram infiltradas com soluções gradativas contendo glicolmetacrilato (Technovit 7200[®] ; Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico, finalizando com duas infiltrações de glicolmetacrilato puro. Os espécimes foram então incluídos em resina e polimerizados. Dos blocos de resina foram obtidas secções entre 20 a 30 µm de espessura, coradas pelo azul de toluidina à 1%.

Através de um programa de análise de imagens (Image-Pro®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), foram obtidas as seguintes medidas nos lados direito e esquerdo de cada implante sem que o examinador soubesse a qual grupo o mesmo pertencia.

1. **DO:** densidade óssea de uma região de 500 μ m lateralmente à superfície do implante (FIG.5).
2. **AO:** área do tecido ósseo dentro dos limites das roscas de cada implante, dada pela porcentagem relativa à área de tecido ósseo presente pela área total de todas das roscas (FIG. 6).
3. **CD:** extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante, calculada dividindo-se o comprimento do contato ósseo pelo comprimento total das roscas (FIG. 6).

Os dados obtidos foram agrupados em cortical (região A) e medular (região B) para a subsequente análise estatística (FIG. 5).

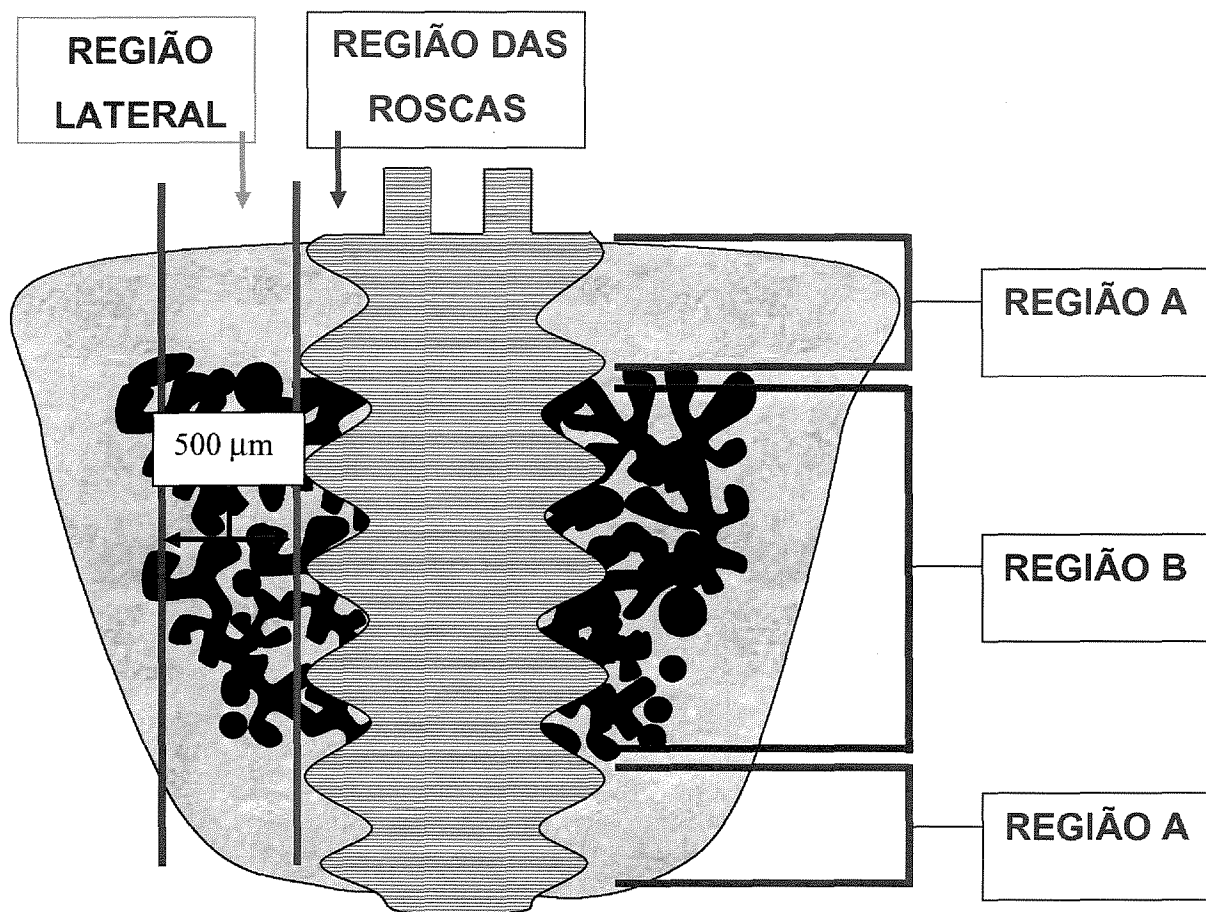


Figura 5: Desenho esquemático representando o osso cortical (região A), osso medular (região B) e a área delimitada para a análise da densidade óssea na de 500 μm na região lateral (fora das roscas do implante).

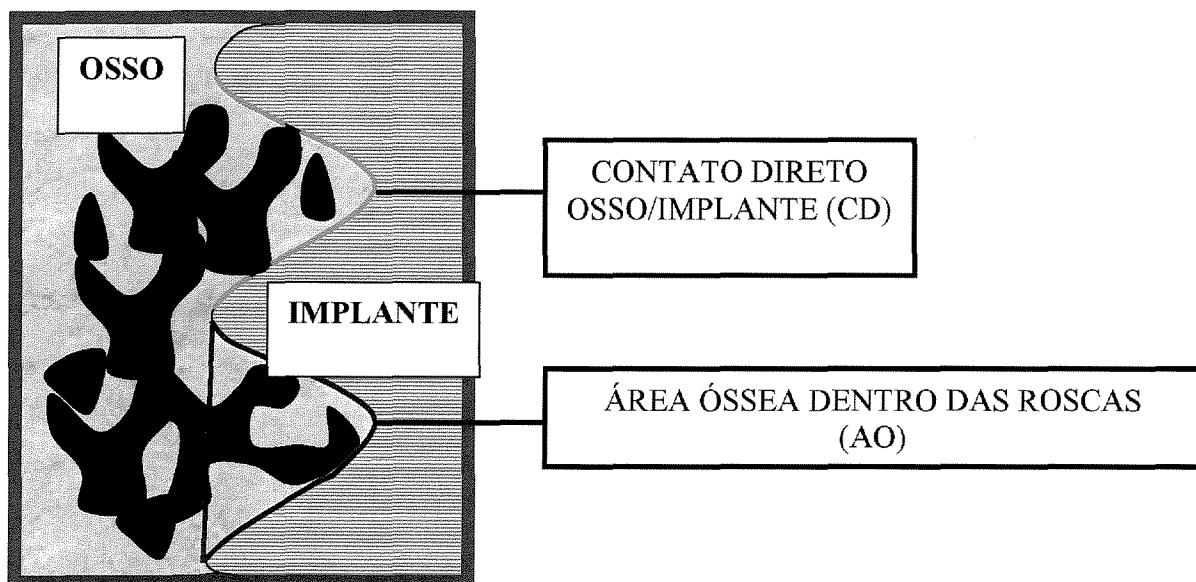


Figura 6: Desenho esquemático representando a área a ser analisada dentro das roscas dos implantes e os dois parâmetros avaliados: área de tecido ósseo dentro dos limites das roscas (AO) e extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (CD).

4.8- Análises Estatísticas

Dados das regiões A e B foram analisados separadamente. Uma média dos valores foi feita entre os implantes da tíbia direita e esquerda, obtendo-se um resultado final para cada animal. A hipótese de que a administração de estrógeno e de calcitonina não influencia o reparo ósseo ao redor dos implantes foi testada usando uma análise intergrupo (Teste de Kruskal-Wallis; $\alpha = 5\%$). Caso detectadas diferenças estatísticas o teste de Dunn foi usado para isolar o grupo ou grupos que se diferenciavam um dos outros.

A hipótese de que a terapia estrogênica e a calcitonina não influenciaram os níveis de fosfatase alcalina e cálcio sérico foi testada pelo teste ANOVA monofatorial ($\alpha = 5\%$). Quando detectada diferença estatística, o teste paramétrico para comparações múltiplas ($\alpha = 5\%$) foi utilizado para identificar a diferença (Teste de Bonferroni).

Finalmente, utilizando-se o teste de análise de variância ANOVA ($\alpha = 5\%$), uma análise intergrupo foi utilizada para testar a hipótese de que não havia diferença entre o peso dos animais no início e final do experimento. Para verificar se havia diferença de peso entre o início e final foi utilizado o teste Teste t pareado.

5. RESULTADOS

5.1- Observações clínicas

Comparando-se os períodos inicial e final, todos os animais ganharam peso durante o experimento. Antes do sacrifício os animais do grupo 4 apresentaram média de peso significativamente menor que os demais grupos ($p < 0.05$). As médias iniciais e finais do peso corpóreo para todos os grupos estão representadas na tabela 1. Durante a cirurgia para colocação de implantes um animal pertencente ao grupo 4 (estradiol) morreu por motivos de complicações na anestesia e este grupo passou a ter 14 animais.

Tabela 1: Médias e desvio padrão dos pesos finais e iniciais, em gramas (g).

Grupo	INICIAL	FINAL
1	204,40 $\pm$ 14,94 aA	256,27 $\pm$ 15,7 aB
2	203,00 $\pm$ 9,75 aA	261,67 $\pm$ 14,98 aB
3	209,20 $\pm$ 12,92 aA	255,47 $\pm$ 20,25 aB
4	209,67 $\pm$ 12,06 aA	228,57 $\pm$ 13,68 bB

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si estatisticamente pela ANOVA ($\alpha = 5\%$) e médias seguidas de mesma letra maiúscula nas linhas não diferem estatisticamente pelo Teste t pareado.

Em relação ao ciclo estral, os animais dos grupos 2 e 3 apresentaram-se na fase diestro, confirmando a redução do nível de estrógeno e o sucesso da ovariectomia. Os animais do grupo que recebeu estradiol apresentaram-se no estágio estro, sugerindo que a terapia de reposição foi capaz de manter o nível constante de hormônio. O grupo que foi submetido apenas à simulação da ovariectomia apresentou todas as fases do ciclo comprovando padrão de normalidade do ciclo ovariano.

A análise macroscópica dos cornos uterinos confirmou o sucesso da ovariectomia antes do sacrifício, pois nos grupos 1 (ovariectomia simulada) e 4 (estradiol) estes se apresentaram róseos e volumosos, enquanto nos demais grupos estavam atróficos e anêmicos (FIG 7 e 8). Um animal do grupo 3 (calcitonina) não se manteve na fase diestro e apresentou o útero normal. Essas observações indicaram o insucesso da ovariectomia e o animal foi excluído da amostra.

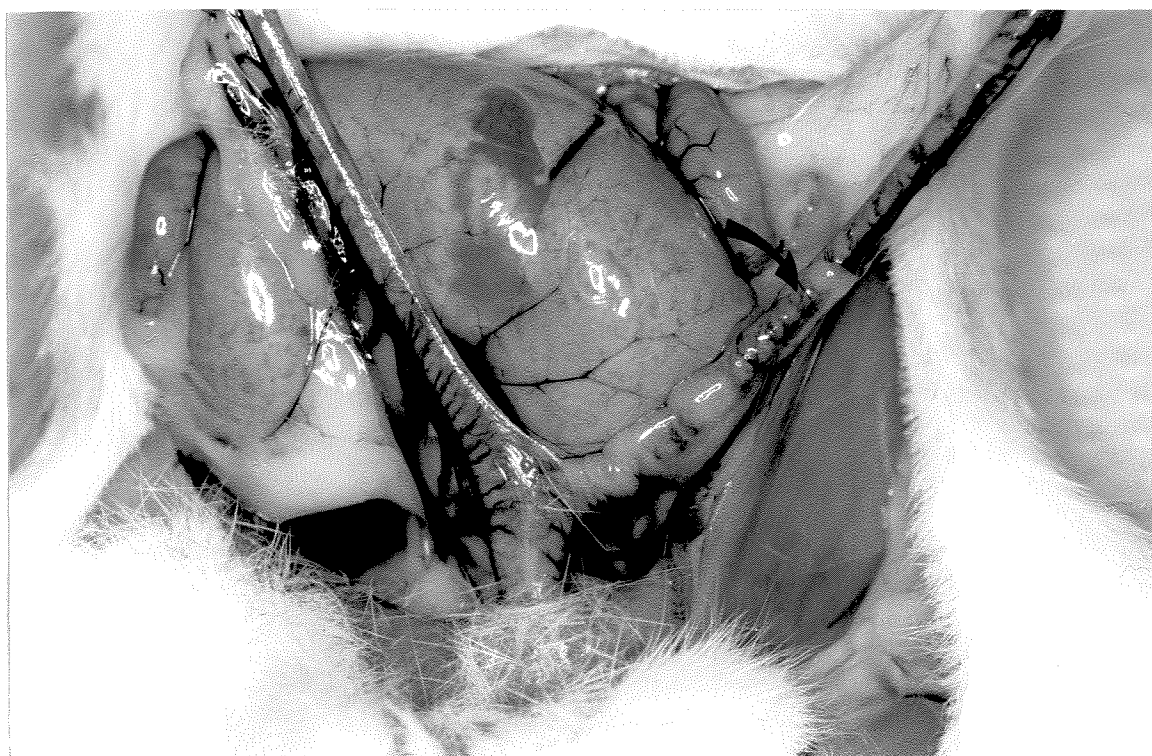


Figura 7: Útero encontrado na presença de estrógeno: vascularizado, róseo e volumoso (seta).

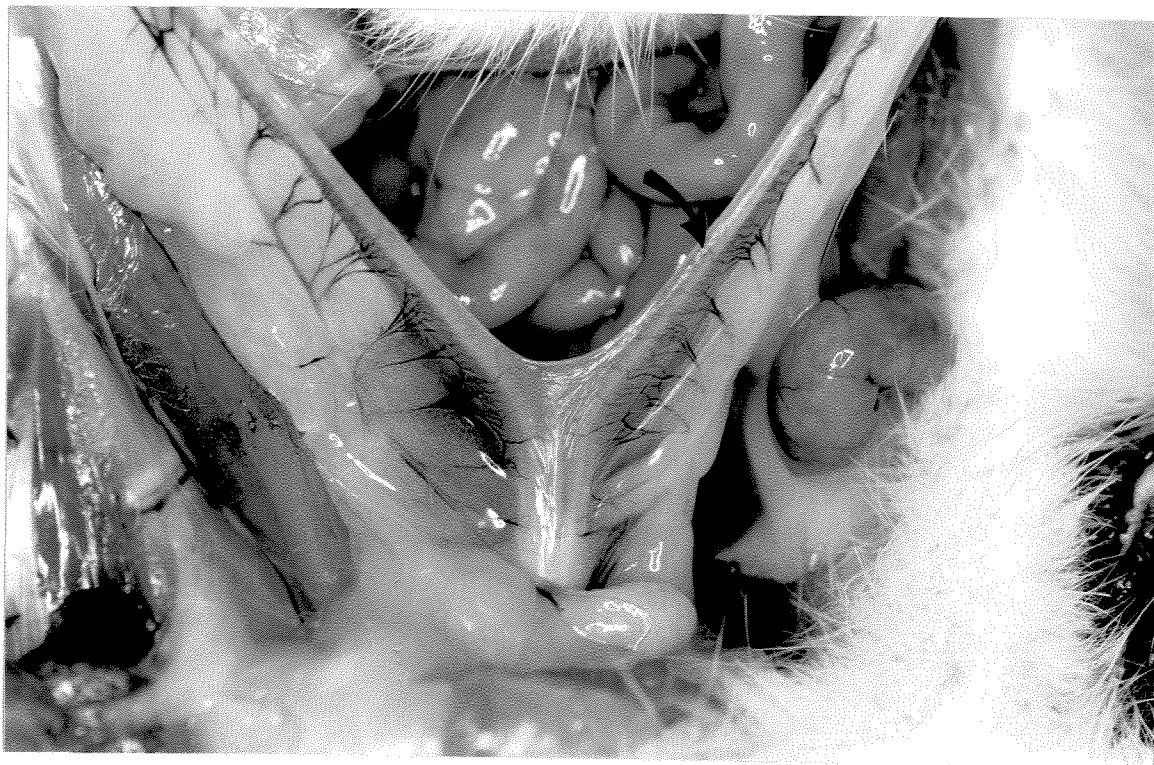


Figura 8: Útero encontrado na deficiência de estrógeno: atrófico e anêmico (seta).

5.2- Análises séricas

O nível sérico de fosfatase alcalina variou entre os grupos experimentais. Para os grupos 1 e 4, a taxa de fosfatase alcalina foi similar ($29,13 \pm 10,93$ IU/l e $33,29 \pm 14,91$ IU/l, respectivamente- $p < 0,05$) e estatisticamente menor que o grupos 2 e 3 ($80,47 \pm 20,16$ IU/l e $98,20 \pm 14,27$ IU/l, respectivamente $p < 0,05$). Estes dados estão representados no gráfico 1. A média do nível sérico de cálcio foi expressa em nmol/l. Os animais ovariectomizados e não tratados (grupo2) apresentaram valores estatisticamente ($p < 0,05$) maiores que os demais grupos. Estes valores foram para os grupos 1, 2, 3 e 4 respectivamente $1,10 \pm 0,07$; $1,24 \pm 0,08$; $1,10 \pm 0,14$ e $1,07 \pm 0,13$ e estão ilustrados no gráfico 2.

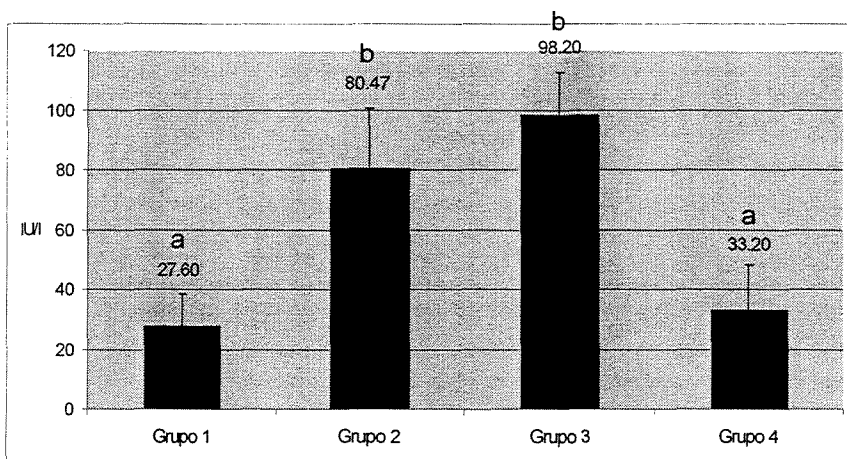


Gráfico 1: Média e desvio padrão do nível sérico de fosfatase alcalina antes do sacrifício para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferenciam entre si estatisticamente pelo ANOVA ($\alpha=5\%$).

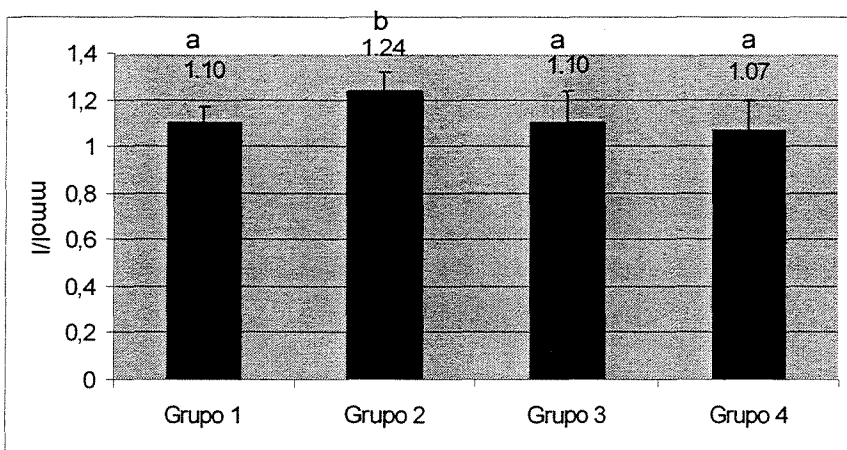


Gráfico 2: Média e desvio padrão do nível sérico de cálcio (nmol/l) antes do sacrifício para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferenciam entre si estatisticamente pelo ANOVA ($\alpha=5\%$).

5.3- Resultados Histométricos

5.3.1- Contato direto osso/implante (CD)

Na cortical, não houve diferenças significativas entre os grupos ($p=0,64$), demonstrando que a deficiência de estrógeno não influenciou o reparo ósseo nessa região. As médias das porcentagens (%) e desvio padrão dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram respectivamente $50,98 \pm 15,19$; $46,00 \pm 7,94$; $49,79 \pm 14,81$; $50,45 \pm 12,76$ (gráfico 3). Na medular, os valores para os grupos 1, 2, 3 e 4 foram respectivamente $51,75 \pm 12,53$; $40,28 \pm 9,51$; $48,60 \pm 10,16$; $52,99 \pm 10,27$. As ratas ovariectomizadas não-tratadas apresentaram menor porcentagem de contato que os demais grupos ($p=0,018$). A influência negativa da deficiência de estrógeno foi restaurada no grupo 4 (estradiol). O grupo que recebeu calcitonina por sua vez demonstrou numericamente uma tendência em anular essa influência negativa, mas este não foi estatisticamente significativo $p>0,05$ (gráfico 4).

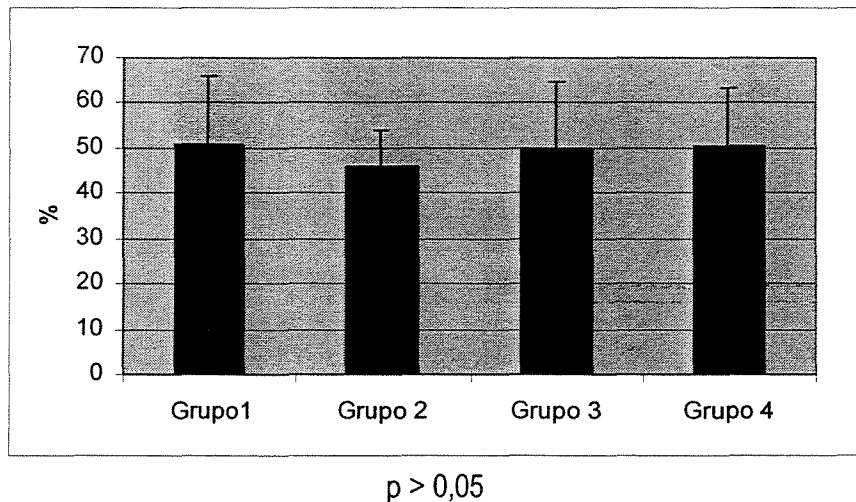


Gráfico 3: Média e desvio padrão das porcentagens do contato osso/implante da região cortical para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha= 5\%$).

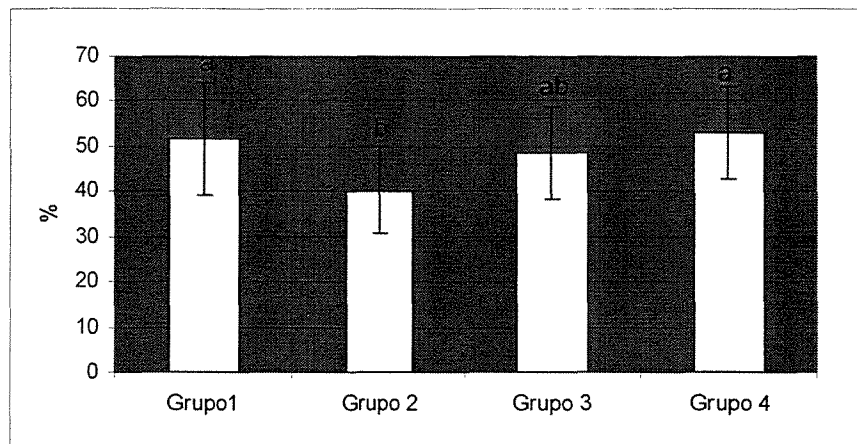


Gráfico 4: Média e desvio padrão das porcentagens do contato osso/implante da região medular para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha = 5\%$).

5.3.2 Área de preenchimento ósseo dentro das roscas (AO)

Na cortical, a análise dos dados não demonstrou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para os grupos 1, 2 e 3. Porém os animais que receberam estrógeno (grupo 4) demonstraram uma porcentagem de área de preenchimento estatisticamente maior que os grupos 2 e 3 ($p < 0,05$). Os valores para área de preenchimento cortical foram $84,76 \pm 3,74\%$, $81,35 \pm 3,81\%$, $82,65 \pm 5,15\%$, $88,36 \pm 3,39\%$, respectivamente para os grupos 1, 2, 3 e 4 (gráfico 5). O mesmo foi observado para a região medular (zona B), onde os grupos 1 ($49,26 \pm 5,60\%$), 2 ($41,38 \pm 10,8\%$) e 3 ($42,64 \pm 5,49\%$) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), mas o grupo 4 ($58,56 \pm 12,22\%$) demonstrou uma porcentagem estatisticamente maior que os grupos 2 e 3 ($p < 0,05$). O gráfico 6 ilustra estes dados.

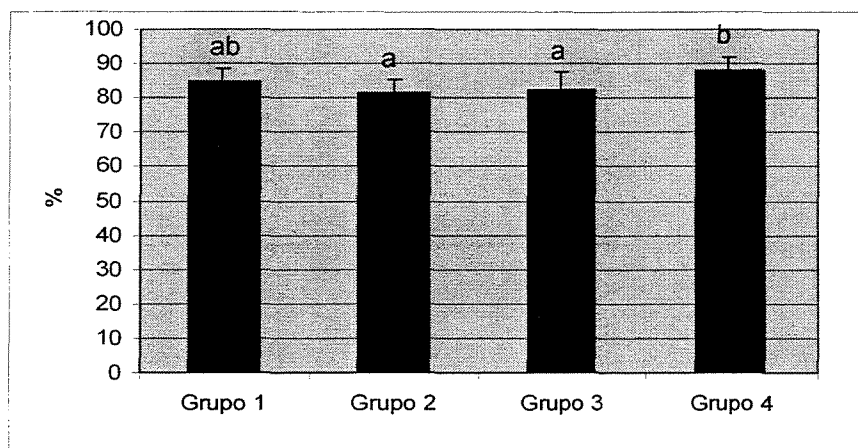


Gráfico 5: Média e desvio padrão das porcentagens da área de preenchimento das roscas na região cortical para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha=5\%$).

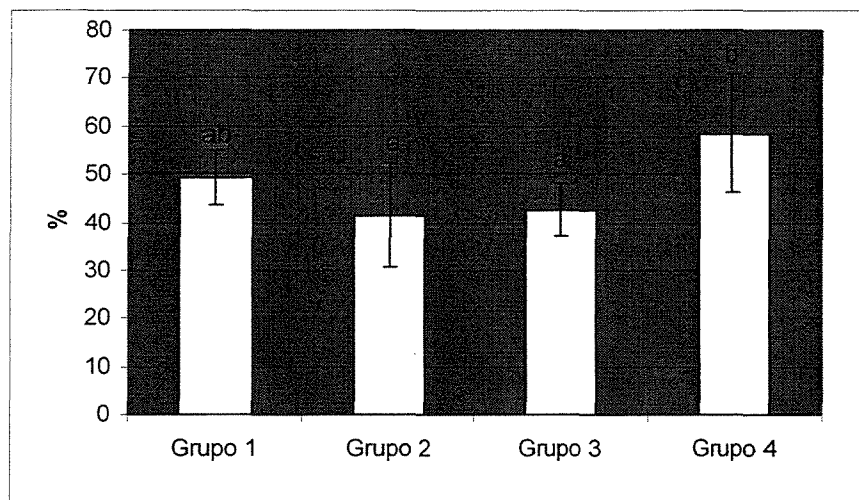


Gráfico 6: Média e desvio padrão das porcentagens da área de preenchimento das roscas na região medular para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha=5\%$).

4.2.2 Densidade óssea na região adjacente ao implante (DO)

Na zona cortical, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os quatro grupos ($p=0,147$) para a densidade óssea. Os grupos 1, 2, 3 e 4 apresentaram, respectivamente, as seguintes médias e desvio padrão $95,39 \pm 1,34\%$; $93,27 \pm 3,81\%$; $94,90 \pm 2,16\%$; $95,84 \pm 1,75\%$ (gráfico 7). Na medular, os resultados demonstraram que o grupo que recebeu estradiol ($50,97 \pm 8,25\%$) não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado ao grupo da ovariectomia simulada ($48,39 \pm 9,37\%$). Os grupos 2 ($8,26 \pm 4,77\%$) e 3 (grupo3: $16,97 \pm 6,87\%$) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, mas apresentaram médias estatisticamente inferiores ao grupo 1 e 4 (gráfico 8).

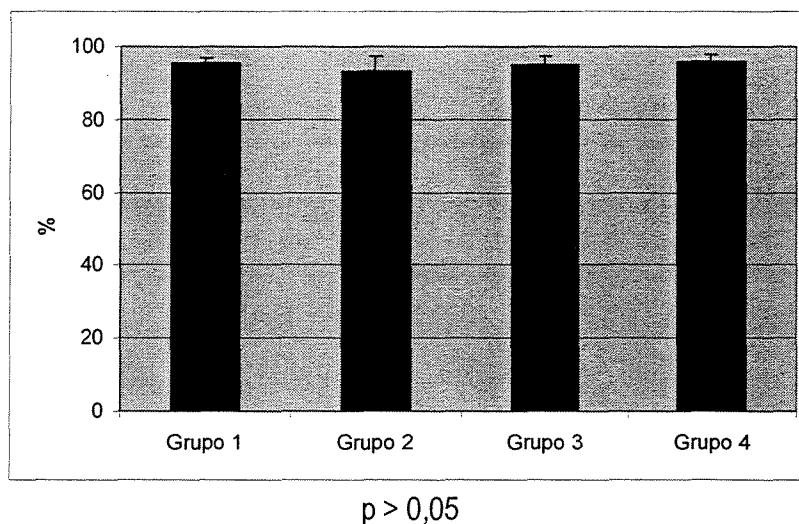


Gráfico 7: Média e desvio padrão das porcentagens de densidade óssea na região cortical para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha=5\%$).

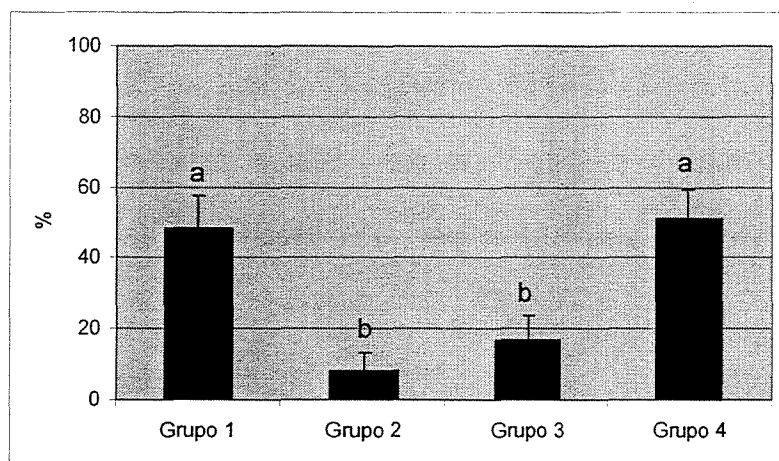
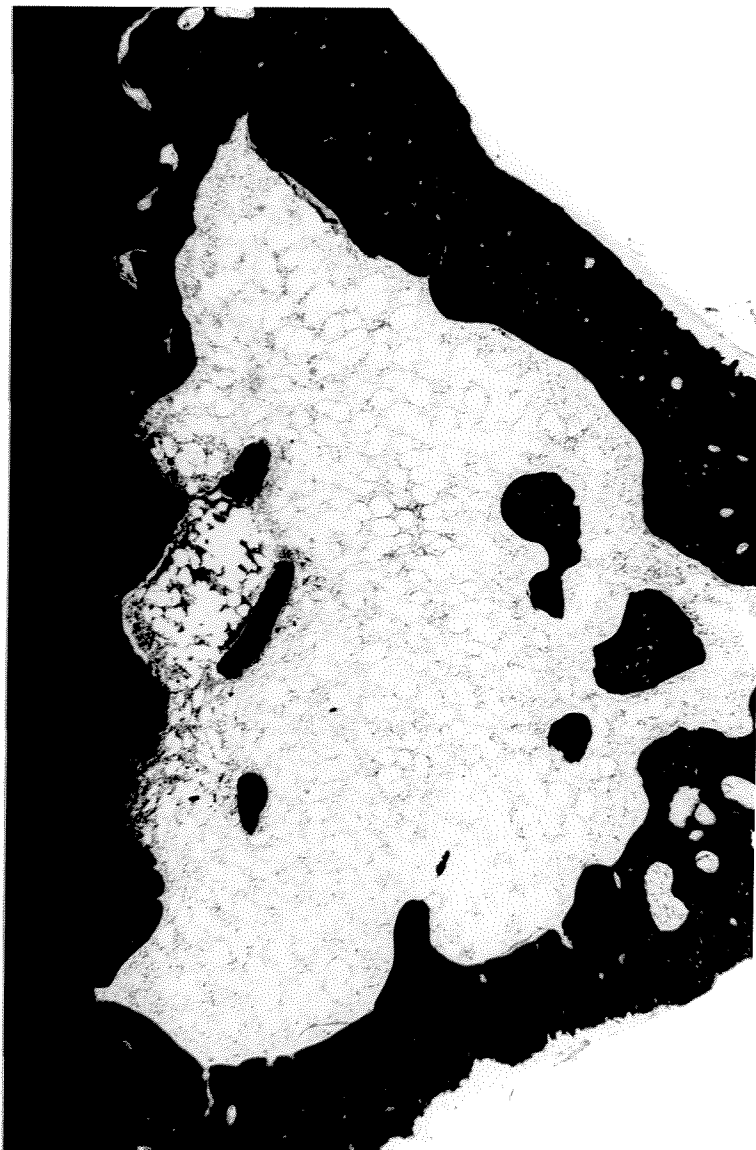


Gráfico 8: Média e desvio padrão das porcentagens de densidade óssea na região medular para o grupo 1 (ovariectomia simulada), grupo 2 (ovariectomia), grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn ($\alpha=5\%$).



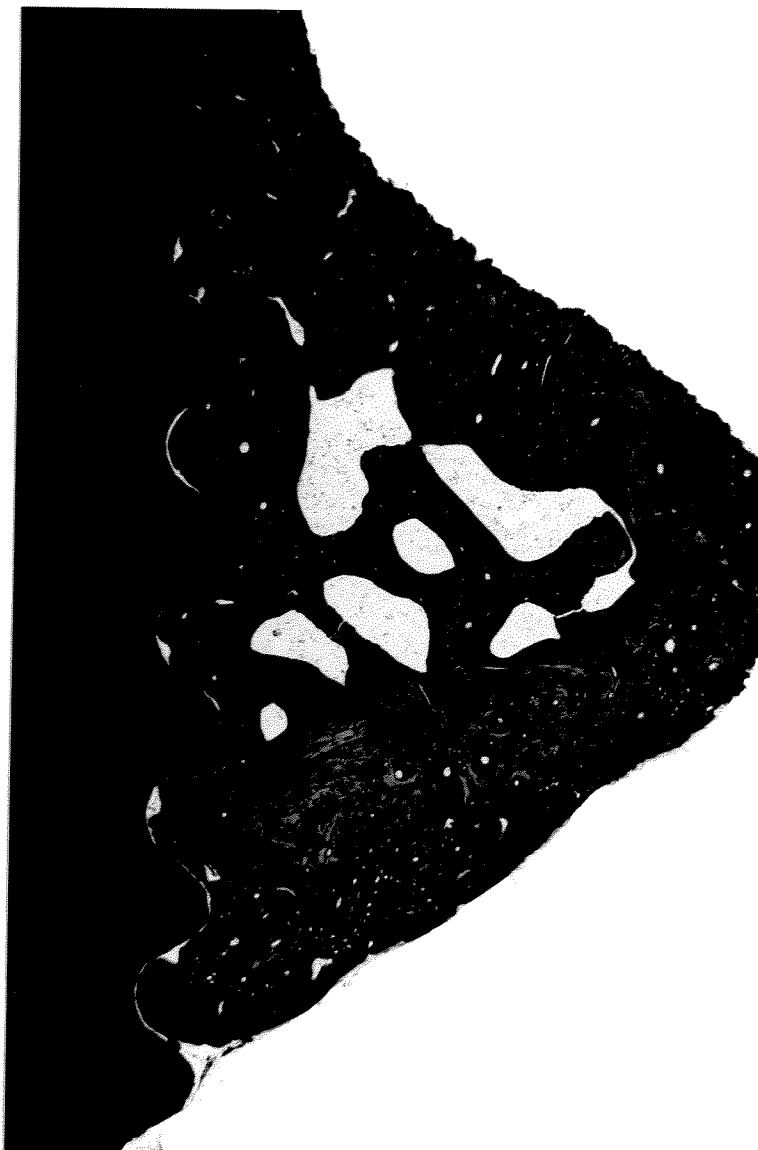
Figuras 9: Fotomicrografia do tecido ósseo ao redor do implante de titânio pertencente ao grupo 1 (ovariectomia simulada), ilustrando a região cortical e medular, dentro e fora do limite das roscas (azul de toluidina, aumento 12,5X). Note a presença de tecido ósseo na região medular.



Figuras 10: Fotomicrografia do tecido ósseo ao redor do implante de titânio pertencente ao grupo 2 (ovariectomia), ilustrando a região cortical e medular, dentro e fora do limite das roscas (azul de toluidina, aumento 12,5X). Note a deficiência de tecido ósseo na região medular.



Figuras 11: Fotomicrografia do tecido ósseo ao redor do implante de titânio pertencente ao grupo 3 (calcitonina), ilustrando a região cortical e medular, dentro e fora do limite das roscas (azul de toluidina, aumento 12,5X). Note a deficiência de tecido ósseo na região medular.



Figuras 12: Fotomicrografia do tecido ósseo ao redor do implante de titânio pertencente ao grupo 4 (estradiol), ilustrando a região cortical e medular, dentro e fora do limite das roscas (azul de toluidina, aumento 12,5X). Note a presença de tecido ósseo na região medular.

6. DISCUSSÃO

Osteoporose é uma desordem óssea caracterizada pela diminuição de massa sem alteração da composição química do tecido ósseo (ALBRIGHT, 1941) que atinge, sobretudo, idosos e mulheres no período pós-menopausa (KLEEREKOPER & AVIOLI, 1993). A doença tem sido correlacionada tanto à deficiência de estrógeno, gerada fisiologicamente durante a menopausa ou pela excisão cirúrgica dos ovários, quanto à diversos fatores de risco como dieta, consumo de cigarros, consumo de álcool e atividade física (VICO *et al.*, 1992). Uma vez que estudos em humanos apresentam dificuldade em isolar a variável osteoporose/osteopenia induzida apenas pela deficiência de estrógeno, o presente estudo utilizou um modelo de ratas ovariectomizadas. O modelo de indução de osteoporose através da ovariectomia tem sido amplamente encontrado na literatura por ser capaz de resultar em osteopenia qualitativamente similar à desenvolvida na osteoporose pós-menopausa humana (WRONSKI *et al.*, 1985; CHOW *et al.*, 1992, . LI & NISHIMURA, em 1994, SIMS *et al.*, em 1996).

Os implantes dentais de titânio, por sua vez, têm sido utilizados com alta taxa de sucesso para substituição de espaços edêntulos (LINDQUIST & CARLSSON, 1996). Porém, alguns fatores de ordem local e/ou sistêmica podem interferir na osseointegração (ESPOSITO *et al.*, 1998), prejudicando o reparo e o contato implante/tecido ósseo (BRANEMARK, 1977; ZARB & SMICHTT, 1990; LINDQUIST & CARLSSON, 1996). Considerando que uma extensa porcentagem da população necessita da substituição de dentes perdidos e que a expectativa de vida está aumentando, podemos esperar uma maior demanda para a colocação de implantes em pacientes osteoporóticos (LUGERO *et al.*, 2000), submetidos a tratamentos ou não. Com base nessa probabilidade, o presente estudo

investigou a influência da osteoporose e seu tratamento com estrógeno ou calcitonina no tecido ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em ratas ovariectomizadas.

Embora relatos de casos clínicos tenham demonstrado que a osteoporose não interfere no sucesso da osseointegração (DAO *et al.*, 1993; FUJIMOTO *et al.*, 1996, FRIEBERG, 1994), AUGUST *et al.* (2001), demonstraram, através de um estudo retrospectivo, que a deficiência de estrógeno pode ser considerada um fator de risco para o sucesso de implantes osseointegráveis na maxila, que apresenta grande quantidade de osso trabecular. Esses dados clínicos são suportados por este estudo e por muitos outros estudos em animais que têm demonstrado que a deficiência de estrógeno afeta preferencialmente a região medular (MOTOHASHI *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 2000). Logo, a opção em dividir a análise histométrica em zona A (cortical) e zona B (medular) foi baseada em estudos (MOTOHASHI *et al.*, 1999; PAN *et al.*, 2000) que demonstram que essas regiões apresentam diferentes respostas frente à deficiência de estrógeno e as desordens sistêmicas de forma geral. Esse fenômeno pode ser confirmado pelo fato das fraturas ocorrerem em sítios predominantemente compostos por osso trabecular, como por exemplo, a coluna vertebral (HARRISON, 1989). Assim como nos animais ovariectomizados do presente estudo, avaliações clínicas têm demonstrado ausência de correlação entre a perda de massa óssea medular e cortical em pacientes osteoporóticos (WAHNER *et al.*, 1984).

Os dados obtidos dos grupos controle negativo (grupo 1) e controle positivo (grupo 2) deste experimento estão de acordo com diversos estudos da literatura baseados em observações histológicas e histométricas de implantes inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas. MOTOHASHI *et al.*, (1999); por exemplo, demonstraram um nível de contato ósseo na cortical estatisticamente semelhante para o grupo controle (99,2%) e para o grupo ovariectomizado (99,4%),

após 56 dias da colocação de implantes. Para região medular, os autores encontraram diferenças estatisticamente significativas para o contato, comparando o grupo controle (97%) e o grupo ovariectomizado (87,8%). Assim como o presente estudo, os autores demonstraram que a deficiência de estrógeno não afetou severamente o reparo do tecido ósseo na região cortical, mas reduziu a taxa de contato na região medular. YAMAZASKI *et al.* (1999) avaliaram o tecido ósseo ao redor de implantes colocados em tíbia osteopênica de ratas ovariectomizadas e encontraram menor unidade de massa óssea para o grupo ovariectomizado (20,2%) em relação ao controle (49%), após 56 dias. Para o contato osso-implante, houve diferenças entre teste e controle tanto para a região cortical como para a medular. O presente estudo não foi capaz de detectar diferenças para o contato na zona cortical, mas está de acordo com YAMAZASKI *et al.* em relação ao menor contato e massa óssea na região medular. PAN *et al.* (2000), estudando o reparo ósseo ao redor de implantes na deficiência de estrógeno, concluíram que a ovariectomia afetou levemente a região cortical, mas diminuiu significativamente o volume e o contato osso-implante na região medular.

No presente estudo, observando o grupo 1 (ovariectomia simulada) e o grupo 2 (ovariectomia), foi demonstrado que a região cortical foi influenciada pela deficiência de estrógeno de forma bastante sutil, observada apenas por dados numéricos, mas sem diferenças estatísticas para contato direto osso implante (CD), área óssea de preenchimento das roscas (AO) e densidade óssea (DO). Por outro lado, na região medular a deficiência estrogênica influenciou significativamente o reparo ósseo, uma vez que o grupo ovariectomizado (grupo 2) apresentou contato estatisticamente inferior e demonstrou numericamente uma menor área de preenchimento de roscas. Para a densidade óssea (DO) o grupo ovariectomizado também apresentou valor estatisticamente inferior ao controle negativo demonstrando que a reabsorção osteoclástica

resultante da deficiência de estrógeno afetou não somente a região de reparo (CD e AO) como também o osso pré-existente em uma região lateral à superfície do implante.

Embora este estudo não tenha como objetivo investigar a ação da ovariectomia isolada ao redor de implantes de titânio, observou-se que controle positivo (deficiência de estrógeno) foi capaz de gerar prejuízos no tecido ósseo ao redor dos implantes de titânio e, dessa forma, a influência da calcitonina e do estradiol foi avaliada de forma segura. A literatura apresenta muitas informações sobre o efeito desses medicamentos sobre o tecido ósseo osteopênico, porém este é o primeiro estudo a investigar a ação de duas terapias propostas para osteoporose (estradiol e calcitonina) no tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em animais com deficiência de estrógeno e conseqüente osteopenia.

A reposição de estrógenos, utilizada no presente estudo na forma de injeção subcutânea diária de 17β estradiol, tem sido considerada a primeira linha terapêutica para prevenção de osteoporose pós-menopausa. Isso porque, conforme revisado anteriormente, este hormônio inibe a perda óssea por uma ação direta sobre as células ósseas e indireta pela regulação da liberação de citocinas relacionadas ao metabolismo ósseo (HOSKING *et al.*, 1998). Os resultados do presente trabalho demonstraram que o estrógeno, administrado imediatamente após a ovariectomia, neutralizou o efeito negativo da deficiência do hormônio endógeno para o contato osso-implante, para área de preenchimento das roscas e para a densidade óssea na região medular. Na região cortical, a administração de 17β estradiol resultou em uma maior área de preenchimento das roscas. O grupo 4 (estradiol) apresentou valores estatisticamente e/ou numericamente similares ao grupo 1 (animais normais, submetidos apenas a ovariectomia simulada) para todos os parâmetros analisados na região medular e cortical. Nossos dados estão de acordo com diversos estudos realizados em

animais ovariectomizados, que apesar de não terem utilizado implantes de titânio, puderam demonstrar que a terapia é efetiva para prevenir a perda óssea gerada pela deficiência de estrógeno (WRONSKI *et al.* 1988, CHOW *et al.*, em 1992, SIMS *et al.*, em 1996) após a excisão cirúrgica dos ovários.

A calcitonina é um hormônio polipeptídico que tem sido utilizado no tratamento de distúrbios ósseos por agir diretamente nas células osteoclásticas, inibir a reabsorção óssea (GONZÁLEZ, *et al.*, 1986), bem como por apresentar propriedades analgésicas (LYRITIS *et al.*, em 1991). No presente estudo, a calcitonina, administrada imediatamente após ovariectomia, demonstrou uma tendência em recuperar o efeito negativo da deficiência de estrógeno, mas os valores encontrados não foram estatisticamente significativos. Observando o contato direto osso-implante (CD) na região medular, o grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) apresentou um valor de 48,6% que foi numericamente maior que 40,28% do grupo 2 (ovariectomia) e muito próximo aos 51,75% do grupo 1 (normais). WRONSKI *et al.* (1991), demonstraram que a calcitonina foi capaz de promover proteção contra a osteopenia desenvolvida pela deficiência de estrógeno quando utilizada por 42 dias. SHEN *et al.* (1996) avaliaram as alterações ósseas ocorridas em tíbias de ratas ovariectomizadas tratadas por um período de 90 dias com calcitonina e demonstraram que a mesma foi apenas parcialmente capaz de prevenir o desenvolvimento de osteopenia no osso medular. No presente estudo, a calcitonina foi administrada por 81 dias e nossos resultados estão próximos aos encontrados por SHEN *et al.* Essa tendência na diminuição do efeito da calcitonina com o prolongamento do tratamento tem sido reportada também em estudos clínicos envolvendo tratamento de pacientes osteoporóticos (GRUBER *et al.*, 1984, ALOIA *et al.*, 1985). O fenômeno tem sido atribuído a uma desregulação dos sítios ósseos de ligação com o hormônio e a uma resistência do tecido ósseo a calcitonina pelo

desenvolvimento de anticorpos (SINGER *et al.*, 1972). Por muitos anos, estudos *in vitro* e *in vivo* têm sugerido que a calcitonina é capaz de induzir a perda de seus receptores, como resultado de uma resistência ao hormônio administrado por longos períodos e/ou altas doses (MESSER & COPP, 1974; WADA *et al.*, 1996). Existem ainda relatos de que a calcitonina pode promover a perda óssea trabecular devido à indução de hiperparatireoidismo secundário (GLAJCHEN *et al.*, em 1990). Para afirmar se algum desses fenômenos ocorreu no presente estudo seriam necessárias outras investigações. O fato é que, neste trabalho, o tecido ósseo ao redor dos implantes dos animais ovariectomizados e tratados com calcitonina foi negativamente afetado pela deficiência de estrógeno.

Comparando o peso dos diferentes grupos experimentais no início do experimento, observamos que a amostra apresentou-se homogênea, pois não houve diferenças estatísticas significativas entre os diferentes grupos. No entanto, no decorrer do estudo todos os grupos ganharam peso e antes do sacrifício o grupo que recebeu estradiol apresentou peso estatisticamente inferior que os demais grupos. A restrição alimentar feita aos animais ovariectomizados que não receberam tratamento com estradiol se deve ao fato da ovariectomia induzir ganho de peso. A obesidade, por sua vez, é um fator de proteção contra a osteoporose devido a um aumento da sobrecarga no esqueleto e conseqüente aumento de estresse sobre o mesmo. Além disso, tem sido sugerido que os níveis plasmáticos de estradiol e estrona são proporcionais ao peso corporal em decorrência da conversão de andostenidiona em estrona e estradiol pelo tecido adiposo. Logo, animais obesos poderiam interferir no nível plasmático disponível de estradiol e conseqüentemente no metabolismo ósseo (WRONSKI *et al.*, 1985, 1986).

A monitoração do ciclo estral nos animais do presente estudo foi importante tanto para a confirmação do sucesso da ovariectomia como para a confirmação do sucesso da administração de

estradiol nos animais pertencentes ao grupo 4 (estradiol). Através da observação do tipo de célula presente no esfregaço vaginal pôde ser previsto o nível de estrógeno circulante no animal. Assim, um animal do grupo 3 (ovariectomia e calcitonina) foi eliminado do experimento por apresentar todas as fases do ciclo estral, indicando insucesso da ovariectomia. Certamente esse animal interferiria nos resultados histométricos caso fosse incluído na amostra. As observações do aspecto macroscópico do útero dos animais após o sacrifício indicaram que a maioria deles estavam dentro das expectativas e permitiu mais uma vez a confirmação do animal pertencente ao grupo 3 que deveria ser excluído

As análises de concentração plasmática de fosfatase alcalina e cálcio deram suporte aos resultados histométricos. A fosfatase alcalina óssea é liberada pelos osteoblastos, sendo considerada um marcador de formação óssea. No presente estudo, os níveis desta fosfatase apresentaram-se aumentados nos grupos ovariectomizado (grupo 2) e ovariectomizado que recebeu calcitonina (grupo 3). Níveis mais baixos foram encontrados de forma similar para o grupo 1 (ovriectomia simulada) e grupo 4 (ovariectomia e estradiol). Tais resultados indicam que a reposição por estrógeno foi capaz de controlar o alto remodelamento ósseo promovido pela deficiência do hormônio endógeno, porém a calcitonina não apresentou o mesmo efeito. Esses dados estão de acordo com SONES *et al.* (1986) que também demonstraram níveis plamáticos de fosfatase alcalina aumentados em animais osteopênicos. Os resultados do presente estudo estão ainda de acordo com CHRISTIANSEN *et al.*, (1984) que verificaram que a taxa de fosfatase alcalina encontra-se aumentada em cerca de 20% na menopausa em comparação a valores pré-menopausicos, continua aumentando durante o envelhecimento e diminui com a terapia de reposição hormonal. Embora a calcitonina não tenha demonstrado eficiência em impedir o alto remodelamento ósseo, verificado

pelos dados histométricos e dos níveis de fosfatase alcalina, a mesma foi capaz de demonstrar seu efeito hipocalcêmico (HIRSCH *et al.*, 1964; ALIAPOLIOUS *et al.*, 1966). Apenas o grupo 2 (ovariectomia) apresentou taxa de cálcio sérico estatisticamente superior aos demais grupos.

Dentro dos limites do presente estudo, demonstrou-se que o tecido ósseo ao redor de implantes de titânio foi mais positivamente influenciado pela terapia com estrógeno que com calcitonina. Alguns aspectos devem ser considerados antes de tentar extrapolar esses resultados para prática clínica. Primeiramente, os implantes não foram submetidos a cargas oclusais e não se pode determinar as implicações desses medicamentos em um tecido ósseo submetido a forças mecânicas. Além disso, existem diversos tipos de terapia de reposição hormonal e este trabalho está limitado ao uso de estrógeno de forma contínua. Por fim, não se sabe se um modelo animal é realmente capaz de reproduzir inteiramente os fenômenos ocorridos em seres humanos, apesar de sua indiscutível capacidade de se isolar a variável a ser estudada.

Entretanto, poderíamos sugerir aos cirurgiões dentistas que sejam cautelosos em colocar implantes e próteses convencionais em regiões com predomínio de osso trabecular de pacientes osteoporóticos que não estejam sendo submetidos à terapia de reposição estrogênica. Finalmente, estudos em animais utilizando outras terapias para osteoporose, analisando o efeito da interrupção desses tratamentos e estudos em humanos certamente complementaríamos nossos resultados.

7. CONCLUSÃO

Diante do objetivo do presente estudo, conclui-se que:

- A terapia de reposição hormonal, através de estrógeno, imediatamente após a ovariectomia, foi capaz de prevenir a influência negativa da deficiência do estrógeno endógeno tanto no reparo quanto na densidade óssea ao redor dos implantes de titânio;
- A calcitonina, imediatamente após a ovariectomia, não foi capaz de evitar a influência negativa da deficiência de estrógeno no reparo e na densidade óssea dos tecidos adjacentes aos implantes de titânio.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adell R The surgical principles of osseointegration. In: WORTHINGTON, P., BRANEMARK, P-I. Advanced osseointegration surgery: Applications in the maxillofacial region 1992: 94-107

Adell R, Eriksson B, Lekholm U, Branemark PI, Jemt T. Long-term follow-up study of osseointegrated implants in the treatment of totally edentulous jaws. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990 Winter;5(4):347-59

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Branemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg* 1981 Dec;10(6):387-416

Albright F, Smith PH, Richardson AM. Postmenopause osteoporosis. It's clinical features. *JAMA* 1941; 116:2465-74

Aliapoulos MA, Goldhaber P, Munson PL. Thyrocalcitonin inhibition of bone resorption induced by parathyroid hormone in tissue culture. *Science* 1966 Jan 21;151(708):330-1

Aloia JF, Vaswani A, Ellis K, Yuen K, Cohn SH A model for involutional bone loss. *J Lab Clin Med* 1985; 106: 630-637

Arjmandi BH, Salih MA, Herbert DC, Sims SH, Kalu DN. Evidence for estrogen receptor-linked calcium transport in the intestine. *Bone Miner* 1993 Apr;21 (1):63-74*

August M, Chung K, Chang Y, Glowacki J. Influence of estrogen status on endosseous implant osseointegration. *J Oral Maxillofac Surg* 2001 Nov;59(11):1285-9; discussion

* De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

1290-1

Austin LA, Heath H 3rd. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *N Engl J Med* 1981 Jan 29;304 (5):269-78

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

Becker W, Hujoel PP, Becker BE, Willingham H. Osteoporosis and implant failure: an exploratory case-control study. *J Periodontol* 2000 Apr;71(4):625-31

Branemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindstrom J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1969;3(2):81-100

Branemark PI, Hansson BO, Adell R, Breine U, Lindstrom J, Hallen O, Ohman A. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl* 1977;16:1-132

Caniggia A, Gennari C, Borrello G, Bencini M, Cesari L, Poggi C, Escobar S. Intestinal absorption of calcium-47 after treatment with oral oestrogen-gestogens in senile osteoporosis. *Br Med J* 1970 Oct 3;4(726):30-2

Cao T, Shirota T, Yamazaki M, Ohno K, Michi KI. Bone mineral density in mandibles of ovariectomized rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2001 Dec;12(6):604-8

Chambers TJ The effect of calcitonin on the osteoclast. *Triangle* 1988;27:53

Chesnut CH 3rd, Kribbs PJ. Osteoporosis: some aspects of pathophysiology and therapy. *J Prosthet Dent* 1982 Jul;48(1):4-7

Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ. 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 Jan;89(1):74-8

Christiansen C, Christensen MS, Transbol I Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of estrogen/gestagen replacement therapy. *Lancet* 1981;1:459-461

Christiansen C, Rodbro P, Tjellesen L, Serum alkaline phosphatase during hormone treatment in early postmenopausal women. *Acta Med Scand* 1984 216: 11-17

Christiansen C. Skeletal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1993 Dec;8 Suppl 2:S475-80

Christensen JH, Kristiansen JH. Combination therapy with pamidronate and calcitonin in hypercalcemic crisis caused by primary hyperparathyroidism. *Ugeskr Laeger* 1992 Nov 16;154(47):3341-2

Civitelli R, Gonnelli S, Zacchei F, Bigazzi S, Vattimo A, Avioli LV, Gennari C Bone turnover in postmenopausal osteoporosis. Effect of calcitonin treatment. *J Clin Invest* 1988 Oct;82(4):1268-74

Cooper C, Melton LJ III. Magnitude and impact of osteoporosis and fractures. In: Marcus R, Feldman D, Kelsey J. Osteoporosis. San Diego: Academic Press; 1996:419-434

Dao TT, Anderson JD, Zarb GA. Is osteoporosis a risk factor for osseointegration of dental implants? *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993;8(2):137-44

Eriksen EF, Colvard DS, Berg NJ, Graham ML, Mann KG, Spelsberg TC, Riggs BL. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science* 1988 Jul 1;241(4861):84-6

Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P. Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci* 1998 Jun;106(3):721-64

Feldman RS, Krieger NS, Tashjian AH Jr. Effects of parathyroid hormone and calcitonin on osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 1980 Oct;107(4):1137-43

Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Giardino R. Titanium alloy osseointegration in cancellous and cortical bone of ovariectomized animals: histomorphometric and bone hardness measurements.

Int J Oral Maxillofac Implants 2002 Jan-Feb; 17(1):28-37

Foster GV, Doyle FH, Bordier P, Matrajt H Effect of thyrocalcitonin on bone. *Lancet* 1966 Dec 31;2(7479):1428-31

Friberg B. Treatment with dental implants in patients with severe osteoporosis: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1994 Aug;14(4):348-53

Friberg B, Ekestubbe A, Mellstrom D, Sennerby L. Branemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2001;3(1):50-6

Friedman J, Raisz LG., Thyrocalcitonin: inhibitor of bone resorption in tissue culture. *Science* 1965Dec10;150(702):1465-7

Fujimoto T, Niimi A, Nakai H, Ueda M. Osseointegrated implants in a patient with osteoporosis: a case report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996; 11: 539-542

Girasole G, Jilka RL, Passeri G, Boswell S, Boder G, Williams DC, Manolagas SC.17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and

osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J Clin Invest* 1992 Mar;89(3):883-91

Girasole G, Passeri G, Pedrazzoni M, Giuliani N, Passeri M. Interleukin-6: a pathogenetic role in the postmenopausal osteoporosis? *Acta Biomed Ateneo Parmense* 1995;66(3-4):125-38

Glajchen N, Thomas S, Jowell P, Epstein S, Ismail F, Fallon M. The effect of high-dose salmon calcitonin on bone mineral metabolism in the normal rat. *Calcif Tissue Int* 1990 Jan;46(1):28-32

Gonzalez D, Vega E, Ghiringhelli G, Mautalen C. Comparison of the acute effect of the intranasal and intramuscular administration of salmon calcitonin in Paget's disease. *Calcif Tissue Int* 1987 Dec;41(6):313-5

Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, McGuire MK, Russell RG. An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* 1983 Nov 24-30;306(5941):378-80

Gruber HE, Ivey JL, Baylink DJ, Matthews M, Nelp WB, Sisom K, Chesnut CH Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism* 1984 33: 295-303.

Guyton AC *Tratado de Fisiologia Médica* 8° ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1992. p.776.

Hara T, Hayashi K, Nakashima Y, Kanemaru T, Iwamoto Y. The effect of hydroxyapatite coating on the bonding of bone to titanium implants in the femora of ovariectomised rats. *J Bone Joint Surg Br* 1999 Jul;81(4):705-9

Harrison JE. Osteoporosis. In: Tam CS, Heersche JNM, Murray TM. Metabolic bone diseases: Cellular and tissue mechanisms. Boca Raton: CRC Press, 1989:240-267

Hayashi K, Uenoyama K, Mashima T, Sugioka Y. Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. *Biomaterials* 1994 Jan;15(1):11-6

Heaney RP A unified concept of osteoporosis. *Am J Med* 1961 39: 877-880.

Hildebolt CF. Osteoporosis and oral bone loss. *Dentomaxillofac Radiol* 1997 Jan;26(1):3-15

Hirai T, Ishijima T, Hashikawa Y, Yajima T. Osteoporosis and reduction of residual ridge in edentulous patients. *J Prosthet Dent* 1993 Jan;69(1):49-56

Hirsch PF, Voelkel EF, Munson PL Thyrocalcitonin: Hypocalcemic, Hypophosphatemic principle of the thyroid gland. *Science* 1964 146: 412-413

Hoar W, Hickman CP Ovariectomy and the estros cycle of the rat. In W hoar & CP Hickman (eds) *General and comparative physiology* 2 ed Prentice-Hall, New Jersey, 1975, pp. 260-265.

Hosking D, Chilvers CE, Christiansen C, Ravn P, Wasnich R, Ross P, McClung M, Balske A, Thompson D, Daley M Yates AJ. Prevention of bone loss with alendronate in postmenopausal women under 60 years of age. Early Postmenopausal Intervention Cohort Study Group. *N Engl J Med* 1998;338:485-492.

Jaffin, R.A., Berman, C. L. The Excessive Loss Of Branemark Fixtures In Type Iv Bone: A 5-Year Analysis. *J Periodontol* 1991 Jan 62(1): 2-4

Jahangiri L, Kim A, Nishimura I. Effect of ovariectomy on the local residual ridge remodeling. *J Prosthet Dent* 1997 Apr;77(4):435-43

Januario AL, Sallum EA, de Toledo S, Sallum AW, Nociti JF Jr. Effect of calcitonin on bone formation around titanium implant. A histometric study in rabbits. *Braz Dent J* 2001;12(3):158-62

Jeffcoat MK. Osteoporosis: a possible modifying factor in oral bone loss. *Ann Periodontol* 1998 Jul;3(1):312-21

Jilka RL, Hangoc G, Girasole G, Passeri G, Williams DC, Abrams JS, Boyce B, Broxmeyer H, Manolagas SC. Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science* 1992 Jul3;257(5066):88-91

Jones JD, Lupori J, Van Sickels JE, Gardner W. A 5-year comparison of hydroxyapatite-coated titanium plasma-sprayed and titanium plasma-sprayed cylinder dental implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Jun;87(6):649-52

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

Kallio DM, Garant PR, Minkin C. Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. *J Ultrastruct Res* 1972 May; 39(3):205-16

Kleerekoper M, Avioli L Evaluation and treatment of post-menopause osteoporosis. In *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*, edn 2. Edited by Favus M. New York: Raven Press 1993:223-228.

Klemetti E, Vainio P, Lassila V, Alhava E. Trabecular bone mineral density of mandible and alveolar height in postmenopausal women. *Scand J Dent Res* 1993 Jun;101(3):166-70

Kribbs PJ, Chesnut CH 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in a population of normal women. *J Prosthet Dent* 1990 Jan;63(1):86-9

Kribbs PJ, Chesnut CH 3rd, Ott SM, Kilcoyne RF. Relationships between mandibular and skeletal bone in an osteoporotic population. *J Prosthet Dent* 1989 Dec;62(6):703-7

Kribbs PJ. Comparison of mandibular bone in normal and osteoporotic women. *J Prosthet Dent* 1990 Feb;63(2):218-22

Lambert PM, Morris HF, Ochi S. Positive effect of surgical experience with implants on second-stage implant survival. *J Oral Maxillofac Surg* 1997 Dec. 55 [supl.5]:12-18

Li X, Nishimura I. Altered bone remodeling pattern of the residual ridge in ovariectomized rats. *J Prosthet Dent* 1994 Sep;72(3):324-30

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

Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implants Res* 1996 Dec;7(4):329-36

Lorenzo JA, Naprta A, Rao Y, Alander C, Glaccum M, Widmer M, Gronowicz G, Kalinowski J, Pilbeam CC. Mice lacking the type I interleukin-1 receptor do not lose bone mass after ovariectomy. *Endocrinology* 1998 Jun;139(6):3022-5

Loza JC, Carpio LC, Dziak R Osteoporosis and its relationship to oral bone loss. *Curr Opin Periodontol* 1996;3:27-33

Lugero GG, de Falco Caparbo V, Guzzo ML, Konig B Jr, Jorgetti V. Histomorphometric evaluation of titanium implants in osteoporotic rabbits. *Implant Dent* 2000;9(4):303-9

Lyrakis GP, Trovas G. Analgesic effects of calcitonin. *Bone* 2002 May;30(5 Suppl 1):71-4

Lyrakis GP, Tsakalakos N, Magiatis B, Karachalios T, Yiatzides A, Tsekoura M. Analgesic effect of salmon calcitonin in osteoporotic vertebral fractures: a double-blind placebo-controlled clinical study. *Calcif Tissue Int* 1991 Dec;49(6):369-72

Maraghi NR, Platt BS, Stewart RJ. The effect of the interaction of dietary protein and calcium on the growth and maintenance of the bones of young, adult and aged rats. *Br J Nutr* 1965;19(4):491-509

Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol.* 2002; 62(4A): 609-614

Matukas VJ Medical risks associated with dental implants. *J Dent Educ* 1988 Dec; 52(12):745-7

Melton LJ, Riggs BL Epidemiology of age-related fractures In: Avioli LV (ed.) The osteoporotic syndrome (Grune & Stratton, New York 1983), pp.45-72.

Merckse-Stern R, Aerni D, Geering AH, Buser D. Long-term evaluation of non-submerged hollow cylinder implants. Clinical and radiographic results. *Clin Oral Implants Res* 2001 Jun;12(3):252-9

Michaelsson K, Baron JA, Farahmand BY, Johnell O, Magnusson C, Persson PG, Persson I, Ljunghall S. Hormone replacement therapy and risk of hip fracture: population based case-control study. The Swedish Hip Fracture Study Group. *BMJ* 1998 Jun

20;316(7148):1858-63

Minsk L, Polson AM. Dental implant outcomes in postmenopausal women undergoing hormone replacement. *Compend Contin Educ Dent* 1998 Sep;19(9):859-62,864;quiz866

Morris HF, Manz MC, Tarolli JH. Success of multiple endosseous dental implant designs to second-stage surgery across study sites. *J Oral Maxillofac Surg* 1997 Dec; 55(12 Suppl 5):76-82

Motohashi M, Shirota T, Tokugawa Y, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions around hydroxyapatite-coated implants in ovariectomized rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Feb;87(2):145-52

Mulder H, van Bolhuis H, Naafs MA, Winckers PL. Influence of pharmacological doses of calcitonin on serum beta 2 microglobulin concentration.

Calcif Tissue Int 1985 Jul; 37(4):367-71

Naert I, Koutsikakis G, Duyck J, Quirynen M, Jacobs R, Van Steenberghe D. Biologic outcome of single-implant restorations as tooth replacements: a long-term follow-up study. *Clin Implant Dent Relat Res* 2000 2(4):209-218

NIH Consensus development panel on osteoporosis prevention, diagnosis and therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis and therapy *JAMA* 2001 285: 785

Noda K, Kuwahara Y. The occurrence of mitochondrial variations including large mitochondria in osteoclasts following calcitonin treatment. *J Electron Microsc(Tokyo)*1993Aug;42(4):218-26

Overgaard K, Hansen MA, Nielsen VA, Riis BJ, Christiansen C. Discontinuous calcitonin treatment of established osteoporosis--effects of withdrawal of treatment. *Am J Med* 1990

Jul;89(1):1-6

Ozawa S, Ogawa T, Iida K, Sukotjo C, Hasegawa H, Nishimura RD, Nishimura I. Ovariectomy hinders the early stage of bone-implant integration: histomorphometric, biomechanical, and molecular analyses. *Bone* 2002 Jan;30(1):137-43

Pacifici R, Rifas L, McCracken R, Vered I, McMurtry C, Avioli LV, Peck WA. Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Apr;86(7):2398-402

Pacifici R. Is there a causal role for IL-1 in postmenopausal bone loss? *Calcif Tissue Int* 1992 Apr;50(4):295-9

Pan J, Shiota T, Ohno K, Michi K. Effect of ovariectomy on bone remodeling adjacent to hydroxyapatite-coated implants in the tibia of mature rats. *J Oral Maxillofac Surg* 2000 Aug;58(8):877-82

Parr GR, Gardner LK, Toth RW. Titanium: the mystery metal of implant dentistry. Dental materials aspects. *J Prosthet Dent* 1985 Sep;54(3):410-4

Patel S, Lyons AR, Hosking DJ. Drugs used in the treatment of metabolic bone disease. Clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 1993 Oct;46(4):594-617

Proceedings of the 1996 World Workshop In Periodontics. Consensus report. Implant therapy II. *Ann Periodontol*, 1996 1: 816-820

Raisz LG. Hormonal regulation of bone growth and remodelling. *Ciba Found Symp*

1988;136:226-38

Regan MM, Emond SK, Attardo MJ, Parker RA, Greenspan SL. Why do older women discontinue hormone replacement therapy? *J Womens Health Gend Based Med* 2001 May;10(4):343-50

Riggs BL, Melton LJ 3rd. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* 1986 Jun 26;314(26):1676-86

Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro RA. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant Dent* 1992 Spring;1(1):11-21

Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000 Sep 1;289(5484):1508-14

Shen Y, Li M, Wronski TJ. Skeletal effects of calcitonin treatment and withdrawal in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1996 58:263-267

Sims NA, Morris HA, Moore RJ, Durbridge. Estradiol treatment transiently increase trabecular bone volume in ovariectomized rats. *Bone* 1996; 19: 455-461

Singer FR, Aldred JP, Neer RM, Krane SM, Potts JT Jr, Bloch KJ. An evaluation of antibodies and clinical resistance to salmon calcitonin. *J Clin Invest* 1972 Sep;51(9):2331-8

Smith RA, Berger R, Dodson TB. Risk factors associated with dental implants in healthy and medically compromised patients. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1992 7(3): 367-372

Sones AD, Wolinsky LE, Kratochvil FJ. Osteoporosis and mandibular bone resorption in the Sprague Dawley rat. *Calcif Tissue Int* 1986 Oct; 39(4):267-70

Storey E. The influence of adrenal cortical hormones on bone formation and resorption. *Clin Orthop* 1963; 30:197-217

Takano-Yamamoto T, Rodan GA. Direct effects of 17 beta-estradiol on trabecular bone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990 Mar;87(6):2172-6

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

Urist MR Osteoporosis *Ann Rev Med* 1972, 13:273

Vaananen HK, Harkonen PL. Estrogen and bone metabolism. *Maturitas* 1996 May;23 Suppl:S65-9

Vico L, Prallet B, Chappard D, Pallot-Prades B, Pupier R, Alexandre C. Contributions of chronological age, age at menarche and menopause and of anthropometric parameters to axial and peripheral bone densities. *Osteoporos Int* 1992 May;2(3):153-8

von Wowern N, Kollerup G. Symptomatic osteoporosis: a risk factor for residual ridge reduction of the jaws. *J Prosthet Dent* 1992 May;67(5):656-60

Wada S, Udagawa N, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Physiological levels of calcitonin regulate the mouse osteoclast calcitonin receptor by a protein kinase Alpha-mediated mechanism. *Endocrinology* 1996;137:312-320.

Wahner HW, Dunn WL, Riggs BL. Assessment of bone mineral. Part I. *J Nucl Med* 1984

Oct;25(10):1134-41

Weyant RJ Characteristics associated with the loss and peri-implant tissue health of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1994 Jan-Feb;9(1):95-102

Women's Health Initiative (WHI) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. 2002 July; 288(3): 321-333.

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

Wronski TJ, Dann LM, Qi H, Yen CF. Skeletal effects of withdrawal of estrogen and diphosphonate treatment in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1993 Sep;53(3):210-6

Wronski TJ, Walsh CC, Ignaszewski LA. Histologic evidence for osteopenia and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Bone* 1986;7(2):119-23

Wronski TJ, Yen CF, Burton KW, Mehta RC, Newman PS, Soltis EE, DeLuca PP. Skeletal effects of calcitonin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1991 Oct;129(4):2246-50

Yamazaki M, Shirota T, Tokugawa Y, Motohashi M, Ohno K, Michi K, Yamaguchi A. Bone reactions to titanium screw implants in ovariectomized animals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999 Apr;87(4):411-8

Zarb GA, Schmitt A. The longitudinal clinical effectiveness of osseointegrated dental implants: the Toronto Study. Part II: The prosthetic results. *J Prosthet Dent* 1990 Jul;64(1):53-61



Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 243-1, sobre "Efeito do estrogênio e da calcitonina sobre a integração óssea em ratos ovariectomizados"

sob a responsabilidade de Poliana Mendes Duarte e Francisco H. Nozaki JR. está

de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 05/04/2001. Este certificado expira em 04/04/2002.

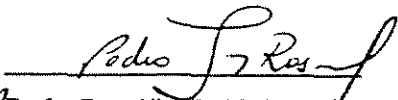
CERTIFICATE

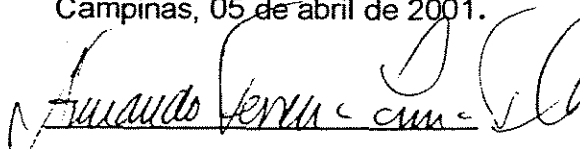
We certify that the protocol nº 243-1, entitled "Effect of estrogen and calcitonin on bone integration in ovariectomized rats"

is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 05/04/2001. This certificate expires on 04/04/2002.

(d) (m) (y)

Campinas, 05 de abril de 2001.


Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP


Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP



Editorial Chairman
William R. Laney, DMD, MS

Section Editors
John B. Brunski, MS, PhD
Daniel M. Laskin, DDS, MS
Michael G. Newman, DDS
Thomas D. Taylor, DDS, MSD

Dr Francisco H. Nociti Jr
Av. Limeira 901 – Caixa Postal: 052 -
CEP: 13414-903
Piracicaba – S.P.
Brazil

Dear Dr Nociti Jr,

I am very pleased to inform you that your manuscript, **"Effect of Estrogen Replacement and Calcitonin Therapies on Bone Around Titanium Implants Placed in Ovariectomized Rats: A Histometric Study,"** has been accepted for publication in *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. Your article is scheduled to be published in the 6/2002 (November/December) issue. To that end, you should expect to receive page proofs to review and approve in early October. If you anticipate being away at this time, please let me know as soon as possible.

We are beginning a new procedure that would allow you to receive your proofs more efficiently. Please let me know if you would be able to receive and print out an electronic PDF file of your page proofs. If you are unable to receive them electronically, page proofs will be mailed to the address above. Please let me know as soon as possible whether you wish to receive them electronically or by regular mail.

As corresponding author, you will receive 100 free reprints of your article following publication. These will be shipped to the address above unless you direct me otherwise. Additional reprints may be purchased at cost. Each author will receive a complimentary copy of the issue in which the article appears.

I look forward to working with you on the production of your article for publication. If you have any questions, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,

Rhonda DiSandro
Editorial Coordinator
E-mail: rdisandro@quintbook.com