

TÁBATA DE MELLO TERA

**IMUNOLocalização dos marcadores de formação e
reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em
ratas com deficiência estrogênica**



2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

TÁBATA DE MELLO TERA

**IMUNOLocalização dos marcadores de formação e
reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em
ratas com deficiência estrogênica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia

Orientadora: Prof^a Adjunta Maria Aparecida Neves Jardimi

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Renata Falchete do Prado

São José dos Campos

2010

BANCA EXAMINADORA

Profª Adjunta Maria Aparecida Neves Jardim (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Drª Andréa Carvalho de Marco

Faculdade de Odontologia de São Paulo

Universidade de São Paulo - USP

Profª Titular Yasmin Rodarte Carvalho

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos, 02 de junho de 2010

Dedicatória

À Deus, por ter me dado força e saúde para cumprir essa jornada.

À minha mãe, Angelina, por todo o carinho e o esforço para proporcionar a mim e minhas irmãs tudo de melhor.

A meu pai, Sílvio Yoshimi Tera (in memoriam). Sei que estaria muito orgulhoso de mim neste momento.

Ao meu namorado, Guto, pelo seu apoio incondicional e por acreditar sempre em mim. Seu companheirismo, compreensão e participação intensa em todo esse trabalho tornaram essa jornada mais suave.

Agradecimentos

À Ucha, minha orientadora. Por ter me aceitado como sua orientada. Agradeço pela sua amizade, a confiança depositada em mim, a liberdade que me deu em todo o desenvolvimento deste trabalho, e ao aprendizado que tive nesses anos de convivência. Que o fim deste ciclo seja o início de um novo.

À Profa. Dra. Renata Falchete do Prado, por ter aceitado ser minha co-orientadora. Seu conhecimento foi imprescindível para a realização deste trabalho. Sua paciência e vontade de ensinar fazem com que muitos de nós, pós-graduandos, se espelhem em você.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. José Roberto Rodrigues.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga-Ito

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Larry W. Fisher, do National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, por ter gentilmente cedido os anticorpos Sialoproteína Óssea e Osteonectina utilizados neste trabalho.

Ao Dr. Rodrigo Dias Nascimento, por ter gentilmente cedido os blocos utilizados em seu trabalho de mestrado.

Aos professores da Disciplina de Periodontia, por todo o aprendizado.

Ao Prof. Dr. Warley David Kerbauy, por ter me acolhido nas Disciplinas de Odontologia Geriátrica e Periodontia. Sua amizade e vontade de ensinar contribuíram muito para minha formação.

À Prof^a Maria Nadir Gasparoto Mancini (in memorian), pelos ensinamentos em tão curta convivência.

Aos meus amigos de jornada Michelle, Adriana Delgado, Adriana Marchini, Lilibeth, Dennia, Ana Lourdes, Fernanda, Fernando, Luis Felipe. A companhia de vocês tornou minha caminhada mais alegre.

À Ana Lourdes, pelo capricho na confecção dos meus blocos e lâminas.

À Sandra, secretária do Departamento de Cirurgia e Diagnóstico Bucal, e à Marcinha, por toda a ajuda e amizade.

À todos que me acompanharam e torceram por mim nestes 2 anos.

De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE QUADROS E TABELAS	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	18
RESUMO	19
1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 Remodelação Óssea.....	22
2.2 Osteoporose.....	23
2.3 Proteínas não-colágenas da matriz óssea	25
2.3.1 Osteocalcina	26
2.3.2 Sialoproteína Óssea.....	27
2.3.3 Osteonectina.....	29
2.4 RANK, RANKL e Osteoprotegerina	30
2.5 Regeneração Óssea Guiada	33
3 PROPOSIÇÃO	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais e grupos experimentais	38
4.2 Procedimentos cirúrgicos	40
4.2.1 Anestesia	40
4.2.2 Antibiótico.....	40
4.2.3 Ovariectomia e ovariectomia simulada.....	41
4.2.4 Execução do enxerto	42
4.2.5. Eutanásia	47
4.3 Processamento histológico	47
4.4 Processamento imunistoquímico.....	48
4.5 Análise Microscópica	52

5 RESULTADOS.....	53
5.1 Análise Histológica Descritiva.....	53
5.1.1 Período de zero hora.....	53
5.1.2 Período de sete dias.....	53
5.1.3 Período de 21 dias.....	54
5.1.4 Período de 45 dias.....	55
5.1.5 Período de 60 dias.....	55
5.2 Análise Imunoistoquímica.....	56
5.2.1 Sialoproteína Óssea (BSP).....	56
5.2.1.1 Período de zero hora.....	57
5.2.1.2 Período de sete dias.....	58
5.2.1.3 Período de 21 dias.....	59
5.2.1.4 Período de 45 dias.....	59
5.2.1.5 Período de 60 dias.....	60
5.2.2 Osteonectina (ONC).....	64
5.2.2.1 Período de zero hora.....	65
5.2.2.2 Período de sete dias.....	66
5.2.2.3 Período de 21 dias.....	67
5.2.2.4 Período de 45 dias.....	68
5.2.2.5 Período de 60 dias.....	68
5.2.3 Osteocalcina (OCC).....	74
5.2.3.1 Período de zero hora.....	75
5.2.3.2 Período de sete dias.....	76
5.2.3.3 Período de 21 dias.....	77
5.2.3.4 Período de 45 dias.....	78
5.2.3.5 Período de 60 dias.....	79
5.2.4 RANKL.....	83
5.2.4.1 Período de zero hora.....	84
5.2.4.2 Período de 7 dias.....	85
5.2.4.3 Período de 21 dias.....	86
5.2.4.4 Período de 45 dias.....	87

5.2.4.5 Período de 60 dias	87
6 DISCUSSÃO	92
7 CONCLUSÕES	104
8 REFERÊNCIAS	105
ANEXOS	115
ABSTRACT	117

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Ovariectomia (OVZ) e Ovariectomia Simulada (SHAM). a) Tricotomia e desinfecção da região abdominal; b) incisão linear; c) tracionamento e exposição do ovário (❖) 42
- Figura 2 - Exposição e preparo do leito receptor: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular; d) exposição do ângulo mandibular; e) perfuração para fixação do enxerto; f) passagem do fio de sutura para a fixação do enxerto..... 45
- Figura 3 - Exposição e preparo do leito doador: a) incisão e exposição da calvária; b) osteotomia circular realizada com a broca trefina; c) enxerto removido; d) perfuração central para fixação ao leito receptor..... 46
- Figura 4 - a) fixação do enxerto; b) fixação da membrana de PTFE-e sobre o enxerto. 46
- Figura 5 - Esquema representativo dos cortes histológicos..... 48
- Figura 6 - Sialoproteína Óssea. Período zero hora. a) Marcação leve da matriz óssea do leito receptor (L) e enxerto (E) do grupo OVZ-ME. Aumento original 100x. b) Lacunas de osteócitos da matriz com marcação

- moderada. Aumento original 400x. c) Megacariócitos (▶) com marcação citoplasmática leve. Aumento original 1000x. d) Marcação moderada de linhas reversas (⇨). Aumento original 400x..... 61
- Figura 7 - Sialoproteína Óssea. Período 7 dias. a) Grupo SHAM-E: Marcação intensa do osso neoformado (*) sobre o leito (L) e na base do leito. Aumento original 100x. b) Grupo SHAM-ME: Marcação intensa do osso neoformado (*) sobre o leito receptor. Osteoblastos (➔) e osteócitos (⇨) se mostram intensamente marcados. Aumento original 400x..... 62
- Figura 8 - Sialoproteína Óssea. Período 21 dias. a) Grupo SHAM-ME: Marcação intensa do osso neoformado (*) na interface leito-enxerto e ao redor do enxerto (E). Aumento original 100x. b) Grupo OVZ-ME: Osteócitos (⇨) e osteoblastos (➔) de permeio às trabéculas ósseas imaturas mostram-se intensamente marcados. Aumento original 400x..... 62
- Figura 9 - Sialoproteína Óssea. Período 45 dias. a) Grupo SHAM-ME: Marcação leve a moderada do osso neoformado (*) e da parte mediana do enxerto (E). Aumento original 400x. b) Grupo OVZ-ME: Osteoblastos (➔) na superfície e osteócitos (⇨) moderadamente marcados. Aumento original 1000x... 63
- Período 60 dias. c) Grupo SHAM-ME: Os osteócitos (⇨) moderadamente marcados na porção mediana do enxerto. Aumento original 400x. d) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (➔) na periferia do osso neoformado

exibem marcação leve a moderada. Aumento original 1000x..... 63

Figura 10 - Osteonectina. Período zero hora. a) Ausência de marcação da matriz óssea tanto do leito receptor (L) como do enxerto (E). Na parte inferior observa-se intensa marcação do músculo estriado esquelético (*). Aumento original 100x. b) Marcação moderada do tecido conjuntivo do espaço medular do enxerto (◆). Aumento original 200x. c) Megacariócito (▶) com marcação intensa. Demais células da medula óssea com marcação citoplasmática que varia de leve a intensa. Aumento original 1000x. d) Osteócitos (⇒) presentes na porção mediana do enxerto exibem marcação leve a moderada. Aumento original 400x..... 70

Figura 11 - Osteonectina. Período sete dias. a e b) Grupo OVZ-E: Tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) com marcação intensa, e levemente marcado (❖) ao redor do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. c e d) Grupo SHAM-ME. Intensa marcação do tecido de granulação tanto na interface leito-enxerto (★) como ao redor (❖) do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. e) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (➔) e osteócitos volumosos (⇒) nas trabéculas ósseas imaturas intensamente marcados. Aumento original 1000x. f) Grupo OVZ-E: Marcação intensa do tecido conjuntivo do espaço medular (◆), osteócitos (⇒) e osteoblastos (➔). Aumento original 400x..... 71

- Figura 12 - Osteonectina. Período 21 dias. Grupo OVZ-E. a) Tecido medular nas trabéculas ósseas imaturas (◆) mostra marcação moderada a intensa. Os osteoblastos (→) mostram marcação leve a moderada enquanto os osteócitos (⇒) volumosos apresentam-se mais intensamente marcados. Aumento original 400x. b) Osteoblastos (→) sobre a superfície óssea estão moderadamente marcados. Aumento original 1000x..... 72
- Figura 13 - Osteonectina. Período 60 dias. a e b) Grupo SHAM-E: Tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e ao redor (❖) do enxerto (E) com marcação leve Aumento original 200x. c) Grupo OVZ-ME: Osteoblastos (→) com marcação citoplasmática leve. Aumento original 1000x. d) Grupo SHAM-ME: Intensa marcação do tecido de granulação ao redor (❖) do enxerto (E). Aumento original 200x..... 72
- Figura 14 - Osteocalcina. Período zero hora. a) Matriz óssea com leve marcação. Aumento original 100x. b) Lacunas dos osteócitos (⇒) no centro do enxerto moderadamente marcadas. Aumento original 400x. c) Tecido medular discretamente marcado (◆). Aumento original 400x. d) Positividade moderada de células da medula óssea e ausência de marcação de megacariócitos (▶). Aumento original 400x..... 79
- Figura 15 - Osteocalcina. Período sete dias. a e b) Grupo OVZ-ME: intensa marcação do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e ao redor (❖) do enxerto

(E), respectivamente. Aumento original 200x. c e d) Grupo SHAM-E: Marcação intensa do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e discreta ao redor (❖) do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. e) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (➔) com moderadamente marcados. Aumento original 1000x. f) Grupo SHAM-E: Osteócitos (⇨) nas trabéculas ósseas imaturas exibem positividade leve, enquanto os osteoblastos (➔), positividade que variou de leve a moderada. Aumento original 400x..... 80

Figura 16 - Osteocalcina. Período de 45 dias. Grupo SHAM-ME. a) Osteoblastos (➔) com marcação moderada. Aumento original 1000x. b) Lacunas dos osteócitos (⇨) com positividade leve, e por vezes, ausente. Aumento original 400x..... 81

Figura 17 - Osteocalcina. Período 60 dias. a) Grupo OVZ-E: Marcação moderada do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Grupo OVZ-ME: Marcação intensa do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. c) Osteoblastos (➔) com positividade intensa. Aumento original 1000x. d) Osteócitos (⇨) volumosos do osso neoformado intensamente marcados. Aumento original 400x..... 81

Figura 18 - RANKL. a) Marcação negativa de megacariócitos e intensa de células da medula óssea (»). Aumento original 1000x. b) Marcação negativa da matriz óssea. Aumento original 100x. c) Marcação leve do tecido

conjuntivo fibroso nos espaços medulares (◆) do enxerto e marcação moderada dos osteócitos (⇒) próximo aos espaços medulares. Aumento original 200x. Marcação moderada dos osteócitos (⇒) na região mediana do enxerto. Aumento original 400x..... 88

Figura 19 - RANKL. Período 7 dias. a) Grupo OVZ-ME: Marcação leve do tecido da interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Grupo OVZ-E: Marcação intensa do tecido da interface leito enxerto (★). Aumento original 100x. c) Osteoblastos (➔) com marcação moderada a intensa e lacunas dos osteócitos (⇒) volumosas e intensamente marcadas. Aumento original 400X. d) Osteoclasto (▶) na parte inferior do enxerto mostra-se levemente marcado. Aumento original 1000X..... 89

Figura 20 - RANKL. a) Período 21 dias. a) Grupo OVZ-ME: Osteócitos (⇒) do osso neoformado menos volumosos com marcação leve de suas lacunas. Osteoblastos (➔) sobre a superfície óssea exibem positividade moderada. Aumento original 400x. b) Grupo SHAM-E Osteoclasto (▶) com marcação negativa 400x..... 89

Figura 21 - RANKL. Período 45 dias. a) e b) Grupo OVZ-ME. a) Marcação moderada do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Marcação moderada do tecido conjuntivo ao redor do enxerto (❖); osteoclasto (▶) sobre a superfície óssea com marcação citoplasmática leve. Aumento original 400x. c) e d) Grupo OVZ-E: c) Marcação intensa do tecido

conjuntivo na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. d) Intensa marcação de fibroblastos do tecido ao redor do enxerto. Aumento original 400x..... 90

Figura 22 - RANKL. Período 60 dias. a) Marcação moderada de osteoblastos (➔). Aumento original 1000x. b) Intensa marcação de células endoteliais (➔) do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto (L-E). Aumento original 400x..... 90

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Anticorpos, titulação, tempo e temperatura de incubação, e recuperação antigênica.....	49
Tabela 1 -	Sialoproteína Óssea. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.....	57
Tabela 2 -	Osteonectina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.....	64
Tabela 3 -	Osteocalcina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.....	73
Tabela 4 -	RANKL. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSP = sialoproteína óssea

E = enxerto

EOA = enxerto ósseo autógeno

L = leito receptor

M-CSF = fator estimulador de colônias de macrófagos

ME = membrana de politetrafluoretileno expandido

OCC = osteocalcina

OCIF = fator inibidor de osteoclastogênese

ON = osso neoformado

ONC = osteonectina

OPG = osteoprotegerina

OVZ = ovariectomizado

PTFE-e = politetrafluoretileno expandido

RANK = receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$

RANKL = ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$

ROG = regeneração óssea guiada

SHAM = ovariectomia simulada

TC = tecido conjuntivo

TNF = fator de necrose tumoral

TNF α = fator de necrose tumoral alfa

WHO = World Health Organization

Tera TM. Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

O estudo avaliou a expressão imunoistoquímica dos marcadores de formação óssea Osteocalcina (OCC), Osteonectina (ONC) e Sialoproteína Óssea (BSP), e do marcador de reabsorção óssea Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa- β (RANKL) no processo de reparo do enxerto ósseo autógeno em bloco, recoberto ou não por membrana de Politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), em ratas com deficiência estrogênica induzida. Para tanto, foram avaliadas espécimes de Enxerto Ósseo Autógeno (EOA) recobertos ou não por membrana de PTFE-e, provenientes de 80 ratas, divididas aleatoriamente em 2 grupos (OVZ e SHAM). As 40 ratas pertencentes ao grupo OVZ foram submetidas à cirurgia de ovariectomia e as 40 do grupo SHAM à cirurgia de ovariectomia simulada. Os dois grupos foram subdivididos em E, onde foi realizada cirurgia para colocação de EOA, e grupo ME, onde o EOA foi recoberto por membrana de PTFE-e. Os períodos avaliados foram dia 0, 7, 21, 45 e 60 dias. Os espécimes foram incluídos em parafina, para realização de cortes seriados com 3 μ m de espessura, que foram estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropiltriétoxissilano e então foram submetidos à técnica imunoistoquímica para os marcadores OCC, BSP, ONC e RANKL. Os resultados mostraram marcação mais intensa da BSP nos dias 7 e 21. No sétimo dia, observou-se marcação intensa da ONC e RANKL, enquanto a OCC mostrou maior positividade nos dois últimos períodos. No último período avaliado, as características de marcação quanto à intensidade e às estruturas marcadas se assemelharam com os períodos iniciais para todos os marcadores. Os resultados permitiram concluir que o metabolismo ósseo foi mais intenso entre os dias 7 e 21, enquanto a maior taxa de remodelação foi observada aos 7 dias. A partir do 45^o dia, o osso neoformado já exibia características de osso maduro. A expressão dos marcadores imunoistoquímicos não foi alterada pela deficiência estrogênica, mas sim pela presença da membrana de PTFE-e.

Palavras-chave: Deficiência estrogênica. Regeneração Óssea Guiada. Reparo Ósseo. Osteocalcina. Osteonectina. Sialoproteína Óssea. RANKL.

1 INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida é acompanhado pelo aumento de doenças associadas a idades mais avançadas, como hipertensão, diabetes e osteoporose. Associado ao envelhecimento da população observa-se maior demanda por procedimentos estéticos e funcionais reconstrutivos, como os implantes osseointegrados.

Um dos requisitos para o sucesso dos implantes osseointegrados é que a área receptora tenha quantidade suficiente de tecido ósseo, situação que não ocorre em muitos casos. Nesses casos, pode-se lançar mão de técnicas que visam o ganho de tecido ósseo. Dentre essas técnicas, a considerada “*gold standard*” é a do enxerto ósseo autógeno (Jardini et al., 2005), devido às suas propriedades osteogênicas e por não apresentar riscos de rejeição (Khan et al., 2005). A técnica da Regeneração Óssea Guiada tem sido associada aos enxertos ósseos autógenos, com melhores resultados, como tem sido demonstrado por diversos estudos (Alberius et al. 1992; Donos et al. 2002).

As proteínas não-colágenas apresentam papel importante na organização da matriz colágena e na regulação da formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Ganss et al., 1999) e estão relacionadas com a formação e reparo de tecidos mineralizados (McKee et al., 1996), enquanto a interação Osteoprotegerina/ Receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ / Ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (OPG/RANK/RANKL) tem papel fundamental no processo de osteoclastogênese, e é crítica para a regulação da remodelação óssea (Cao et al., 2005).

A influência da osteoporose pós-menopausa no processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos em bloco ainda não é completamente conhecida e explicada, o que leva muitos autores e profissionais a contra-indicarem os implantes osseointegrados nesses pacientes. Dessa maneira, torna-se necessário a avaliação do processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos nesses pacientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Remodelação Óssea

A saúde óssea é mantida pelo balanço do processo de remodelação (Young, 2003; Cao et al., 2005; Lerner, 2006; McCormick, 2007), que garante a reposição contínua de osso velho, fragilizado por microfraturas, por osso novo (Lerner, 2006; McCormick, 2007).

Durante o crescimento, a formação óssea é maior que a reabsorção, ocorrendo aumento da massa óssea. Com a aproximação da idade adulta, o processo de remodelação caracteriza-se pelo reparo contínuo do osso através de ciclos coordenados de formação óssea por osteoblastos e reabsorção por osteoclastos (Cao et al., 2005; Lerner, 2006; McCormick, 2007; Gallagher, 2008). As taxas de formação e reabsorção estão intimamente ligadas, aumentando e diminuindo de maneira sinérgica (Lerner, 2006; Gallagher, 2008). A perda óssea tem início logo no início da idade adulta e continua até o envelhecimento (Cao et al., 2005).

Embora o estágio final do processo de reabsorção óssea seja marcado pela presença de osteoclastos multinucleados aderidos à superfície óssea, há uma fase inicial de ativação em que aparecem precursores de osteoclastos e antecedem a fase reabsortiva. A reabsorção se completa em período de 10 a 14 dias, e em seqüência, o processo de neoformação óssea se inicia e preenche a cavidade pelos

próximos 6 a 9 meses. Este processo é dinâmico e localizado, e ocorre em diversos sítios do esqueleto (Gallagher, 2008).

Falhas no processo de remodelação podem levar à perda de tecido ósseo, e é observada em condições patológicas como osteoporose, periodontite, osteíte periapical, osteomielite, perda de próteses ortopédicas, metástase de câncer (Young, 2003; Lerner, 2006).

A superfície de todos os ossos é recoberta por uma camada de osteoblastos. Os osteoblastos controlam a formação e ativação dos osteoclastos. A ativação do ciclo de remodelação leva, inicialmente, à degradação de osteóide não-mineralizado, presente entre a camada de osteoblastos e o osso mineralizado. Quando a remodelação é iniciada, os osteoclastos criam lacunas de reabsorção, que serão povoadas por células mononucleadas. Em seguida, células precursoras de osteoblastos são recrutadas para a lacuna, onde irão se diferenciar em osteoblastos ativos que preencherão a lacuna de reabsorção com osso novo (Lerner, 2006).

2.2 Osteoporose

A osteoporose é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, e caracteriza-se por diminuição da massa óssea, deterioração da estrutura óssea, levando a um decréscimo da força óssea e aumento do risco de fraturas (Lerner, 2006).

A fragilidade óssea é associada com múltiplos fatores de risco, sendo os mais importantes a idade avançada, sexo feminino, baixo peso corpóreo, baixa densidade mineral, menopausa precoce, distúrbios alimentares e história materna de osteoporose (McCormick, 2007).

Estima-se que 75 milhões de pessoas na Europa, Japão e EUA são afetadas, o que levaria a um número de 2,3 milhões de fraturas anuais decorrentes de osteoporose apenas na Europa e EUA. As mulheres são acometidas em proporção 3 vezes maior que os homens (WHO, 2003).

A densidade óssea inicia seu declínio antes da meia-idade (Lips et al., 1978), quando ocorre a diminuição dos níveis de estrogênio na mulher (Slemenda et al., 1996). Condições adversas, como tabagismo, sedentarismo, inflamação gastrointestinal e mal-absorção são fatores etiológicos para a diminuição da integridade esquelética (McCormick, 2007).

A Organização Mundial de Saúde propôs, em 1994, uma classificação para diagnóstico da osteoporose. Segundo essa classificação, o diagnóstico da osteoporose é dado quando a densidade mineral óssea for menor que 2,5 desvios-padrões, independente da ocorrência de uma fratura. Quando a densidade mineral óssea variar entre -1 e -2,5 desvios-padrões é classificada como osteopenia (WHO, 2003).

A prevenção da osteoporose deve começar muito antes da menopausa. Nutrição deficiente nos períodos de pico de massa óssea pode resultar no aumento do risco de fraturas em idade avançada (Brabaj et al., 2005).

O estrogênio é o principal hormônio regulador da remodelação óssea, importante tanto para a mulher como para o homem. O estrogênio limita a perda óssea através de seus efeitos sobre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos (Kalaitzidis; Gilmore, 2005).

A diminuição dos níveis de estrogênio leva ao aumento do número de sítios de remodelação, devido ao aumento da formação de osteoclastos e diminuição da formação de osso novo nas lacunas de reabsorção, com conseqüente diminuição da massa óssea e aumento do risco de desenvolver osteoporose. Esse fato pode ser explicado pela

presença de receptores de estrogênio em células progenitoras de osteoclastos e osteoclastos multinucleados, ou ainda devido ao aumento da expressão, nas células T, de citocinas capazes de estimular a osteoclastogênese (Lerner, 2006; McCormick, 2007).

2.3 Proteínas não-colágenas da matriz óssea

A matriz óssea é composta de material orgânico e mineral. O colágeno tipo I é o produto primário dos osteoblastos durante a formação da matriz óssea (Aubin; Liu, 1996) e compreende 85% a 90% do total da matriz óssea orgânica (Termine; Robey, 1996).

As proteínas não-colágenas compreendem um grupo de proteínas ácidas que se ligam a mineral, e mostram extensivas modificações como glicosilação, fosforilação e sulfatação. Apresentam diversas funções relacionadas à formação, remodelação e reparo de tecidos mineralizados de origem colágena (McKee et al., 1996).

As proteínas não-colágenas apresentam papel importante na organização da matriz colágena e na regulação da formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita (Ganss et al., 1999).

A incorporação dessas proteínas na matriz pode variar de acordo com o estágio de formação das unidades do osso. Sua distribuição específica e relação espacial podem estar relacionadas à função de cada proteína durante a reabsorção e formação. Os padrões distintos de localização dessas proteínas no osso sustentam a hipótese de que, além das propriedades estruturais e de indução mineral, essas proteínas podem influenciar eventos associados com remodelação óssea, como recrutamento, adesão, diferenciação e atividade de células ósseas (Ingram et al., 1993).

2.3.1 Osteocalcina

A Osteocalcina (OCC) é uma pequena proteína de 5,8 kDa encontrada exclusivamente em tecidos mineralizados, produzida por osteoblastos durante a síntese de tecido ósseo (Lerner, 2006; Miheller et al., 2007; Inanç et al., 2007) e odontoblastos (Diniz-Santos et al., 2008). É a proteína não-colágena mais abundante do osso (Crăcium et al., 2000). É também conhecida como proteína Gla Óssea, devido à presença de resíduos de ácido glutâmico modificados (Lim et al., 2007).

Após sua síntese e secreção, 80% se liga à matriz de hidroxiapatita (Crăcium et al., 2000), e quantidades proporcionais caem na corrente sanguínea (Miheller et al., 2007). Portanto, níveis séricos ou plasmáticos de OCC são úteis na avaliação da formação e reabsorção óssea (Lerner, 2006).

A OCC está associada às fases iniciais da mineralização e na regulação do crescimento dos cristais (Hunter et al., 1996), sendo portanto um marcador tardio da atividade osteoblástica (Aubin; Liu, 1996; McCormick, 2007;)

Estudo de McKee et al. (1992) mostrou associação da OCC com regiões mineralizadas de matrizes extracelulares do osso e cartilagem e o acúmulo dessas proteínas nas superfícies teciduais, dado consistente com a hipótese de que tenham papel fundamental no processo de mineralização extracelular e/ou que possam mediar a adesão celular.

Ivanovski et al. (2000) avaliaram, através da imunistoquímica, a regeneração tecidual guiada, com a barreira de PTFE-e em defeitos ósseos criados. A OCC foi marcada mais intensamente no osso maduro quando comparado ao osso em processo

de regeneração. O padrão de imunolocalização das macromoléculas da matriz extracelular sugere que a população de células heterogêneas que preencheu o defeito ósseo criou um ambiente favorável à regeneração periodontal.

A OCC é também um marcador útil no diagnóstico de tumores malignos, como o osteossarcoma (Takada et al., 1992; Fanburg et al., 1997).

2.3.2 Sialoproteína Óssea

A Sialoproteína Óssea (BSP) é uma fosfoproteína não-colágena de 75kD, glicosilada e sulfatada (Fisher et al., 1990; Ganss et al., 1999), encontrada quase que exclusivamente em tecidos mineralizados (Bianco et al., 1993; Ganss et al., 1999) e constitui aproximadamente 8 a 12% do total de proteínas não-colágenas do osso (Fisher et al., 1990; Bianco et al., 1993). É sintetizada e secretada por células formadoras de osso (Bianco et al., 1991; Bianco et al., 1993; Ganss et al., 1999; Inanç et al., 2007), dentina e cemento (Chen et al., 1998; Ganss et al., 1999; Inanç et al., 2007) e condrócitos hipertróficos (Bianco et al., 1991; Fisher et al., 2001).

A BSP pertence à família de proteínas chamada SIBLING (do inglês: small integrin binding ligand N-linked glycoprotein) (Fisher; Fedarko, 2003; Fisher et al., 2001).

A BSP se liga seletivamente à hidroxiapatita e ao colágeno (Termine et al., 1981; Fisher et al., 2001). Está associada à quimioatração de pré-cementoblastos, adesão à superfície radicular e diferenciação celular (Lao et al., 2006).

No osso, a BSP é responsável pela adesão de osteoblastos e osteoclastos por meio de receptores $\alpha v\beta 3$ (Bellahcène et al., 2000).

Expressão do gene da BSP é induzida por osteoblastos recém-formados, estimulada por hormônios e citocinas que promovem a formação óssea e suprimida por fatores de supressão da formação óssea (Ganss et al., 1999).

A BSP é um marcador do tardio fenótipo osteoblástico (Aubin; Liu, 1996; Termine; Robey, 1996), e está associada à formação óssea, remodelação (Chen et al., 1994; Amar et al., 1995) e mineralização (Inanç et al., 2007).

Alguns autores sugerem que a BSP tenha função na regulação do crescimento de cristais de hidroxapatita (Hunter et al., 1996; Bosshardt et al., 1998), e em processos físico-químicos como a sinalização celular que levará à diferenciação celular, e interações matriz-células e matriz-matriz (Bosshardt et al., 1998). Esses achados em osso e dente sugerem múltiplas funções para a BSP no desenvolvimento e manutenção de tecidos mineralizados.

Chen et al. (1993) observaram imunorreatividade da BSP restrita às células e matriz de tecidos mineralizados do osso alveolar e dentina. No osso alveolar, a imunorreatividade da BSP foi evidente nas células osteoblásticas e osteócitos na matriz óssea, o osso velho se corou mais intensamente que o osso neoformado. A BSP apareceu concentrada em linhas reversas de osso remodelado rapidamente. Este estudo demonstrou que a BSP é expressa durante a formação inicial da dentina e osso alveolar, e que esta proteína se acumula na dentina peritubular e matriz óssea.

Ingram et al. (1993) avaliaram espécimes de biópsia de osso humano através da imunoistoquímica e observaram marcação positiva para a BSP em todo o osso cortical e trabecular.

Chen et al. (1994) observaram, através da imunocitoquímica, que a matriz osteóide do osso recém-formado apresentava marcação para BSP associada à lócus de mineralização. Expressão moderada de BSP foi observada em osteoblastos velhos e osteócitos recentemente aprisionados na matriz óssea.

Estudos ainda têm demonstrado que a BSP é também expressa por câncer esteotrópico, sugerindo que a BSP tenha algum papel na patogênese de metástases ósseas (Ibrahim et al., 2000), incluindo carcinoma de mama (Ganss et al., 1999). A maior expressão da BSP estaria relacionada com maior severidade da doença e menos expectativa de vida (Fisher et al., 2001).

2.3.3 Osteonectina

A Osteonectina (ONC) é uma glicoproteína ácida fosforilada de 32 kD, específica do osso e rica em cisteína (Nakamura et al., 1996). É a proteína não-colágena mais abundante produzida por osteoblastos (Termine; Robey 1996) e se liga seletivamente à hidroxiapatita e ao colágeno (Termine et al., 1981; Termine; Robey 1996)

É marcador têmporo-espacial da proliferação e diferenciação de condrócitos e durante a formação da matriz condróide (Haas; Holick, 1996) e pode estar envolvida na regulação do ciclo celular dos condrócitos e modulação (Termine; Robey 1996).

A ONC é detectada no osteóide, matriz óssea, dentina, osteoblastos ativos e precursores na medula óssea, odontoblastos, ligamento periodontal e células da gengiva, condrócitos e condrócitos hipertróficos (Amar et al., 1995).

A ONC está envolvida nos estágios iniciais da mineralização do esqueleto, e é um reconhecido marcador da diferenciação de células osteogênicas normais (Serra et al., 1992). Está localizada no osso trabecular mineralizado e em níveis mais elevados na matriz do que nas células ósseas. Estudos sugerem que a ONC seja uma proteína específica do tecido, ligando-se às fases colágena e mineral do osso, talvez iniciando a mineralização ativa em tecidos esqueléticos normais (Termine et al., 1981). Vasos sanguíneos também podem mostrar imunorreatividade variada (Wewer et al., 1988).

Nakamura et al. (1996) sugerem que vários fatores de crescimento e citocinas, incluindo TGF beta e IL-1 beta, regulam a produção de ONC por condrócitos a níveis pré e pós translacionais, e que a síntese de ONC está aumentada em articulações com artrite reumatóide.

A ONC pode ser útil no diagnóstico histológico de tumores ósseos, e na diferenciação entre malignos e benignos (Serra et al., 1992). Bellahcène e Castronovo (1995) sugerem que a ONC pode ter papel na formação de microcalcificações ectópicas associadas ao câncer de mama. Wewer et al. (1988) observaram imunorreatividade da ONC na membrana basal de carcinomas bem-diferenciados e no citoplasma de carcinomas indiferenciados, além de marcação variada dos vasos sanguíneos.

2.4 RANK, RANKL e Osteoprotegerina

A homeostase óssea é mantida pelo balanço entre reabsorção óssea por osteoclastos e formação óssea por osteoblastos. Os osteoblastos têm papel central na formação óssea pela síntese de

diversas proteínas da matriz óssea, regulam a maturação dos osteoclastos por meio de fatores solúveis e interações que resultam em reabsorção óssea (Lerner, 2006).

Os osteoclastos se originam de células hematopoiéticas da medula óssea (Gallagher, 2008). Os osteoblastos regulam o número e atividade dos osteoclastos por meio da expressão do RANKL, OPG e Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) (Cao et al., 2005).

O M-CSF estimula a proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos através de seu receptor (c-fms), aumenta a fusão de células mononucleadas, e promove a sobrevivência dos osteoclastos. Os efeitos do RANKL nos precursores de osteoclastos são dependentes do M-CSF (Cao et al., 2005).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β – RANKL - é uma citocina pertencente à família do fator de necrose tumoral – TNF (Miheller et al., 2007; Gallagher, 2008). O RANKL é o mediador primário da formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, e está relacionado à perda óssea sob várias circunstâncias (Stolina et al., 2007). É produzido por osteoblastos e por células T ativadas (McCormick, 2007; Miheller et al., 2007), e são ativados localmente no osso (Miheller et al., 2007). O receptor ativador do fator nuclear kappa- β – RANK - e RANKL são expressos por células envolvidas na remodelação óssea e células do sistema imune (Stolina et al., 2007). O RANKL é o principal mediador da reabsorção óssea osteoclástica (Miheller et al., 2007).

O RANKL ativa o receptor RANK e induz a formação de osteoclastos através de recrutamento de precursores de osteoclastos na medula óssea, promove seu desenvolvimento e fusão em osteoclastos multinucleados (Gallagher, 2008).

A Osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibidor de osteoclastogênese (OCIF) é uma citocina pertence à família do receptor do fator de necrose tumoral – TNF (Miheller et al., 2007; McCormick, 2007). É produzida por osteoblastos e células da medula

óssea, e age como receptor para o RANKL, prevenindo que este que ligue ao RANK, bloqueando assim a reabsorção óssea (Jilka, 2003; Cao et al., 2005; Miheller et al., 2007; McCormick, 2007).

A interação OPG/RANK/RANKL tem papel fundamental no processo de osteoclastogênese, e é crítica para a regulação da remodelação óssea (Cao et al., 2005). A expressão alterada dessas moléculas pode resultar em extremos de fenótipos esqueléticos (osteoporose e osteopetrose) (Lee et al., 2005).

Muitas citocinas estão envolvidas no desenvolvimento dos osteoclastos. As citocinas IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão presentes nos precursores de osteoclastos e nos osteoclastos maduros (Pfeilschifter et al., 2002). A IL-1 é derivada de osteoblastos e é um potente estimulador do RANKL (Gallagher, 2008).

O RANKL tem papel importante na patogênese da osteoporose pós-menopausa, perda óssea associada à artrite reumatóide, metástase de câncer, mieloma múltiplo (Lewiecki et al., 2006).

O envelhecimento leva à redução da produção de hormônios sexuais, ao aumento do nível de citocinas pró-inflamatórias e diminuição da função do sistema imune (Garrett et al., 1990). A redução dos níveis de estrogênio leva à ativação de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias e RANKL, que estimulam a osteoclastogênese (Cao et al., 2005; McCormick, 2007). O estrogênio é um potente inibidor da IL-1, IL-6 e TNF- α (Lerner, 2006).

Após a menopausa, a perda óssea deve-se ao favorecimento da atividade do RANKL sobre a OPG. A diminuição dos níveis de estrógeno leva à diminuição da atividade da OPG e aumento da atividade do RANKL, levando ao aumento da reabsorção e perda óssea. Tratamento com estrógeno restaura o balanço em favor da OPG sobre o RANKL e pode explicar porque o estrógeno previne a perda óssea em mulheres pós-menopausa (Gallagher, 2008).

2.5 Regeneração Óssea Guiada

Os resultados clínicos favoráveis obtidos com o uso dos implantes osseointegrados e os resultados documentados sobre a integração tecidual tornaram seu uso confiável no tratamento dos pacientes. Entretanto, um dos principais requisitos para o sítio que receberá o implante é o adequado volume de osso alveolar (Donos et al., 2002; Jardini et al., 2005; Adeyemo et al., 2008).

Técnicas para promover ganho de tecido ósseo, como a regeneração óssea guiada e o enxerto ósseo autógeno permitem a colocação de implantes em áreas que não seriam possíveis (Buser et al., 1995; Buser et al., 1996; Donos et al., 2002).

A Regeneração Óssea Guiada (ROG) consiste na colocação de uma membrana e tem como objetivo promover ganho ósseo (Buser et al., 1993). Esta técnica tem sido empregada em vários casos de implantes dentários em que há quantidade (volume) insuficiente de osso no local receptor do implante (Taguchi et al., 2005).

A técnica consiste no recobrimento do defeito ósseo com uma membrana oclusiva que previne que o defeito ósseo seja povoado por células não-formadoras de osso provenientes do tecido mole. A membrana mantém o espaço que deve ser preenchido apenas por células originárias do osso (Kostopoulos; Karring, 1994).

Para o sucesso da ROG, alguns requisitos devem ser seguidos, como estabilização mecânica do enxerto, prevenção de infecção bacteriana, manutenção do espaço sob a membrana, separação de células osteogênicas das não-osteogênicas (Alberius et al., 1992; Donos et al., 2002), estabilidade da membrana, tamanho das perfurações

nas membranas, selamento periférico entre a membrana e o osso, e adequado suprimento sanguíneo (Lundgren et al., 1995).

Para que a membrana seja efetiva, deve apresentar algumas características, como biocompatibilidade, integração ao tecido, seleção de células que irão repovoar a área, estabilidade mecânica e fácil manuseio (Kim et al., 2005).

A membrana PTFE-e (politetrafluoretileno expandido) é um material biologicamente inerte muito utilizado para casos de ROG. Por ser um polímero sintético inerte, a membrana de PTFE-e necessita ser removida em uma segunda cirurgia. O osso neoformado pode apresentar maior ou menor risco de reabsorção óssea alveolar, sendo a remodelação óssea crucial para a manutenção da massa óssea estabelecida (Taguchi et al., 2005).

A técnica do enxerto ósseo autógeno requer remoção de tecido ósseo do próprio paciente e tem sido considerada como “*gold standard*” das técnicas de ganho de tecido ósseo por ser imunologicamente inerte e osteogênico (Jardini et al., 2005; Khan et al., 2005)

A regeneração e a incorporação do enxerto ósseo envolvem a interação entre o enxerto ósseo e o leito receptor por meio de um complexo processo de proliferação celular, migração, diferenciação e revascularização (Adeyemo et al., 2008).

Quando a técnica do enxerto ósseo autógeno é utilizada isoladamente, apresenta como principal desvantagem a possibilidade de parte do osso enxertado sofrer reabsorção com o passar do tempo (Jardini et al., 2005).

Alguns fatores como origem embriológica, arquitetura, dimensão e orientação do enxerto podem contribuir para o fracasso da técnica (Khan et al., 2005).

Alberius et al. (1992) e Jensen et al. (1995) encontraram maior formação óssea e maturação, além de maior componente ósseo e

menor quantidade de perda óssea em enxertos *onlay* cobertos com membranas de PTFE-e, quando comparados com enxertos não-cobertos.

Matsuzaka et al. (2001) e Donos et al. (2002) demonstraram que o uso de membranas para recobrimento do enxerto autógeno acelera a migração de células osteogênicas, a formação de osso novo e a mineralização.

Donos et al. (2002) avaliaram a regeneração de enxertos ósseos *onlay* autógenos com e sem recobrimento de membrana de PTFE-e. Entre os dias 15 e 180 após a cirurgia, o enxerto passou por processo de reabsorção e remodelação, e a área criada pela membrana foi parcialmente ocupada pelo enxerto ósseo e gradualmente preenchida por osso neoformado. Após 180 dias, o enxerto recoberto por membrana estava completamente integrado no osso neoformado, o que tornou praticamente impossível a identificação da junção entre o enxerto e o osso neoformado. Nesse mesmo período, quando não houve recobrimento dos enxertos pela membrana, observou-se reabsorção das bordas do enxerto.

Jardini et al. (2005) avaliaram o uso de membranas de PTFE-e em espécimes de enxerto autógeno e observaram perda óssea no período de cicatrização do grupo em que a membrana não foi utilizada. A partir do 21º dia, o grupo que recebeu apenas o enxerto ósseo autógeno sofreu extensiva reabsorção óssea, enquanto o grupo em que os enxertos foram recobertos por membrana de PTFE-e mostrou regeneração óssea difusa além das bordas do enxerto.

Nascimento (2006) avaliou a técnica do enxerto ósseo autógeno associada à ROG em ratas ovariectomizadas, e observou que os enxertos não recobertos pela membrana de PTFE-e sofreram significativa reabsorção, enquanto que a associação da ROG aos enxertos proporcionou a manutenção do seu volume original e neoformação óssea preenchendo o espaço subjacente à membrana de PTFE-e. Verificou-se ainda que a ovariectomia não influenciou

quantitativamente a reparação do enxerto ósseo recoberto ou não por membrana de PTFE-e.

Adeyemo et al. (2008) demonstraram em ovelhas que a combinação do enxerto ósseo *onlay* e a ROG resulta em maior ganho ósseo em comparação com o enxerto ósseo usado isoladamente. Após 4 semanas, observou-se maior formação óssea nos espécimes em que o enxerto ósseo foi recoberto por membrana colágena reabsorvível. A membrana formou um espaço que foi preenchido pelas células formadoras de osso originadas da margem do enxerto ósseo durante o processo de regeneração.

Faria et al. (2008) realizaram perfurações para acelerar a revascularização de enxertos *onlay* em mandíbula de coelhos. Após 10 dias, observaram que a revascularização dos enxertos acelerou o processo de remodelação, que levou ao aumento da deposição óssea. Nos grupos em que a perfuração não foi realizada, após 60 dias, a cortical do enxerto ainda estava em processo de remodelação, sem evidência de deposição óssea na interface leito receptor-enxerto.

A influência da osteoporose pós-menopausa no processo de reparo dos enxertos ósseos autógenos *onlay* ainda não é completamente conhecida e explicada.

Levando-se em consideração o aumento da incidência dessa patologia nas mulheres no período da menopausa, associada ao aumento da expectativa de vida e conseqüente aumento da demanda pelas reabilitações com implantes osseointegrados e procedimentos reconstrutivos, seria interessante avaliar o comportamento biológico no processo de reparo dos enxertos autógenos *onlay* em modelo animal.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a expressão imunohistoquímica dos marcadores de formação óssea Osteocalcina, Osteonectina e Sialoproteína Óssea, e do marcador de reabsorção óssea RANKL no processo de reparação do enxerto ósseo autógeno *onlay*, recoberto ou não por membrana de PTFE-e, e a influência da deficiência estrogênica em ratas ovariectomizadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e grupos experimentais

O presente estudo está de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o protocolo n° 026/2008-PA/CEP (Anexo 1).

Para realização deste experimento foram utilizados os blocos parafinados originários da dissertação de Mestrado do Doutor Rodrigo Dias Nascimento, intitulada “Influência da Osteopenia na Regeneração do Enxerto Autógeno Recoberto ou não por membrana de PTFE-e. Estudo histológico e histomorfométrico em ratas”.

A amostra consistiu de 80 ratas adultas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com noventa dias de idade, com peso em torno de 300 gramas, mantidas em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com ração Guabi Nutrilabor e água *ad libitum*, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Local da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP sob o protocolo n° 035/2004-PA/CEP.

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (processo nº 09/50214-1).

Os animais pertenciam a dois grupos experimentais, divididos aleatoriamente:

- Grupo Teste, composto por 40 ratas ovariectomizadas (OVZ), subdivididos em 2 grupos com 20 animais cada:

- a) OVZ - E: animais somente com realização de enxerto;
- b) OVZ - ME: animais com realização de enxerto e recobrimento com membrana de politetrafluoretileno expandido (PTFE-e-GORE TEX[®], GT10; W. L. Gore & Associates, Flagstaff, AZ, USA).

- Grupo Controle, composto por 40 ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia simulada (SHAM), subdivididos em 2 grupos com 20 animais cada:

- a) SHAM - E: 20 animais somente com realização de enxerto;
- b) SHAM - ME: 20 animais com realização de enxerto e recobrimento com membrana de PTFE-e.

O objetivo deste procedimento foi submeter os animais do grupo controle às mesmas condições de estresse dos animais do grupo teste.

Os passos operatórios descritos a seguir constam na dissertação de Mestrado do Doutor Rodrigo Dias Nascimento, intitulada “Influência da Osteopenia na Regeneração do Enxerto Autógeno Recoberto ou não por membrana de PTFE-e. Estudo histológico e histomorfométrico em ratas” (Nascimento, 2006). Sua reprodução, bem como das fotografias, foi autorizada pelo autor.

4.2 Procedimentos cirúrgicos

4.2.1 Anestesia

Para a realização das cirurgias de ovariectomia (OVZ) e ovariectomia simulada (SHAM), enxertia e eutanásia, os animais foram anestesiados com uma solução de 13 mg/Kg de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5-6-dihidro-4H-1,3 tiazina (Rompum – Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativas e analgésicas, além de relaxante muscular e 33 mg/Kg de ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil), anestésico geral, via intramuscular.

4.2.2 Antibiótico

Após os procedimentos cirúrgicos para a realização dos enxertos ósseos, todos os animais receberam dose única de 1 mg/Kg de antibiótico (Pentabiótico Veterinário – Fort Dodge) por via intramuscular.

4.2.3 Ovariectomia e ovariectomia simulada

Após anestesia os animais foram posicionados em decúbito lateral, permitindo a visualização e o fácil acesso ao flanco lateral. Foi realizada tricotomia da região, utilizando-se lâminas de barbear (Gillette do Brasil) e, logo abaixo da costela após anti-sepsia com solução de gluconato de clorexidina a 0,2%, realizou-se incisão longitudinal de 1 cm na pele com lâmina de bisturi nº 15 montada em cabo de bisturi BardParker. Em seguida, foi feita a divulsão do tecido subcutâneo e posterior incisão da musculatura para que fosse possível o acesso à cavidade abdominal. Com o auxílio de uma pinça o ovário tracionado para fora da cavidade abdominal e, após amarra da vasculatura local com fio de sutura, realizou-se a excisão. Em seguida foi realizada a sutura da camada muscular com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson) e da pele com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson), sendo esse processo realizado bilateralmente (Figura 1).

Os animais do grupo controle foram submetidos à cirurgia SHAM (ovariectomia simulada) com tracionamento dos ovários para fora da cavidade abdominal, porém sem a excisão dos mesmos. O objetivo deste procedimento foi submeter os animais do grupo controle às mesmas condições de estresse dos animais do grupo teste.

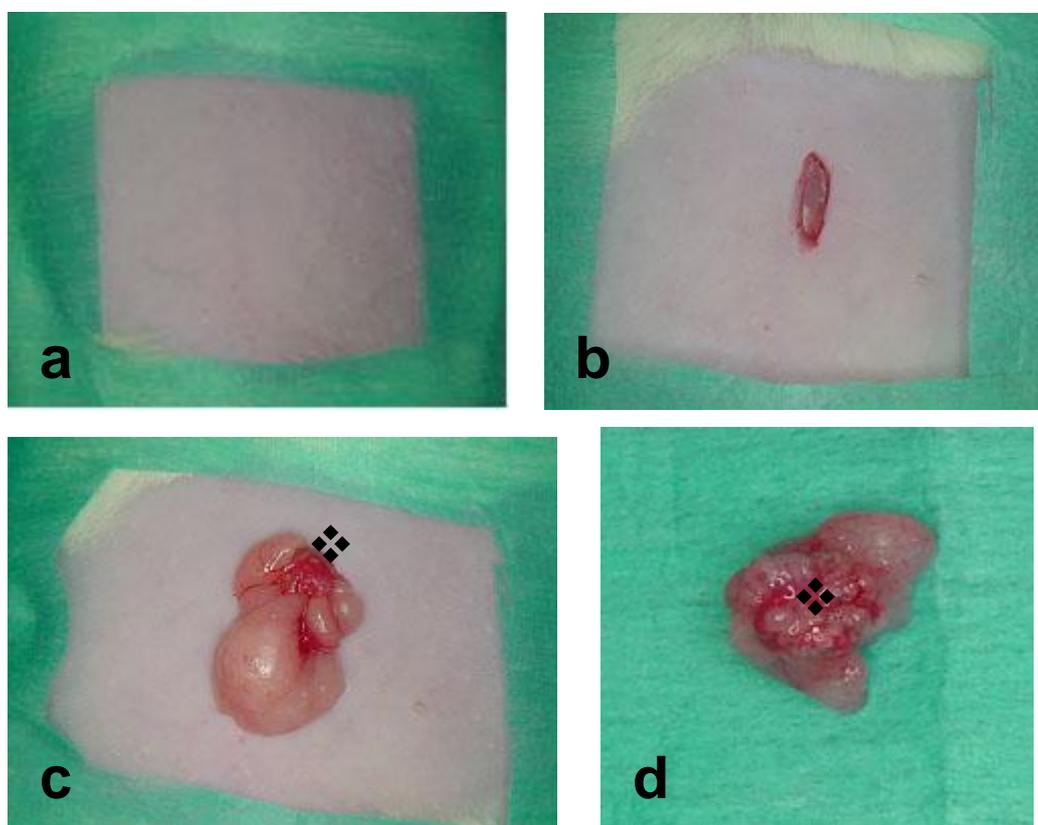


Figura 1 - Ovariectomia (OVZ) e Ovariectomia Simulada (SHAM). a) Tricotomia e desinfecção da região abdominal; b) incisão linear; c) tracionamento e exposição do ovário (❖). d) Ovariectomia simulada (SHAM).

4.2.4 Execução do enxerto

Os enxertos foram realizados trinta dias após a ovariectomia verdadeira ou simulada, sendo os animais anestesiados e as regiões temporal e parotídeo-massetérica esquerda e parietal e frontal bilaterais tricotomizadas utilizando-se lâminas de barbear. A anti-sepsia

dessas regiões foi realizada com solução de gluconato de clorexidina 0,2%. O osso parietal foi a área doadora de osso autógeno, enquanto o ângulo mandibular esquerdo a área receptora.

Na mandíbula foi realizada incisão linear na pele, de extensão aproximada de 1,5 cm, paralela ao arco zigomático, que se estendeu do ângulo da boca do lado esquerdo ao ângulo da mandíbula do mesmo lado. Desta maneira pode-se visualizar o músculo masséter, para que pudesse ser divulsionado, utilizando-se instrumentos desenvolvidos especialmente para esta finalidade, até atingir-se a face lateral da mandíbula. O passo seguinte foi promover o deslocamento das estruturas anatômicas linguais até a exposição da face medial mandibular com o auxílio de uma espátula, desenhada para esta finalidade, a fim de permitir a fixação do enxerto ósseo e da membrana de acordo com o grupo experimental (Figura 2).

Para obtenção do enxerto ósseo foi realizada incisão linear de aproximadamente 1,5 cm no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal, de onde o enxerto foi retirado com o auxílio de uma broca tipo trefina com diâmetro externo de 4,1 mm (Neodent – Brasil) sob abundante irrigação com solução fisiológica. Após a remoção, este bloco foi perfurado no seu centro com uma broca carbide ½ (KG Sorensen) em baixa rotação, refrigerada com soro fisiológico visando à futura fixação do mesmo no leito receptor. O bloco permaneceu armazenado temporariamente em uma cuba contendo soro fisiológico (Figura 3).

Neste momento, na área receptora, foram realizadas três perfurações com broca carbide ½ sob abundante refrigeração, dispostas triangularmente, que permitiram a estabilização do bloco ósseo ao leito receptor utilizando-se um fio de sutura 5,0 de poliéster verde trançado (Ethicon – Johnson & Johnson) e a adaptação da membrana de PTFE-e nos grupos onde foi realizado o recobrimento do enxerto com a membrana (OVZ-ME e SHAM-ME). Nos grupos onde o enxerto foi utilizado isoladamente (OVZ-E e SHAM-E), foi realizada uma única

perfuração no ângulo mandibular com o objetivo de estabilizar o enxerto utilizando-se o mesmo fio já citado (Figura 4). Estes procedimentos permitiram o posicionamento do enxerto em íntimo contato com a superfície óssea mandibular, estabilizando-o e também propiciando o recobrimento de todo o bloco enxertado e estabilização da membrana de PTFE-e nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME.

Para recortar as membranas de maneira uniforme, foi utilizada uma matriz de alumínio medindo 7 x 7 mm obtida a partir de películas radiográficas. O recorte foi feito sempre na porção oclusiva da membrana de PTFE-e.

Para a remoção do enxerto ósseo, assim como para a realização das perfurações foi utilizado um motor elétrico (Driller BLM 600 Plus) que permitiu o controle da velocidade em 960 rpm, e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril.

As suturas foram realizadas por planos na área experimental, suturando-se primeiramente a camada muscular, com fio 5,0 absorvível de poliglactina 910 (Ethicon – Johnson & Johnson) e posteriormente a pele com fio de seda 4.0 (Ethicon – Johnson & Johnson). A área doadora também foi suturada com este último tipo de fio.

Em seguida realizou-se a limpeza das regiões operadas com solução de clorexidina 0,2%. Após a cirurgia, os animais receberam dieta normal e água “ad libitum”.

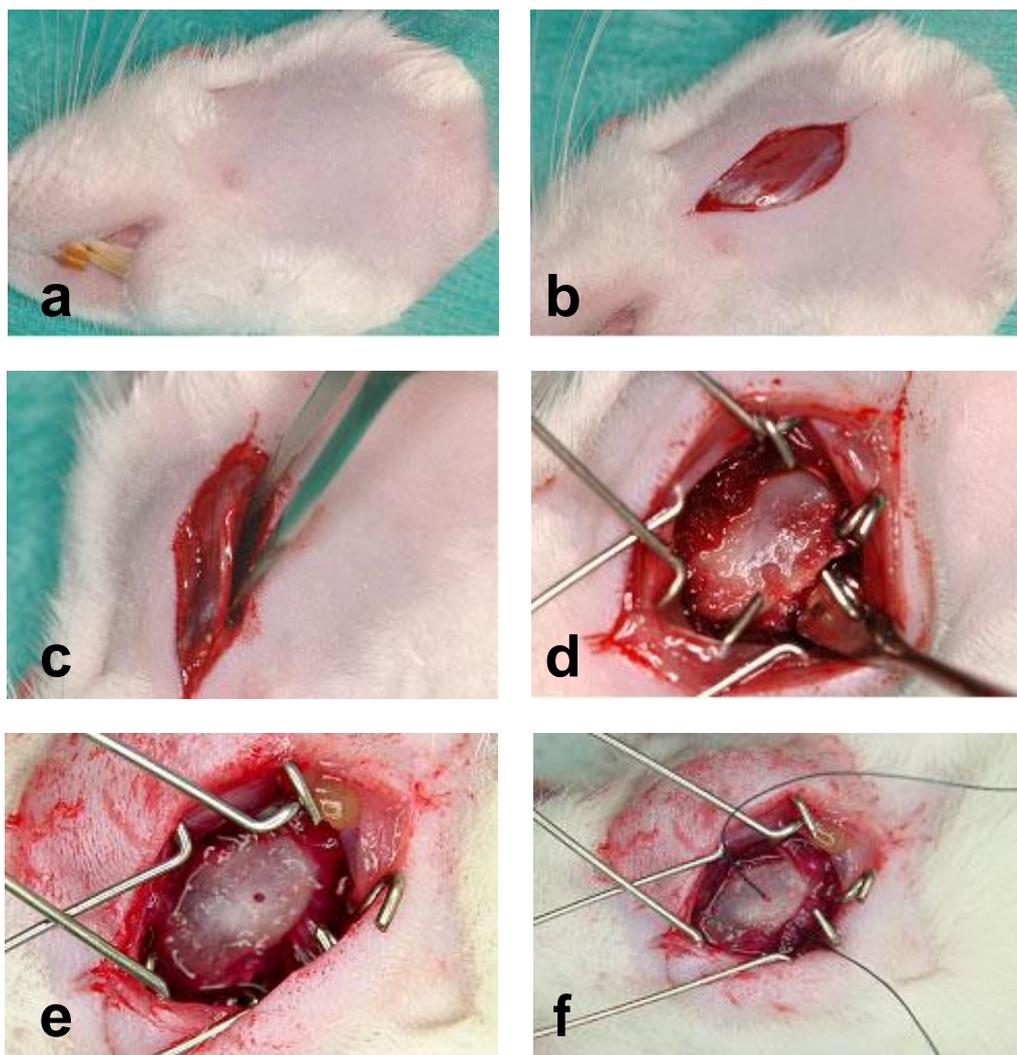


Figura 2 - Exposição e preparo do leito receptor: a) tricotomia e desinfecção; b) incisão linear; c) divulsão muscular; d) exposição do ângulo mandibular; e) perfuração para fixação do enxerto; f) passagem do fio de sutura para a fixação do enxerto.

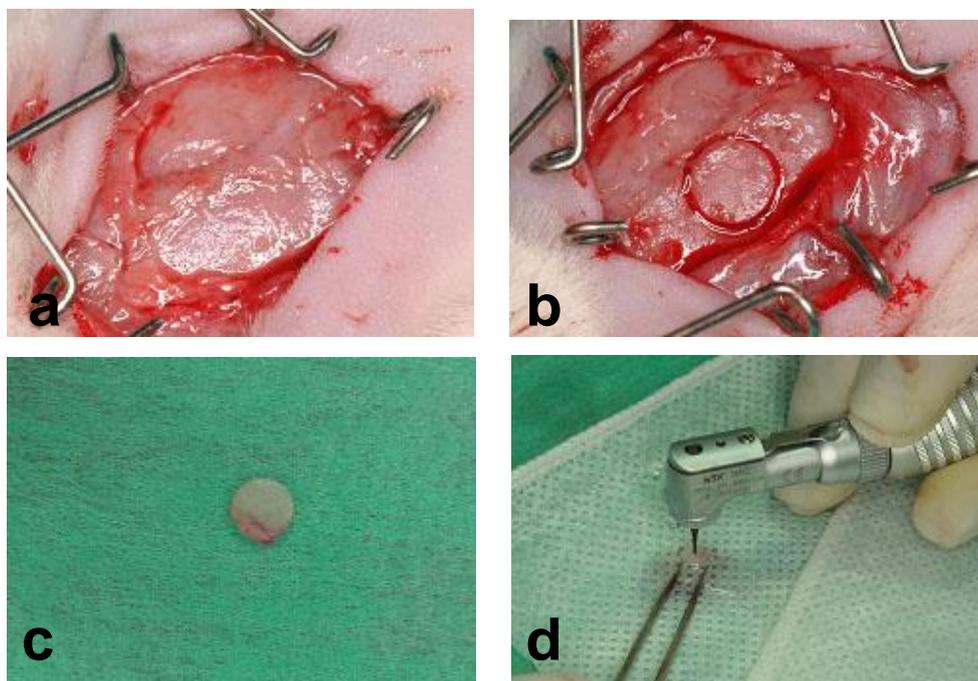


Figura 3 - Exposição e preparo do leito doador: a) incisão e exposição da calvária; b) osteotomia circular realizada com a broca trefina; c) enxerto removido; d) perfuração central para fixação ao leito receptor.

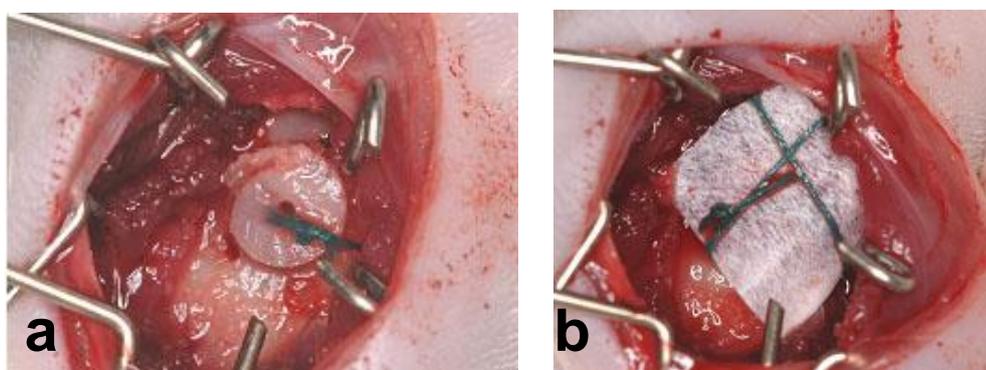


Figura 4 - a) fixação do enxerto; b) fixação da membrana de PTFE-e sobre o enxerto.

4.2.5. Eutanásia

A eutanásia dos animais foi realizada nos seguintes períodos: 0 hora, 7, 21, 45 e 60 dias. Para cada período, 4 animais foram sacrificados por grupo experimental.

4.3 Processamento histológico

As hemi-mandíbulas esquerdas foram removidas e armazenadas para fixação em solução de formaldeído a 10%, tamponado, durante um período mínimo de 48 horas. Cada espécime foi catalogado.

As peças foram desmineralizadas com solução de EDTA 10%, pH 7,8 em aparelho de microondas (PELCO 3441, Ted Pella, Inc., CA, USA), no laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, em São Paulo. Para tanto, os espécimes foram armazenados em um recipiente contendo EDTA, que por sua vez era colocado em um segundo recipiente contendo gelo triturado para que se mantivesse a temperatura em 33° C durante a realização dos ciclos. O conjunto era então levado ao aparelho de micro-ondas e submetido a ciclos de 15 minutos com troca do gelo entre os ciclos e troca do EDTA a cada 1 hora (4 ciclos).

As peças desmineralizadas foram seccionadas transversalmente na região central do enxerto ósseo (Figura 5). Cada

fragmento foi incluído, no sentido da superfície de corte, em bloco de parafina.



Figura 5. Esquema representativo dos cortes histológicos.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes seriados com 3 μm de espessura e estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropiltriétoxissilano (Sigma Chemical CO., St.Louis, USA).

4.4 Processamento imunoistoquímico

Os marcadores imunoistoquímicos utilizados foram a Osteocalcina (OCC), Osteonectina (ONC), Sialoproteína Óssea (BSP) e RANKL.

Os anticorpos ONC (LF-23) e BSP (LF-87) foram gentilmente cedidas pelo Dr Larry W. Fisher, National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA.

Os anticorpos OCC (FL-110: sc-30044) e RANKL (N-19: sc-7628) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology[®], CA, USA.

Os anticorpos, a titulação, tempo e temperatura de incubação e recuperação antigênica encontram-se listados na tabela a seguir.

Quadro 1. Anticorpos, titulação, tempo e temperatura de incubação, e recuperação antigênica.

Anticorpo	Diluição	Incubação	Recuperação Antigênica
Sialoproteína Óssea (BSP)	1:150	1 hora, temperatura ambiente	Citrato
Osteonectina (ONC)	1:400	1 hora, temperatura ambiente	Citrato
Osteocalcina (OCC)	1:400	4° C, overnight	Citrato
RANKL	1:200	4° C, overnight	Pepsina

Os cortes foram submetidos a reações de imunoistoquímica segundo o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - FOSJC/UNESP:

- a) desparafinização em 2 banhos de xilol: o 1º por 30 minutos a temperatura de 60° C e o 2º a temperatura ambiente por 20 minutos;
- b) reidratação em uma série de etanol em concentrações decrescentes (absoluto por 3 vezes, 95% e 85%) por 5 minutos cada, seguido de imersão em solução de hidróxido de amônia (10% em álcool 95° GL) por 10 minutos para remoção de pigmentos formólicos. Lavagem em água corrente seguida de 2 passagens em água destilada.
- c) recuperação antigênica. Quando utilizou-se o Citrato, pH 6,0, as lâminas foram acondicionadas

e imersas em recipiente contendo a solução, e levadas ao forno de micro-ondas, onde foram submetidas a 3 ciclos consecutivos de 3 minutos a potência 7, seguida de resfriamento a temperatura ambiente.

Para o anticorpo RANKL, para o qual utilizou-se Pepsina, pH 1,8, as lâminas foram imersas na solução e levadas à estufa a 60° C por 10 minutos, e em seguida, à estufa à 37° C por 50 minutos.

Após, realizou-se lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;

- d) bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de álcool metílico 50% e peróxido de hidrogênio 20 vol, na proporção de 1:1, em dois ciclos de 5 minutos cada;
- e) lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- f) imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano, pH 7,4, que é solução tampão da reação em dois ciclos de 5 minutos cada;
- g) incubação com soro albumina bovina (BSA) por 1 hora, em câmara úmida, para eliminação dos anticorpos inespecíficos;
- h) incubação dos anticorpos primários de acordo com a titulação, tempo e temperatura listados na tabela 1.
- i) lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano em dois ciclos de 5 minutos cada;

- j) incubação do anticorpo secundário (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – DAKO CO., California, USA) por 30 minutos;
- k) lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano em dois ciclos de 5 minutos cada;
- l) incubação do complexo terciário estreptavidina peroxidase (Universal LSAB TM Kit/HRP, Rb/Mo/Goat – Dako) por 30 minutos;
- m) lavagem e imersão em solução de TRIS hidroximetil amino metano em dois ciclos de 5 minutos cada;
- n) revelação da reação com diaminobenzidina (DAB) (DAKO CO., California, USA) por 10 minutos;
- o) 2 Lavagens em solução de TRIS hidroximetil amino metano;
- p) lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- q) contra-coloração com a hematoxilina de Mayer por 2 minutos;
- r) lavagem por 10 minutos em água corrente seguindo-se duas passagens em água destilada;
- s) os cortes foram então desidratadas em cadeia crescente de etanóis (85%, 95% e 3 vezes em álcool absoluto) por 3 minutos cada, diafanizadas em xilol e montados com resina permount (Fisher Scientific®, New Jersey, NY, USA) para microscopia.

4.5 Análise Microscópica

A análise microscópica foi feita através da captura de imagens das lâminas a partir de um microscópio de luz Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a uma câmera digital AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha) que as transmite para o programa computacional AxioVision Release 4.7.2.

Para todos os períodos e anticorpos utilizados, classificou-se a intensidade da imunomarcagem das estruturas e células pré-definidas como sendo leve (+), moderada (++) ou intensa (+++). (Lekic et al. (1996); Ivanovski et al. (2000); Ivanovski et al. (2001); Silvestrini et al. (2005); Adeyemo et al., 2008; Kim et al. (2009)).

As estruturas analisadas foram: matriz óssea do leito receptor e enxerto, matriz óssea neoformada na interface leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, linhas reversas, espaços vasculares, células da medula óssea.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

5.1.1 Período de zero hora

Nos grupos OVZ-E e OVZ-ME, pode-se observar tanto no leito receptor como no enxerto maior quantidade de espaços medulares quando comparados aos grupos SHAM.

5.1.2 Período de sete dias

O grupo SHAM-E apresentava, no leito receptor, formação de delgadas trabéculas ósseas imaturas com numerosos e volumosos osteoblastos no seu interior e na periferia. Na interface leito-enxerto observou-se a proliferação de grande quantidade de tecido de granulação. A base do leito receptor (face oposta à qual foi realizado o enxerto) mostrou a formação de trabéculas ósseas imaturas com amplos espaços medulares contornados por osteoblastos. O enxerto ósseo, na sua face voltada para o leito, apresentou áreas de reabsorção.

O grupo SHAM-ME mostrou características semelhantes às do grupo SHAM-E. As diferenças consistiram na menor quantidade de tecido de granulação interposto entre leito-enxerto e na menor reabsorção sofrida pelo enxerto do grupo SHAM-ME.

Os grupos OVZ-E e OVZ-ME apresentavam maior quantidade de espaços medulares tanto no enxerto quanto no leito receptor, além do maior diâmetro desses espaços. O grupo OVZ-E mostrou maior quantidade de tecido de granulação na interface leito-enxerto. A neoformação óssea caracterizou-se por trabéculas ósseas mais delgadas delimitando grandes espaços medulares. A periferia do enxerto no grupo OVZ-E mostrou-se mais irregular e com maiores áreas de reabsorção.

5.1.3 Período de 21 dias

O grupo SHAM-E apresentava pontos de união na interface leito-enxerto pela deposição de tecido ósseo neoformado sobre a superfície do leito receptor com diversos espaços medulares revestidos por osteoblastos e lacunas preenchidas por osteócitos volumosos, além da interposição de tecido de granulação. O enxerto mostrou intensa reabsorção das bordas laterais e da sua superfície externa.

No grupo SHAM-ME observou-se, assim como no grupo SHAM-E, tecido ósseo neoformado com pontos de união entre o leito e o enxerto. O enxerto exibiu menor reabsorção de suas bordas e superfície.

No grupo OVZ-E pode-se observar intensa reabsorção das bordas laterais do enxerto. A superfície do leito receptor apresentava neoformação óssea com maior quantidade de espaços medulares e poucos pontos de união entre o leito e o enxerto, com interposição de

tecido de granulação. O grupo OVZ-ME mostrou basicamente as mesmas características do grupo OVZ-E, mostrando porém, em alguns espécimes, tecido ósseo neoformado além dos limites do enxerto e integrados às bordas laterais do enxerto.

5.1.4 Período de 45 dias

Nos grupos SHAM-E e SHAM-ME, observou-se que poucas áreas do enxerto não estavam totalmente integradas ao leito, com tecido de granulação. O grupo SHAM-ME apresentou maior quantidade de osso neoformado na periferia do enxerto.

O grupo OVZ-E apresentava pontos de ligação na interface leito-enxerto, porém essa integração não foi completa, sendo possível ainda observar tecido de granulação interposto. O enxerto mostrou intensa remodelação.

O grupo OVZ-ME mostrou as mesmas características observadas no grupo OVZ-E, porém com mais pontos de integração na interface leito-enxerto. O enxerto estava integrado com o tecido ósseo neoformado ao seu redor.

5.1.5 Período de 60 dias

O enxerto mostrou-se integrado ao leito receptor em todos os grupos. Nos grupos SHAM-E e OVZ-E o enxerto sofreu acentuada reabsorção.

Nos grupos SHAM-ME e OVZ-ME, pode-se observar uma maior preservação do volume original do enxerto, além de neoformação óssea periférica. O leito receptor e o enxerto estavam completamente integrados pelo tecido ósseo neoformado, sendo, muitas vezes, difícil delimitar os limites tanto do leito receptor como do enxerto.

5.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Para todos os períodos e anticorpos utilizados, classificou-se a intensidade da imunomarcção das estruturas e células pré-definidas como sendo leve (+), moderada (++) ou intensa (+++). (Lekic et al. (1996); Ivanovski et al. (2000); Ivanovski et al. (2001); Silvestrini et al. (2005); Adeyemo et al., 2008; Kim et al. (2009)).

As estruturas analisadas foram: matriz óssea do leito receptor e enxerto, matriz óssea neoformada na interface leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, osteócitos, osteoblastos, osteoclastos, tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto e ao redor do enxerto, linhas reversas, espaços vasculares, células da medula óssea.

5.2.1 Sialoproteína óssea (BSP)

As estruturas marcadas e a intensidade da marcação encontram-se listadas na tabela 1.

Não mostraram qualquer tipo de marcação: tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto e ao redor deste,

glândulas, tecido conjuntivo e muscular. Osteoclastos também não mostraram positividade em nenhum dos períodos avaliados.

Tabela 1. Sialoproteína Óssea. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

	DIA 0		DIA 7	DIA 21	DIA 45	DIA 60
	OVZ	SHAM				
Matriz óssea	+	+	+	+	+	+
Osteócitos Leito	+ a ++					
Osteócitos Enxerto	++	++	++	++	++	++
Osso neoformado L-E			+++	+++	+ a ++	+ a ++
Osso neoformado redor E				+++	+ a ++	+ a ++
Osteócitos ON			+++	+++	++	+ a ++
Osteoblasto			+++	+++	++	+ a ++
Espaços vasculares	++	++	++	++	++	++
Megacariócitos	+	+	+	+	+	-
Linhas reversas	++	-	+++	+++	+++	++
Tecido de granulação	-	-	-	-	-	-
Células medula	-	-	-	-	-	-
Glândulas	-	-	-	-	-	-
Tecido conjuntivo	-	-	-	-	-	-
Tecido muscular	-	-	-	-	-	-
Osteoclastos	-	-	-	-	-	-

(L= leito receptor; E= enxerto; ON= osso neoformado)

5.2.1.1 Período de zero hora

Tanto no grupo OVZ-E como no grupo OVZ-ME, a matriz óssea do leito receptor e do enxerto apresentavam positividade leve. Os núcleos dos osteócitos destas duas áreas não se mostraram positivos, apenas sua lacuna exibiu marcação que variou de leve a moderada, bem

como os espaços vasculares. Nos espaços medulares, pode-se observar megacariócitos com marcação citoplasmática leve. O enxerto ósseo exibiu marcação moderada na região medular central, assim como os osteócitos e espaços vasculares presentes nesta área. Linhas reversas do leito receptor mostraram marcação moderada. (Figura 6).

Os grupos SHAM-E e SHAM-ME mostraram-se semelhantes aos grupos OVZ, porém não apresentaram marcação de linhas reversas.

5.2.1.2 Período de sete dias

Os quatro grupos analisados exibiram o mesmo padrão imunoistoquímico.

Assim como observado no período anterior, a matriz óssea apresentou-se levemente marcada. Os osteócitos do leito receptor não foram marcados, apenas as lacunas vazias mostravam positividade que variou de leve a moderada. Na porção central do enxerto pode-se observar osteócitos com marcação moderada.

O tecido ósseo neoformado sobre a superfície do leito receptor mostrou marcação intensa, assim como o osso da base do leito receptor (superfície oposta à qual foi realizada o enxerto). (Figura 7).

Os osteoblastos na periferia do leito receptor e ao redor das trabéculas ósseas imaturas mostraram marcação intensa, assim como os osteócitos volumosos, entremeados nas trabéculas ósseas imaturas. (Figura 7).

5.2.1.3 Período de 21 dias

O padrão imunohistoquímico foi semelhante ao observado no período anterior.

Na interface leito-receptor enxerto, os grupos OVZ-ME e SHAM-ME mostravam pontos de união. Houve também neoformação óssea ao redor do enxerto. Esse tecido ósseo neoformado exibiu positividade intensa, com osteócitos e osteoblastos também fortemente marcados. (Figura 8).

Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, nem sempre os osteócitos da região mediana do enxerto foram marcados. Nos casos em que a marcação foi observada, variou de leve a moderada.

5.2.1.4 Período de 45 dias

Os quatro grupos apresentaram características imunohistoquímicas semelhantes.

O tecido ósseo neoformado, tanto na interface leito-enxerto quanto na periferia do enxerto mostrou marcação variando de leve a moderada. Os osteoblastos e osteócitos volumosos desta área foram moderadamente marcados. Nos grupos SHAM, por vezes, essa marcação foi restrita à lacuna dos osteócitos, enquanto seu núcleo não exibiu qualquer positividade. (Figura 9).

Embora o enxerto estivesse em boa parte incorporado ao leito receptor, seus limites eram delimitados por uma linha de positividade moderada.

5.2.1.5 Período de 60 dias

A matriz óssea exibiu marcação leve, com marcação leve também das lacunas dos osteócitos e negativa do núcleo. A marcação moderada dos osteócitos foi vista na porção mediana do enxerto. (Figura 9).

O tecido ósseo neoformado tanto na interface leito-enxerto como ao redor do enxerto mostrou marcação difusa com intensidade variando de leve a moderada, com predomínio das áreas com positividade leve. Os osteócitos desta área ora acompanham a marcação, ora mostram marcação leve a moderada apenas de sua lacuna. Os osteoblastos desta região mostraram marcação variando de leve a moderada. Linhas reversas mostraram-se moderadamente positivas. (Figura 9)

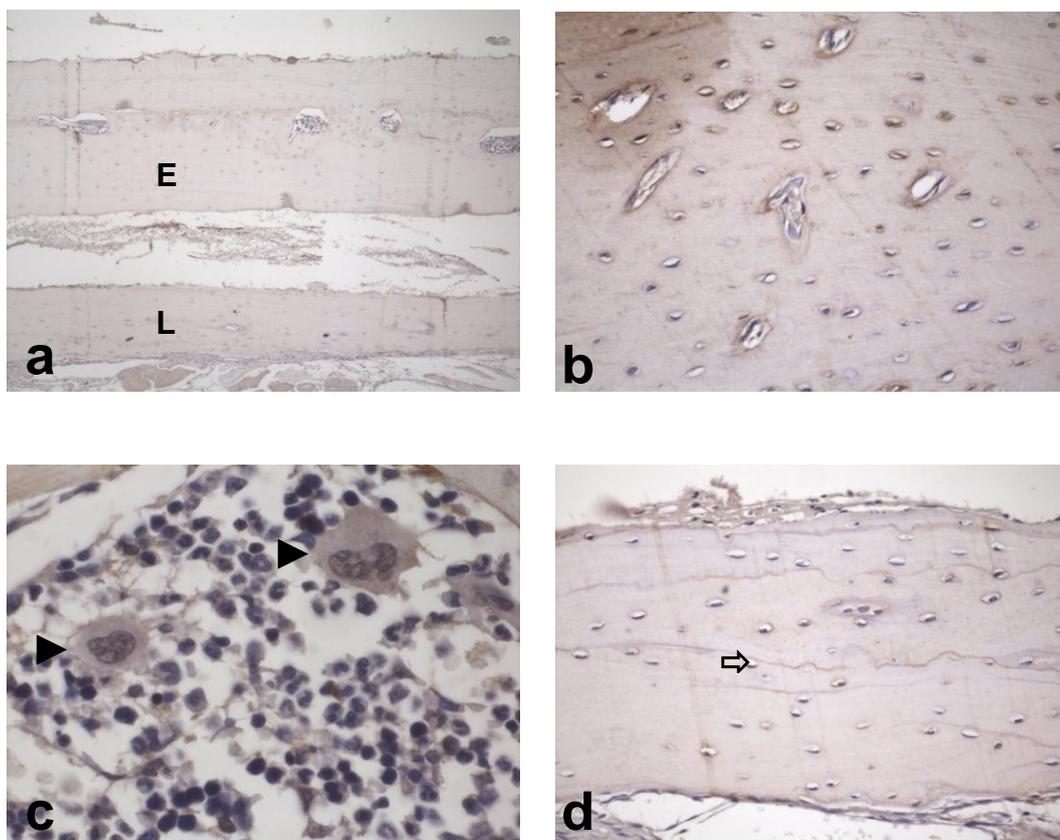


Figura 6 - Sialoproteína Óssea. Período zero hora. a) Marcação leve da matriz óssea do leito receptor (L) e enxerto (E) do grupo OVZ-ME. Aumento original 100x. b) Lacunas de osteócitos da matriz com marcação moderada. Aumento original 400x. c) Megacariócitos (▶) com marcação citoplasmática leve. Aumento original 1000x. d) Marcação moderada de linhas reversas (⇨). Aumento original 400x.

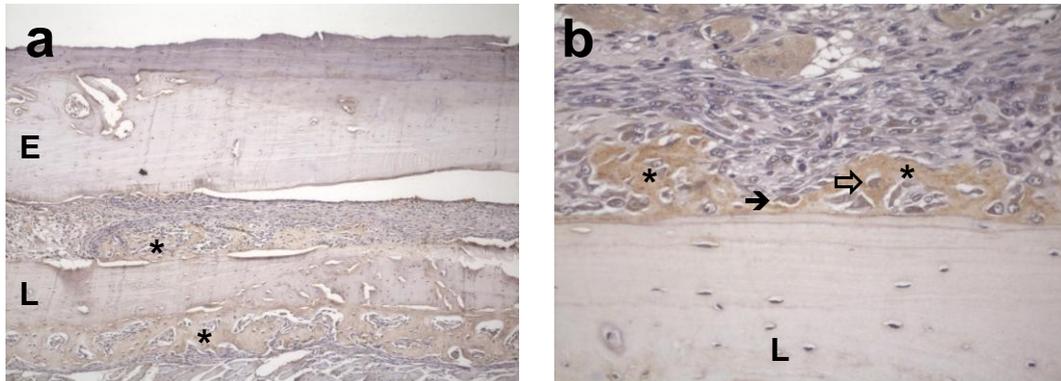


Figura 7 Sialoproteína Óssea. Período 7 dias. a) Grupo SHAM-E: Marcação intensa do osso neoformado (*) sobre o leito (L) e na base do leito. Aumento original 100x. b) Grupo SHAM-ME: Marcação intensa do osso neoformado (*) sobre o leito receptor. Osteoblastos (→) e osteócitos (⇨) se mostram intensamente marcados. Aumento original 400x.

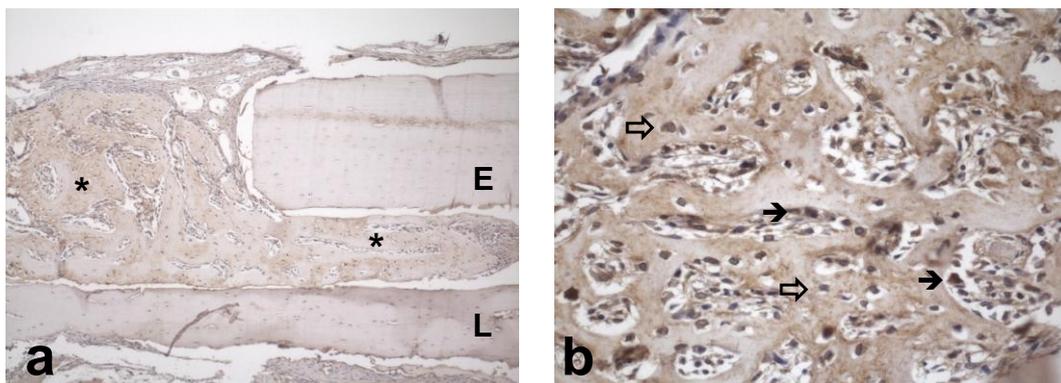


Figura 8 - Sialoproteína Óssea. Período 21 dias. a) Grupo SHAM-ME: Marcação intensa do osso neoformado (*) na interface leito-enxerto e ao redor do enxerto (E). Aumento original 100x. b) Grupo OVZ-ME: Osteócitos (⇨) e osteoblastos (→) de permeio às trabéculas ósseas imaturas mostram-se intensamente marcados. Aumento original 400x.

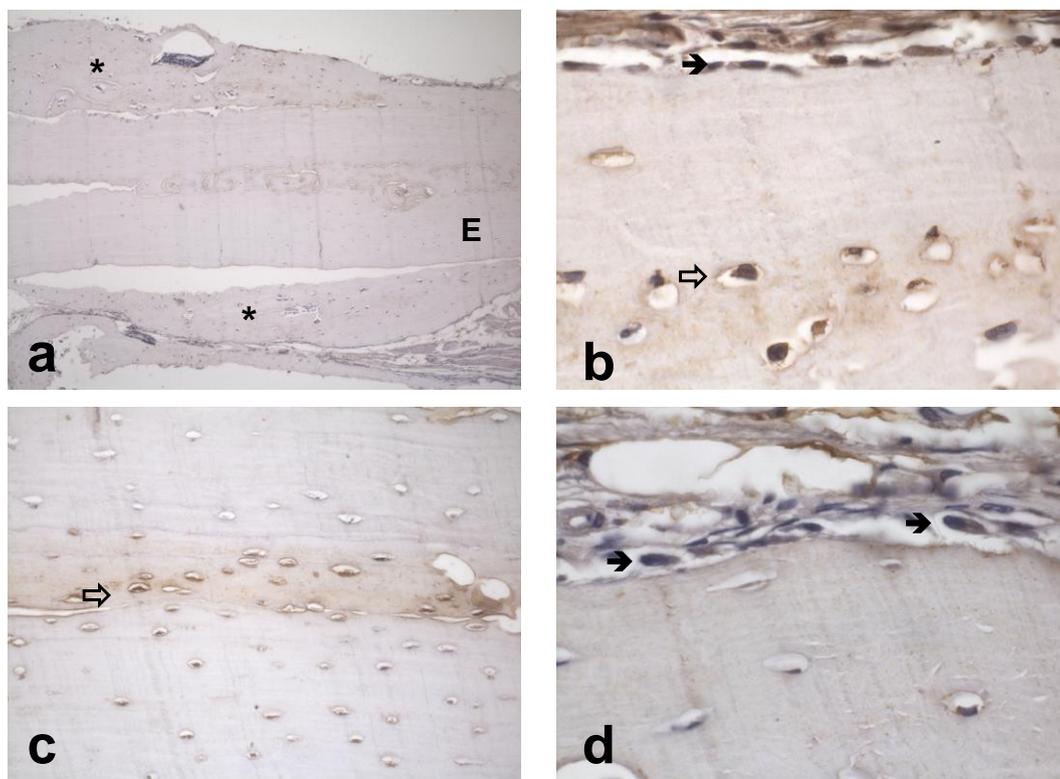


Figura 9 - Sialoproteína Óssea. Período 45 dias. a) Grupo SHAM-ME: Marcação leve a moderada do osso neoformado (*) e da parte mediana do enxerto (E). Aumento original 400x. b) Grupo OVZ-ME: Osteoblastos (→) na superfície e osteócitos (⇨) moderadamente marcados. Aumento original 1000x. Período 60 dias. c) Grupo SHAM-ME: Os osteócitos (⇨) moderadamente marcados na porção mediana do enxerto. Aumento original 400x. d) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (→) na periferia do osso neoformado exibem marcação leve a moderada. Aumento original 1000x.

5.2.2 OSTEONECTINA (ONC)

As estruturas marcadas e a intensidade encontram-se listadas na tabela 2.

Em todos os grupos observou-se intensa marcação de músculo esquelético estriado (Figura 10). Também foi comum a todos os espécimes a marcação moderada de vasos e dos septos conjuntivos das glândulas salivares.

A matriz óssea, espaços vasculares e osteoclastos não mostraram qualquer tipo de marcação em nenhum dos períodos (Figura 10).

Tabela 2. Osteonectina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.
(*continua*)

	DIA 0		DIA 7		DIA 21	
	OVZ	SHAM	E	ME	E	ME
Glândulas	++	++	++	++	++	++
Tecido muscular	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TC L-E			+++	+++	+++	+++
TC E			+	++ a +++	+ a ++	+++
TC espaços medulares	+ a ++	-	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++ a +++
Osteócitos L	-	-	-	-	-	-
Osteócitos E	+ a ++	+ a ++	+ a ++	+ a ++	+ a ++	+ a ++
Osteócitos ON			+ a +++	+ a +++	+ a +++	+ a +++
Osteoblasto			+++	+++	++ a ++	++ a +++
Megacariócitos	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Células medula	+ a +++	+ a +++	+ a +++	+ a +++	+ a +++	+ a +++
Espaços vasculares	-	-	-	-	-	-
Osteoclastos	-	-	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-	-	-
Matriz óssea	-	-	-	-	-	-
Osso neoformado	-	-	-	-	-	-

Tabela 2. Osteonectina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

(conclusão)

	DIA 45		DIA 60	
	E	ME	E	ME
Glândulas	++	++	++	++
Tec muscular	+++	+++	+++	+++
TC L-E	+++	+++	+ a ++	+ a ++
TC E	+ a ++	+++	+	++
TC espaços medulares	++ a +++	++ a +++		
Osteócitos L	-	-	-	-
Osteócitos E	+ a ++	+ a ++	+	+
Osteócitos ON	- a +	- a +	-	-
Osteoblasto	+ a +++	+ a +++	+ a ++	+ a ++
Megacariócitos	+++	+++	+++	+++
Células medula	+ a +++	+ a +++	+ a +++	+ a +++
Espaços vasculares	-	-	-	-
Osteoclastos	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-
Matriz óssea	-	-	-	-
Osso neoformado	-	-	-	-

(TC = tecido conjuntivo; L= leito receptor; E=enxerto; ON= osso neoformado)

5.2.2.1 Período de zero hora

Tanto no grupo OVZ-E como no grupo OVZ-ME, observou-se que o tecido conjuntivo presente nos espaços medulares do enxerto mostraram marcação variando de leve a moderada. (Figura 10).

Na base do leito receptor (face oposta à qual o enxerto foi realizado), pode-se observar marcação citoplasmática dos osteoblastos, que variou de leve à moderada.

Os osteócitos presentes no enxerto, especialmente aqueles localizados na região mediana e próximos aos espaços medulares, apresentavam positividade variando de leve a moderada, enquanto os osteócitos do leito receptor não apresentaram marcação. (Figura 10).

Na medula óssea, observou-se marcação intensa de megacariócitos. Outras células exibiram positividade de seu citoplasma que variou de leve a intensa. (Figura 10).

Os grupos SHAM-E e SHAM-ME mostraram-se semelhantes aos grupos OVZ. Como nesses espécimes não havia espaços medulares no enxerto, a quantidade de osteócitos marcados foi menor.

5.2.2.2 Período de sete dias

Os quatro grupos exibiram características imunoistoquímicas bem semelhantes.

Os grupos OVZ-E e SHAM-E mostraram grande quantidade de tecido de granulação interposto entre leito receptor e enxerto, intensamente marcado. Os grupos OVZ-ME e SHAM-ME também mostraram esse mesmo padrão de marcação, porém a quantidade de tecido de granulação nessa área foi menor. (Fig 5.6).

O tecido de granulação presente ao redor do enxerto mostrou marcação leve nos grupos OVZ-E e SHAM-E e moderada a intensa nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME. (Figura 11).

O tecido conjuntivo presente entremeado nas trabéculas ósseas imaturas da base e da superfície do leito receptor mostrou marcação variando de moderada a intensa. Nos grupos OVZ-E e SHAM-

E, essa marcação foi observada também nos espaços medulares do enxerto. (Figura 11).

Os osteoblastos, presentes tanto sobre a superfície óssea como entremeadas entre as trabéculas ósseas imaturas, mostrou marcação citoplasmática intensa. Ainda de permeio às trabéculas ósseas imaturas, observou-se que os osteócitos exibiam marcação bem variada, ora leve, ora intensa. A marcação mais intensa foi observada nos osteócitos mais volumosos. (Figura 11).

5.2.2.3 Período de 21 dias

O padrão imunoistoquímico deste período foi semelhante em todos os grupos.

O tecido conjuntivo presente na interface leito receptor-enxerto mostrou-se também intensamente marcado. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, o tecido conjuntivo presente ao redor do enxerto exibiu marcação que variou de leve a moderada, enquanto nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME, essa marcação foi intensa.

O tecido medular das trabéculas ósseas imaturas, tanto do osso neoformado como da base do leito receptor exibiu positividade moderada a intensa. (Figura 12).

Os osteoblastos dispostos em camada sobre a superfície óssea mostraram marcação variando de moderada a intensa, enquanto aqueles presentes nos espaços medulares tiveram sua marcação variando de leve a moderada. Os osteócitos presentes nessa área mostraram grande variedade de marcação, sendo os volumosos mais intensamente marcados, enquanto os demais variaram de leve a moderada. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E nem sempre os osteócitos da

região mediana foram marcados. Nos casos em que a marcação foi observada, variou de leve a moderada. Os osteócitos presentes nas demais áreas foram negativos. (Figura 12).

5.2.2.4 Período de 45 dias

Os quatro grupos apresentaram características imunoistoquímicas semelhantes.

O tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto mostrou marcação intensa nos quatro grupos. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, o tecido conjuntivo presente ao redor do enxerto exibiu marcação que variou de leve a moderada, enquanto nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME, essa marcação foi intensa. Em todos os grupos, o tecido medular mostrou marcação que variou de moderada a intensa.

Os osteoblastos mostraram marcação que variou de leve a intensa. A maioria dos osteócitos não exibiu qualquer tipo de marcação, mesmo os mais volumosos. Alguns na região mediana do enxerto ainda exibiram leve marcação.

5.2.2.5 Período de 60 dias

O tecido conjuntivo na interface leito-enxerto, quando presente, mostrou marcação que variou de leve a moderada. O grupo SHAM-ME mostrou apenas tecido ósseo na interface. O tecido conjuntivo

presente ao redor do enxerto mostrou marcação leve nos grupos E, enquanto os grupos ME exibiram marcação moderada. (Figura 13).

Os osteoblastos exibiram marcação citoplasmática leve a moderada. Os osteócitos mostraram marcação leve apenas na região mediana do enxerto de alguns espécimes, devido à reabsorção sofrida. Nas demais regiões, os osteócitos não foram marcados.

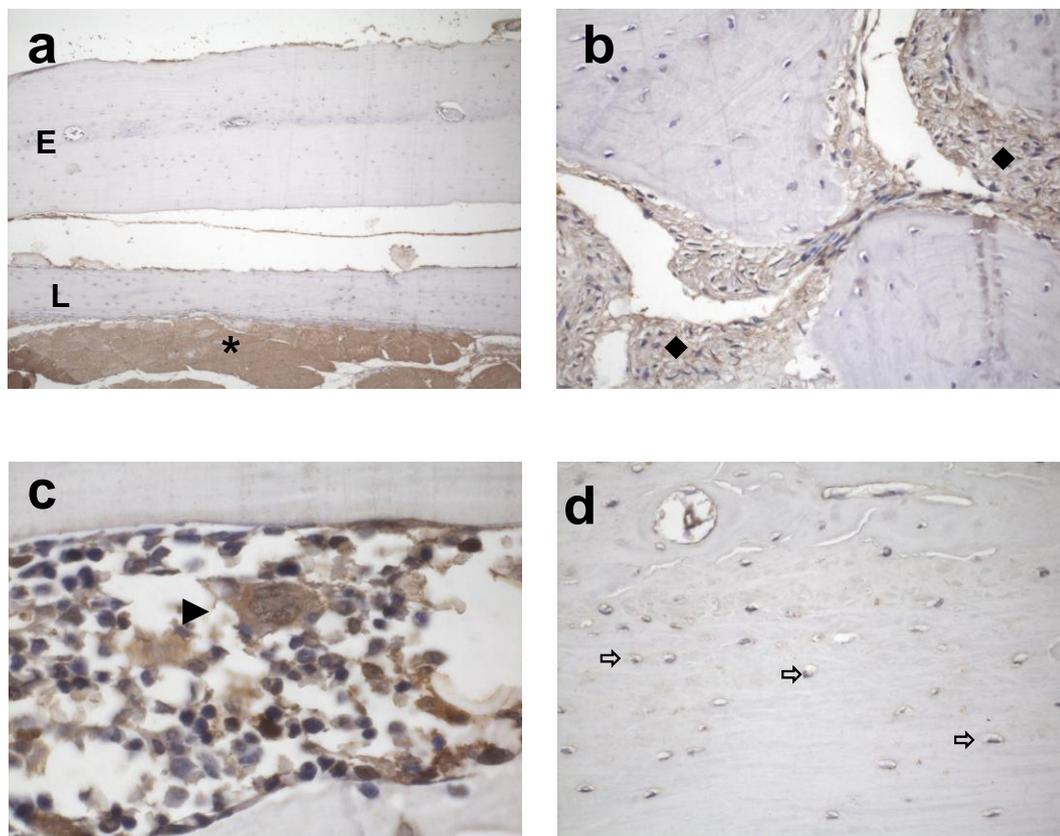


Figura 10 Osteonectina. Período zero hora. a) Ausência de marcação da matriz óssea tanto do leito receptor (L) como do enxerto (E). Na parte inferior observa-se intensa marcação do músculo estriado esquelético (*). Aumento original 100x. b) Marcação moderada do tecido conjuntivo do espaço medular do enxerto (◆). Aumento original 200x. c) Megacariócito (▶) com marcação intensa. Demais células da medula óssea com marcação citoplasmática que varia de leve a intensa. Aumento original 1000x. d) Osteócitos (⇨) presentes na porção mediana do enxerto exibem marcação leve a moderada. Aumento original 400x.

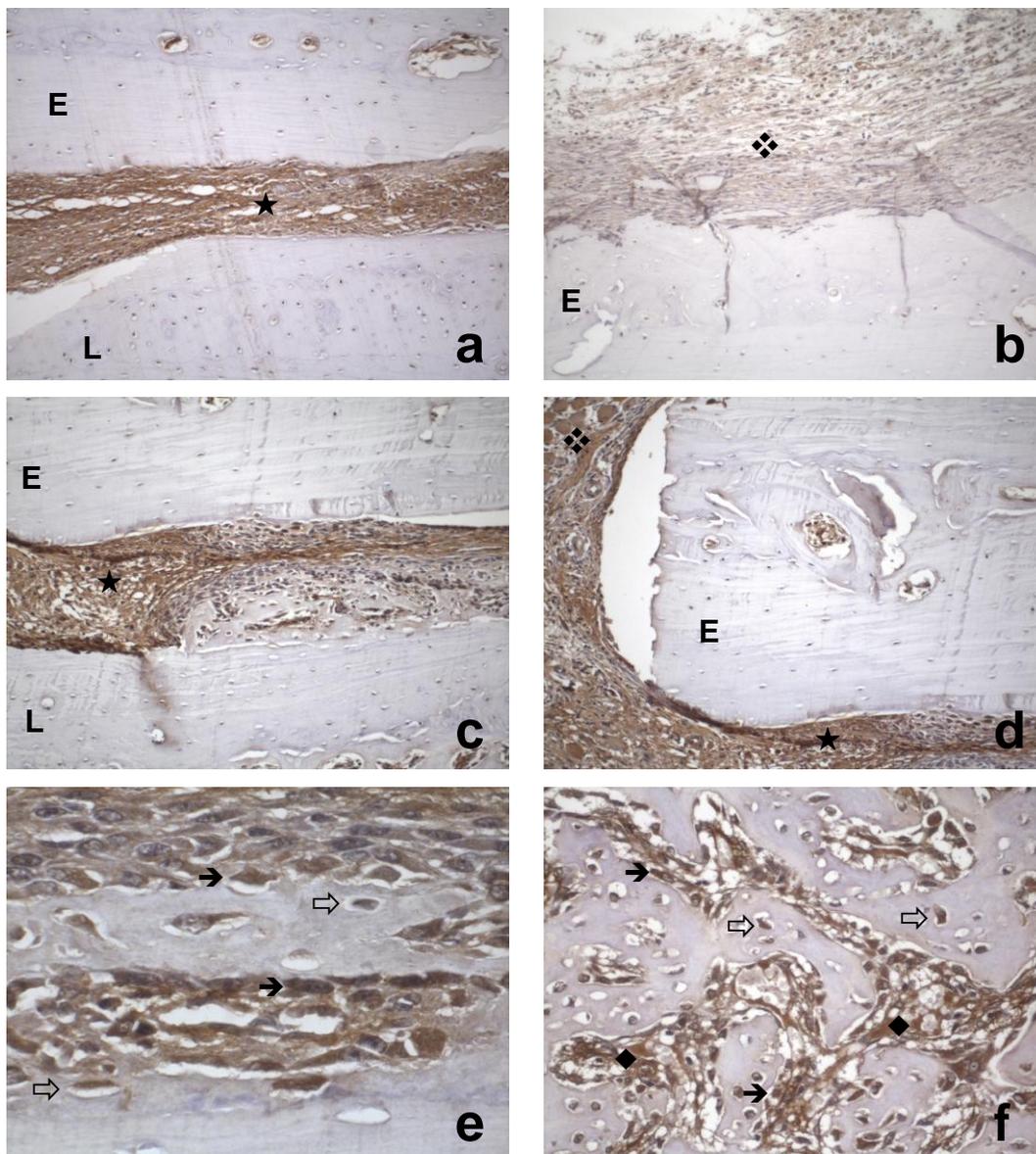


Figura 11 - Osteonectina. Período sete dias. a e b) Grupo OVZ-E: Tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) com marcação intensa, e levemente marcado (❖) ao redor do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. c e d) Grupo SHAM-ME. Intensa marcação do tecido de granulação tanto na interface leito-enxerto (★) como ao redor (❖) do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. e) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (→) e osteócitos volumosos (⇨) nas trabéculas ósseas imaturas intensamente marcados. Aumento original 1000x. f) Grupo OVZ-E: Marcação intensa do tecido conjuntivo do espaço medular (◆), osteócitos (⇨) e osteoblastos (→). Aumento original 400x.

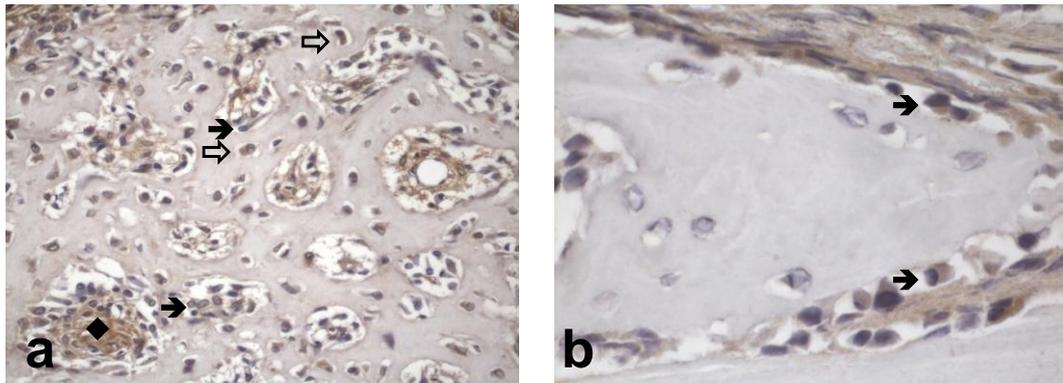


Figura 12 Osteonectina. Período 21 dias. Grupo OVZ-E. a) Tecido medular nas trabéculas ósseas imaturas (◆) mostra marcação moderada a intensa. Os osteoblastos (→) mostram marcação leve a moderada enquanto os osteócitos (⇨) volumosos apresentam-se mais intensamente marcados. Aumento original 400x. b) Osteoblastos (→) sobre a superfície óssea estão moderadamente marcados. Aumento original 1000x.

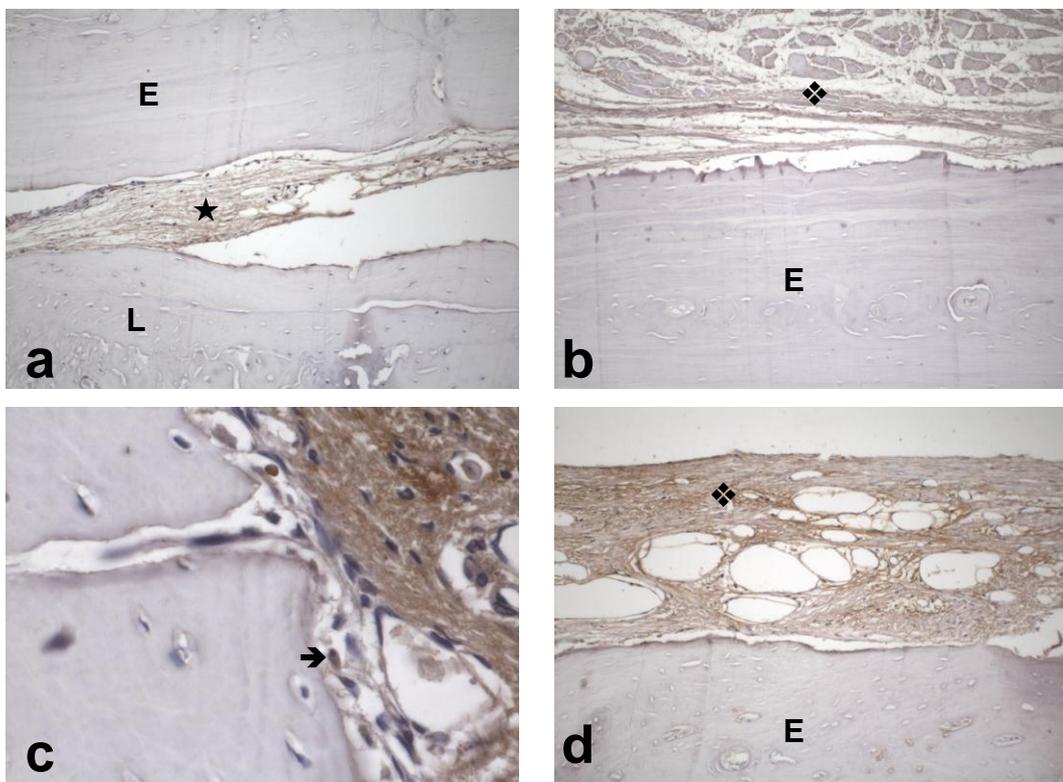


Figura 13 - Osteonectina. Período 60 dias. a e b) Grupo SHAM-E: Tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e ao redor (◆) do enxerto (E) com marcação leve Aumento original 200x. c) Grupo OVZ-ME: Osteoblastos (→) com marcação citoplasmática leve. Aumento original

1000x. d) Grupo SHAM-ME: Intensa marcação do tecido de granulação ao redor (❖) do enxerto (E). Aumento original 200x.

5.2.3 OSTEOCALCINA (OCC)

As estruturas marcadas e a intensidade da marcação encontram-se listadas na tabela 3.

Em todos os grupos avaliados, os espaços vasculares mostraram marcação moderada. A matriz óssea do leito receptor e do enxerto exibiu marcação discreta e difusa. (Figura 14).

Tabela 3. Osteocalcina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

(continua)

	DIA 0		DIA 7		DIA 21	
	OVZ	SHAM	E	ME	E	ME
Matriz óssea	+	+	+	+	+	+
Osso neoformado			-	-	-	-
Osteócitos L	+	+	+	+	+	+
Osteócitos E	++	++	++	++	++	++
TC L-E	+ a +++	+ a +++	+++	+++	+++	+++
TC E			+ a +++	+++	- a +	+++
TC espaços medulares +		-	++ a +++	++ a +++	+++	+++
Osteócitos ON			+	+	- a +	- a +
Osteoblasto			+ a ++	+ a ++	+ a ++	+ a ++
Megacariócitos	-	-	+++	+++	+++	+++
Células medula	++	++	++	++	++	++
Esp vasculares	-	-	-	-	-	-
Osteoclastos	-	-	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-	-	-

Tabela 3. Osteocalcina. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

	<i>(conclusão)</i>			
	DIA 45		DIA 60	
	E	ME	E	ME
Matriz óssea	+	+	+	+
Ossó neoformado	+	+	+	+
Osteócitos L	+	+	+	+
Osteócitos E	++	++	++	++
TC L-E	+++	+++	+++	++
TC E	- a +	+++	- a +	++ a +++
TC espaços medulares	++ a +++	++ a +++	++ a +++	++ a +++
Osteócitos ON	- a +	- a +	+++	+++
Osteoblasto	+++	+++	+++	+++
Megacariócitos	+++	+++	+++	+++
Células medula	++	++	++	++
Esp vasculares	-	-	-	-
Osteoclastos	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-

(TC = tecido conjuntivo; L= leito receptor; E=enxerto; ON= osso neoformado)

5.2.3.1 Período de zero hora

As características imunoistoquímicas observadas nos quatro grupos foram semelhantes.

As lacunas dos osteócitos presentes na região mediana do enxerto foram moderadamente marcadas. No leito receptor, essa marcação foi mais discreta, com menor quantidade de osteócitos marcados que o enxerto. (Figura 14).

O tecido conjuntivo presente nos espaços medulares do enxerto dos grupos OVZ-E e OVZ-ME mostrou-se levemente marcado. (Figura 14).

Algumas células presentes na medula óssea exibiram marcação citoplasmática moderada, enquanto megacariócitos não foram marcados. (Figura 14).

5.2.3.2 Período de sete dias

A matriz óssea mostrou marcação discreta e difusa. O tecido ósseo neoformado não exibiu qualquer marcação.

Os grupos OVZ-E e SHAM-E mostraram grande quantidade de tecido de granulação interposto entre leito receptor e enxerto, intensamente marcados. Os grupos OVZ-ME e SHAM-ME também mostraram esse mesmo padrão de marcação, porém a quantidade de tecido de granulação nessa área foi menor. (Figura 15).

O tecido de granulação presente ao redor do enxerto mostrou marcação que variou de leve a intensa nos grupos OVZ-E e SHAM-E, e intensa nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME. (Figura 15).

Nos grupos OVZ-E e OVZ-ME, o tecido conjuntivo presente entremeado nas trabéculas ósseas imaturas da base e da superfície do leito receptor mostrou marcação variando de moderada a intensa. Nos grupos SHAM-E e SHAM-ME, essa marcação foi intensa. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, essa marcação foi observada também nos espaços medulares do enxerto. (Figura 15).

Os osteoblastos, presentes tanto sobre a superfície óssea como entremeados nas trabéculas ósseas imaturas, mostraram marcação citoplasmática e de membrana que variou de leve a moderada. (Fig 5.10).

Ainda de permeio às trabéculas ósseas, observou-se que nos quatro grupos, os osteócitos volumosos exibiam marcação leve.

Marcação mediana foi visto nas lacunas daqueles presentes na região mediana do enxerto.

Observou-se ainda, marcação citoplasmática moderada de algumas células presentes na medula óssea, e marcação intensa de megacariócitos.

5.2.3.3 Período de 21 dias

Os quatro grupos exibiram marcação imunoistoquímica semelhantes.

A matriz óssea neoformada na interface leito-enxerto e na periferia do enxerto não exibiu qualquer marcação.

O tecido conjuntivo presente na interface leito-enxerto mostrou-se novamente com intensa marcação. Nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME, o tecido conjuntivo presente ao redor do enxerto exibiu marcação intensa, enquanto nos grupos OVZ-E e SHAM-E, essa marcação foi ora negativa, ora leve.

O tecido medular das trabéculas ósseas imaturas, tanto do osso neoformado como da base do leito receptor exibiu positividade intensa.

Os osteoblastos, dispostos em camada sobre a superfície óssea ou entremeados nos espaços medulares tiveram sua marcação variando de leve a moderada.

Os osteócitos presentes nas trabéculas ósseas imaturas, principalmente os mais volumosos, mostraram-se levemente marcados nos grupos SHAM-E e SHAM-ME, enquanto nos grupos OVZ-E e OVZ-ME, a marcação foi negativa.

Observou-se ainda, marcação citoplasmática moderada de algumas células presentes na medula óssea, e marcação intensa de megacariócitos.

5.2.3.4 Período de 45 dias

Os quatro grupos apresentaram características imunoistoquímicas semelhantes.

O tecido ósseo neoformado mostrou-se, neste período, com marcação difusa e discreta, semelhante à encontrada nos períodos iniciais.

O tecido conjuntivo interposto entre leito receptor e enxerto mostrou marcação intensa nos quatro grupos. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, o tecido conjuntivo presente ao redor do enxerto exibiu marcação que ora foi negativa, ora leve, enquanto nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME, essa marcação foi intensa. Em todos os grupos, o tecido medular mostrou marcação que variou de moderada a intensa.

Os osteoblastos mostraram marcação intensa no citoplasma e membrana. (Figura 16).

Os osteócitos volumosos entremeados nas trabéculas ósseas imaturas mostraram marcação leve e até mesmo ausente, enquanto os localizados nas demais áreas mostraram marcação moderada apenas em suas lacunas. (Figura 16).

Algumas células presentes na medula óssea mostraram marcação moderada citoplasmática, enquanto em outras, essa marcação foi vista em sua membrana. Megacariócitos exibiram marcação citoplasmática acentuada.

5.2.3.5 Período de 60 dias

O tecido ósseo neoformado na interface leito receptor-enxerto exibiu marcação leve e difusa, como observado nos períodos iniciais. Por vezes, foi possível observar esse tecido neoformado com marcação ligeiramente mais acentuada que a matriz.

O tecido conjuntivo na interface leito-enxerto, quando presente, mostrou marcação intensa nos grupos OVZ-E e SHAM-E e moderada no grupo OVZ-ME. O grupo SHAM-ME mostrou apenas tecido ósseo na interface. (Figura 17).

O tecido conjuntivo presente ao redor do enxerto mostrou marcação leve e até mesmo ausente nos grupos E, enquanto os grupos ME exibiram marcação que variou de moderada a intensa. (Figura 17).

Os osteoblastos exibiram marcação citoplasmática intensa, em todas as regiões em que estavam presentes, o mesmo observado com os osteócitos volumosos da matriz neoformada. (Figura 17).

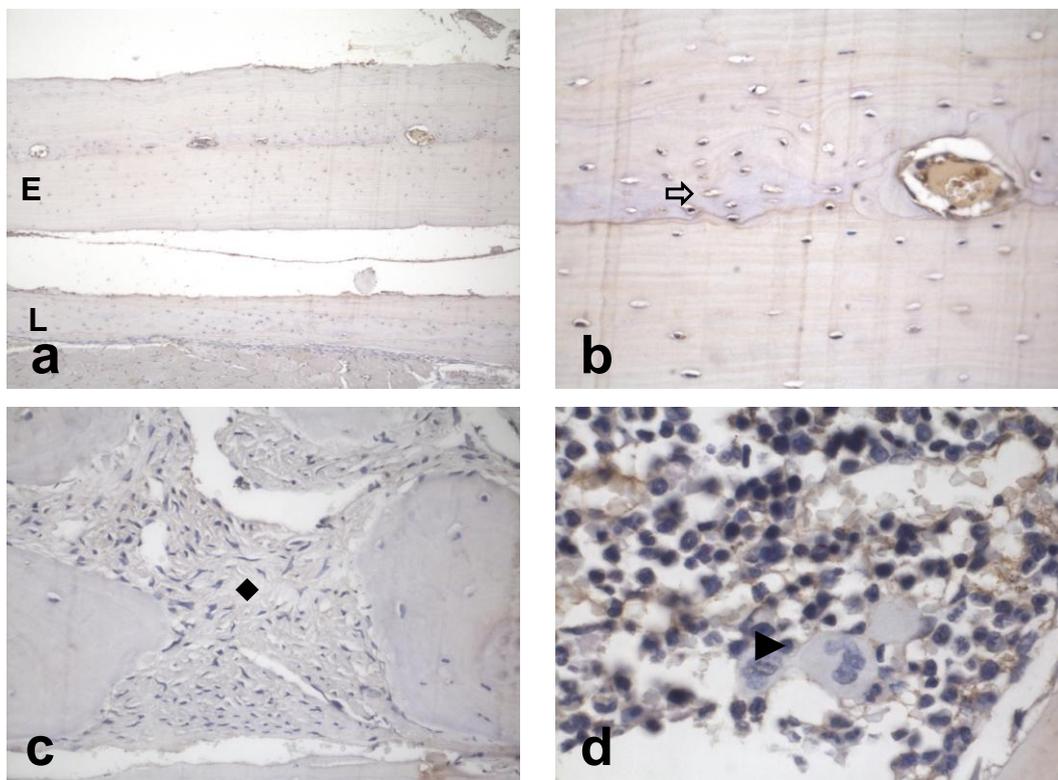


Figura 14 - Osteocalcina. Período zero hora. a) Matriz óssea com leve marcação. Aumento original 100x. b) Lacunas dos osteócitos (\Rightarrow) no centro do enxerto moderadamente marcadas. Aumento original 400x. c) Tecido medular discretamente marcado (\blacklozenge). Aumento original 400x. d) Positividade moderada de células da medula óssea e ausência de marcação de megacariócitos (\blacktriangleright). Aumento original 400x.

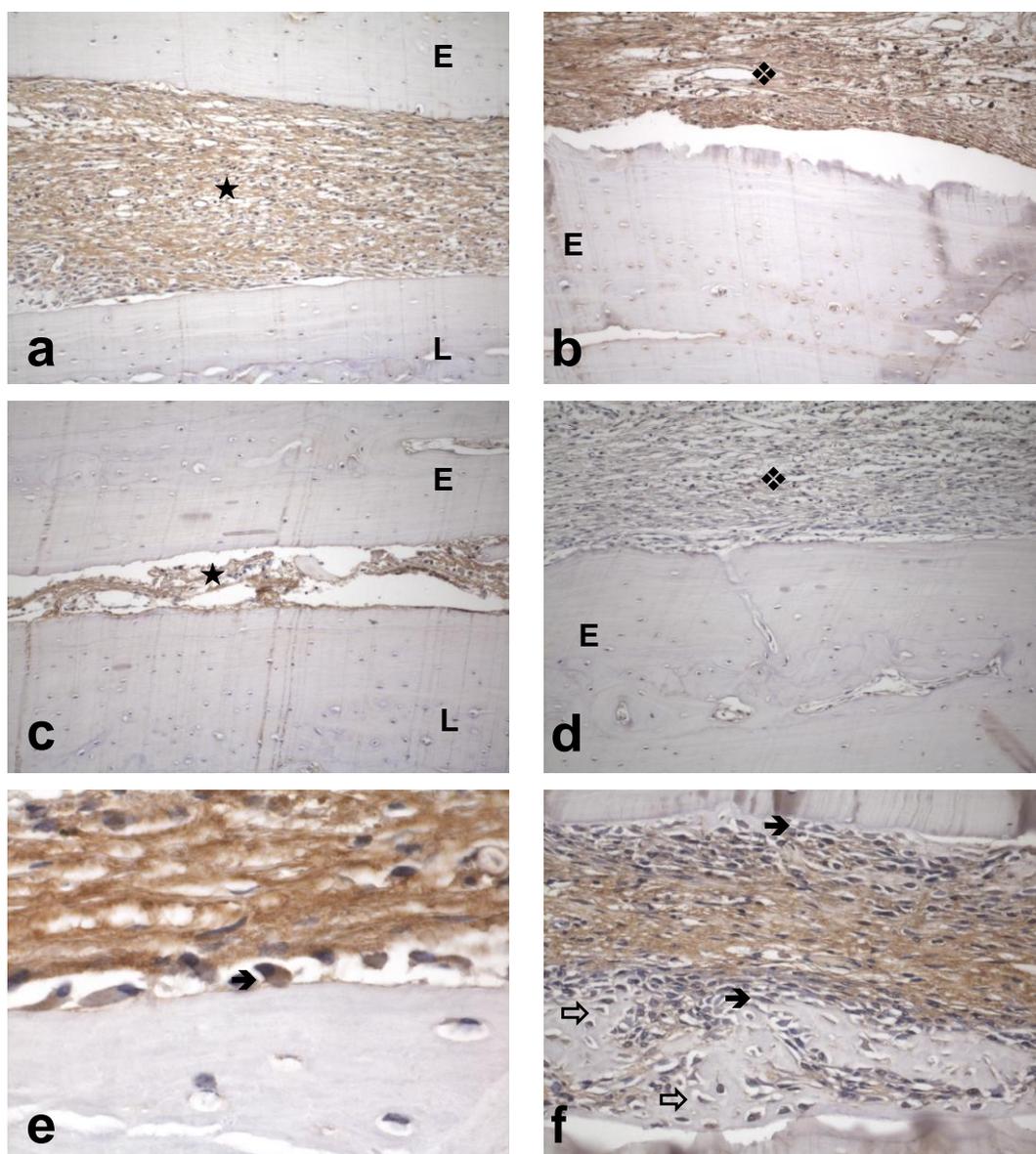


Figura 15 - Osteocalcina. Período sete dias. a e b) Grupo OVZ-ME: intensa marcação do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e ao redor (❖) do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. c e d) Grupo SHAM-E: Marcação intensa do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★) e discreta ao redor (❖) do enxerto (E), respectivamente. Aumento original 200x. e) Grupo SHAM-ME: Osteoblastos (→) com moderadamente marcados. Aumento original 1000x. f) Grupo SHAM-E: Osteócitos (⇨) nas trabéculas ósseas imaturas exibem positividade leve, enquanto os osteoblastos (→), positividade que variou de leve a moderada. Aumento original 400x.

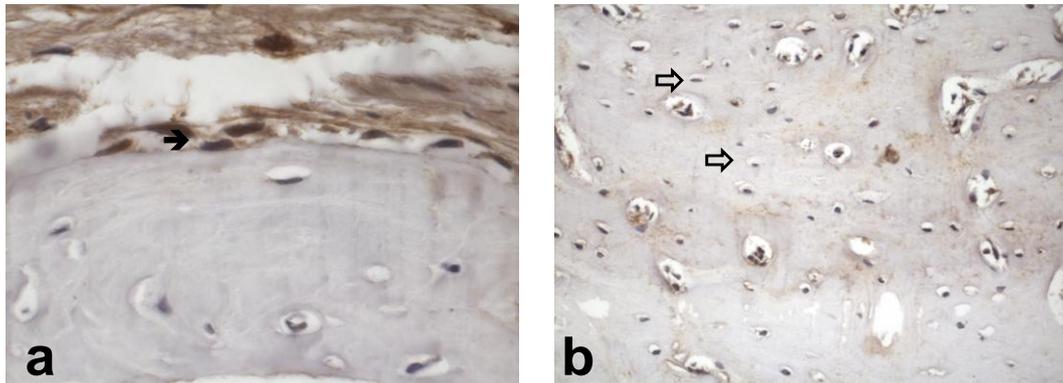


Figura 16 - Osteocalcina. Período de 45 dias. Grupo SHAM-ME. a) Osteoblastos (→) com marcação moderada. Aumento original 1000x. b) Lacunas dos osteócitos (⇨) com positividade leve, e por vezes, ausente. Aumento original 400x.

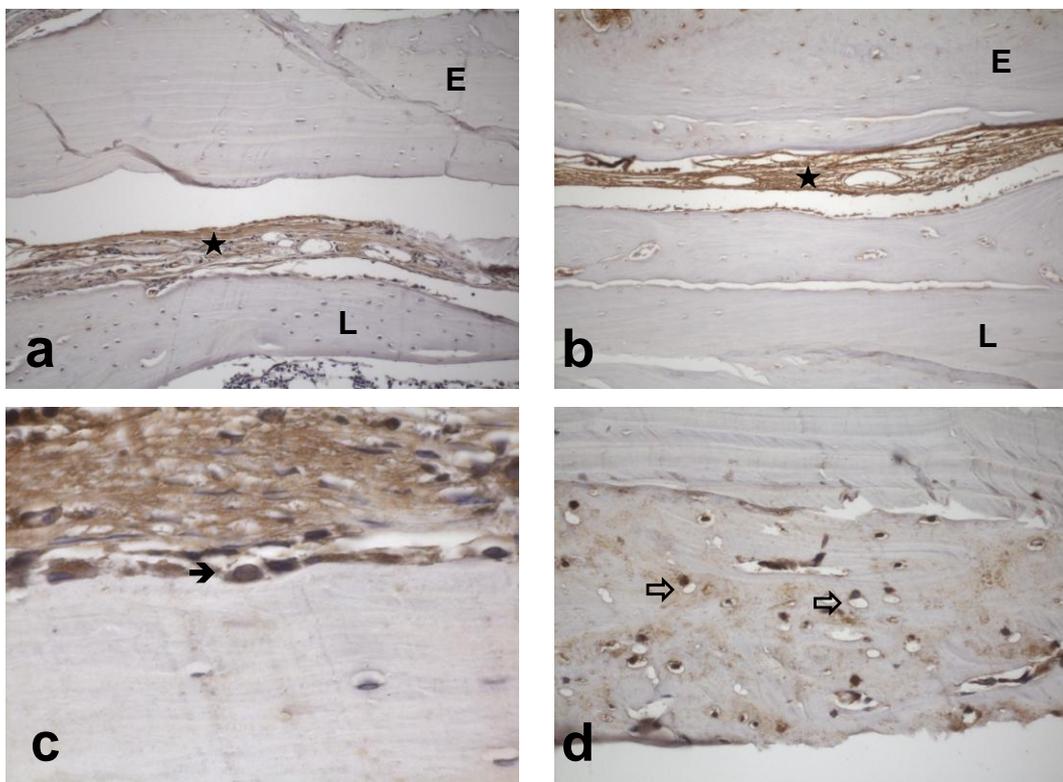


Figura 17 - Osteocalcina. Período 60 dias. a) Grupo OVZ-E: Marcação moderada do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Grupo OVZ-ME: Marcação intensa do tecido de granulação na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. c) Osteoblastos (→) com

positividade intensa. Aumento original 1000x. d) Osteócitos (⇒) volumosos do osso neoformado intensamente marcados. Aumento original 400x.

5.2.4 RANKL

As estruturas marcadas e a intensidade da marcação encontram-se listadas na tabela 4.

A matriz óssea não foi marcada em nenhum dos períodos analisados. (Figura 18).

Algumas células presentes no espaço medular apresentaram marcação citoplasmática intensa. Essa marcação foi constante para todos os períodos. Megacariócitos não exibiram nenhum tipo de marcação. (Figura 18).

Também foi igual a todos os períodos a marcação moderada dos espaços vasculares.

Tabela 4. RANKL. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

(continua)

	DIA 0		DIA 7		DIA 21	
	OVZ	SHAM	E	ME	E	ME
Osteócitos L	+ a ++	+ a ++	++	++	+	+
Osteócitos E	++	++	++	++	+	+
TC L-E	+	+	+++	+ a +++	++	++
TC E			+++	+ a +++	+++	+++
TC espaços medulares	+		+++	+++	+++	+++
Osteócitos ON			+++	+++	++	++
Osteoblasto			++ a +++	++ a +++	++	++
Osteoclastos			+ a ++	+ a ++	- a +	- a +
Megacariócitos	-	-	-	-	-	-
Células medula	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Esp vasculares	-	-	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-	-	-
Matriz óssea	-	-	-	-	-	-
Osso neoformado	-	-	-	-	-	-

Tabela 4. RANKL. Estruturas marcadas e intensidade da marcação.

(conclusão)

	DIA 45			DIA 60	
	OVZ-E	OVZ-ME	SHAM	E	ME
Osteócitos L	+	+	+		
Osteócitos E	+	+	+		
TC L-E	+++	++	++	++	+
TC E	+++	++	++	++	+ a ++
TC espaços medulares	+++	+++	+++	++	++
Osteócitos ON	++	++	++	+ a ++	+ a ++
Osteoblasto	++	++	++	++	++
Osteoclastos	- a +	- a +	- a +	+	+
Megacariócitos	-	-	-	-	-
Células medula	+++	+++	+++	+++	+++
Esp vasculares	-	-	-	-	-
Linhas reversas	-	-	-	-	-
Matriz óssea	-	-	-	-	-
Osso neoformado	-	-	-	-	-

(TC = tecido conjuntivo; L= leito receptor; E=enxerto; ON= osso neoformado)

5.2.4.1 Período de zero hora

Os espécimes dos quatro grupos avaliados neste período exibiram características semelhantes.

Nos grupos OVZ-E e OVZ-ME o leito receptor e o enxerto apresentavam maior quantidade de espaços medulares. No interior destes espaços, o tecido conjuntivo fibroso mostrou leve marcação em alguns espécimes.

As lacunas dos osteócitos do leito receptor exibiam marcação que variava de intensidade leve a moderada. A marcação moderada foi observada nos mais volumosos e que estavam localizados na periferia do leito. (Figura 18).

Na região do enxerto, as lacunas dos osteócitos mais volumosos e localizados próximo à região central mostraram marcação moderada. (Figura 18).

5.2.4.2 Período de 7 dias

As características imunoistoquímicas foram semelhantes para os quatro grupos.

Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, na interface leito-enxerto observou-se considerável quantidade de tecido de granulação com marcação intensa, o mesmo observado para o tecido de granulação que recobria o enxerto. Esse tecido de granulação mostrava marcação intensa de células endoteliais e do citoplasma dos fibroblastos. Nos grupos OVZ-ME e SHAM-ME, essa marcação foi bem difusa, variando de leve a intensa. (Figura 19).

As lacunas dos osteócitos tanto do leito receptor quanto do enxerto mostraram marcação moderada, especialmente os mais volumosos.

Os osteócitos das trabéculas ósseas imaturas eram bastante volumosos e exibiam marcação intensa de sua lacuna bem como o tecido conjuntivo presente no interior destas trabéculas. Os osteoblastos presentes no interior das trabéculas exibiam marcação citoplasmática moderada a intensa, assim como os osteoblastos presentes na superfície óssea do leito receptor. (Figura 19).

Os osteoclastos mostraram-se com marcação citoplasmática que variou de leve a moderada. A marcação mais acentuada foi observada nos que estavam mais próximos ao tecido ósseo. (Figura 19).

5.2.4.3 Período de 21 dias

Todos os espécimes mostraram características imunoistoquímicas semelhantes.

O tecido conjuntivo na interface leito-enxerto mostrou marcação moderada. Já o tecido conjuntivo que recobria o enxerto apresentou intensa marcação para os quatro grupos.

O tecido presente no espaço medular das trabéculas ósseas imaturas mostrou-se intensamente marcado.

Os osteoblastos presentes tanto nos espaços medulares como na superfície óssea apresentavam positividade moderada. (Figura 20).

Em todos os grupos observou-se que os osteócitos tanto do leito receptor como do enxerto mostram-se menos volumosos que nos dias 0 e 7, e exibiram marcação mais leve de suas lacunas. Os osteócitos do osso neoformado eram mais amplos, com marcação moderada de suas lacunas. (Figura 20).

Alguns osteoclastos localizados em íntimo contato com o tecido ósseo mostraram marcação leve de seu citoplasma enquanto outros, que se localizavam mais afastados, não exibiram positividade alguma. (Figura 20).

5.2.4.4 Período de 45 dias

Os grupos OVZ-ME, SHAM-E e SHAM-ME apresentaram marcação moderada do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto e ao redor do enxerto. Apenas o grupo OVZ-E mostrou intensa marcação. De permeio à este tecido, pode-se notar intensa marcação das células endoteliais e fibroblastos. (Figura 21).

Os osteoblastos presentes tanto nos espaços medulares como recobrimdo a superfície óssea apresentavam positividade moderada. (Figura 21).

Os osteócitos tanto do leito receptor como do enxerto mostraram marcação mais leve de suas lacunas. Os osteócitos das trabéculas ósseas, mais amplos, exibiram marcação moderada de suas lacunas.

Alguns osteoclastos localizados em íntimo contato com o tecido ósseo mostraram marcação leve de seu citoplasma enquanto outros, que se localizavam mais afastados, não exibiram positividade alguma.

5.2.4.5 Período de 60 dias

Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, o tecido conjuntivo na interface mostrou marcação moderada, enquanto no grupo OVZ-ME essa marcação foi leve, com marcação intensa de células endoteliais e

fibroblastos. O grupo SHAM-ME apresentava apenas tecido ósseo na interface leito-enxerto. O tecido conjuntivo na periferia do enxerto mostrou marcação moderada em todos os grupos, exceto no SHAM-ME, que mostrou leve marcação.

Os osteócitos do osso neoformado na interface leito-enxerto e ao redor do enxerto exibiam sua lacuna com marcação que variava de leve a moderada.

Os osteoblastos mostraram-se moderadamente marcados, enquanto os osteoclastos exibiam marcação leve (Figura 22).

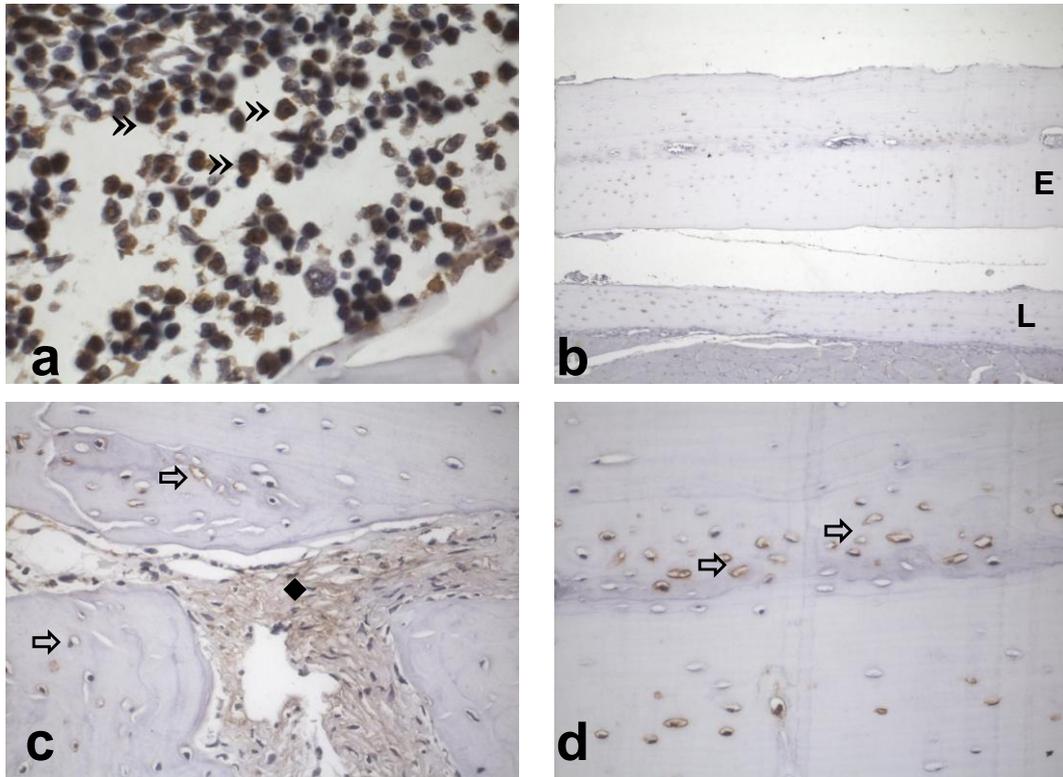


Figura 18 - RANKL. a) Marcação negativa de megacariócitos e intensa de células da medula óssea (»). Aumento original 1000x. b) Marcação negativa da matriz óssea. Aumento original 100x. c) Marcação leve do tecido conjuntivo fibroso nos espaços medulares (◆) do enxerto e marcação moderada dos osteócitos (⇒) próximo aos espaços medulares. Aumento original 200x. Marcação moderada dos osteócitos (⇒) na região mediana do enxerto. Aumento original 400x.

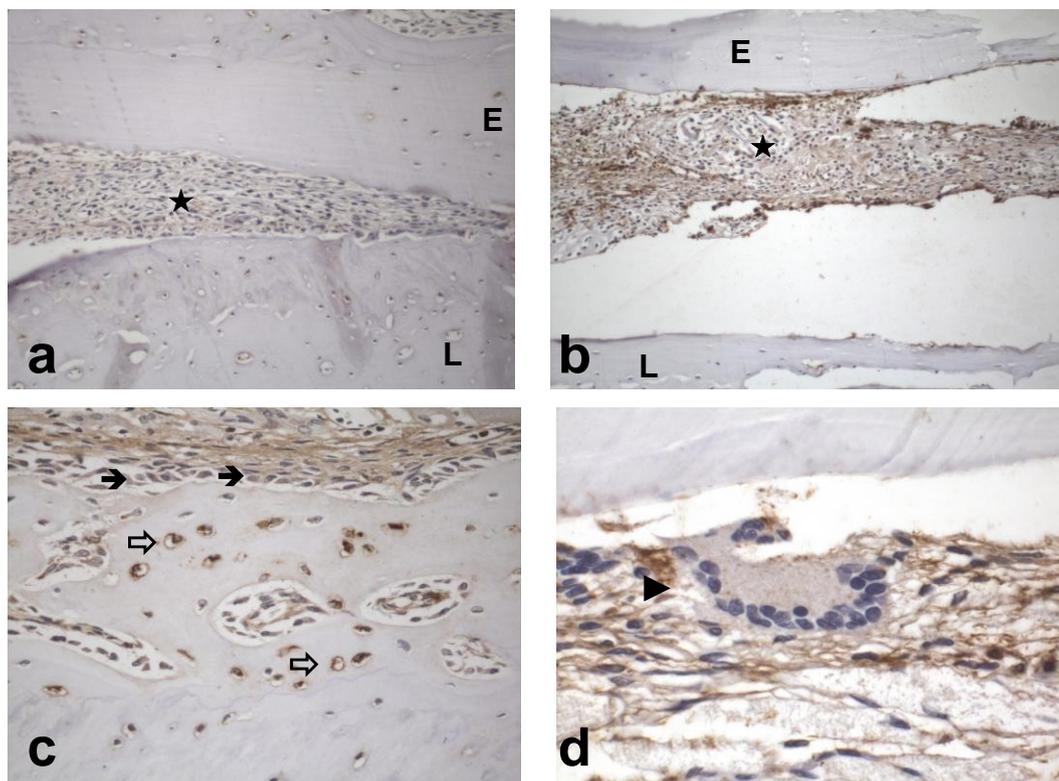


Figura 19 - RANKL. Período 7 dias. a) Grupo OVZ-ME: Marcação leve do tecido da interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Grupo OVZ-E: Marcação intensa do tecido da interface leito enxerto (★). Aumento original 100x. c) Osteoblastos (➔) com marcação moderada a intensa e lacunas dos osteócitos (⇨) volumosas e intensamente marcadas. Aumento original 400X. d) Osteoclasto (▶) na parte inferior do enxerto mostra-se levemente marcado. Aumento original 1000X.

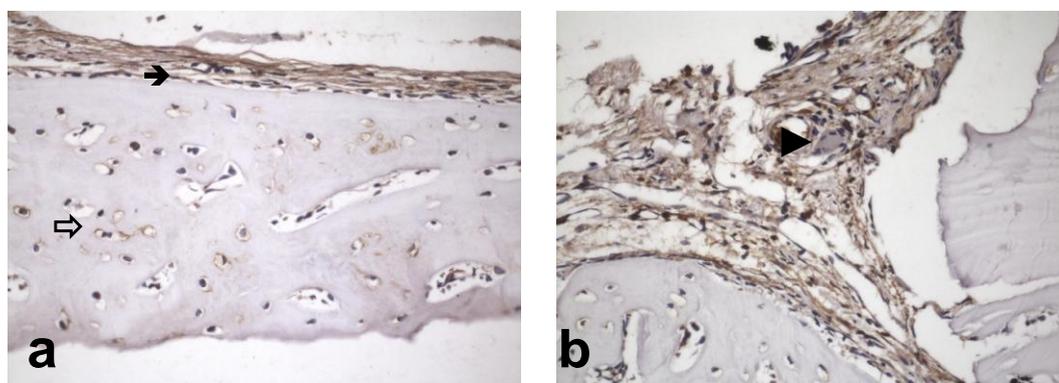


Figura 20 - RANKL. a) Período 21 dias. a) Grupo OVZ-ME: Osteócitos (⇨) do osso neoformado menos volumosos com marcação leve de suas lacunas. Osteoblastos (➔) sobre a superfície óssea exibem positividade

moderada. Aumento original 400x. b) Grupo SHAM-E Osteoclasto (▶) com marcação negativa 400x.

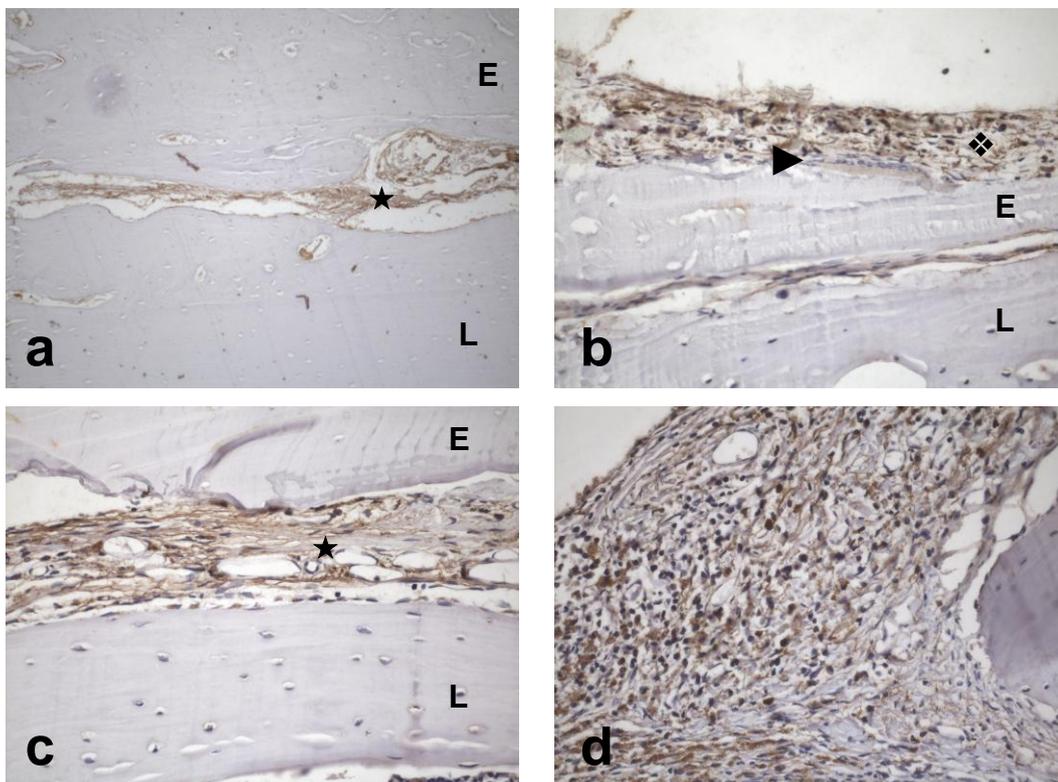


Figura 21 - RANKL. Período 45 dias. a) e b) Grupo OVZ-ME. a) Marcação moderada do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. b) Marcação moderada do tecido conjuntivo ao redor do enxerto (❖); osteoclasto (▶) sobre a superfície óssea com marcação citoplasmática leve. Aumento original 400x. c) e d) Grupo OVZ-E: c) Marcação intensa do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto (★). Aumento original 200x. d) Intensa marcação de fibroblastos do tecido ao redor do enxerto. Aumento original 400x.

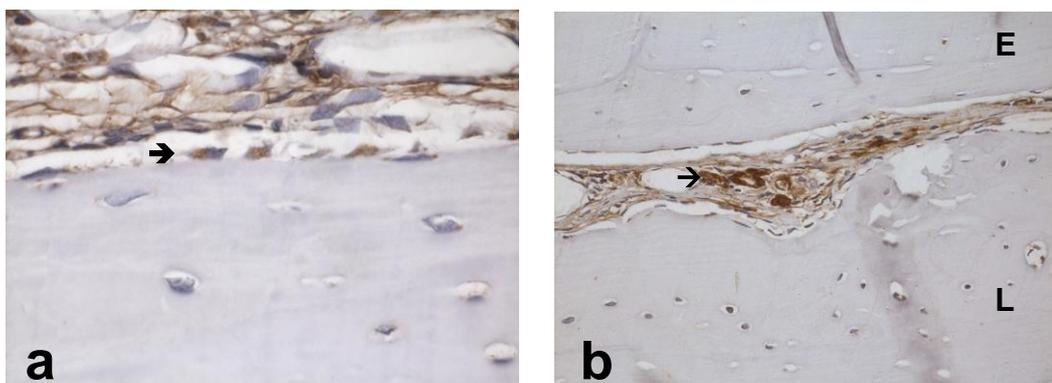


Figura 22 - RANKL. Período 60 dias. a) Marcação moderada de osteoblasto (→). Aumento original 1000x. b) Intensa marcação de células endoteliais (→) do tecido conjuntivo na interface leito-enxerto (L-E). Aumento original 400x.

6 DISCUSSÃO

A homeostase óssea é mantida pelo balanço entre reabsorção óssea por osteoclastos e formação óssea por osteoblastos.

Sialoproteína óssea (BSP), Osteonectina (ONC) e Osteocalcina (OCC) são proteínas não-colágenas que possuem a capacidade de se ligarem a mineral, e apresentam diversas funções relacionadas à formação e reparo de tecidos mineralizados de origem colágena, como organização da matriz colágena e regulação da formação e crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Os padrões distintos de localização dessas proteínas no osso sustentam a hipótese de que essas proteínas podem influenciar eventos como recrutamento, adesão, diferenciação e atividade de células ósseas e que sua distribuição nos tecidos esteja relacionada com o estágio de formação óssea (Ingram et al., 1993; McKee et al., 1996; Ganss et al., 1999).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANKL) é uma citocina pertencente à família do fator de necrose tumoral (TNF). É o mediador primário da formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, e está relacionado à perda óssea sob várias circunstâncias (Miheller et al, 2007; Stolina et al., 2007; Gallaghet, 2008). O RANKL ativa o receptor ativador do fator nuclear kappa- β (RANK), presente na membrana de pré-osteoclastos e induz sua diferenciação em osteoclastos (Gallagher, 2008).

A Osteoprotegerina (OPG) é uma citocina também pertencente à família do TNF que age como receptor para o RANKL,

prevenindo que este que ligue ao RANK, bloqueando assim a diferenciação de osteoclastos, e conseqüentemente a reabsorção óssea (Jilka, 2003; Miheller et al., 2007; McCormick, 2007)..

A interação OPG/RANK/RANKL tem papel fundamental no processo de osteoclastogênese, e é crítica para a regulação da remodelação óssea.

Após a menopausa, a perda óssea deve-se ao favorecimento da atividade do RANKL sobre a OPG. A diminuição dos níveis de estrógeno leva à diminuição da atividade da OPG e aumento da atividade do RANKL, levando ao aumento da reabsorção e perda óssea.

A odontologia tem acompanhado o aumento da expectativa de vida e conseguido propiciar a esses pacientes tratamentos reabilitadores cada vez mais especializados. A realização de enxertos ósseos autógenos tem proporcionado a colocação de implantes osseointegrados em pacientes que antes não seria possível.

Assim, a avaliação da expressão imunoistoquímica dos marcadores de formação óssea OCC, ONC e BSP, e do marcador de reabsorção óssea RANKL no processo de reparação do enxerto ósseo autógeno *onlay*, recoberto ou não por membrana de Politetrafluoretileno expandido (PTFE-e), em ratas com deficiência estrogênica permitiu um melhor conhecimento deste delicado processo biológico.

Os resultados do presente estudo mostraram que os marcadores imunoistoquímicos exibiram, dentro de um mesmo período, características semelhantes entre os grupos.

A BSP mostrou marcação mais intensa nos dias 7 e 21. No 7º dia, observou-se marcação intensa também da ONC e RANKL, enquanto a OCC mostrou maior positividade nos dois últimos períodos. No último período avaliado, as características de marcação quanto à intensidade e às estruturas marcadas se assemelharam com os períodos iniciais.

A maior semelhança da marcação imunoistoquímica pela BSP foi observada entre os períodos 7 e 21 dias, o mesmo observado para a ONC. A marcação pela OCC mostrou-se semelhante aos 45 e 60 dias, enquanto o RANKL teve sua expressão entre os dias 21 e 45 semelhante.

A matriz óssea foi marcada apenas pela BSP e OCC. Com a BSP, a matriz óssea tanto de leito receptor quanto do enxerto exibiu marcação leve em todos os grupos, enquanto a OCC marcou de maneira discreta e difusa. A marcação mais intensa pela BSP foi observada entre os dias 7 e 21. Nos dias 45 e 60, a intensidade da marcação variou de leve a moderada, exibindo, neste último período, marcação difusa com predomínio das áreas levemente marcadas. A localização da BSP no osso neoformado nesses períodos foi consistente com seu papel na formação e remodelação (Bianco et al. (1991); Chen et al. (1993).

Os achados do presente estudo mostraram marcação mais intensa da BSP no osso neoformado, enquanto o osso maduro, em todos os períodos, mostrou-se fracamente marcado. Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados por Lekic et al. (1996) e por Arambawatta et al. (2005), após análise da formação do osso alveolar de ratos.

Chen et al. (1993) analisaram o osso alveolar mandibular de fetos de porcos com 35 a 50 dias e observaram marcação da BSP restrita à matriz de tecidos mineralizados do osso alveolar e dentina. No osso alveolar, essa marcação foi evidente nos osteoblastos e osteócitos da matriz, e o osso maduro foi corado mais intensamente que o osso neoformado. A BSP foi observada também concentrada em linhas reversas devido à rápida remodelação.

Pinero et al. (1995) utilizaram o mesmo marcador anti-BSP, LF-87, utilizado neste trabalho, em mandíbula de ratos recém-nascidos e observaram marcação intensa da matriz óssea e dos osteoblastos, e marcação discreta de osteoclastos. Osteócitos não foram marcados.

Malaval et al. (2008) concluíram que deficiência de BSP de ratos *knockout* para BSP afeta, e impede o crescimento dos ossos e sua mineralização, com redução dramática da formação óssea, evidenciado pelo peso e tamanho inferior ao considerado normal.

Lao et al. (2006) observaram com a BSP marcação fraca da matriz óssea do osso alveolar e marcação leve a moderada ao redor de lacunas e das linhas reversas em espécimes humanos de dentes associados ao periodonto previamente tratado.

Ivanovski et al. (2000) realizaram, em cachorros, defeitos periodontais experimentais ao redor do 2º pré-molar seguido de colocação de membrana de PTFE-e. Após 4 semanas, a BSP mostrou marcação moderada do tecido conjuntivo fibroso que preencheu o defeito e alguns pontos de fraca marcação intracelular das células deste tecido, além de marcação intensa, difusa e granular do osso neoformado. Osteócitos e lacunas próximas a esta área também foram intensamente marcados, assim como uma pequena porção de osteoblastos associados ao osso neoformado. Ao contrário dos nossos achados, alguns osteoclastos foram intensamente marcados. Estes autores também avaliaram a OCC, que se mostrou fracamente localizada na matriz extracelular do tecido conjuntivo que preencheu o defeito periodontal. Houve alguma marcação intracelular de células do tecido mole e de osteoblastos ao redor do osso neoformado, enquanto a matriz extracelular do osso neoformado mostrou pouca e até mesmo nenhuma marcação. A falta de marcação da matriz extracelular do osso neoformado estava em total contraste ao osso mais maduro, que se corou mais intensamente. No presente estudo, os cortes corados pela OCC mostraram marcação da matriz neoformada apenas a partir do dia 45. Essa marcação era discreta e difusa, repetindo-se no período final.

Já em 2001, Ivanovski et al. avaliaram a expressão da OCC e BSP em dentes humanos com periodonto associado. A OCC mostrou marcação fraca na matriz extracelular do tecido conjuntivo da gengiva e

marcação moderada do cimento e do osso. A expressão da BSP foi restrita aos tecidos mineralizados, com marcação moderada do cimento e do osso, com maior intensidade imediatamente adjacente ao ligamento periodontal, devido à presença de células com potencial de formação de tecido mineralizado. No presente estudo, tal marcação em estruturas mineralizadas, pela BSP, também foi observada. Inclusive, os osteoblastos, células em intenso processo de formação óssea nos períodos de 7 e 21 dias, de todos os grupos deste estudo, apresentaram-se fortemente marcadas.

Bobryshev et al. (2008) avaliaram artérias carótidas ateroscleróticas de espécimes humanos e observaram marcação intensa de agregados homogêneos e granulares de OCC na matriz óssea.

Luzivuto et al (2010b) analisaram a reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas e observaram alteração na expressão da OCC, uma vez que a deficiência estrogênica atrasa o processo de reparo. As ratas que não foram submetidas à castração mostraram marcação intensa da matriz óssea neoformada pela OCC nos dias 14 e 21, enquanto o grupo ovariectomizado teve essa expressão mais discreta.

A BSP neste estudo se mostrou o único marcador que evidenciou linhas reversas. No período inicial, essa marcação foi observada apenas no leito receptor dos grupos OVZ-E e OVZ-ME. A marcação mais intensa ocorreu nos dias 7 e 21 tanto no leito receptor quanto no enxerto. Aos 45 dias, pode-se observar forte marcação da linha que demarcava as bordas do osso neoformado. No período final, essa marcação foi novamente moderada.

Apenas a BSP não corou o tecido de granulação interposto entre leito receptor e enxerto.

Quanto a este mesmo tecido, no período inicial, quando presente na interface leito-enxerto, mostrou-se levemente marcado pelo RANKL. Essa marcação variou de leve a moderada nos cortes corados

pela ONC e de leve a intensa para a OCC. Em todos os grupos, a marcação mais intensa foi observada no 7º dia.

Amar et al. (1995) analisaram espécimes de dentes humanos com doença periodontal em que foi utilizada membrana de PTFE-e, e observaram que a ONC marcou de maneira intensa o tecido conjuntivo gengival.

Ainda no tecido de granulação do presente estudo, foi observado que o RANKL apresentou marcação moderada no dia 21. Aos 45 dias, a marcação intensa foi observada apenas no grupo OVZ-E, enquanto nos demais a marcação foi moderada. No período final, os espécimes que receberam a membrana de PTFE-e mostraram marcação leve, enquanto os outros, marcação moderada. A OCC mostrou intensa marcação nos demais períodos. Essa marcação também foi intensa nos dias 21 e 45 para a ONC, mostrando-se novamente moderada aos 60 dias.

O tecido de granulação sobre o enxerto exibiu, nos espécimes que foram recobertos pela membrana de PTFE-e, positividade para a ONC que variou de moderada a intensa no dia 7, e intensa nos dias 21 e 45, mostrando-se novamente moderada aos 60 dias. Os espécimes que não receberam a membrana mostraram marcação leve aos 7 e 60 dias. Nos dias 21 e 45, essa marcação oscilou entre leve e moderada.

A OCC mostrou, nos grupos em que a membrana de PTFE-e foi utilizada, intensa marcação entre o período 7 a 45 dias, e marcação moderada aos 60 dias. Quando a membrana não foi utilizada, a marcação foi bastante variada aos 7 dias, ora leve, ora intensa. Após esse período, a marcação foi leve, e por vezes, ausente.

O RANKL mostrou um padrão de imunomarcação mais heterogêneo. No dia 7, houve intensa marcação nos grupos OVZ-E e SHAM-E, enquanto os grupos OVZ-ME e SHAM-ME mostraram marcação mais difusa, variando de leve a intensa. Nesta área, foi possível ainda

identificar células endoteliais, intensamente marcadas. No dia 21, todos os espécimes mostraram intensa marcação desta área. Aos 45 dias, assim como o observado para o tecido de granulação interposto entre leito receptor e enxerto, apenas o grupo OVZ-E mostrou-se intensamente marcado, enquanto nos demais a marcação moderada. De permeio a este tecido, pode-se notar intensa marcação das células endoteliais e fibroblastos. No período final, todos os grupos mostraram positividade moderada.

O tecido conjuntivo entremeado nas trabéculas ósseas imaturas da base e da superfície do leito receptor mostrou positividade para ONC que variou de moderada à intensa entre os dias 7 e 45. Nos grupos OVZ-E e SHAM-E, observou-se marcação moderada também nos espaços medulares do enxerto.

Já a OCC mostrou leve marcação no dia 0, enquanto no dia 7, essa marcação variou de moderada a intensa nos grupos OVZ, enquanto nos grupos SHAM, essa marcação foi intensa. Ainda nesse período, pode-se observar marcação moderada dos espaços medulares do enxerto não recoberto pela membrana de PTFE-e. Aos 21 dias, essa marcação foi intensa em todos os grupos.

O RANKL mostrou, no período inicial, marcação apenas nos grupos OVZ-E e OVZ-ME. Essa marcação foi leve e restrita aos espaços medulares do enxerto. No período compreendido entre os dias 7 e 45, a marcação foi intensa.

Os osteoblastos presentes nas lacunas ósseas e sobre a superfície óssea mostraram intensa positividade citoplasmática para BSP nos períodos 7 e 21 dias. Essa marcação foi moderada aos 45 dias e aos 60, essas estruturas exibiram positividade que variou de leve a moderada, como observado no período inicial.

A ONC mostrou, no período inicial, marcação citoplasmática dos osteoblastos que variou de moderada a intensa. No dia 7, essa marcação foi intensa. Nos dias 21 e 45, apenas os osteoblastos dispostos

em camada sobre a superfície óssea mostraram-se intensamente marcados, enquanto aqueles que estavam entremeados às trabéculas ósseas exibiram positividade que variou de leve a moderada. No período final, essa marcação foi moderada.

Ishigaki et al. (2002) observaram, em mandíbulas de fetos de ratos, expressão moderada a intensa da ONC em osteoblastos dos fetos a partir de 15 dias, enquanto, no mesmo período, a marcação para OCC e BSP foi fraca. A matriz óssea não foi marcada pela ONC, enquanto a BSP mostrou positividade ora leve ora moderada, e fraca para OCC.

Em 1992, Serra et al. afirmaram que a ONC é um marcador confiável de tumores osteogênicos, uma vez que células normais não mostrariam evidência de marcação imunoistoquímica.

Pode-se observar com a OCC, nos dias 7 e 21, que os osteoblastos dos quatro grupos mostraram marcação citoplasmática e de membrana que variou de leve a moderada. Aos 45 e 60 dias, essa marcação foi intensa em todos os grupos.

Marcação citoplasmática dessas células foi observada também com o RANKL. No dia 7, a marcação variou de moderada a intensa, mostrando-se moderada nos demais períodos.

Luzivuto et al (2010a) utilizaram os marcadores RANKL e OPG para avaliar o reparo ósseo alveolar em ratas ovariectomizadas e observaram marcação intensa dos osteoblastos ao redor e entremeados às trabéculas ósseas imaturas no tecido ósseo. Com base nestes resultados, os autores sugerem que estas células têm participação importante na síntese destas duas citocinas.

A BSP mostrou que em todos os períodos e grupos, a marcação das lacunas dos osteócitos do leito receptor variou de leve a moderada.

Os osteócitos do leito receptor não se mostraram marcados em nenhum período pela ONC.

A OCC exibiu positividade leve das lacunas dos osteócitos em todos os períodos.

O RANKL mostrou, nos dias 0 e 7, as lacunas dos osteócitos do leito receptor com marcação que variava de intensidade leve a moderada. A marcação moderada foi observada nos mais volumosos e que estavam localizados na periferia do leito. Nos demais períodos, essa marcação foi leve.

Em todos os períodos, todos os marcadores mostraram que os osteócitos da região mediana do enxerto, especialmente os mais volumosos, exibiram marcação moderada. Os marcadores OCC e RANKL mostraram positividade apenas das lacunas dos osteócitos. A partir do dia 21, essa visualização não foi possível em alguns espécimes devido à intensa reabsorção sofrida, principalmente nos espécimes em que não houve o recobrimento do enxerto pela membrana de PTFE-e.

Os osteócitos entremeados nas trabéculas ósseas imaturas mostraram intensa positividade para a BSP nos períodos 7 e 21 dias. No dia 45, essas estruturas apresentavam-se moderadamente marcadas. No período final, essas estruturas exibiram positividade que variou de leve a moderada, como observado no período inicial.

Nos dias 7 e 21, a positividade para ONC dos osteócitos das trabéculas ósseas imaturas variou de leve a intensa. A marcação mais intensa foi observada nos osteócitos mais volumosos. A partir do dia 45, já não se observava marcação da maioria dos osteócitos.

A OCC mostrou que os osteócitos do osso neoformado apresentavam positividade leve de suas lacunas, inclusive os mais volumosos. Aos 21 dias, a marcação intensa foi observada nos grupos SHAM, enquanto nos grupos OVZ, a marcação foi moderada. Aos 45 e 60 dias, a marcação foi intensa em todos os grupos.

O RANKL mostrou, no dia 7, marcação intensa da lacuna dos osteócitos das trabéculas ósseas imaturas, principalmente os mais

volumosos. Nos dias 21 e 45, essa marcação foi moderada. No período final, a marcação variou de leve a moderada.

No presente estudo, os osteoclastos mostraram-se positivos apenas para o RANKL. No dia 7, a marcação citoplasmática variou de leve a moderada. A marcação mais acentuada foi observada nos que estavam em íntimo contato com o tecido ósseo. Nos demais períodos, os osteoclastos mais próximos ao tecido ósseo mostraram-se levemente marcados, ao passo que os demais não exibiram marcação alguma.

Na medula óssea, pode-se observar megacariócitos com marcação citoplasmática leve para a BSP. Essa marcação mostrou-se negativa apenas no período final. As demais células, para todos os períodos, não exibiram qualquer tipo de marcação.

A OCC mostrou, nos dia 0, 7 e 21, que algumas células presentes na medula óssea exibiram marcação citoplasmática moderada. Aos 45 e 60 dias, essa marcação foi vista também na membrana de algumas células. Megacariócitos não foram marcados no período inicial, enquanto nos demais períodos observou-se marcação citoplasmática intensa.

Algumas células presentes no espaço medular apresentaram marcação citoplasmática intensa para o RANKL. Essa marcação foi constante para todos os períodos. Megacariócitos não exibiram nenhum tipo de marcação. Lee et al. (2005) descreveram a expressão do marcador RANKL na regeneração do timo de ratos, e observaram relação deste marcador com linfócitos T durante sua regeneração.

Apenas a ONC não mostrou positividade para nenhuma célula da medula óssea.

Apenas os cortes corados com a ONC mostraram intensa marcação de músculo esquelético estriado. Também foi comum a todos os espécimes a marcação moderada do tecido conjuntivo interposto entre os lóbulos das glândulas salivares. O mesmo anticorpo anti-ONC LF-23

foi utilizado por Wewer et al. (1988) para análise de casos de carcinomas humanos. Estes autores observaram intensa marcação do tecido muscular do útero.

Os espaços vasculares não mostraram positividade apenas para a ONC, enquanto para os demais marcadores, a expressão foi moderada em todos os períodos.

O presente estudo mostrou expressão mais intensa do RANKL no 7º dia. Amorim et al. (2008) avaliaram o reparo ósseo em tibia de ratos diabéticos. Estes autores observaram imunorreatividade no citoplasma e na membrana de células do tecido conjuntivo e ósseo, em fibroblastos, células endoteliais, células na periferia do osso, osteócitos, células da medula óssea e condrócitos. No sétimo dia, os ratos diabéticos mostraram decréscimo do recrutamento e diferenciação de osteoclastos no local da fratura, enquanto no dia 14, houve aumento da atividade reabsortiva. Os autores puderam concluir que a falta de balanço na expressão RANK-RANKL-OPG associado ao diabetes pode contribuir para o atraso no reparo das fraturas.

Silvestrini et al. (2005) avaliaram a expressão imunohistoquímica de RANKL e OPG no fêmur e tibia de ratos com 3 semanas de vida e observaram que estes dois marcadores foram expressos nas mesmas células de maneira semelhante. Os osteoblastos e osteócitos volumosos do osso medular da zona de ossificação primária foram intensamente marcados. Na zona de ossificação secundária, essa marcação variou de leve a moderada. Poucos osteoclastos foram marcados com intensidade variável. Na medula óssea, megacariócitos foram intensamente marcados, assim como outras células.

Luzivuto et al. (2010a) também observaram marcação semelhante dos marcadores RANKL e OPG nas mesmas células no reparo ósseo alveolar de ratas ovariectomizadas. A expressão destes marcadores foi mais intensa aos 7 dias pós-operatórios, devido à intensa taxa de remodelação. Aos 42 dias, último período avaliado, essa

marcação mostrou-se diminuída devido à diminuição da taxa de remodelação óssea, principalmente nos grupos SHAM e no grupo de ratas ovariectomizadas tratadas com raloxifeno.

Pedrosa Junior et al. (2009) realizaram enxerto ósseo de calvária em mandíbula de coelhos e observaram expressão mais intensa do RANKL nos dias 5 e 10. A OCC mostrou a mesma intensidade em todos os grupos e períodos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com o presente estudo permitem concluir:

- a) O metabolismo ósseo no processo de reparo foi mais intenso entre os dias 7 e 21;
- b) A partir do 45º dia, o osso neoformado já exibiu características de osso maduro;
- c) A maior taxa de reabsorção óssea e remodelação foi observada aos 7 dias;
- d) A deficiência estrogênica não afetou a expressão dos marcadores imunoistoquímicos;
- e) A expressão dos marcadores imunoistoquímicos foi alterada pela presença da membrana de PTFE-e.

8 REFERÊNCIAS*

Adeyemo WL, Reuther T, Bloch W, Korkmaz Y, Fisher JH, Zöller JE et al. Healing of onlay mandibular bone grafts covered with collagen membrane or bovine bone substitutes: a microscopical and immunohistochemical study in the sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(7):651-59.

Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50(8):829-34.

Amar S, Petrungaro P, Amar A, Van dyke TE. Immunolocalization of bone matrix macromolecules in human tissues regenerated from periodontal defects treated with expanded polytetrafluoroethylene membranes. *Arch Oral Biol.* 1995;40(7):653-61.

Amorim FPLG, Ornelas SS, Diniz SF, Batista AC, Silva TA. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. *J Mol Histol.* 2008;39(4):401-8

Arambawatta AKS, Yamamoto T, Wakita M. Immunohistochemical characterization of noncollagenous matrix molecules on the alveolar bone surface at the initial principal fiber attachment in rat molars. *Ann Anat.* 2005;187(1):77-87.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Aubin JE, Liu F (1996) The osteoblast lineage. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (eds) Principles of bone biology. Academic Press, San Diego, pp 51–67 *apud* Sasano Y et al.. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol.* 2000;202(1):31-37.

Babraj JA, Smith K, Cuthbertson DJ, Rickhuss P, Dorling JS, Rennie MJ. Human bone collagen synthesis is a rapid, nutritionally modulated process. *J Bone Miner Res.* 2005;20(6):930-7.

Bellaïhcène A, Castronovo V. Increased expression of osteonectin and osteopontin, two bone matrix proteins, in human breast cancer. *Am J Pathol.* 1995;146(1):95-100.

Bellaïhcène A, Bonjean K, Fohr B, Fedarko NS, Robey FA, Young MF et al.. Bone sialoprotein mediates human endothelial cell attachment and migration and promotes angiogenesis. *Circ Res.* 2000;86(8) 885-91.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.* 1991;49(6):421-6.

Bianco P, Riminucci M, Silvestrini G, Bonucci E, Termine JD, Fisher LW et al.. Localization of bone sialoprotein (BSP) to Golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix. *J Histochem Cytochem.* 1993;42(2):193-203.

Bobryshev YV, Killingsworth MC, Lord RSA. Spatial distribution of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 and bone formation in atherosclerotic arteries. *Cell Tissue Res.* 2008;333(2):225-35

Bosshardt DD, Sculean A, Donos N, Lang NP. Pattern of mineralization after regenerative periodontal therapy with enamel matrix proteins. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:225-31.

Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodont Rest Dent.* 1993;13(1):29–45.

Buser D, Dula K, Belser U, Peter H, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodont Rest Dent*. 1995;15(1):10-29.

Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(4):420-32.

Cao JJ, Singleton PA, Majumdar S, Boudignon B, Burghardt A, Kurimoto P et al.. Hyaluronan increases RANKL expression in bone marrow stromal cells through CD44. *J Bone Miner Res*. 2005;20(1):30-40.

Chen J, Aufdemorte TB, Jiang H, Liu AR, Zhang W, Thomas HF. Neoplastic odontogenic epithelial cells express bone sialoprotein. *Histochem J*. 1998;30(1):1-6.

Chen J, McCulloch CA, Sodek J. Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol*. 1993;38(3):241-9.

Chen J, McKee MD, Nanci A, Sodek J. Bone sialoprotein mRNA expression and ultrastructural localization in fetal porcine calvarial bone: comparisons with osteopontin. *Histochem J*. 1994;26(1):67-78.

Crăciun AM, Vermeer C, Eisenwiener HG, Drees N, Knapen MH. Evaluation of a bead-based enzyme immunoassay for the rapid detection of osteocalcin in human serum. *Clin Chem*. 2000;46(2):252-7.

Diniz-Santos DR, Brandão F, Adan L, Moreira A, Vicente EJ, Silva LR. Bone mineralization in young patients with type 1 diabetes mellitus and screening-identified evidence of celiac disease. *Dig Dis Sci*. 2008;53(5):1240-5.

Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. An experimental study in the rat. *Clin Oral Impl Res*. 2002;13(12):185-91

Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL, Leslie KO, Mann KG, Taatjes DJ, et al. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am J Clin Pathol.* 1997;108(4):464-73.

Faria PE, Okamoto R, Bonilha-Neto RM, Xavier SP, Santos AC, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay iliac grafts remodeling. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(4):393-401.

Fisher LW, McBride OW, Termine JD. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J Biol Chem.* 1990;265(4):2347-51.

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(2):460–5.

Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003; 44 (Suppl 1):33-40.

Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas.* 2008;60(1):65-69.

Ganss B, Kim RH, Sodek J. Bone sialoprotein. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(1):79-98.

Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR. Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 1990; 85(3):632-39.

Haas DW, Holick MF. Enhanced osteonectin expression in the chondroid matrix of the unloaded mandibular condyle. *Calcif Tissue Int.* 1996; 59(3):200-6.

Hunter GK, Hauschka PV, Poole AR, Rosenberg LC, Goldberg HA. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochem J.* 1996;317:59–64

Ibrahim T, Leong I, Sanchez-Sweatman O, Khokha R, Sodek J, Tenenbaum HC et al.. Expression of bone sialoprotein and osteopontin in breast cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis.* 2000;18(3):253-60.

Inanç B, Elçin AE, Elçin YM. Effect of osteogenic induction on the in vitro differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *Artif Organs.* 2007;31(11):792-800.

Ingram RT, Clarke BL, Fisher LW, Fitzpatrick LA.. Distribution of noncollagenous proteins in the matrix of adult human bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. *J Bone Miner Res.* 1993;8(9):1019-29.

Ishigaki R, Takagi M, Igarashi M, Ito K. Gene expression and immunohistochemical localization of osteonectin in association with early bone formation in the developing mandible. *Histochem J.* 2002;34(1-2):57-66.

Ivanovski S, Li H, Daley T, Bartold PM. An immunohistochemical study of matrix molecules associated with barrier membrane-mediated periodontal wound healing. *J Periodontal Res.* 2000;35(3):115-26.

Ivanovski S, Li H, Haase HR, Bartold PM: Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res.* 2001;36(3):131-41.

Jardini MAN, De Marco AC, Lima LA. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:666-73.

Jensen OT, Greer Junior RO, Johnson L, Kassebaum D. Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1995;10(3):335-44.

Jilka RL. Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*. 2003;41(3):182-5.

Kalaitzidis D, Gilmore TD. Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NFkappaB. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(2):46-52.

Khan SN, Cammisa FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005;13(1):77-86.

Kim KH, Jeong L, Park HN, Shin SY, Park WH, Lee SC, et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J Biotechnol*. 2005;120(3):327-39.

Kim YD, Song WW, Kim SS, Kim GC, Hwang DS, Shin SH, et al. Expression of receptor activator of nuclear factor -kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor -kappaB, and osteoprotegerin, following low-level laser treatment on deproteinized bovine bone graft in rats. *Lasers Med Sci*. 2009;24(4):577-84.

Kostopoulos L, Karring T. Guided bone regeneration in mandibular defects in rats using a bioresorbable polymer. *Clin Oral Implants Res*. 1994;5(2):66-74.

Lao M, Marino V, Bartold PM. Immunohistochemical study of bone sialoprotein and osteopontin in healthy and diseased root surfaces. *J Periodontol*. 2006;77(10):1665-73.

Lee H, Kim B, Kim H, Lee C, Yoo H, Kim J et al. Upregulation of receptor activator of nuclear factor-jB ligand expression in the thymic subcapsular, paraseptal, perivascular, and medullary epithelial cells during thymus regeneration. *Histochem Cell Biol*. 2005;123(4-5):491-500

Lekic P, Sodek J, McCulloch CAG. Osteopontin and Bone Sialoprotein Expression in Regenerating Rat Periodontal Ligament and Alveolar Bone. *Anat Rec*. 1996;244(1):50-8.

Lerner UH. Bone Remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. *J Dent Res.* 2006;85(7):584-95.

Lewiecki EM. RANK ligand inhibition with denosumab for the management of osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(10):1041-50.

Lim SL, Ichinose H, Shinoda T, Ueda H. Noncompetitive detection of low molecular weight peptides by open sandwich immunoassay. *Anal Chem.* 2007;79(16):6193-200.

Lips P, Courpron P, Meunier PJ. Mean wall thickness of trabecular bone packets in the human iliac crest: changes with age. *Calcif Tissue Res.* 1978;26(1):13-7.

Lundgren D, Lundgren AK, Sennerby L, Nyman S. Augmentation of intramembranous bone beyond the skeletal envelope using an occlusive titanium barrier. *Clin Oral Implants Res.* 1995;6(2):67-72.

Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RCM, Garcia Jr IR. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010a;55:52-59.

Luvizuto ER, Dias SM, Queiroz TP, Okamoto T, Garcia Junior IR, Okamoto R et al. Osteocalcin immunolabeling during the alveolar healing process in ovariectomized rats treated with estrogen or raloxifene. *Bone* (2010b), doi: 10.1016/bone.2009.12.016

Malaval L, Wade-Gu ye NM, Boudiffa M, Fei J, Zirngibl R, Chen F, et al.. Bone sialoprotein plays a functional role in bone formation and osteoclastogenesis. *J Exp Med.* 2008;205(5):1145-53.

Matsuzaka K, Shimono M, Inoue T. Characteristics of newly formed bone during guided bone regeneration: observations by immunohistochemistry and confocal laser scanning microscopy. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2001;42(4):225-34.

McCormick RK. Osteoporosis: Integrating biomarkers and other diagnostic correlates into the management of bone fragility. *Altern Med Rev.* 2007;12(2):113-45.

McKee MD, Glimcher MJ, Nanci A. High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia. *Anat Rec.* 1992;234(4):479-92.

McKee MD, Nanci A. Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec.* 1996;245(2):394-409.

Miheller P, Muzes G, Rácz K, Blázovits A, Lakatos P, Herszényi L, et al. Changes of OPG and RANKL concentrations in Crohn's disease after infliximab therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(11):1379-84.

Nakamura S, Kamihagi K, Satakeda H, Katayama M, Pan H, Okamoto H, et al. Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum.* 1996;39(4):539-51.

Nascimento RD. Influência da Osteopenia na Regeneração do Enxerto Autógeno Recoberto ou não por membrana de PTFE-e. Estudo histológico e histomorfométrico em ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2006.

Pedrosa Junior WF, Okamoto R, Faria PE, Arnez MF, Xavier SP, Salata LA. Immunohistochemical, tomographic and histological study on onlay bone graft remodeling. Part II: calvarial bone. *Clin Oral Implants Res.* 2009; 20(11):1254-64.

Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002;23(1):90-119.

Pinero GJ, Farach-Carson MC, Devoll RE, Aubin JE, Brunn JC, Butler WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodelling in the neonatal rat mandible as studied by immunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, alpha 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. *Arch Oral Biol.* 1995;40(2):145-55

Serra M, Morini MC, Scotlandi K, Fisher LW, Zini N, Colombo MP et al. Evaluation of osteonectin as a diagnostic marker of osteogenic bone tumors. *Hum Pathol.* 1992;23(12):1326-31.

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri MLN, Monnazzi P, et al.. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol.* 2005;36(1-2):59-67.

Slemenda C, Longcope C, Peacock M, Hui S, Johnston CC. Sex steroids, bone mass and bone loss. A prospective study of pre-, peri-, and postmenopausal women. *J Clin Invest.* 1996;97(1):14-21.

Stolina M, Kostenuik PJ, Dougall WC, Fitzpatrick LA, Zack DJ. RANKL inhibition: from mice to men (and women). *Adv Exp Med Biol.* 2007;602:143-50.

Taguchi Y, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K et al.. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials.* 2005;26(31):6158-66.

Takada J, Ishii S, Ohta T, Koshiba H, Matsuyama T, Usui M et al.. Usefulness of a novel monoclonal antibody against human osteocalcin in immunohistochemical diagnosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;420(6):507-11

Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981;26:99-105.

Terminé JD, Robey PG (1996) Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus MJ (ed) Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp 24–28 *apud* Sasano Y et al.. Expression of major bone extracellular matrix proteins during embryonic osteogenesis in rat mandibles. *Anat Embryol.* 2000;202(1): 31-37.

Wewer UM, Albrechtsen R, Fisher LW, Yuong MF, Termine JD. Osteonectin/SPARC/BM-40 in human deciduas and carcinoma, tissue characterized by de Novo formation of basement membrane. *Am J Pathol.* 1988;132(2)345-55.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and Management of Osteoporosis: report of a WHO scientific group. WHO technical report series;921. Geneva; 2000.

Young MF. Bone matrix proteins: more than markers. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(1): 2-4.

ANEXO A – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

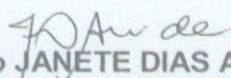
CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **026/2008-PA/CEP**, sobre **“Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com osteopenia induzida”**, sob responsabilidade de **TÁBATA DE MELLO TERA** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 20 de dezembro de 2008.



Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora

ANEXO B – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS FACULDADE DE ODONTOLOGIA <small>Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - São Dimas - CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9000 - FAX (12) 3947-9028</small>	
 Comitê de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos	
São José dos Campos, 27 de abril de 2010	
Ofício nº 027/10-CEP	
Prezado(a) Sr.(a)	TÁBATA DE MELLO TERA
Projeto	Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com osteopenia induzida
PARECER	
Por solicitação da Pesquisadora Responsável, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para “Imunolocalização dos marcadores de formação e reabsorção óssea em regeneração óssea guiada em ratas com deficiência estrogênica.” Convalidando dessa forma o Protocolo nº 079/2009-PH/CEP de 17/11/2009	
Atenciosamente,	
 Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA Coordenadora	

Tera TM. Immunolocalization of markers of bone formation and resorption in guided bone regeneration in rats with estrogen deficiency. [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

The study evaluated the immunohistochemical expression of bone formation markers Osteocalcin (OCC), Osteonectin (ONC) and Bone Sialoprotein (BSP) and the marker of bone resorption Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa- β Ligand (RANKL) in the repair process autogenous bone grafts in blocks covered or not by polytetrafluoroethylene membrane (PTFE-e), in rats with estrogen deficiency induced. For this, 80 female rats were divided randomly into two groups (SHAM and OVZ). The 40 rats in the group OVZ underwent surgical ovariectomy and 40 of the SHAM group underwent to surgical sham ovariectomy. The two groups were subdivided into E, where surgery was performed for placement of ABG, and ME group, where the ABG was covered with PTFE-e membrane. The evaluation periods were days 0, 7, 21, 45 and 60 days. The specimens were embedded in paraffin, to perform serial sections with 3 mm thick, which were extended on slides previously treated by 3-aminopropyltriethoxysilane and then were subjected to immunohistochemical technique for the markers for the OCC, BSP, ONC and RANKL. The results showed more intense labeling of the BSP on days 7 and 21. On the seventh day, there was intense labeling of the ONC and RANKL, while the OCC showed higher positivity in the last two periods. In the last period evaluated, the characteristics of marking on the intensity and the structures resembled marked with initial periods for all markers. The results showed that the bone metabolism was most intense between days 7 and 21, while the highest rate of remodeling was observed at 7 days. From the 45th day, the newly formed bone already displayed characteristics of mature bone. The expression of immunohistochemical markers was not altered by estrogen deficiency, but rather by the presence of PTFE-e membrane.

Keywords: Estrogen deficiency. Guided Bone Regeneration. Bone Repair. Osteocalcin. Osteonectin. Bone sialoprotein. RANKL.

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](#)