RODRIGO ALBUQUERQUE BASÍLIO DOS SANTOS

Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos

São Paulo

2015

RODRIGO ALBUQUERQUE BASÍLIO DOS SANTOS

Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos

Versão Original

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

Área de Concentração: Periodontia

Orientador: Prof. Dr. João Batista César Neto

São Paulo

2015

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

Santos, Rodrigo Albuquerque Basílio dos.

Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos / Rodrigo Albuquerque Basílio dos Santos ; orientador João Batista César-Neto. -- São Paulo, 2015.

59 p. : fig., tab. ; 30 cm.

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

Versão original.

1. Ósseointegração. 2. Transplante ósseo. 3. Regeneração óssea. I. César-Neto, João Batista. II. Título.

Santos RAB. Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a

Ao meu rei **Jesus**, a quem consagro toda a minha vida.

A minha amada esposa **Yandra**, que esteve ao meu lado em todo tempo, apoiando e fazendo parte de cada etapa dessa conquista, sempre com alegria e bom ânimo.

Aos meus abençoados filhos, **Danilo** e **Fernando**, que foram verdadeiros presentes pra mim e sempre me trazem esperança em cada olhar e em cada sorriso.

A minha amorosa mãe **Ana**, que sempre acreditou no meu potencial e nunca deixou de me incentivar a continuar, e aos meus irmãos, **Matheus** e **Fabiana**, por torcerem por esse sonho e se alegrarem comigo.

A minha querida sogra **Jacira**, que muito me ajudou dando carinho e suporte a nossa família.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ser meu pai e me sustentar com as suas mãos todos os dias da minha vida, a **Jesus** por ter me salvado e ser meu melhor amigo e ao **Espírito Santo**, que me consola e me fortalece pra cumprir Seus propósitos na Terra.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. João Batista César Neto**, quem eu admiro e respeito muito, por ter me aceitado como seu aluno, acreditado em mim e principalmente pela competência e disposição com que me orientou. Agradeço pela oportunidade. Muito obrigado.

Aos Professores da Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da USP, **Prof. Dr. Giuseppe Alexandre Romito, Prof. Dr. Claudio Mendes Pannuti, Prof. Dr. Luiz Antônio Pugliesi Alves de Lima, Profa. Dra. Marinella Holzhausen Caldeira, Profa. Dra. Luciana Saraiva de Campos, Prof. Dr. Marco Antônio Paupério Georgetti, Prof. Dr. Giorgio De Micheli, Profa. Dra. Marina Clemente Conde e Profa Dra. Cristina Cunha Villar**. Agradeço por todos os ensinamentos e por estarem sempre disponíveis para me ajudar e esclarecer minha duvidas.

Aos meus amigos de pesquisa, **Carlos Eduardo Secco Mafra e Marcelo Sirolli Ferreira**, pelo companheirismo nas atividades acadêmicas, laboratórios e congressos que participamos juntos. Agradeço por estarem sempre dispostos a ajudar e favorecer nossos estudos.

Aos meus colegas de pós-graduação **Adriana Foz, Caio Cremonini, Ecinele Rosa, Livia Tolentino**, e demais alunos e estagiários da disciplina de Periodontia. Foi um privilégio enorme ter conhecido vocês.

À **Márcia Maria dos Santos** e **Marília Camargo Gomes**, funcionárias do Departamento de Periodontia, que com muita paciência e carinho, sempre me ajudaram com os relatórios, prazos e com todo o resto que precisei.

Ao **Prof. Dr. Victor Elias Arana Chavez**, por disponibilizar o laboratório de Biologia Oral (LBO/FOUSP) para que fosse possível a execução desse trabalho e pelo constante apoio e orientação. E por todos que ajudaram, dividindo suas salas e compartilhando conhecimento, **Dra. Vivian Bradaschia**, **Dra. Luana Campos**, e demais colegas de pesquisa.

Aos técnicos do laboratório do ICB USP, **Marta Righetti** e **Sebastião Boleta**, pelo auxílio com os procedimentos histológicos e preparação das lâminas.

Às bibliotecárias da FOUSP **Cláudia**, **Glauci** e **Vânia**, que sempre dispostas colaboraram muito com a finalização da tese.

À **FAPESP** por ter apoiado este trabalho.

*“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria;
bom entendimento têm todos os que cumprem
os seus mandamentos;
o seu louvor permanece para sempre.”*

Salmos 111:10

RESUMO

Santos RAB. Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito do hormônio paratireoideano sintético (1-34) na reparação de enxertos ósseos autógenos, fixados próximo ao ângulo da mandíbula de ratos. Adicionalmente, foi avaliado se doses mais baixas que as estudadas previamente (em outros modelos experimentais) ainda apresentam um efeito osteoanabólico, favorecendo a integração do enxerto ao leito. Para isto, realizou-se um estudo paralelo, cego onde foram utilizados 50 ratos Wistar machos adultos. Sob anestesia geral, uma trefina de diâmetro interno de 3,5 mm foi utilizada para a remoção do enxerto ósseo em bloco da calvária do animal. O enxerto foi fixado próximo ao ângulo da mandíbula do rato, na cortical vestibular, através de um implante de titânio (1,4 mm de diâmetro e 2,5 mm de comprimento). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram sorteados para receber um dos seguintes tratamentos: **grupo 1**: injeções do veículo necessário para a dissolução do hormônio (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 de 40 µg/kg de PTH sintético (1-34) três vezes por semana (n=15). Trinta dias após a cirurgia, os animais foram sacrificados, e as peças contendo o enxerto, o implante e o osso circundante removidas e processadas histologicamente para cortes não descalcificados. Os seguintes parâmetros histométricos foram avaliados nas regiões adjacentes ao implante: espessura total do conjunto leito+*gap*+enxerto (ET) e espessura do enxerto (EE). E os seguintes parâmetros foram avaliados dentro dos limites das roscas dos implantes: preenchimento ósseo (PR) e contato direto com a superfície do implante (CD). Cinco animais foram sacrificados imediatamente após o procedimento cirúrgico (tempo zero) fornecendo referências iniciais das dimensões do enxerto, *gap* e leito antes da reparação óssea. A análise histométrica mostrou que o grupo 3 apresentou um ganho ósseo significativamente maior quando comparado aos grupos 1 e 2 (i.e. segundo os parâmetros ET e EE, $p < 0,05$). Além disso, os valores de ET e EE do grupo 3 foram muito próximos aos apresentados no

tempo zero. Não foram observadas diferenças entre os grupos para PR e CD ($p>0,05$). Dentro dos limites desse estudo, pode-se concluir que a administração sistêmica do PTH (1-34) potencializou o ganho ósseo conseguido com enxertos autógenos, prevenindo a contração do enxerto.

Palavras-chave: Osseointegração, Transplante ósseo, Regeneração óssea, Teriparatida.

ABSTRACT

Santos RAB. Influence of different doses of synthetic PTH (1-34) on autogenous bone graft healing. Study in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Original.

PTH has been investigated for its benefits on bone healing and osteoporosis treatment; however, there is poor information regarding bone grafts. This study therefore investigated the effect of PTH on autogenous bone graft healing. One bone graft was harvested from the calvarium with a trephine bur (3mm internal diameter), and placed on the cortical near the mandible angle with a titanium screw. The animals were randomly assigned to: G1-(control): subcutaneous injections of vehicle solution, three-times/week (n=15); G2 – 2µg/Kg of PTH(1-34), three-times/week (n=15); G3 - 40µg/Kg of PTH(1-34), three-times/week (n=15). These animals were killed 30 days postoperatively, the specimens (implant+bed+graft) removed and used for undecalcified sections. The following histometric parameters were evaluated: total bone thickness (bed+gap+graft - TT), graft thickness (GT) (adjacent to the implant), Bone-to-implant contact (BIC), and bone area (BA) (within the limits of the threads). Five additional animals were sacrificed immediately after surgery (zero hour-ZH) to register bed and graft sizes prior to healing. G3 presented a significantly greater bone gain when compared to G1 and G2 (TT and GT, $p < 0,05$). In relation to initial thickness (ZH), G1 and G2 showed a total contraction of 15,91% and 20,83%, respectively, while G3 showed a slight bone gain (1.21%). Data analysis revealed a significant difference for G3, when compared to G1 and G2 ($p < 0.01$). No differences were observed for BIC and BA ($p > 0,05$). Systemic administration of PTH (1-34) prevented graft contraction and increased bone augmentation after the autogenous bone graft.

Keywords: Bone transplantation; Bone regeneration; Osseointegration; Parathyroid hormone; Dental implants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Sistema para obtenção das imagens dos cortes histológicos através do microscópio de luz acoplado a uma câmera digital e conectado a um microcomputador.....30
- Figura 4.2 - Esquema representando os parâmetros histométricos: 1 - Espessura total do conjunto leito + enxerto (**ET**), 2 - Espessura do enxerto (**EE**). Tais parâmetros são obtidos através de medidas lineares.....31
- Figura 4.3 - Esquema representando as regiões de interesse do parâmetro: 4 - extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (**CD** – representado pelas linhas em verde).....32
- Figura 4.4 - Esquema representando as regiões de interesse do parâmetro: 5- Área de tecido mineralizado dentro dos limites das roscas (**PR** - delimitado pela linha vermelha).....32
- Figura 5.1 - Fotomicrografia representativa do grupo zero hora. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.....35
- Figura 5.2 - Fotomicrografia representativa do grupo 1. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.....35
- Figura 5.3 - Fotomicrografia representativa do grupo 2. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.....36

Figura 5.4 - Fotomicrografia representativa do grupo 3. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Média e desvio padrão (DP) do parâmetro ECE, expresso em %, para os grupos 1 (controle), 2 (baixa dose) e 3 (alta dose).....38

Tabela 5.2 - Resultados histométricos.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PTH	Hormônio paratiroidiano
ROG	Regeneração óssea guiada
µg	Micrograma
kg	Kilograma
1,25(OH) ₂	1,25- dihidroxivitamina D
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca	Cálcio
RNA	Ácido ribonucleico
PTHr1	Receptor de membrana celular do PTH tipo 1
Rank	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>
RankL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
PKA	Enzima proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Enzima proteína cinase C
PLC	Enzima fosfolipase C
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
ZH	Grupo zero hora
ET	Espessura total
EE	Espessura do enxerto
ECE	Estimativa de contração de enxerto
PR	Preenchimento ósseo da rosca do implante
CD	Contato direto osso-implante
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
rPTH	<i>Recombinant parathyroid hormone</i>
DO	Distração osteogênica
OP	Osteopontina
OC	Osteocalcina

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor
>	maior
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual
±	mais ou menos
=	igual
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 Fisiologia do PTH.....	19
2.2 O papel do PTH no tecido ósseo.....	20
2.3 PTH e reparação óssea ao redor de implantes.....	24
2.4 PTH e reparação de enxertos ósseos.....	25
3 PROPOSIÇÃO.....	26
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Características da amostra.....	27
4.2 Delineamento experimental	27
4.3 Procedimento cirúrgico.....	28
4.4 Processamento histométrico.....	29
4.5 Análise estatística.....	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 Observações clínicas.....	34
5.2 Análise descritiva (grupo zero hora).....	34
5.3 Resultados histométricos.....	34
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
ANEXO.....	59

1 INTRODUÇÃO

Estudos de longa duração têm relatado um alto nível de previsibilidade no processo de osseointegração e altas taxas de sucesso clínico na reabilitação protética com a utilização de implantes de titânio (Branemark et al., 1977; Adell et al., 1981). Entretanto, alguns fatores têm sido relacionados ao insucesso dos implantes osseointegráveis, como o estado de saúde geral, quantidade e qualidade óssea, grau de trauma cirúrgico, tabagismo e contaminação bacteriana (Sennerby; Roos, 1988; Esposito et al., 1998).

Além de influenciar as taxas de sucesso, frequentemente, a quantidade óssea é um fator que limita ou impossibilita a reabilitação oral com implantes. Sendo assim, torna-se necessário a indicação de técnicas de aumento de osso para permitir a instalação de próteses implanto-suportadas. A crescente utilização das reabilitações com implantes, devido aos bons resultados em estudos de longa duração, levaram ao crescimento das indicações de técnicas para o aumento do volume ósseo (Araújo et al., 2002; Satow et al., 1997).

Após a extração dental é comum a reabsorção de parte do osso alveolar, o que pode alterar tanto a espessura quanto a altura do remanescente ósseo. Tal evento influencia diretamente um dos principais requisitos para o sítio receptor de implantes que é um adequado volume de osso. Técnicas como enxertos ósseos autógenos, regeneração óssea guiada (ROG) e distração osteogênica permitem a colocação de implantes em áreas onde o remanescente ósseo apresenta-se reabsorvido (Buser et al., 1995, 1996; Proussaefs; Lozada, 2005).

A literatura relata bons resultados com o uso das técnicas mencionadas acima, entretanto, tais técnicas apresentam algumas limitações como a baixa previsibilidade no ganho de altura óssea e a necessidade de um significativo intervalo de tempo (cerca de 6 meses), entre o procedimento de reconstrução óssea e a colocação dos implantes. Dentro dos limites de nosso conhecimento, poucos estudos têm investigado abordagens para otimizar os resultados obtidos com os procedimentos de reconstrução óssea. Tais abordagens podem objetivar um aumento na velocidade de reparação e, conseqüentemente, uma diminuição do intervalo entre a reconstrução e a colocação de implantes.

O hormônio paratireóideo (PTH) tem sido muito estudado por suas propriedades mostradas no tratamento da osteoporose (Neer et al., 2001; Arita et al., 2004; Murray et al., 2005). O PTH é o maior regulador do metabolismo de cálcio e fosfato no organismo e controla, por meio de remodelação óssea, o fluxo desses minerais nos ossos e rins (Schwarz 1993; Schwarz et al., 1994). Administrado de maneira contínua promove reabsorção óssea, porém, seu uso intermitente é altamente anabólico para esse tecido, favorecendo a reparação (Locklin et al., 2003; Kanzawa et al., 2000) do tecido ósseo. Estudos na área odontológica revelaram que a administração intermitente de PTH (1-34) diminui significativamente a perda óssea promovida pela periodontite induzida por ligaduras em ratos normais (Barros et al., 2003) e ratas ovariectomizadas (Marques et al., 2005). Shiota et al. (2003) avaliaram o efeito do hormônio paratireoideano no tecido ósseo após a colocação de implantes de titânio em tíbias de ratas ovariectomizadas. Seus achados sugerem que a aplicação intermitente de PTH (1-34) pode prevenir a reabsorção óssea trabecular ao redor de implantes, assim como adicionar um volume ósseo perdido após a ovariectomia. Um estudo de Skripitz et al. (2005) mostrou que o PTH parece ter um efeito por agir na estimulação de osteoblastos. Também é considerado mais efetivo no tratamento da osteoporose quando comparado a inibidores de reabsorção óssea como o alendronato, residronato, etidronato e raloxifeno (Neer et al., 2001). Relatou-se, ainda, que o PTH (1-34) não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley et al., 1997; Mohan et al., 2000; Neer et al., 2001) ou qualquer efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes tratados com PTH (1-34) por 3 anos (Horwitz et al., 2000).

Um estudo avaliando injeções de PTH (1-34) em ratos jovens e idosos mostrou que esta substância exerce um intenso efeito osteogênico, aumentando a quantidade de tecido ósseo ao redor dos implantes de titânio (Mair et al., 2009). Em 2007, Abe et al. reportaram que o PTH (1-34), administrado numa dosagem de 40 µg/kg/dia, aumentou a velocidade de reparação de enxertos ósseos utilizados para fusão espinhal em ratos. Hashimoto et al. (2007) avaliaram, em ratos, o efeito de duas doses de PTH (1-34) (10 versus 100 µg/kg/dia) num modelo de extensa reconstrução de tíbia com enxertos ósseos transplantados de animais isogênicos. Os autores reportaram um efeito positivo (diretamente proporcional a concentração) do PTH (1-34) na massa óssea do enxerto. 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 20 μ g (Neer et al., 2001) ou 40 μ g (Body et al., 2002) de PTH (1-34) (valores em torno de 0,3 a 0,7 μ g/kg/dia).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial osteogênico de doses mais baixas que as utilizadas em estudos prévios em ratos, e mais próximas às administradas clinicamente em pacientes, sobre a reparação de enxertos ósseos obtidos da calvária de ratos e fixados através de parafusos de titânio na região do ângulo mandibular do mesmo animal. Consideramos relevante obter conhecimento a respeito da ação do PTH no tecido ósseo tanto em áreas ao redor de implantes osseointegrados, quanto em enxertos autógenos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fisiologia do PTH

O hormônio paratireóideo (PTH) é o mais importante controlador do metabolismo de cálcio e fosfato, secretado pelas células principais das glândulas paratireóideas (Akerstrom et al., 2005). O PTH tem ação em três órgãos: indiretamente no intestino, aumentando a absorção de cálcio e fosfato, e diretamente no rim e ossos (Arnaud et al., 1967).

Seu efeito principal é aumentar os níveis plasmáticos de cálcio; diretamente estimulando a reabsorção óssea e a reabsorção de cálcio pelos túbulos renais, e indiretamente estimulando a síntese renal de 1,25- dihidroxivitamina D (1,25(OH)₂D) (Brown, 1999). Simultaneamente, o PTH diminui a concentração plasmática de fosfato, inibindo a reabsorção de fosfato pelos túbulos renais (Ba et al., 2003).

O PTH é uma proteína de cadeia única, e contém 84 aminoácidos. A atividade biológica do PTH reside na porção N-terminal da molécula, dentro dos aminoácidos 1 a 27 (Deal; Gideon 2003; Madore et al., 2004). A região do 14 ao 34 do PTH contém a seqüência de ligação ao receptor da membrana celular nas células-alvo.

O regulador dominante da atividade da glândula paratireóidea é o nível plasmático de cálcio. O PTH e o cálcio formam um par de retroalimentação negativa (Arnaud et al., 1967). O receptor para cálcio na membrana plasmática da célula paratireóidea sente as alterações na concentração de cálcio ionizado, no líquido extracelular. Quando o nível de cálcio plasmático excede o normal, um aumento na ligação do cálcio ao componente extracelular do receptor, ativa a fosfolipase C e inibe a adenilato ciclase (Nemeth et al., 1986). A queda nos níveis de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), resultante da inibição da adenilato ciclase, e o maior nível de cálcio intracelular, interrompem a exocitose dos grânulos secretórios contendo PTH. Quando a ligação do cálcio ionizado ao receptor diminui, a supressão da exocitose dos grânulos é retirada e a secreção de PTH aumenta (Brown, 1999).

2.2 O papel do PTH no tecido ósseo

O PTH apresenta uma dupla ação sobre o tecido ósseo, de modo que o efeito deste hormônio depende da sua administração (Qin et al., 2004; Hock; Gera, 1992). Quando acontece fisiologicamente, há homeostase dos níveis de Ca. De forma contínua, observamos um aumento da reabsorção óssea (catabolismo), e intermitentemente, uma maior formação óssea (anabolismo) (Ejersted et al., 1993).

Os efeitos reabsortivos do PTH sobre o osso são atingidos pelas concentrações elevadas de hormônio, que resultam da estimulação das glândulas paratireóideas pela hipocalcemia. Assim, a reabsorção óssea completa uma alça de retroalimentação negativa que restaura o nível de cálcio plasmático ao normal (Raue et al., 2006).

Receptores para PTH estão presentes nas membranas plasmáticas de osteoblastos e osteócitos (Sneddon et al., 2004). O PTH acelera a remoção do cálcio ósseo através de dois processos. O efeito inicial deste hormônio é rápido e consiste em estimular o processo denominado osteólise osteocítica (Talmage et al., 1976). O PTH, ligado a receptores proteicos nas membranas plasmáticas dos osteócitos, ativa a bomba de cálcio, induzindo a rápida remoção de sais de fosfato de cálcio dos cristais ósseos amorfos, situados junto a essas células. O PTH estimula essa bomba mediante o aumento da permeabilidade do cálcio da fração do líquido ósseo na membrana osteocítica, o que permite difusão dos íons cálcio até as membranas celulares. Dessa forma, este processo faz com que o cálcio seja transferido do líquido canalicular do osso para os osteócitos e, então para o líquido extracelular (Tazawa et al., 2004; Krempien et al., 1978).

Um segundo efeito, de desenvolvimento mais lento, é estimular os osteoclastos a reabsorverem o osso maduro completamente mineralizado. Neste processo, tanto o cálcio quanto o fosfato são liberados para transferência para o líquido extracelular. A matriz orgânica do osso é hidrolisada pela atividade aumentada da colagenase, induzida pelo PTH, e das enzimas lisossomais. Osteoclastos não apresentam receptores para PTH, mas são indiretamente ativados por esse hormônio (Dempster et al., 2005; Lee et al., 1994). O PTH ativa receptores no osteoblasto, que estimula a secreção de RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*). RANKL ativa o receptor RANK (*receptor activator of nuclear*

factor Kappa-B) nos precursores de osteoclastos, promovendo diferenciação celular, maturação de osteoclastos imaturos e reabsorção óssea (Huang et al., 2004). O paratormônio aumenta inicialmente a borda ondulada do osteoclasto e a zona de reabsorção clara, que se desenvolve entre ele e o osso mineralizado. Em seguida, ocorre o aumento no tamanho dos osteoclastos, na síntese de ácido ribonucleico (RNA) e no número de osteoclastos (Yasuda et al., 1998).

Os osteoblastos e seus precursores (pré-osteoblastos) podem responder ao hormônio, através de uma alteração precoce no formato celular e no arranjo citoesquelético, por uma fosforilação das cadeias leves de miosina, induzida pela AMPc (Egan et al., 1991). O PTH também parece inibir a síntese de colágeno pelos osteoblastos, provavelmente no nível de transcrição (Fall et al., 1994).

O potencial osteogênico do PTH tem sido mencionado a partir da década de 1920, com estudos de Bauer et al. (1929). Em 1932, Selye e Pugsley, demonstraram que extrato bovino de PTH injetado diariamente por 30 dias em ratos, promovia macroscopicamente osso mais denso, que no grupo controle. Os autores observaram maior número de osteoblastos, que produziam preenchimento medular do trabeculado ósseo. O fragmento de PTH humano (1,34) foi introduzido em 1971, por Potts et al., sendo relacionado, posteriormente, a um melhor *turnover* ósseo e crescimento trabecular estrutural, em pacientes idosos (Reeve et al., 1976). O PTH (1,34) foi aprovado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) em 2002, para tratamento de pacientes com osteoporose e alto risco de fratura.

Horwitz et al. (2000) analisaram a osteoporose e PTH, em mulheres. Em seguida, o primeiro estudo com reparo de fraturas, em mulheres na pós-menopausa, foi publicado em 2010, demonstrando melhora na cicatrização de fraturas de radio não-operadas, tratadas com PTH (Aspenberg et al., 2010). Com relação a doença periodontal, Bashutski et al., em 2010, realizou o tratamento de 40 pacientes com periodontite crônica, utilizando administração de PTH e suplementação com cálcio oral e vitamina D, em conjunto com cirurgia a retalho, obtendo melhores resultados nos defeitos ósseos alveolares, em comparação ao placebo. Em um relato de caso, o mesmo autor em 2012, demonstrou o potencial do PTH, no tratamento de defeitos infra-ósseos severos. Skripitz iniciou os estudos com implantes em 2000 e 2001, em animais, onde o PTH promoveu melhor fixação mecânica.

Quando administrado em baixas doses e intermitentemente, o PTH estimula a formação óssea em humanos (Jilka 2007; Girotra et al., 2006). A resposta

anabólica no osso pelo PTH é considerada uma cascata de sinalização. A ação do PTH é mediada pelo receptor de membrana celular do PTH tipo 1 (PTHr1), acoplado a proteína G (Rosenblatt et al., 1980). O PTH unido ao PTHr1 estimula as seguintes vias de sinalização, que levam a ativação de formação óssea osteoblástica:

a) Acoplado a proteína G_s : Ativação de adenilato ciclase, que catalisa a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), a partir de trifosfato de adenosina (ATP), e subsequente produção de proteína cinase dependente de AMPc (PKA), podendo fosforilar diversas estruturas intracelulares, como proteínas necessárias para o aumento do transporte de íons cálcio e outros íons (Cranney et al., 2006).

b) Acoplado a proteína G_q : Ativação de proteína cinase C (PKC). A proteína G_q está envolvida na ativação da enzima fosfolipase C (PLC), que assim como a adenilato ciclase, participa na ativação de segundos mensageiros. Depois de ativada, ela degrada o fosfatidil inositol presente na membrana, em trifosfato de inositol e 1,2 diacilglicerol, que são segundos mensageiros envolvidos em respostas biológicas mediadas por esta proteína, aumentando a atividade de PKC (Yang et al., 2007).

Em cultura, o PTH, tendo o AMPc como segundo mensageiro, causa um aumento no número de osteoblastos, inibindo sua taxa de apoptose em 80 a 90%. O PTH ativa uma via anti-apoptose, envolvendo a sinalização da PKA, e subsequente fosforilação e inativação da proteína apoptótica *Bad*. Além disso, aumenta a transcrição de um gene de sobrevivência, chamado Bcl-2 (Bellido et al., 2003; Krishnan et al., 2003).

Em ratos, Alkhiary et al., 2005, administraram PTH (1,34) por 4 semanas, e também relataram diminuição da apoptose de osteoblastos, e maior formação óssea. Um estudo de Skripitz et al. (2005) mostrou que o PTH parece ter um efeito de anti-reabsorção óssea, por agir na estimulação de osteoblastos. Injeções de PTH aumentam a diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Skripitz; Aspenberg, 2004). Marx, em 2007, relatou aumento de função, atividade e *turnover* dos osteoblastos e osteoclastos, resultando em maior espessura cortical e trabecular, bem como massa e densidade óssea.

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstram que PTH aumenta a expressão de *Runt-related transcription factor 2* (Runx2), que é um fator de transcrição associado

com diferenciação de osteoblastos, a partir de células mesenquimais (de Castro et al., 2012; Lozano et al., 2011; Alonso et al., 2008).

Há evidências de que o PTH pode interagir com células de revestimento nas superfícies ósseas, o que explicaria o aumento precoce de formação óssea após tratamento com este hormônio (Dobnig; Turner, 1995).

Os níveis plasmáticos de fosfatase alcalina e osteocalcina (marcadores de formação óssea) são frequentemente aumentados pelo PTH. Estas ações anabólicas são mediadas por aumentos locais nos fatores de crescimento semelhante a insulina e nos fatores de crescimento transformantes, induzidos pelo PTH (Bikle; Wang, 2012). O fator de crescimento semelhante a insulina (IGF) é conhecido por exercer funções anabólicas no tecido ósseo. Estudos *in vivo* (Watson et al., 1995) e *in vitro* (Linkhart; Mohan, 1989) tem demonstrado que o tratamento intermitente com PTH induz um aumento na expressão de IGF em osteoblastos, em ratos e camundongos. Em mulheres pós-menopausa, tratadas com PTH, também foi observado maior formação óssea, com ações anabólicas da IGF (Ma et al., 2006). Resumindo, a interação IGF-PTH regula atividade e proliferação osteoblástica, bem como afeta a taxa de sobrevivência dessas células (Canalis, 1980).

O paratormônio é considerado mais efetivo quando comparado a outros inibidores de reabsorção óssea, como o alendronato, residronato, etidronato e raloxifeno (Neer et al., 2001). Relatou-se, ainda, que o PTH (1-34) não aumenta a incidência de tumores e não apresenta efeitos mutagênicos ou tóxicos (Morley et al., 1997; Mohan et al., 2000) ou qualquer efeito colateral, dados estes confirmados por estudos envolvendo aproximadamente 1000 pacientes tratados com PTH (1-34) por 3 anos (Horwitz et al., 2000).

O efeito osteogênico do PTH depende da dose, frequência de administração e duração do tratamento. Em estudos laboratoriais, têm sido aplicadas injeções subcutâneas de PTH de 5 a 200µg/kg/dia, ocorrendo geralmente um aumento da massa óssea e resistência biomecânica. Administração de doses menores que 10 µg/kg/dia demonstram resultados conflitantes (Kimmel et al., 1993; Lane et al., 1995; Shen et al., 1992). Em humanos, a dose ideal no tratamento da osteoporose é de 20µg/dia de PTH por pessoa. Os estudos clínicos utilizam aplicações diárias de 20µg (Neer et al., 2001) ou 40µg (Body et al., 2002) de PTH(1-34) (valores em torno de 0,3 a 0,7 µg/kg/dia). Com relação a frequência e duração do tratamento, apesar da

resposta anabólica no osso, demandar uma administração pulsátil, injeções diárias não são necessárias. Em modelos em animais de osseointegração de implantes, aplicações 3 a 5 vezes semanais, por no mínimo 30 dias, têm sido preconizadas (Almagro et al., 2013; Corsini et al., 2008).

2.3 PTH e reparação óssea ao redor de implantes

Estudos em animais têm demonstrado resultados positivos quanto à osseointegração de implantes, através da administração intermitente de PTH (1-34). Shirota et al. (2003) avaliaram o efeito da administração de 30 µg/kg/dia do hormônio paratireoideano (1-34), 3 vezes por semana, por até 29 semanas, após a colocação de implantes de titânio em tíbias de ratas ovariectomizadas. Seus achados sugerem que a aplicação intermitente de PTH (1-34) pode prevenir a reabsorção óssea trabecular ao redor de implantes, assim como adicionar um volume ósseo perdido após a ovariectomia. Um estudo recente avaliando injeções de 60 µg/kg/dia de PTH (1-34), 3 vezes por semana, por 4 semanas, em ratos jovens e idosos, mostrou que esta substância exerce um intenso efeito osteogênico, aumentando a quantidade de tecido ósseo ao redor dos implantes de titânio (Mair et al., 2009).

Em coelhas ovariectomizadas e com osteoporose induzida por glicocorticoide, Almagro et al. (2013) demonstraram maior contato osso/implante em animais que receberam tratamento com 10 µg/kg/dia de PTH(1,34), 5 vezes por semana, durante 12 semanas, além de um aumento na densidade mineral óssea na área peri-implantar. O efeito negativo do fumo sobre a osseointegração parece ser atenuado, quanto ao volume ósseo o redor de implantes, através da administração de 40 µg/kg/dia de PTH(1,34), 3 vezes por semana, pelo período de 60 dias, em ratos (Lima et al., 2013).

Em humanos, Kuchler et al. (2011a) avaliaram histologicamente implantes que haviam sido retirados da região da mandíbula interforaminal, após 9 semanas. Os pacientes receberam 20µg de teriparatida (forma sintética de hormônio natural humano PTH) uma vez ao dia por 28 dias, ou nenhum tratamento. O grupo que utilizou PTH demonstrou melhores resultados em relação ao volume ósseo por

volume de tecido e contato osso/implante, do que o controle. Esses foram os primeiros resultados de osseointegração em pacientes tratados com teriparatida.

2.4 PTH e reparação de enxertos ósseos

Em 2007, Abe et al. reportaram que o PTH (1-34), administrado numa dosagem de 40 $\mu\text{g/kg/dia}$, aumentou a velocidade de reparação de enxertos ósseos utilizados para fusão espinhal em ratos. Esses resultados tem sido confirmados recentemente por Qiu et al. (2013). Em animais com osteoporose diagnosticada com alterações degenerativas e espondilolistese, foram comparados o efeito do PTH e do bifosfonato, na fusão espinhal com enxerto ósseo. A injeção subcutânea de teriparatida foi mais efetiva do que a administração oral com bifosfonato.

Hashimoto et al. (2007) avaliaram, em ratos, o efeito de duas doses de PTH (1-34) (10 versus 100 $\mu\text{g/kg/dia}$) num modelo de extensa reconstrução de tibia com enxertos ósseos transplantados de animais isogênicos. Os autores reportaram um efeito positivo (diretamente proporcional a concentração) do PTH (1-34) na massa óssea do enxerto. Quando técnicas de reconstrução óssea, através de enxertos, são utilizadas, há a necessidade de aguardar alguns meses para que ocorra o adequado processo de reparação óssea. A administração do hormônio PTH poderia reduzir esse prazo, favorecendo a remodelação do tecido ósseo. Estudos em animais, com enxertos alogênicos, têm demonstrado bons resultados, quando utilizado PTH (Reynolds et al., 2011; Takahata et al., 2012; Dugaard et al., 2011a, 2012).

Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão-ouro” em reconstruções esqueléticas. Em um estudo com coelhos, Lehman et al. (2010) avaliaram o efeito de 10 $\mu\text{g/kg/dia}$ de teriparatida na reparação de enxertos da crista ilíaca, em áreas de fusão espinhal, promovendo bons resultados quanto a parâmetros histológicos e radiográficos. Porém, se faz necessária a elaboração de estudos laboratoriais adicionais, que esclareçam o mecanismo de ação e benefícios do uso do PTH na reparação de enxertos ósseos autógenos em bloco na região maxilo-mandibular.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi:

3.1 Avaliar o efeito do PTH (1,34) na reparação e remodelação do enxerto ósseo autógeno aposicional.

3.2 Avaliar o potencial osteogênico de doses mais baixas de PTH (1,34), que as comumente utilizadas em estudos prévios, sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos, obtidos da calvária de ratos e fixados através de parafusos de titânio na região do ângulo mandibular do mesmo animal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

O presente estudo foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA- ICB/USP) (protocolo nº 012). Foram utilizados 50 ratos adultos, machos, da raça Wistar, pesando entre 300 e 400g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com acesso a comida e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

4.2 Delineamento experimental

Após a realização de um procedimento de enxertia óssea, em que o enxerto foi removido da calota craniana do animal e fixado na região do ângulo da mandíbula através de um parafuso de titânio, foi conduzido um desenho experimental paralelo utilizando 45 ratos. Os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos:

Grupo 1 (controle) – 15 ratos que receberam apenas o veículo necessário para a dissolução do hormônio (1% de ácido acético dissolvido em água), num volume de solução semelhante ao utilizado nos grupos 2 e 3;

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;

Grupo 3 – 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.

Com o intuito de permitir uma estimativa de reabsorção do enxerto e também das dimensões e anatomia da região no momento da cirurgia, cinco ratos adicionais foram operados e sacrificados imediatamente após o procedimento cirúrgico, formando um grupo de animais denominado “ZERO HORA” (grupo ZH).

4.3 Procedimento cirúrgico

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).

O modelo experimental utilizado baseia-se no trabalho de Jardini et al. (2005). Após a anestesia, foi realizada a tricotomia das regiões temporal e parotídeo-massetérica esquerda, e frontal bilateral. Uma solução de álcool iodado foi utilizada para a anti-sepsia dos dois campos operatórios (doador e receptor). Uma incisão em meia-lua, paralela ao arco zigomático, próximo ao ângulo da mandíbula, foi realizada na pele do animal, permitindo a visualização do músculo masseter. O músculo masseter foi divulsionado, permitindo o acesso à tábua óssea vestibular da mandíbula.

Após a preparação do leito receptor, foi realizado o acesso ao leito doador. Uma incisão linear foi executada no centro da calvária do animal, expondo o osso parietal. Com uma broca do tipo trefina (3,5 mm de diâmetro interno) montada em um contra-ângulo redutor, conectado a um motor elétrico com uma velocidade constante de 600 RPM e refrigeração com fluxo constante de soro fisiológico estéril, um bloco ósseo foi removido com cuidado para não envolver a região da sutura de crescimento sagital e coronal. O enxerto foi perfurado em sua região central com o uso de uma broca helicoidal de 1,2 mm de diâmetro e acondicionado em uma cuba contendo solução fisiológica estéril.

Para a perfuração da região do ângulo da mandíbula, medidas foram realizadas com o uso de uma sonda periodontal, de maneira que a perfuração fosse realizada equidistante 3 mm tanto da região da chanfradura mandibular, quanto da borda mais inferior do corpo da mandíbula. Após a perfuração, o enxerto ósseo foi transpassado pelo mini-implante (1,4 mm de diâmetro e 2,5 mm de comprimento), sendo o conjunto (enxerto+implante) posicionado e fixado ao leito receptor, com o uso de uma chave para implantes. O mini-implante foi travado no leito receptor mantendo o enxerto ósseo justaposto ao mesmo e isento de mobilidade.

Na área experimental, as suturas foram realizadas por planos, suturando-se inicialmente o músculo, com fio 5.0 absorvível de poliglactina 910 (Vicryl, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). A pele foi suturada com fio 5.0 de Nylon (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil), tanto na área doadora quanto na área receptora. Uma solução de álcool iodado foi novamente aplicada sobre a área operada e os animais receberam uma única dose de antibiótico via intramuscular (1 ml/kg). Não houve nenhuma restrição de movimentação ou alimentação aos animais após a cirurgia, sendo mantidos em gaiolas durante todo o período experimental.

Após o procedimento cirúrgico, foi realizado o sorteio para a alocação dos animais nos grupos experimentais descritos anteriormente (Grupo 1: controle; Grupo 2: PTH (1-34) na dosagem de 2 µg/kg; Grupo 3: PTH (1-34) na dosagem de 40 µg/kg; e grupo ZH).

4.4 Processamento histométrico

Os animais foram sacrificados 30 dias após o enxerto ósseo, através da administração de uma sobredose da associação de cloridrato de ketamina/xilazina (respectivamente, 148 mg/kg e 30 mg/kg, intramuscular). Após o sacrifício, os espécimes foram removidos em blocos (implante + osso do leito + enxerto) e colocados em formalina neutra tamponada a 4% por 48 horas.

Subseqüentemente, foram desidratadas em escala ascendente de concentrações alcoólicas (60-100%) sob constante agitação. Finalmente, infiltrados com soluções crescentes de resina metacrilato (Fluka Chemie, Ag, Buchs, Suíça), inicialmente com 50/50 até 100%. Cortes longitudinais foram obtidos com um micrótomo, equipado com uma máquina de serra fita (Exakt Saw 300 CP band system, Exakt Technologies, Oklahoma City, OK, E.U.A.).

Em seguida, as secções foram coladas em lâminas de vidro, e desgastadas e polidas com uma politriz (Knuth-Rotor-3, Struers, Copenhagen, Dinamarca) até uma espessura aproximada de 70-80 µm. Em seguida, foram coradas com solução de *Stevenel's Blue* e vermelho de Alizarina S (Maniatopoulos et al., 1986), que permitem uma boa visualização e diferenciação entre tecido mineralizado (corado

pelo vermelho de Alizarina S), tecido não-mineralizado (corado em tons de azul pelo *Stevenel's Blue*) e a superfície do implante .

Secções centrais de cada peça foram utilizadas para a análise histométrica. As imagens digitais foram adquiridas utilizando um microscópio de luz (Olympus BX60 optical microscope, Olympus, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera digital (Olympus DP72 Camera, Olympus, Tóquio, Japão) e conectados a um microcomputador com *software* para captura e análise de imagens (Cell F, Olympus, Tóquio, Japão) (Figura 4.1). As lâminas e imagens digitalizadas foram codificadas, tornando o examinador cego em relação ao grupo experimental. A análise histomorfométrica foi realizada por um único examinador através de um programa para análise de imagens (ImageJ®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, E.U.A.).

Figura 4.1 – Sistema para obtenção das imagens dos cortes histológicos através do microscópio de luz acoplado a uma câmera digital e conectado a um microcomputador.

Os seguintes parâmetros histométricos foram avaliados:

- 1- Espessura total do conjunto leito+enxerto (**ET**) adjacente às roscas do implante (Figura 4.2);
- 2- Espessura do enxerto (**EE**) adjacente às roscas do implante (Figura 4.2).
- 3- Estimativa da Contração do Enxerto (**ECE**). Utilizou-se como referência para o cálculo da ECE, os valores médios da espessura do enxerto obtidos para o grupo Zero Hora. O primeiro passo foi transformar o resultado individual de

EE de cada animal em uma porcentagem do tamanho inicial do enxerto, para isso, utilizou-se a seguinte equação ($ECE = (EE \text{ de cada animal} / \text{média de EE em zero hora}) \times 100$). Após a obtenção da porcentagem para cada animal de cada grupo, novas médias para cada grupo foram realizadas e os testes estatísticos pertinentes foram utilizados para a comparação entre os grupos.

Figura 4.2 - Esquema representando os parâmetros histométricos: 1 - Espessura total do conjunto leito + enxerto (**ET**), 2 - Espessura do enxerto (**EE**). Tais parâmetros são obtidos através de medidas lineares.

Adicionalmente, foram mensurados os parâmetros histométricos relacionados com o reparo ósseo ao redor dos implantes:

- 4- Contato direto osso/implante, mensurado em porcentagem, referente a extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (**CD**) (Figura 4.3);
- 5- Área de tecido mineralizado dentro dos limites das roscas de cada implante (**PR**) (em porcentagem), utilizando retículo quadriculado (Figura 4.4). Foi utilizada a técnica da contagem de pontos, com a aplicação de uma grade e marcando as intersecções com cores diferentes pra estrutura mineralizada e não-mineralizada. Explicar melhor como faz a medida .

Figura 4.3 - Esquema representando as regiões de interesse do parâmetro: 4 - extensão de tecido ósseo em contato direto com a superfície do implante (**CD** – representado pelas linhas em verde).

Figura 4.4 - Esquema representando as regiões de interesse do parâmetro: 5- Área de tecido mineralizado dentro dos limites das roscas (**PR** - delimitado pela linha vermelha).

4.5 Análise estatística

Após a obtenção dos resultados de cada parâmetro, para cada animal, médias representativas dos grupos experimentais foram obtidas e comparadas estatisticamente. O teste estatístico para comparar os grupos experimentais foi escolhido levando-se em consideração o tipo de parâmetro histométrico e o resultado do teste de normalidade (teste de kolmogorov-smirnov). O nível de significância adotado foi 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Observações clínicas

Um total de 50 animais foi incluído no estudo, sendo que com exceção dos animais sacrificados imediatamente após a cirurgia (n=5), nenhum desses morreram antes do término do período experimental (30 dias após o procedimento cirúrgico).

5.2 Análise descritiva (grupo zero hora)

Através dos dados fornecidos no grupo zero hora, pudemos obter as medidas da espessura original do leito e do enxerto, e avaliarmos o possível efeito do PTH (1-34) na contração do enxerto ósseo. No tempo zero hora, um *gap* evidente foi observado entre o leito receptor e o enxerto. Adicionalmente, não foi observado nenhum preenchimento ósseo dentro das roscas do implante, tanto na região do enxerto, quanto do *gap* e também do leito receptor. Como foram operados apenas cinco animais com sacrifício em zero hora, este grupo não foi incluído na análise estatística, mas seus valores médios estão apresentados na tabela 5.2 como valores de referência e para favorecer uma comparação visual com os resultados obtidos em 30 dias.

5.3 Resultados histométricos

As fotomicrografias apresentadas a seguir (Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4) ilustram os resultados obtidos na avaliação histométrica.

Figura 5.1 – Fotomicrografia representativa do grupo zero hora. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.

Figura 5.2 - Fotomicrografia representativa do grupo 1. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.

Figura 5.3 - Fotomicrografia representativa do grupo 2. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.

Figura 5.4 - Fotomicrografia representativa do grupo 3. Observa-se o leito receptor, o enxerto e a interface leito/enxerto. Barra corresponde a 0,5 mm.

A análise histométrica foi realizada considerando duas áreas de avaliação para cada corte histológico: lado direito e esquerdo da superfície do implante. Todas as medidas foram realizadas em ambos os lados do corte histológico e a média desses valores considerada o valor para o animal.

A análise dos dados demonstrou que o grupo 3 (alta dose) apresentou ganhos na espessura total (ET), e que essa diferença foi estatisticamente significativa (teste de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$), quando comparada com grupos 1 (controle) e 2 (baixa dose). Quando foram comparados os valores médios de espessura total entre os grupos 1 e 2, nenhuma diferença significativa foi encontrada (teste de Kruskal-Wallis, $p > 0,05$). Ao avaliar a espessura óssea total, no tempo zero hora, pudemos notar valores próximos daqueles apresentados no grupo 3, após trinta dias. Estes dados sugerem a manutenção do volume ósseo inicial com a administração de altas doses do PTH (1-34).

Resultados similares foram encontrados para o parâmetro EE. Após o período de observação de 30 dias, foram encontrados nos espécimes do grupo 3, médias com valores próximos aos iniciais, observados no grupo zero hora. Através do teste de comparação de médias ANOVA, foi possível observar que, o grupo 3 apresentou maior espessura do enxerto (EE), com valores de média maiores e diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,01$), em relação ao grupo controle e ao grupo baixa dose, que não tiveram diferença entre si ($p > 0,05$). Esses dados sugerem que o volume ósseo inicial pode ser mantido pela administração de altas doses de PTH (1-34).

Além disso, a porcentagem referente a contração do enxerto ósseo autógeno (ECE), após o período de trinta dias, pode ser observado na tabela 5.1. Nos grupos 1 e 2 pudemos verificar que houve uma contração tecidual semelhante, com uma perda de 15,91% e 20,83%, respectivamente, em relação ao volume inicial do enxerto, considerando o parâmetro ET no grupo zero hora. No grupo 3, esse evento não foi observado, mas um discreto ganho ósseo (1,21%) foi notado comparado ao grupo zero hora. A análise estatística revelou que o grupo 3 diferia dos outros grupos (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). 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 – Média e desvio padrão (DP) do parâmetro ECE, expresso em %, para os grupos 1 (controle), 2 (baixa dose) e 3 (alta dose).

	Média $\pm$DP
Grupo 1	-15,91 $\pm$ 10,13 a
Grupo 2	-20,83 $\pm$ 12,81 a
Grupo 3	1,21 $\pm$ 16,92 b

P (ANOVA) = 0,00. Tabela referente ao parâmetro ECE. Médias representativas de cada grupo, 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 indicam diferenças com significância estatística (ANOVA - pós-teste: Tukey).

Os grupos 1, 2 e 3 apresentaram valores de médias similares para os parâmetros CD e PR ($p > 0,05$). Com relação ao parâmetro histométrico contato direto osso-implante observou-se que os grupos experimentais 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA). Com relação ao parâmetro histométrico preenchimento de rosca observou-se que os grupos experimentais 1, 2 e 3 também não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA). Os resultados histométricos completos podem ser vistos na tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Resultados histométricos

Grupos	<i>ET</i> (μm)	<i>EE</i> (μm)	<i>CD</i> (%)	<i>PR</i> (%)
ZH	1.100,80 $\pm$ 399,19	487.000 $\pm$ 168.327	-	-
1	969,39 $\pm$ 248,65 a	406,753 $\pm$ 49,88 a	71,71 $\pm$ 7,94 a	80,14 $\pm$ 4,80 a
2	946,81 $\pm$ 185,68 a	383,262 $\pm$ 62,82 a	67,32 $\pm$ 12,23 a	76,42 $\pm$ 7,30 a
3	1.163,7 $\pm$ 292,37 b	493,493 $\pm$ 84,23 b	75,30 $\pm$ 6,25 a	80,75 $\pm$ 6,46 a

Médias representativas de cada grupo, 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 indicam diferenças com significância estatística ($p < 0,05$). O grupo ZH não foi incluído na análise estatística, sendo apresentado apenas como referência.

6 DISCUSSÃO

O hormônio paratireóideo (PTH 1-34) tem sido muito estudado por seus efeitos na reparação óssea (kanzawa et al., 2000; Locklin et al., 2003) e tem sido associado a benefícios no tratamento da osteoporose (Arita et al., 2004), contudo ainda há falta de informação sobre seu impacto nos procedimentos de enxertia óssea. Esse é o primeiro estudo avaliando a influencia do PTH (1-34) em enxertos ósseos autógenos *onlay* posicionados no osso mandibular. Além disso, foi possível investigar o nível de contração óssea em relação aos resultados observados no tempo zero hora. Nossos resultados sugerem que o PTH (1-34) diminui a contração do enxerto, resultando em um aumento de volume ósseo em cirurgias de reconstrução óssea. Achados similares foram encontrados em um modelo de fechamento de artrose espinal póstero-lateral (Abe et al., 2007). A confirmação desses achados, em estudos clínicos, pode ter um efeito direto na prática da implantodontia.

No presente estudo, a administração sistêmica de 40 µg/kg de PTH (1-34), 3 vezes por semana, reduziu a contração dos enxertos ósseos. Contudo, uma perda óssea de 15% e 21%, foi observada quando utilizou-se o veiculo de administração (grupo 1 - controle) e uma dose de PTH de 2 µg/kg por dia (grupo 2), respectivamente. Os resultados dos grupos 1 e 2 foram comparáveis aos apresentados pelo estudo de Jardini et al., 2005, que relataram uma perda óssea de 24% na área operada após 45 dias, quando utilizaram um modelo experimental similar.

Existem vários modelos experimentais em ratos, com o propósito de avaliar a reparação óssea e o uso de biomateriais (Reynolds et al., 2011; Takahata et al., 2012). Apesar de muitos resultados interessantes, algumas limitações têm sido observadas. Por exemplo, Jardini et al., em 2005, preconizaram uma técnica para avaliação da reparação óssea de enxertos autógenos e utilização de membrana não-reabsorvível, otimizando a formação óssea através da ROG. Inicialmente, o enxerto era posicionado com uma sutura, enquanto que em nossa metodologia foi utilizado um parafuso de titânio. Essa modificação aumentou a estabilidade do enxerto, e permitiu a investigação da reparação óssea em volta do implante de titânio no leito receptor, bem como no osso enxertado.

O processo de reparação óssea e incorporação do enxerto incluem reabsorção e remodelação do tecido ósseo (Faria et al., 2008). Após o período de cicatrização, observa-se com muita frequência uma diminuição no volume ósseo, em relação aquele encontrado no momento em que é colocado no leito cirúrgico. No estudo de Faria et al. (2008), coelhos foram sacrificados em diferentes períodos de observação, sendo que o nível de reabsorção foi mais intenso do que o de formação óssea na maioria dos tempos experimentais. Esses achados histológicos estão correlacionados com a localização imunohistoquímica de algumas moléculas. A expressão de osteopontina (OP), que promove a inserção de osteoclastos durante a reabsorção (Shapses et al., 2003), tende a aumentar a partir do período de 3 dias até o período de 10 dias. Da mesma forma, a reabsorção do osso cortical do leito receptor talvez seja um pré-requisito para o processo de angiogênese iniciar nos enxertos *onlay* (Salata et al., 2002). Esses dados estão de acordo com os nossos resultados dos grupos 2 e 3. Além disso, a administração sistêmica de 40 µg/kg de PTH (1-34) parece modificar a remodelação óssea e promover menor contração do enxerto.

A influência do PTH na angiogênese pode ser uma das maneiras pela qual o PTH aumenta a formação óssea. Angiogênese é um fator primário para a osteogênese (Pacicca et al., 2003), e uma penetração vascular precoce e nutrição do enxerto são fatores chaves para sua integração ao leito receptor (De Marco et al., 2005). Moreira et al. (2013), analisaram enxertos ósseos *onlay* em coelhos e demonstraram histologicamente (complementado por células imuno marcadoras de CD31+) que a osteogênese foi intensificada quando a angiogênese estava consolidada. Adicionalmente, Dhillon et al., 2013, examinaram os efeitos da terapia com *recombinant parathyroid hormone* (rPTH) na formação de vasos sanguíneos e integração óssea durante a reparação de enxertos alogênicos femorais. Os resultados demonstraram que o rPTH afeta a vascularização dos enxertos alogênicos logo aos 14 dias pós-operatórios, promovendo um aumento significativo no número de vasos pequenos e diminuindo a arteriogênese de vasos mais calibrosos. A produção do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma via potencial para a ação do PTH na angiogênese (Wang et al., 1996), uma vez que o crescimento vascular e ósseo parecem estar relacionados com o aumento da expressão de VEGF. Segundo Prisby et al. (2011), o PTH parece também favorecer uma maior concentração dos vasos sanguíneos nas áreas próximas aos sítios de

nova formação óssea, promovendo um microambiente mais favorável para o crescimento.

A importância da angiogênese para o efeito anabólico do PTH também tem sido investigada utilizando o inibidor de angiogênese CKD-732, em ratos jovens (4 semanas) em crescimento (Rhee et al., 2009). O tratamento com PTH (1-84), por 6 semanas, promoveu um aumento significativo no índice de massa óssea e nos níveis de marcadores de *turnover* ósseo (OC e *rat β -crosslaps*). Porém, no grupo em que o PTH foi administrado simultaneamente com o inibidor de angiogênese, houve uma redução significativa nos dados desses parâmetros, em relação ao grupo em que somente o hormônio foi utilizado. Adicionalmente, a administração intermitente de PTH num modelo em ratos, de distração osteogênica (DO), demonstrou reverter significativamente a hipovascularização, causada pela aplicação de radiação (Kang et al., 2013). Essas evidências suportam a importância da vascularização para a incorporação do enxerto, e fortemente sugerem que a formação vascular parece ser uma das vias pela qual o PTH (1-34) intensifica a reparação óssea.

Em ensaios de cultura de célula, PTH e AMPc (como mensageiro secundário) causam um aumento no número de osteoblastos, inibindo sua taxa de apoptose (Jilka et al., 1999), e também induzindo a inativação da proteína pro-apoptótica *Bad*, bem como genes de transcrição de sobrevivência como o Bcl-2 (Nagase et al., 2010). Em ratos, a administração de PTH (1-34) por 4 semanas, promoveu uma diminuição na apoptose de osteoblastos e aumentou a formação óssea (Alkhiary et al., 2005). Um estudo de Skripitz et al. (2005) determinou que o PTH (1-34) apresenta um efeito anti-reabsorção óssea pela ação na estimulação de osteoblastos. Isso está relacionado com o aumento na diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Skripitz; Aspenberg, 2004). O aumento da formação óssea induzida pelo PTH tem sido associado com a ativação de células de revestimento preexistentes em osteoblastos (Dobnig; Turner, 1995). Além disso, a sinalização com o receptor de PTH relacionado com peptídeo tipo 1 nos osteócitos parece ser um pré-requisito para a remodelação óssea (Saini et al., 2013).

A ação anabólica do paratormônio tem demonstrado variações inter-esqueletais, entre ossos, e intra-esqueletais, dentro dos compartimentos cortical e medular (Lida-Klein et al., 2002; Bellido et al., 2003). É reconhecido que a morfologia e características histológicas do sitio cirúrgico influenciam a resposta óssea anabólica. As informações sobre a ação da aplicação sistêmica de PTH (1-34) na

reparação de enxertos ósseos foram fornecidos por estudos que utilizaram tíbia, fêmur e úmero como sítios cirúrgicos (Daugaard et al., 2011b; Reynolds et al., 2011; Takahata et al., 2012). Não encontramos estudos avaliando a influência do PTH (1-34) na reparação óssea de enxertos ósseos autógenos em bloco, no complexo maxilo-mandibular. Isto pode ser um fator importante a ser considerado na aplicabilidade desse hormônio em futuras técnicas para o aumento de rebordo ósseo e reconstruções cirúrgicas na cavidade oral.

As características do sitio experimental utilizado neste estudo, que é predominantemente composto por osso cortical, parecem estar relacionadas com o fato da administração sistêmica de PTH (1-34) não ter influenciado os resultados obtidos no parâmetro contato osso/implante. A ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos também pode ser observado no parâmetro preenchimento de rosca, sendo que alguns autores sugerem haver uma influência das forças de fixação biomecânica sobre o tipo de tecido ósseo com (Li et al., 2013). Estudos prévios, já reportaram que os efeitos do PTH (1-34) ao redor de implantes de titânio são menos intensos no osso cortical (Mair et al., 2009; Kuchler et al., 2011b; Almagro et al., 2013).

Mair et al. (2009) analisaram a osseointegração na tíbia de ratos, onde foram relacionadas as variáveis idade do animal (2 e 8 meses) e efeito da administração sistêmica do PTH (60 µg de teriparatida por 4 semanas, 3 vezes por semana). Considerando o parâmetro contato osso/implante, observou-se que a variável idade não influenciou os resultados obtidos após o término do estudo, ao passo que pode ser observado um aumento significativo estatisticamente da osseointegração no grupo do PTH, com relação ao grupo controle, quando avaliou-se o compartimento ósseo medular. Para a região cortical da tíbia, não houve influência dessa variável para esse parâmetro. Da mesma forma, Almagro et al. (2013) estudaram o efeito do PTH na reparação óssea ao redor dos implantes inseridos em coelhos. A análise histométrica mostrou um maior aumento na massa óssea peri-implantar entre as roscas inseridas no compartimento de osso medular, que confirmaram que o efetividade da administração do PTH em melhorar a reparação óssea em áreas de osso esponjoso. Seguindo a mesma metodologia, Kuchler et al. (2011b) analisaram ratos diabéticos e ratos controle. Os animais foram divididos em quatro grupos de tratamento: controle, controle + PTH, diabéticos, diabéticos + PTH. Ao avaliar os parâmetros contato osso/implante e volume ósseo/volume tecidual em implantes

inseridos na tíbia, os resultados foram melhores com diferenças estatísticas, apenas no compartimento de osso medular. Quando foram comparados estatisticamente os parâmetros histométricos na área de osso cortical, os resultados encontrados entre os grupos foram similares.

O presente estudo utilizou doses de 2 µg/kg e 40 µg/kg. A dose de 40 µg/kg foi baseada em um estudo inicial que avaliou carcinogênese em ratos (Tashjian; Goltzman, 2008) e também em estudos de reparação óssea (Reynolds et al., 2011; Takahata et al., 2012). A dose alternativa de 2 µg/kg foi investigada devido ao fato de ser mais próxima daquela usada clinicamente em humanos, e aprovada pela FDA (20 µg/dia). Além disso, quanto menor a dose e período de administração, menor é a chance de encontrarmos efeitos colaterais.

Os estudos em animais avaliando a administração sistêmica de PTH (1-34) têm utilizado várias dosagens diferentes. A aplicação de baixas doses (0,4 e 4 µg/kg) não tem demonstrado diferenças significativas na reparação óssea quando parâmetros radiográficos, histológicos e biomecânicos foram avaliados (Takahata et al., 2012). As doses citadas acima foram avaliadas em ratos, por 2, 4 e 9 semanas, utilizando enxertos alográficos, em defeitos ósseos de sítios no fêmur. Para doses de 5 µg/kg, foi observada uma maior área de tecido ósseo imaturo na interface do implante quando administrado PTH (1-34), com diferenças estatisticamente significante com relação ao grupo controle (Daugaard et al., 2011a). Para enxertos ósseos alográficos, doses intermediárias (20 µg/kg) têm demonstrado maior volume ósseo peri-implantar ao utilizar PTH (Fahlgren et al., 2013). Em geral, para os parâmetros analisados na osseointegração, doses entre 40 a 60 µg/kg têm apresentado resultados significativos previsíveis (Mair et al., 2009; Kuchler et al., 2011b). Esses dados estão de acordo com os resultados encontrados em nosso estudo, onde a dosagem de 40 µg/kg demonstrou influenciar a remodelação óssea positivamente, sugerindo ser uma alternativa para manter o volume ósseo original e impedir a contração do enxerto. Em contrapartida, observamos que, após o período de 4 semanas, a dosagem de 2 µg/kg não favoreceu a reparação óssea no modelo experimental presente. Contudo, mais estudos são necessários para investigar o impacto da aplicação dessa dosagem, em outras pesquisas com animais e modelos diferentes.

7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- 1- A administração sistêmica de doses de 40 µg/kg de PTH (1,34) promoveu um maior volume ósseo final, após o período de trinta dias, diminuindo a contração do enxerto durante a remodelação óssea.
- 2- A administração sistêmica de doses de 2 µg/kg de PTH (1-34) parece não ter influenciado nenhum parâmetro avaliado neste modelo experimental.

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(5):775-85.

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

Akerström G, Hellman P, Hessman O, Segersten U, Westin G. Parathyroid glands in calcium regulation and human disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Apr;1040:53-8.

Alkhiary YM, Gerstenfeld LC, Krall E, Westmore M, Sato M, Mitlak BH, Einhorn TA. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Apr;87(4):731-41.

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.

Alonso V, de Gortázar AR, Ardura JA, Andrade-Zapata I, Alvarez-Arroyo MV, Esbrit P. Parathyroid hormone-related protein (107-139) increases human osteoblastic cell survival by activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *J Cell Physiol*. 2008 Dec;217(3):717-27.

Araujo MG, Sonohara M, Hayacibara R, Cardaropoli G, Lindhe J. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog. *J Clin Periodontol*. 2002;29(12):1122-31.

Arita S, Ikeda S, Sakai A, Okimoto N, Akahoshi S, Nagashima M, Nishida A, Ito M, Nakamura T. Human parathyroid hormone (1-34) increases mass and structure of the cortical shell, with resultant increase in lumbar bone strength, in ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab*. 2004;22(6):530-40.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Arnaud CD, Jr., Tenenhouse AM, Rasmussen H. Parathyroid hormone. *Annu Rev Physiol.* 1967, 29:349-72.

Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, García-Hernández PA, Recknor CP, Einhorn TA, Dalsky GP, Mitlak BH, Fierlinger A, Lakshmanan MC. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with +distal radial fractures. *J Bone Miner Res.* 2010 Feb;25(2):404-14.

Ba J, Brown D, Friedman PA. Calcium-sensing receptor regulation of PTH-inhibitable proximal tubule phosphate transport. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003 Dec;285(6):1233-43.

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.

Bashutski JD, Kinney JS, Benavides E, Maitra S, Braun TM, Giannobile WV, McCauley LK, Eber RM. Systemic teriparatide administration promotes osseous regeneration of an intrabony defect: a case report. *Clin Adv Period.* 2012, 2(2); 66-71.

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.

Bauer W, Aub JC, Albright F. Studies of calcium and phosphorus metabolism: V. A study of the bone trabeculae as a readily available reserve supply of calcium. *J Exp Med.* 1929 Jan;49(1):145-62.

Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. 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 Dec 12;278(50):50259-72.

Bikle DD, Wang Y. Insulin like growth factor-I: a critical mediator of the skeletal response to parathyroid hormone. *Curr Mol Pharmacol.* 2012 Jun;5(2):135-42.

Body JJ, Gaich GA, Scheele WH, Kulkarni PM, Miller PD, Peretz A, Dore RK, Correa-Rotter R, Papaioannou A, Cumming DC, Hodsman AB. 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.

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

Brown EM. Physiology and pathophysiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Am J Med.* 1999 Feb;106(2):238-53.

Buser D, Dula K, Belser UC, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. II. Surgical procedure in the mandible. *Int J Periodontics Restorative 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; discussion 32-3.

Canalis E. Effect of insulinlike growth factor I on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *J Clin Invest.* 1980 Oct;66(4):709-19.

Corsini MS, Faraco FN, Castro AA, Onuma T, Sendyk WR, Shibli JA. Effect of systemic intermittent administration of human parathyroid hormone(rhPTH[1-34]) on the resistance to reverse torque in rabbit tibiae. *J Oral Implantol.* 2008;34(6):298-302.

Cranney A , Papaioannou A, Zytaruk N, Hanley D, Adachi J, Goltzman D, Murray T, Hodsman A. Parathyroid hormone for the treatment of osteoporosis: a systematic review. *CMAJ.* 2006 July; 175(1): 52–9.

Daugaard H, Elmengaard B, Andreassen TT, Baas J, Bechtold JE, Soballe K. The combined effect of parathyroid hormone and bone graft on implant fixation. *J Bone Joint Surg Br.* 2011a Jan;93(1):131-9.

Daugaard H, Elmengaard B, Andreassen T, Bechtold J, Lamberg A, Soballe K. Parathyroid hormone treatment increases fixation of orthopedic implants with gap healing: a biomechanical and histomorphometric canine study of porous coated titanium alloy implants in cancellous bone. *Calcif Tissue Int.* 2011b Apr;88(4):294-303.

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, Portal-Núñez S, Maycas M, De la Fuente M, Caeiro JR, Esbrit P. Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol*. 2012 Apr; 227(4):1752-60.

De Marco AC, Jardini MA, Lima LP. Revascularization of autogenous block grafts with or without an e-PTFE membrane. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005; 20(6):867-74.

Deal C, Gideon J. Recombinant human PTH 1-34 (Forteo): an anabolic drug for osteoporosis. *Cleve Clin J Med*. 2003 Jul;70(7):585-6, 589-90, 592-4 passim.

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. Normal human osteoclasts formed from peripheral blood monocytes express PTH type 1 receptors and are stimulated by PTH in the absence of osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2005 May 1;95(1):139-48.

Dhillon RS, Xie C, Tyler W, Calvi LM, Awad HA, Zuscik MJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM. PTH-enhanced structural allograft healing is associated with decreased angiopoietin-2-mediated arteriogenesis, mast cell accumulation, and fibrosis. *J Bone Miner Res*. 2013; 28(3):586-97.

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

Egan JJ, Gronowicz G, Rodan GA. Parathyroid hormone promotes the disassembly of cytoskeletal actin and myosin in cultured osteoblastic cells: mediation by cyclic AMP. *J Cell Biochem*. 1991 Jan;45(1):101-11.

Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H, Jørgensen PH, Bak B, Häggblad J, Tørring O, Nilsson MH. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. *J Bone Miner Res*. 1993 Sep;8(9):1097-101.

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

Fahlgren A, Yang X, Ciani C, et al. The effects of PTH, loading and surgical insult on cancellous bone at the bone-implant interface in the rabbit. *Bone.* 2013 Feb; 52(2):718-24.

Fall PM, Breault DT, Raisz LG. Inhibition of collagen synthesis by prostaglandins in the immortalized rat osteoblastic cell line Py1a: structure-activity relations and signal transduction mechanisms. *J Bone Miner Res.* 1994 Dec; 9(12):1935-43.

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.

Forero MS, Klein RF, Nissenson RA, Nelson K, Heath H 3rd, Arnaud CD, Riggs BL. Effect of age on circulating immunoreactive and bioactive parathyroid hormone levels in women. *J Bone Miner Res.* 1987; 2:363–66.

Girotra M, Rubin MR, Bilezikian JP. The use of parathyroid hormone in the treatment of osteoporosis. *Endocr Metab Disord.* 2006 Jun; 7(1-2):113-21.

Hashimoto T, Shigetomi M, Ohno T, Matsunaga T, Muramatsu K, Tanaka H, Sugiyama T, Taguchi T. Sequential treatment with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34) and bisphosphonate enhances large-size skeletal reconstruction by vascularized bone transplantation. *Calcif Tissue Int.* 2007; 81(3):232-9.

Hock JM, Gera I. Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. *Bone Miner Res.* 1992 Jan; 7(1):65-72.

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

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.

Jardini MA, 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(6):666-73.

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(4):439-46.

Jilka RL. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.* 2007 Jun;40(6):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; 34:929-40.

Kang SY, Deshpande SS, Donneys A, Rodriguez JJ, Nelson NS, Felice PA, Chepeha DB, Buchman SR. Parathyroid hormone reverses radiation induced hypovascularity in a murine model of distraction osteogenesis. *Bone.* 2013 Sep; 56(1):9-15.

Kanzawa M, Sugimoto T, Kanatani M, Chihara K. Involvement of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor in the stimulation of osteoclast formation by parathyroid hormone in mouse bone cells. *Eur J Endocrinol.* 2000; 142(6):661-4.

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

Krempien B, Friedrich E, Ritz E. Effect of PTH on osteocyte ultrastructure. *Adv Exp Med Biol.* 1978; 103:437-450.

Krishnan V, Moore TL, Ma YL, Helvering LM, Frolik CA, Valasek KM, Ducy P, Geiser AG. Parathyroid hormone bone anabolic action requires Cbfa1/Runx2-dependent signaling. *Mol Endocrinol.* 2003 Mar; 17(3):423-35.

Kuchler U, Luvizuto ER, Tangl S, Watzek G, Gruber R. Short-term teriparatide delivery and osseointegration: a clinical feasibility study. *J Dent Res.* 2011a Aug; 90(8):1001-6.

Kuchler U, Spilka T, Baron K, Tangl S, Watzek G, Gruber R. Intermittent parathyroid hormone fails to stimulate osseointegration in diabetic rats. *Clin Oral Implants Res.* 2011b May; 22(5):518-23.

Lane NE, Thompson JM, Strewler GJ, Kinney JH. Intermittent treatment with human parathyroid hormone (hPTH[1-34]) increased trabecular bone volume but not connectivity in osteopenic rats. *J Bone Miner Res.* 1995 Oct; 10(10):1470-7.

Lee C, Gardella TJ, Abou-Samra AB, Nussbaum SR, Segre GV, Potts JT Jr, Kronenberg HM, Jüppner H. Role of the extracellular regions of the parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor in hormone binding. *Endocrinology.* 1994 Oct; 135(4):1488-95.

Lehman RA Jr, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Helgeson MD, Christensen CL, Raymond JW, Eckel TT, Riew KD. Effect of teriparatide [rhPTH(1,34)] and calcitonin on intertransverse process fusion in a rabbit model. *Spine (Phila Pa 1976).* 2010 Jan 15; 35(2):146-52.

Li YF, Li XD, Bao CY, Chen QM, Zhang H, Hu J. Promotion of peri-implant bone healing by systemically administered parathyroid hormone (1-34) and zoledronic acid adsorbed onto the implant surface. *Osteoporos Int.* 2013 Mar; 24(3):1063-71.

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

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.

Linkhart TA, Mohan S. Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. *Endocrinology.* 1989 Sep; 125(3):1484-91.

Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem.* 2003 May; 89(1):180-90.

Lozano D, Fernández-de-Castro L, Portal-Núñez S, López-Herradón A, Dapía S, Gómez-Barrena E, Esbrit P. The C-terminal fragment of parathyroid hormone-related peptide promotes bone formation in diabetic mice with low-turnover osteopaenia. *Br J Pharmacol*. 2011 Mar; 162(6):1424-38.

Ma YL, Zeng Q, Donley DW, Ste-Marie LG, Gallagher JC, Dalsky GP, Marcus R, Eriksen EF. Teriparatide increases bone formation in modeling and remodeling osteons and enhances IGF-II immunoreactivity in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2006 Jun; 21(6):855-64.

Madore GR, Sherman PJ, Lane JM. Parathyroid hormone. *J Am Acad Orthop Surg*. 2004 Mar-Apr; 12(2):67-71.

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.

Mair B, Tangl S, Feierfeil J, Skiba D, Watzek G, Gruber R. Age-related efficacy of parathyroid hormone on osseointegration in the rat. *Clin Oral Implants Res*. 2009 Apr; 20(4):400-5.

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

Marx RE. Bone and bone graft healing. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2007 Nov; 19(4): 455-66.

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

Moreira DC, Sá CN, Andrade MG, Bório dos Santos Calmon de Bittencourt TC, de Almeida Reis SR, Pithon MM, Sadigursky M. Angiogenesis and osteogenesis at incorporation process of onlay bone graft. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71(12):2048-57.

Morley P, Whitfield JF, Ross V, Preston E, Soska M, Barbier JR, Isaacs RJ, Maclean S, Ohannessian-Barry L, Willick GE. The hypotensive actions of osteogenic and nonosteogenic parathyroid hormone fragments. *Calcif Tissue Int*. 1997 Mar; 60(3):302-8.

Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringham FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. *Endocr Rev.* 2005 Feb; 26(1):78-113.

Nagase Y, Iwasawa M, Akiyama T, Ogata N, Kadono Y, Nakamura M, Oshima Y, Yasui T, Matsumoto T, Masuda H, Bouillet P, Nakamura K, Tanaka S. Antiapoptotic molecule Bcl-2 is essential for the anabolic activity of parathyroid hormone in bone. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1192:330-7.

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 May 10; 344(19):1434-41.

Nemeth EF, Wallace J, Scarpa A. Stimulus-secretion coupling in bovine parathyroid cells. Dissociation between secretion and net changes in cytosolic Ca^{2+} . *J Biol Chem.* 1986 Feb 25; 261(6):2668-74.

Pacicca DM, Patel N, Lee C, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone.* 2003; 33(6):889-98.

Potts JT Jr, Tregear GW, Keutmann HT, Niall HD, Sauer R, Deftos LJ, Dawson BF, Hogan ML, Aurbach GD. Synthesis of a biologically active N-terminal tetratriacontapeptide of parathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971 Jan; 68(1):63-7.

Prisby R, Guignandon A, Vanden-Bossche A, Mac-Way F, Linossier MT, Thomas M, Laroche N, Malaval L, Langer M, Peter ZA, Peyrin F, Vico L, Lafage-Proust MH. Intermittent PTH(1-84) is osteoanabolic but not osteoangiogenic and relocates bone marrow blood vessels closer to bone-forming sites. *J Bone Miner Res.* 2011; 26(11):2583-96.

Proussaefs P, Lozada J. The use of intraorally harvested autogenous block grafts for vertical alveolar ridge augmentation: a human study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005; 25(4):351-63.

Pugsley LI. The effect of parathyroid hormone and of irradiated ergosterol on calcium and phosphorous metabolism in the rat. *J Physiol.* 1932 Nov 5; 76(3):315-28.

Qin L, Raggatt LJ, Partridge NC. Parathyroid hormone: a double-edged sword for bone metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Mar; 15(2):60-5.

Qiu Z, Wei L, Liu J, Sochacki KR, Liu X, Bishop C, Ebraheim M, Yang H. Effect of intermittent PTH (1-34) on posterolateral spinal fusion with iliac crest bone graft in an ovariectomized rat model. *Osteoporos Int.* Oct; 24(10):2693-700.

Raue F, Haag C, Schulze E, Frank-Raue K. The role of the extracellular calcium-sensing receptor in health and disease. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006 Sep; 114(8):397-405.

Reeve J, Hesp R, Williams D, Hulme P, Klenerman L, Zanelli JM, Darby AJ, Tregear GW, Parsons JA. Anabolic effect of low doses of a fragment of human parathyroid hormone on the skeleton in postmenopausal osteoporosis. *Lancet.* 1976 May 15; 1(7968):1035-8.

Reynolds DG, Takahata M, Lerner AL, O'Keefe RJ, Schwarz EM, Awad HA. Teriparatide therapy enhances devitalized femoral allograft osseointegration and biomechanics in a murine model. *Bone.* 2011 Mar 1; 48(3):562-70.

Rhee Y, Park SY, Kim YM, Lee S, Lim SK. Angiogenesis inhibitor attenuates parathyroid hormone-induced anabolic effect. *Biomed Pharmacother.* 2009; 63(1):63-8.

Rosenblatt M, Segre GV, Tyler GA, Shepard GL, Nussbaum SR, Potts JT Jr. Identification of a receptor-binding region in parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1980 Aug; 107(2):545-50.

Saini V, Marengi DA, Barry KJ, Fulzele KS, Heiden E, Liu X, Dedic C, Maeda A, Lotinun S, Baron R, Pajevic PD. Parathyroid hormone (PTH)/PTHrelated peptide type 1 receptor (PPR) signaling in osteocytes regulates anabolic and catabolic skeletal responses to PTH. *J Biol Chem.* 2013; 288(28):20122-34.

Salata LZ, Rasmusson L, Kahnberg KE. Effects of a mechanical barrier on the integration of cortical onlay bone grafts placed simultaneously with endosseous implant. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2002;4 (2):60-8.

Satow S, Slagter AP, Stoelinga PJ, Habets LL. Interposed bone grafts to accommodate endosteal implants for retaining mandibular overdentures. A 1-7 year follow-up study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997; 26(5):358-64.

Schwarz P, Hyldstrup L, Transbøl I. Cica clamp evaluation of parathyroid responsiveness in chronic hypoparathyroidism: a sequential citrate and calcium clamp study. *Miner Electrolyte Metab.* 1994; 20(3):135-40.

Schwarz P. Dose response dependency in regulation of acute PTH (1-84) release and suppression in normal humans: a citrate and calcium infusion study. *Scand J Clin Lab Invest.* 1993 Oct; 53(6):601-5.

Selye H. On the stimulation of new bone-formation with parathyroid extract and irradiated ergosterol. *Endocrinology.* 1932 Sep-Oct; 16(5):547-58.

Sennerby L, Roos J. Surgical determinants of clinical success of osseointegrated oral implants: a review of the literature. *Int J Prosthodont.* 1988 Sep-Oct; 11(5):408-20.

Shapses SA, Cifuentes M, Spevak L, et al. Osteopontin facilitates bone resorption, decreasing bone mineral crystallinity and content during calcium deficiency. *Calcif Tissue Int.* 2003; 73(1):86-92.

Shen V, Dempster DW, Mellish RW, Birchman R, Horbert W, Lindsay R. Effects of combined and separate intermittent administration of low-dose human parathyroid hormone fragment (1-34) and 17 beta-estradiol on bone histomorphometry in ovariectomized rats with established osteopenia. *Calcif Tissue Int.* 1992 Mar; 50(3):214-20.

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

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

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

Skripitz R, Andreassen TT, Aspenberg P. Parathyroid hormone (1-34) increases the density of rat cancellous bone in a bone chamber. A dose-response study. *J Bone Joint Surg Br.* 2000 Jan; 82(1):138-41.

Skripitz R, Aspenberg P. Parathyroid hormone--a drug for orthopedic surgery? *Acta Orthop Scand*. 2004 Dec; 75(6):654-62.

Sneddon WB, Magyar CE, Willick GE, Syme CA, Galbiati F, Bisello A, Friedman PA. Ligand-selective dissociation of activation and internalization of the parathyroid hormone (PTH) receptor: conditional efficacy of PTH peptide fragments. *Endocrinology*. 2004 Jun; 145(6):2815-23.

Takahata M, Schwarz EM, Chen T, O'Keefe RJ, Awad HA. Delayed short-course treatment with teriparatide (PTH(1-34)) improves femoral allograft healing by enhancing intramembranous bone formation at the graft-host junction. *J Bone Miner Res*. 2012 Jan; 27(1):26-37.

Talmage RV, Doppelt SH, Fondren FB. An interpretation of acute changes in plasma ⁴⁵Ca following parathyroid hormone administration to thyroparathyroidectomized rats. *Calcif Tissue Res*. 1976 Dec 22; 22(2):117-28.

Tashjian AH Jr, Goltzman D. On the interpretation of rat carcinogenicity studies for human PTH(1-34) and human PTH(1-84). *J Bone Miner Res*. 2008; 23(6):803-11.

Tazawa K, Hoshi K, Kawamoto S, Tanaka M, Ejiri S, Ozawa H. Osteocytic osteolysis observed in rats to which parathyroid hormone was continuously administered. *J Bone Miner Metab*. 2004; 22:524-529.

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; 30:312-321.

Wang DS, Yamazaki K, Nohtomi K, Shizume K, Ohsumi K, Shibuya M, Demura H, Sato K. Increase of vascular endothelial growth factor mRNA expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res*. 1996; 11(4):472-9.

Watson P, Lazowski D, Han V, Fraher L, Steer B, Hodsman A. Parathyroid hormone restores bone mass and enhances osteoblast insulin-like growth factor I gene expression in ovariectomized rats. *Bone*. 1995; 16:357-365.

Yang D, Singh R, Divieti P, Guo J, Bouxsein ML, Bringhurst FR. Contributions of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling pathways to the anabolic effect of PTH on bone. *Bone*. 2007 Jun; 40(6):1453-61.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 March 31; 95(7): 3597–3602.

ANEXO – Parecer da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – ICB/USP).

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 **012** nas fls. **99** 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 *"Influência de diferentes doses de PTH sintético (1-34) sobre a reparação de enxertos ósseos autógenos. Estudo em ratos"* do qual participam o(s) alunos **Rodrigo Albuquerque Basílio dos Santos** e o pesquisador **Luís Antônio Pugliesi Alves 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 **29.03.2011**, com validade de **1 anos**.

São Paulo, 29 de março de 2011.

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

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