

LIANA LINHARES LIMA

***EFEITO DA APLICAÇÃO INTERMITENTE DO PTH (1-34) SOBRE O
TECIDO ÓSSEO AO REDOR DE IMPLANTES INSERIDOS EM
RATAS EXPOSTAS OU NÃO À FUMAÇA DE CIGARRO***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia,
Universidade Estadual de Campinas, para
obtenção do título de doutor em Clínica
Odontológica, Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati

Co-Orientador: Prof. Dr. João Batista César Neto

PIRACICABA

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª/ 6159

L628e Lima, Liana Linhares.
 Efeito da aplicação intermitente do PTH (1-34) sobre o tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratas expostas ou não à fumaça de cigarro. / Liana Linhares Lima. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Márcio Zaffalon Casati, João Batista César Neto.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Implantes dentários . I. Casati, Márcio Zaffalon. II. César Neto, João Batista. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Effect of intermittent PTH (1-34) on bone tissue around implants in rats exposed or not to cigarette smoke inalation

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental implants

Área de Concentração: Periodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Márcio Zaffalon Casati, Sérgio de Toledo, Marcelo Rocha Marques, Daiane Cristina Peruzzo, Suzana Peres Pimentel.

Data da Defesa: 25-11-2009

Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Novembro de 2009, considerou a candidata LIANA LINHARES LIMA aprovada.

Prof. Dr. MÁRCIO ZARFALON CASATI

Profa. Dra. SUZANA PERES PIMENTEL

Profa. Dra. DAIANE CRISTINA PERUZZO

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES

Prof. Dr. SÉRGIO DE TOLEDO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, com muito carinho...

Aos meus amados pais, **José Barbosa** e **Maria Benedita**, por estarem ao meu lado com dedicação, amor, carinho e confiança em toda minha trajetória. Sempre apoiaram todas as minhas decisões, me incentivando a buscar o melhor tanto na vida pessoal como profissional. A vocês, por tudo, minha eterna gratidão!

Aos meus irmãos queridos, **Anali** e **Alisson**, meus maiores e queridos amigos.

E a toda a minha linda **família**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus** em primeiro lugar, que sempre guiou meus passos, iluminando o meu caminho e me conduzindo para o bem. Agradeço-lhe pela minha vida, por tudo o que sou e alcancei até hoje. Agradeço-lhe por me acolher como filha amada e por me consolar em momentos difíceis, me dando a força necessária para seguir em frente, segundo a Sua vontade.

“Esforça-te, e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus é contigo, por onde quer que andares” (Josué 1:9)

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Márcio Zaffalon Casati**, pelo exemplo de profissionalismo e, sobretudo, pela amizade e toda a atenção dispensada durante este curso. Aprendi a admirá-lo como amigo, orientador e profissional.

Ao Prof. Dr. **Antonio Wilson Sallum**, pelo exemplo de profissionalismo, experiência e dedicação à carreira acadêmica. Do seu exemplo surgiu o meu amor pela docência e pela Periodontia.

Ao Prof. Dr. **Enilson Antônio Sallum**, pela amizade, exemplo de dedicação à pesquisa, pelo apoio, pelo incentivo e todas as oportunidades a mim concedidas durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. **Sérgio de Toledo**, pela grande contribuição em minha formação. A sua serenidade, enorme coração e bondade o fazem ser admirado por todos.

À amiga **Eliete Aparecida Ferreira Lima**, pela grande amizade, simplicidade, competência e pelos inmensuráveis auxílios prestados durante o curso de pós-graduação. Sem você nada seria possível.

À **Mariana Piovezan Fugolin**, pela grande amizade, ajuda indispensável na execução da parte laboratorial deste trabalho e pelos momentos agradáveis de convivência no laboratório.

Aos meus grandes amigos e colegas de turma, **Beatriz Bezerra, Renato Casarin, Fabrícia Suaid, Thais Gonçalves, Kamille Barbosa, Daniela Feitosa, Mauro Santamaría, Fernanda Ribeiro, Thaisângela Rodrigues, Ezymar Cayana, e Lucas Moura** companheiros de todas as horas, continuarei levando a nossa amizade aonde quer que eu vá. Crescemos e aprendemos juntos, e temos o orgulho de dizer que também fizemos crescer e aprender.

Ezymar Cayana, Hugo, João Batista e Marcelo Marques pessoas indispensáveis na realização desta tese. Pela disponibilidade e pelo esforço em fazer com que tudo acontecesse da melhor forma possível. Sobretudo pela enorme amizade e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Excelentíssimo Senhor Prof. Dr. José Tadeu Jorge, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp na pessoa do seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e Prof. Dr. Marcelo de Castro Meneghim

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Jr coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/Unicamp. A Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/Unicamp.

Ao Prof. Dr. Márcio Casati, chefe do Departamento de Prótese e Periodontia.

Ao Prof. Dr. Enilson Antônio Sallum, responsável pela área de Periodontia.

À CAPES pelo apoio na forma de bolsa e reserva técnica de mestrado indispensável para a execução deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro dado a este trabalho.

À FAEPEX à complementação do auxílio financeiro dado a este trabalho.

À empresa Titaniun Fix pela doação dos implantes.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, em especial à D.Cida e Rosângela, que sempre nos recebem com sorrisos na Clínica de Especialização.

Às minhas amigas-irmãs Fernanda Ferreira Lopes, Maria Carmem Rodrigues, Valéria Pereira e Gláucia Xavier, pela grande amizade e agradável convívio durante minha vida. Mesmo que a distância nos separe, são pessoas que sei que posso contar em qualquer momento.

À minha companheira e amiga Maíra Daysê, por confiar em mim e por abrir seu coração para que eu pudesse ser mais uma amiga. Sem você, a minha estada em Piracicaba seria bem mais penosa. Uma amiga para todas as horas e que admiro muito.

Às minhas amigas, Fabrícia Suaid, Mônica e Mirela. Aprendi a admirá-las a cada dia. Obrigada por tornarem meus dias melhores e mais engraçados.

Aos bioteristas Wanderley e Fábio, pelo cuidado prestado aos meus animais.

A todos que indiretamente tiveram grande importância para a realização de mais essa etapa da minha formação.

**“Não há outra maneira de aprender a não ser nos conhecendo
transformando nossos medos e limitações em
força e alegria.
Essa é a principal lição”.
(Brian Weiss)**

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente a influência do PTH (1-34) sobre o reparo ósseo e osseointegração de implantes de titânio instalados em tíbias de ratas expostas ou não à inalação da fumaça de cigarro. Foram utilizadas 61 ratas Wistar adultas aleatoriamente divididas em: **grupo 1** (n=15) : animais que receberam a aplicação do veículo necessário para a dissolução do hormônio após a instalação do implante; **grupo 2** (n=16) : inalação de fumaça de cigarro (IFC) por 60 dias no pré e pós-operatório da colocação do implante; **grupo 3** (n = 17): tratamento do grupo 2 associado à injeções subcutâneas de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana, após a colocação do implante e **grupo 4** (n=13) : injeções subcutâneas de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana após a instalação dos implantes. Os animais foram sacrificados sessenta dias após a colocação dos implantes, secções não descalcificadas foram obtidas e avaliadas histometricamente, segundo os seguintes parâmetros: porcentagem de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (CD), porcentagem de preenchimento ósseo das roscas do implante (AO) e porcentagem de tecido mineralizado numa zona de 500 µm, adjacente à superfície do implante (PTM). Os parâmetros foram obtidos separadamente para região cortical e região medular. Não foram detectadas diferenças entre os grupos que receberam aplicação de PTH (1-34) (Grupos 3 e 4) em todos os parâmetros avaliados ($p>0,05$). Além disso, o PTH promoveu um aumento significativo no CD, AO e PTM em ambas as regiões, mesmo na presença de IFC ($p<0.05$) (exceto para AO na região cortical). Uma influência negativa da IFC foi observada para o parâmetro CD na região cortical, uma vez que o grupo 2 apresentou os menores valores de CD, seguidos do grupo 1. Resultados semelhantes foram observados para PTM em ambas as regiões analisadas. Dentro dos limites deste estudo pode-se concluir que a aplicação intermitente de PTH (1-34) é capaz de minimizar os impactos negativos da inalação da fumaça de cigarro na osseointegração de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratas.

Palavras-Chave: cigarro, implantes dentais, PTH (1-34).

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the synthetic parathyroid hormone, PTH (1-34), can mitigate the effect of cigarette smoke inhalation (CSI) on the bone healing around titanium implants inserted in rats. 61 female Wistar rats were randomly assigned to one of four groups: group 1 (n = 15): animals that received the application of the necessary vehicle for the dissolution of the hormone after installation of the implant; group 2 (n = 16): cigarette smoke inhalation (CSI) for 60 days preoperatively and sixty days after implant placement; group 3 (n = 17), treatment group 2, associated with subcutaneous injections of 40 µg / kg of synthetic PTH (1-34) three times a week after implant placement and group 4 (n = 13): subcutaneous injections of 40 µg / kg of synthetic PTH (1-34) three times a week after placement of implants. The animals were sacrificed sixty days after the placement of implants, not decalcified sections were obtained and evaluated histometrically, according to the following parameters: percentage of bone tissue in direct contact with the implant surface (BIC), percentage of bone filling the threads of the implant (BF) and percentage of mineralized tissue in an area of 500 µm adjacent to the implant surface (BA). The parameters were obtained separately for the cortical and cancellous bone. No differences were found between the groups that received PTH (1-34) (Groups 3 and 4) in all evaluations ($p > 0.05$). In addition, PTH (1-34) caused a significant increase in BIC, BF and BA in both regions, even in the presence of CSI ($p < 0.05$) (except for BF in the cortical region). A negative influence of the IFC was observed for the parameter BIC in the cortical region, as group 2 had the lowest values of BIC, followed by group 1. Similar results were observed for BA in both regions analyzed. Within the limits of this study can conclude that the intermittent application of PTH (1-34) is able to reversing the negative effects of cigarette smoke inhalation on osseointegration of titanium implants inserted in rats.

Keywords: cigarettes, dental implants, PTH (1-34).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	04
2.1 Implantes dentais de titânio	04
2.2 Etiologia do insucesso dos implantes dentais	05
2.3 Influência da fumaça de cigarro e seus componentes	08
2.4 PTH (1-34): Fisiologia e mecanismo de ação	11
2.5 PTH (1-34): Estudo em animais	13
2.6 Utilização clínica do PTH (1-34)	16
3. PROPOSIÇÃO	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Amostra	19
4.2 Delineamento experimental	19
4.3 Metodologia de exposição à fumaça	21
4.4 Procedimento cirúrgico	22
4.5 Aplicação da medicação	23
4.6 Processamento histológico e análise histométrica	25
4.7 Calibração do examinador	29
4.8 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS	31
5.1 Porcentagem de tecido mineralizado na região adjacente ao implante	32
5.2 Porcentagem de tecido ósseo dentro das roscas	34
5.3 Porcentagem de contato direto osso-implante	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXO	56

1 INTRODUÇÃO

Estudos de longa duração têm relatado um alto nível de previsibilidade no processo de osseointegração e altas taxas de sucesso clínico na reabilitação protética com a utilização de implantes de titânio (Branemark *et al.*, 1977; Adell *et al.*, 1981). Entretanto, alguns fatores têm sido relacionados ao insucesso dos implantes osseointegráveis, como o estado de saúde geral, qualidade óssea, grau de trauma cirúrgico, tabagismo e contaminação bacteriana (Esposito *et al.*, 1998). Dentre estes, o consumo de cigarros tem recebido grande atenção por parte dos pesquisadores uma vez que afeta uma significativa parcela da população. Estudos têm relatado uma maior incidência de perda de implantes (Bain & Moy, 1993; Gorman *et al.*, 1994; De Bruyn & Collaert, 1994; Bain, 1996; Bain & Moy, 1997; Esposito *et al.*, 1998; Sennerby & Roos, 1998) e uma maior perda óssea ao redor dos implantes já osseointegrados em paciente fumantes quando comparados a não-fumantes (Haas *et al.*, 1996; Lindquist *et al.*, 1996). Estudos realizados pela área de periodontia da FOP/UNICAMP revelaram que alguns fenômenos observados histologicamente poderiam explicar, ao menos em parte, o pior desempenho dos implantes de titânio em pacientes fumantes. De maneira geral, observou-se um menor preenchimento ósseo das roscas e uma menor proporção de osso mineralizado na área fora das roscas nos animais que inalaram fumaça de cigarro (Nociti *et al.*, 2002a e b, César-Neto *et al.*, 2003).

Diante das evidências mostrando os prejuízos causados pelo consumo de cigarros sobre o desempenho clínico dos implantes de titânio, alguns estudos têm buscado alternativas para minimizar ou reverter este efeito. Bain (1996) testou a influência da interrupção temporária e definitiva do consumo de cigarro sobre as taxas de sucesso de implantes osteointegráveis. Foi estabelecido um protocolo de suspensão do consumo de cigarros no qual os pacientes foram encorajados a parar fumar por 1 semana antes e 8 semanas após a colocação dos implantes. Os resultados mostraram que o grupo de pacientes que seguiu o protocolo apresentou resultados semelhantes ao grupo de pacientes não fumantes. Resultados histológicos obtidos no laboratório da área de periodontia da FOP/UNICAMP concordaram com os achados de Bain (1996) mostrando que após a interrupção da inalação da fumaça de cigarro (definitiva ou temporária), o padrão ósseo ao

redor de implantes de titânio tornava-se semelhante ao observado em animais não expostos a fumaça de cigarro (César-Neto *et al.*, 2005 a e b). Resultados semelhantes são observados em estudos de diversas áreas da saúde os quais têm relatado que o impacto do fumo em alguns tecidos é transitório, ocorrendo sua reversão quando o consumo de cigarros é interrompido (Fielding, 1985, Tomar & Asma, 2000, Ward & Klesges, 2001, Smith *et al.*, 2003, César-Neto *et al.*, 2005c, César-Neto *et al.*, 2006b). Embora esta medida seja positiva, os índices de sucesso dos pacientes que buscam abandonar o tabagismo, os quais variam entre 30% e 40 % após 1 ano mesmo com acompanhamento especializado e uso de medicação, limitam a utilização clínica deste tipo de protocolo. Por outro lado, alguns estudos clínicos têm relatado taxas de sucesso semelhantes entre fumantes e não-fumantes quando implantes de superfície tratada são instalados nestes pacientes (Lambert *et al.*, 2000). Os resultados histológicos obtidos por Stefani *et al.* (2002) também sugeriram um benefício do uso de superfícies tratadas na presença de componentes do tabaco. Entretanto, mais estudos e com um período maior de acompanhamento são necessários para se estabelecer o real efeito do uso de implantes com superfície tratada em pacientes fumantes.

Portanto, a busca por alternativas viáveis que minimizem os efeitos do fumo sobre os implantes continua aberta. Sabendo da importância que o tecido ósseo ao redor dos implantes exerce sobre o desempenho dos mesmos e do efeito que a fumaça de cigarro tem sobre este tecido, a utilização de drogas que atuam estimulando a formação óssea merece ser investigada. O PTH é o maior controlador do metabolismo orgânico de cálcio e fosfato e organiza, por meio de remodelação óssea, o fluxo desses minerais nos ossos e rins. O PTH tem sido muito explorado, principalmente por suas propriedades no tratamento da osteoporose. Administrado de maneira contínua promove reabsorção óssea, porém, seu uso intermitente é altamente anabólico para o tecido ósseo (Cosman & Lindsay, 1998). Na área odontológica, estudos revelaram que a administração intermitente de PTH (1-34) diminuiu significativamente a perda óssea promovida pela periodontite induzida por ligaduras em ratos normais (Silva *et al.*, 2005) e em ratas ovariectomizadas (Marques *et al.*, 2005). Shiota *et al.* (2003) avaliaram o efeito do hormônio paratireoideano (1-34) no tecido ósseo após a colocação de implantes de titânio em tíbias de ratas ovariectomizadas. Seus achados

sugerem que a aplicação intermitente de PTH (1-34) pode prevenir a reabsorção óssea trabecular ao redor de implantes e aumentar o volume ósseo perdido após a ovariectomia.

Um estudo de Skripitz *et al.* (2005) mostrou que o PTH parece ter um efeito de formação óssea por agir na estimulação de osteoblastos. Também é considerado o mais efetivo quando comparado a outros inibidores de reabsorção óssea como o alendronato, residronato, etidronato e raloxifeno (Neer *et al.*, 2001). Relatou-se, ainda, que o PTH (1-34) não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley *et al.*, 1997; Mohan *et al.*, 2000; Neer *et al.*, 2001) ou qualquer efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes tratados com PTH (1-34) por 3 anos (Horwitz *et al.*, 2000).

Em vista da ausência de estudos em modelo animal que avaliem de maneira sistemática o efeito do PTH (1-34) na presença ou não dos componentes da fumaça de cigarro, o presente estudo tem como objetivo avaliar histometricamente a influência do PTH (1-34) sobre o reparo ósseo e osseointegração de implantes de titânio instalados em tíbias de ratas expostas ou não à fumaça de cigarro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPLANTES DENTAIS DE TITÂNIO

A partir dos estudos iniciados por Branemark *et al.* (1969) foram desenvolvidos os implantes de titânio, os quais se mostravam capazes de formar uma união resistente com o osso alveolar sem causar reações adversas nos tecidos ósseos e orais. Tal característica possibilitaria que os mesmos servissem de ancoragem para elementos protéticos colocados em função mastigatória. Algumas características inerentes ao titânio, como 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, foram descritas por Parr *et al.* (1985) como pontos essenciais que tornam o titânio o material de escolha para implantes dentais.

Em 1977 Branemark *et al.* apresentaram um estudo clínico longitudinal de 10 anos, onde relataram altas taxas de sucesso, alcançando 99% para os implantes instalados na mandíbula e 76% na maxila, mesmo após a instalação das próteses.

Adell *et al.* (1981) acompanharam 2768 implantes por um período de 15 anos, encontrando altas taxas de sucesso. Os implantes mandibulares obtiveram um índice de sucesso de 91%, enquanto na maxila esse índice foi de 81%. Em 89% dos casos, as próteses maxilares mantiveram-se estáveis, já as próteses mandibulares estiveram estáveis em 100% dos casos.

Devido à alta previsibilidade do sucesso dos implantes de titânio foram desenvolvidos estudos como o de Zarb & Schmitt (1990) que relataram 89% de sucesso de implantes sob próteses avaliados durante quatro e nove anos. Weyant (1994) relatou 96,1% de êxito em implantes num período de cinco anos. Lindquist *et al.* (1996), através de avaliações após 1, 10 e 15 anos do carregamento protético, demonstraram taxas de sucesso de 99,3%; 98,9% e 98,9%, respectivamente. Jones *et al.* (1999) relataram taxa de sucesso de 92,8% para implantes de titânio bem sucedidos antes da instalação da prótese e 95,3% após colocação da carga protética. Naert *et al.* (2000) encontraram uma taxa de sucesso de 93% após 11 anos de acompanhamento, enquanto Merckse-Stern *et al.* (2001) relataram

91,4 % para implantes em função após 10 anos de observação. E mais recentemente, Schwartz-Arad *et al.* (2002) demonstraram taxas de sucesso de 98% antes da instalação de próteses. Outros acompanhamentos clínicos confirmaram as altas porcentagens de estabilidade em curto e longo prazo, variando de 89% a 98,9%, por períodos que se estenderam de três a quinze anos (Lindquist *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 1999, Van Steenberghe *et al.*, 2003).

2.2 ETIOLOGIA DO INSUCESSO DOS IMPLANTES DENTAIS

Apesar de inúmeros trabalhos demonstrarem taxas de sucesso acima de 90% para os implantes dentais, uma porcentagem de insucesso ainda persiste. Em virtude de tal fato, estudos vêm sendo desenvolvidos, objetivando esclarecer os motivos para o fracasso de um implante. Diversos fatores têm sido relacionados com as falhas dos implantes osseointegráveis. Esposito *et al.* (1998) classificaram esses fatores como: exógenos, que podem estar relacionados tanto à experiência e técnica do operador, como a biocompatibilidade do material, características superficiais e desenho do implante; endógenos locais, que se relacionam à quantidade e qualidade óssea, localização anatômica e presença de enxertos no leito receptor; e endógenos sistêmicos, que dizem respeito à idade, genética, estado de saúde e hábitos do paciente. No início dos estudos em implantodontia, as falhas foram muito relacionadas ao biomaterial empregado. Entretanto, os materiais mais utilizados atualmente para a confecção de implantes dentais (Ti c.p., Ti6Al4V, HA e Al2O3) mostram grande biocompatibilidade e não apresentam esse tipo de problema (Esposito *et al.*, 1998).

Quanto ao ato operatório, a experiência e a habilidade do operador têm demonstrado influenciar o resultado da terapia. Morris *et al.*, em 1997, relataram que a falha precoce de implantes (antes da instalação de prótese) pode ser duas vezes maior para profissionais com experiência de colocação inferior a cinquenta implantes. Lambert *et al.* (1997), analisando a curva de aprendizado para a colocação de implantes, observaram que a taxa de falha precoce nos nove primeiros implantes era duas vezes maior que nos colocados após este período de treinamento.

Ainda no que se refere ao ato operatório, estudos têm demonstrado que a técnica utilizada, a contaminação bacteriana e o trauma cirúrgico (calor e torque excessivo) podem gerar prejuízos na reparação óssea ao redor de implantes dentais. Smith *et al.* (1992) sugeriram que a colocação de múltiplos implantes requer um maior tempo operatório, o que poderia ocasionar a contaminação bacteriana e conseqüente diminuição dos índices de sucesso, em virtude da correlação positiva encontrada entre o número de implantes colocados e o risco de falhas. Quanto ao trauma cirúrgico, uma zona de osso necrótico circundando o implante pode ser formada, sendo que a extensão dessa zona está diretamente relacionada com o grau de injúria promovido pelo operador. Para que haja a reparação óssea, primeiramente ocorre a reabsorção dessa porção necrótica, podendo resultar em uma menor proporção de contato osso-implante (Iver *et al.*, 1997; Eriksson *et al.*, 1982).

A anatomia e a qualidade óssea do sítio receptor constituem dois dos principais fatores locais relacionados às falhas de implantes. Altas taxas de insucesso (37%) foram encontradas por Jaffin & Berman (1991) para implantes colocados em osso tipo IV, enquanto apenas 3% dos implantes colocados em ossos dos tipos I, II e III falharam. Corroborando com esses achados, Friberg (1994), por meio de estudo retrospectivo, avaliou mais de 4000 implantes, concluindo que mandíbulas com pobre qualidade óssea apresentam risco para a estabilidade inicial do implante, podendo conferir maior insucesso aos implantes. As maiores taxas de falhas têm sido relatadas para o segmento posterior da maxila e mandíbula, o que pode ser parcialmente explicado pela qualidade óssea e forças oclusais que essas regiões recebem (Esposito *et al.*, 1998). Existem indícios de que algumas condições sistêmicas podem influenciar os resultados da terapia com implantes. O estado nutricional e algumas doenças como as osteometabólicas, reumatológicas, hormonais, líquen plano, alterações de neutrófilos e alterações imunológicas parecem influenciar no resultado dos implantes (Adell, 1992). Segundo Roberts *et al.* (1992), as desordens osteometabólicas que apresentam potencial para afetar pacientes implantados incluem a osteodistrofia renal, osteomalácia, doença de Paget e osteoporose, pois resultam em estrutura óssea desfavorável para a inserção de implantes.

Apesar de Weyant (1994) não ter observado uma correlação negativa entre a sobrevida dos implantes em pacientes com diabetes que recebiam estrógeno e que estavam em tratamento com corticoesteróides, é consenso que um estado de saúde geral comprometido tem um impacto negativo na sobrevida dos implantes (Proceedings of the World Workshop in Periodontics, 1996).

O tabagismo tem sido conhecido com um fator pré-disponente para o insucesso de implantes dentais (Van Steenberghe *et al.* 2002; Schwartz-Arad *et al.* 2002). Jones & Triplett (1992) verificaram baixa taxa de reparo ósseo em implantes associados a enxertos em fumantes. A taxa de sobrevivência de implantes varia de 80 a 100% em fumantes e de 93 a 98% em não fumantes (De Bruyn & Collaert 1994; Lindquist *et al.* 1996; Jones *et al.* 1999; Lambert & Morris 2000; Schwartz-Arad *et al.* 2002; Chuang *et al.* 2002; McDermott *et al.* 2003; Moy *et al.* 2005).

Estudos têm demonstrado que os pacientes fumantes apresentam um maior índice de insucesso nas reabilitações com implantes (Bain & Moy, 1993; Wallace, 2000; Rocci *et al.* 2003) e que estes apresentam maior perda óssea ao redor dos implantes já osseointegrados (Haas *et al.*, 1996; Lindquist *et al.*, 1997). Além disso, os pacientes fumantes apresentaram menor grau de sucesso em implantes colocados em seios maxilares que receberam enxertos (Kan *et al.*, 1999).

Lindquist *et al.* (1996, 1997) avaliaram a taxa de sucesso dos implantes em função após 25 anos. Os autores encontraram taxa de sucesso 98,9%. O tabagismo foi o principal fator de perda óssea marginal, em especial quando associado à má higiene bucal, e principalmente em dentes anteriores. Pacientes fumantes com má higiene bucal perderam em média três vezes mais osso marginal que não fumantes após 10 anos, num padrão dose-dependente.

Jones *et al.* (1997) compararam as falhas precoces de implantes recobertos por plasma-spray de titânio ou hidroxiapatita e perceberam que 9% dos pacientes não fumantes apresentaram insucesso, contra 26% dos pacientes fumantes. Os autores concluíram que o histórico de consumo de cigarros exerce um papel importante nas falhas precoces dos implantes, independente de suas características superficiais.

Alsaadi *et al.* (2007), num estudo retrospectivo, verificaram a influência de fatores locais e sistêmicos sobre a taxa de insucesso de implantes. Incluíram no estudo 2004 pacientes com um total de 6946 implantes do sistema Branemark. A taxa global de falha foi de 3,6% e fatores como o tabagismo, osteoporose, doença de Crohn foram associados à falha precoce dos implantes. Mais uma vez, Alsaadi *et al* (2008) avaliaram a influência de fatores sistêmicos e locais sobre a taxa de insucesso de implantes. No entanto, foram utilizados implantes TiUnite (superfície tratada por oxidação eletroquímica). Foram incluídos no estudo, 283 pacientes que receberam um total de 720 implantes TiUnite. Verificou-se uma taxa global de falha de 1,9% e houve uma maior tendência de falhas diante de lesões apicais, tabagismo, terapia de reposição hormonal, problemas gástricos, doença de Crohn, diabetes mellitus tipo 1 e esterectomia radical.

Sverzut *et al.*, (2008), em uma avaliação retrospectiva da taxa de perda precoce de 1628 implantes inseridos em pacientes fumantes e não fumantes, observaram que o uso do tabaco levou a uma perda de 3.32% dos implantes instalados comparado a 2.81% em pacientes não fumantes.

2.3 INFLUÊNCIA DA FUMAÇA DE CIGARROS E SEUS COMPONENTES

Em 1993 Broulik & Jarab estudaram a influência da nicotina sobre a concentração óssea mineral em ratos, onde foram incluídos 32 animais divididos em 4 grupos iguais e submetidos ao seguinte tratamento: A - controle, B - nicotina, C - castração e D - castração e nicotina. Após 56 dias, os animais foram sacrificados e o fêmur analisado. Os resultados revelaram que os animais dos grupos B e D apresentaram uma significativa redução na densidade óssea e no componente ósseo mineral, quando comparados aos outros grupos.

Ueng *et al.*, 1997 estudaram o efeito da fumaça de cigarro sobre o reparo ósseo de tíbias de coelhos submetidas a um procedimento cirúrgico de distração osteogênica. Foram utilizados 38 animais divididos em grupo teste (fumaça de cigarro) e controle. A tíbia direita de cada animal foi alongada 5,0mm. Foram sacrificados 5 animais de cada grupo 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias para os testes de resistência mecânica, e 1 animal de

cada grupo foi sacrificado 2, 4, 6 e 8 semanas pós-operatórias, para as análises histológicas de reparo ósseo. Os resultados demonstraram que os animais submetidos à fumaça de cigarro obtiveram menor resistência no teste mecânico e que, histologicamente, a reabsorção do tecido de granulação, formação óssea e remodelação foram prejudicadas.

Num estudo seguinte, Ueng *et al.*, 1999 foi avaliado o efeito da fumaça de cigarro sobre a densidade óssea mineral em coelhos após um procedimento cirúrgico de distração osteogênica da tíbia. Foram utilizados 12 coelhos divididos em grupo teste (fumaça de cigarro) e controle e sacrificados 6 semanas após a realização das cirurgias. Os resultados mostraram que a fumaça de cigarro diminuiu a resistência à torção e a densidade mineral. Hollinger *et al.*, 1999 avaliaram o efeito da nicotina sobre o reparo ósseo em ratos que receberam enxerto ósseo autólogo. Para isso, foram criados defeitos bilaterais (4,0mm de diâmetro) na região parietal de 60 animais, nos quais o lado esquerdo servia como leito doador e era deixado cicatrizar espontaneamente, e o lado direito recebia o enxerto. Parte da amostra recebeu nicotina em 3 concentrações distintas (12,5mg/ml, 25mg/ml e 50mg/ml) e foi comparada com animais que não receberam nicotina. Os resultados revelaram que não houve diferença no reparo ósseo dos defeitos que receberam enxerto autólogo, entretanto a nicotina influenciou negativamente o reparo dos leitos doadores. Também em 1999, Fung *et al.* investigaram o efeito da nicotina sobre o osso e os hormônios calcitrópicos de ratas adultas velhas. Foram utilizados no experimento 30 animais divididos em 3 grupos: A – solução salina fisiológica, B – nicotina numa dosagem de 3mg/Kg/dia através de bomba osmótica (n=10) e C – nicotina numa dosagem de 4,5mg/Kg/dia através de bomba osmótica (n=11). Após 3 meses de administração de nicotina, os ratos do grupo C mostraram uma menor área vertebral, menor densidade mineral e uma taxa de aposição óssea endocortical mais baixa quando comparados aos do grupo A. Nociti *et al.* (2000) analisaram o papel da nicotina na progressão da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Para isso, foram utilizados 20 ratos divididos em 4 grupos, 1 controle e 3 testes que receberam as seguintes concentrações de nicotina por ml de solução fisiológica: 0,13µl, 0,19µl e 0,26µl. Concluiu-se que a nicotina potencializou a progressão da doença periodontal num padrão não dose-dependente.

Num estudo subsequente realizados pelo mesmo grupo de pesquisadores, Nociti *et al.* (2002 a) utilizaram a mesma metodologia para avaliar a influência de outras dosagens de nicotina na progressão da doença periodontal em ratos (0,37; 0,57 e 0,73 mg de nicotina/Kg). Os resultados desse estudo mostraram um efeito dose-dependente da nicotina sobre a progressão da doença periodontal e também observou-se que a nicotina parece ter uma ação deletéria direta sobre os tecidos periodontais. Além disso, a fumaça de cigarros interfere negativamente no reparo e densidade óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos analisadas histometricamente (Nociti *et al.*, 2002 a e b) e que a nicotina é responsável por parte deste efeito (César-Neto *et al.*, 2003). Estudos radiográficos (César-Neto *et al.*, 2005 a e b) e histológico (César-Neto *et al.*, 2006) mostraram que além de influenciar negativamente o reparo ósseo, a fumaça de cigarro também promove uma diminuição na densidade do tecido ósseo que não sofreu nem um tipo de lesão e está em função normal, e que esse efeito é revertido com a interrupção da exposição à fumaça. A reversibilidade dos efeitos da fumaça de cigarro foi também observada no tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em tíbias de ratos (César-Neto *et al.*, 2005 c e d).

Apesar de todas as evidências, a influência da nicotina no reparo ósseo continua controversa. Zheng *et al.* (2008) avaliaram os efeitos da nicotina na perfusão sanguínea, angiogênese e formação óssea de coelhos durante o procedimento de distração osteogênica. A perfusão sanguínea foi avaliada através do monitoramento do Laser Doppler e imunohistoquímica e a formação óssea foi avaliada por exames radiológico, histológico e imunohistoquímico. Os resultados mostraram que a exposição à nicotina aumentou a densidade dos micro-capilares, mas diminuiu o fluxo sanguíneo e a formação óssea. Sendo assim, os autores concluíram que a nicotina compromete a regeneração óssea possivelmente por causar isquemia e pelo efeito inibitório direto nas células osteoblásticas. A exposição à nicotina aumenta a angiogênese, mas não consegue compensar o efeito adverso na vasoconstrição.

O número de evidências investigando os mecanismos pelos quais o tabagismo interfere sobre o reparo ósseo é limitado e, além disso, mais estudos são necessários para uma melhor compreensão destes fenômenos, uma vez que outros genes podem estar

envolvidos neste processo e outras substâncias presentes na fumaça do cigarro, além da nicotina, podem interferir em sua ação como um todo.

2.4 PTH (1-34): FISIOLOGIA E MECANISMO DE AÇÃO

O PTH (paratormônio) é um hormônio protéico sintetizado pelas paratireóides com 84 aminoácidos em sua forma final. Após sua síntese, este permanece armazenado em vesículas de secreção e pode sofrer metabolização intracelular, sendo que os fragmentos amino-terminais são degradados e os fragmentos carboxi-terminais de tamanhos variados são liberados para a circulação, juntamente com a forma ativa (1-84). A ação do PTH se faz diretamente sobre o osso e o rim e, indiretamente, sobre o intestino, elevando o fluxo de cálcio para a circulação. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem através de um receptor de membrana acoplada à proteína G, que compartilha com o *PTH related protein* (PTHrp), denominado receptor PTH/PTHrp tipo I ou PRPI (1)(Usdin *et al.*,1999). Com sequência e estrutura molecular muito semelhantes ao PTH em sua porção amino-terminal, o PTHrp se liga ao mesmo receptor do PTH, na cartilagem, no osso e no rim. O PTHrp possui ações endócrinas especialmente durante a vida fetal, quando é responsável pela manutenção dos níveis de cálcio do feto. Após o nascimento, as paratireóides iniciam a síntese de PTH e este assume o controle sobre a calcemia. A produção do PTHrp é mantida em diversos tecidos normais, tais como epitélios, tecidos mesenquimais, glândulas endócrinas e tecido nervoso central, demonstrando funções biológicas próprias (Strewler,2000).

Desde 2002 a terapia anabólica da teriparatida tem sido indicada como droga para pacientes que apresentam osteoporose e alto risco de fraturas vertebrais (MacDonald & Peters, 1986; Dempster *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995; Ejersted *et al.*, 1995). Esta ação anabólica se deve ao aumento do número de osteoblastos que parece ser decorrente de uma resposta dos osteoblastos maduros ao tratamento com o PTH em locais de remodelação óssea (Swarthout *et al.*, 2002), da diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea, da ativação dos osteoblastos de revestimento (Dobnig & Turner, 1995) ou ainda, do estímulo da proliferação de osteoblastos maduros (Partridge

et al., 1985). As mais variadas pesquisas indicam o PTH como uma molécula solúvel capaz de sintetizar colágeno (Jilka *et al.*, 1999) e formar um tecido ósseo histologicamente normal e biomecanicamente forte (Whitfield *et al.*, 1999) vêm sendo amplamente preconizadas tanto por estudos clínicos em animais (Hock *et al.*, 1988; Hori *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1999; Kimmel *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1995; Brommage *et al.*, 1999; Jilka *et al.*, 1999) quanto em humanos (Reeve *et al.*, 1980; Slovik *et al.*, 1986; Dempster *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 1999; Dempster *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2001) estabelecendo-se, deste modo, uma atividade anabólica para o PTH no metabolismo do esqueleto (Dempster *et al.*, 1993).

Existem relatos que relacionam a ação anabólica do PTH a uma possível manutenção dos osteoblastos pela inibição da sua apoptose (morte celular programada) (Hock, 1988), uma vez que este fato parece ser o destino da maioria destas células (Jilka *et al.*, 1998), considerando-se que 50 – 70% dos osteoblastos entram em apoptose e apenas a minoria se transforma em osteócitos ou células de revestimento ósseo (Hill *et al.*, 1997). Após administração de 25 µg de hPTH (1-34) subcutâneo diariamente, ou seja, intermitentemente, durante 3 anos em mulheres menopausadas com osteoporose e recebendo terapia de reposição hormonal, Lindsay *et al.*, (1997) obtiveram aumentos significativos de massa óssea vertebral e menor incidência a novas fraturas. Neer *et al.*, em 2001, em um trabalho realizado com 1.637 mulheres pós-menopausadas com fraturas vertebrais prévias, encontraram resultados também muito significativos no emprego do PTH subcutâneo intermitentemente como forma de tratamento no aumento de massa óssea e na redução aos riscos de fratura óssea. Tais resultados consagraram injeções subcutâneas diárias deste peptídeo como realidade terapêutica anabólica para o tecido ósseo (Vieira, 2002).

Em relação ao mecanismo de ação do PTH (1-34), acredita-se que ele age no osteoblasto por intermédio de um único receptor transmembrana, o PTH1R (Abou-Samra *et al.*, 1992), que está caracteristicamente acoplado a proteínas ligantes de guanosina trifosfato (proteínas G) (Swarthout *et al.*, 2001; Jilka *et al.*, 2007), desencadeando uma série de reações em cascata capazes de causar alterações na estrutura e função de proteínas alvo, relacionados à reabsorção ou à formação óssea (Parfitt, 1976). O PTH1R é um receptor

acoplado a proteína G(GPCR) ou classe II ou receptor da família B (Kolakowski, 1994 *apud* Mannstad *et al.*, 1999).

A ativação dos osteoblastos pelo PTH (1-34) resulta na expressão de genes importantes para a degradação da matriz, a produção de fatores de crescimento e a estimulação dos osteoclastos. Seus efeitos biológicos conhecidos se fazem por meio de um receptor de membrana acoplado à proteína G que estimula a adenil-ciclase elevando as concentrações de AMPc e o sistema da proteína-quinase A (PKA), enquanto que o receptor acoplado à proteína Gq ativa a fosfolipase C, a proteína-quinase C (PKC) e o metabolismo dos inositóis-fosfatos (Goltzman D.,1999). O equilíbrio entre esses dois sistemas permite o efeito biológico global do PTH e a via da Ac/AMPc/PKA que ativa o sistema da PKC tem se mostrado importante para a função osteoblástica quando o PTH (1-34) é fornecido de maneira intermitente. Isso sugere que o sistema da PKC participa da transcrição protéica associada ao aumento da massa óssea com PTH (1-34) intermitente (Goltzman D.,1999; Kousteni & Bilezikian, 2008).

De forma geral, o PTH (1-34) induz a expressão de genes relacionados a fatores de crescimento como IGF-1, IGF-2, TGF- β (*transforming growth factor beta*). Além do que, o PTH (1-34) induz a produção de IGF *binding protein* (IGFBP), como IGFBP-1, -3, -4 e -5 (Goltzman D.,1999; Rosen CJ & Rackoff PJ.,2001). Esses fatores de crescimento agem recrutando células pré-osteoblásticas, derivadas das células estromais da medula óssea, e induzem a diferenciação e maturação destas em osteoblastos maduros, capazes de sintetizar colágeno em grande quantidade (Goltzman D.,1999).

2.5 PTH (1-34): ESTUDOS EM ANIMAIS

Skripitz *et al.*, 2000 avaliaram a formação do calo ósseo ao redor de uma câmara de titânio inserida em tíbia de ratas. Após a cirurgia os animais receberam aplicações de PTH (1-34) nas dosagens de 15, 60 e 240 μ g/Kg/dia por um período de 42 dias. De acordo com os resultados deste estudo os autores concluíram que o PTH (1-34) aumentou a densidade óssea medular em 90%,132% e 173% conforme a dose de aplicação.

Os autores sugerem que um efeito benéfico é possível mesmo nos grupos que receberam baixas doses.

Posteriormente, Skriptz *et al.*, 2001, estudaram a estabilidade de união entre uma placa ortopédica de titânio e o tecido ósseo inserida na tíbia esquerda de 20 ratos machos divididos em dois grupos, um que recebeu 60µg/ kg de PTH (1-34) e outro, uma solução placebo aplicada diariamente por um período de 4 semanas. Foi realizado um teste de tensão de união osso-implante e os autores concluíram que o PTH (1-34) tem a capacidade de aumentar em mais que o dobro a força de união osso-implante.

Shirota *et al.*, 2003 avaliaram os efeitos sobre o tecido ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratas ovariectomizadas. Os animais foram divididos em três grupos e após 30 dias da cirurgia de colocação dos implantes iniciou-se a aplicação de 30µg/Kg de PTH (1-34) três vezes por semana. Nos dias 7, 14, 28 e 56 seis ratas por grupo foram mortas e feitas às avaliações histométricas. Os resultados demonstraram que o volume da densidade óssea só foi alterado após o 28º dia de aplicação do PTH (1-34) e que esta medicação não só previne a reabsorção óssea como também pode trazer um volume adicional de osso em ratas ovariectomizadas.

Iida-Klein *et al.*, 2007 avaliaram as formas de aplicação diária e cíclica do PTH (1-34) por um período de 4 semanas. Os animais foram divididos em 3 grupos.: injeções diárias de veículo , injeções diárias de PTH (1-34) e um regime onde foi alternada a aplicação do PTH (1-34) e veículo, por um período de 7 semanas. Os autores observaram, por meio de histometria da coluna vertebral e fêmur, que os regimes diário e cíclico melhoraram a microarquitetura tanto do osso cortical quanto do medular.

Jung *et al.*, 2007 utilizaram o PTH (1-34) em defeitos ósseos ao redor de implantes. Foram utilizados seis cães que receberam um total de 48 implantes cilíndricos que foram instalados 7 meses após a extração dental. Durante a instalação dos implantes foi confeccionado um gap entre o implante e o tecido ósseo de 1,5 mm. Os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: (1) animais que receberam uma matriz de polietileno mais 20µg/Ml de PTH (1-34) , (2) animais que receberam somente a matriz de polietileno, (3) animais que receberam apenas osso autógeno e (4) animais que não receberam nada. Os resultados demonstraram que após avaliações de 4 e 12 semanas não

houve diferença estatística entre os grupos que receberam PTH (1-34) e o grupo que recebeu osso autógeno, demonstrando assim a possível utilização do PTH (1-34) nos processos de regeneração óssea.

Ohkawa *et al.*, 2008 utilizou implantes tratados com hidroxiapatita em ratas ovariectomizadas e que receberam aplicação intermitente de PTH (1-34). Foram avaliadas quanto a fixação dos implantes inseridos nas tíbias dos animais e o volume ósseo formado ao redor dos implantes em dois tempos de avaliação de 2 e 4 semanas. Os resultados demonstraram resistência de tração superior no grupo que recebeu implante mais PTH (1-34), porém não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao volume ósseo formado ao redor do implante para todos os tempos avaliados. Os autores sugerem que o PTH (1-34) pode ser favorável na fixação inicial de implantes com hidroxiapatita em pacientes com osteoporose.

Recentemente, Skripitz *et al.* (2009) compararam os efeitos sobre a formação óssea ao redor de um prisma de polimetilmetacrilato inserido em tíbias de 36 ratas ovariectomizadas que receberam alendronato e PTH (1-34) por um período de 2 semanas. Após avaliação histométrica os autores observaram que os animais que receberam PTH (1-34) apresentaram maior densidade óssea e maior contato osso implante quando comparado ao grupo que recebeu alendronato e placebo.

Mair *et al.*, 2009, em um estudo em ratas, relacionaram a idade dos animais, 8 meses e 2 meses de vida, com os efeitos anabólicos do PTH (1-34). Foram colocados implantes de titânio na tíbia das ratas e logo após a cirurgia os animais começaram a receber a aplicação de 60µg/Kg 3 vezes por semana por 4 semanas ou aplicação de injeções de veículo no mesmo volume. Após 4 semanas os animais foram sacrificados e as amostras enviadas para avaliação histológica, onde os autores observaram que a terapia com PTH (1-34) parece ser mais eficaz na ósseo integração em ratas adultas quando comparadas as ratas jovens, levando a crer na possível influência da idade no desenvolvimento de terapias farmacológicas para melhorar o processo de ósseo integração.

2.6 UTILIZAÇÃO CLÍNICA DO PTH (1-34)

Estudos clínicos foram realizados para avaliar a eficácia do PTH (1-34) na redução de fraturas e sua ação na densidade óssea mineral. Neer *et al.*, 2001 avaliaram o efeito do PTH (1-34) em 1.637 mulheres com menopausa e fraturas vertebrais sobre a densidade óssea mineral. Foi administrada uma dose que variou entre 20 e 40µg/dia nos grupos teste e apenas o veículo para dissolução da droga para o grupo controle, por um período de 18 meses. Os resultados mostraram, no exame da densidade óssea mineral, que os tratamentos com PTH (1-34) foi capaz de aumentar a densidade óssea em média 9% e 13% e reduziu o risco de fraturas vertebrais em 65% e 69%.

Em 1999, Lindsay *et al.* estudaram o efeito clínico do PTH (1-34) 25µg/dia em 17 mulheres que estavam fazendo reposição hormonal comparado com mulheres que faziam apenas reposição hormonal. Os autores observaram que as mulheres que receberam a terapia hormonal mais o PTH (1-34) apresentaram uma maior densidade óssea mineral quando comparado ao grupo sem PTH (1-34) e observaram uma redução significativa da incidência de fraturas vertebrais.

Posteriormente, Cosman *et al.* em 2001 avaliaram 280 pacientes com osteoporose que estavam fazendo terapia de reposição estrogênica por pelo menos 1 ano. Os autores associaram a esta terapia o uso do PTH (1-34) 25µg/dia a um grupo de 140 pacientes. Os resultados demonstram que houve um aumento na densidade óssea mineral e diminuição significativa do risco de fraturas vertebrais no grupo PTH (1-34) após 36 meses de terapia. Desta forma, observaram que o incremento da densidade óssea nos diferentes locais estudados não seria transitório e sim prolongado.

Em 2004, Ettinger *et al.* avaliaram os efeitos do PTH (1-34) 20µg/dia em pacientes que faziam uso do alendronato ou raloxifeno por um período de avaliação de 18 a 36 meses. Os resultados deste estudo demonstraram que as pacientes que fizeram uso do raloxifeno prévio ao PTH (1-34) obtiveram maiores valores de densidade óssea mineral quando comparadas às pacientes que fizeram uso do alendronato prévio ao PTH (1-34).

Bauer *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a relação entre as mudanças celulares antes e após a terapia com PTH (1-34) em pacientes que já

faziam o uso de alendronato, além de mudanças na densidade óssea mineral. Os pacientes foram divididos em três grupos os que faziam uso somente do alendronato, grupo que só recebeu PTH (1-34) e grupo placebo. De acordo com os resultados deste estudo os autores observaram um aumento dos marcadores de colágeno tipo I com uma maior densidade óssea mineral no grupo que recebeu PTH (1-34) após avaliação de 1 ano.

Recentemente, File Deal (2009) em um artigo de revisão sobre o uso clínico do PTH (1-34), os autores demonstraram que esta terapia anabólica é capaz de aumentar a densidade óssea e reduz o risco de fraturas vertebrais e não vertebrais. Para estes autores o PTH (1-34) parece ser superior no tratamento de osteoporose induzida pelo uso de glicocorticóide.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo do presente estudo foi avaliar histometricamente a influência do PTH sintético (1-34) sobre o reparo ósseo de implantes de titânio instalados em tíbias de ratas expostas ou não à fumaça de cigarro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA

Foram utilizadas 65 ratas adultas, da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com idade de 12 semanas e peso aproximado de 250g e 300g, provenientes do Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB-UNICAMP).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), em gaiolas plásticas (5 animais/gaiola) e com acesso à comida (ração Purina – Nuvilab CR-1autoclavável; Nuvital, SP, Brasil) e água *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de 5 dias para aclimação ao biotério de experimentação, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais, em sala climatizada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), e com ciclo claro/escuro de 12/12 h, estáveis durante todo o período do estudo. Todos os procedimentos foram aprovados e executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (CEEa-IB-UNICAMP), sob o protocolo nº 1261-1 (anexo).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para realização do estudo, adotou-se um desenho experimental paralelo, em que 65 ratas foram aleatoriamente divididas em 4 grupos de acordo com o tratamento estabelecido no início do experimento (Figura 1):

Grupo 1 (n=15): animais receberam injeção subcutânea, na região dorsal, de 10 ml de água de injeção. As injeções foram aplicadas três vezes por semana, entre 8 e 10 horas da manhã, durante 60 dias após a instalação do implante.

Grupo 2 (n=16): animais foram expostos à fumaça de cigarro (IFC) por 60 dias no pré-operatório e sessenta dias após a instalação do implante. Além disso, receberam

aplicação de 10 mL de água de injeção. As injeções foram aplicadas três vezes por semana, entre 8 e 10 horas da manhã, durante 60 dias após a instalação do implante.

Grupo 3 (n=17): animais expostos à fumaça de cigarro (IFC) por 60 dias no pré-operatório e sessenta dias no período após a instalação do implante. Adicionalmente, injeções intermitentes subcutâneas de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) diluído em água, de injeção foram administradas três vezes por semana, entre 8 e 10 horas da manhã, durante 60 dias após a instalação dos implantes (Barros *et al.*, 2003, Lida-Klein *et al.*, 2002).

Grupo 4 (n=13): animais que receberam apenas injeções intermitentes subcutâneas de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana durante 60 dias, entre 8 e 10 horas da manhã, após a instalação dos implantes (Barros *et al.*, 2003, Lida-Klein *et al.*, 2002).

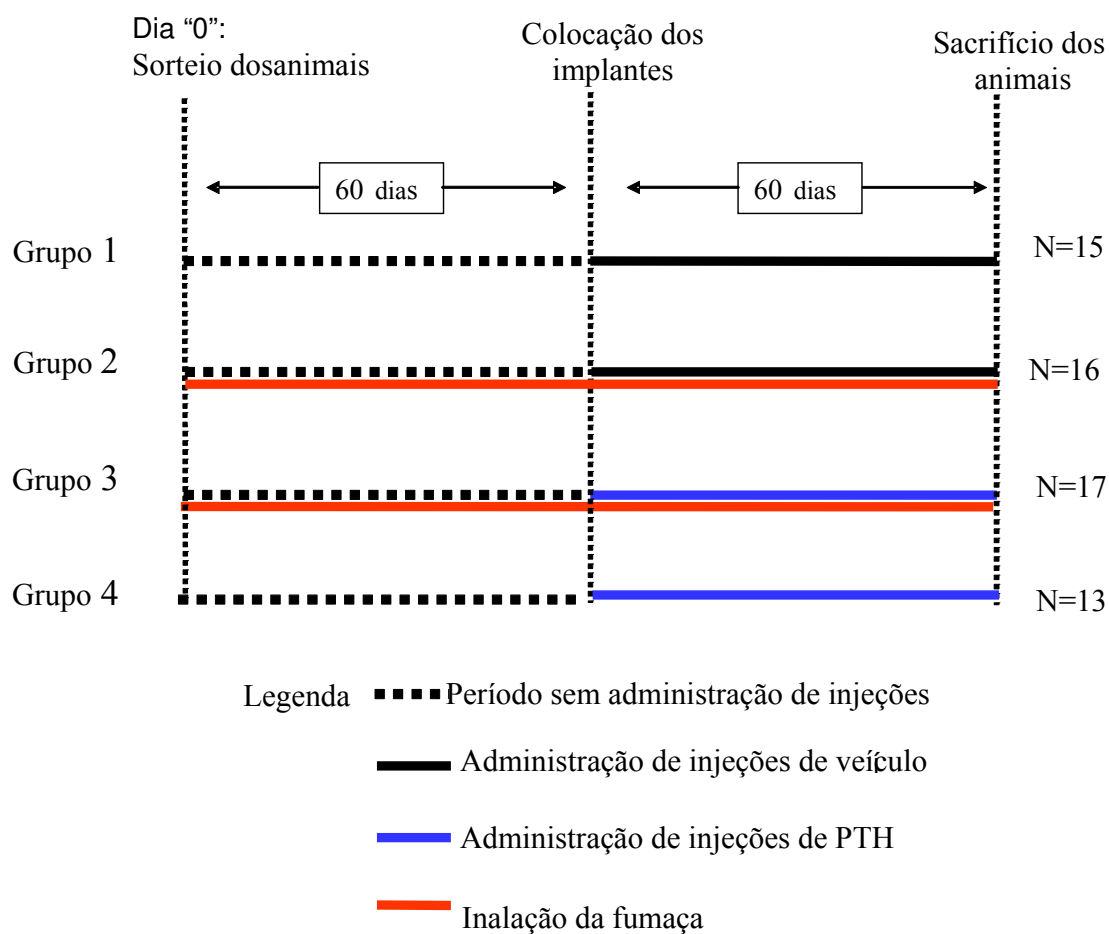


Figura 1- Representação esquemática do desenho experimental.

4.3 METODOLOGIA DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA

A metodologia utilizada para a exposição dos animais à fumaça foi descrita inicialmente por Le Mesurier *et al.* (1983), sendo modificada posteriormente por Cendon-Filha, 1997 e Nociti *et al.* (2002 a,b). Num recipiente de acrílico (45X25X20cm) composto por duas câmaras interligadas por um orifício são acondicionados os animais (grupos de 5) e armazenados cigarros acesos (Figura 2). Na parte anterior, onde são colocados os cigarros é bombeado ar, formando uma corrente que leva a fumaça para a parte posterior da câmara,

onde ficam os animais. Os animais são expostos à fumaça de 10 cigarros com concentração de 1,3 mg de nicotina, 16,5 mg de alcatrão e 15,2 mg de monóxido de carbono por três períodos diários de 8 minutos. Inicialmente os animais passam por um período de adaptação de 2 dias. No primeiro dia estes ficaram expostos por períodos de 5 minutos, no segundo dia de 7 minutos e a partir do terceiro dia os animais são expostos em 3 períodos diários de 8 minutos. Na segunda câmara existe outro orifício que dá vazão ao ar bombeado.

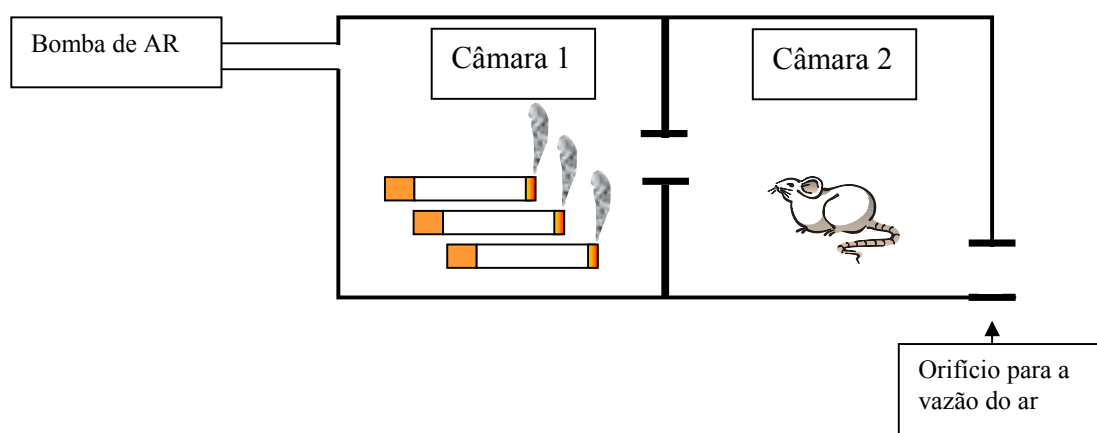


Figura 2- Desenho esquemático representando o mecanismo de exposição à fumaça.

4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Foram utilizados 65 implantes de titânio comercialmente puro, de superfície tratada com óxido de alumínio, do tipo osseointegrável, rosqueável, com 4,0mm de comprimento por 2,2mm de diâmetro (Titanium Fix®, AS Technology Ltda, São José dos Campos, SP, Brasil). Inicialmente, os animais foram anestesiados de acordo com o peso corpóreo, por meio de injeção intramuscular de solução de ketamina (50mg/kg) (Francotar®; Virbac do Brasil indústria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xilasina (15mg/kg) (Virbaxil®; Virbac do Brasil Indústria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil).

Foram realizadas tricotomia e anti-sepsia local das tíbias com solução iodada (Riodeine Tópico; Indústria Farmacêutica Rioquímica LTDA., São José do Rio Preto, SP, Brasil). A colocação dos implantes foi realizada de acordo com protocolo preestabelecido por Nociti *et al.* (2002). Com uma lâmina de bisturi número 15, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm localizada 8 mm abaixo da região do joelho do animal, proporcionando livre acesso à superfície óssea da tíbia. Sob irrigação constante com solução salina estéril, com auxílio de motor elétrico, contra-ângulo redutor 16:1 (1000 rpm) e broca tipo lança, foi preparado um leito bicortical na tíbia dos animais. Os leitos apresentavam dimensão final de 2 mm de diâmetro. Os implantes foram posicionados e rosqueados manualmente até que estivessem completamente introduzidos nas corticais (Figura 3). Finalmente, os tecidos foram reposicionados e suturados com pontos interrompidos de fio de mononylon 4-0 (Ethicon®, Johnsons do Brasil AS, São José dos Campos, SP, Brasil).

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de antibiótico via intramuscular (1 ml/Kg) (Pentabiótico; Whitehall LTDA, São Paulo, S.P., Brasil). Nenhuma restrição de movimentação ou alimentação foi feita aos animais após a cirurgia, os quais foram mantidos em gaiolas durante todo o período experimental.

4.5 APLICAÇÃO DA MEDICAÇÃO

A medicação utilizada foi a forma comercial do PTH sintético (1-34) conhecida como Forteo® (Teriparatida derivada de ADN recombinante-Eli Lilly do Brasil Ltda), droga liberada no Brasil pela ANVISA em 2003. A aplicação da medicação foi iniciada 24 horas após o procedimento cirúrgico, de forma subcutânea três vezes por semana (intermitente) sempre entre 8 e 10 horas da manhã (Iida-Klein *et al.*, 2002).

Os animais foram pesados semanalmente para ajuste da diluição da medicação, onde 40µg / Kg eram diluídos em 1 ml de água de injeção e aplicados no animal. Vinte e quatro horas antes do sacrifício os animais receberam a última dose de PTH sintético (1-34) (Iida-Klein *et al.*, 2002).

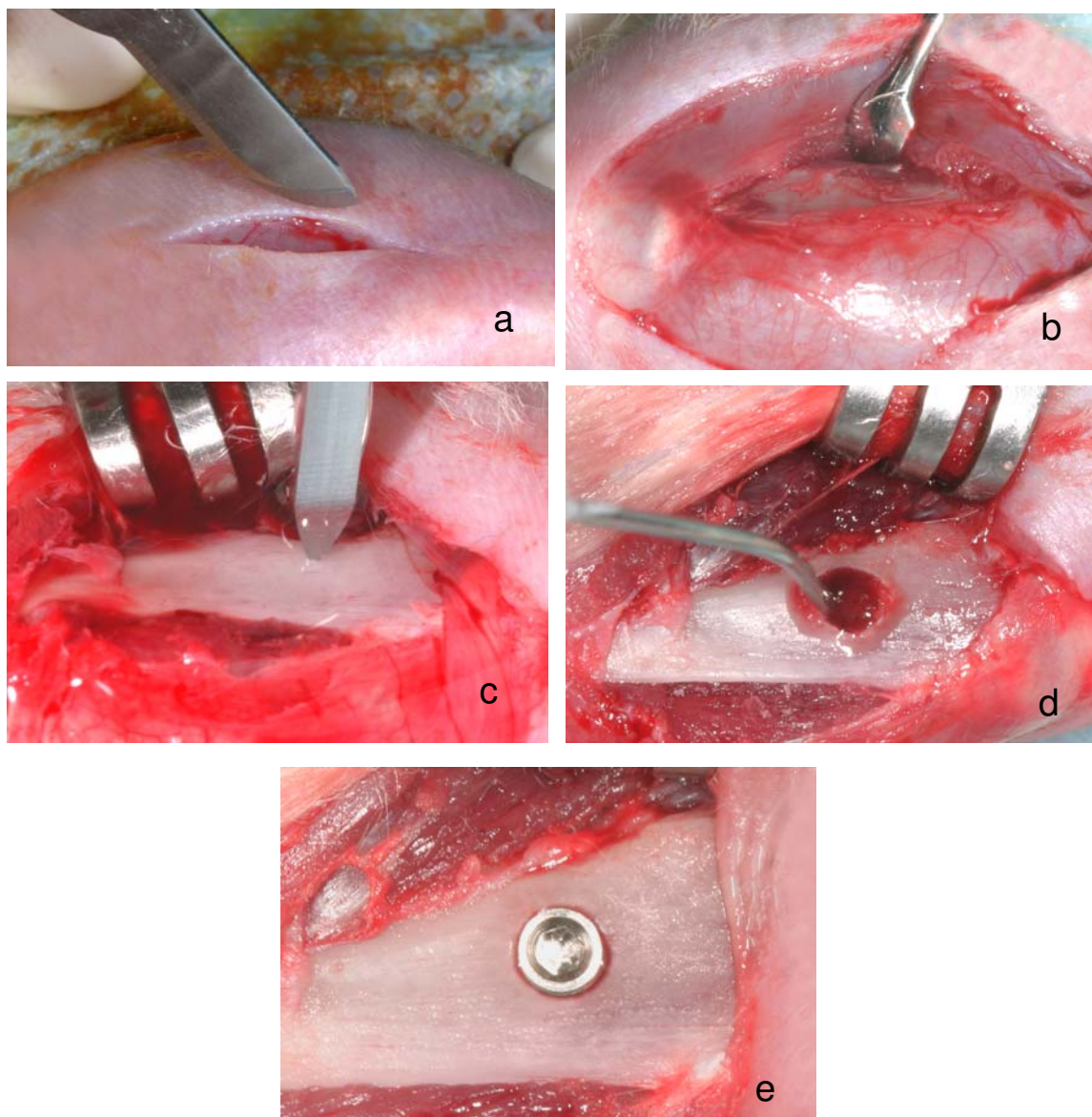


Figura 3 –(a) Incisão, (b) acesso à superfície da tíbia e exposição. (c) Início da confecção do leito bicortical com broca tipo lança. (d) Irrigação do leito. (e) Implante posicionado.

4.7 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO E ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Após 60 dias da instalação dos implantes, os animais foram sacrificados e as tíbias removidas e seccionadas em blocos (implantes e o tecido ósseo), os quais foram imersos em formol a 3,7% por 48 horas. Após a fixação e lavagem em água, os blocos foram desidratados progressivamente em solução de álcool etílico (60-100%) sob constante agitação.

Foi realizada uma infiltração plástica das amostras com soluções gradativas de glicolmetacrilato (Technovit 7200 VLC – Kulzer, Wehrheim, Alemanha) e álcool etílico seguindo concentrações crescentes, finalizando com 2 infiltrações de glicolmetacrilato puro, sob agitação constante. Após a infiltração os blocos foram incluídos em metilmetacrilato puro e foi realizada a polimerização por 10 horas.

Os blocos foram removidos do molde e montados em uma lâmina acrílica (Technovit 4000 - Kulzer, Wehrheim, Alemanha). Através de um sistema de corte (Exakt – Cutting and Grinding System, Apparatebau GmbH, Hamburgo, Alemanha) foi realizado o corte preliminar (300–500 μm). Esta secção foi submetida a um microdesgaste, que resultou em uma secção de aproximadamente 20 a 30 μm de espessura. As secções obtidas foram fixadas em lâminas, coradas com coloração de azul de toluidina a 1%, lamínulas foram posicionadas e coladas com resina e polimerizadas, a fim de que, posteriormente, fosse realizada a análise histométrica.

A imagem de cada lâmina contendo uma secção de implante e tecido duro não descalcificado circundante foi capturada por uma câmera digital (MC80 DX®, Zeiss, Jena, Alemanha) acoplada em microscópio óptico (Axioskop 2 plus®, Zeiss, Jena, Alemanha) nas objetivas de 5 e 10x.

Por meio de um programa de análise de imagens (Image-Pro®; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA) foi aplicado um retículo quadriculado de 0,04 mm e foram obtidas as seguintes medidas nos lados direito e esquerdo de cada implante sem que o examinador soubesse a qual grupo pertencia:

1- Porcentagem de tecido mineralizado (**PTM**) na região de 500 μm lateralmente a superfície do implante (Figuras 4 e 5);

2- Porcentagem de tecido ósseo dentro dos limites das roscas de cada implante (AO) (Figuras 6 e 7);

3- Porcentagem de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (CD) (Figura 6).

Os resultados foram obtidos separadamente para região cortical (A) e medular (B)

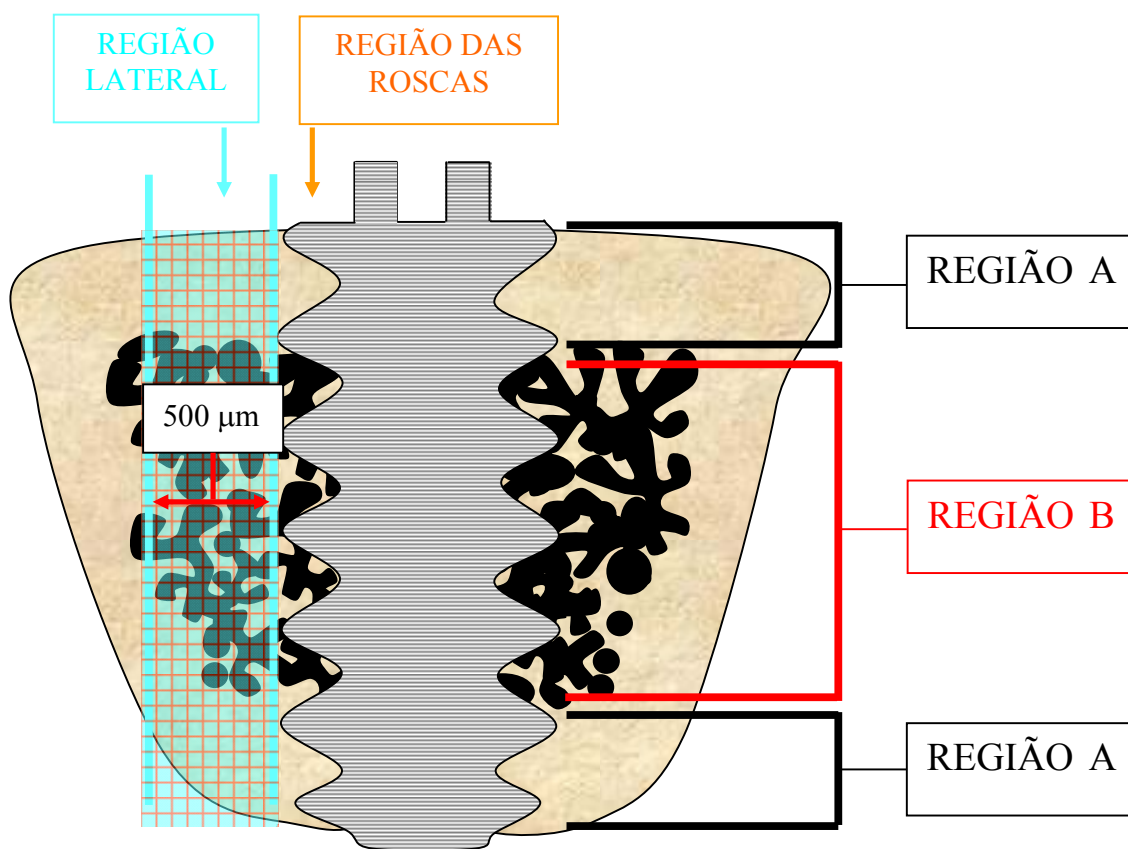


Figura 4- Esquema representando os tipos de osso presentes ao redor dos implantes (região A: cortical; região B: medular). Cada parâmetro histométrico foi separadamente mensurado em A e B. A área demarcada em azul indica a região adjacente ao implante na qual foi avaliado o parâmetro proporção de tecido mineralizado (PTM). As linhas em vermelho dentro dessa área representam o retículo usado para a obtenção de PTM. O número de

pontos coincidentes com tecido mineralizado dividido pelo total de pontos de cada região resulta no valor de PTM

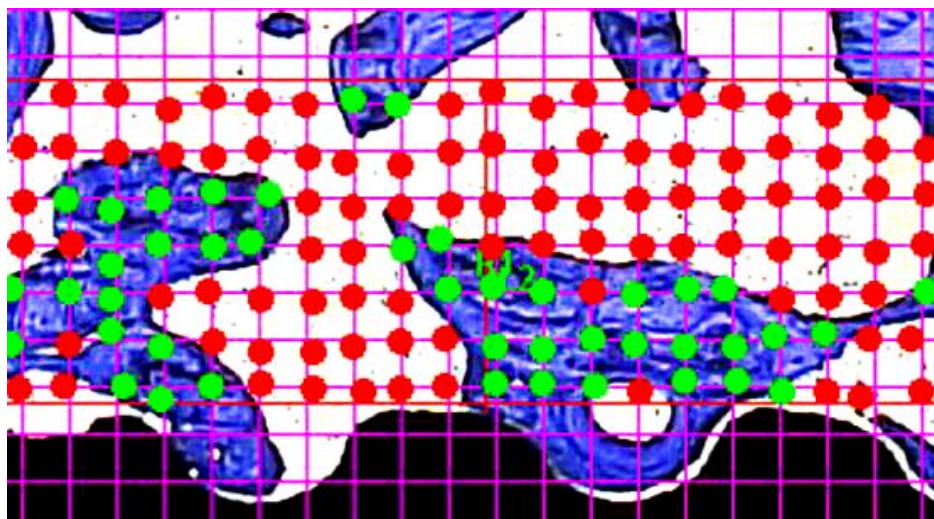


Figura 5 – Fotomicrografia ilustrando a posição de tecido ósseo mineralizado na região adjacente ao implante por meio do programa Image-Pro®. Notar retículo quadriculado posicionado e pontos verdes correspondentes ao tecido ósseo.

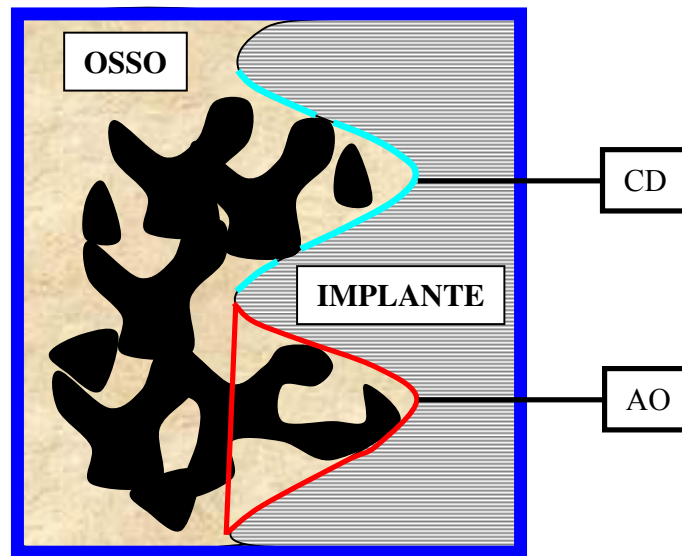


Figura 6 - Esquema dos parâmetros histométricos avaliados: **(AO)** área de tecido ósseo dentro dos limites das rosca e **(CD)** contato direto osso-implante. A linha vermelha delimita o local onde foi medido o parâmetro AO. A linha verde representa a extensão de tecido ósseo formado diretamente sobre a superfície do implante. A razão desse valor sobre a extensão total da rosca resulta no valor de CD.

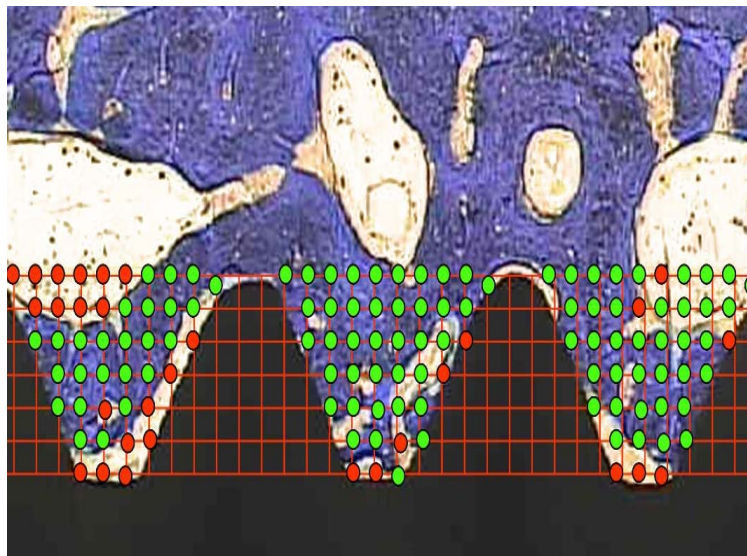


Figura 7 – Fotomicrografia ilustrativa do preenchimento ósseo dentro do limite das roscas do implante (AO). Pontos verdes correspondem ao tecido ósseo e os pontos em vermelho representam a ausência de tecido ósseo.

4.8 CALIBRAÇÃO DO EXAMINADOR

Previamente às leituras finais, foi determinado o coeficiente de calibração do examinador por meio da correlação intra-classe. Vinte cortes foram aleatoriamente selecionados e um avaliador cego realizou as mensurações que foram repetidas 3 semanas após a primeira medição. O alto valor do coeficiente de correlação ($r = 0,095$; intervalo de confiança 95%) mostrou consistência na reprodutibilidade da leitura e, portanto, a boa calibração do examinador.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Dados de PTM, CD e AO das regiões cortical e medular foram agrupados separadamente para a análise estatística. Nas situações em que a amostra apresentou distribuição normal, utilizou-se o teste de ANOVA seguido pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$), nos casos onde a distribuição normal não foi observada, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, associado ao método de Dunn ($\alpha=5\%$).

5 RESULTADOS

Inicialmente, foram incluídos no estudo 65 animais. Porém, 1 animal do grupo 1 e 1 do grupo 2 morreram após a cirurgia de colocação do implante, além disso 2 amostras do grupo 4 foram perdidas durante o processamento laboratorial. Desta forma, ao final do presente estudo foram considerados para análise estatística 61 animais distribuídos em quatro grupos: 15 no grupo 1, 16 no grupo 2, 17 no grupo 3 e 13 no grupo 4.

5.1 Porcentagem de tecido mineralizado na região adjacente ao implante (PTM)

Na região cortical, em relação ao parâmetro proporção de tecido mineralizado adjacente ao implante (PTM) foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos 3 e 2 ($p<0,05$), 4 e 2 ($p<0,05$) e entre os grupos 1 e 2 ($p<0,05$). Os grupos que receberam aplicação do PTH (1-34) apresentaram comportamento similar ao grupo 1 ($p<0,05$) (Figura 8).

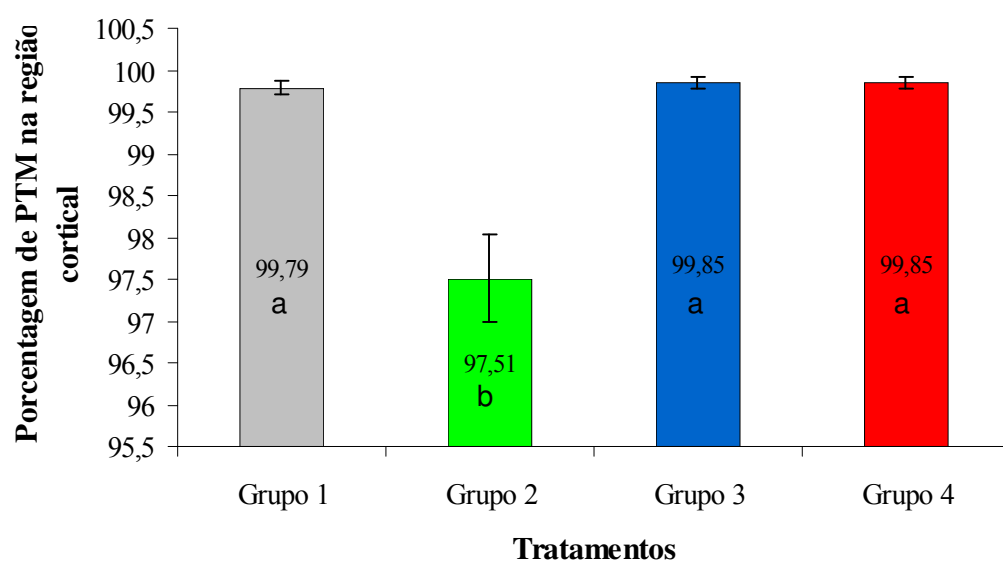


Figura 8: Médias e desvios-padrão da porcentagem de tecido mineralizado (PTM) zona cortical dos animais que receberam implantes. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de Kruskal-Wallis e método de Dunn ($\alpha=5\%$).

Na avaliação do parâmetro histométrico PTM, na região medular, observou-se que a IFC influenciou negativamente a quantidade de tecido mineralizado, uma vez que o grupo 2 apresentou as menores proporções de PTM e essa diferença foi significativa estatisticamente dos outros grupos ($p < 0,05$). Valores intermediários foram observados no grupo 1 seguido dos grupos 3 e 4, os quais não apresentaram diferenças ao serem comparados entre si ($p > 0,05$) (Figura 9).

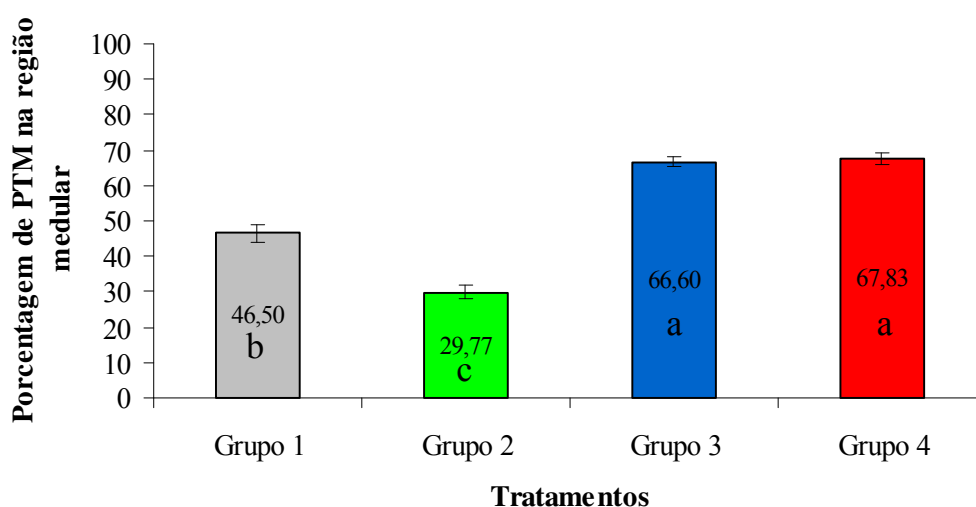


Figura 9: Médias e desvios-padrão da porcentagem de tecido mineralizado (PTM) zona medular dos animais que receberam implantes. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA monofatorial e teste Tukey ($\alpha=5\%$).

5.2 Porcentagem de tecido ósseo dentro das roscas (AO)

Em relação ao parâmetro porcentagem de tecido ósseo dentro das roscas todos os grupos apresentaram um comportamento semelhante, não sendo observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 10).

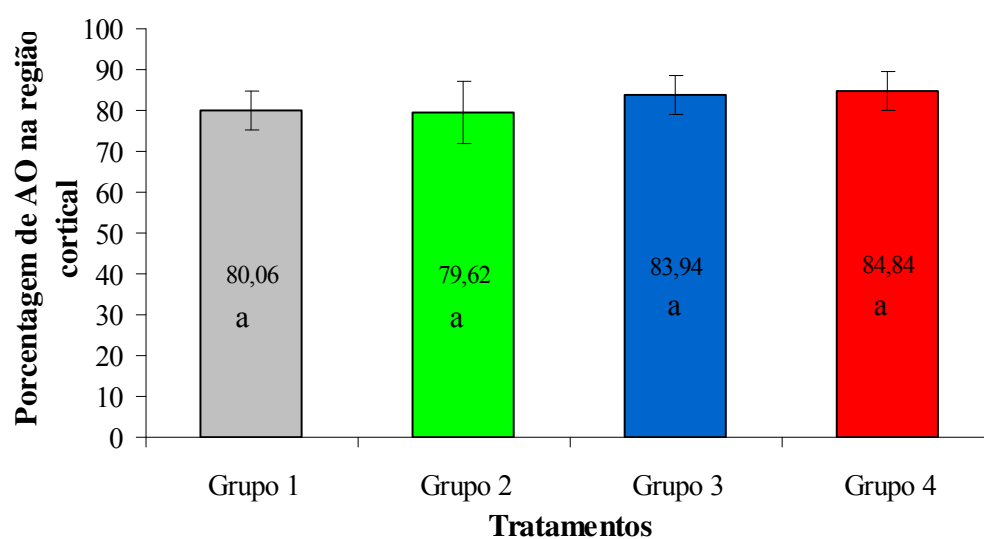


Figura 10: Médias e desvios-padrão da porcentagem de preenchimento ósseo dentro das roscas (AO) dos implantes na zona cortical. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA monofatorial e teste Tukey ($\alpha=5\%$).

A análise dos dados do parâmetro AO, na região medular, revelou que não foram observadas diferenças significantes entre os grupo 1 e 2 ($p>0,05$). Também não foram observadas diferenças entre os grupos 3 e 4 ($p>0,05$). Por outro lado, os 2 grupos que receberam o hormônio apresentaram diferenças estatisticamente significantes ao serem comparados aos grupos que não receberam o hormônio ($p<0,05$) (Figura 11).

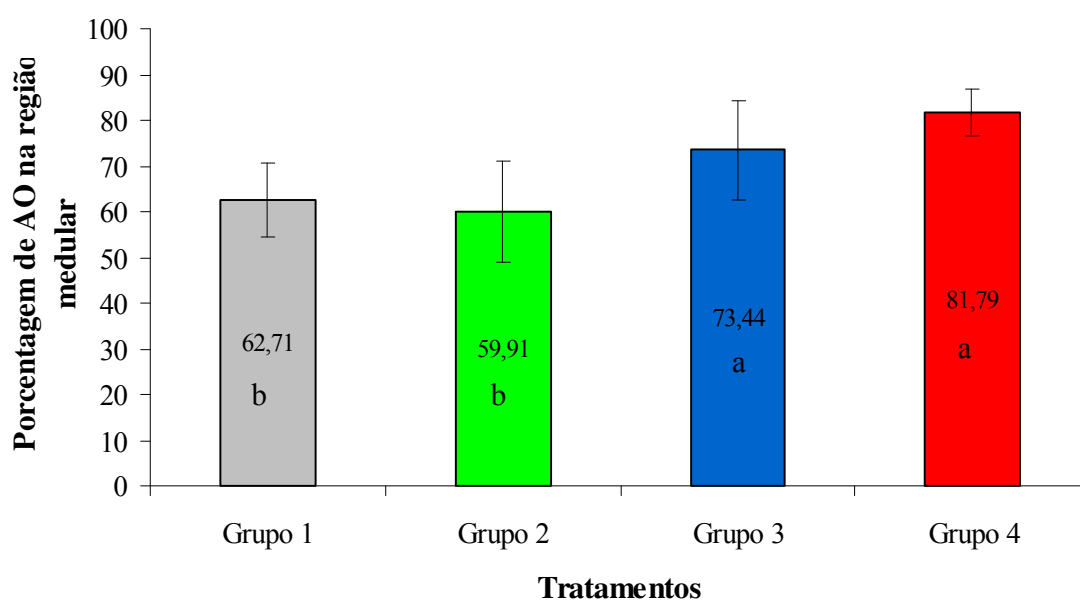


Figura 11: Médias e desvios-padrão da porcentagem de preenchimento ósseo dentro das roscas (AO) dos implantes na zona medular. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA monofatorial e teste Tukey ($\alpha=5\%$).

5.3 Porcentagem de contato direto osso-implante (CD).

A análise dos dados mostrou que o contato direto (CD) osso-implante, na região cortical, foi influenciado negativamente pela IFC. A menor porcentagem de CD foi observada no grupo 2 (60,40%), seguido do grupo 1 (68,48%), havendo diferenças estatisticamente significantes entre estes grupos ($p < 0,05$). Os animais que receberam a aplicação de PTH (1-34) apresentaram uma maior proporção de CD comparados aos grupos 1 e 2, independente da exposição à fumaça de cigarro ($p > 0,05$) (Figura 12).

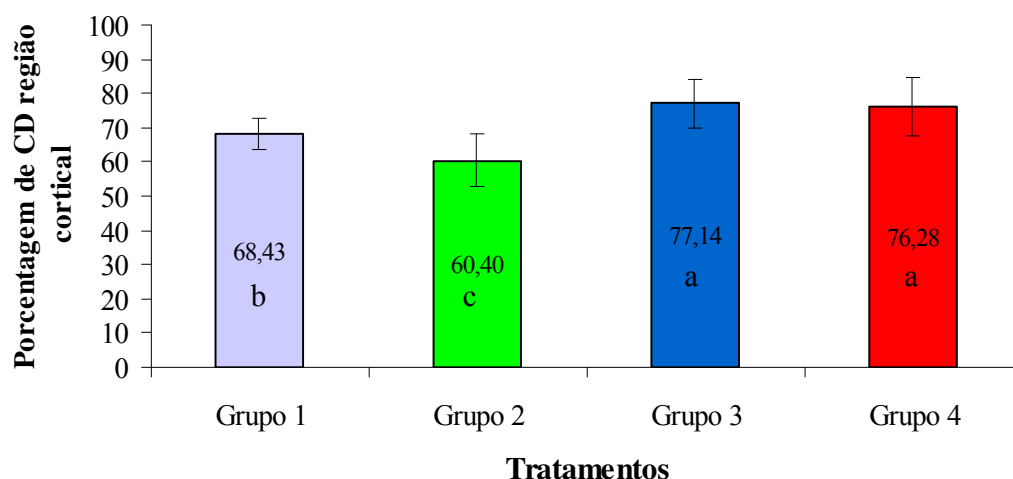


Figura 12: Médias e desvios-padrão da porcentagem de contato osso-implante (CD) avaliado na região cortical. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA monofatorial e teste Tukey ($\alpha = 5\%$).

Na região medular, a análise dos dados do parâmetro CD mostrou que não houve diferenças estatisticamente significante entre os grupos 1 e 2 ($p>0,05$). A mesma situação pode ser observada ao comparar os dois grupos que receberam PTH (1-34) ($p>0,05$). Por outro lado, os 2 grupos que receberam o hormônio apresentaram diferenças estatisticamente significantes ao serem comparados aos grupos que não receberam o hormônio ($p<0,05$) (Figura 13).

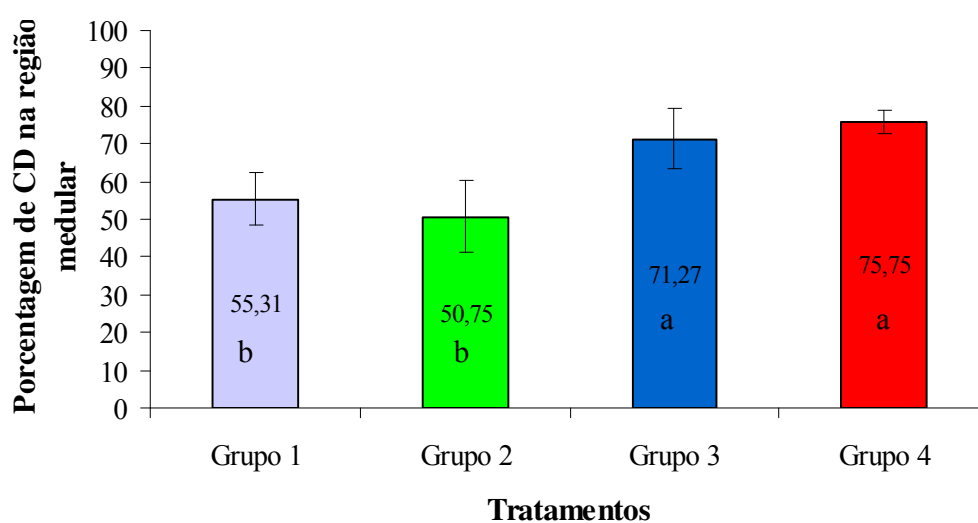


Figura 13: Médias e desvios-padrão da porcentagem de contato osso-implante (CD) avaliado na região medular. Letras distintas diferem entre si estatisticamente pela análise de variância ANOVA monofatorial e teste Tukey ($\alpha=5\%$).

Em relação às análises histológicas pode-se observar que os grupos que receberam aplicação intermitente de PTH (1-34) tiveram menor influencia da fumaça do cigarro, pois apresentaram maior preenchimento de rosca e tecido ósseo mais mineralizado na região lateral ao implante (Figura 14).

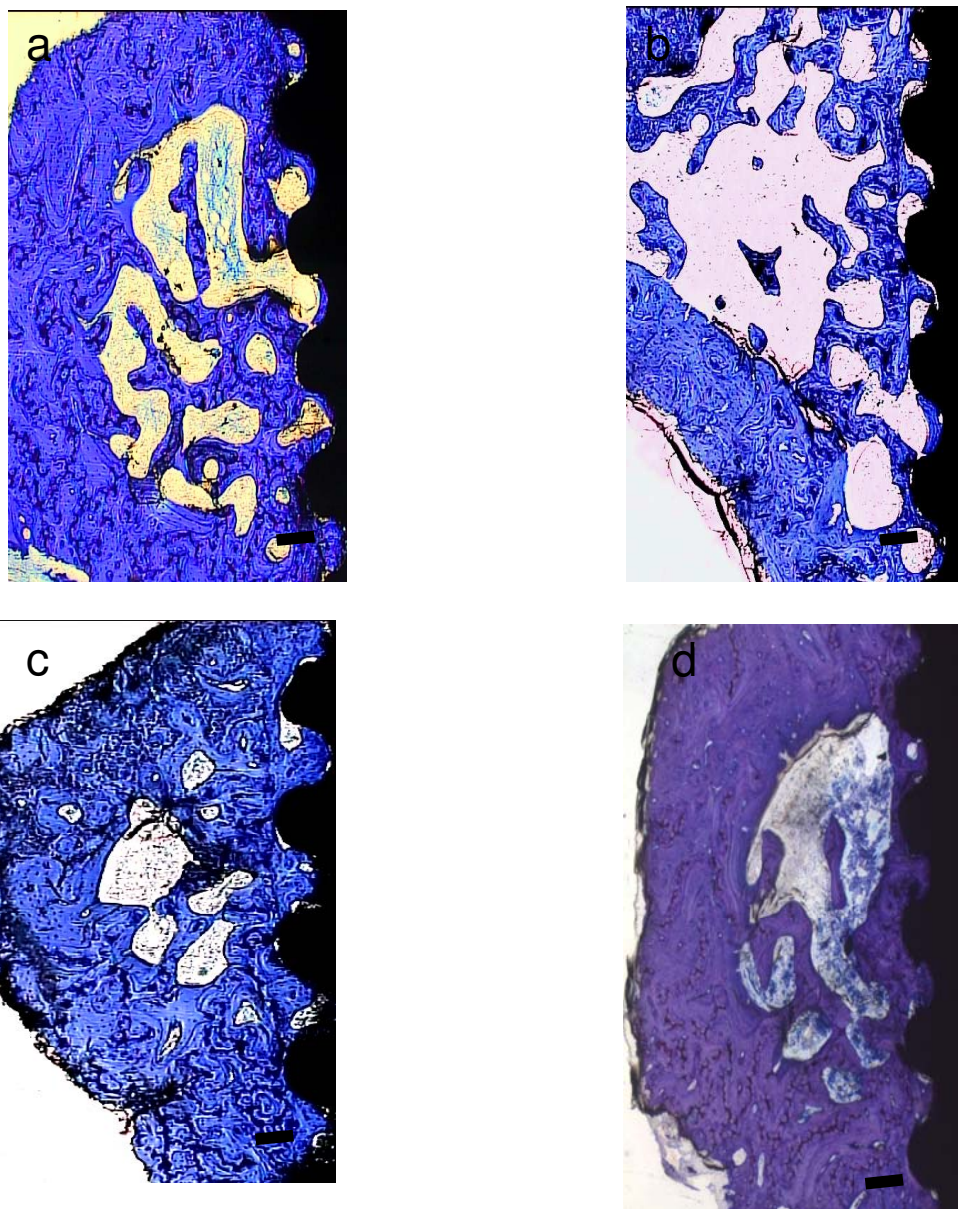


Figura 14 - Fotomicrografia ilustrando o aspecto histológico observado dentro dos limites das rosca e na área adjacente à superfície do implante. Observar osso medular e cortical. (Azul de Toluidina; Magnificação Original X 5,0, barra=200µm).a) Grupo 1; b) Grupo 2; c)Grupo 3 e d) Grupo 4.

6 DISCUSSÃO

O efeito da fumaça de cigarros sobre o metabolismo ósseo foi relatada por César-Neto *et al.* (2003) o qual mostraram que a inalação da fumaça de cigarros tem maior influência, quando comparada com injeções subcutâneas de nicotina, no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos. Esse mesmo modelo de inalação da fumaça de cigarros também mostrou um efeito negativo no osso pré-existente da tíbia (Pan *et al.*, 2000) e no reparo ósseo ao redor de implantes de titânio (Motohashi *et al.*, 1999; Nakajima *et al.*, 2000; Nociti *et al.*, 2002) sendo que o impacto negativo do cigarro na qualidade óssea também foi observada numa análise radiográfica de tíbias e mandíbulas de ratos (Ueng *et al.*, 1997; Ueng *et al.*, 1999). Resultados semelhantes foram encontrados ao avaliar, histometricamente, o osso alveolar de suporte (César- Neto *et al.* 2006a). Portanto, o presente estudo confirma pesquisas prévias que demonstraram os efeitos negativos da fumaça de cigarro sobre o tecido ósseo, desta forma validando os resultados aqui encontrados onde a inalação da fumaça de cigarros afetou negativamente osseointegração de implantes.

O mecanismo pelo qual o cigarro causa efeitos nocivos sobre o tecido ósseo ainda está sendo bastante estudado. Porém, algumas alterações já foram observadas como diminuição na diferenciação osteoblástica (Liu *et al.* 2003, Andreou *et al.* 2004, Gullihorn *et al.* 2005), aumento de citocinas (Kamer *et al.* 2006, César-Neto *et al.* 2004, 2006), além do que, a nicotina promove uma vasoconstrição (Feitelson *et al.* 2003) diminui a angiogênese (Daftari *et al.* 1994, Pinto *et al.* 2002) e osteogênese em áreas de remodelação (Pinto *et al.* 2002) alterando a densidade óssea.

Os eventos iniciais no processo de reparo ósseo ao redor de implantes podem determinar falha ou o sucesso dos mesmos e tais eventos podem ser afetados pelas propriedades da superfície dos implantes (Schwartz & Boyan, 1994). A rugosidade, energia de superfície e composição química inerentes à superfície dos mesmos podem influenciar a resposta celular na interface osso-implante e, portanto, afetar positivamente a taxa e qualidade de formação de tecido ósseo (Deligianni *et al.*, 2001). A modificação de superfícies de implantes por meio de inúmeras técnicas, tais como jateamentos de

partículas, condicionamentos ácidos, combinação desses, entre outros, vem sendo investigada e estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado resultados promissores com a utilização de implantes com diferentes tratamentos de superfície (Buser *et al.*, 1991; Wennerberg *et al.*, 1995). Deste modo, optou-se por utilizar implantes com superfície tratada com óxido de alumínio com o objetivo de tentar favorecer o processo de osseointegração, além do que na prática clínica atual a utilização de implantes de superfície tratada é uma realidade justificando assim a utilização deste tipo de implante no presente estudo. Neste contexto, pode-se observar que os grupos que receberam a aplicação intermitente do PTH (1-34) apresentaram resultados superiores em relação aos parâmetros avaliados, quando comparado aos grupos que não receberam aplicação de PTH (1-34) independente da exposição à fumaça de cigarro.

Em relação ao mecanismo pelo qual o PTH (1-34) age no tecido ósseo este ainda não foi totalmente elucidado, porém autores (Jilka *et al.*, 2009; Ohkawa *et al.*, 2008) acreditam que é por meio da ativação de osteoblastos aumentando em número e em atividade, além do que o PTH (1-34) reduz apoptose dos osteoblastos levando a uma atividade anabólica de maior magnitude que a ação reabsortiva (Gracitelli *et al.*, 2002). A ativação dos osteoblastos pelo PTH (1-34) resulta na expressão de importantes genes para formação da matriz, produção de fatores de crescimento e a estimulação e recrutamento dos osteoblastos. De uma forma global o PTH (1-34) intracelular liga-se a um receptor específico na superfície do osteoblasto (proteína G) estimulando a adenil-ciclase, elevando as concentrações de AMP cíclico (AMPc), que ativa a proteína quinase A (PKA), estimulando vários fatores de crescimento como IGF-1, IGF-2, TGF- β (transforming growth factor β). Além disso, o PTH (1-34) induz a produção de IGF *binding protein* (IGFBP), como IGFBP-1,-3,-4 e -5 (Rosen *et al.*, 2001). Esses fatores de crescimento agem recrutando células pré-osteoblásticas induzindo a diferenciação e maturação em osteoblastos maduros, capazes de sintetizar colágeno em grandes quantidades (Goltzman D, 1999). Sendo assim, acreditamos que por estimular diversos fatores de crescimento e por agir diretamente sobre os osteoblastos, o PTH (1-34) pode minimizar os efeitos do cigarro sobre o tecido ósseo, pois segundo pesquisas, *in vitro*, que avaliaram a ação da nicotina em

cultura de células, esta age inibindo a diferenciação osteoblástica e produção de fibronectina dificultando o processo de remodelação e reparo. (Liu *et al.*, 2001;2003).

Em relação à ação indireta do PTH (1-34) nos osteoclastos, recentes estudos indicam que, sob estímulo do receptor PTH/PTHrp, a célula osteoblástica madura secreta o fator de diferenciação osteoclástica, chamado de ligante da osteoprotegerina (OPG-L), que tem sua transcrição ativada pela via da PKA (Mitnick *et al.*,2001). A OPG-L tem a capacidade de se ligar ao receptor de membrana (RANK) nas células progenitoras hematopoiéticas induzindo a diferenciação em osteoclastos. Além disso, o hormônio estimula a síntese de interleucina-6, também capaz de desencadear a diferenciação osteoclástica (Calvi *et al.*,2001; Mitnick *et al.*,2001). De grande importância na ligação entre osteoblastos e osteoclastos, a osteoprotegerina (OPG) inibe a diferenciação e ativação dos osteoclastos por competir com o RANK pela OPG-L (Bekker *et al.*,2001). Estudos também demonstraram que infusões contínuas de PTH, causadoras de reabsorção óssea, desencadeiam uma diminuição da OPG e um aumento da OPG-L, capaz de induzir a diferenciação dos osteoclastos (Ma *et al.*, 2001).

Entretanto a administração sistêmica e intermitente de PTH (1-34) pode promover regeneração óssea, como já evidenciada em modelos *in vivo* e *in vitro*, incluindo estudos relacionados à osseointegração (Skripitz *et al.*, 2000 e 2009; Shirota *et al.*, 2003). Recentemente Skripitz *et al.* (2009) compararam o efeito do uso do alendronato e do PTH (1-34) em ratas ovariectomizadas que receberam implantes para fixação óssea de polimetilmetacrilato. Os autores observaram que os animais que receberam aplicação intermitente de PTH (1-34) apresentaram mais de 20% de volume de densidade óssea quando comparado ao grupo que recebeu somente o alendronato e 50% a mais quando comparado ao grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente estudo onde os grupos que receberam PTH (1-34) apresentaram uma porcentagem bem maior e diferente estatisticamente de tecido mineralizado quando comparado aos grupos que não receberam PTH (1-34). Estes resultados nos levam a pensar, também, na capacidade de ação do PTH (1-34) em atenuar os efeitos do cigarro sobre o tecido ósseo agindo de forma semelhante tanto em osso cortical quanto em medular.

Em relação ao tempo de administração do PTH (1-34), estudos em ratos mostram que os efeitos anabólicos podem ser observados em 1 ou 2 semanas após sua administração (Skripitz *et al.*, 2009). Em um estudo realizado por Iida-Klein *et al.*, (2006 e 2007) comparando as formas cíclica e diária de aplicação do PTH (1-34) os autores observaram que o modo de aplicação diário do PTH (1-34) por 7 semanas pode aumentar os marcadores de reabsorção óssea, além do que, observaram que a forma cíclica pode produzir um aumento na espessura do osso cortical e maior densidade óssea mineral em ossos longos. Baseado no sucesso deste tipo de terapia o presente estudo optou por aplicar o PTH (1-34) de forma cíclica por um período de 8 semanas.

Atualmente, comercializa-se no Brasil, teriparatida considerado novo tratamento para osteoporose. Teriparatida está registrada no país desde 2003 com o nome comercial de Fórtéo®. (ANVISA, 2003). Quanto ao uso clínico, o PTH (1-34), é um hormônio eficaz para o tratamento da osteoporose idiopática em homens e em mulheres com osteoporose pós-menopausa severa, com histórico ou que apresentam risco de fraturas ósseas, constituindo-se na primeira terapia anabólica para tratamento destas situações clínicas (File & Deal, 2009). O PTH (1-34) é uma medicação de uso intermitente, sendo administrada via subcutânea na dose de 20 µg/Kg ou 40 µg/Kg podendo estar associada a outros agentes com ação anti reabsortiva. É uma medicação segura, com poucos eventos adversos os quais desaparecem após a descontinuação do tratamento. Apesar de sua eficácia, a teriparatida apresenta desvantagens, tais como, administração subcutânea, a necessidade de estocagem sob refrigeração, alto preço e o monopólio comercial, além das contra indicações para o tratamento com a Teriparatida que não deve ser realizado em pacientes com hipercalcemia, metástases ósseas, hiperparatireoidismo, doença de Paget do Osso, níveis elevados da fosfatase alcalina sérica, hipercalciúria, urolitíase. A medicação não deve ser administrada durante a gravidez e puerpério devido à deficiência de informações.

Finalmente, apesar de todo esforço na pesquisa de recursos que possam minimizar os efeitos do cigarro em implantes dentais, talvez o objetivo maior deva ser o desenvolvimento de medidas que estimulem os pacientes a parar de fumar, ou com o auxílio de medicação ou com acompanhamentos psicológicos. Akkaya *et al.* (2006) em um

estudo realizado com 349 pacientes demonstraram que a combinação de terapias mais o suporte motivacional dado ao paciente durante o processo de deixar de fumar, parece ser mais importante que a terapia medicamentosa isolada, pois foi observado que mais de 55.2% dos pacientes que receberam aconselhamento e pararam de fumar. No mesmo estudo, a autora reforça a importância dos profissionais da saúde neste processo.

Já foi demonstrado previamente que o regime de exposições à fumaça de cigarros usado nesse estudo pode promover um nível sérico de cotinina diretamente correlacionado com os níveis obtidos de pacientes fumantes que consomem entre 10 e 20 cigarros por dia (Gonzalez *et al.*, 1996). No entanto, existem diferenças anatômicas e fisiológicas entre ratos e humanos, principalmente em relação às suas idades cronológicas e biológicas. Além disso, estudos com implantes em ratos não podem ser extrapolados para a prática clínica, pois, apesar da vantagem de conseguir isolar a variável a ser estudada, têm inúmeras limitações. Uma vez que neste modelo os implantes não são, por exemplo, submetidos a cargas oclusais e o tipo de osso no quais os implantes são inseridos difere na prática em humanos, os resultados obtidos neste estudo devem ser analisados com cautela.

7 CONCLUSÃO

Dentro dos limites deste estudo, pode-se concluir que o uso do PTH (1-34) tem a capacidade de promover maior formação óssea ao redor dos implantes em animais expostos ou não à inalação da fumaça de cigarro.

REFERÊNCIAS*

Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, et al. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1;89(7):2732-6.

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

Akkaya A, Oztürk O, Cobanoğlu H, Bircan HA, Simşek S, Sahin U. Evaluation of patients followed up in a cigarette cessation clinic. *Respirology*. 2006 May;11(3):311-6.

Alsaadi G, Quirynen M, Komárek A, van Steenberghe D Impact of local and systemic factors on the incidence of oral implant failures, up to abutment connection. *J Clin Periodontol*. 2007 Jul;34(7):610-7. Epub 2007 Apr 13.

Bain CA. Smoking and implant failure: benefits of a smoking cessation protocol. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1996;11:756-759.

Bain CA, Moy PK. The association between the failure of dental implants and cigarette smoking. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1993; 8: 609-615.

Bain CA, Moy PK. The relationship between smoking and bone quality in implant patients. *Clin Oral Impl Res* 1997; 8:435.

Barros SP, Silva MAD, Somerman MJ, Nociti Jr FH. Parathyroid Hormone Protects against Periodontitis-associated Bone Loss. *J Dent Res* 2003; 82(10):791-795.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos Periódicos em conformidade com o Medline.

Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res.* 2001 Feb;16(2):348-60.

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.

Brommage R, Hotchkiss CE, Lees CJ, Stancill MW, Hock JM, Jerome CP Daily treatment with human recombinant parathyroid hormone-(1-34), LY333334, for 1 year increases bone mass in ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3757-63.

Calvi LM, Sims NA, Hunzelman JL, Knight MC, Giovannetti A, Saxton JM, Kronenberg HM, Baron R, Schipani E. Activated parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblastic cells differentially affects cortical and trabecular bone. *J Clin Invest.* 2001 Feb;107(3):277-86.

Cendon-Filha S.P. Enfisema Pulmonar: Modelo experimental em ratos expostos a fumaça do cigarro. {dissertação}. São Paulo: USP/ Escola Paulista de Medicina; 1993.

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

Cesar-Neto JB, Benatti BB, Neto FH, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Smoking cessation may present a positive impact on mandibular bone quality and periodontitis-related bone loss: a study in rats. *J Periodontol.* 2005 Apr;76(4):520-5.

Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Nociti FH Jr. Bone density around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Sep-Oct;20 (5):713-9.

Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Bone filling around titanium implants may benefit from smoking cessation: a histologic study in rats. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1476-81.

Cesar-Neto JB, Benatti BB, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH Jr. The influence of cigarette smoke inhalation and its cessation on the tooth-supporting alveolar bone: a histometric study in rats. *J Periodontal Res*. 2006 Apr;41(2):118-23.

Cosman F, Lindsay R. Is parathyroid hormone a therapeutic option for osteoporosis? A review of the clinical evidence. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 475-80.

Daftari TK, Whitesides TE Jr, Heller JG, et al.; Nicotine on the revascularization of bone grafts. *Spine* 1994; 19:904.

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

Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. *Endocr Rev*. 1993 Dec;14(6):690-709.

Dempster DW, Parisien M, Silverberg SJ, Liang XG, Schnitzer M, Shen V, *et al.*, On the mechanism of cancellous bone preservation in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 May;84(5):1562-6

Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L, *et al.* Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in

patients with osteoporosis: a paired biopsy study. *J Bone Miner Res.* 2001 Oct;16(10):1846-53.

Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. *Endocrinology.* 1995 Aug;136(8):3632-8.

Ejersted C, Andreassen TT, Hauge EM, Melsen F, Oxlund H. Parathyroid hormone (1-34) increases vertebral bone mass, compressive strength, and quality in old rats. *Bone.* 1995 Dec;17(6):507-11.

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.

File E, Deal C. Clinical update on teriparatide. *Curr Rheumatol Rep.* 2009 Jul;11(3):169-76.

Fielding JE. Smoking: health effects and control (2). *N Engl J Med.* 1985 Aug 29;313(9):555-61.

Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res.* 1999 Feb;14(2):173-7.

Gonzalez YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardim E. Serum cotinine levels, smoking and periodontal attachment loss. *J Dent Res* 1996; 75: 796-802.

Gorman LM, Lambert PM, Morris HF, Ochi S, Winkler S. The effect of smoking on implant survival at second-stage surgery. *Dental Implant CLinical Research Group. Implant Dent.* 1994;3(3):165-8.

Gracitelli MEC, Vidoris AAC, Luba R, Lazaretti-Castro M. Paratormônio e Osteoporose: Encontrando o Fio da Meada. Bases Fisiológicas para Utilização do PTH no Tratamento da Osteoporose. *Arq Brás Endocrinol Metab* 2002 junho;46(3):215-220.

Haas R. The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J Prosthet Dent* 1996 Dec; 76(6):592-596.

Horwitz M, Stewart A, Greenspan SL. Sequential parathyroid hormone/alendronate therapy for osteoporosis--robbing Peter to pay Paul? *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Jun;85(6):2127-8.

Hock JM, Gera I, Fonseca J, Raisz LG. Human parathyroid hormone-(1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchidectomized rats. *Endocrinology.* 1988 Jun;122(6):2899-904

Hori M, Uzawa T, Morita K, Noda T, Takahashi H, Inoue J Effect of human parathyroid hormone (PTH(1-34)) on experimental osteopenia of rats induced by ovariectomy. *Bone Miner.* 1988 Jan;3(3):193-9.

Hollinger JO, Schmitt JM, Hwang K, et al.; Impact of nicotine on bone healing. *J Biomed Mater Res* 1999;45:294.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000; 41:48-72.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1999 Aug;104(4):439-46.

Jilka RL, O'Brien CA, Ali AA, Roberson PK, Weinstein RS, Manolagas SC. Intermittent PTH stimulates periosteal bone formation by actions on post-mitotic preosteoblasts *Bone*. 2009 Feb;44(2):275-86. Epub 2008 Oct 22.

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; 50(3):237-40

Kimmel DB, Bozzato RP, Kronis KA, Coble T, Sindrey D, Kwong P, Recker RR. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult osteopenic ovariectomized rats. *Endocrinology*. 1993 Apr;132(4):1577-84.

Lambert PM, Morris HF, Ochi S. The influence of smoking on 3-year clinical success of osseointegrated dental implants. *Ann Periodontol*. 2000 Dec;5(1):79-89.

Le Mesurier SM. Injury to type-2 pneumocytes in rats exposed to cigarette smoke. *Environ Research* 1981;24:207-17.

Lichtensteiger W, Schlumpf M. Prenatal nicotine exposure: biochemical and neuroendocrine bases of behavioral dysfunction. *Dev Brain Dysfunc* 1993;6:279-304.

Li M, Liang H, Shen Y, Wronski TJ. Parathyroid hormone stimulates cancellous bone formation at skeletal sites regardless of marrow composition in ovariectomized rats. *Bone*. 1999 Feb;24(2):95-100.

lida-Klein A, Zhou H, Lu SS, Levine LR, Ducayen-Knowles M, Dempster DW. Anabolic action of parathyroid hormone is skeletal site specific at the tissue and cellular levels in mice. *J Bone Miner Res* 2002;17:808-16.

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):329-336.

Liu XD, Zhu YK, Umino T, Spurzem JR, Romberger DJ, Wang H, Reed E, Rennard SI. Cigarette smoke inhibits osteogenic differentiation and proliferation of human osteoprogenitor cells in monolayer and three-dimensional collagen gel culture. *J Lab Clin Med*. 2001; 137(3):208-219.

Ma YL, Cain RL, Halladay DL, Yang X, Zeng Q, Miles RR, *et al*. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*. 2001 Sep;142(9):4047-54.

MacDonald RS, Peters D. Osteopathy. *Practitioner*. 1986 Dec;230(1422):1073-6.

Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*. 2005 Apr;50(4):421-9.

Mitnick MA, Grey A, Masiukiewicz U, Bartkiewicz M, Rios-Velez L, Friedman S, Xu L, Horowitz MC, Insogna K. Parathyroid hormone induces hepatic production of bioactive interleukin-6 and its soluble receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Mar;280(3).

Mohan S, Kutilek S, Zhang C, Shen HG, Kodama Y, Srivastava AK, Wergedal JE, Beamer WG, Baylink DJ. Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice. *Bone* 2000 Oct;27(4):471-8.

Morley P, Whitfield JF, Ross V, Preston E, Soska M, Barbier JR, *et al.* The hypotensive actions of osteogenic and nonosteogenic parathyroid hormone fragments. *Calcif Tissue Int.* 1997 Mar;60(3):302-8.

Muneoka K, Ogawa T, Kamei K, Mimura Y, Kato H, Takigawa M. Nicotine exposure during pregnancy is a factor which influences serotonin transporter density in the rat brain. *Eur J Pharmacol.* 2001 Jan 12;411(3):279-82.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, *et al.* Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2001 May 10;344(19):1434-41.

Nishida S, Yamaguchi A, Tanizawa T, Endo N, Mashiba T, Uchiyama Y, *et al.* Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration is due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. *Bone.* 1994 Nov-Dec;15(6):717-23.

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

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

Qi H, Li M, Wronski TJ. A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 1995 Jun;10(6):948-55.

Ohkawa Y, Tokunaga K, Endo N. Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) increases new bone formation on the interface of hydroxyapatitecoated titanium rods implanted into ovariectomized rat femora. *J Orthop Sci.* 2008 Nov;13(6):533-42. Epub 2008 Dec 17.

Partridge NC, Opie AL, Opie RT, Martin TJ. Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells. *Calcif Tissue Int.* 1985 Sep;37(5):519-25

Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: relation to bone remodeling and turnover, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part IV of IV parts: The state of the bones in uremic hyperparathyroidism--the mechanisms of skeletal resistance to PTH in renal failure and pseudohypoparathyroidism and the role of PTH in osteoporosis, osteopetrosis, and osteofluorosis. *Metabolism.* 1976 Oct;25(10):1157-88.

Pinto JR, Bosco AF, Okamoto T, Guerra JB, Piza IG. Effects of nicotine on the healing of extraction sockets in rats. A histological study. *Braz Dent J* 2002; 13: 3-9.

Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P, *et al.*. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. *Br Med J.* 1980 Jun 7;280(6228):1340-4.

Rosen CJ, Rackoff PJ. Emerging anabolic treatments for osteoporosis. *Rheum Dis Clin North Am.* 2001 Feb;27(1):215-33.

Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Int J Prosthodont* 1988 Sep.-Oct; 11(5):408-420.

Shirota T, Tashiro M, Ohno K, Yamaguchi A. Effect of intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment on the bone response after placement of titanium implants into the tibia of ovariectomized rats. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Apr;61(4):471-80.

Silva, Marco Antonio Dias da. A Influencia da administração intermitente de hormônio paratireoideo humano fragmento (1-34) nas fibras de sharpey da face lingual do alvéolo de incisivos inferiores e na ultra-estrutura dos hepatócitos de ratos. {dissertação}. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2005.

Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Strong effect of PTH (1-34) on regenerating bone: a time sequence study in rats. *Acta Orthop Scand*. 2000 Dec;71(6):619-24.

Skripitz R, Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases attachment of PMMA cement to bone. *J Orthop Sci*. 2001;6(6):540-4.

Skripitz R, Aspenberg P. Early effect of parathyroid hormone (1-34) on implant fixation. *Clin Orthop Relat Res*. 2001 Nov;(392):427-32.

Skripitz R, Bohling S, Ruther W, Aspenberg P. Stimulation of implant fixation by parathyroid hormone (1-34)-A histomorphometric comparison of PMMA cement and stainless steel. *J Orthop Res*. 2005 Nov;23(6):1266-70.

Skripitz, R., H. R. Johansson, et al. Effect of alendronate and intermittent parathyroid hormone on implant fixation in ovariectomized rats. *J Orthop Sci* 2009;14(2): 138-43.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells *Gene*. 2002 Jan 9;282(1-2):1-17.

Tomar SL, Asma S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. *J Periodontol*. 2000 May;71(5):743-51.

Smith PO, Sheffer CE, Payne TJ, Applegate BW, Crews KM. Smoking cessation research in primary care treatment centers: the SCRIPT-MS project. *Am J Med Sci*. 2003 Oct;326(4):238-41.

Stefani CM. Avaliação da influência da nicotina sobre o reparo ósseo ao redor de implantes de titânio com diferentes tratamentos de superfície colocados em tíbias de coelhos. {dissertação}. Piracicaba:UNICAMP/FOP;2001.

Strewler GJ The parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2000 Sep;29(3):629-45.

Sverzut AT, Stabile GA, de Moraes M, Mazzonetto R, Moreira RW. The influence of tobacco on early dental implant failure. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 May;66(5):1004-9.

Usdin TB, Hilton J, Vertesi T, Harta G, Segre G, Mezey E Distribution of the parathyroid hormone 2 receptor in rat: immunolocalization reveals expression by several endocrine cells. *Endocrinology*. 1999 Jul;140(7):3363-71.

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

Whitfield JF, Morley P, Willick GE. The bone-building action of the parathyroid hormone: implications for the treatment of osteoporosis. *Drugs Aging*. 1999 Aug;15(2):117-29.

Anexo



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

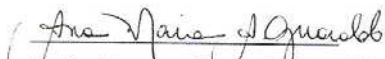
CERTIFICADO

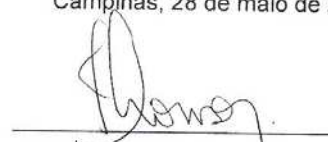
Certificamos que o Protocolo nº 1261-1, sobre "Efeito do PTH sintético (1-34) sobre o tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratas expostas à fumaça de cigarro", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati / Liana Linhares Lima, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação 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 28 de maio de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1261-1, entitled "Effect of synthetic PTH (1-34) on bone tissue around implants in rats exposed to cigarette smoking inhalation", 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 May 28, 2007.

Campinas, 28 de maio de 2007.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB - Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP - Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3521-6356
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm>