

**INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E ENVELHECIMENTO:  
UM MODELO PARA ESTUDO EM CAMUNDONGOS**

**ELKEN GOMES RIVALDO**

**Porto Alegre  
Março 2004**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA**

**PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E ENVELHECIMENTO:  
UM MODELO PARA ESTUDO EM CAMUNDONGOS**

ELKEN GOMES RIVALDO

Orientador: Profa. Dra. Dalva Maria Pereira Padilha

Tese de Doutorado em Gerontologia Biomédica

Porto Alegre  
Março de 2004

*Em especial a **Deus**,  
infinitamente obrigada!*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Dalva Maria Pereira Padilha, pelo empenho, disponibilidade, atenção e carinho, que foram fundamentais para realização deste trabalho. Exemplo de competência e coerência a serem seguidos. Sou muito agradecida.

A minha mãe Nérida, meu filho Felipe e meu marido Antônio pelo incentivo, apoio e carinho. Muito obrigada.

## **AGRADECIMENTOS**

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, na pessoa do Prof. Dr. Emilio Antônio Jeckel Neto, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica;

Ao Bruno, meu sobrinho e futuro colega, pela participação dedicada na execução dos experimentos;

Aos colegas Fernando Hugo e Juliana Hilgert pela disponibilidade em ajudar sempre;

Aos colegas Júlio Sanfelice, Ana Carolina Corso, Jose Miguel Amenábar e Samuel Corso do grupo de pesquisa coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Dalva, pelo empenho e dedicação;

Aos colegas e amigos Eduardo de Lima Fernandes, pela competência e disponibilidade para desenhar as idéias desenvolvidas neste estudo, Luis Carlos da Fontoura Frasca e Marcos Michelin Naconecy, pela amizade e apoio;

Às funcionárias Lúcia e Raquel do Programa de Pós-Graduação e do Instituto de Pesquisas Biomédicas respectivamente, pela eficiência com que desempenharam suas funções;

A CAPES, pelo apoio financeiro;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

*“Nenhuma história humana é escrita sem a presença de uma ou duas mãos amigas que se estendem em nossa direção”.*

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

R616e	Rivaldo, Elken Gomes Envelhecimento e perda óssea alveolar: um modelo para estudo em camundongos / Elken Gomes Rivaldo; Orientação de Dalva Maria Pereira Padilha. – Porto Alegre, 2004. 77 f. : il.  Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica.  1. Perda óssea alveolar 2. Envelhecimento 3. Reabsorção  4. Camundongo I. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia II. Título
óssea	
	CDU 616 -053.9

Bibliotecária: Eloisa Futuro Pfitscher

CRB 10/598



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	viii
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	04
2.1 ENVELHECIMENTO E SAÚDE BUCAL.....	04
2.2 TECIDO ÓSSEO .....	10
2.3 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR.....	12
2.4 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E ENVELHECIMENTO .....	15
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	18
3.1 OBJETIVO GERAL.....	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>4 ARTIGOS</b> .....	19
4.1 ARTIGO 1 - SURGERY TABLE WITH MOUTH PROP FOR RODENTS .....	19
4.2 ARTIGO 2 - RELIABILITY OF A POSITIONING METHOD OF HEMI MANDIBLES FOR QUANTIFICATION OF ALVEOLAR BONE LOSS IN MICE.....	26
4.3 ARTIGO 3 - ALVEOLAR BONE LOSS AND AGING: A MODEL FOR THE STUDY IN MICE .....	40

<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>67</b>
ANEXO A - Aprovação do projeto de tese pela Comissão Científica e de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.....	68
ANEXO B - Normas para a prática didático-científica da vivissecção de animais.....	70
ANEXO C - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde Divisão de Produção e Experimentação Animal - DPEA.....	74
ANEXO D - Anexos do artigo 1 .....	76

## RESUMO

Numerosos estudos em animais têm demonstrado correlação positiva entre envelhecimento e perda óssea alveolar. O objetivo desta investigação foi criar um modelo para estudo de perda óssea alveolar em camundongos, no envelhecimento. Para tanto, foi desenvolvido um equipamento denominado "mesa cirúrgica com dispositivo de abertura bucal para roedores" pouco oneroso e de fácil operação, facilitando o acesso e a visibilidade à cavidade bucal destes animais. A confiabilidade de um método de posicionamento de hemi arcadas mandibulares para quantificação de perda óssea alveolar em camundongos foi avaliada, visto que qualquer alteração no posicionamento das amostras compromete os resultados. Os resultados indicaram que o posicionador criado permite uma visualização correta, sem distorções da área de perda óssea alveolar. 72 camundongos CF<sub>1</sub> de 3, 6, 9 e 12 meses, divididos em três grupos, machos, fêmeas virgens e com parições, foram submetidos à cirurgia de descolamento mucoperiósteo na face vestibular do lado esquerdo da mandíbula. O lado direito foi usado como controle. A área de perda óssea alveolar foi medida e analisada. Os resultados indicaram que o camundongo CF<sub>1</sub>, quando submetido à cirurgia de descolamento mucoperiósteo, sofre perda óssea alveolar em um processo sexo e *status* reprodutivo independente. Medindo a área de exposição radicular, pode-se observar um padrão semelhante de reabsorção nos animais de três e 12 meses. Sugerimos o camundongo CF<sub>1</sub> de três meses, sexo e *status* reprodutivo independente como um modelo único e extremamente útil para estudos de perda óssea alveolar no envelhecimento.

## ABSTRACT

Several studies in animals have shown a positive correlation between aging and alveolar bone loss. The objective of this investigation was to develop a model for study of alveolar bone loss in mice in aging. Therefore, low cost and easy-to-operate equipment named “surgical table with mouth prop for rodents” was developed, enhancing access and visibility of the mouth of these animals. The reliability of a method for positioning hemi mandibles in mice was evaluated, since any change in the positioning of the samples compromise the results. Results indicated that the positioner allows a correct visualization, without distortions of the alveolar bone loss area. Seventy-two 3, 6, 9, and 12 month-old CF<sub>1</sub> mice, divided in three groups (males, virgins, and non-virgins [breeding]) were submitted to a mucoperiosteal flap surgery in the buccal aspect of the left mandible. The right aspect was used as control. Alveolar bone loss area was measured and analyzed. Results indicated that CF<sub>1</sub> mice, when submitted to the mucoperiosteal flap surgery, suffer bone loss sex and reproductive status independent. Measuring the area of root exposition, it is possible to visualize a similar pattern resorption both on 3 and 12 month-old animals. We suggest sex and reproductive status independent three month-old CF<sub>1</sub> mouse as a unique and extremely useful model for studies on alveolar bone loss, in aging.

## 1 INTRODUÇÃO

Nunca, em toda a história da humanidade, populações apresentaram expectativas de vida tão altas, fruto, principalmente, de políticas de saúde pública e de medicina preventiva, bem como dos avanços na área da pesquisa científica. Assim como as teorias do envelhecimento, o estado de saúde bucal do idoso transcende os limites biológicos. É composto por requisitos funcionais, estéticos e psicológicos e tem como objetivo maior a qualidade de vida.

Algumas alterações nas estruturas orofaciais podem ser vistas como alterações verdadeiras da idade, outras podem estar relacionadas a doenças ou serem a combinação de ambas.

A perda óssea alveolar é uma alteração que pode ser decorrente do envelhecimento ou da perda dentária (resultante da doença cárie, de traumatismos, de fraturas longitudinais e da doença periodontal), da doença periodontal e de procedimentos cirúrgicos. A redução do rebordo alveolar, pós-extração dentária, foi descrita como "a maior entidade de doença oral", podendo ser agravada quando a altura do rebordo alveolar já encontra-se diminuída previamente à perda dentária. Quando o dente é extraído, a redução do rebordo alveolar ocorre como um processo contínuo e imprevisível que pode resultar em rebordos alveolares irregulares e atróficos. Nestas situações, a reabilitação protética convencional ou implantossuportada é complexa e de difícil execução. A velocidade da perda óssea alveolar varia de indivíduo para indivíduo, no mesmo indivíduo em períodos diferentes e no mesmo período de região para região. É resultante da combinação de determinantes anatômicos, metabólicos e mecânicos.

O impacto na qualidade de vida dos pacientes afetados pela perda óssea alveolar avançada é descrito pelo envelhecimento precoce, caracterizado pela alteração da imagem, humor e dificuldade de relacionamento.

A associação entre envelhecimento e perda óssea alveolar é difícil de ser avaliada em humanos pelos diferentes níveis de higiene, por fatores imunológicos individuais e pela natureza crônica da doença periodontal. Numerosos estudos em animais têm demonstrado correlação positiva entre envelhecimento e perda óssea alveolar.

O retalho muco-periósteo é largamente utilizado na odontologia para obter-se acesso ao osso alveolar e à superfície radicular em procedimentos periodontais, paraendodônticos e cirúrgicos propriamente ditos. Na realização deste retalho, os tecidos moles da papila gengival, incluindo os feixes de fibras colágenas, são incisados e o periósteo é separado do osso alveolar desde a gengiva aderida até a junção muco-periósteo. Vários estudos, em animais, têm relatado perda óssea alveolar após a realização de retalho muco periósteo que inicia com uma atividade de reabsorção acelerada e continua imediatamente com um processo lento de regeneração óssea. Este fenômeno foi descrito em cirurgia ortopédica, por Frost, como *regional accelerated phenomenon* (RAP).

A similaridade do padrão de perda óssea pelo insulto infeccioso da periodontite com a perda óssea proveniente da realização de retalho muco periósteo pode sugerir um padrão comum de reabsorção alveolar que é, possivelmente, determinado pela injúria aos tecidos conjuntivos da gengiva marginal comum em ambos os processos.

O objetivo desta investigação foi criar um modelo para estudo de perda óssea alveolar a partir de um procedimento cirúrgico em camundongos. A busca por este

modelo originou o desenvolvimento de um equipamento e de dois estudos experimentais:

- mesa cirúrgica com dispositivo de abertura bucal para roedores,
- confiabilidade de um método de posicionamento de hemi arcadas mandibulares para quantificação de perda óssea alveolar em camundongos,
- perda óssea alveolar e envelhecimento: um modelo para estudo em camundongos.

Com o intuito de conhecer como a reabsorção óssea alveolar ocorre em várias idades, nos diferentes sexos e entre as fêmeas, em diferentes *status* reprodutivos, estudos foram realizados para o estabelecimento de um modelo que seja utilizável em futuras intervenções que detectem e ou previnam precocemente a perda óssea alveolar no envelhecimento.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 ENVELHECIMENTO E SAÚDE BUCAL

Apesar de ser o envelhecimento um fenômeno comum a todos os animais, é surpreendente que ainda hoje persistam tantos pontos obscuros quanto à dinâmica e à natureza desse processo. Dentro de uma visão biogerontológica, o envelhecimento é conceituado como um processo dinâmico e progressivo. Nele há modificações morfológicas, funcionais, bioquímicas e psicológicas que determinam perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e maior incidência de processos patológicos que terminam por levá-lo à morte.<sup>1</sup> Alguns pesquisadores conceituam envelhecimento como “o que acontece com um organismo com o passar do tempo”. O envelhecimento apresenta como única característica universal a ocorrência de mudanças ao longo do tempo, independentemente de terem ou não efeito deletério sobre a vitalidade e a longevidade.<sup>2</sup>

Os múltiplos aspectos do processo do envelhecimento e da velhice justificam a noção já exposta de que o estado de saúde transcende os limites puramente biológicos, e mais, que, no controle das doenças, o objetivo maior é a melhora da



qualidade de vida.<sup>1</sup>

Nunca, em toda história da humanidade, populações apresentaram expectativas de vida tão altas, fruto, principalmente, de políticas de saúde pública e de medicina preventiva bem como dos avanços na área da pesquisa científica.<sup>2</sup>

O envelhecimento populacional é, hoje, um proeminente fenômeno mundial. Isso significa um crescimento mais elevado da população idosa com relação aos demais grupos etários. O caso brasileiro pode ser exemplificado pelo aumento da participação da população maior de 60 anos no total da população nacional de 4%, em 1940, para 9%, em 2000.<sup>3</sup> O ciclo do envelhecimento, que na Europa levou quase dois séculos, aqui estará terminando em meados do próximo século, ou seja, na metade do tempo. Em termos práticos, no ano de 2025, o Brasil terá a sexta maior população de idosos do mundo (cerca de 32 milhões de pessoas com 60 anos ou mais).<sup>4</sup>

A grande heterogeneidade existente entre os idosos, nos aspectos morfológicos, funcionais, psicológicos e sociais, decorrentes, entre outros fatores da grande amplitude desta faixa etária, que começa cronologicamente aos 60 anos e atinge 100 anos de idade ou mais, tem originado questionamentos sobre o conceito de normalidade, quando se faz referência à população idosa. Por outro lado, é conhecido o fato de que o ritmo de declínio das funções orgânicas varia de um órgão a outro, mesmo entre idosos que têm a mesma idade. Esta observação justifica a impressão de que os fatores determinantes do envelhecimento produzem efeitos diferentes de uma pessoa a outra.<sup>5</sup> São reconhecidas, hoje, duas formas distintas de envelhecimento: o usual ou comum e o bem-sucedido ou saudável.<sup>6</sup> Admite-se que, na forma de envelhecimento comum, os fatores extrínsecos, como tipo de dieta, sedentarismo e causa psicossociais, intensificariam os efeitos adversos

que ocorrem com o passar dos anos, enquanto na forma de envelhecimento saudável estes não estariam presentes ou, quando existentes, seriam de pequena importância. A crença sobre a importância desses fatores se acha expressa na ênfase que, atualmente, tem sido dada para o potencial benéfico dos exercícios, para a moderação na ingestão de bebidas alcoólicas, para a cessação do hábito de fumar, para a observância de dieta adequada, entre outras medidas.<sup>6</sup>

O preparo para uma velhice saudável deve iniciar-se por volta dos 30 anos de idade, com medidas preventivas, mantidas com constância, por toda a vida.<sup>7</sup> Já para outros autores, os cuidados contra o envelhecimento comum devem começar desde o nascimento.<sup>8</sup>

Um grande número de teorias busca explicar a complexidade do processo de envelhecimento. Estas teorias foram divididas em biológicas, psicológicas e sociológicas.<sup>2</sup> As biológicas, em estocásticas e sistêmicas.<sup>9</sup> Porém nenhuma destas teorias consegue sozinha explicar o processo. Provavelmente um conjunto delas explique partes isoladas do processo de envelhecimento.

Assim como as teorias do envelhecimento, o estado de saúde bucal do idoso transcende os limites biológicos. É composto por requisitos funcionais, estéticos, psicológicos e sociais e tem, como objetivo maior, a qualidade de vida. Alguns estudos têm relacionado, em idosos, a capacidade mastigatória com qualidade de vida. Miura, ao estudar idosos japoneses, encontrou resultados que sugerem que a capacidade mastigatória está relacionada com os níveis de atividade na vida diária. A saúde oral não é apenas uma condição física, mas também social. Ela é um elemento vital para a saúde em geral do idoso.<sup>10</sup>

O sistema estomatognático funciona como a primeira parte do processo digestivo, reduzindo os alimentos para que os nutrientes possam ser bem

aproveitados pelo organismo. Se um indivíduo corretamente alimentado consegue cuidar de sua reparação mais satisfatoriamente e se um organismo bem equilibrado vive por mais tempo, podemos dizer que os dentes, mantidos pelo máximo de tempo, ajudam de forma praticamente direta na obtenção de uma longevidade mais saudável.<sup>11</sup>

A literatura mostra claramente que idosos procuram cirurgiões dentista com menos freqüência que qualquer outro grupo etário, ainda que apresentem necessidades de tratamento odontológico.<sup>7</sup> A nova geração de pessoas idosas terá, provavelmente, necessidades diferentes em decorrência da odontologia preventiva oferecida desde o século passado.<sup>12</sup>

Algumas alterações nas estruturas orofaciais podem ser vistas como alterações verdadeiras da idade, outras podem estar relacionadas a doenças ou serem a combinação de ambas. Estas alterações variam de indivíduo para indivíduo de acordo com suas condições físicas e psíquicas e no mesmo indivíduo em tempos diferentes, dentro da terceira idade.<sup>7</sup>

Alterações estruturais nas glândulas salivares ocorrem com o decorrer da idade. Células acinosas responsáveis pela produção de saliva são substituídas por gordura ou tecido conjuntivo.<sup>13</sup> Estas alterações não causam diminuição do fluxo de saliva funcional.<sup>14,15</sup> A diminuição de saliva funcional é ocasionada, geralmente, por ação medicamentosa ou em decorrência de doenças como Diabetes, Parkinson, Alzheimer, Síndrome de Sjögren e Radioterapia de Cabeça e Pescoço.<sup>16</sup> A ausência ou diminuição da secreção salivar permite o aparecimento de cáries rampantes, candidíase, disfagia, desconforto para mastigar<sup>17</sup> e dificuldade para usar próteses. A alteração do paladar também é relatada.<sup>18,19</sup>

Alterações na mucosa oral, relacionadas à idade, são semelhantes às que acontecem na pele, perda da elasticidade e da textura superficial e a impressão de que os tecidos tornam-se adelgaçados.<sup>20</sup> Uma maior frequência no aparecimento de varicosidades sublinguais e grânulos de Fordyce pode ser o resultado clínico da diminuição da espessura do epitélio. A maioria das alterações da mucosa que ocorrem na terceira idade são patológicas na sua essência e, portanto, alterações como língua saburrosa, língua pilosa, glossite papilar mediana, queilites angulares, estomatites por próteses, lesões brancas diversas e língua geográfica são freqüentemente observadas em levantamentos estomatológicos em idosos.<sup>21</sup> Além disso, a mucosa pode refletir diversas condições alteradas no organismo do idoso.<sup>22</sup>

A estrutura das fibras periodontais torna-se mais irregular com o envelhecimento e o cemento que é depositado continuamente na superfície radicular aumenta com a idade. A resposta aos microorganismos da placa muda com o envelhecimento, resultando numa maior resposta inflamatória dos tecidos gengivais. Entretanto, não há evidências de aumento da susceptibilidade à progressão da doença periodontal em idosos saudáveis.<sup>20</sup> Os dados disponíveis sobre a epidemiologia da doença periodontal na América Central e do Sul apontam para uma baixa prevalência (-10%) e baixa severidade da doença periodontal entre indivíduos idosos no Brasil.<sup>23</sup>

Os dentes apresentam sinais de mudanças com a idade, principalmente na forma e na cor. A mudança na cor é um reflexo direto do envelhecimento. Alterações na forma incluem aquelas produzidas ou associadas a desgastes, cáries e hábitos dos pacientes.<sup>24</sup> A cárie radicular é freqüente nos pacientes idosos e está associada à diminuição da secreção salivar e à exposição cervical dentária.<sup>25,26</sup> Perdas de tecidos mineralizados dentários podem ser resultante dos processos de erosão,

atrição e abrasão, isolados ou combinados.<sup>27</sup> Dependendo do grau de envolvimento da estrutura dentária, o tratamento restaurador e/ou a reabilitação protética é difícil e, muitas vezes, a perda dentária é inevitável.<sup>28</sup>

Evidências científicas demonstram que a perda dentária não pode ser considerada parte do processo de envelhecimento.<sup>29,30</sup> Apesar disto, o edentulismo, em muitos países, está associado à idade, além de estar associado a outros fatores sociais como, educação, classe social, renda e ao local de moradia. O número de pessoas desdentadas aumenta com relação à idade, em decorrência dos efeitos cumulativos das doenças cárie e periodontal.<sup>29</sup> A perda dentária é o resultado final de uma saúde bucal pobre.<sup>23</sup>

A principal consequência local da perda dentária é a reabsorção do rebordo residual. A redução do rebordo residual (RRR) após a extração dentária é crônica, progressiva e incurável.<sup>20</sup> A RRR inicia no processo de cicatrização que inclui restauração da integridade epitelial, reabsorção óssea das margens do alvéolo e formação de tecido ósseo dentro do alvéolo. Após este período inicial de cicatrização, a velocidade da reabsorção óssea diminui,<sup>31</sup> mas este processo é contínuo e imprevisível.<sup>32</sup> A redução da crista residual pode resultar em rebordos irregulares, produzindo uma base sem estabilidade, retenção e suporte para a prótese total<sup>33</sup> ou insuficiência óssea para o uso de implantes.<sup>34</sup> A perda da estrutura alveolar prévia, fisiológica ou patológica, a perda dentária, tem sido considerada como um dos fatores que dificulta a reabilitação protética.

O grau de reabsorção do rebordo residual é resultante de determinantes anatômicos, metabólicos e mecânicos.<sup>35</sup>

Possíveis medidas preventivas à reabsorção do rebordo residual incluem terapia hormonal,<sup>36</sup> intervenção nutricional,<sup>37</sup> manutenção dentária<sup>20,38,39</sup> e reposição

dentária por próteses implantossuportadas.<sup>40,41</sup>

O uso de drogas de aplicação sistêmica ou local na prevenção da reabsorção tem sido estudado em animais de laboratório.<sup>42-52</sup> Os resultados promissores sugerem o uso destas em procedimentos onde a reabsorção óssea alveolar é esperada.

## 2.2 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido vivo e dinâmico, que está envolvido em duas funções básicas: prover a integridade mecânica para a locomoção e proteção e mediar rotas metabólicas que estão associadas à homeostase mineral. Apesar do aspecto aparentemente inerte, os ossos crescem, são remodelados e se mantêm ativos durante toda a vida do organismo. Aproximadamente 0,7% do esqueleto humano é reabsorvido diariamente e substituído por osso novo.<sup>53</sup>

A formação, reabsorção, remodelação e homeostase óssea são mediadas por três tipos celulares: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.<sup>54-56</sup> Os osteoblastos são células produtoras de moléculas da matriz orgânica do osso cujo componente mais abundante é o colágeno do tipo I. Por esta razão, essas células apresentam as características ultra-estruturais típicas da sua função, isto é, a síntese e secreção de macromoléculas da matriz. Os osteoblastos, quando não estão formando matriz, são denominados células de revestimento ósseo, podendo voltar à síntese e secreção de matriz se surgirem necessidades para nova formação óssea. Também funcionam como receptores e transmissores de sinais para remodelação.<sup>54</sup>

O osteócito é um osteoblasto maduro dentro da matriz óssea, sendo responsável pela sua manutenção, é a célula mais abundante do osso. O papel preciso dos osteócitos ainda é incerto. Existe a possibilidade destas células estarem

envolvidas na regulação biomecânica da estrutura e massa óssea.<sup>57</sup>

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas que possuem a atividade de reabsorver os tecidos mineralizados como o osso, a dentina e as cartilagens. A reabsorção dos tecidos mineralizados é obrigatória para a maturação normal do esqueleto, incluindo o crescimento e o remodelamento ósseo, bem como a erupção dentária. No entanto, tem sido discutido que a necessidade da reabsorção óssea é oriunda da importância de se manter a homeostase do cálcio e da hematopoiese e que estas células de reabsorção teriam sido, originalmente, desenvolvidas para apoio destas funções vitais.<sup>58</sup> Acredita-se que os progenitores dos osteoclastos são de origem hematopoiética, talvez da linhagem monócito-fagocítica, sendo estes recrutados de tecidos hematopoiéticos como a medula óssea via sangue circulante.<sup>54,59</sup>

Ao longo da vida, o osso cortical e o esponjoso estão, constantemente, sendo repostos, seja por situações fisiológicas ou patológicas. Fenômenos simultâneos ou seqüenciais de formação e de reabsorção óssea constituem o processo de remodelação.<sup>60,61</sup> É provável que a principal razão para que ocorra este processo seja a de capacitar o osso a responder e se adaptar ao estresse mecânico. O remodelamento também permite ao osso reparar micro fraturas, mantendo assim sua dureza e participar do metabolismo mineral sérico.<sup>55</sup> A velocidade de reabsorção e a velocidade de formação óssea são iguais, de modo que a massa óssea total permanece constante. Em estados patológicos, ocorre um desequilíbrio, prevalecendo um dos processos.<sup>62</sup>

O processo alveolar é definido como as partes da maxila e da mandíbula que formam e dão suporte aos alvéolos dos dentes. Consiste em osso que é formado tanto pelas células do folículo dentário (osso alveolar propriamente dito) como por

células não envolvidas no desenvolvimento dentário.<sup>53,54,61</sup>

O osso alveolar é a porção do osso que faz parte do periodonto de inserção dos dentes.<sup>54</sup> É formado quando o dente faz sua erupção (simultaneamente com a formação do cemento e do ligamento periodontal) e está sujeito a um processo de atrofia, reduzindo-se progressivamente após a perda dentária.<sup>32,33</sup>

A relação idade e alterações ósseas é um fenômeno que afeta todo o esqueleto. Entretanto, o padrão difere de osso para osso e entre diferentes revestimentos ósseos.<sup>63</sup>

Em decorrência de variáveis como sexo, nível de atividade física, história óssea e nutrição, o comportamento ósseo, durante o processo de envelhecimento, é muito variável e individual.<sup>64</sup>

### 2.3 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR

Em circunstâncias normais, a reabsorção é igual à formação, mantendo constante o volume e a massa óssea. Por razões fisiológicas e/ou patológicas, um desequilíbrio, como a diminuição na formação em relação à reabsorção, causa a perda óssea.<sup>14,53,54</sup>

A velocidade da perda óssea alveolar pode variar de indivíduo para indivíduo, no mesmo indivíduo em períodos diferentes e no mesmo período de região para região.<sup>32,33</sup>

Segundo Budtz-Jørgensen, os fatores envolvidos na reabsorção óssea alveolar são divididos em locais e gerais. Os locais são: exposição cirúrgica do osso, perda do ligamento periodontal, período de edentulismo, carga excessiva de compressão sobre o rebordo, uso noturno de prótese e instabilidade oclusal. Entre



os sistêmicos podemos citar a osteoporose associada ao sexo, à idade e à nutrição, bem como à deficiência de cálcio e vitamina D.<sup>20</sup>

A exposição cirúrgica do osso é realizada em muitos procedimentos para obter acesso à superfície radicular, no tratamento cirúrgico restaurador, periodontal, paraendodôntico, reabilitador, na colocação de implantes e na remoção cirúrgica de dentes e/ou processos patológicos entre outros.

A reabsorção do osso alveolar causada pela exposição cirúrgica do osso tem sido avaliada em animais de laboratório. Esta reabsorção é chamada de Fenômeno Regional Acelerado, em inglês, *Regional Accelerated Phenomenon* (RAP).<sup>65,66</sup>

O RAP, estágio prévio à cicatrização no osso alveolar, pós-exposição cirúrgica do osso, foi avaliado por Yaffe e colaboradores que realizaram cirurgia de descolamento mucoperiósteo em ratos Wistar. A maior reabsorção foi observada aos 21 dias pós-cirurgia. Através deste estudo, foi criada uma metodologia para estudo de perda óssea alveolar. A análise histológica também demonstrou o RAP.<sup>67</sup> Este fenômeno foi observado por ortopedistas em ossos longos,<sup>65,66</sup> após cirurgia de colocação de implantes<sup>68,69</sup> e é responsável pelo aumento da mobilidade dentária imediatamente após cirurgias periodontais.<sup>70</sup>

Uma investigação comparou a perda óssea alveolar em dois tipos de incisão realizadas no processo alveolar de ratos Wistar. Em um grupo, o retalho mucoperiósteo foi realizado com aproximação coronal (COR) na altura da gengiva marginal e no outro grupo, com aproximação apical (AP) na altura do ápice das raízes dos molares inferiores. Análises micro-radiográficas vestibulares e linguais em secções transversais na altura dos molares, bem como a avaliação histológica, mostraram não haver perda óssea alveolar significativa na aproximação apical. Os resultados deste estudo mostram que no osso alveolar, diferentemente dos ossos

longos, somente o desnudamento através do descolamento do periósteo não é suficiente para produzir perda óssea, é necessária a interrupção da integridade da gengiva marginal.<sup>71</sup>

A utilização de drogas na prevenção e/ou minimização da perda óssea alveolar vem sendo estudada em ratos. A administração sistêmica e/ou em aplicações tópicas de amino bifosfonato,<sup>42,43</sup> alendronato,<sup>44,46,49,50</sup> bifosfonatos heterocíclicos (V55, V5-6 e ISA-13),<sup>45</sup> tetraciclina,<sup>47</sup> e doxicilina<sup>51,52</sup> foram avaliadas na prevenção da reabsorção óssea alveolar. Usando a metodologia descrita por Yaffe e colaboradores,<sup>67</sup> os resultados obtidos foram promissores e os autores sugerem o uso destas em procedimentos onde a reabsorção óssea é esperada.

Al-Rasheed e colaboradores buscaram um modelo animal para estudar a perda óssea alveolar. Camundongos machos com deficiência de interleucina-10 e normais foram utilizados. Ao completar 7 meses, os animais foram sacrificados e as hemimandíbulas medidas para perda óssea alveolar. Os resultados permitiram concluir que camundongos com deficiência de interleucina-10 perdem de 30 a 40% mais osso alveolar que os normais. Os autores sugerem estes como modelo para estudos de perda óssea alveolar.<sup>72</sup>

A relação entre osteoporose e perda óssea alveolar foi investigada em ratas fêmeas de quatro semanas, ovariectomizadas e não ovariectomizadas, que receberam dieta com deficiência de cálcio e normal. Após quatro semanas, os animais foram sacrificados e a perda óssea alveolar medida da junção amelocementária à crista óssea, no centro da raiz mesial dos três molares. A densidade óssea mineral nos ossos, mandíbula, maxila, fêmur e tíbia foi calculada. Os resultados indicaram que a osteoporose experimental (ovarectomia e dieta deficiente em cálcio) induz redução na densidade óssea mineral no esqueleto e no

osso alveolar de ratas, mas não induz perda óssea alveolar. Os autores concluíram que osteoporose sozinha não é capaz de causar destruição do osso alveolar dentário.<sup>73</sup>

#### 2.4 PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E ENVELHECIMENTO

Para avaliar o osso alveolar, camundongos machos jovens e velhos foram sacrificados e as mandíbulas dissecadas e divididas na linha média. Além da mandíbula, a tíbia e a fíbula foram fixadas em formalina 10%. A análise histológica quantitativa e qualitativa demonstrou alteração durante o processo de envelhecimento no periodonto e na tíbia. Os dados sugerem que a perda óssea nos camundongos velhos está mais relacionada ao processo de envelhecimento do que à doença periodontal.<sup>74</sup>

As alterações nas estruturas periodontais foram estudadas em ratos machos. Os animais foram sacrificados aos 30 aos 90 dias de vida. Os dados da análise histológica sugerem que a distância entre a junção cimento-esmalte e o limite osso alveolar cimento aumentou, primeiramente, na face lingual e depois na face vestibular.<sup>75</sup>

A perda óssea alveolar foi avaliada em ratos resistentes e propensos ao envelhecimento acelerado. Os animais foram sacrificados com um, seis, doze e dezesseis meses de vida e avaliados para determinar a perda óssea alveolar nos molares inferiores e superiores. Os resultados mostraram que a perda óssea alveolar aumenta gradualmente com o avançar da idade. Os animais propensos ao envelhecimento mostraram elevada perda óssea ao redor de todos os molares desde o primeiro mês de idade e em todo o tempo de vida.<sup>76</sup>

Messer avaliou a perda óssea alveolar em duas linhagens de camundongos machos (STR/N e SW) entre três e 18 meses. Após análise morfométrica das áreas interdentais e inter-radiculares, concluiu que a perda óssea alveolar progressiva e severa aumenta com o envelhecimento nos camundongos STR/N, o que não foi observado nos camundongos SW. A ocorrência de perda óssea nos camundongos STR/N sugere que esta linhagem é adequada para estudar mecanismos de perda óssea alveolar e fatores capazes de modificar esta perda.<sup>77</sup>

As alterações no periodonto de ratos foram analisadas histologicamente quanto à idade (21-1000 dias). Na análise de perda óssea alveolar, os dados indicaram um lento aumento da distância entre a crista óssea alveolar e a junção cimento-esmalte com o envelhecimento.<sup>78</sup>

Por outro lado, Gilmore e Glickman avaliaram as alterações no periodonto de camundongos (fêmeas virgens) de um a dezesseis meses. Concluíram que por causa da prevalência de inflamação gengival não foi possível determinar se a tendência de migração do epitélio juncional foi decorrente da idade ou estimulada pelos irritantes locais. A formação de bolsa periodontal e a reabsorção óssea associada parece ser um processo patológico, muito mais do que uma alteração fisiológica do envelhecimento.<sup>79</sup>

Buscando um modelo animal para estudar perda óssea alveolar, Tatakis e Gugliemoni investigaram ratos transgênicos (HLA-B27) e não transgênicos. Os animais de 6, 8 e 12 meses foram sacrificados, dissecados e a perda óssea alveolar medida pela área de exposição radicular. Os resultados mostraram uma maior perda nos ratos de 12 meses transgênicos. Não houve diferença significativa entre o macho, a fêmea virgem e a com parições. Os autores concluíram que ratos transgênicos (HLA-B27) são susceptíveis à perda óssea alveolar espontânea em um

processo sexo independente e idade dependente.<sup>80</sup>

Tradicionalmente, os estudos sobre perda óssea alveolar têm sido realizados ao longo dos anos em modelos animais. Os modelos animais mais comumente utilizados têm sido ratos e camundongos com o objetivo de investigar o processo de perda óssea alveolar,<sup>48,67,71-80</sup> bem como estudar possibilidades de prevenir ou minimizar esta perda.<sup>42-47,49-52</sup> O grande número de experimentos sugere a complexidade deste processo, o que determina uma busca por um modelo simples.

Selvig, em seu artigo sobre modelos animais em terapias regenerativas, deixa claro que as respostas obtidas em experimentos com animais não necessariamente implicam em que o mesmo tratamento produza resultados semelhantes em humanos, portanto é necessário ter consciência dos limites dos estudos em animais.<sup>81</sup>

O modelo experimental desenvolvido neste estudo segue a Lei 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências,<sup>82</sup> e pelas normas da Comissão de Pesquisa e Ética da PUCRS.<sup>83</sup>

O objetivo desta investigação foi criar um modelo para estudo de perda óssea alveolar no envelhecimento. Portanto, foi necessário definir um modelo animal experimental que apresentasse tempo de vida curto.<sup>84,85</sup> A utilização de camundongos machos, fêmeas virgens e com parições visou eliminar variáveis hormonais, alterações de Ca<sup>86,87</sup> decorrentes do *status* reprodutivo e outras alterações decorrentes do envelhecimento nos dois sexos.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Criar um modelo para estudo de perda óssea alveolar a partir de um procedimento cirúrgico em camundongos no envelhecimento.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos são:

- a) desenvolver uma mesa cirúrgica para estudos em animais de laboratório (roedores), com dispositivos que viabilizem o acesso à cavidade bucal;
- b) validar uma metodologia para posicionamento de hemi-arcada de camundongos, para medição da perda óssea alveolar;
- c) analisar o comportamento, através da análise morfométrica (face vestibular e lingual) do osso alveolar submetido ao estresse cirúrgico (retalho mucoperiósteo com aproximação coronal) em camundongos de 3, 6, 9 e 12 meses, machos, fêmeas virgens e com parições.

## **4 ARTIGOS**

### **4.1 ARTIGO 1 - SURGERY TABLE WITH MOUTH PROP FOR RODENTS**

A formatação do artigo está de acordo com as instruções para pedido de patente junto ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), por intermédio da Agência de Gestão Tecnológica (AGT/PUCRS).

**Abstract**

Laboratory animal research represents a remarkable source of information. Rodents are often used as an experimental model for studies in the medical field, showing several advantages. The access to the oral cavity, allows to examine and perform surgical, restorative procedures. The application of topic substances on hard tissues and mucosa is also possible. Literature reports mouth opening systems both for animals and humans, but they are not available in the Brazilian market. Therefore, researchers must improvise methods that allow the access to the oral cavity, which may, several times, compromise the experiment. The purpose of this article is to introduce an inexpensive and easy-to-use surgery table containing a device for rodents mouth opening, which favors the approach and viewing of the oral cavity, maintaining mouth opening and spreading the cheeks apart, allowing free access to the oral structures.

**Key words:** rodents, surgery table, mouth prop



## Introduction

Laboratory animal research shows a remarkable source of information. Rodents are often used as experimental models in studies in the biomedical field<sup>1</sup> showing such advantages as: they are mammals; they are small in size; their reproduction, care handling and acquisitions are easy; and the cost for acquisition and maintenance is low.<sup>2</sup> Further, mice present a short life span, making them an attractive model for research on the biology of aging<sup>1</sup>.

Dentistry is a science that quite often use rodents for studies on oral biology, not only for the anatomic resemblance of molars and oral structures, but as well for the similarities in physiological responses during their handling.

The access to the oral cavity of these animals allows to examine and to perform surgical and restorative procedures, as well as the application of topic substances both on hard tissues and on mucosa<sup>2</sup>. The size of teeth and structures that belong to the oral cavity, as well as the posterior location of molars, creates difficulty for access and viewing.

Literature reports systems for oral opening both for animals<sup>3-7</sup> and humans<sup>8-12</sup>. The described systems for use in animals are too old in the literature and are not available in the Brazilian market. Some of these described devices<sup>3,4,6</sup> show, as an advantage, the fact of allowing the performing of experiments without anesthesia, which is today completely unacceptable according to the rules for ethics in animal research. This way, researchers must improvise methods that allow them to have access to the oral cavity<sup>13</sup>. Several times these methods make the viewing difficult, compromising the reliability of the experiment, injuring the animal, and, quite often, killing it by asphyxiation.

The aim of this article is to introduce an inexpensive and easy-to-use surgery table containing a device for rodents' mouth opening. The equipment allows the placing of the animal under anesthesia in such an inclination that the viewing of the oral cavity is favored, maintaining the maxilla far from the mandible (not to the maxim opening which could obstruct the breathing), as well as spreading the cheeks apart, allowing free access to the oral cavity. This equipment facilitates scientific research in the medical, veterinarian and dentistry fields. In the dentistry field, literature describes the use of rodents in the periodontal, cranium-facial biology, pharmacology, pulp biology, stomatology and oral geriatrics fields. A major part of the research aimed to understand the nature and the etiology, as well as to find out treatments for oral diseases, depends on the use of laboratory animals.

### **Description and operation**

The surgery table is compounded of a 20 X 25 cm base, over which a white acrylic centered platform measuring 18 X 12 cm is coupled, having 5 cm in height in the posterior portion and 8 cm in height in the anterior portion. In the anterior portion of the platform, five 1 cm pins are fixed at 1 cm from the base, regulating the length of an elastic band (5 cm in diameter), which holds the upper incisors of the animal. In the posterior portion of the base, a 10 cm vertical metallic rod is centrally attached. A 0.8 mm in diameter, 15 cm in length metallic stainless steel wire emerges from the end of this rod, having a curved, hook-like end. This end is attached to another elastic band measuring 2 cm in diameter, which is placed on the lower incisors of the rodents. An optical fiber cable is coupled to this same vertical rod, extending over the platform at a height of 10 cm, connected to a 21 V, 150 W halogenous light source.

Laterally to the platform, four centimeters far from the anterior portion, two vertical rods are attached, one at each side, measuring 10 cm. These rods regulate the positioning of the lateral openers through the use of fixing screws that can be adjusted both on vertical and horizontal direction. It is possible to keep the animal's abdomen in position by means of an elastic band (5 cm in diameter) that is also attached to the lateral rods. Grooves in the lower portion of the rods regulate the tension on the elastic.

The placing of the animal is performed in approximately five seconds.

## References

- 1-Brookbank JW. Aging in mammals. In: Brookbank JW. The biology of aging. New York: Harper & Row Publishers;1990. p.40-61.
- 2-Jordan HV. Rodent model systems in periodontal disease research. J Dent Res 1971; 50:236-42.
- 3-Rizzo AA. A new mouth prop for oral examinations and operative procedures in rodents. J Dent Res 1959 July-Aug;38(4):830-32.
- 4-Moss RL, Collins TA, Cole DF. A new apparatus for intraoral manipulations in the hamster. J Dent Res 1965 July-Aug;44:668-70.
- 5-Houston WJB. A new design of rat mouth prop. J Dent Res 1964 May-Jun;43:458.
- 6-Johansen E. A new technique for oral examination of rodents. J Dent Res 1952;31:361-65.
- 7-Amann G. Mouth retractor for special feeding of rats. Med Lab 1963 Jan; 16:17.
- 8-Hayton-Williams DS. Mouth prop for oral endotracheal anaesthesia. Lancet 1965 Feb;40:469.
- 9-Clark DP, Dierks EJ. Self-retaining retraction for third molar surgery using a molt mouth prop, a wieder retractor, and a towel clip. J Oral Maxillofac Surg 2002;60:1215.
- 10-Walker RS. Custom-made mouth prop. J Prosthet Dent 1996 Apr;75 (4):472.
- 11-Martinez CR. Custom finger guard-mouth prop as an alternative to conventional mouth props. J Am Dent Assoc 1977 Oct;95(4):804-6.
- 12-Bazan MT, Ellard JD. A combination mouth prop-suction device Spec Care Dent 1983 July-Aug;3(4):164-5.

13-Waynforth HB. Basics of surgery. In: Tuffery AA. Laboratory animals: an introduction for experimenters. 2<sup>rd</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 1996. p.351-73.

#### 4.2 ARTIGO 2 - RELIABILITY OF A POSITIONING METHOD OF HEMI MANDIBLES FOR QUANTIFICATION OF ALVEOLAR BONE LOSS IN MICE

A formatação do artigo está de acordo com as instruções para autores do *Journal of Periodontal Research* (Qualis A Internacional/Capes 2003) que está indexado ao Medline.

**Objective:** The purpose of the present study was to determine the reliability of a positioning method for quantification of ABL in mice.

**Background:** Standardization of the measuring methodology is not frequently performed in alveolar bone loss (ABL) studies.

**Material and methods:** Mucoperiosteal flaps were performed on CF<sub>1</sub> *Mus domesticus* mice on the buccal aspects of the left side of the mandibles. Twenty-one days after surgery animals were killed, mandibles were defleshed and stained to locate the area to be measured. A positioner was created to keep a standard of the hemi mandibles positioning. The consistency of the positioning was analyzed in two series of pictures. The photographs were digitalized and ABL was measured as the exposed root surface area. Blinded measures were performed using a computer-assisted image analysis system.

**Results:** The analysis of reliability proposed by Bland and Altman demonstrates that the mean of differences was located between -1.5 and +1.33, intra and inter examiners, in the assessment of one mandible only. In the group's analysis, the mean of differences slightly increased, and this was probably due to the variation of ABL among the animals, but it was still located within the limits of agreement of 95%.

**Conclusions:** The positioner allows a consistency on the placing of hemi mandibles without distortions in the area of alveolar bone loss. This suggests that this can be a useful device for positioning hemi mandibles in studies of ABL.

**Running title:** reliability of a positioner for mice's mandibles.

**Keywords:** alveolar bone loss, reproducibility of results, mice.

## Introduction

Rodents are frequently used as an experimental model for the evaluation of alveolar bone loss. Several techniques for measuring alveolar bone loss based either on quantification or on scoring have been proposed. (1-8)

Earlier studies, where alveolar bone loss had been quantified, described techniques based on vertical measures from the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar bone in points aligned with the cusps' vertex. These measures were directly performed on the samples, with the aid of a millimetered ruler, (4) or on photographs, (2) where the measures were tabulated according to scores. In other techniques, other reference points were used for the vertical measures from the CEJ to the alveolar bone, such as: the center of mesial and distal molar roots, (3,5,6) of mesial roots only, (7) or in furcation areas. (1) The measure of total root exposition area in mm<sup>2</sup> was described by Gaegauf-Zollinger (1) and was later improved. (8,9) Aiming to make both the visualization of the exposed root area and the marking easier, substances as Indian ink, (2,4) 1% methylene blue, (3,8) 1% toluidine blue, (9) and silver nitrate(1,3) are mentioned. Standardization in the positioning of hemi mandibles to be measured is essential. Any changes on the inclination of the sample cause distortions of the alveolar bone loss area, compromising the results reliability.

The amount of variation that exists in repeated measures of the same sample, which is a property known as reliability, is affected by the random error. The reliability assessment is done by means of the assessment of the consistency of the following measures: intra examiner reproducibility and inter examiners' reproducibility. (10)



The aim of this study was to determine the reliability of hemi mandibles positioning method for quantification of alveolar bone loss in mice.

## **Material and methods**

### **Study design and experimental procedure**

Ten male, three-month-old CF<sub>1</sub> *Mus domesticus* mice were used in this study. The protocol of this experiment was carried out in accordance with the Committee of Ethics in Research of the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Animals were obtained, maintained, and handled during the experimental phase at the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul.

After the weaning, animals were maintained in individual cages and received distilled water and rations *ad libitum* during the three months of study. Standard conditions of light (12-24 h light / dark cycle) and temperature (approximately 20°C) were kept during the experiment.

Three months old animals were weighted and were intramuscularly anesthetized (ketamine 100 g/l\* + 2% aqueous solution of 2-(2,6-xilidine)-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine hydrochloride,† in the ratio of 1:1, in a dosage of 1,0 ml/kg). A mucoperiostal flap was performed on the buccal aspect of the lower left molars. The mucosa was separated from the underlying bone after a incision at the marginal gingival with the aid of a small elevator, and was immediately readapted, without any suture.(11) The procedure was performed in approximately 40 seconds. The right aspect served as a control. Animals received only water during the initial 24 hours to

---

\* Dopalen, Agribbrands do Brasil Ltda, Paulina, Brasil

† Rompun, Bayer S.A., São Paulo, Brasil

avoid the flap's displacing. Twenty-one days after the surgical procedure, animals were killed by means of cervical dislocation under anesthesia. Mandibles were divided along the medium line, defleshed, and all organic material was removed with the aid of sodium hypochloride applied with a brush. Sections were then stored in 10% buffered formalin for 12 hours. (12)

### **Analysis of the reliability of alveolar bone loss measures in hemi mandibles with a standardized positioning**

Each hemi arch was stained with 1% toluidine blue to make limits of enamel, cementum, and bone evident. Two series of photographs were done. In the first series (S1), one right and one left hemi mandible of the same animal were photographed 30 times on the buccal and lingual aspect. All the 120 pictures were taken by repositioning the sample at every picture taken. In the second series (S2), 10 right hemi mandibles (control) had their buccal and lingual aspects photographed. Pictures were done under magnification (X2.5), standard illumination and positioning, in a stereomicroscope<sup>‡</sup> with conventional film<sup>§</sup>. The positioning of the buccal aspects was assured by means of a plain positioner, while a positioner aiming to compensate the mice mandibular anatomy was developed for the lingual aspects. Buccal and lingual positioner aligned buccal and lingual cusps between themselves in a perpendicular position to the long axis of the stereomicroscope's focus.

The lingual positioner was built with a polivynilsyloxane block (2X2X1 cm), having an anterior 12° angulation and a lateral 5° angulation, and two centimeter-long metallic rods were placed one centimeter far from each other, functioning to

---

<sup>‡</sup> B201, Olympus, Olympus América Inc., NY, USA.

<sup>§</sup> Kodak Ultra 135 ASA 100, Kodak Brasileira Comercio e Indústria Ltda, Manaus, Brasil.

attach the hemi mandibles to the positioner. (Fig.1) Later, the pictures were digitalized with a table scanner, and were processed with image analysis software\*\*.

Two independent and previously trained examiners performed two measures of each sample with an interval of one week between the measures. The alveolar bone loss area was defined as follows (Fig.2): mesially, by the mesial edge (CEJ to alveolar bone) of the mesial root of the first molar; distally, by the distal edge (CEJ to alveolar bone) of the distal root of the second molar tooth; coronally, by three points on each of the two molar teeth: two points defined by the position of the CEJ on the mesial and distal aspects of the tooth and one defined by the most apical position of the CEJ on the surface of the tooth; and apically, by the most apical position of the alveolar bone on the first and second root surfaces. Results are shown in mm<sup>2</sup>. (9)

### **Statistical analysis**

The statistical approach used for reliability analysis of alveolar bone loss measures was proposed by Bland and Altman for assessment of continued data reliability of continuous data. (13) In this study, data obtained from pairs of repeated measures of the same digitalized images were analyzed. The reliability of the proposed methodology was expressed by means of plotting of the differences for each pair of observation, compared to the mean values of intra and inter examiners' pair of observations performed; of the mean and standard deviation of the intra and inter examiners' measures differences (reliability); and of the limits of agreement of 95% between the intra and inter examiners' observations. (13,14) The analysis was performed with graphic analysis software<sup>††</sup>.

---

\*\* UTHSCSA Image Tool version 2.02 (available for download at <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>).

†† GraphPad Prism version 4.00 for Windows. (GraphPad Software, San Diego, California, USA.)

## Results

Table 1 shows the mean of differences and the limits of agreement of the measures performed in the digitalized images of both buccal and lingual aspects of first series photographs. The reliability of all assessed variables was excellent both in the intra examiner observation as in the inter examiners observations. The means of the differences were located between -1.5 and 1.33, and the limits of agreement were small, varying from -4.77 (inter examiner, buccal aspect, control) to 5.51 (intra examiner 1, buccal aspect, operated). The Bland and Altman's graphic shows the inter examiners' differences in relation to the mean of each pair of measures and the interval of confidence of 95% for the variable alveolar bone loss in the operated buccal aspect.(Fig.3)

The reliability results of the alveolar bone loss measures in different animals are shown on Table 2. The mean of differences and the limits of agreement in the samples of buccal and lingual aspects were bigger, mainly on the lingual ones, resulting in wider limits of agreement. However, Bland and Altman's graphics obtained from these data show that the major part of the mean of differences between the pairs of measures was located within the intervals of confidence of 95%. (Fig.4)

## Discussion

The present study evaluated the reliability of a method of positioning hemi mandibles for quantification of alveolar bone loss (ABL) in mice. The results obtained in S1, without ABL variation, indicated that the lingual aspect's positioner allows the placing of hemi mandibles in a position where the measures can be performed without distortions, and the mean was situated between -1.03 and +1.03 (inter

examiners, Table 1). Similar results were also found by Hilgert and Tatakis and Guglielmoni, who reported the concern with the perpendicular positioning of the lingual aspect in relation to the microscope's focus. This concern is not reported in the majority of the studies about alveolar bone loss, (1,2,4-7) and this lack of concern is confirmed by the images. (4,5) Independently of the measurement method, standardization, either of the issue of points' recording and the tracing of lines or in the demarcation of areas, as in the mechanism of measure itself, by photography, radiography or scanner microscopy is essential to avoid distortions, methodological flaws, and false results.

In Table 2, the mean of differences obtained in the buccal aspects was small, while in the lingual aspects, bigger areas of alveolar bone loss of the different animals increased the mean, although it is still located within the interval of confidence of 95%. This naturally occurring alveolar bone loss, higher in the lingual aspect when compared to the buccal aspect in the control hemi mandible, mentioned by other authors, (7,12-14) results from smaller thickness of the bone in this region. (12) The measure of the ABL area only in first (buccal side) and in first and second molars (lingual side) is a change of Tatakis and Guglielmoni proposed by Hilgert, who demonstrated a smaller variability, when the analyzed area was reduced, due to the lingual inclination of the third molars, as well as to the frequent loss of these teeth in old mice. (7)

Besides the positioner, special attention should be paid to the painting with 1% toluidine blue, that must be uniform, neither too dark nor too light. The best visualization of the CEJ and the bone-cementum limit makes it easier to mark the reference points and, consequently, the reliability of the ABL area.

It is difficult to compare the results of this study due to the non existence of other experiments that had assessed the validity/reliability of the positioning of hemi mandibles for ABL measures. The reproducibility of ABL measures was determined (8) by the repetition of measures of random samples through the analysis of the coefficient of variation. The size of the differences between the measures, (13) close to zero, found in our study, both by the analysis of one mandible only (S1) and of the group (S2), confirm that the use of the proposed positioner permits measures without distortions and is not impaired by the random error.

The capture of images from the samples via digital photography probably increases the reliability of the method of measuring alveolar bone loss.

The study confirms the reliability of the Hilgert's ABL measurement technique, based on Tatakis and Guglielmoni. In conclusion, the results of this study indicate that the positioner allows a correct visualization, without distortions of the alveolar bone loss area. It suggests that this methodology, associated with the positioning standardization, is a unique and useful model for study of ABL in both pathogenesis and therapeutic intervention.

## References

- 1-Gaegauf-Zollinger R, Burckhardt JJ, Guggenheim B. Radiographic measurements of alveolar bone loss in the rat. Arch Oral Biol 1982;**27**(8):651-8.
- 2-Gupta OP, Shaw JH. Periodontal disease in the rice rat. II. Methods for the evaluation of the extent of periodontal disease. J Oral Surg (Chic) 1956 Jul;**9**(7):727-35.
- 3-Klausen B, Evans RT, Sfantescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. Scand J Dent Res 1989 Dec;**97**(6):494-9.
- 4-Keyes PH, Gold HS. Periodontal lesions in the Syrian hamster. I. A method of evaluating alveolar bone resorption. J Oral Surg (Chic) 1955 May;**8**(5):492-9.
- 5-Messer HH, Douglas WH. Inhibition by chlorhexidine of alveolar bone loss in mice. J Periodontal Res 1980 Nov;**15**(6):646-9.
- 6-Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. J Oral Sci 1998 Dec;**40**(4):171-5.
- 7-Sashima M, Satoh M, Suzuki A. Alveolar bone loss of senescence-accelerated mouse (SAM). J Dent Res 1990 Jan;**69**(1):82-6.
- 8-Tatakis DN, Guglielmoni P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. J Periodontol 2000 Sep;**71**(9):1395-400.
- 9-Hilgert JB, Hugo FN, Bozzetti MC, Padilha DMP. Comparação de duas técnicas de medição da perda óssea alveolar em roedores. Pesqui Odontol Bras 2002;**16**:216.
- 10-Hulley SB. Designing clinical research: an epidemiological approach. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

11-Binderman I, Adut M, Zohar R, Bahar H, Faibish D, Yaffe A. Alveolar bone resorption following coronal versus apical approach in a mucoperiosteal flap surgery procedure in the rat mandible. *J Periodontol* 2001 Oct;**72**(10):1348-53.

12-Yaffe A, Fine N, Binderman I. Regional accelerated phenomenon in the mandible following mucoperiosteal flap surgery. *J Periodontol* 1994 Jan;**65**(1):79-83.

13-Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986 Feb **8**;1(8476):307-10.

14-Altman DC. *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall; 1991.



## Figure Legends

**Figure 1** – Draft of positioners that were built on polivynilsyloxane (2X2x1cm), with an anterior angulation of 12° and a lateral angulation of 5°.

**Figure 2** - Picture of lingual aspect of the zone limited by the linking of 12 points, which defines the alveolar bone loss area.

**Figure 3** - Bland and Altman's plot of the alveolar bone loss variable in the left buccal aspect, operated (Table 1 / inter examiner).

**Figure 4** - Bland and Altman's plot of the alveolar bone loss variable in the buccal aspect of 10 right hemi mandibles (Table 2 / intra examiner 2).

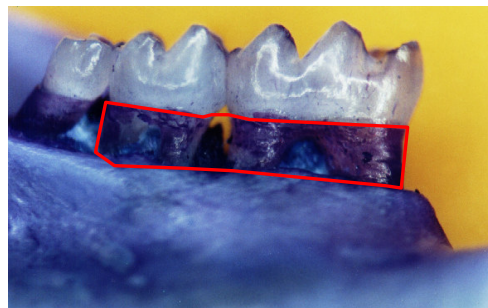
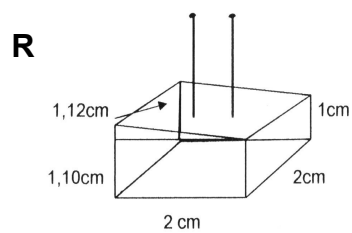
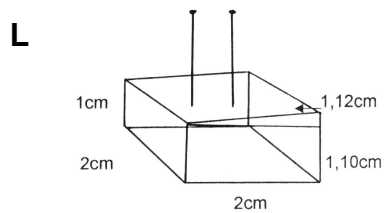
## Tables

**Table 1.** Reliability of measures of alveolar bone loss performed on the buccal and lingual aspects of one animal only (control and operated).

		Intra examiner 1		Intra examiner 2		Inter examiners	
		Buccal aspect	Lingual aspect	Buccal aspect	Lingual aspect	Buccal aspect	Lingual aspect
Right mandible (control)	Mean of differences	-0.38	0.53	-0.02	-1.50	-1.03	1.03
	Limits of agreement	-2.24 to 1.47	-1.21 to 2.27	-1.41 to 1.37	-4.28 to 1.27	-4.77 to 2.72	-1.19 to 3.25
Left mandible (operated)	Mean of differences	1.33	0.19	-0.61	-0.76	-0.11	1.07
	Limits of agreement	-2.86 to 5.51	-2.27 to 2.65	-3.77 to 2.56	-3.61 to 2.09	-4.14 to 3.93	-2.12 to 4.27

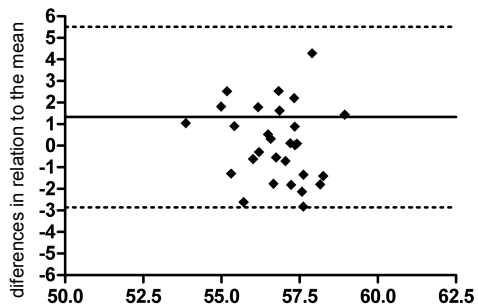
**Table 2.** Reliability of the measures of alveolar bone loss in different animals, right hemi mandible; buccal and lingual aspects

	Intra examiner 1		Intra examiner 2		Inter examiners	
	Buccal aspect	Lingual aspect	Buccal aspect	Lingual aspect	Buccal aspect	Lingual aspect
Mean of differences	-1.03	8.89	-2.84	14.70	3.45	-3.37
Limits of agreement	-9.01 to 10.09	53.94 to 64.05	-20.46 to 14.79	-51.01 to 80.41	-9.20 to 16.19	-51.61 to 44.88

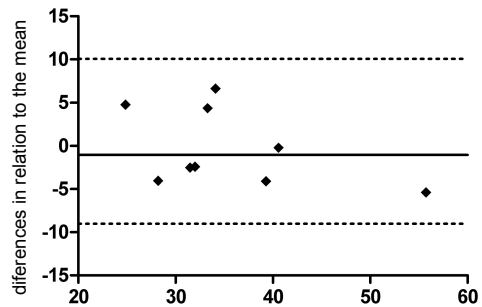


**Figure 1**

**Figure 2**



**Figure 3**



**Figure 4**

#### 4.3 ARTIGO 3 - ALVEOLAR BONE LOSS AND AGING: A MODEL FOR THE STUDY IN MICE

A formatação do artigo está de acordo com as instruções para autores do *Journal of Periodontology* (Qualis A Internacional/Capes 2003) que está indexado ao Medline.

**Background:** Several studies in animals have shown a positive correlation between aging and alveolar bone loss. The purpose of this study was to develop a model for study of ABL in mice, in aging.

**Materials and methods:** Mucoperiosteal flap surgery (MFS) was performed on the buccal aspect of the left side of the mandible (BL) in 72 CF<sub>1</sub> *Mus domesticus* mice, divided into three groups as follows: male, breeding (non-virgin) and virgin females. The MFS was performed in 3, 6, 9 or 12 month-old animals under anesthesia. Right hemi mandibles were used as controls (buccal aspect, BR). Animals were killed under anesthesia twenty-one days after surgery. Mandibles were removed, defleshed, stained with toluidine blue, and photographed in a microscope. The photographs were digitalized and ABL was measured as the exposed root surface area (mm<sup>2</sup>). Blinded measurements were performed using a computer-assisted image analysis system.

**Results:** The BL operated area showed significant difference (paired Student-t test,  $p < 0,001$ ) when compared to the BR area in all three groups. Sex and breeding differences were not observed in this experiment. ABL in the left hemi mandibles was significantly larger in 3 ( $\bar{x} 0.70$  / CI 95% 0,59 – 0,80) and 12 month-old animals ( $\bar{x} 0.58$  / CI 95% 0,46 – 0,71) than in 6 ( $\bar{x} 0.39$  / CI 95% 0,33 – 0,46) and 9 month-old animals ( $\bar{x} 0.42$  CI 95% 0,35-0,48),  $p < 0.001$ .

**Conclusion:** The results suggest that 3 month-old CF<sub>1</sub> mice, sex and breeding-independent, could be a useful model for provoked alveolar bone loss studies in aging.

**Keywords:** alveolar bone loss, resorption, mice, aging

Population aging is today a world phenomenon. More and more, people keep their teeth while they reach advanced ages. This growing population has perceived that due to functional, esthetic, and psychological reasons, oral health is important for quality of life.<sup>1</sup> During the aging process, physiological alveolar bone loss (ABL) is observed,<sup>2-6</sup> besides the result of pathologies and surgical procedures. This ABL favors bad hygiene and root exposition, and may cause as a consequence periodontal disease, root caries, tooth loss, and difficulties to perform conventional and implant-supported prosthetics rehabilitation. The impact of tooth loss on the quality of life of elderly patients is described as premature aging, characterized by the change of image and humor, as well as difficulties in relationships.<sup>7</sup>

The association between aging and ABL is difficult to be evaluated in humans, due to the different levels of hygiene and individual immunological factors, and because the chronic nature of periodontal disease.<sup>8</sup> Several studies in animals have demonstrated a positive correlation between aging and ABL.<sup>2,3,5,6,8</sup>

Mucoperiosteal flap surgery is largely used in dentistry to access alveolar bone and root surfaces in periodontal, paraendodontics, and surgical procedures. By performing this flap surgery soft tissues of the gingival papilla, including collagenous fibers, are cut and the periosteum is separated from the alveolar bone from the attached gingival to the mucoperiosteal junction. Several studies in animals have reported alveolar bone loss after the performing of the mucoperiosteal flap surgery, and it initiates with an accelerated resorption activity and immediately continues as a slow process of bone regeneration.<sup>9-21</sup> This phenomenon was described in orthopedics surgery by Frost as regional accelerated phenomenon (RAP).<sup>22,23</sup> The phase of higher resorption occurs during the three weeks following surgery. Roberts also observed this phenomenon in animals after implant surgeries.<sup>24,25</sup> Factors like

infection, occlusal trauma, and bone anatomy may quantitatively affect both bone loss and regeneration.<sup>6,9</sup>

Hormonal changes that occur to female mice during aging may cause alveolar bone loss,<sup>26</sup> as well as pregnancy and breast feeding can be considered risk factors for ABL, especially under Ca<sup>++</sup> deficiency or insufficiency.<sup>27</sup>

The purpose of this investigation was to create a model for studying alveolar bone loss, starting from a surgical procedure in mice that can be applied in future interventions to detect and / or prevent early alveolar bone loss in aging.

## **Materials and methods**

### **Study design and experimental procedure**

This research was carried out in accordance with the Committee of Ethics in Research of Pontifícia Universidade Católica. Animals were obtained, maintained, and handled during the experimental phase at the Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul.

Seventy-two CF<sub>1</sub> *Mus domesticus* were used in this study. Mice were divided in three experimental groups: males, virgin females, and breeding (non-virgin) females. Each group was formed by twenty-four animals (3, 6, 9, and 12 months).

After the weaning, the animals were maintained in individual cages consuming distilled water and food *ad libitum*. Standard conditions of light (12-24 h light / dark cycle) and temperature (approximately 20°C) were kept during the experiment. Animals were monitored daily. At 3, 6, 9 and 12 months the animals were weighted and intramuscularly anesthetized (ketamine 100 g/l<sup>##</sup> + 2% aqueous solution of 2-

---

<sup>##</sup>Dopalen, Agribands do Brasil Ltda, Paulina, Brasil

(2,6-xilidine)-5,6-dihydro-4-H-1,3-thiazine hydrochloride<sup>§§</sup>, in the ratio of 1:1, in a dosage of 1.0 ml/kg). A mucoperiosteal flap was performed on the buccal aspect of lower left molars. The mucosa was separated from the underlying bone after a incision at the marginal gingival with the aid of a small elevator, and was immediately readapted, without any suture.<sup>9-19</sup> The procedure was performed in approximately 40 seconds. The right side buccal aspect served as control. Animals received only water during the initial 24 hours to avoid the displacement of the flap. Twenty-one days after the surgical procedure, animals were killed by means of cervical dislocation under anesthesia.<sup>9</sup> Under a stereomicroscope, mandibles were divided along the mediumline, defleshed, and all the organic material was removed with the help of sodium hypochlorite applied with a brush. Pieces were then stored in 10 % buffered formalin for 12 hours.<sup>28-30</sup>

Each hemi mandible was stained with 1% toluidine blue to make root exposition area, limits of enamel, cementum, and bone evident, being photographed under magnification (X2.5), having light and position standardized in a stereomicroscope<sup>\*\*\* 31</sup> with conventional film<sup>†††</sup>. A standard positioning of the buccal aspect was obtained by the use of a plain positioner, while for the lingual aspect an especially designed positioner with inclinations allowed that buccal and lingual cusps were aligned between themselves in a perpendicular position to the long axis of the stereomicroscope's focus. Starting from the described procedure, the obtained

---

<sup>§§</sup> Rompun, Bayer S.A., São Paulo, Brasil

<sup>\*\*\*</sup> B201, Olympus, Olympus America Inc., NY, USA.

<sup>†††</sup> Kodak Ultra 135 ASA 100, Kodak Brasileira Comércio e Indústria Ltda, Manaus, Brasil.



photographs were digitalized with a table scanner and were processed with an image analysis software<sup>†††</sup>

### **Bone loss analysis**

Two independent and previously trained examiners performed two measurements of each sample with an interval of one week between them. The measure of the ABL area only in first (buccal aspect) and in first and second molars (lingual aspect) is a change of Tatakis and Guglielmoni proposed by Hilgert<sup>32</sup>. The alveolar bone loss area was defined as follows: mesially, by the mesial edge (CEJ to alveolar bone) of the mesial root of the first molar; distally, by the distal edge (CEJ to alveolar bone) of the distal root of the second molar tooth; coronally, by three points on each of the two molar teeth: two points defined by the position of the CEJ on the mesial and distal aspects of the tooth and one defined by the most apical position of the CEJ on the surface of the tooth; and apically, by the most apical position of the alveolar bone on the first and second root surfaces. Results are shown in mm<sup>2</sup>.(Fig.1)

### **Statistical analysis**

ANOVA test was used to check the differences between the mean of ABL for the three groups (male, breeding [non-virgin] and virgin females). Paired Student-t test verified if there was any difference between buccal left (operated) and right (control), and lingual left and right ABL areas. ANOVA and Tukey's Post Hoc tests were used to check the existence of ABL differences between animals of the three groups (male,

---

<sup>†††</sup> UTHSCSA Image Tool version 2.02 (available for download at <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/download.html>).

breeding [non-virgin] and virgin females) at different times (3, 6, 9, and 12 months old). The existence of differences between the ABL areas of both buccal and lingual aspects at different times and groups were also checked by the Student-t test.

## Results

Large areas of bone resorption were observed three weeks after mucoperiosteal flap surgery (Fig.2). ANOVA test did not show difference between males, breeding (non-virgin), and virgin females at the, right and left, buccal and lingual ABL areas. The ABL In operated area (BL) showed a significant difference (paired Student-t test,  $p < 0.001$ ) of buccal right (BR), lingual left (LL), and lingual right (LR) areas in the three groups. (Table 1)

Alveolar bone loss significantly varied in relation to time (3, 6, 9, and 12 months). The average bone loss at the operated side (BL) was  $\bar{x}$  0.70 / CI 95% 0,59 – 0,80 (3 m),  $\bar{x}$  0.39 / CI 95% 0,33 – 0,46 (6 m),  $\bar{x}$  0.42 CI 95% 0,35-0,48 (9 m), and  $\bar{x}$  0.58 / CI 95% 0,46 – 0,71 (12 m). Animals at 3 and 12 months of age showed a significant difference when compared to the 6 and 9 month-old ones (Tukey's Post Hoc test,  $p < 0.001$ ). (Table 2) (Fig.2) ABL also occurred in the control side. On the lingual right and left, the mean of ABL was  $\bar{x}$  0.87, varying between  $\bar{x}$  0.81 (LR and LL / 6 m) and  $\bar{x}$  0.98 (LR / 12 m). LR area was significantly different of BR (paired Student-t test,  $p < 0.01$ ).

## Discussion

In this study, we searched for a model to study alveolar bone loss (ABL) during aging. The choice of mouse as a model animal was based on short life,<sup>33</sup> on the easier handling, reproduction and care, on low cost of acquisition and maintenance, besides on the anatomic resemblance of molars and oral structures to human tissues.<sup>34</sup>

Mice have been reported to show alveolar bone loss as an age-related change.<sup>5,6,8,35</sup> The continuing predisposition of STR/N mice to alveolar bone loss was described by Messer, who evaluated animals from 3 to 18 month-old.<sup>5</sup> Predisposition was also found in C57B1/6 mice when evaluated between 3 and 23 month-old,<sup>8</sup> when compared with senescence-accelerated mouse between 1 and 16 month-old mice.<sup>6</sup> Belting et al., using conventional Wistar albino and Norwegian gray rats, found age-related changes in regard to the height of the alveolar bone loss crest, the apical termination of the junctional epithelium and cementum opposition.<sup>2</sup> Germ-free rats showed gradually increased distance between the cemento-enamel junction and alveolar bone crest at the lingual side in the period of 30 to 80 days.<sup>3</sup> Our study confirms in CF<sub>1</sub> mice the occurrence of alveolar bone loss during aging, which was demonstrated by the evaluation of the buccal right aspect (control) and the lingual aspects. Both in the lingual right and left region, ABL area was between  $\bar{x}$  0.81 (LR and LL / 6 m) and  $\bar{x}$  0.98 (LR / 12 m). Right lingual area was significantly different from right buccal (paired Student-t test,  $p < 0.01$ ). This higher loss on the lingual aspect, when compared to control buccal aspect, probably results from the bone thin thickness on the lingual region.<sup>9,17</sup>

The search for substances and treatments to prevent or to minimize ABL is a frequent research subject. Therefore, the establishment of models for these studies is necessary. The performance of a surgical procedure that produces alveolar bone loss was described by Yaffe et al. in rats as a model for studying alveolar bone loss.<sup>9</sup> The use of animals either prone to aging<sup>6</sup> or genetically modified,<sup>28-30</sup> susceptible to accelerated ABL or to periodontal disease, are other alternatives proposed for the study of alveolar bone loss. Mucoperiosteal flaps are used routinely in many surgical procedures to access bone and root surfaces, for debridement, pocket elimination, management of moderate and deep periodontal defects, regenerative procedures and implant surgery.<sup>9</sup> Our results show, in mice, the resorptive effect following this surgery described by others in rats.<sup>9-21</sup> The total mean ABL area (BL) was  $\bar{x}$  0.53mm (CI 95% 0.47 - 0.58), showing a significant difference with the other areas in the three groups. (Table 1)

The use of male animals in the majority of ABL studies<sup>3,8,9-19</sup> shows a concern with the possible effect of females' hormone changes on bone resorption and neoformation.<sup>26,27</sup> Data from Table 1 show similarity of ABL between males, virgin females and breeding ones, indicating that it could be a sex-breeding independent process.

Our study demonstrated that alveolar bone resorption significantly varied in relation to the age of animals. Animals between 3 and 12 months of age showed a higher bone loss (Table 2) and showed a significant difference when compared to the 6 and 9 months old ones. Similar results were also observed in upper molars of SAM-R/1/lw mouse, in the period of 2 to 16 months of age.<sup>6</sup> It is not known yet why the response to the surgical procedure is similar in 3 and 12 month-old animals. We

postulate that the T-cell dependence process regulates the observed severe alveolar bone loss in both three and twelve month animals.<sup>36</sup>

Another study evaluating cytokines and future histologic analysis would probably add information that would help the understanding of the results obtained in this morphometric ABL's analysis. Another limitation of present study's design is the analysis of teeth in non-decalcified buccal-lingual sections. They would probably to identify, if there is, interference of hypercementosis and occlusal wear in ABL.

Many studies have used drugs such as bisphosphonates, tetracycline e doxycycline, among others, in either topical, systemic or combined applications, to minimize and/or prevent alveolar bone loss.<sup>9-16,18-21</sup> The performance of a surgical procedure that provokes ABL makes possible the utilization of this loss as a model for future interventions.

In summary, the results of this study indicate that CF<sub>1</sub> mice, when submitted to the mucoperiosteal flap surgery, suffer alveolar bone loss, in a sex and breeding-independent process. By measuring the root exposition area, a standard can be observed and it is similar to the resorption in 3 and 12 month-old animals. Results suggest that 3 month-old CF<sub>1</sub> mice sex and breeding-independent could be a useful model for alveolar bone loss aging studies.

## References

1. MacEntee MI. The impact of edentulism on function and quality of life. In: Feine JS, Carsson GE. Implant overdentures: The standard of care for edentulous patients. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 2003:23-8.
2. Belting CM, Schour I, Weinmann JP, Shepro MJ. Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. *J Dent Res* 1953;32:332-53.
3. Amstad-Jossi M, Schroeder HE. Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res* 1978;13:76-90.
4. Roberts WE, Gonsalves M. Aging of bone tissue. In: Holm-Pedersen P, Løe H. *Geriatric Dentistry*. Munksgaard: Mosby Company Ltd.;1986. p.83-93.
5. Messer HH. Alveolar bone loss in a strain of mice. *J Periodontal Res* 1980;15:193-205.
6. Sashima M, Satoh M, Suzuki A. Alveolar bone loss of senescence-accelerated mouse (SAM). *J Dent Res* 1990;69:82-6.
7. Fiske J, Davis DM, Frances C, Gelbier S. The emotional effects of tooth loss in edentulous people. *Br Dental J* 1998;184:90-3.
8. Barnett NA, Rowe DJ. A comparison of alveolar bone in young and aged mice. *J Periodontol* 1986;57:447-52.
9. Yaffe A, Fine N, Binderman I. Regional accelerated phenomenon in the mandible following mucoperiosteal flap surgery. *J Periodontol* 1994;65:79-83.
10. Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 1995;66:999-1003.

11. Yaffe A, Izkovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 1997;68:884-9.
12. Yaffe A, Binderman I, Breuer E, Pinto T, Golomb G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. *J Periodontol* 1999;70:893-5.
13. Yaffe A, Golomb G, Breuer E, Binderman I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. *J Periodontol* 2000;71:1607-12.
14. Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. *J Periodontol* 2003;74:44-50.
15. Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. *J Periodontol* 2003;74:1038-42.
16. Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000;71:1236-40.
17. Binderman I, Adut M, Zohar R, Bahar H, Faibish D, Yaffe A. Alveolar bone resorption following coronal versus apical approach in a mucoperiosteal flap surgery procedure in the rat mandible. *J Periodontol* 2001;72:1348-53.
18. Kaynak D, Meffert R, Gunhan M, Gunhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000;71:790-6.

19. Kaynak D, Meffert R, Bostanci H, Gunhan O, Ozkaya OG. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. *J Periodontol* 2003;74:1348-54.
20. Grevstad HJ. Doxycycline prevents root resorption and alveolar bone loss in rats after periodontal surgery. *Scand J Dent Res* 1993;101:287-91.
21. Grevstad HJ, Boe OE. Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. *Eur J Oral Sci* 1995;103:156-9.
22. Frost MH. The biology of fracture healing: An overview for clinicians Part I. *Clin Ortho* 1989;248:283-93.
23. Frost MH. The biology of fracture healing: An overview for clinicians Part II. *Clin Ortho* 1989;248:294-309.
24. Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Implants: Bone physiology and metabolism. *CDA J* 1987 ;15:54-61.
25. Roberts WE. Bone tissue interface. *J Dent Educ.* 1988 Dec;52(12):804-9.
26. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res* 2002;37:161-5.
27. Shoji K, Ohtsuka-Isoya M, Horiuchi H, Shinoda H. Bone mineral density of alveolar bone in rats during pregnancy and lactation. *J Periodontol* 2000;71:1073-8.
28. Tatakis DN, Guglielmoni P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol* 2000;71:1395-400.
29. Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick DM, Fletcher HM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *J Dent Res* 2003;82:632-5.
30. May NY, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in male HLA-B27 transgenic rats: adult onset. *J Periodontal Res* 2004;39:33-6.



31. Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998 Dec;40(4):171-5.
32. Hilgert JB, Hugo FN, Bozzetti MC, Padilha DMP. Comparação de duas técnicas de medição da perda óssea alveolar em roedores. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16:216.
33. Brookbank JW. Aging in mammals. In: Brookbank JW. *The biology of aging*. New York: Harper & Row Publishers;1990:40-61.
34. Jordan HV. Rodent model systems in periodontal disease research. *J Dent Res* 1971;50:236-42.
35. Gilmore ND, Glickman I. Some age changes in the periodontium of the albino mouse. *J Dent Res* 1959;38:1195-206.
36. Shearer GM. Th1/Th2 changes in aging. *Mech Ageing Dev* 1997;94:1-5.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Illustration of the landmarks used to define the area of alveolar bone loss. Each circle is centered over the corresponding point. Connecting all the points together represents the area of interest.

a- left side lingual aspect                      b- left side buccal aspect

**Figure 2.** Alveolar bone loss (mandibular buccal aspect). The photographs of the left identify the control side and the photographs of the right identify the operated side of the mice mandible.

Representative animals aged 3 (a,b), 6 (c,d), 9 (e,f) and 12 (g,h) months.

## TABLES

**Table 1.** Mandible buccal and lingual areas, right and left aspects in the three groups (male, virgin females and breeding females).

		Mean	Interval of Confidence 95%	
			Lower limit	Upper limit
BR AREA (control)	Male	0.29	0.25	0.33
	Virgin female	0.27	0.23	0.31
	Breeding female	0.29	0.25	0.32
	Total	0.29	0.26	0.31
BL AREA (operated)	Male <sup>1</sup>	0.50	0.41	0.59
	Virgin female <sup>1</sup>	0.60	0.48	0.72
	Breeding female <sup>1</sup>	0.47	0.41	0.54
	Total <sup>1</sup>	0.53	0.47	0.58
LR AREA	Male <sup>1</sup>	0.81	0.75	0.88
	Virgin female <sup>1</sup>	0.90	0.79	1.01
	Breeding female <sup>1</sup>	0.93	0.83	1.04
	Total <sup>1</sup>	0.88	0.83	0.93
LL AREA	Male <sup>2</sup>	0.79	0.74	0.86
	Virgin female <sup>2</sup>	0,9	0.74	1.04
	Breeding female <sup>2</sup>	0.90	0.81	0.98
	Total <sup>2</sup>	0.86	0.80	0.92

<sup>1</sup>. Significant difference of BR area, paired Student- t test,  $p < 0.001$ .

<sup>2</sup>. Significant difference of BL area, paired Student-t test,  $p < 0.001$ .

**Table 2.** Buccal and lingual mandibular areas, right and left aspects in 3, 6, 9 and 12 month-old animals.

		Mean	Interval of Confidence 95%	
			Upper limit	Lower limit
BR AREA (control)	3 month-old	0.27	0.22	0.32
	6 month-old	0.26	0.22	0.30
	9 month-old	0.28	0.24	0.32
	12 month-old	0.33	0.29	0.37
	Total	0.29	0.26	0.31
BL AREA (operated)	3 month-old <sup>1,4,5</sup>	0.70	0.59	0.80
	6 month-old <sup>1,2,3,4,6</sup>	0.39	0.33	0.46
	9 month-old <sup>1,2,3,4,6</sup>	0.42	0.35	0.48
	12 month-old <sup>1,4,6</sup>	0.58	0.46	0.71
	Total	0.53	0.47	0.58
LR AREA	3 month-old <sup>4</sup>	0.82	0.73	0.91
	6 month-old <sup>4</sup>	0.81	0.70	0.91
	9 month-old <sup>4</sup>	0.92	0.82	1.01
	12 month-old <sup>4</sup>	0.98	0.83	1.12
	Total	0.88	0.83	0.93
LL AREA	3 month-old	0.84	0.77	0.91
	6 month-old	0.81	0.71	0.90
	9 month-old	0.86	0.70	1.02
	12 month-old	0.93	0.79	1.08
	Total	0.86	0.80	0.92

<sup>1</sup>. Significant difference between the groups (times), ANOVA test,  $p < 0.001$ .

<sup>2</sup>. Significant difference with the 3 months group, Tukey's Post Hoc test,  $p < 0.001$ .

<sup>3</sup>. Significant difference with the 12 months group, Tukey's Post Hoc test,  $p < 0.05$ .

<sup>4</sup>. Significant difference with BR area, paired Student-t test,  $p < 0.001$ .

<sup>5</sup>. Significant difference with LL area, paired Student-t test,  $p < 0.05$ .

<sup>6</sup>. Significant difference with LL area, paired Student-t test,  $p < 0.001$ .

FIGURES

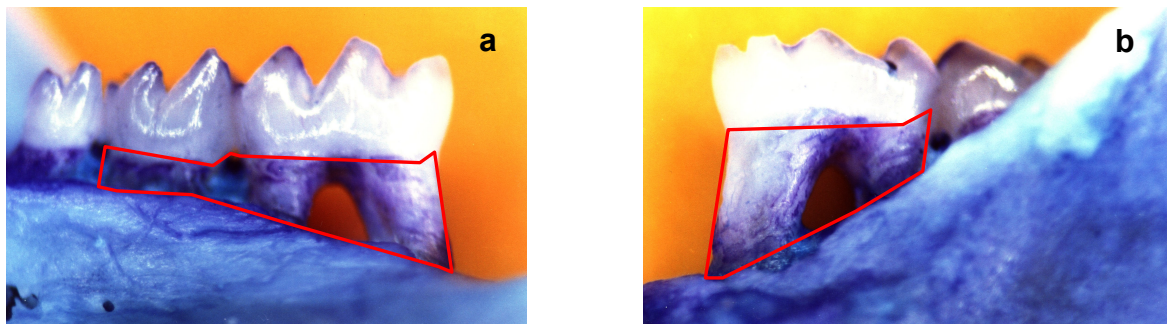


Figure 1

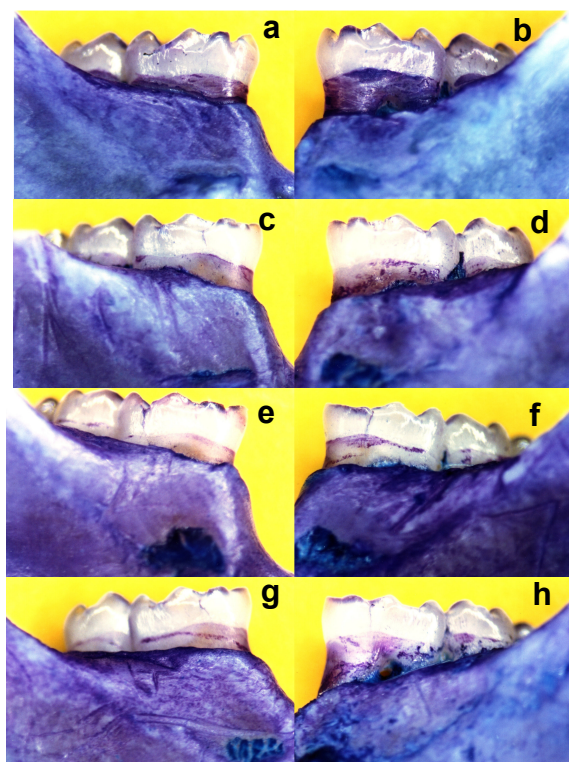


Figure 2

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma grande parte das pesquisas interessadas em compreender a natureza e a etiologia, bem como desenvolver tratamentos para as doenças orais, depende do uso de animais de laboratório. Equipamentos, métodos e técnicas são continuamente desenvolvidos e modelos experimentais são criados com o intuito de facilitar a pesquisa científica.

Um equipamento denominado "mesa cirúrgica com dispositivo de abertura bucal para roedores" pouco oneroso e de fácil operação foi desenvolvido para facilitar o acesso e a visibilidade à cavidade bucal destes animais. O *design* inovador deste permite, também, a sua utilização na pesquisa científica em outras áreas biomédicas.

Vários métodos de quantificação de perda óssea alveolar em roedores estão descritos na literatura. Independente do método utilizado, a padronização no posicionamento das hemi mandíbulas a serem medidas é fundamental. Qualquer alteração na inclinação das amostras causa distorção das medidas, comprometendo a confiabilidade dos resultados. Através da criação de um posicionador próprio, a área de perda óssea alveolar é visualizada sem distorções. A verificação da confiabilidade deste método de posicionamento e também do método de medição

de perda óssea alveolar de Hilgert realizada neste estudo permite sugerir esta associação de metodologias como modelo para estudo de perda óssea alveolar.

A perda óssea alveolar vem sendo estudada em roedores. A produção desta perda através de um procedimento cirúrgico já foi estudada em ratos, e tem sido utilizada, para o estudo de drogas que previnam ou minimizem esta perda. Estes estudos, entretanto, não foram relacionados ao tempo de vida destes animais e tampouco foram utilizados em um animal que é o principal modelo de mamífero para o estudo do envelhecimento, o camundongo. Os resultados do nosso estudo indicam que o camundongo CF<sub>1</sub>, quando submetido ao procedimento cirúrgico de descolamento mucoperiósteo, sofre perda óssea alveolar em um processo sexo *status* reprodutivo independente. A área de exposição radicular medida mostrou um padrão de reabsorção semelhante nos animais de três e 12 meses. Sugere-se o camundongo CF<sub>1</sub> de três meses de idade, independente do sexo e do *status* reprodutivo como um modelo único e extremamente útil para estudos de perda óssea alveolar no envelhecimento.

Outras pesquisas deverão elucidar as dúvidas levantadas por este estudo ou que apesar dele ainda persistam. As limitações vinculadas ao estudo de fenômenos biológicos em modelos animais não devem ser esquecidas. Entretanto, estas limitações não devem orientar a compreensão de que os resultados obtidos não têm como finalidade um melhor entendimento do envelhecimento em humanos. A busca da saúde e da qualidade de vida para os indivíduos velhos é nossa última instância.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Papaléo Neto M. O Estudo da Velhice no Século XX: histórico, definição do campo e termos básicos. In: Freitas EV, et al. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.2-12.
- 2.Jeckel-Neto EA, Cunha GL. Teorias Biológicas do Envelhecimento. In: Freitas EV et al. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.13-9.
- 3.Camarano AM. Envelhecimento da População Brasileira: uma contribuição demográfica. In: Freitas EV, et al. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.58-71.
- 4.Ramos LR. Epidemiologia do Envelhecimento. In: Freitas EV, et al. Tratado de Geriatria e Gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.72-78.
- 5.Rowe JW, Khan R. Human aging: usual and successful. Science 1987;237:143-51.
- 6.Papaléo Netto M, Brito FC. Aspectos multidimensionais das urgências do idoso. In: Papaléo Netto M, Brito FC. Urgências em geriatria: epidemiologia, fisiopatologia, quadro clínico e controle terapêutico. São Paulo: Editora Atheneu; 2001. p.23-4.
- 7.Brunetti RF, Montenegro FLB. A Odontologia geriátrica e o Novo Século. In: Brunetti RF, Montenegro FLB. Odontogeriatrics - Noções de Interesse Clínico. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p.27-52.
- 8.Mattar T. Daqui a 50 anos, o homem vai viver até 200 anos? Mind 2000 Abr/Mai/Jun;5(26):12-5.
- 9.Arking R. Biology of aging: observations and principles. 2<sup>nd</sup> ed. Massachusetts: Sinauer Associates; 1998.



10.Miura H, et al. Chewing ability and quality of life among the elderly residing in a rural community in Japan. *J Oral Rehabil* 2000 Aug;27(8):731-4.

11.Ettinger RL. Considerações geriátricas em prótese dentária. In: Owall B, Kayser AF, Carlsson GE. *Prótese dentária: princípios e condutas estratégicas*. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p.81-95.

12.Budtz-Jørgensen E. Epidemiology: Dental and Prosthetic Status of Older Adults. In: Budtz-Jørgensen E. *Prosthodontics for Elderly: diagnosis and treatment*. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 1999. p.1-22.

13.Scott J. Degenerative changes in the histology of the human submandibular gland occurring with age. *J Biol Buccale* 1977 Dec;5(4):311-9.

14.Torres SVS. Saúde Bucal: alterações fisiológicas e patológicas do envelhecimento. In: Freitas EV, et al. *Tratado de Geriatria e Gerontologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p.828-37.

15.Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *J Dent Res* 1994 Aug;73(8):1416-20.

16.Sreebny LM. Xerostomia: diagnosis, management and clinical complications. In: Edgar WM, O'Mullane DM. *Saliva and oral health*. London: British Dental Association; 1996. p.43-66.

17.Baum BJ. Age changes in salivary glands and salivary secretion. In: Holm-Pedersen P, Løe H. *Geriatric Dentistry*. Munkgaard: Mosby Company; 1986. p.114-20.

18.Moriguchi Y. Aspectos geriátricos no atendimento odontológico. *Odontol Mod* 1992 Jul/Ago;19(4):11-3.

19.Kina S, Belotti A. Alteração da sensibilidade gustativa no paciente idoso. *Atual Geriatria* 1998 Ago;3(18):20-2.

20.Budtz-Jørgensen E. Age-related changes of the masticatory apparatus. In: Budtz-Jørgensen E. *Prosthodontics for Elderly: diagnosis and treatment*. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc; 1999. p.23-48.

21.Padilha DMP, Sousa MAL. Alterações da mucosa bucal em grupos de idosos no Brasil e na Inglaterra. *Rev Odontoc* 1998 25(1):175-202.

22.Axell T. The oral mucosa as a mirror of general health or disease. *Scand J Dent Res* 1992 Feb;100(1):9-16.

23.Gjermeo P, Rosing CK, Susin C, Oppermann RV. Periodontal disease in Central and South America. *Periodontol* 2000 2002;29:70-8.

- 24.Mjör IA. Age changes in the teeth. In: Holm-Pedersen P, Løe H. Geriatric Dentistry. Munkgaard: Mosby Company; 1986. p.94-100.
- 25.Hassan AK, Omar S. Root caries among Benghazi patients. East Mediterr Health J 2000 Mar-May;6(2-3):494-6.
- 26.Narhi TO, Vehkalahti MM, Siukosaari P, Ainamo A. Salivary findings, daily medication and root caries in the old elderly. Caries Res 1998;32(1):5-9.
- 27.Watson ML, Burke FJ. Investigation and treatment of patients with teeth affected by tooth substance loss: a review. Dent Update 2000 May;27(4):175-83.
- 28.Cosme DC, Rivaldo EG, Frasca LCF, Padilha DMP. Reabilitação oral em pacientes idosos com desgaste dentário acentuado. Rev ABO Nac Dec-2003/Jan-2004;11(6):368-74.
- 29.Mojon P. The Word Without Teeth: demographic trends. In: Feine JS, Carlsson GE. Implant Overdentures: the standard of care edentulous patients. Hong Kong: Quintessence Publishing Co, Inc; 2003. p.3-14.
- 30.Gift HC. Issues of aging and oral health promotion. Gerodontology 1988 Oct;4(5):244-8.
- 31.Guglielmotti MB, Cabrini RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. J Oral Maxillofac Surg 1985 May;43(5):359-64.
- 32.Tallgren A. The continuing reduction of the residual alveolar ridges in complete denture wearers: a mixed longitudinal study covering 25 years. J Prosthet Dent 2003 May;89(5):427-35.
- 33.Atwood D. Reductions of residual ridges: a major oral disease entity. J Prosthet Dent 1971 Sept;26(3):266-79.
- 34.Taylor TD. Indications and treatment planning for mandibular implant overdentures. In: Feine JS, Carlsson GE. Implant Overdentures: the standard of care edentulous patients. Hong Kong: Quintessence Books; 2003. p.71-82.
- 35.Atwood DA, Coy WA. Clinical, cephalometric and densitometric study of reduction of the residual ridges. J Prosthet Dent 1971 Sept;26(3):280-95.
- 36.Faine MP. Dietary factors related to preservation of oral and skeletal bone mass in women. J Prosthet Dent 1995 Jan;73(1):65-72.
- 37.Wical KE, Swoope C. Studies of residual ridge resorption. Part I. Use of panoramic radiographs for evaluation and classification of mandibular resorption. J Prosthet Dent 1974 Jul;32(1):13-22.
- 38.Crum RJ, Rooney GEJr. Alveolar bone loss in overdentures: a 5-year study. J Prosthet Dent 1978 Dec;40(6):610-3.

- 39.von Wowern N, Winther S. Submergence of roots for alveolar ridge preservation. A failure (4-year follow-up study) *Int J Oral Surg* 1981 Aug;10(4):247-50.
- 40.Sennerby L, Carlsson GE, Bergman B, Warfvinge J. Mandibular bone resorption in patients treated with tissue-integrated prostheses and in complete-denture wearers. *Acta Odontol Scand* 1988 Jun;46(3):135-40.
- 41.von Wowern N, Harder F, Hjørting-Hansen E, Gottfredsen K. ITI implants with overdentures: a prevention of bone loss in edentulous mandibles? *Int J Oral Maxillofac Implants* 1990 Summer;5(2):135-9.
- 42.Yaffe A, Fine N, Alt I, Binderman I. The effect of bisphosphonate on alveolar bone resorption following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 1995 Nov;66(11):999-1003.
- 43.Yaffe A, Iztzovich M, Earon Y, Alt I, Lilov R, Binderman I. Local delivery of an amino bisphosphonate prevents the resorptive phase of alveolar bone following mucoperiosteal flap surgery in rats. *J Periodontol* 1997 Sep;68(9):884-9.
- 44.Yaffe A, Binderman I, Breuer E, Pinto T, Golomb G. Disposition of alendronate following local delivery in a rat jaw. *J Periodontol* 1999 Aug;70(8):893-5.
- 45.Yaffe A, Golomb G, Breuer E, Binderman I. The effect of topical delivery of novel bisacylphosphonates in reducing alveolar bone loss in the rat model. *J Periodontol* 2000 Oct;71(10):1607-12.
- 46.Yaffe A, Kollerman R, Bahar H, Binderman I. The influence of alendronate on bone formation and resorption in a rat ectopic bone development model. *J Periodontol* 2003 Jan;74(1):44-50.
- 47.Yaffe A, Herman A, Bahar H, Binderman I. Combined local application of tetracycline and bisphosphonate reduces alveolar bone resorption in rats. *J Periodontol* 2003 Jul;74(7):1038-42.
- 48.Binderman I, Adut M, Yaffe A. Effectiveness of local delivery of alendronate in reducing alveolar bone loss following periodontal surgery in rats. *J Periodontol* 2000 Aug;71(8):1236-40.
- 49.Kaynak D, Meffert R, Gunhan M, Gunhan O, Ozkaya O. A histopathological investigation on the effects of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the mandible of rats. *J Periodontol* 2000 May;71(5):790-6.
- 50.Kaynak D, Meffert R, Bostanci H, Gunhan O, Ozkaya OG. A histopathological investigation on the effect of systemic administration of the bisphosphonate alendronate on resorptive phase following mucoperiosteal flap surgery in the rat mandible. *J Periodontol* 2003 Sep;74(9):1348-54.
- 51.Grevstad HJ. Doxycycline prevents root resorption and alveolar bone loss in rats after periodontal surgery. *Scand J Dent Res* 1993 Oct;101(5):287-91.

52. Grevstad HJ, Boe OE. Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. *Eur J Oral Sci* 1995 Jun;103(3):156-9.
53. Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent* 1998;7(4):267-76.
54. Katchburian E, Arana V. Tecido Ósseo. In: Kratchburian E, Arana V. *Histologia e Embriologia Oral*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1989. p.39-75.
55. Ott SM. Theoretical and methodological approach. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p.18-231.
56. Meghji S. Bone remodeling. *Brit Dent J* 1992 Mar;172(5):235-42.
57. Nijweide PJ, Burger EH, Nulend JK, Van der Plas A. The osteocycle. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p.9-115.
58. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Wijen AJ, Frenkel B, Montecino M. Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p.6-69.
59. Suda T, Udagawa N, Takahashi N. Cells of bone: osteoclast generation. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press; 1996. p.7-87.
60. Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1977.
61. Neves JB. *Implantodontia Oral*. São Paulo: Rona; 2001.
62. Bezzerra FJB, Lenharo A. *Terapia Avançada em Implantodontia*. São Paulo: Artes Médicas; 2002.
63. Nyssen-Behets C, Duchesne PY, Dhem A. Structural changes with aging in cortical bone of the human tibia. *Gerontology* 1997 Nov-Dez;43(6):316-25.
64. Roberts WE, Gonsalves M. Aging of bone tissue. In: Holm-Pedersen P, Løe H. *Geriatric Dentistry*. Munksgaard: Mosby Company Ltd.; 1986. p.83-93.
65. Frost MH. The biology of fracture healing: An overview for clinicians Part I. *Clin Ortho* 1989;248:283-93.
66. Frost MH. The biology of fracture healing: An overview for clinicians Part II. *Clin Ortho* 1989;248:294-309.
67. Yaffe A, Fine N, Binderman I. Regional accelerated phenomenon in the mandible following mucoperiosteal flap surgery. *J Periodontol* 1994 Jan;65(1):79-83.
68. Roberts WE, Turley PK, Brezniak N, Fielder PJ. Implants: bone physiology and metabolism. *CDA J* 1987 Oct;15(10):54-61.

69. Roberts WE. Bone tissue interface. *J Dent Educ* 1988 Dec;52(12):804-9.
70. Nyman S, Lindhe J, Ericsson I. The effect of progressive tooth mobility on destructive periodontitis in the dog. *J Clin Periodontol* 1978 Aug;5(3):213-25.
71. Binderman I, Adut M, Zohar R, Bahar H, Faibish D, Yaffe A. Alveolar bone resorption following coronal versus apical approach in a mucoperiosteal flap surgery procedure in the rat mandible. *J Periodontol* 2001 Oct;72(10):1348-53.
72. Al-Rasheed A, Scheerens H, Rennick DM, Fletcher HM, Tatakis DN. Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10. *J Dent Res* 2003 Aug;82(8):632-5.
73. Moriya Y, Ito K, Murai S. Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 1998 Dec;40(4):171-5.
74. Barnett NA, Rowe DJ. A comparison of alveolar bone in young and age mice. *J Periodontol* 1986 Jul;57(7):447-52.
75. Amstad-Jossi M, Schroeder HE. Age-related alterations of periodontal structures around the cemento-enamel junction and of the gingival connective tissue composition in germ-free rats. *J Periodontal Res* 1978 Jan;13(1):76-90.
76. Sashima M, Satoh M, Suzuki A. Alveolar bone loss of senescence-accelerated mouse (SAM). *J Dent Res* 1990 Jan;69(1):82-6.
77. Messer HH. Alveolar bone loss in a strain of mice. *J Periodontal Res* 1980 Mar;15(2):193-205.
78. Belting CM, Schour I, Weinmann JP, Shepro MJ. Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. *J Dent Res* 1953 Jun;32(3):332-53.
79. Gilmore ND, Glickman I. Some age changes in the periodontium of the albino mouse. *J Dent Res* 1959 Nov-Dec;38:1195-206.
80. Tatakis DN, Guglielmoni P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. *J Periodontol* 2000 Sep;71(9):1395-400.
81. Selvig KA. Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol* 1994 Dec;65(12):1169-72.
82. Núcleo interdisciplinar de bioética. Disponível em: <<http://www.bioética.ufrgs.br>> Acesso em 15 jun. 2002.
83. Comitê de Ética em Pesquisa. Disponível em: <<http://www.pucrs.br/prppg/cep/>> Acesso em 10 maio 2002.
84. Brookbank JW. Aging in mammals. In: Brookbank JW. *The biology of aging*. New York: Harper & Row Publishers; 1990. p.40-61.

85.The Jackson Laboratory. Disponível em: <<http://www.jacksonlaboratory.com>> Acesso em 10 jan. 2004.

86.Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. J Periodontal Res 2002 Apr;37(2):161-5.

87.Shoji k, Ohtsuka-Isoya M, Horiuchi H, Shinoda H. Bone mineral density of alveolar bone in rats during pregnancy and lactation. J Periodontol 2000 Jul;71(7):1073-8.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

Aprovação do projeto de tese pela Comissão Científica e de Ética da  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul





Ofício nº 395/02-CEP

Porto Alegre, 06 de setembro de 2002.

Ilmo(a) Sr(a)  
Mest Elken Gomes Rivaldo  
N/Universidade

Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS  
apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Um modelo  
para estudo de perda óssea alveolar ao longo do envelhecimento".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Délio José Kipper  
Coordenador do CEP-PUCRS

## ANEXO B

Normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais

Art. 1 - Fica permitida, em todo território nacional, a vivissecação de animais, nos termos desta lei.

Art. 2 - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3 - A vivissecação não será permitida:

I – sem emprego de anestesia;

II – em centros de pesquisa e estudos não registrados em órgão competente;

III – sem supervisão de técnico especializado;

IV – com animais que não tenham permanecido mais de 15(quinze) dias em biotérios legalmente autorizados;

V – em estabelecimento de ensino de 1º e 2º graus e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.<sup>1</sup>

Art.4 – O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizagem cirúrgica, quando ou após a vivissecação, receber cuidados especiais.

Parágrafo 1 – Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas;

Parágrafos 2 – Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiências ou demonstrações somente poderão sair do biotério 30(trinta) dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

---

<sup>1</sup> Brasil. 6638, de 08 de maio de 1979, que estabelece normas para a prática didático Lei -científica da vivissecação de animais e determina outras providências.

Art.5 – Os infratores desta lei estarão sujeitos:

I – às penalidades cominadas no artigo 64, apud, do decreto-lei 3688, de 03/10/41, no caso de ser a primeira infração;

II – à interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisas, no caso de reincidência.

Art.6 – O poder executivo, no prazo de 90(noventa) dias, regulamentará a presente lei, especificando:

I – o órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstração com animais vivos;

II – as condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios;

III – órgãos e autoridades competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art.7 – Esta lei entra em vigor na data de sua publicação.

Art.8 – Revogam-se as disposições em contrário.

## NORMAS

- a) Todo o pesquisador deverá encaminhar à SEA (seção de experimentação animal/DPEA) o formulário devidamente preenchido para avaliação e aprovação;
- b) o pesquisador deverá cumprir o cronograma estabelecido para uso do local;
- c) todo procedimento que envolver procedimentos cirúrgicos deverá seguir as normas de ética e legislação vigentes;
- d) quanto aos animais utilizados:
- e) Origem: DPEA ou de lugar idôneo;
- f) Todo animal que entrar no biotério deverá sofrer quarentena para avaliação prévia.
- g) Ao pesquisador caberá: racionalizar o número de pessoas circulantes dentro do biotério e o número de vezes que entrar no setor;
- h) Não circular com avental já utilizado em outro ambiente;
- i) Em nenhuma hipótese, entrar nas salas de criação;
- j) O pesquisador deverá providenciar, pessoalmente, quaisquer materiais e instrumentos necessários à sua pesquisa, devendo, os mesmos, serem mantidos em caixas e identificados;
- k) Os responsáveis pela SEA deverão ser informados, de qualquer alteração na dieta e rotina dos animais;
- l) Manter as normas de uso do laboratório.

## ANEXO C

Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde Divisão  
de Produção e Experimentação Animal - DPEA

GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL  
SECRETARIA DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PRODUÇÃO E PESQUISA EM SAÚDE  
DIVISÃO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL-DPEA

**SOLICITAÇÃO DE APOIO A PESQUISA**

TÍTULO DO TRABALHO:

**PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E ENVELHECIMENTO: UM MODELO PARA ESTUDO EM CAMUNDONGOS**

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Analisar o comportamento do osso alveolar submetido ao estresse cirúrgico (retalho mucoperiósteo com aproximação coronal) em camundongos de 3, 6, 9 e 12 meses, machos, fêmeas virgens e com parições.

- Análise morfométrica; face vestibular e lingual

**ESPÉCIE E LINHAGEM NECESSÁRIA:** camundongos *Mus domesticus* CF<sub>1</sub>

**NÚMERO DE ANIMAIS:** 76.

**SEXO/IDADE:** machos, fêmeas virgens e com parições, de 3, 6, 9 e 12 meses.

**DURAÇÃO DO EXPERIMENTO (INÍCIO E TÉRMINO):** maio de 2002 até agosto de 2003.

**CUIDADOS NECESSÁRIOS:** alimentação, cuidados de higiene, cuidados de manejo e hospedagem.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Elken Gomes Rivaldo

**MÉDICA VETERINÁRIA:** Luisa Macedo Braga- CRMV -1-2393 Matr.:12178233

ANEXO D  
Anexos do artigo 1



Patente é um título de propriedade temporária sobre uma invenção ou modelo de utilidade, outorgados pelo Estado aos inventores ou autores ou outras pessoas físicas ou jurídicas detentoras de direitos sobre a criação. Em contrapartida, o inventor se obriga a revelar detalhadamente todo o conteúdo técnico da matéria protegida pela patente.

#### Processamento do Pedido de Patente e da Patente

São várias as etapas que constituem o depósito de um pedido de patente no INPI e de sua tramitação no Órgão: busca prévia, depósito e conteúdo do pedido de patente, sigilo do pedido depositado, exame do pedido, carta-patente, recurso/anuidade e custos básicos.

[www.periodicos.capes.gov.br/DII](http://www.periodicos.capes.gov.br/DII) 23/01/2004

[www.inpi.gov.br](http://www.inpi.gov.br) 04/02/2004

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)