CARLOS EDUARDO SECCO MAFRA

**Efeitos de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre o tecido ósseo ao
redor de implantes inseridos em ratos**

São Paulo

2013

CARLOS EDUARDO SECCO MAFRA

**Efeito de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre o tecido ósseo ao
redor de implantes inseridos em ratos**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. João Batista
César Neto

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Mafra, Carlos Eduardo Secco.

Efeito de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratos / Carlos Eduardo Secco Mafra; orientador João Batista Cesar Neto. -- São Paulo, 2013.

53 p.: il. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Periodontia. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Hormônios paratireóideos. 2. Implantes - Titânio. 3. Enxerto ósseo. I. Cesar Neto, João Batista. II. Título.

Mafra, CES. Efeito de diferentes doses de PTH (1-34) sintético sobre o tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratos. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 26/02/2014

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a).	João Batista César Neto	
Instituição:	FOUSP	Julgamento : APROVADO

Prof(a).Dr(a).	Vivian Bradaschia Corrêa	
Instituição:	FOUSP	Julgamento : APROVADO

Prof(a).Dr(a).	Cleverson de Oliveira e Silva	
Instituição:	UEM	Julgamento : APROVADO

Deus.....obrigada por me iluminar sempre que necessitei, por nunca ter me abandonado,
por colocar pessoas abençoadas em minha vida, por ter me protegido nestas infinitas viagens pela BR 116 . Obrigada por mais essa conquista.....

Aos Meus Pais (In Memoriam)- Gostaria que estivessem aqui (materialmente), senti falta de suas presenças em cada conquista nestes anos todos... Obrigado

A Cynthia, Ana Luisa e Thomás.... é por vocês que eu acordo com ânimo e força para tentar melhorar a cada dia. Vocês são a Luz na minha vida... e fazem com que os obstáculos pareçam pequenos. Obrigado por preencherem minha vida com sua alegria.

Aos Meus Irmãos, apoio incondicional em todos os momentos desde antes da graduação

AGRADECIMENTOS

Ao Meu Orientador **Prof. Dr. João Batista César Neto**, por me receber mesmo após tantos anos sem contato, como se nunca estivéssemos estado distantes, por ter me aceitado como aluno e confiar em mim para realização deste trabalho.

A Prof Dra. **Luciana Saraiva**, por ter junto com meu orientador aberto as portas da FOU SP para mim e deixado eu trabalhar em sua equipe, enquanto eu ainda não tinha um trabalho definido.

Aos graduandos **Chicão e Fred** por terem me ajudado nas cirurgias com os animais. Obrigado pela disposição em me ajudar e **Beth e Priscila** pela ajuda na aplicação do hormônio.

Aos colegas da pós-graduação **Dida, Caio, Sassá, Ecinele, Flavia, Henrique, Isabella, Livia, Marcelo Sirolli, Mari Rabelo, Mari Rocha, Michelle, Priscila, Rodrigo Santos, Hilana, Rodrigo Nahas, Vanessa, Verônica, Ieda, Daniela, Fukushima e Stefânia** pelos momentos de convivência e apoio.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia FOU SP, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Francisco Emílio Pustiglioni, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Prof. Dr. João Batista Cesar Neto, Profa Dra. Marinella Holzhausen, Prof. Dra. Luciana Saraiva de Campos, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti e Prof. Dra. Marina Clemente Conde**. Foi gratificante ter a oportunidade de estar ao lado de vocês todos em pelo menos uma fase de minha vida.

À **Márcia, Marília e Cecília**, equipe administrativa da Disciplina de Periodontia, muito obrigada pela disposição, paciência, auxílio com os prazos, relatórios e em tudo que precisei.

Aos Professores da Banca Examinadora, agradeço por terem aceitado o convite e por enriquecerem esse trabalho com suas sugestões e críticas.

À **FAPESP**, pelo Auxílio à Pesquisa .

À **CAPES**, pela bolsa de mestrado no Programa de Demanda Social.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
=	igual
≠	diferente
mm	milímetros
μm	micrômetros
mg	miligrama
μg	micrograma
Kg	quilograma
n	quantidade de animais presentes na amostra
IM	intramuscular
AO	área óssea
BMP	proteína morfogenética óssea
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CD	contato direto
OPG	osteoprotegerina
PTH	paratormônio
PTM	proporção de tecido mineralizado
RANK	receptor ativador de fator nuclear kappa- β
RANK-L	receptor ativador de fator nuclear kappa- β ligante
TNF	fator de necrose tumoral
EUA	Estados Unidos da América

ACASO

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, pois cada pessoa é única e nenhuma substitui outra. Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho, mas não vai só nem nos deixa sós. Leva um pouco de nós mesmos, deixa um pouco de si mesmo. Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada. Essa é a maior responsabilidade de nossa vida, e a prova de que duas almas não se encontram ao acaso."

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Mafera CES. Efeito de diferentes doses de PTH (1-34) sintético sobre o tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia; 2013. Versão Corrigida.

O objetivo do presente estudo foi investigar se doses do hormônio sintético paratireoideano (PTH 1-34), mais baixas que as estudadas previamente apresentam um efeito osteoanabólico ao redor de implantes de titânio. Para isto, realizou-se um estudo paralelo, cego no qual foram utilizados 45 ratos Wistar machos adultos. Sob anestesia geral, todos os animais receberam em uma das tíbias, aleatoriamente escolhida, um implante de titânio comercialmente puro e superfície usinada (4.5 x 2.2 mm). Após a colocação dos implantes, os animais foram sorteados para receber um dos seguintes tratamentos: **grupo 1**: injeções subcutâneas de 40 µg/Kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana (n=15); **grupo 2**: injeções subcutâneas de 2 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana (n=15) e **grupo 3**: injeções subcutâneas do veículo utilizado para a dissolução do hormônio (n=15). 30 dias após a cirurgia os animais foram sacrificados, as peças contendo o implante e o osso circundante foram removidas e processadas histologicamente para cortes não descalcificados. As lâminas obtidas foram avaliadas em relação aos seguintes parâmetros histométricos, os quais foram expressos em porcentagem: (PTM) proporção de tecido mineralizado na região adjacente ao implante (500µm lateralmente a superfície do implante e fora das roscas); (AO) preenchimento ósseo dentro dos limites das roscas de cada implante e (CD) extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante. Os resultados do presente estudo mostraram que ambas as doses utilizadas influenciaram a região medular apenas para o parâmetro AO ($P=0,0394$). Já para a região cortical, ambas as concentrações de PTH (1-34) utilizadas (Grupos 1 e 2) influenciaram de maneira positiva todos os parâmetros investigados (PTM, AO e CD - $p<0,05$). Dentro dos limites deste estudo concluiu-se que o PTH (1-34) estimulou a formação óssea ao redor de implantes de titânio, mesmo em doses baixas.

Palavras chave: PTH 1-34. Implantes. atividade osteoanabólica.

ABSTRACT

Mafrá CES. Effect of different doses of synthetic PTH (1-34) on bone around implants inserted in rats. ratos [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de odontologia; 2013. Versão corrigida.

The aim of this study was to investigate whether doses of synthetic parathyroid hormone (PTH 1-34), lower than the previously studied, have an osteoanabólic effect on bone around titanium implants. A blind parallel study was conducted and used 45 adult male Wistar rats. Under general anesthesia, all the animals received in a randomly chosen tibia a titanium implant (4.5 x 2.2 mm). After implant placement, the animals were randomized to receive one of the following treatments: group 1: subcutaneous injections of 40 µg / kg of synthetic PTH (1 -34) three times per week (n=15); group 2 subcutaneous injections of 2 µg / kg of synthetic PTH (1-34) three times per week (n = 15); group 3: vehicle injections required for hormone dissolution (n = 15). Thirty days after surgery, the animals were sacrificed and specimens containing the implant and the surrounding bone were removed and processed for histological non-decalcified sections. The sections obtained were evaluated according to the following histometric parameters (presented as percentage): proportion of mineralized tissue in the region adjacent to the implant (500µm laterally to the implant surface and out of the threads (PTM), bone filling within the limits of the threads(AO) and bone-to-implant contact (BIC). For the cortical region, all parameters were positively affected by both hormone concentrations and Groups 1 and 2 presented similar results that were significantly higher than the results of control group (group3) ($p < 0.05$). Similar results were observed for the parameter AO in the cancellous region ($p = 0.0394$). Within the limits of this study, it can be concluded that PTH (1-34) stimulates bone formation around titanium implants, even at low doses

Keywords: PTH (1-34). Implants. Osteoanabolic activity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Fisiologia do tecido ósseo e Biologia do reparo ósseo	13
2.2 Fisiologia do PTH e do PTHrp	18
2.3 Plausibilidade biológica do PTH (1-34).....	21
3 PROPOSIÇÃO	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Características da amostra.....	27
4.2 Delineamento experimental.....	27
4.3 Procedimento cirúrgico	28
4.4 Processamento histológico e Análise histométrica.....	29
5 RESULTADOS.....	32
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

Os implantes dentários são extremamente importantes para que haja a recuperação de aspectos funcionais e estéticos nos pacientes (Hutton et al., 1995). A qualidade do osso pode afetar diretamente o tratamento com implantes dentários, uma vez que é bem estabelecido que a estabilidade primária e o travamento são importantes no que diz respeito à osseointegração, carregamento protético e capacidade de assimilar cargas mastigatórias futuras (Brånemark, 1983).

Várias alternativas tem sido estudadas para otimizar o tratamento com implantes, tais como, tratamentos na superfície dos implantes, modificações na forma do corpo e no desenho das espiras (Piattelli et al., 2011), entretanto, pouco tem sido estudado no sentido de melhorar a resposta osteoanabólica por parte do paciente. É amplamente reconhecido na literatura científica que o PTH 1-34 tem efeito osteoanabólico quando aplicado de maneira intermitente (Lindsay et al., 2006; Silva et al., 2011). O mesmo tem sido muito estudado como alternativa viável para o tratamento da osteoporeose e de pacientes com alto risco de fratura (Rubin et al., 2003). Estudos em ratos fêmeas ovariectomizadas, já demonstraram que o PTH (1-34) atua mesmo em deficiência de estrógeno (Shirota et al., 2003), e presença de cigarro (Lima et al., 2013), mas falha em estimular a osseointegração na presença de diabetes (Kuchler et al., 2011). Em trabalho realizado em ratos diabéticos Kuchler et al. (2011), demonstraram que o diabetes pode produzir uma característica que impede a resposta ao PTH 1-34, o que, conseqüentemente torna a presença de diabetes crítica para pacientes em tratamento para melhorar a resposta osteoanabólica. Pode-se inferir que utilizado de modo intermitente, o PTH (1-34) (paratormônio) pode ter utilidade quando implantes dentários forem inseridos em ossos com perda óssea trabecular e melhorar os resultados clínicos.

Apesar destes interessantes achados, os estudos em animais têm utilizado dosagens baseadas nos estudos de carcinogênese em ratos (Vahle et al., 2002; Jolette et al., 2006), as quais são cerca de 100 a 200 vezes mais altas que as doses utilizadas clinicamente em humanos. Os estudos clínicos têm utilizado aplicações diárias de 20µg/dia (Neer et al., 2001) ou 40µg/dia (Body et al., 2002) de PTH (1-34) (valores em torno de 0,3 a 0,7 µg/kg/dia).

Dessa forma, o intuito do presente estudo foi observar alterações anabólicas ósseas em animais, utilizando doses mais próximas às doses aprovadas para a utilização em humanos (20µg/dia).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia do Tecido Ósseo e Biologia do Reparo Ósseo

O esqueleto é uma estrutura mineralizada, composta por células, vasos e cristais de hidroxiapatita. Os processos de diferenciação celular que constituem o esqueleto são regulados por genes, que primeiro estabelecem um padrão estrutural em forma de cartilagem e mesenquima e então é substituído por osso através da diferenciação dos osteoblastos (Wellik; Capecchi, 2003), que são células responsáveis pela mineralização da matriz óssea.

Os ossos e cartilagens possuem muitas funções, como a função estrutural, dando suporte e proteção aos órgãos internos assim como para inserção da musculatura e para locomoção. Além disso, o esqueleto tem uma função metabólica servindo como uma reserva de cálcio e fosfato contribuindo para a manutenção da homeostase (Hadjidakis; Androulakis 2006). Apesar da aparência estática, sabe-se que o tecido ósseo está em constante remodelação e que este fenômeno, é fundamental para a sua manutenção (Eriksen., 2010). A remodelação é o processo através do qual a estrutura óssea é renovada, permitindo a manutenção da forma, qualidade e tamanho do esqueleto. Dessa forma, a manutenção da massa óssea depende da ação coordenada entre osteoclastos que reabsorvem a matriz óssea e tem origem hematopoiética e células apositoras de origem mesenquimal, os osteoblastos. Durante estes fenômenos, alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz óssea e são denominados como osteócitos.

Hauge et al. (2001) descreveram em estudo histológico, uma região referida como compartimento de remodelação óssea (BRC-Bone Remodeling Compartment), que está intimamente relacionada com a remodelação do osso medular (esponjoso). Esta cavidade estreita é forrada por células achatadas (provavelmente células osteogênicas) no seu lado medular, formando uma cobertura que parece estar conectada a células osteogênicas na superfície quiescente do osso e, no seu lado interno, pela superfície que está sendo remodelada. O conjunto de células que comanda a remodelação óssea é denominado Unidade Óssea Multicelular, (BMU-

Bone Multicellular Unit), que compreende osteoclastos, osteoblastos e osteócitos no interior de uma cavidade de remodelação óssea. Penetrando esta cavidade, e completando os elementos participantes da BMU, há capilares que servem de fonte de nutrição para estas células. Os osteócitos são células importantes na remodelação e reparo ósseo uma vez que podem identificar microtrincas e esforço mecânico e responder a mudanças hormonais no meio ósseo, para essencialmente desencadear a remodelação (Everts et al., 2002; Bonewald, 2007). Quando os osteoblastos tornam-se osteócitos começam a expressar diversas moléculas incluindo DMP1 (Dentin Matrix acidic Phosphoprotein1), que é crítica para uma apropriada mineralização óssea, e esclerotina, que controla a formação óssea e metabolismo de fosfato (Bonewald, 2006).

De acordo com Everts et al, (2002), as células osteogênicas iniciam o processo de reabsorção, atraem osteoclastos e junto com as células osteogênicas contíguas, começam a formação do teto do BRC. Através deste processo de remodelação, o osso é gradualmente substituído. A remodelação óssea é iniciada pela ativação da reabsorção óssea, com a retração das células osteogênicas seguida pelo recrutamento de preosteoclastos para formar osteoclastos maduros que escavarão a superfície do osso. Essa fase de reabsorção dura 2-4 semanas em humanos, e é seguida pelo novo preenchimento das cavidades ósseas por células da linhagem osteoblástica. Ao final da formação óssea, que leva 2-3 meses em humanos, a maioria dos osteoblastos morre por apoptose, poucos permanecem como células osteogênicas na superfície quiescente do osso e alguns permanecem aprisionados na matriz óssea como osteoblastos diferenciados, chamados de osteócitos .

Alguns hormônios participam da regulação do homeostase do tecido ósseo. O paratormônio (PTH) é o mais importante regulador da homeostase de cálcio, mantendo a concentração de cálcio no sangue através do estímulo à reabsorção, aumentando a reabsorção de cálcio tubular renal e a produção de calcitrol. Pode estimular tanto a reabsorção em doses contínuas tanto quanto a aposição em doses intermitentes. O calcitrol é essencial para melhorar a absorção intestinal de cálcio e fosfato, que desta maneira promove mineralização óssea. Calcitonina inibe a atividade de osteoclastos bem como a secreção de enzimas proteolíticas através de seus receptores nos osteoclastos. Alguns glicocorticóides também exercem tanto

papel estimulatório quanto inibitório nas células ósseas. Além disso, glicocorticóides sensibilizam células ósseas a reguladores da remodelação, que aumentam o recrutamento de osteoclastos (Kim et al., 2003).

A regulação local da remodelação e reparo ósseo é feita através do mecanismo OPG-RANK-RANKL. O RANKL, expresso na superfície dos preosteoblastos/células tronco, liga-se ao RANK nas células precursoras de osteoclastos, e isto é crítico para a diferenciação, fusão em células multinucleadas e sobrevivência de osteoclastos (Suda et al., 1999). A OPG inibe todo o sistema bloqueando os efeitos do RANKL (Simoneti et al., 1997)

Células das linhagens osteoclástica e osteoblástica são responsivas a vários hormônios sistêmicos, como PTH e também a 1,25 dihidroxivitamina D3, além disso, a múltiplos fatores locais β (TGF- β); família de fatores que inclui proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que estão sob controle hormonal. Estes fatores locais são sintetizados por osteoblastos e osteoclastos e seus precursores (Jilka, 2007).

BMP's tem um forte impacto na diferenciação dos osteoblastos. Ainda que a osteogênese seja normalmente iniciada em ratos deficientes em BMP's, nenhuma cavidade medular, osso trabecular ou cortical são observados. Portanto, BMP's (notavelmente BMP 2 e 4) são cruciais para a progressão e maturação da osteogênese, a qual dependeria do fator de transcrição Osterix que atua na sequência de outro fator de transcrição, o runx2 (Runt related transcription factor 2) (Nakashima et al., 2002).

Vários fatores que controlam a osteoblastogênese e a formação óssea parecem agir através de vias de sinalização comuns, os quais incluem TGF- β /BMP/Smad, mitogen-activated protein Kinase (MAPK) e vias Wnt/ β -catenina, assim como a ativação de runt-related transcription factor denominado Runx2 (Vaes et al., 2006; Jilka, 2007). O Runx2 regula a proliferação celular, integra inúmeras vias de sinalização e controla a expressão de muitos genes (ex: genes que codificam osteocalcina, VEGF, RANKL, esclerotina e proteína da matriz dentinária 1(DMP1), por toda maturação osteoblástica (Otto et al., 2003; Lian et al., 2006).

O Osterix (Late Osteogenic transcription factor) é outro fator de transcrição essencial para formação de preosteoblastos a partir de progenitores multipotentes

(Nakashima et al., 2002), agindo como um regulador mestre da osteogênese tardia, inibindo a condrogênese (Baek et al., 2009).

A formação óssea começa quando células mesenquimais formam condensações e, na maioria delas, o processo endocondral procede a regeneração óssea. Portanto as células tornam-se primeiro condrócitos, os quais formam o pericôndrio nas bordas das condensações. Condrócitos são células com forma específicas, secretam uma matriz rica em colágeno tipo 2a1 (sulfato de condroitina proteoglicano1), e geralmente expressa um programa genético característico dirigido pela transcrição dos fatores Sox9 e Runx2. Sox9 é essencial para converter células condensadas em condrócitos e, além disso, age em cada estágio da diferenciação de condrócitos (Akiyama et al., 2002). Entretanto, o Runx 2 direciona condrócitos proliferativos a se diferenciar em células hipertróficas, além disso, Runx2 é altamente expresso em células pericondriais e em osteoblastos. De fato, Runx2 é um regulador mestre na osteogênese inicial, animais Runx2^{-/-} (animais com inibição da expressão do Runx2) morreram sem formação óssea (Baek et al., 2009).

Outro grupo de moléculas altamente importantes em muitos aspectos da função celular, particularmente a osteogênese, são as Wnt's, que compreendem uma família de proteínas secretadas, ricas em cisteína. Várias Wnts, como Wnt1, 3a, 4, 5, 10b e 13, tem um papel significativo na formação óssea (Liu et al., 2008). A sinalização de Wnts tem as três maiores funções na linhagem de células osteoblásticas: ditar a especificação de osteo/condroprogenitores, estimular a proliferação osteoblástica e melhorar a sobrevivência dos osteoblastos e osteócitos. No interior da BMU, Wnts influenciam a maturação dos osteoclastos pela regulação dos níveis de RANKL nos osteoblastos (Kloen et al., 2003).

Sistemicamente, o mais importante regulador da homeostase de cálcio é o paratormônio (PTH), mantendo a concentração de cálcio no sangue através do estímulo à reabsorção aumentando a reabsorção de cálcio tubular renal e a produção de calcitriol. Pode estimular tanto a reabsorção em doses contínuas tanto quanto a deposição em doses intermitentes (Kim et al., 2003). Seu uso tornou-se importante em pacientes com osteoporose e é extremamente importante entender seu mecanismo de ação tanto celular quanto molecular. Dessa forma, diversos estudos clínicos, laboratoriais e em animais tem sido feitos para elucidar seu mecanismo de

ação, para que o mesmo possa ter outras utilizações, como por exemplo, em pacientes que passaram por cirurgias para inserção de implantes dentários e que tem algum comprometimento sistêmico ou fazem uso de inibidores de reabsorção.

Reparo ósseo é um processo pelo qual osso danificado, como após um trauma ortopédico, ou ainda após uma cirurgia, por exemplo, se recompõe. É um processo que envolve uma inter-relação de complexos eventos moleculares e celulares para formar novo osso. Em contraste com a remodelação que leva um longo período para se completar em sítios aleatórios pelo esqueleto, o reparo ocorre em um período mais curto e em um sítio específico, onde ocorreu a injúria. O processo de reparo basicamente recapitula a formação normal do osso durante a embriogênese, exceto pela inflamação, pelo limitado número de osteoprogenitores disponíveis, bem como pelo estímulo mecânico que influencia largamente a cicatrização óssea (Deschaseaux et al., 2009).

Imediatamente após a injúria, forma-se um coágulo sanguíneo, proteínas provenientes dos vasos e das células injuriadas iniciam uma série de eventos que levam à formação de uma rede de fibrina. Plaquetas formam agregados e interagem com a rede de fibrina para produzir coágulo sanguíneo, que efetivamente obstrui os vasos rompidos e interrompe o sangramento. Após alguns dias, ocorre a fibrinólise que dará espaço à formação de um novo tecido. Neutrófilos e macrófagos migram para o interior da ferida e, além de “limpar” a ferida, também liberam fatores de crescimento, que posteriormente promovem a migração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais (Lindhe et al., 2010). No sítio onde houve a injúria, a nova formação óssea é iniciada pela condensação de células tronco mesenquimais capazes de se diferenciar em células osteogênicas (Deschaseaux et al., 2009; Arvidson et al., 2011). As células mesenquimais começam a proliferar e a depositar componentes da matriz no meio extracelular e um novo tecido, denominado tecido de granulação, irá substituir o coágulo. O tecido de granulação eventualmente contém macrófagos e um grande número de células semelhantes aos fibroblastos, bem como numerosos vasos sanguíneos recém formados. A intensa síntese de componentes é chamada de fibroplasia e a formação de novos vasos é chamada de angiogênese. A combinação da fibroplasia e da angiogênese dá origem a um tecido conjuntivo provisório (Lindhe et al., 2010). Neste processo, ocorre a liberação de diversos mediadores químicos pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral- α

(TNF- α), e interleucinas 1 e 6 dos agregados de plaquetas, células endoteliais e macrófagos. A transição para um tecido ósseo ocorre ao longo dos vasos sanguíneos, uma vez que células osteoprogenitoras migram e concentram-se nestes, transformando-se então em osteoblastos que produzem uma matriz de fibras colágenas que apresenta um modelo imaturo, o osteóide. O processo de mineralização inicia-se na sua porção central. Os osteoblastos continuam a depositar osteóide e algumas células ficam aprisionadas na estruturas mineralizadas, são os osteócitos. As trabéculas do osso imaturo é formada ao redor dos vasos e tornam-se espessas pela deposição contínua de osso imaturo, Os osteócitos são agrupados e os ósteons primários são organizados. O processo de formação inicial do osso é bastante rápido e dentro de poucas semanas todo o coágulo foi substituído pelo osso imaturo também denominado osso esponjoso primário.

Os osso imaturo e seus ósteons primários são gradativamente substituídos por osso lamelar e osso medular e ósteons secundários, ocorrendo então a corticalização, através do processo de modelamento e remodelamento acima descrito. Embora o osso esteja cicatrizado, os tecidos do sítio continuarão a se adaptar as demandas funcionais com o tempo (Lindhe et al., 2010). Osso comprometido pode formar-se em casos de perdas grandes de tecido ósseo, vascularização deficiente, ou associado com o decréscimo do número de osteoprogenitores com ocorre em pacientes idosos e diabéticos. E todos estes cenários, novas terapias que podem otimizar esse processo de cicatrização são importantes, como a utilização de doses intermitentes de PTH 1-34, por exemplo.

2.2 Fisiologia do PTH e do PTHrp

O PTH é um hormônio produzido pela glândula paratireóide enquanto que o PTHrp (PTH related protein) é um homólogo parcial expresso por tecidos normais como o fígado e o osso. Esta homologia estrutural parcial está no interior das sequências 1-13 e 34-39 destes polipeptídeos, e embora pequena, é responsável pela capacidade de ambas moléculas ligarem-se ao mesmo Receptor acoplado a proteína-G que possui sete domínios transmembrana (Datta; Abou-Samra, 2009).

As ações esqueléticas do PTH são complexas, uma vez que este hormônio pode estimular tanto formação óssea osteoblasto-dependente, quanto mediar reabsorção-osteoclasto dependente; sendo que o efeito depende do tipo de administração. A exposição intermitente leva a uma reação que aumenta a formação óssea, enquanto a administração contínua ou sua liberação fisiológica leva a reabsorção (Jilka, 2007; Silva et al., 2011).

Tradicionalmente, o PTH é conhecido como catabólico ao esqueleto humano, uma vez que sua principal função fisiológica é manter o nível de íons cálcio no sangue. A atividade do PTH é exercida através de um mecanismo indireto. O PTH se liga aos receptores nos osteoblastos fazendo com que expressem o RANKL (RANK ligante). O RANKL ativa receptores nas células pré-osteoclastos, fazendo com que elas se tornem osteoclastos multinucleados maduros. Os osteoblastos também produzem a Osteoprotegerina (OPG), por vezes denominado fator inibidor da osteoclastogênese, citocina que inibe a reabsorção óssea, ligando-se ao RANKL antes de este se ligar ao pré-osteoclastos, inibindo sua diferenciação em osteoclastos maduros (Guyton; Hall, 2011).

Os principais órgãos alvo do PTH são o fígado e os ossos (ell-Hajj et al., 1989). Embora alguns autores como Langub et al. (2001) e Dempster et al. (2005), sugeriram a presença do receptor para PTH em osteoclastos, a maior parte dos trabalhos considera que a contínua administração do PTH e PTHrp induz reabsorção pela ativação indireta de osteoclastos (Dempster et al., 2005). Chambers et al. (1985) demonstraram em experimento *in vitro* que quando osteoclastos são separados fisicamente de osteoblastos, os mesmos não respondem ao PTH, entretanto não existe consenso a esse respeito.

O entendimento dos papéis fisiológicos, celulares e moleculares do PTH e do PTHrp começou quando o seu receptor PTHR1 foi clonado no início dos anos 90 (Abou-Samra et al., 1992). A região amino-terminal do PTH 1-34 e do PTHrp interage com o J-domain(Domínio-J), a porção funcional do receptor que contém os sete terminais transmembrana e os loops conectantes. Enquanto que a porção carboxy-terminal do PTH e do PTHrp conecta-se ao domínio extracelular N do receptor promovendo a associação do terminal amino biologicamente ativo do ligante J-domain (Hoare et al., 2001).

Em osteoblastos, a ligação do PTH ao PTHr1 ativa a adenilciclase e fosfolipase com formação de cAMP (AMP cíclico) e subsequente aumento na concentração de cálcio intracelular (Cranney et al., 2006), bem como ativa a proteína C Kinase (PKC) pela vias fosfolipase C (PLC) dependente e independente. Essas vias levam à ativação da formação óssea pelos osteoblastos, e também à produção do receptor Fator Ativador Nuclear $\kappa\beta$ ligante (RANKL) e fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF- Macrophage Colony-stimulating factor) que são necessários para a formação de osteoclastos e reabsorção óssea (Aslan et al., 2012). Além disso, a OPG é também induzida em osteoblastos. A OPG funciona como um bloqueador de receptor, ligando-se ao RANKL e previne a ligação do RANKL ao RANK nos precursores de osteoclasto, inibindo portanto a formação de osteoclastos, e consequentemente regulando a reabsorção óssea (Huang et al., 2004), ou seja, em condições fisiológicas, o PTH atua tanto em formação quanto em reabsorção.

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem mostrado que a exposição intermitente ao PTH ou PTHrp aumenta a expressão de Runx2 em osteoblastos (Krishnan et al., 2003; Lozano et al., 2009, 2011; de Castro et al., 2012;). O Runx2 é um fator de transcrição que guia a diferenciação de progenitores mesenquimais à células de linhagem osteogênica e à osteoblastos bem como à manutenção da maturidade dos osteoblastos (Vaes, 2006). Além disso, a administração intermitente de PTH e PTHrp, aumenta a produção de osteocalcina, um fator diferenciador tardio (late osteoblast differentiation factor), que é detectado no plasma e é usado como um marcador de formação óssea (Stewart et al., 2000; Horwitz et al., 2003).

O aumento no número de osteoblastos não se deve somente ao aumento na atividade e recrutamento de novos osteoblastos, mas também ao aumento na sobrevivência das células. Estudos *in vitro* demonstraram uma via envolvendo sinalização PKA mediada por AMPc e subsequente fosforilação e inativação de uma proteína apoptótica denominada Bad (Bellido et al., 2003), consequentemente inibindo a apoptose e aumentando o número de células viáveis, interferindo de maneira positiva na capacidade osteoanabólica do PTH 1-34.

2.3 Plausibilidade biológica e estudos que suportam a utilização do PTH

PTH (1-34) é uma formulação recombinante contendo a parte biologicamente ativa dos primeiros 34 amino-ácidos do hormônio paratireóideo (PTH 1-84) e é uma droga aprovada pela FDA (US food and drug administration) para o tratamento da osteoporose (Chan; McCauley, 2013).

A lógica para considerar o PTH como um potencial agente para o tratamento de osteoporose teve origem em observações clínicas de pacientes com hiperparatireoidismo primário, os quais apresentavam grande aumento da massa óssea ao invés de diminuição da massa óssea, já que o paratormônio em condições fisiológicas controla a calcemia através da reabsorção óssea (Rubin et al., 2003).

Antes mesmo disso, a ação osteoanabólica do extrato da glândula paratireóide foi descrita em ratos, guinea pigs, gatos e coelhos no início dos anos 30 (Pugsley, Selye, 1993). Sato et al. (2000), em trabalho realizado com macacos cynomolgus, compararam a aplicação de PTH (1-34) por 18 meses e 12 meses e chegaram a conclusão que a aplicação intermitente de PTH se traduz em um aumento da resistência óssea. Concluíram ainda que a resistência óssea persistiu nos animais tratados apenas por 12 meses em valores semelhante aos animais tratados por 18 meses, sugerindo que os efeitos do PTH (1-34) permanecem mesmo após o tratamento ser interrompido.

Valenta et al. (2005) realizaram trabalho com ratos fêmea ovariectomizadas, em que um grupo recebeu uma dose de 80 µg/Kg de PTH (1-34) e outro grupo recebeu PTH (1-34) associado a OPG (osteoprotegerina) três vezes por semana. Neste trabalho, foi demonstrado que o PTH (1-34) aumentou a massa óssea mesmo em ratos idosos, sem afetar a distribuição da densidade mineral e as características das partículas minerais da matriz óssea. A associação do PTH (1-34) à OPG não otimizou os resultados, mas melhorou a homogeneidade da estrutura óssea.

Além disso, alguns estudos de dose resposta indicaram que a administração intermitente em ratos adultos diminuiu a prevalência de apoptose na esponjosa secundária de fêmur distal. O decréscimo na apoptose de osteoblastos foi

positivamente correlacionado com o aumento da densidade óssea tanto na espinha quanto em membros posteriores (Jilka et al; 1999; Bellido et al.,2003).

Injeções diárias do hormônio da glândula paratireóide (PTH) terminal amino peptídeo (1-34), ou da proteína completa, PTH 1-84, aumenta a massa óssea e reduz a incidência de fratura em mulheres no pós menopausa, em homens idosos e em mulheres com osteoporose glicocorticóide-induzida (Hodsman et al., 2005). Esses efeitos são ativados pela exposição repetida do esqueleto ao PTH já que o *clearance* do PTH ocorre 2-3 dias após a administração do mesmo (Frolik et al., 2003; Lindsay et al., 2006).

Estudos *in vitro* tem demonstrado que pulsos curtos de PTH ou peptídeos N-terminal, PTHrp, aumentam a proliferação das células osteoblásticas subconfluentes, enquanto seu efeito em culturas de células com alta densidade foi inibitório, neste mesmo estudo, o efeito *in vivo* foi demonstrado utilizando um modelo, em que ossículos ectópicos derivado de células do estroma da medula óssea foram implantados em ratos, tratados ou não com administrações diárias de PTH (Datta et al., 2007).

Também ocorre um estímulo na formação óssea tanto no lado periosteal como no lado endosteal do cortex. Em ratos, a aposição cortical hormônio induzida de osso resulta em um aumento no diâmetro da cortical externa do osso associada com marcantes melhorias nas propriedades biomecânicas (Sato et al., 2002).

Observou-se, em um trabalho em articulações de cães, que embora o PTH 1-34 tenha melhorado histologicamente a osteointegração de próteses implantadas, não houve melhoria na fixação mecânica inicial (Daugaard et al., 2012). Além disso, Neer et al. (2001), em um ensaio controlado randomizado com 1637 mulheres no pós-menopausa, encontraram um aumento na densidade mineral óssea e uma redução na incidência de fraturas vertebrais e não vertebrais em um tratamento com 20µg ou 40 µg de PTH (1-34) sintético pelo período de 19 meses.

Um estudo comparativo realizado com ratos em grupos com idades distintas revelou importantes diferenças relacionadas à idade, aos níveis celular e molecular, nas ações do PTH sobre o osso. O PTH intermitente levou a um aumento no número de trabéculas ósseas em ratos jovens e nenhum efeito no crescimento

ósseo longitudinal, enquanto em ratos maduros houve apenas o aumento na espessura das trabéculas .

Ao nível celular, houve um aumento no número de osteoblastos em ratos jovens em oposição ao aumento na atividade osteoclástica predominante visto em ratos maduros (Friedl et al., 2007). Além disso, Mair et al. (2009) realizaram um estudo com implantes inseridos em tíbias de ratos wistar, sendo 20 ratos fêmea com idade de 2 meses e outros 20 com idade de 8 meses. Neste estudo, foi utilizada a dose de 60µg/Kg de PTH (1-34), três vezes por semana, durante quatro semanas. Após a análise histomorfométrica, concluiu-se que a ação do hormônio foi mais efetiva em ratos adultos do que em ratos jovens sugerindo que a idade interfere na ação do PTH (1-34).

Almagro et al. (2012), em um trabalho em coelhos com osteoporose glicocorticoide-induzida, encontraram um aumento significativo na área de contato osso-implante nos animais que receberam PTH (1-34) comparada com os controles ou animais osteoporóticos que receberam o veículo utilizando uma dose diária de 10 µg/kg.

Por outro lado, em ratos diabéticos, de acordo com Kuchler et al. (2011), a aplicação de PTH (1-34), intermitente falhou em estimular a osteointegração, sugerindo que a hiperglicemia pode ter um impacto negativo na capacidade terapêutica deste hormônio.

Shirota et al. (2003), em um estudo com fêmeas de ratos ovariectomizadas, realizaram a aplicação intermitente de PTH 1-34 com doses de 30 µg/Kg e concluíram que o PTH (1-34) parece favorecer a formação óssea pós-operatória aumentando o volume ao redor de implantes, sugerindo dessa forma, que administração do hormônio pode ser útil quando implantes dentários forem inseridos em mandíbulas com perda óssea trabecular, e portanto melhorando os resultados clínicos.

Além disso Tokunaga et al. (2011) induziram a periodontite através de ligadura em ratos por 20 dias. Após a remoção da ligadura, foram injetadas na gengiva vestibular dos ratos alta dose de 5µg em 50 µl e baixa dose de 1µg em 50 µl de PTH (1-34) três vezes por semana e chegou-se à conclusão de que a

administração tópica de PTH (1-34) pode aumentar a massa óssea alveolar e pode ser efetivo para a regeneração do tecido periodontal.

Vasconcelos et al. (2013) utilizaram um modelo animal no qual foram criados defeitos na face vestibular da raiz distal de primeiros molares inferiores de ratos wistar machos com 8 semanas. Neste estudo os animais posteriormente receberam 40µg/Kg de PTH (1-34) a cada dois dias, e foi concluído que a aplicação intermitente de PTH 1-34 leva a uma melhoria no processo de cicatrização periodontal comparado ao animais não tratados.

A ação do PTH (1-34), também foi estudada em pacientes com periodontite. Bashutski et al. (2010), realizaram um estudo com 40 pacientes com periodontite crônica severa e que passaram por cirurgia periodontal. Estes pacientes receberam em seguida, injeções de teriparatide com 20µg/d, três dias após a cirurgia prosseguindo até seis semanas. Outro grupo, recebeu apenas placebo e chegou-se à conclusão de que, comparado ao placebo, o teriparatide, PTH (1-34), está associado com melhorias nos parâmetros clínicos, grande resolução dos defeitos do osso alveolar e cicatrização acelerada das injúrias ósseas na cavidade oral.

A osteonecrose da mandíbula associada ao uso de drogas inibidores de reabsorção é um efeito colateral de relevante significância (Khosla et al., 2007). Devido ao seu efeito osteoanabólico, o PTH (1-34) tem sido usado para tratar pacientes com osteonecrose da mandíbula, com resultados favoráveis (Harper; Fung, 2007). O PTH (1-34) promove diferenciação e atividade de osteoblastos e isto parece ser benéfico, devido ao papel osteoanabólico da aplicação intermitente de PTH (1-34), contra um quadro de supressão do *turnover* comum ao tratamento de longo prazo com o uso de bifosfonados (Narongroeknawin et al., 2010), revertendo dessa forma, um efeito colateral relacionado aos bifosfonados.

Por outro lado, o paratormônio está associado ao aparecimento de osteosarcoma e outras lesões ósseas proliferativas. Em estudo conduzido por Vahle em 2002; houve aparecimento de osteosarcoma de uma maneira dose-responsiva em todos os grupos utilizados no trabalho. Entretanto a menor dose utilizada nos trabalhos de Vahle (5µg/Kg) ainda é 3,4 vezes a dose utilizada em humanos. Tratam-se de eventos importantes de serem investigados pois os mesmos são sinais de hiperparatireoidismo. Além disso, em estudo em macacos, o tratamento com

rhPTH (1-34) reduziu os níveis plasmáticos de PTH (1-84) em aproximadamente 50% (Brommage et al., 1999).

Piemonte et al. (2009), em estudo com 10 mulheres em fase pós menopausa com osteoporose, investigou a ação do PTH (1-34) e PTH (1-84) nos níveis de cálcio ionizado, 1,25 dihidroxivitamina D e excreção de cálcio urinário, não encontrando diferenças significantes entre os dois peptídeos. Além disso o estudo investigou a ação de uma dose única dos hormônios nestas pacientes e a hipercalcemia e hipercalcúria não foram significantes. Entretanto os autores relatam que tratamentos por períodos maiores podem levar a hipercalcemia e hipercalcúria transitórios, entretanto não afetando a função renal dos pacientes.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial osteogênico de doses mais baixas de PTH (1-34) que as utilizadas em estudos prévios em ratos, e mais próximas às administradas clinicamente em pacientes, sobre a reparação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

Foram utilizados 45 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 280 e 330g. Os animais serão mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

4.2 Delineamento Experimental

O presente estudo teve um desenho experimental paralelo em que os 45 ratos serão aleatoriamente divididos em 3 grupos após a instalação de um implante de titânio em uma das tíbias:

Grupo 1 – 15 ratos que receberam injeções subcutâneas na região dorsal de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34), três vezes por semana, durante 30 dias, após a inserção dos implantes (Barros et al., 2003)

Grupo 2 – 15 ratos que receberam injeções subcutâneas na região dorsal de 2 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana, durante 30 dias, após a inserção dos implantes.

Grupo 3 – 15 ratos que receberam apenas o veículo necessário para a dissolução do hormônio (1% de ácido acético dissolvido em água) num volume semelhante ao utilizado nos grupos anteriores.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Todos os animais utilizados no estudo receberam um implante do tipo osseointegrável, rosqueável, de titânio comercialmente puro da marca INP com as seguintes dimensões: 4,5 mm de comprimento e 2,2 mm de diâmetro. Antes da cirurgia, os animais foram pesados, e, de acordo com seu peso corpóreo, foram anestesiados com solução de ketamina (1ml/Kg/IM) (Francotar[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil) e cloridrato de xylasina (0,3 ml/kg/IM) (Virbaxil[®]; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, S.P., Brasil). Uma solução de álcool iodado foi utilizada para a antissepsia do campo operatório. Com uma lâmina de bisturi número 15, foi realizada uma incisão de aproximadamente 1,5 cm, proporcionando a exposição do tecido muscular, que foi divulsionado, permitindo o acesso a tibia do animal.

Utilizando-se um motor elétrico e um contra-ângulo redutor 16:1, um leito bi-cortical com a dimensão final de 2 mm de diâmetro foi preparado para a inserção dos implantes. Os leitos foram irrigados com solução salina fisiológica para a remoção de fragmentos que possam prejudicar a adaptação do implante.

Os implantes foram manualmente rosqueados até que ficassem estabilizados nas duas corticais ósseas. O tecido muscular foi reposicionado e suturado em massa com fio absorvível (Vycryl, Ethicon) e o tecido superficial com fio de mononylon (Ethicon). Uma solução de álcool iodado foi novamente aplicada sobre a área operada.

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

4.4 Processamento histológico e análise histométrica

Os animais foram sacrificados 30 dias após a inserção dos implantes através de sobredose de anestésico (Ketamina 148 mg/Kg associada à Xylasina 30 mg/Kg). Após o sacrifício dos animais, os espécimes (implante + osso circundante) foram removidos em blocos (implante + osso circundante) e colocados em formalina neutra tamponada a 4% por 48 horas. Após a fixação e lavagem em água, os blocos foram desidratados em solução de álcool etílico em escala ascendente de concentração (60-100%), sob constante agitação.

Os espécimes foram incluídos em resina metilmetacrilato (Fluka Chemie AG, Buchs, Suíça). Os cortes longitudinais foram realizados perpendicularmente ao implante. Secções de 500 µm foram obtidas com um micrótomo (Exakt Saw 300 CP band system, Exakt Technologies, Oklahoma, OK, E.U.A) equipado com uma lâmina de tungstênio. Em seguida, as secções foram coladas às lâminas de acetato opaco, desgastadas e polidas com o uso de uma politriz (Knuth-Rotor-3, Struers, Copenhagen, Dinamarca), até uma espessura aproximada de 80 µm e coradas com a técnica Stevenel's Blue e Alizarina (Maniopoulos et al., 1986) pela qual torna-se fácil diferenciar os tecidos mineralizados (corado pelo vermelho Alizarina) dos não mineralizados (corado pelo Stevenel's Blue) (fig 4.1).

Os cortes centrais de cada peça foram utilizados para a análise histométrica utilizando um microscópio de luz com objetivas que permitirão aumento de 04 a 10 vezes (Axioskop 2 Plus, Carl-Zeiss, GMBH, Alemanha) e um programa para análise de imagens (Image J). Os seguintes parâmetros foram avaliados (conforme Fig. 4.3).

- 1- Proporção de tecido mineralizado (PTM) (em porcentagem) fora das roscas, na região adjacente ao implante (500µm lateralmente a superfície do implante) por toda a extensão do mesmo.
- 2- Área de tecido mineralizado dentro dos limites das roscas de cada implante (AO) (em porcentagem) .
- 3- Extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (CD) (em porcentagem). Os resultados serão obtidos separadamente para a região cortical e medular (Fig. 4.1)

Figura 4.1 – Esquema representando as áreas que foram avaliadas em cada corte histológico

Figura 4.2 - Esquema representando os parâmetros histométricos avaliados

Figura 4.3 - Tela do Programa Image J, utilizado para a análise histométrica, representando os parâmetros avaliados

5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo mostraram que, para o parâmetro histométrico PTM na região cortical, ambas as concentrações de PTH (1-34) utilizadas (Grupos 1 e 2) influenciaram de maneira positiva a densidade óssea, quando comparados ao grupo Controle (Grupo 3) ($p < 0,05$) (ANOVA / pós-teste Bonferroni, $\alpha = 5\%$). Já para a região de osso medular, não foram observadas diferenças entre os grupos ($p > 0,05$). Médias representativas de cada grupo, seus respectivos desvios padrão e os resultados da análise estatística podem ser observados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Referente ao parâmetro PTM. Médias representativas de cada grupo, para cada uma das regiões, seguidas de seus respectivos desvios padrão podem ser observadas. As letras representam o resultado da análise estatística e devem ser consideradas por colunas. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ - ANOVA / pós-teste Bonferroni, $\alpha = 5\%$).

	PTM	
	Cortical	Medular
Grupo 1	79,57±5,04 a	10,37±6,69 a
Grupo 2	75,98±7,90 a	12,17±7,10 a
Grupo 3	72,85±5,32 b	10,25±10,2 a
(p)	<0,005	0,1994

Com relação à área óssea no interior das rosca (AO), resultados semelhantes foram observados para a região cortical. O grupo alta dose (grupo 1) e baixa dose (grupo 2) apresentaram resultados semelhantes e superiores numericamente quando comparados ao grupo controle (grupo 3). Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), (ANOVA- pós teste de Bonferroni, $\alpha = 5\%$). Para a região óssea medular também houve diferença entre os grupos ($p = 0,0394$) 1 e 2 em relação ao controle. Médias representativas de cada grupo, seus respectivos desvios padrão podem ser observados na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Referente ao parâmetro AO. Médias representativas de cada grupo, para cada uma das regiões, seguidas de seus respectivos desvios padrão podem ser observadas. As letras representam o resultado da análise estatística e devem ser consideradas por colunas. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ - ANOVA / pós-teste Bonferroni, $\alpha = 5\%$).

AO		
	Cortical	Medular
Grupo 1	74,46 $\pm$ 8,19 a	21,15 $\pm$ 10,7 a
Grupo 2	74,48 $\pm$ 7,30 a	22,24 $\pm$ 9,40 a
Grupo 3	62,52 $\pm$ 7,11 b	15,82 $\pm$ 4,55 b
(p)	< 0,0001	0,0394

O PTH (1-34) também influenciou de maneira positiva o parâmetro CD na região cortical, de maneira semelhante aos parâmetros descritos anteriormente. Médias representativas de cada grupo, seus respectivos desvios padrão e os resultados da análise estatística podem ser observados na tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Referente ao parâmetro CD. Médias representativas de cada grupo para cada uma das regiões, seguidas de seus respectivos desvios padrão podem ser observadas. As letras representam o resultado da análise estatística e devem ser consideradas por colunas. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$ - ANOVA / pós-teste Bonferroni, $\alpha = 5\%$).

CD		
	Cortical	Medular
Grupo 1	74,71 $\pm$ 10,5 a	27,73 $\pm$ 8,40 a
Grupo 2	73,65 $\pm$ 9,85 a	28,43 $\pm$ 8,35 a
Grupo 3	42,99 $\pm$ 21,21 b	23,42 $\pm$ 7,87 a
(p)	<0,0001	0,1699

Figura 5.1 - A fotomicrografia apresentada acima ilustra o resultados obtidos na avaliação histométrica para o grupo 1 - Alta dose (40 $\mu\text{g/Kg}$)

Figura 5.2 - A fotomicrografia apresentada acima ilustra o resultados obtidos na avaliação histométrica para o grupo 2 - Baixa dose (2 $\mu\text{g/Kg}$)

Figura 5.3 - A fotomicrografia apresentada acima ilustra o resultados obtidos na avaliação histométrica para o grupo 3 - Controle

6 DISCUSSÃO

O presente estudo testou a influência do PTH (1-34) sobre a reparação óssea ao redor de implantes de titânio, e adicionalmente, avaliou se uma dose alternativa, mais baixa que a investigada em estudos prévios, também exerceria algum efeito nestes fenômenos biológicos. Os resultados demonstraram um efeito osteoanabólico do PTH 1-34 para ambas as concentrações em todos os parâmetros histométricos investigados i.e. PTM, AO e AC. Além disso, um efeito semelhante foi observado para as duas dosagens experimentais, não havendo diferença estatisticamente significativa entre elas. Este resultado permite especular que doses menores que as utilizadas usualmente nos estudos em ratos podem também favorecer a formação óssea, e que isto pode ter uma implicação clínica futura.

A maioria dos estudos que investigou o PTH (1-34) para os implantes odontológicos teve como foco principal avaliar seu efeito em animais com alterações sistêmicas, como osteoporose (Almagro et al., 2013), envelhecimento (Mair et al., 2009), diabetes (Kuchler et al., 2011) e consumo de cigarros (Lima et al., 2012). Já o presente estudo demonstra que o PTH (1-34) administrado em doses mais baixas que as sugeridas para o tratamento da osteoporose, pode beneficiar até mesmo animais jovens e normo-reativos, o que amplia seu potencial terapêutico para situações além dos eventos sistêmicos que resultam em perda óssea. Nestes estudos, foram utilizadas doses de 10µg/Kg/dia, 60 µg/Kg três vezes por semana e 40 µg/Kg/Três vezes por semana e por períodos que foram de 4 semanas a 20 semanas. Alguns estudos de carcinogênese em ratos (Tashjian; Goltzman, 2008) testaram doses de 1,2 nmol/kg (5 µg/Kg), 7,2 nmol/Kg (30 µg/Kg) e 18,3 nmol/kg (75 µg/kg) do peso corporal. Estes estudos administraram estas dosagens por um período de 6, 20 e 24 meses e foram observadas efeitos colaterais com doses a partir de 30 µg/kg por 20 meses ou mais, sendo que osteosarcoma foi a alteração mais comum, seguida pela hiperplasia osteoblástica focal, osteoblastoma, osteoma e fibrosarcomas esqueléticos sendo que, mesmo a menor dose utilizada, ainda é 3,4 vezes (Subbiah et al., 2010) maior que a dose utilizada no presente estudo.

O presente estudo utilizou doses muito menores (2 µg/Kg), e mais próximas da dose utilizada clinicamente em humanos aprovada pela FDA (20 µg/dia). O cálculo da dose de 2µg/Kg utilizada neste estudo tem como base o princípio

alométrico de transposição de doses que usa uma escala fisiológica comparando animais de vários tamanhos. Tendo como base o fato de que a eliminação de muitas drogas segue princípios fisiológicos compatíveis com a escala alométrica, sabe-se que as dosagens podem ser extrapoladas para diversos animais levando em conta a taxa metabólica de cada espécie (Schneider et al., 2004). Comparado aos trabalhos em animais, os trabalhos em humanos utilizam doses menores que as acima apresentadas e também menor que uma das doses utilizadas em nosso trabalho (40µg/Kg), uma vez que a dose aprovada em humanos é de 20µg/dia, pelo período de 2 anos nos EUA e 18 meses na comunidade européia. Entretanto, o presente estudo sugere um período de administração muito menor que os observados em tratamentos clínicos para a osteoporose. Mais estudos são necessários para confirmar se não haverá problema em humanos e se esse tipo de protocolo de administração consegue benefícios clínicos em humanos, uma vez que para o tratamento de osteoporose o tempo sugerido é maior.

Estudos anteriores seguiram outros protocolos e doses diversas. Mair et al. (2009), utilizaram um modelo animal com ratos, Wistar, fêmeas não ovariectomizadas as quais receberam um implante de titânio em uma das tíbias. Estes animais foram separados em 2 grupos de acordo com a idade dos animais. O grupo de animais jovens continha ratos de 2 meses, já o de animais idosos continha animais de oito meses. O PTH (1-34) influenciou a proporção de tecido mineralizado em ambos os grupos, entretanto, não influenciou o contato osso-implante, embora tendências numéricas possam ser observadas. Os resultados do presente estudo diferiram de Mair et al. (2009) e mostraram uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro CD (tradicionalmente denominado BIC- Bone implant contact). Outra diferença interessante entre os estudos foi que, ao contrário do nosso trabalho onde a melhoria dos parâmetros foi observada principalmente para as corticais nos três parâmetros observados, Mair et al. (2009) encontraram diferença estatisticamente significativa na região medular. Ao avaliar o estudo de Kuchler et al. (2011), observamos que há várias similaridades metodológicas entre seu estudo e o estudo de Mair et al. (2009). Entretanto, no trabalho de Kuchler et al. (2011) não houve resposta ao PTH em animais diabéticos, ou seja, existem fatores que podem interferir nos resultados. Estes fatores podem ser sistêmicos como o diabetes, ou ainda outros fatores que podem ajudar a explicar tais diferenças de resultados como diferença no desenho das espiras dos implantes, tratamento de

superfície, idade dos animais e doses utilizadas. O conjunto das evidências nos sugere um efeito do PTH (1-34) também em animais normo-reativos, entretanto, mais estudos são necessários para estabelecer de maneira mais precisa a magnitude destes efeitos.

De acordo com Thomas (2006) a administração de PTH em ratos estimula a formação de osso tanto no lado periosteal quanto endosteal, o que resulta em aumento do diâmetro da cortical. Este aumento no diâmetro cortical está associado a melhorias marcantes nas propriedades biomecânicas. Este resultado vai de encontro aos dados obtidos em nosso trabalho, no qual o efeito do PTH (1-34) parece ter sido mais forte na região cortical, uma vez que diferenças estatisticamente significantes foram observadas para todos os parâmetros histométricos avaliados neste tipo de osso. Já para a região medular, apenas o parâmetro AO apresentou diferenças estatisticamente significantes em favor dos grupos que receberam PTH. Ressalta-se que neste trabalho, um grupo foi sacrificado em duas semanas apenas e outro grupo foi sacrificado após um mês, como no nosso trabalho. Sato et al. (2002), desenvolveram trabalho com ratos machos intactos e ratos fêmea ovariectomizadas com idade de 5 meses de idade. Nestes animais foram aplicadas doses de 8 µg/Kg/dia e 40 µg/Kg/dia e comparou-se o tratamento por 6 meses com o tratamento por 12 meses. Neste trabalho, concluiu-se que o tratamento por 6 meses traz resultados comparáveis ao tratamento por um ano. Estes resultados reforçam uma possível aplicabilidade clínica futura do PTH sintético (1-34) relacionada aos implantes, uma vez que o objetivo seria justamente a administração a curto prazo, para melhorar a cicatrização óssea e osteointegração em pacientes normais e também com comprometimentos sistêmicos como pacientes que utilizam inibidores de reabsorção, por exemplo.

Skripitz et al. (2005) realizaram um estudo utilizando metodologia semelhante à metodologia utilizada no presente estudo. Utilizaram ratos Wistar machos e aplicação de doses intermitentes de 60 µg/Kg de peso corpóreo. Neste trabalho, avaliou-se a área de contato entre osso e implantes de barras de aço inox e entre implantes e barras de cimento PMMA. Observou-se um aumento substancial na área de contato com os implantes. Entretanto, é importante lembrar que os autores utilizaram uma dose bem maior que a utilizada em no presente estudo, o que pode aumentar o risco de osteosarcoma.

Diversos estudos utilizaram a dose de 40 µg/Kg (Abe et al., 2007; Pettway et al., 2008; Motyl et al., 2012; Takahata et al., 2012; Vasconcelos et al., 2013), em ratos o que nos forneceu subsídios para utilizar esta dose, assim como um estudo de Barros et al. (2003), que em modelo experimental com ratos adultos normo-reativos, demonstrou que 40 µg/Kg aplicado a cada dois dias tem efeito protetor contra a perda óssea alveolar associada a periodontite, entretanto esta dose é muito superior à dose aprovada pela FDA (20µg/Kg/dia).

Outros também avaliaram o efeito do PTH no tratamento da doença periodontal em ratos, Pereira Vasconcelos et al. (2013) avaliaram a cicatrização periodontal em modelo animal onde utilizou-se dose igual à utilizada em nosso trabalho (40 µg/Kg). Neste trabalho foi criado um defeito no tecido periodontal (osso, cimento) e dentina, com utilização de um cinzel para avaliar a cicatrização do mesmo e chegaram à conclusão de que o PTH pode influenciar de maneira positiva a cicatrização periodontal. Em outro estudo realizado por Tokunaga et al. (2011), avaliou-se a aplicação intermitente de PTH (1-34) com o objetivo de recuperar a perda óssea em ratos com periodontite induzida. Neste estudo, em um grupo de animais foi aplicado localmente 1µg de PTH (1-34) e em outro foi aplicado 5µg. Concluiu-se que a administração tópica de PTH (1-34) pode também reverter a periodontite.

Bashutski et al., (2010) realizaram um ensaio clínico controlado, duplo cego, com 40 pacientes portadores de periodontite severa localizada ou generalizada que passaram por cirurgia periodontal em um sextante. Estes pacientes receberam então, 20 µg de PTH (1-34) ou placebo. Observou-se que a resolução linear de defeitos ósseos, bem como, melhorias nos parâmetros clínicos foi maior no grupo que utilizou injeções diárias de PTH (1-34) (20 µg/Kg) associada a cálcio oral (1000 mg) e vitamina D (800 UI) por 6 semanas. Estes pacientes foram acompanhados por 1 ano e houve manutenção dos resultados, ou seja, o efeito não ficou restrito ao tempo de aplicação. Dessa forma, podemos sugerir que o PTH (1-34) pode ser utilizado para otimizar o tratamentos com implantes e que mesmo em doses mais baixas e por tempo menor pode interferir de maneira positiva para a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, utilizando doses mais baixas podemos diminuir substancialmente o risco de osteosarcoma, uma vez que o mesmo é dose e tempo dependente. Estes dados vem ao encontro ao nosso trabalho que visa a aplicação

apenas durante o tempo de tratamento com implantes e doses menores, visando uma importante diminuição dos efeitos colaterais.

Uma outra possibilidade clínica futura seria a utilização do PTH (1-34) no tratamento das necroses maxilares por bifosfonados, (Marx , 2003; Khosla et al., 2007; Ruggiero; Woo, 2008). Assim, pacientes que fazem uso de inibidores de reabsorção também podem fazer uso deste tratamento ainda que temporário, para evitar ou diminuir o risco de osteonecrose. Finalmente, o fato de não haver diferenças significantes entre alta e baixa dose, torna-se importante como já citado acima devido a diminuição do risco de aparecimento de osteosarcoma uma vez que em animais já foi possível observar osteosarcoma a partir de doses de 40 µg ao dia, sendo relatado que o aparecimento de osteosarcoma é dose dependente (Vahle et al, 2002). Também ao alto custo do tratamento com o PTH, dessa forma, se conseguirmos efeitos similares utilizando uma dose muito menor, seria muito mais acessível para o paciente fazer um tratamento utilizando o PTH, uma vez que poderia custar muito menos do que os tratamentos feitos com as doses atualmente utilizadas. Além disso, a observação de um efeito importante mesmo em baixas dosagens abre uma importante possibilidade para a utilização clínica sem ou com mínimos efeitos colaterais.

7 CONCLUSÃO

Dentro das limitações inerentes a este tipo de estudo, o PTH 1-34 aplicado em doses intermitentes, favoreceu a formação óssea ao redor de implantes de titânio inseridos em tíbias de ratos tanto em alta dose (40µg/Kg) quanto em baixa dose (2µg/Kg), aumentando a calcificação destas áreas em relação ao grupo controle, entretanto também houve efeito significativo para a região medular na área AO (dentro do limite das roscas).

REFERÊNCIAS¹

Abe Y, Takahata M, Ito M, Irie K, Abumi K, Minami A. Enhancement of graft bone healing by intermittent administration of human parathyroid hormone (1–34) in a rat spinal arthrodesis model. *Bone*. 2007; 41: 775-85.

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

Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev*. 2002;16: 2813-28.

Almagro MI, Roman-Blas JA, Bellido M, Castañeda S, Cortez R, Herrero-Beaumont G. PTH [1-34] enhances bone response around titanium implants in a rabbit model of osteoporosis. *Clin Oral Implants Res*. 2013 Sep;24(9):1027-34

Arvidson K, Abdallah BM, Applegate LA, Baldini N, Cenni E, Gómez-Barrena E. Bone regeneration and stem cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15:718–46.

Aslan D, Andersen MD, Gede LB, De Franca TK, Jørgensen SR, Schwarz P & Jørgensen NR. Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scand J Clin Labor Invest*. 2012;74:14-22.

Baek WY, Lee MA, Jung JW, Kim SY, Akiyama H, de Crombrughe B, Kim JE.(2009) Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor Osterix. *J. Bone Miner Res*. 2009; 24:1055–65.

Barros SP, Silva MAD, Somerman MJ, NOCITI JR FH. Parathyroid Hormone Protects against Periodontitis-associated Bone Loss. *J Dent Res* 2003; 82(10):791-5.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Bashutski JD, Eber RM, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, Giannobile WV, McCauley LK. Teriparatide and osseous regeneration in the oral cavity. *N Engl J Med*. 2010 Dec 16;363(25):2396-405.

Bellido T; Afshan A; Plotkin LI; Fu Q; Gubril I; Roberson PK; Weinstein RS; O'Brien CA, Manolagas S, Jilka R. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts:a putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem*. 2003;278(50):50259–72.

Body JJ, Gaich GA, Scheele WH. Et al. A randomized double-blind trial to compare the efficacy of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1-34)] with alendronate in postmenopausal women with osteoporosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 87:4528–35.

Bonewald, LF. Osteocytes as multifunctional cells. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact*. 2006; 6:331–3.

Bonewald, LF. Osteocyte messages from a bony tomb. *Cell Metab*. 2007; 5:410–11.

Bonewald LF . The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*. 2011; 26:229–38.

Brånemark PI. Osseointegration and its experimental back- ground. *J Prosthet Dent*. 1983; 50:399.

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

Chan HL and McCauley LK. Parathyroid Hormone Applications in the Craniofacial skeleton. *J Dent Res* 92 2013;(1):18-25.

Cranney A, Papaioannou A, Zytaruk N, Hanley D, Adachi J, Goltzman D, Murray T, Hodsman A; Clinical Guidelines Committee of Osteoporosis Canada. Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *CMAJ*. 2006

Jul4;175(1):52-9. Review.

Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med*. 2009;15:417–29.

Datta NS, Pettway GJ, Chen C, Koh AJ, McCauley LK. Cyclin D1 as a target for the proliferative effects of PTH and PTHrP in early osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*. 2007;22:951–64.

Datta NS, Abou-Samra AB. PTH and PTHrP signaling in osteoblasts. *Cell Signal*. 2009;21:245–54.

Daugaard H, Elmengaard B, Andreassen TT, Lamberg A, Bechtold JE, Soballe K. Systemic intermittent parathyroid hormone treatment improves osseointegration of press-fit inserted implants in cancellous bone. *Acta Orthop*. 2012 Aug;83(4):411-9.

de Castro LF, Lozano D, Dapía S, Portal Núñez S, Caeiro JR, Gómez Barrena E, et al. Role of the N and C terminal fragments of parathyroid hormone related protein as putative therapies to improve bone regeneration under high glucocorticoid treatment. *Tissue Eng. Part A*. 2010;16:1157–68.

Dempster DW, Hughes-Begos CE, Plavetic-Chee K, Brandao-Burch A, Cosman F, Nieves J, Neubort S, Lu SS, Iida-Klein A, Arnett T, Lindsay R.J. (Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *Cell Biochem*. 2005 May; 95(1):139-48.

Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling *Rev Endocr Metab. Disord*. 2010;11:219–27.

Esposito M, Murray-Curtis L, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jan 25;(1):CD 003815.

Esposito M, Murray-Curtis L, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: different types of dental implants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Oct; 17(4):CD 003815.

Everts V, Delaissé JM, Korper W, Jansen DC, Tigchelaar-Gutter W, Saftig P, Beertsen W. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner. Res* 2002;17:77–90.

el-Hajj FG, Chen CJ, Rivkees SA, Marynick SP, Stock J, Pallotta JA, Brown EM. Calcium-dependent release of N-terminal fragments and intact immunoreactive parathyroid hormone by human pathological parathyroid tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 69:860–7.

Friedl, G., Turner, R.T., Evans, G.L. & Dobnig, H. Intermittent parathyroid hormone (pth) treatment and age-dependent effects on rat cancellous bone and mineral metabolism. *J Orthop Res.* 2007; 25: 1454–64.

Frolik CA, Black EC, Cain RL, Satterwhite JH, Brown-Augsburger PL, Sato M, et al . Anabolic and catabolic bone effects of human parathyroid hormone (1–34) are predicted by duration of hormone exposure. *Bone.* 2003;33:372–9.

Guyton & Hall. *Tratado de fisiologia médica* 12^a edition, Rio de Janeiro; 2011:1009-10

Hadjidakis D J; Androulakis I I. Bone remodeling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1092:385-96.

Hall B K and Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays.* 2000; 22:138–47.

Hauge ME, Qvesel D, Eriksen EF, Mosekilde L and Melsen F. Cancellous Bone Remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J Bone Miner Res.* 2001;16(9):1575-82.

Harper RP, Fung E. Resolution of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the mandible: possible application for intermittent low-dose parathyroid hormone PTHrp (1-34). *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:573-80.

Hoare SR, Gardella TJ, Usdin TB. Evaluating the signal transduction mechanism of the parathyroid hormone 1 receptor. Effect of receptor-G-protein interaction on the ligand binding mechanism and receptor conformation. *J Biol Chem.* 2001; 276(11):7741-53.

Hodsman AB, Bauer DC, Dempster D, Dian L, Hanley DA, Harris ST. (2005) Parathyroid

hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev.* 2005;26:688–703.

Horwitz MJ, Tedesco MB, Gundberg C, Garcia-Ocaña A, Stewart AF. Short-term, high-dose parathyroid hormone-related protein as a skeletal anabolic agent for the treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88:569–75.

Hutton JE, Heath MR, Chai JY, Harnett J, Jemt T, Johns RB, McKenna S, McNamara DC, van Steenberghe D, Taylor R, et al. Factors related to success and failure rates at 3-year follow-up in a multicenter study of overdentures supported by Branemark implants. *Int J Oral Maxillofac Implant.* Jan-Feb 1995; 10(1):33-42.

Huang JC, Sakata T, Pflieger LL, Bencsik M, Halloran BP, Bikle DD, Nissenson RA. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. *J Bone Miner Res.* 2004;19:235–44.

Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007;40:1434–46.

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

Jilka RL. (2007) Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007; 40:1434–46.

Jolette J, Wilker CE, Smith SY, Doyle N, Hardisty JF, Metcalfe AJ, Marriott TB, Fox J, Wells DS. Defining a noncarcinogenic dose of recombinant human parathyroid hormone 1-84 in a 2-year study in Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol.* 2006;34(7):929-40.

Kim CH, Takai E, Zhou H, von Stechow D, Müller R, Dempster DW, Guo XE. Trabecular bone response to mechanical and parathyroid hormone stimulation: the role of mechanical microenvironment. *J Bone Miner Res.* 2003 Dec;18(12):2116-25.

Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D et al. American Society for Bone and Mineral Research. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: report of a task force of the American Society for Bone and

Mineral Research. J Bone Miner Res. 2007 Oct;22(10):1479-91.

Kloen P, Di Paola M, Borens O, Richmond J, Perino G, Helfet DL, Goumans MJ. BMP signaling components are expressed in human fracture callus. Bone. 2003; 33:362–71.

Kousteni S, Bilezikian JP. The cell biology of parathyroid hormone in osteoblasts. Curr Osteoporos Rep. 2008 Jun;6(2):72-6. Review.

Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, et al. PTH bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. Mol Endocrinol. 2003; 17:423–35.

Kuchler U, Spilka T, Baron K, Tangl S, Watzek G, Gruber R.(2011) Intermittent parathyroid hormone fails to stimulate osseointegration in diabetic rats. Clin Oral Impl Res. 2011; 22:518-23.

Langub MC, Monier-Faugere MC, Qi Q, Geng Z, Koszewski NJ, Malluche HH. Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide type 1 receptor in human bone. J Bone Miner Res. 2001Mar; 16(3):448-56.

Lian JB , Stein GS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Hassan MQ, Gaur T, Lengner CJ, Young DW. Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. Rev Endocr Metab Disord. 2006;7:1–16.

Lima LL, César Neto JB, Cayana EG, Nociti FH Jr, Sallum EA, Casati MZ. Parathyroid hormone (1-34) compensates the negative effect of smoking around implants. Clin Oral Implants Res. 2013 Sep;24(9):1055-9.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral 5th 5^o edição; Rio de Janeiro, Guanabara Koogan; 2010: 48-65

Lindsay R, Cosman F, Zhou H, Bostrom MP, Shen VW, Cruz JD, et al. A novel tetracycline labeling schedule for longitudinal evaluation of the short-term effects of anabolic therapy with a single iliac crest bone biopsy: early actions of teriparatide. J Bone Miner Res. 2006; 21:366–73.

Liu F, Kohlmeier S, Wang Cun-Yu. Wnt signaling and skeletal development. Cell Signal. 2008; 20:999-1009

Lozano D, de Castro LF, Dapía S, Andrade-Zapata I, Manzarbeitia F, Alvarez- Arroyo MV, et al. Role of parathyroid hormone-related protein in the decreased osteoblast function in diabetes-related osteopenia. *Endocrinology*. 2009; 150:2027–35.

Lozano D, Fenández de Castro L, Portal Núñez S, López Herradón A, Dapía S, Gómez Barrena E, et al. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low turnover osteopenia. *Br J Pharmacol*. 2011; 162:1424–38.

Mair B, Tangl S, Feierfeil J, Skiba D, Watzek G and Gruber R. Age related efficacy of parathyroid hormone on osseointegration in the rat. *Clin Oral Impl. Res*. 2009; 20:400-5.

Maniatopoulos C, Rodriguez A, Deporter DA, Melcher AH. An improved method for preparing histological sections of metallic implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1986 Summer;1(1):31-7.

Marx R E . Epamidronato and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A Growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg*. 2003; 61:1115-8.

Motyl JK, McCauley LK and McCabe LR. Amelioration of Type I Diabetes-induced Osteoporosis by Parathyroid Hormone is Associated With Improved Osteoblast Survival. *J Cel Physiol*. 2012; 227: 1326-34.

Nakashima K et al. The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*. 2002;108, 17–29.

Narongroeknawin P, Danila MI, Humphreys LG Jr, Barasch A, Curtis JR. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw, with healing after teriparatide: a review of the literature and a case report. *Spec Care Dentist*. 2010 Mar-Apr;30(2):77-82.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster JY, Hodsman AB, Eriksen EF, Ish-Shalom S, Genant HK, Wang O, Mitlak BH. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med* 2001; 344(19):1434-41.

Otto F, Lubbert M , Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem*. 2003;89:9–18.

Pettway JG, Meganck JA, Koh AJ, Keller TE, Goldstein SA, McCauley LK. (Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. *Bone*. 2008; 42:806-18.

Piattelli A, Pontes AEF, Degidic M, Iezzia G. Histologic studies on osseointegration: Soft tissues response to implant surfaces and components. A review. *Dent Mat*. 2011; 27:53-60.

Piemonte S, Romagnoli E, Cipriani C, Fassino V, Del Fiacco R, Carnevale C, Scillitani A, Derasmo E, Tancredi A, Minisola S. The effect of recombinant PTH(1-34) and PTH (1-84) on Serum Ionized Calcium, 1,25 dihydroxyvitamin D and Urinary Calcium Excretion; A Pilot Study *Calcif Tissue Int*. 2009; 85:287–92.

Pugsley L I and Selye H. The histological changes in the bone responsible for the action of parathyroid hormone on the calcium metabolism of the rat. *J Physiol*. 1933; 79(1): 113–7.

Rubin Mr, Cosman F, Lindsay R and Bilezikian JP. The Anabolic Effects of Parathyroid Hormone. *Osteoporos Int*. 2003;13:267-77.

Ruggiero SL, Woo SB. Biophosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws. *Dent Clin N Am*. 2008; 52(1):111–28.

Sato M, M. Westmore, J. Clendenon, S. Smith, B. Hannum, G. Q. Zeng, R. Brommage and C. H. Turner. Three-dimensional Modeling of the Effects of Parathyroid Hormone on Bone Distribution in Lumbar Vertebrae of Ovariectomized Cynomolgus Macaques. *Osteoporos Int*. 2000; 11:871-80.

Sato M, Vahle J, Schmidt A, Westmore M, Smith S, Rowley E, et al.. Abnormal bone architecture and biomechanical properties with near-life- time treatment of rats with PTH. *Endocrinology*. 2002; 143:3230–42.

Schneider K, Olthmanns J and Hassauer M. Allometric Principles for Interspecies Extrapolation in toxicological risk assesement- Empirical Investigations. *Regul toxicol and pharmacol*. 2004; 39:334-47.

Silva BC, Costa AG, Cusano NE, Kousteni S, Bilezikian JP. Catabolic and anabolic actions of parathyroid hormone on the skeleton. *J Endocrinol Invest*. 2011; 34: 801–10.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, et al.

Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89(2):309-19.

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

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

Stewart AF, Cain RL, Burr DB, Jacob D, Turner CH, Hock JM. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893. *J Bone Miner Res*. 2000; 15:1517-25.

Subbiah V, Madsen VS, Raymond Ak, Benjamin RS and Ludwig JA. Of mice and men: Divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteoporos Int*. 2010; 21:1041-5.

Suda T; Takahashi N; Udagawa N; Jimi F; Gillespie MT; Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine* 1999; 20(3):345-57

Takahata M, Schwarz EM, Chen T, O'Keefe RJ and A Awad HA. Delayed Short-Course Treatment With Teriparatide (PTH1-34) Improves Femoral Allograft Healing by Enhancing Intramembranous Bone Formation at the Graft-Host Junction. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(1):26-37

Tashjian Jr AH and Goltzman D. Perspective On the Interpretation of Rat Carcinogenicity Studies for Human PTH(1-34) and Human PTH(1-84). *J Bone and Mineral Res*. 2008; 23 (6) 803-11.

Tokunaga K, Seto H, Ohba H, Mihara C, Hama H, Horibe M, Yoneda S, Nagata T. Topical and intermittent application of parathyroid hormone recovers alveolar bone loss in rat experimental periodontitis. *J Periodont. Res*. 2011; 46:655-62.

Thomas T. Intermittent parathyroid hormone therapy to increase bone formation. *Joint Bone Spine*. 2006; 73:262-9.

Vaes BL, Ducky P, Sijbers AM, Hendriks JM, van Someren EP, de Jong NG, et al. Microarray analysis on Runx2-deficient mouse embryos reveals novel Runx2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone*. 2006; 39:724–38.

Vahle JL, Sato M, Long GG, Young JK, Francis PC, Engelhardt JA, Westmore MS, Linda Y, Nold JB. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1-34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol*. 2002 May-Jun;30(3):312-21.

Valenta A, Roschger P, Fratzl-Zelman N, Kostenuik PJ, Dunstan CR, Fratzl P, Klaushofer K. Combined treatment with PTH (1–34) and OPG increases bone volume and uniformity of mineralization in aged ovariectomized rats. *Bone*. 2005; 37(1): 87–95.

Vasconcelos DFP, Marques MR, Benatti BB, Barros SP. Intermittent PTH administration improves periodontal healing in Rats. *J Periodontol*. 29.07.2013. Posted on line. DOI:10.1902/jop.2013.130155.

Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest*. 1998; 102: 274–82.

Wellik DM & Capecchi MR. Hox 10 and Hox 11 genes are required to locally pattern the mammalian skeleton. *Science*. 2003; 301:363-7.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa com uso de Animais

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 169 nas fls. 113 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **João Batista César Neto**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa *"Efeito de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre o tecido ósseo ao redor de implantes inseridos em ratos"* do qual participam o(s) aluno(s) **Carlos Eduardo Secco Mafra** e o pesquisador **Luis Antonio Pugliesi de Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **22.12.2011, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 27 de janeiro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP