

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

LUÍS HENRIQUE THEODORO ALVES

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA E MICROTOMOGRÁFICA DA REPARAÇÃO
ÓSSEA EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATAS
OSTEOPORÓTICAS PREENCHIDOS COM A ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E
OSSO BOVINO PARTICULADO**

**Alfenas/MG
2019**

LUÍS HENRIQUE THEODORO ALVES

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA E MICROTOMOGRÁFICA DA REPARAÇÃO
ÓSSEA EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATAS
OSTEOPORÓTICAS PREENCHIDOS COM A ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E
OSSO BOVINO PARTICULADO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

**Alfenas/MG
2019**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

A474a Alves, Luís Henrique Theodoro.
Avaliação histométrica e microtomográfica da reparação óssea em defeitos de tamanho críticos em calvárias de ratas osteoporóticas preenchidos com a associação de doxiciclina e osso bovino particulado / Luís Henrique Theodoro Alves - Alfenas/MG, 2019.
118 f.: il. --

Orientador: Ronaldo Célio Mariano.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Osteoporose. 2. Doxiciclina. 3. Reparação Óssea. 4. Osso Bovino. 5. Biomaterial. 6. Ovariectomia. I. Mariano, Ronaldo Célio. II. Título.
CDD-617.693



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG. CEP 37130-001



LUÍS HENRIQUE THEODORO ALVES

AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA E MICROTOMOGRÁFICA DA REPARAÇÃO ÓSSEA EM DEFEITOS DE TAMANHO CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATAS OSTEOPORÓTICAS PREENCHIDOS COM A ASSOCIAÇÃO DE DOXICICLINA E OSSO BOVINO PARTICULADO

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 11/03/19

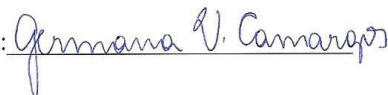
Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Germana de Villa Camargos
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia
UFU

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

À Deus

Gratidão eterna por todas as graças a mim concedidas, como és bom e amável para comigo. Agradeço pela minha vida, por minha família e por me permitir realizar e aprender tantas atividades e ainda lhe servir. Obrigado Senhor pelos dons da Sabedoria e Fortaleza que me guiam nas escolhas e fortalecem diante das dificuldades e problemas. Agradeço por manter a minha Fé renovada e me fazer crer cada vez mais em Ti e saber que o seu Amor e Compaixão são infinitos.

A meus Pais,

Os meus alicerces e guias que transbordam amor e carinho. Exemplos de verdadeiros Cristãos que não medem esforços para levar alegria e felicidade a todos. Obrigado por todos os ensinamentos, por mostrarem o caminho da verdade, da justiça, do amor e da honestidade. E que a busca pelos Sonhos é feita com perseverança, amor e trabalho. Eterno reconhecimento por tudo que fizeram e fazem pela minha vida e família. Somente amparado por pessoas sabias e humanas como vocês é que pude me tornar um homem justo, digno e temente a Deus.

“Filhos, obedecem a seus pais no Senhor, pois isso é justo. Honra teu pai e tua mãe - para que tudo te corra bem e tenhas longa vida sobre a terra”.

Efésios 6:1-3

A meus Irmãos,

Gratidão aos meus irmãos, **Maysa, Luciana e Daniel**, por me apoiarem e incentivarem a lutar pelos meus objetivos e entenderem a minha ausência. Agradeço em especial a **Maysa** por ter me apoiado a iniciar o Mestrado, o auxílio nas revisões e a dividir comigo a responsabilidade em administrar a empresa de nosso Pai, só assim pude continuar a sonhar e chegar até ao final desta etapa. Saudades da minha querida irmã **Waldete**, que por vontade Divina não pode acompanhar aqui na terra esta conquista, mas tenho certeza que sempre esteve presente no meu caminhar.

A minha Esposa,

Agradeço a minha Esposa, **Patrícia**, pelo amor e respeito, pelo entendimento e aceitação das minhas ausências e dedicação aos estudos. Graças a isso, pude ser um exemplo vivo para

os nossos filhos e mostrar-lhes que vale muito o aprender, a busca pelo conhecimento. Meu amor, você sempre está presente nas minhas orações e peço a Deus para continuar a nos manter unidos em uma só carne e que nosso amor se renove e perpetue sendo o alicerce desta maravilhosa família que formamos.

Aos meus Filhos,

Amor incondicional e único para os meus queridos filhos, **Luís Gustavo e Larissa**; vocês são os maiores presentes de Deus. Todas as minhas ações são realizadas pensando na felicidade e alegria de vocês. Obrigado por existirem em minha vida e por aceitarem as minhas escolhas.

Aos meus amigos e colegas de mestrado,

Tive o privilégio de ter cursado um ano como aluno especial e ter feito inúmeras amizades com os mestrandos de 2016, tenham certeza que aprendi muito com todos vocês e saudades e gratidão ficaram para sempre.

Aos colegas de mestrado da turma de 2017, ficará guardado todos os momentos vividos juntos e o mais importante a amizade que iniciamos e continuará pela vida.

Agradecimento especial aos colegas **Giovanni e Guilherme**, que graças ao nosso projeto de pesquisa em comum, nos proporcionou momentos inesquecíveis de amizade e companheirismo e nos uniu por um objetivo único. Fomos privilegiados ao trabalharmos juntos e termos compartilhado as responsabilidades e dificuldades. Peço-lhes desculpas por alguma falha, mas o que prevalecerá será sempre o carinho e amizade por vocês.

A minha cunhada Mariana,

Obrigado pela ajuda em inúmeras cirurgias, sempre disposta e alegre para servir. Nunca esquecerei da ajuda e amizade.

A Profa. Dra. Germana Camargos,

Agradeço imensamente a ajuda e a confiança depositada em mim, o incentivo e as oportunidades proporcionadas. Sua sabedoria e disponibilidade sempre me surpreenderam e pude perceber que você carrega consigo a verdadeira essência da docência, ensinar e motivar o aluno a busca pelo desconhecido. Apesar da sua ausência na instituição, sempre se empenhou ao máximo para que pudesse concluir o trabalho. Além de tudo proporcionou o meu primeiro

aceite para a uma publicação científica. Serei muito grato por tudo e guardarei somente boas recordações enquanto estivemos juntos na UNIFAL.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano;

Professor, nunca esquecerei tudo o que fez por mim, eterna gratidão e reconhecimento pelo seu carinho, amizade e pelos ensinamentos. Ficaré na memória o meu primeiro dia na Instituição em que me aceitou como aluno especial do mestrado, sem mesmo me conhecer e ter me acolhido com tamanho carinho e atenção. Depois outro presente, ter aceitado ser meu orientador e ter permitido desenvolver um projeto de pesquisa tão importante e sério.

Pude ver também o quanto é generoso e humano se preocupando com o próximo e sempre disposto a ajudar os que necessitam da sua ajuda. Agradeço pela disponibilidade e interesse em me orientar, a me corrigir e ensinar o caminho correto. Espero ter podido corresponder às expectativas em mim depositadas e tenha certeza que sempre busquei fazer o melhor. Esta minha passagem aqui pela UNIFAL ficará marcada por toda a minha vida, e pude realizar um sonho de estudar nesta tão conceituada Instituição e o senhor sem dúvida é uma das pessoas que colaboraram para que isso pudesse acontecer. Deus lhe pague muito e continue a lhe proteger e derramar bênçãos em você e toda a sua família.

Também agradeço, à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia pela parceria na realização das captações microtomográficas, na pessoa do **Prof. Dr. Carlos José Soares e a Profa. Dra. Priscilla Barbosa Ferreira Soares**, que permitiram a continuidade da pesquisa.

Agradeço sinceramente, à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Junior**, pela oportunidade de cursar o Mestrado e realizar este trabalho.

Estendo também os agradecimentos ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** e todo o corpo docente por todos ensinamentos e disponibilidade.

Meus sinceros agradecimentos também ao **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann** que me recebeu com muito carinho e amizade. Sempre procurando ensinar com dedicação, profissionalismo e competência.

A **Profa. Dra. Marina Reis Oliveira** pelos ensinamentos e confiança, durante o período em que coordenou a disciplina de Cirurgia.

Ao **Prof. Dr. Luciano Henrique de Jesus** pela oportunidade, amizade e ensinamentos durante a sua passagem pela disciplina de Cirurgia, pude também ter um grande aprendizado com você.

Ao **Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes** por todas as orientações, ensinamentos e conselhos, desde o início quando ministrou a disciplina de *Atenção à Saúde do Idoso*, pude perceber que sempre se preocupou em transcender a pesquisa científica para a prática clínica. Seus questionamentos e sugestões quando membro da banca de Qualificação foram muito válidos e proveitosos, guardarei boas lembranças, gratidão e carinho.

A **Profa. Dra. Juliana Santos Neves**, pelo auxílio e orientação durante a análise histológica e também como membro da banca de Qualificação, sua disponibilidade, generosidade e conhecimento nunca serão esquecidos.

A **Fabiana Kühne (UNICAMP)**, bióloga responsável pelo Laboratório Multiusuário de Biologia Celular e Molecular do CEPID OCRC no Instituto de Biologia da UNICAMP, profissional que muito me ajudou nas análises microtomográficas, extrema conhecedora desta difícil técnica e que não poupou tempo e esforços para compartilhar seus conhecimentos; sempre me recebeu com muito carinho e atenção, eterna gratidão.

As funcionárias da Clínica de cirurgia, **Valdilene e Dayane** pela amizade e companheirismo, sempre dispostas a me ajudar e alegres em servir.

Aos **funcionários do Biotério Central da UNIFAL**, pela ajuda e disponibilidade durante a fase experimental da pesquisa.

Aos **alunos da graduação** pela convivência e carinho, tenham certeza que aprendi muito com vocês e pude ver a importância do “docente” no aprendizado do aluno.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A osteoporose é uma doença crônica esquelética que provoca desequilíbrio no processo de reparação óssea, intensificando a atividade osteoclástica e provocando aumento na fragilidade óssea. A Doxíciclina possui a propriedade de inibir a osteoclastogênese em situações de normalidade no metabolismo ósseo. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação local da Doxíciclina, na forma de gel, associada ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss®) sobre a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratas osteoporóticas, por meio de análise microtomográfica e histométrica. De um total de 58 animais com aproximadamente 8 semanas de idade, pesando entre 180 a 300g, quarenta e quatro foram submetidos à cirurgia de ovariectomia (OVX) e outros 14 animais foram submetidos a falsas cirurgias (SHAM-ovariectomia), na qual os ovários foram apenas expostos, e reposicionados no local de origem. Oito animais foram utilizados para validar o modelo de caracterização da osteoporose, sendo 4 OVX e 4 SHAM. Um defeito de 6 mm de diâmetro foi confeccionado com trefina na calvária dos animais e estes foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 10 animais, de acordo com o tratamento recebido: SHAM (Ovariectomia fictícia); OVX-CS (Coágulo sanguíneo); OVX-DOX (Doxiciclina); OVX-BIO (Bio-Oss®); OVX-BODOX (Bio-Oss® associado à Doxíciclina). Cinco animais de cada grupo foram submetidos a eutanásia nas 4 e 8 semanas de pós-operatório. Nas análises microtomográfica e histométrica, foram calculados a neoformação óssea na região do defeito. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados da análise microtomográfica mostraram que o volume ósseo (BV) neoformado, no período de 4 semanas, foi estatisticamente maior no grupo OVX-BIO (6.0300 mm^3) quando comparada aos demais grupos ($p < 0,05$). No período de 8 semanas, os grupos OVX-DOX (3.2035 mm^3), OVX-BODOX (3.2435 mm^3) e OVX-BIO (5.5041 mm^3) foram estatisticamente maiores que o grupo controle SHAM ($p < 0,05$). Na análise histométrica, no período de 4 semanas, a área de osso neoformado (AO) do grupo OVX-BIO (13.592 %) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que os demais grupos. No período de 8 semanas, os grupos OVX-DOX (9,542 %), OVX-BIO (10,420 %) e OVX-BODOX (4,708 %) foram estatisticamente maiores ($p < 0,05$) que o grupo SHAM (1,944 %). Os resultados obtidos permitem concluir que o gel de Doxíciclina a 10% isolado mostrou resultados semelhantes aos resultados de sua associação com o osso bovino quando empregados localmente em defeitos críticos de calvárias de ratas osteoporóticas. Mas demonstrou resultados inferiores ao preenchimento com osso bovino isolado nos períodos iniciais.

Palavras-chave: Osteoporose. Doxíciclina. Reparação Óssea. Osso bovino. Biomaterial. Ovariectomia.

ABSTRACT

Osteoporosis is a chronic skeletal disease that causes imbalance in the process of bone repair, intensifying osteoclastic activity and causing an increase in bone fragility. Doxycycline has the property of inhibiting osteoclastogenesis in situations of normal bone metabolism. Thus, the objective of this study was to evaluate the local application of Doxycycline, in the form of a gel, associated or not to bovine bone particulate (Bio-Oss®) on bone repair in calvarial defects of osteoporotic rats, by means of microtomographic and histometric analysis. From a total of 58 animals with approximately 8 weeks of age weighing between 180 and 300g, forty-four were submitted to ovariectomy surgery (OVX) and another 14 animals underwent false surgery (SHAM-ovariectomy), in which the ovaries were only exposed, and repositioned at the place of origin. Eight animals were used to validate the model of characterization of osteoporosis, being 4 OVX and 4 SHAM. A defect of 6 mm in diameter was made with trephine in calvaria of the animals and these were randomly divided into 5 groups, with 10 animals, according to the treatment received: SHAM (Fictitious ovariectomy); OVX-CS (Blood clot); OXX-DOX (Doxycycline); OVX-BIO (Bio-Oss®); OVX-BODOX (Bio-Oss® associated with Doxycycline). Five animals from each group underwent euthanasia at 4 and 8 weeks postoperatively. In the microtomographic and histometric analyzes, the bone neoformation was calculated in the region of the defect. The values obtained were submitted to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$). The results of the microtomographic analysis showed that the newly formed bone volume (BV) in the 4-week period was statistically higher in the OVX-BIO group (6.0300 mm³) when compared to the other groups ($p < 0.05$). In the 8-week period, the OVX-DOX (3.2035 mm³), OVX-BODOX (3.2435 mm³) and OVX-BIO (5.5041 mm³) groups were statistically larger than the SHAM control group ($p < 0.05$). In the histometric analysis, in the 4-week period, the area of neoformed bone (OA) of the OVX-BIO group (13.592%) was statistically higher ($p < 0.05$) than the other groups. In the 8-week period, the OVX-DOX (9.542%), OVX-BIO (10.420%) and OVX-BODOX (4.708%) groups were statistically larger ($p < 0.05$) than the SHAM group (1.944%). The results obtained allow us to conclude that the isolated 10% Doxycycline gel showed results similar to the results of its association with bovine bone when used locally in critical defects of calves of osteoporotic rats. However, it showed inferior results when filling with isolated bovine bone in the initial periods.

Keywords: Osteoporosis. Doxycycline. Bone regeneration. Bovine bone. Biomaterial. Ovariectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Papel da esclerotina, Lrp4, Lrp 5/6 e via sinalização Wnt	26
Figura 2-	Cirurgia de ovariectomia	37
Figura 3-	Cirurgia de criação defeito ósseo: passos da técnica	40
Figura 4-	Cirurgia de criação defeito ósseo: aplicação dos biomateriais e sutura.....	41
Figura 5-	Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos da porcentagem do . Volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV) dos animais OVX e SHAM .	44
Figura 6-	Imagens da caracterização da osteoporose após procedimento ovariectomia	44
Figura 7-	Imagens Microtomógrafo e software de capturação	46
Figura 8-	Imagem da tela inicial do software NRecon®	47
Figura 9-	Imagem da tela inicial do software Dataviewer®.	48
Figura 10-	Imagem da tela CTan® utilizada para determinação e seleção das linhas	50
Figura 11-	Imagem da tela CTan® utilizada para determinação e seleção das linhas	51
Figura 12-	Imagem seleção dos <i>thresholds</i>	52
Figura 13-	Imagem da tela CTan® utilizada para seleção dos <i>threshold (biomaterial)</i> ..	53
Figura 14-	Imagem da tela CTan® utilizada para seleção dos <i>threshold (osso neoformado)</i> 54	
Figura 15-	Imagem da tela CTan® utilizada para seleção dos <i>ROIs</i>	55
Figura 16-	Representação esquemática do método em 3D	56
Figura 17-	Representação esquemática do processamento das calvárias	58
Figura 18-	Representação esquemática para análise histométrica	59
Figura 19-	Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico dos grupos estudados no período de 4 semanas	62
Figura 20-	Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico dos grupos estudados no período de 8 semanas	64
Figura 21-	Médias e desvio padrão do Volume ósseo neoformado (mm ³) dos grupos avaliados no período de 4 semanas.....	66
Figura 22-	Médias e desvio padrão do Volume ósseo (BV) neoformado (mm ³) dos grupos avaliados no período de 8 semanas.....	67
Figura 23-	Médias e desvio padrão do Volume ósseo (BV) neoformado (mm ³) dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas	
Figura 24-	Média e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm ²) dos grupos avaliados no período de 4 semanas.....	69
Figura 25-	Médias e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm ²) dos	

grupos avaliados no período de 8 semanas.....	70
Figura 26- Médias e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm ²) dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas.	70
Figura 27- Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 4 semanas.....	73
Figura 28- Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 8 semanas.....	74
Figura 29- Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas.	74
Figura 30- Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp) em mm, dos grupos avaliados no período de 4 semanas.....	76
Figura 31- Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp) em mm, dos grupos avaliados no período de 8 semanas.....	77
Figura 32- Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp) em mm, dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas.....	77
Figura 33- Gráfico de correlação entre a BV e Tb.Sp, análise realizada intergrupos	78
Figura 34- Gráfico em linhas das médias de BV e Tb.Sp, análise realizada intergrupos	79
Figura 35- Gráfico de correlação entre BV e Tb.N, análise realizada intergrupos	79
Figura 36- Gráfico de correlação entre BV e Tb.Th, análise realizada intergrupos.....	80
Figura 37- Fotomicrografias histológicas dos grupos (período de 4 semanas).....	82
Figura 38- Fotomicrografias histológicas dos grupos (período de 8 semanas).....	83
Figura 39- Média, desvio padrão da porcentagem da neoformação óssea (AO) segundo a histometria dos grupos avaliados no período de 4 semanas	85
Figura 40- Box-Plot referente a área de osso neoformado (análise histométrica) entre os grupos avaliados no período de 4 semanas	85
Figura 41- Média, desvio padrão da porcentagem da neoformação óssea (AO) segundo a histometria, dos grupos avaliados no período de 8 semanas	86
Figura 42- Box-Plot referente a área de osso neoformado (análise histométrica) entre os grupos avaliados no período de 4 semanas.....	87
Figura 43- Média e desvio padrão da área de neoformação óssea (AO) em %, segundo a histometria, dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas.....	87
Figura 44- Imagens microtomográficas e fotomicrografias de cortes (microtomográficos/histológicos) representativos dos grupos estudados no período de 4 semanas	88

Figura 45- Imagens microtomográficas e fotomicrografias de cortes (microtomográficos/ histológicos) representativos dos grupos estudados no período de 8 semanas	88
Figura 46- Neoformação óssea pelas análises microtomográficas e histométrica, dos grupos estudados nos períodos 4 e 8 semanas	90
Figura 47- Média e desvio padrão das partículas remanescentes de Bio-Oss® em % dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Distribuição dos animais em relação aos grupos e períodos experimentais..	35
Tabela 2-	Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos referentes a porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV).....	44
Tabela 3-	Médias/desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro volume ósseo (BV) segundo os períodos experimentais.....	65
Tabela 4-	Médias/desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro superfície óssea (SO) segundo os períodos experimentais.....	68
Tabela 5-	Médias/desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro espessura trabecular (Tb.Th) segundo os períodos experimentais.....	71
Tabela 6-	Médias/desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro número de trabéculas (Tb.N) segundo os períodos experimentais	72
Tabela 7-	Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro separação trabecular (Tb.Sp) segundo os períodos experimentais.....	75
Tabela 8-	Médias e desvio padrão dos dados da histometria relacionados a porcentagem neoformação óssea (AO) segundo os períodos experimentais.	84
Tabela 9-	Médias e desvio padrão dos dados da histometria relacionados a porcentagem dos remanescentes das partículas de Bio-Oss [®] segundo os períodos experimentais	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AO	Área do osso
ASBMR	American Society of Bone and Mineral Research
AT	Área total
BMPs	Proteínas ósseas morfogenéticas
BMU	Unidades básicas multicelulares
BV	Medida microtomográfica de volume ósseo em mm ³
BV/TV	Medida microtomográfica de fração volume em %
Ca⁺²	Cálcio
CEUA	Comitê de ética na utilização de animais
CO₂	Gás carbônico
CTan	Software CT Analyser®(versão 1.15.4.0, Bruker, Bélgica)
DEXA	Densitometria por absorção de Raios-X de energia dupla
DMO	Densidade mineral óssea
DOX	Doxiciclina
E.D.T.A	Ácido etilenodiaminotetracético
FDA	Food and Drug Administration – Agência Americana
FZD	Domínio receptor transmembrana Frizzled
HE	Hematoxilina e eosina
IGF	Fator de crescimento insulínico
IL-1	Interleucina -1
IL-6	Interleucina -6
LRP5	Receptor celular relacionado a proteína 5
MIP	Projeção de máxima intensidade
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MMP	Metaloproteinases de matriz
MSC	Células tronco mesenquimais
ONM	Osteonecrose de mandíbula
OPG	Osteoprotegerina
OVX	Animais ovariectomizados
PGE₂	Prostaglandinas E ₂
PVP-I	Polivinil-pirrolidona-iodo
RANK	Receptor do ativador do fator nuclear Kappa-β
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear Kappa-βeta
ROI	Região de interesse
RUNX-2	Fator de transcrição RUNX2
SHAM	Animais falsamente ovariectomizados
SO	Medida microtomográfica da superfície óssea em mm ²
Tb.Th	Medida microtomográfica média da espessura trabecular em mm
Tb.Sp	Medida microtomográfica média de distância entre trabéculas em mm
Tb.N	Medida microtomográfica média do número de trabéculas em 1/mm
Tc	Tetraciclina
TGF-β	Fator de crescimento transformador β
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
uCT	Microtomografia
VOI	Volume de interesse

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO LITERATURA	20
2.1	OSTEOPOROSE	20
2.2	REPARAÇÃO ÓSSEA	22
2.2.1	Wnt e o metabolismo ósseo	25
2.2.2	A reparação óssea e a osteoporose	26
2.3	SUBSTITUTOS ÓSSEOS – BIO-OSS®	28
2.4	TETRACICLINAS E SEUS DERIVADOS	29
2.4.1	Doxiciclina	30
3	OBJETIVOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	MODELO EXPERIMENTAL	34
4.2	DELIANEAMENTO EXPERIMENTAL	34
4.2.1	Grupos	34
4.3	PROCEDIMENTOS CIRURGICOS	35
4.3.1	Indução cirúrgica da osteoporose – ovariectomia e falsa ovariectomia	35
4.3.2	Procedimento cirúrgico para criação do defeito ósseo crítico	38
4.4	EUTANASIA	41
4.4.1	Obtenção dos espécimes	41
4.5	CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOPOROSE: ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA	41
4.6.1	Aquisição das imagens	42
4.5.2	Análise estatística para determinação da osteoporose	43
4.6	ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO CALVÁRIA ..	45
4.6.1	Aquisição das imagens	45
4.6.2	Processamento das imagens	48
4.6.3	Análise das imagens	49
4.6.3.1	Seleção dos cortes (slices) do defeito crítico na imagem (plano coronal).....	49
4.6.3.2	Binarização das imagens.....	
4.6.3.3	Seleção e definição das ROIs	55
4.6.4	Análise em 3D – Obtenção dos parâmetros volumétricos e de densidade.	56

4.6.4.1	Análise estatística – análise microtomográfica.....	57
4.7	PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS	57
4.8	ANÁLISE HISTOMÉTRICA	58
4.8.1	Análise estatística.....	59
5	RESULTADOS	61
5.1	AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA QUALITATIVA.....	61
5.1.1	Período de 4 semanas.....	61
5.1.2	Período de 8 semanas.....	63
5.3	ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA.	65
5.3.1	Volume ósseo (BV).....	65
5.3.2	Superfície óssea (SO)	68
5.3.3	Espessura Trabecular (Tb.Th)	71
5.3.4	Número de Trabéculas (Tb.N).....	71
5.3.5	Separação trabecular (Tb.Sp)	75
5.4	CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS VOLUMÉTRICOS E DE DENSIDADE ÓSSEA.....	78
5.4.1	Correlação entre BV e Tb.Sp intergrupos.....	78
5.4.2	Correlação entre BV e Tb.N intergrupos	79
5.4.3	Correlação entre BV e Tb.Th intergrupos	80
5.4.	Modelo de Regressão	80
5.5	ANÁLISE HISTOLÓGICA - DESCRITIVA	80
5.6	ANÁLISE HISTOLÓGICA – HISTOMETRIA	84
5.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA - PARTÍCULAS DE BIO-OSS® REMANASCENTES.....	90
6	DISCUSSÃO	92
7	CONCLUSÃO.....	100
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXO.....	116
	APÊNDICES	117

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é extremamente dinâmico e complexo. De origem mesenquimal e considerado um tipo especializado de tecido conjuntivo é constituído basicamente por células osteogênicas, osteoclastos e uma matriz extracelular abundante e mineralizada (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). Sabe-se que o tecido ósseo e sua arquitetura são renovados através do processo de reparação óssea e manutenção da densidade óssea. Tal processo é mediado por uma cascata de eventos que envolvem combinações genéticas e regulações de genes, pela ação de hormônios, citocinas e fatores de crescimento (SODEK; MCKEE, 2000).

No entanto, em determinadas situações clínicas, o processo de reparo ósseo é prejudicado, principalmente em casos em que os pacientes apresentam defeitos ósseos extensos decorrentes de traumas, tumores, exodontias, anomalias de desenvolvimento, patologias sistêmicas, ressecções oncológicas e perda fisiológica da densidade óssea. Tais defeitos não apresentam reparação óssea completa de forma espontânea, sendo portanto denominados defeitos críticos e foram descritos inicialmente por Schmitz e Hollinger (1986) como “o menor defeito intraósseo que não se regenera espontaneamente durante a vida do animal”.

O desafio da reparação óssea em defeitos críticos, torna-se mais complexo quando o paciente é acometido por distúrbios do metabolismo ósseo, como no caso da osteoporose. Nesta patologia ocorre um desequilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica, levando a reabsorção óssea aumentada e ou diminuição da atividade osteoblástica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; JEREMIAH; UNWIN; GREENAWALD, 2015).

A osteoporose é uma doença crônica esquelética que ocasiona redução na densidade mineral óssea, alteração da microarquitetura do tecido ósseo e aumento da fragilidade óssea com acréscimo nos riscos de desenvolvimento de fraturas (GARNERO; PATRICK, 1997). Devido ao aumento na expectativa de vida da população (KANIS et al., 2013) essa patologia tem se intensificado e tornado um relevante problema de saúde pública, visto que a idade avançada somada a deficiência do hormônio estrógeno após a menopausa são fatores de risco para a osteoporose (BURGE et al., 2007; MELTON et al., 2009).

A etiologia da osteoporose é multifatorial, contudo destaca-se a deficiência do hormônio estrógeno após a menopausa como um dos grandes responsáveis pelo acometimento da patologia (AASETH; BOIVIN; ANDERSEN, 2012). Sendo assim, a diminuição nos níveis de estrogênio altera o equilíbrio entre as atividades osteoblásticas e osteoclásticas para níveis aumentados na atividade osteoclástica e conseqüentemente prejudicando a resistência e qualidade óssea (SRIVASTAVA et al., 2001).

Várias áreas da Medicina e da Odontologia possuem interesse no processo de reparação óssea e o metabolismo ósseo. Os implantes osseointegrados, sem dúvida, revolucionaram a reabilitação oral (WENNERBERG; ALBREKTSSON, 2011). Contudo, a necessidade de se encontrar osso com qualidade e quantidade suficientes são imprescindíveis para o profissional que busca reabilitar pacientes com implantes, especialmente na presença de defeitos críticos e alterações metabólicas como a osteoporose. Com isso existe uma busca incessante por medicamentos que possam auxiliar o processo de remodelação e reparação óssea. Logo, na presença de defeitos críticos, torna-se necessária a utilização de biomateriais que possam auxiliar o processo de remodelação e reparação óssea, seja atuando na substituição do tecido ósseo perdido (osteocondutores) ou estimulando a osteogênese (osteoindutores) (DURÃO et al., 2014).

Dentre os enxertos ósseos, o osso autógeno é o que apresenta maior previsibilidade no processo de reparo dos defeitos críticos, por apresentar propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (BAUER, 2007). Entretanto, devido a impossibilidade de obtenção cirúrgica, morbidade da área doadora, quantidade limitada de enxerto e necessidade de anestesia geral para a remoção de enxertos extra bucais, em que os indivíduos apresentem alguma contraindicação sistêmica para este tipo de anestesia, estes enxertos podem não ser a melhor opção (GREENWALD et al., 2001).

Assim buscando otimizar a reparação óssea em defeitos críticos, faz-se necessária a utilização de substitutos ósseos (biomateriais) que propiciam e estimulam a reparação óssea, permitindo a reabilitação futura desses defeitos com a instalação de implantes osseointegráveis. Entre os principais biomateriais, o osso bovino inorgânico xenógeno se destaca pela biocompatibilidade, facilidade de uso e osteocondutividade (KOLK et al., 2012).

Todavia, em situações clínicas na qual distúrbios do metabolismo ósseo estão presentes como a osteoporose, os biomateriais além de serem osteocondutivos, devem também prover estímulos osteogênicos e inibir a osteoclastogênese se possível (YIP et al., 2015). Por isso se faz necessária a associação de biomateriais para se obter melhores resultados clínicos devido aos seus diferentes mecanismos de ação que contribuem para atingir essas propriedades regenerativas.

Recentes estudos mostraram que o gel de Doxíciclina a 10%, associado a outros biomateriais, aplicado localmente em defeitos críticos de calvárias de ratos saudáveis promoveu uma maior reparação óssea quando comparada ao grupo controle (SILVA et al., 2015; LUCATELI et al., 2018). Este ganho na reparação óssea pode estar associado à capacidade da

Doxiciclina em inibir a osteoclastogênese além dos efeitos antibacterianos (BETTANY et al., 2000; FRANCO et al., 2011; GOMES et al., 2017).

Assim, hipotetiza-se que a associação do gel de Doxiciclina a 10% a um biomaterial osteocondutivo (enxerto ósseo bovino) promova uma melhor resposta na reparação óssea, diminuindo o tempo de reparo e propiciando a completa reparação do defeito ósseo em quadros de deficiência de estrógeno. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso do gel de Doxiciclina a 10% associado ou não ao osso bovino particulado sobre a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratas ovariectomizadas através de análises histométrica e microtomográfica.

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença crônica esquelética que tem como característica uma diminuição na densidade mineral óssea (DMO), alteração e deterioração na microarquitetura do tecido ósseo, provocando assim um aumento na fragilidade óssea e aumento no risco de fraturas (GARNERO; PATRICK, 1997).

Mais de 200 milhões de pessoas em todo mundo são afetadas pela osteoporose, na qual aproximadamente 2 milhões de fraturas de quadril ocorrem anualmente. É a mais prevalente desordem esquelética sistêmica no mundo e projeções estatísticas sugerem que a incidência poderá aumentar em até quatro vezes nos próximos 50 anos (LAU; COOPER, 1996; WHO, 2004; DURÃO et al., 2014).

A capacidade óssea de suportar forças mecânicas associa-se com a quantidade e a qualidade óssea. A quantidade óssea refere-se ao pico de massa óssea e perda óssea, já a qualidade óssea refere-se a arquitetura, transferência e acúmulo de dano com manutenção da arquitetura óssea satisfatória (NIH, 2001).

Na osteoporose, a resistência óssea está diminuída, porém a concentração de cálcio na matriz orgânica é normal. Contudo, a quantidade de tecido ósseo é menor e assim o osso apresenta amplos canais de reabsorção. Essa situação patológica decorre da diminuição da formação óssea, do aumento na reabsorção do osso formado ou da combinação dos dois fatores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Devido as características clínicas, a osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A osteoporose primária ocorre em ambos sexos, em todas as idades, porém apresenta-se mais nas mulheres após a menopausa e nos homens em idades mais avançadas. Na osteoporose secundária, contrariamente ocorre devido ao uso prolongado de medicações, como por exemplo glicocorticoides, ou relacionado a condições ou doenças sistêmicas (NIH, 2001; LASH et al., 2009; AASETH; BOIVIN; ANDERSEN, 2012).

A etiologia da osteoporose é multifatorial, fatores genéticos, funções endócrinas, sedentarismo, práticas reduzidas de exercícios físicos e fatores nutricionais são extremamente relacionados com o aparecimento e progressão da doença. Além disso baixos níveis dos elementos cálcio (Ca^{+2}), vitamina D, flúor, magnésio no organismo humano contribuem também para o desenvolvimento da osteoporose (AASETH; BOIVIN; ANDERSEN, 2012).

Com o avanço das pesquisas, pode-se identificar a base genética da osteoporose e estudos sugerem mais de 30 genes diferentes relacionados com potencial de desenvolvimento da doença. Os fatores genéticos estão relacionados com densidade óssea mineral, tamanho, qualidade e renovação óssea (RAISZ, 2005; KUNG, 2006; AASETH; BOIVIN; ANDERSEN, 2012; HUANG).

As alterações endócrinas, principalmente do hormônio estrógeno, estão também estritamente relacionadas com o desenvolvimento da osteoporose. A deficiência do estrógeno provoca uma aceleração no catabolismo ósseo e a progressão da doença. Contribuem negativamente também a deficiência de Ca^{+2} , vitamina D e o hiperparatioridismo secundário. Além disso a interação do sistema hormonal com citocinas, fatores de crescimento e fatores de transcrição também estão fortemente relacionados com a origem e avanço da osteoporose (RAISZ, 2005). Paralelamente a deficiência de estrogênio, diversos fatores de risco relacionam-se com o desenvolvimento da osteoporose, tais como o consumo excessivo de álcool, histórico familiar de fraturas, deficiência hormonal gonadal, imobilidade e baixa atividade física, aumento da idade, baixo peso corporal, ingestão baixa de Ca^{+2} /vitamina D e uso de cigarro (NOF, 2002).

Atualmente considera-se como padrão ouro para o diagnóstico da osteoporose a densitometria óssea por absorção de Raios-X de energia dupla (DEXA), que permite definir a DMO. As quantificações ósseas emitidas pelo equipamento são comparadas através de uma tabela de normalidade e os resultados obtidos permitem caracterizar o indivíduo osteoporótico, isto quando o valor obtido apresentar uma taxa maior que 2,5 (desvios padrões) da taxa de normalidade, para valores obtidos entre 0 a 2,5 (desvios padrões) o indivíduo é classificado como osteopênico (BACCARO, 2015; HØIBERG et al., 2016).

De acordo com Jeremiah, Unwin e Greenawald (2015), os tratamentos utilizados para a osteoporose podem ser os não farmacológicos e farmacológicos propriamente ditos. Nos tratamentos não farmacológicos existem a preocupação em prevenir possíveis quedas que podem ocasionar fraturas e ainda suplementação com vitamina D e Ca^{+2} , recomendações voltadas para a prática de exercícios físicos e realização de fisioterapias para os indivíduos vulneráveis. Nos tratamentos via fármacos os mais utilizados são: Bisfosfonatos, raloxifeno, teriparatida e denosumabe, sendo que cada uma destas drogas apresentam um diferente mecanismo de ação, e também a utilização das terapias de reposição hormonal principalmente a suplementação de estrógeno. Os tratamentos medicamentosos apresentam resultados questionáveis, principalmente quando as drogas são utilizadas por longos períodos e com doses elevadas (KHAJURIA; RAZDAN; MAHAPATRA, 2011). O uso dos bisfosfonatos,

principalmente o alendronato, proporcionam redução média de 48% no risco de fraturas vertebrais sendo um resultado bem abaixo do esperado (GATES et al., 2009) e possibilidade de efeitos colaterais sérios, como a Osteonecrose dos maxilares (ONM), irritações esofágicas e toxicidade renal (PAPAPETROU, 2009).

A terapia de reposição hormonal com estrogênio/progesterona foi utilizada como primeira escolha para o tratamento e prevenção da osteoporose (YANG; PHAM; CRABBE, 2003), contudo apresenta riscos no desenvolvimento de câncer de mama e uterino e também de provocar alterações vasculares (CAULEY et al., 2003).

A osteoporose afeta diretamente as estruturas ósseas craniofaciais e orais. Sabe-se que as medidas de densidade óssea encontradas no osso mandibular apresentam semelhanças com as encontradas na espinha e fêmur (DERVIS; FARMAN, 2005; JEFFCOAT, 2005; GUIGLIA et al., 2013). Os achados histomorfológicos relacionados à baixa densidade óssea na osteoporose apontam para corticais mais finas, formação de trabeculado no osso cortical, redução da densidade óssea trabecular, aumento na porosidade do osso trabecular (RECKER; BARGER-LUX, 2001). Segundo Barbato (2015), a osteoporose é tida como um fator de risco e pode acelerar a reabsorção óssea alveolar nos casos de pacientes portadores de periodontite.

Sendo assim, a instalação de implantes em pacientes osteoporóticos é bastante questionável, diversos autores obtiveram sucesso na instalação dos implantes (EDER; WATZEK, 1999; MORENO-SÁNCHEZ et al., 2016; GRISA; VEITZ-KEENAN, 2018) e outros autores obtiveram falhas em seus resultados (GIRO et al., 2015). Segundo Tsolaki; Madianos e Vrotsos, (2009) em uma revisão sistemática sobre as taxas de sucesso e falhas em implantes realizados em pacientes com osteoporose, concluíram que a patologia não é uma contraindicação para o uso da terapia de reabilitação, contudo sugerem um ajustamento da técnica cirúrgica juntamente com um maior tempo de cicatrização para a obtenção da osseointegração. Os autores sugerem também que novos estudos prospectivos sejam realizados para avaliar os resultados de sucesso a longo prazo dos implantes em pacientes osteoporóticos.

2.2 REPARAÇÃO ÓSSEA

O tecido ósseo e sua arquitetura são renovados através do processo de reparação óssea e manutenção da massa óssea, mediados por uma cascata de eventos, que envolvem combinações genéticas e regulações de genes, pela ação de hormônios, citocinas e fatores de crescimento (SODEK; MCKEE, 2000). Segundo Chen et al., (2010), um perfeito sincronismo entre reabsorção e neoformação óssea são essenciais para que não se desenvolvam patologias

esqueléticas e comprometimento do tecido ósseo. Além disso, diversos fatores bioquímicos e forças mecânicas regulam o complexo mecanismo de formação e reabsorção óssea (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

O tecido ósseo possui alta atividade metabólica envolvendo a neoformação e reabsorção óssea e isso caracteriza o processo de remodelação que é fundamental para a manutenção da saúde do esqueleto. De origem mesenquimal, é considerado um tipo especial de tecido conjuntivo mineralizado, sendo composto basicamente por células ósseas (osteoblastos, osteoclastos e osteócitos) e por uma matriz extracelular abundante e mineralizada. Estas células ósseas formam as unidades básicas multicelulares (BMU) que estão envolvidas no processo de remodelação óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; DATTA et al., 2008; ERIKSEN, 2010).

Nas diversas células envolvidas no processo de remodelação, os osteoblastos são as principais e mais ativas células secretoras nos ossos, derivadas de células mesenquimais indiferenciadas (KOMORI et al., 1997; SODEK; MCKEE, 2000; BIANCO et al., 2001). Os osteoblastos não funcionam individualmente e são encontrados em aglomerados ligados sobre a superfície óssea secretando a matriz óssea e atuando na sua biomineralização. No estágio final da fase de formação óssea, os osteoblastos podem entrar em um estado quiescente e permanecerem na superfície da matriz como células de revestimento, ou mesmo serem incorporados à matriz óssea como osteócitos (SODEK; MCKEE, 2000).

Os osteócitos constituem o tipo celular mais encontrado no osso (90-95% das células ósseas totais e com sobrevivência de até 25 anos) (FRANZ-ODENDAAL; HALL; WITTEN, 2006). Os osteócitos possuem diversos prolongamentos citoplasmáticos que se interligam com os osteoblastos e células do revestimento ósseo durante o processo de remodelamento tecidual e ainda são fontes de moléculas relacionadas com a regulação da geração e atividade osteoclástica, como a osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor do fator nuclear Kappa- β (RANKL) (DATTA et al., 2008; BELLIDO, 2014).

Segundo Klein-Nulend et al., (2012), os osteócitos possuem importante função na dinâmica da reparação óssea, orquestrando o processo através da resposta a estímulos mecânicos e hormonais. Os osteócitos ao serem estimulados mecanicamente produzem moléculas sinalizadoras como proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), prostaglandinas E_2 (PGE₂) que controlam o recrutamento, diferenciação e atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Assim sendo, Xiong et al., (2012) comprovaram que os osteócitos relacionam-se com a produção da citocina RANKL que modula a atividade dos osteoclastos durante a remodelação óssea.

Inicialmente atribuía-se aos osteócitos funções meramente passivas quando estes ficavam aprisionados em lacunas tendo suas atividades bem limitadas. Contudo, devido a sua propriedade de mecanotransdução, os osteócitos detectam e respondem a estímulos mecânicos e hormonais e ainda coordenam as funções de osteoblastos e osteoclastos por meio da expressão de fatores regulares que atuam na manutenção e integridade óssea (BELLIDO, 2014).

Os osteoclastos são células multinucleadas gigantes derivadas de células hematopoiéticas da linhagem mononuclear (monócitos/macrófagos) e são responsáveis pela reabsorção óssea (TEITELBAUM, 2000). Enzimas lisossômicas como a Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP), Captetina K, Adenosina ácida trifosfatada são secretadas através das bordas onduladas dos osteoclastos nas áreas em reabsorção provocando a degradação e desmineralização da matriz óssea (VÄÄNÄNEN et al., 2000). A ativação, diferenciação e maturação dos osteoclastos são reguladas principalmente pela tríade OPG/receptor do Fator de Necrose- κ B (RANK)/RANKL; isto ocorre predominantemente pela ligação do RANKL ao receptor RANK na membrana do osteoclasto precursor (ERIKSEN, 2010). A diferenciação do osteoclasto também é modulada pelos fatores estimuladores de colônia de macrófagos (M-CSF). RANKL é uma proteína da superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNFs), com papel predominante na ativação/diferenciação da atividade osteoclástica e inibição da apoptose dos osteoclastos. RANK também é uma proteína transmembrana da família dos receptores das TNFs. São os receptores naturais dos RANKL e são expressos principalmente nas células da linhagem dos monócitos/macrófagos. RANK também está presente na superfície de osteoclastos maduros (KHOSLA, 2001). OPG é uma proteína da superfamília das TNFs e possui uma configuração diferente aos demais membros desta família, pois não se apresenta ligada a uma membrana, sendo encontrada como uma forma solúvel transmembrana e citoplasmática (TAN et al., 1997). A OPG é um receptor antagonista endógeno que neutraliza todos efeitos biológicos de RANKL, atuando como inibidor da reabsorção óssea, agindo também diretamente sobre os osteoclastos, inibindo a osteoclastogênese (HAKEDA et al., 1998).

Recentemente através da engenharia óssea, ao se investigar o processo de remodelação óssea, encontrou que as principais vias osteogênicas são acionadas pela cascata de sinalização das BMPs, Fator de crescimento transformador β (TGF- β) e fator de crescimento insulínico (IGF) (LONG, 2012).

2.2.1 Wnt e o metabolismo ósseo

As proteínas Wnts constituem uma família de glicoproteínas secretadas e modificadas nas células mesenquimais osteoprogenitoras e que influenciam e orquestram inúmeros processos biológicos (RUDNICKI; WILLIAMS, 2015) e a origem do nome provém da abreviação dos genes homólogos à via Wingless de *Drosófila* e o gene *int-1* de camundongo. Estas proteínas desenvolvem atividades críticas no desenvolvimento embrionário, na carcinogênese e no metabolismo ósseo (osteoblastogênese e formação óssea) (ALMEIDA; BRIEN, 2013; TAN et al., 2014).

A via canônica Wnt/ β -Catenina é a mais conhecida e extensivamente estudada. Está relacionada ao processo de diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos e sua não diferenciação em adipócitos por meio da regulação intracelular de β -Catenina. Experimentos *in vivo* e *in vitro* tem mostrado que a ativação da via canônica Wnt/ β -Catenina induz a replicação celular e a diferenciação dos osteoblastos, reduzindo a diferenciação das células tronco mesenquimais (MSC) em adipócitos (BODINE; KOMM, 2007; GOMES et al., 2017).

Sendo assim, a via de transdução de sinal Wnt/ β -Catenina é um importante mecanismo regulador na diferenciação das células troncos mesenquimais em osteoblastos (JAKOB et al., 2013; LONG, 2012), atuando na expressão de genes específicos (KRAMER et al., 2010), aumentando a transcrição de RUNX-2 e Osterix, em etapas de diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em pré-osteoblastos e osteoblastos (HILL et al., 2005).

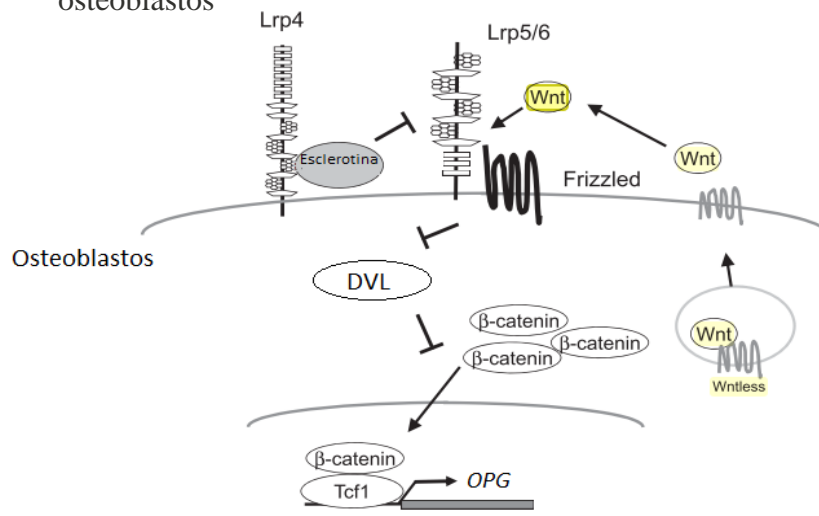
Nesta via de sinalização, as proteínas Wnts ligam-se ao complexo receptor de membrana constituído por um domínio receptor transmembrana Frizzled (FZD) e ao co-receptor LRP5/6 (proteína relacionada ao receptor de baixa densidade 5/6) que promovem a estabilização da β -Catenina. Após ativado, FZD relaciona-se diretamente por meio de seu domínio citoplasmático com a proteína Dishevelled (DVL), ativando-a e recrutando-a para membrana celular. Após a acoplagem da DVL a FZD e a LRP 5/6 favorecem a estabilização e translocação nuclear da β -Catenina. A β -Catenina acumulada no núcleo ativa diversos fatores de transcrição que induzem a diferenciação dos osteoblastos e conseqüentemente o aumento na produção de OPG (KUBOTA; MICHIGAMI; OZONO, 2009). (FIGURA 1)

Estudos relacionaram as mutações que ocorrem nos genes LRP5/LRP6 e a interferência na massa óssea, sendo que mutações ativadoras nos genes LRP5/LRP6 provocam aumento de massa óssea e mutações inativadoras nos genes LRP5/LRP6 causam perda óssea (GONG et al., 2001; BODINE; KOMM, 2007).

A inibição desta via Wnt/ β -Catenina também ocorre pelos osteócitos, através da secreção de fatores reguladores que interferem na manutenção e integridade óssea. Entre os fatores secretados, a proteína esclerostina, produto do gene SOST e potente inibidor da formação óssea, (BONEWALD, 2011) e proteína Dickkopfs (DKK) na fase reabsortiva do processo de remodelamento ósseo (NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014). Estes fatores são inibidores da osteoblastogênese por antagonizarem com a via de sinalização Wnt/ β -Catenina (DALLAS; BONEWALD, 2010).

Em seu estudo, Kramer e colaboradores (2010) identificaram a importância da β -Catenina na linhagem osteoblástica, concluindo que a sua deficiência provoca uma redução na produção de OPG e consequentemente altera o equilíbrio da tríade RANK-RANKL-OPG, favorecendo o aumento do número de osteoclastos e interferindo negativamente na homeostase óssea. A inibição da via de sinalização Wnt/ β -Catenina ocorre principalmente pela ação de mediadores inflamatórios como TNF- α (KUBOTA; MICHIGAMI; OZONO, 2009).

Figura 1 – Papel da esclerostina, Lrp4, Lrp5/6 e Wnt na via sinalização Wnt/ β -Catenina nos osteoblastos



Fonte: Modificado de KOBAYASHI et al., (2016)

Nota: Wnt liga-se aos complexos receptores de Lrp5/6 e Frizzled e ativam os sinais da via Wnt/ β -Catenina induzindo a produção Osteoprotegerina(OPG). Esclerostina secretada pelos osteócitos ligam-se aos Lrp4 e Lrp5/6 para inibir a via Wnt/ β -Catenina.

2.2.2 A reparação óssea e a osteoporose

Com o envelhecimento do esqueleto ocorre uma diminuição dos osteoblastos e também um decréscimo no número de MSCs e na sua habilidade em diferenciar-se em células progenitoras da linhagem osteoblásticas, levando a alterações negativas na reparação óssea

(ALMEIDA; BRIEN, 2013). Defeitos na reparação óssea na osteoporose estão relacionados com o baixo número de células MSCs e também devido a alterações na sua proliferação, diferenciação e migração (VERONESI et al., 2011; JOINER et al., 2012).

Sabe-se que a deficiência de estrogênio, como na osteoporose, leva ao aumento na secreção da interleucina-1(IL-1) e TNF, provocando aumento na osteoclastogenese, isso devido também ao aumento na expressão da interleucina-6(IL-6). IL-1 e TNF agem também estimulando a expressão gênica do RANKL em osteoblastos e células estromais (YASUDA et al., 1998). Posteriormente com o entendimento da tríade OPG/RANK/RANKL, ficou mais claro que o estrogênio possui efeitos protetores nos ossos, tal como o estímulo sobre a expressão do OPG em osteoblastos e células mesenquimais (SAIKA et al., 2001). Além disso, observa-se que a deficiência do estrogênio provoca maior expressão de RANKL na superfície das células da medula óssea como osteoblastos e linfócitos e assim relaciona-se o papel do RANKL no desenvolvimento da osteoporose. Sabe-se que o estrogênio possui efeito inibidor sobre o RANK nos osteoclastos precursores e com isso inibindo a osteoclastogenese (SHEVDE et al., 2000; SRIVASTAVA et al., 2001; EGHBALI-FATOURECHI et al., 2003).

Em estudos *in vitro*, apesar das limitações, identificaram-se que as mudanças na atividade celular dos osteoclastos em pacientes osteoporóticos provocam aumento na atividade osteoclástica e na reabsorção (JEVON et al., 2003; D'AMELIO et al., 2005), sendo que uma célula-chave no incremento da osteoclastogenese parece ser a célula T, que provoca aumento na expressão de RANKL devido aos baixos níveis de estrogênio (D'AMELIO et al., 2008). Ainda assim EGHBALI-FATOURECHI et al., (2003) concluíram que a elevada expressão de RANKL, em pacientes osteoporóticos, possui um importante papel na patogênese da patologia.

Além disso, o déficit de estrogênio provoca uma redução na captação de cálcio no intestino e ainda prejudica a reabsorção do cálcio pelos rins. Caso a deficiência de cálcio não seja suprida através de ingestão de dietas e suplementos, poderá ocorrer um aumento na captação de cálcio dos ossos, com a finalidade de normalizar os níveis séricos e com isso poderá levar ao desenvolvimento da osteoporose (KALU; ORHII, 1999).

Os mecanismos patológicos que estão relacionados com o envelhecimento e a osteoporose levam a deficiência na reparação óssea no paciente idoso. E assim sabe-se que a inibição na cascata de sinalização Wnt/ β -Catenina e a inibição também das proteínas BMPs, levam a uma alteração negativa na diferenciação e atividade osteoblástica (BENISCH et al., 2012).

Van Lierop et al., (2011) observaram também que a proteína esclerotina, codificada pelo gene SOST, interfere na atividade e no metabolismo ósseo e exerce efeito antagonista sobre a

via Wnt/ β -Catenina levando as desordens ósseas. Assim as novas drogas utilizadas no tratamento e prevenção da osteoporose possuem como estratégia de ação o antagonismo sobre a esclerotina através da ação de anticorpos monoclonais neutralizantes do gene SOST e estudos realizados em macacos e ratos *in vivo* apresentaram resultados satisfatórios proporcionado aumento do crescimento, massa e resistência óssea (LI et al., 2009; NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014). Em estudos pré-clínicos, foram obtidos resultados extremamente satisfatórios relacionados ao aumento da formação óssea nas superfícies trabecular, periosteal, endocortical e intracortical, sem haver aumento na reabsorção óssea e com a espessura trabecular aumentada. Desta forma os anticorpos monoclonais para o gene SOST mostraram-se eficazes e bastante promissores como uma nova classe de medicamentos para o tratamento das reabsorções e desordens ósseas (LI et al., 2010; OMINSKY et al., 2010).

2.3 SUBSTITUTOS ÓSSEOS – BIO-OSS®

A reabsorção óssea que ocorre após a perda dos elementos dentários e ou a necessidade de reconstruções ósseas causadas por tumores, cistos e acidentes, exigem dos cirurgiões dentistas o desenvolvimento e utilização de técnicas e biomateriais que possam recuperar o tecido ósseo e propiciar ao paciente a possibilidade de reabilitação oral através de implantes osseointegrados (CARVALHO et al., 2010; MANFRO et al., 2014). Os defeitos ósseos críticos representam um dos maiores problemas clínicos para as cirurgias craniofaciais reconstrutivas (BERNABÉ et al., 2012). Logo, o preenchimento de defeitos com enxertos ósseos autógenos é a alternativa com maior previsibilidade de sucesso, pois apresenta potencial osteogênico, osteoindutor, osteocondutor e não apresenta reações antigênicas (BAUER, 2007). Contudo devido à dificuldade cirúrgica e a necessidade de realização de um novo sítio cirúrgico para obtenção do enxerto ósseo autógeno, estes enxertos podem não ser a melhor opção. Como substitutos dos enxertos ósseos autógenos, os enxertos homogêneos e ou xenógenos são bem utilizados, contudo apresentam a desvantagem de provocar reações imunológicas, risco de transmissão e contaminação viral entre indivíduos ou espécies (GREENWALD et al., 2001). Como alternativa os enxertos ósseos sintéticos são amplamente utilizados e tentam superar estas desvantagens (VAN DER STOK et al., 2011). Em um estudo comparativo entre substitutos ósseos, conclui-se que osso bovino inorgânico xenógeno apresenta resultados satisfatórios nas cirurgias reconstrutivas para instalação de implantes osseointegrados (MANFRO et al., 2014). Com isso a matriz de osso bovino mineralizada Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suíça) que é composta de osso bovino desproteínizado, tem sido amplamente utilizada, seja na

preservação da dimensão do rebordo alveolar após a exodontia, bem como, em defeitos ósseos periodontais em cirurgias de levantamento do seio maxilar (RICHARDSON et al., 1999; LIOUBAVINA-HACK et al., 2005; ORSINI et al., 2007; POLYZOIS et al., 2007). Este material é considerado padrão ouro de enxerto de osso bovino xenógeno (MANFRO et al., 2014), isso porque ele provoca aumento na taxa de formação óssea com uma reparação óssea mais previsível nos primeiros estágios de reparação, propiciando uma maior migração das células da linhagem osteoblástica na região cirúrgica e ainda com propriedades osteocondutoras gerando uma maior superfície para a deposição óssea (HÄMMERLE; LANG, 2001).

2.4 TETRACICLINAS E SEUS DERIVADOS

As tetraciclina foram descobertas por volta de 1940 (DUGGAR, 1948) como um produto natural proveniente de actinomicetos, bactérias presentes no solo, sendo que a primeira forma de tetraciclina liberada para uso clínico, em 1948, pelo Food and Drug Administration (FDA) fora a Aureomicina, em referência a sua cor amarelo ouro. Desde então inúmeros pesquisadores, cientistas e a indústria farmacêutica contribuíram com a história e melhoria das tetraciclina (NELSON; LEVY, 2011).

Esse grupo de antibióticos, que atua na inibição da síntese proteica coibindo a ligação do aminoácido-tRNA ao sítio receptor do ribossoma A, são classificados como agentes de amplo espectro, exibindo atividades contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, organismos atípicos como *Clamídias*, *Micoplasma* e *Rickettsia*. Devido as satisfatórias propriedades antimicrobianas e diminutos efeitos colaterais levaram a utilização extensiva nas infecções humanas e em animais (CHOPRA; ROBERTS, 2001; NELSON; LEVY, 2011).

A aplicabilidade clínica das TCs se estende a sua atividade profilática contra a malária causada pelo *Plasmodium falciparum*, além de ser utilizadas em alguns países em doses subterapêuticas acondicionadas em alimentos para atuarem como estimuladores do crescimento humano (CHOPRA; ROBERTS, 2001). Além dos efeitos antimicrobianos, as TCs tem apresentado outras propriedades como atividades anti-inflamatórias, a inibição das metaloproteinases de matriz e outras enzimas colagenolíticas que destroem o colágeno, estrutura básica do periodonto e podem facilitar a aderência de fibronectina à superfície radicular, o que facilita a reparação de ligamento periodontal, sendo assim, aprovado pela FDA em 2001 para utilização das TCs e seus derivados no tratamento da periodontite no adulto

(TERRANOVA et al., 1986; CATON et al., 2000; CHOPRA; ROBERTS, 2001; NELSON; LEVY, 2011).

Além disso, as tetraciclinas apresentam importante ação sobre o metabolismo ósseo, incluindo a indução de nova síntese de colágeno (SASAKI; RAMAMURTHY; GOLUB, 1992), inibição da atividade da fosfolipase A2 (PRUZANSKI et al., 1992), inibição do gene e da proteína que induzem a síntese de óxido nítrico (TRACHTMAN et al., 1996) e modulação das respostas citosólicas do Ca^{+2} em osteoclastos (BAX et al., 1993).

Bettany et al., (2000) em seus estudos, encontraram que as TCs e seus derivados químicos inibem a reabsorção óssea através da inibição das metaloproteinases de matriz 8 e 9 (MMP-8 e MMP-9). Eles encontraram que as TCs inibem a ativação e diferenciação dos osteoclastos e que induzem também a apoptose dos osteoclastos em culturas de tecidos. Um estudo anterior a este, já indicava as propriedades anti-proteolíticas e associação a atividade anti-cologenase tendo sua aplicação direcionada na inibição da reabsorção óssea, devido a inibição das MMPs que são enzimas colagenolíticas que provocam a degradação do tecido conjuntivo e a reabsorção óssea (TERRANOVA et al., 1986; SASAKI; RAMAMURTHY; GOLUB, 1992) .

Em outro estudo Holmes et al., (2004) também encontraram resultados semelhantes como inibição das MMP e esclareceram a ação das TCs na inibição da osteoclastogênese, e que seu efeito ocorre diretamente sobre os precursores pré-osteoclasticos interrompendo a sua diferenciação em osteoclastos maduros e desta forma minimizando o processo de reabsorção óssea e assim esclarecendo que os efeitos das TCs não são exclusivamente sobre as células osteoblásticas como preconizavam os estudos.

2.4.1 Doxiciclina

A Doxiciclina (DOX) é um antibiótico bacteriostático de amplo espectro da classe das tetraciclinas, derivada da oxitetraciclina e constituindo um importante grupo de antimicrobianos (GRIFFIN, 2010). A sua descoberta ocorreu pelo químico Charlie Stephens, que conseguiu identificar um substância análoga com excelente atividade, estabilidade e eficácia farmacológica. A regulamentação para uso comercial pela FDA ocorreu em 1967 e passou a ser amplamente utilizada em diversas infecções bacterianas, sendo eficaz contra, por exemplo, o anthrax e a malária.(NELSON; LEVY, 2011).

Devido a necessidade de obtenção de tetraciclinas mais potentes e estáveis, modificações estruturais no núcleo e aplicações sintéticas orgânicas foram realizadas e com isso

produziu-se novas drogas semi-sintéticas (NELSON; LEVY, 2011). A DOX um isômero natural e pertencente a segunda geração das tetraciclinas, teve sua composição química obtida através de uma alteração disjuntiva que modificou a posição da hidroxila 1, alterando-a do anel de Carbono 6 da oxitetraciclina para o anel de Carbono 5 na doxiciclina característica que lhe confere maior estabilidade (FRANKLIN; SNOW, 1975).

As modificações em sua composição química e a utilização em doses subclínicas (independente de sua atividade antibiótica), permitiram que DOX tivesse sua aplicação terapêutica ampliada e é utilizada como terapia medicamentosa em diversas patologias como a artrite reumatóide (PAYNE et al., 2015), osteoartrite (BRANDT et al., 2005), inflamações crônicas cutâneas, por exemplo acne vulgaris (BIKOWSKI, 2003), cicatrização de úlceras cornoas estéreis (FEDERICI, 2011), osteopenia e osteoporose (PAYNE; GOLUB, 2011), inibição da angiogênese nos Sarcomas de Kaposi (RICHARDS; PANTANOWITZ; DEZUBE, 2011) e alterações cardiovasculares relacionadas a inflamações sistêmicas (CASTRO et al., 2011).

Entre os efeitos não microbianos da DOX, a inibição das MMPs é o que está melhor caracterizado (GRIFFIN, 2010), inibindo principalmente as collagenases MMP-8 e as gelatinases MMP-2 e MMP-9 (CRAIG et al., 1998; GOLUB et al., 1999). Além disso, a DOX possui efeitos antioxidante e antiinflamatório por meio da inibição das interleucinas e citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 E TNF- α (DI CAPRIO et al., 2015; GRIFFIN, 2010; KRAKAUER; BUCKLEY, 2003).

Em outros estudos Silva et al., (2016) e Lucateli et al., (2018) avaliaram a DOX em forma de gel a 10% associados a outros biomateriais na reparação óssea em defeitos críticos de calvárias de ratos normoreativos e os melhores resultados obtidos foram nos grupos em que se utilizou a DOX. Assim a proteção óssea pode estar associada a sua propriedade em inibir a osteoclastogênese, provocando a apoptose de osteoclastos (BETTANY et al., 2000; FRANCO et al., 2011).

A inibição da osteoclastogênese pela DOX ocorre pela inibição das enzimas de MMP-9, que desta forma interrompe a diferenciação dos osteoclastos que é mediada pelo RANKL (FRANCO et al., 2011; KINUGAWA et al., 2012; SHAHABOOEI et al., 2015).

Gomes et al., (2017) identificaram a capacidade da DOX em estimular a via de sinalização Wnt/ β -catenina. Neste estudo utilizaram doses subclínicas de DOX (10mg/kg e 25mg/kg) em ratos e, através da análise imunistoquímica, encontraram uma maior imunomarcagem dos marcadores relacionados com a ativação da via Wnt/ β -catenina. Desta

forma se confirmou uma maior atividade osteoblástica e diminuição dos osteoclastos, além de ratificar os efeitos anti-inflamatórios e indutores de remodelamento ósseo atribuídos à DOX.

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar, por meio de análises histométricas e microtomográficas, o efeito da aplicação local do gel de Doxíciclina a 10%, associada ou não ao osso bovino particulado, sobre a reparação óssea em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratas osteoporóticas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Todo o protocolo experimental foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização em Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) com o protocolo de registro nº 43/2017 (ANEXO A).

Para a presente pesquisa foram utilizadas 58 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com peso entre 180 a 300 gramas provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG. Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada entre 22 e 24° C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo o período experimental, conforme é preconizado no Manual de Utilização do Biotério Central da UNIFAL-MG.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 10 ratas em cada grupo, para serem submetidos a eutanásia em 2 períodos experimentais (4, 8 semanas) (TABELA 1).

4.2.1 Grupos

- a) SHAM (Ovariectomia fictícia/Coágulo Sanguíneo): grupo constituído por 10 ratas submetidas à cirurgia fictícia de ovariectomia, com produção de defeito ósseo crítico de 6mm na calvária sem aplicação de nenhum biomaterial;
- b) OVX-CS (Ovariectomia/Coágulo Sanguíneo): grupo constituído por 10 ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia, com produção de defeito ósseo crítico de 6 mm na calvária sem aplicação de nenhum biomaterial;
- c) OVX-BIO (Ovariectomia/Bio-Oss[®]): grupo constituído por 10 ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia, com produção de defeito ósseo crítico de 6 mm na calvária e preenchimento com osso bovino inorgânico particulado – grânulos pequenos (0,25 – 1 mm) (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Suíça);
- d) OVX-DOX (Ovariectomia/Doxiciclina): grupo constituído por 10 ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia, com produção de defeito ósseo crítico de 6 mm na calvária e preenchimento com gel de doxiciclina a 10%;

- e) **OVX-BODOX** (Ovariectomia/Bio-Oss[®] associado à Doxíciclina): grupo constituído por 10 ratas submetidas à cirurgia de ovariectomia, com produção de defeito ósseo crítico de 6 mm na calvária e preenchimento com osso bovino inorgânico particulado – grânulos pequenos (0,25 – 1 mm) (Bio-Oss[®]) associado ao gel de Doxíciclina a 10%.

Tabela 1 - Distribuição dos animais em relação aos grupos e períodos experimentais.

Grupo	Material	Nº total animais	Nº de animais 4 semanas	Nº de animais 8 semanas
SHAM	Coágulo (controle +)	10	5	5
OVX-CS	Coágulo (controle -)	10	5	5
OVX-BIO	Bio-Oss [®]	10	5	5
OVX-DOX	Doxiciclina 10%	10	5	5
OVX-BODOX	Doxiciclina 10% + Bio-Oss [®]	10	5	5

Fonte: Do autor.

Além dos grupos acima descritos, 8 ratas foram utilizadas para a caracterização da osteoporose, divididas em 4 ratas que sofreram a ovariectomia (OVX) e 4 ratas SHAM.

4.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

4.3.1 Indução cirúrgica da osteoporose – ovariectomia (OVX) e falsa ovariectomia (SHAM)

Quarenta e quatro animais com aproximadamente 8 semanas de idade foram submetidos à cirurgia de ovariectomia e os outros 14 animais foram submetidos a falsas cirurgias (SHAM-ovariectomia), na qual os ovários foram apenas expostos, e reposicionados no local de origem.

Para isso, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (6 mg/kg) (Rompum[®], Bayer S.A., Brasil) e Quetamina (70 mg/kg) (Dopalen[®], Vetbrands, Brasil). Como auxílio para analgesia e controle da dor aplicou-se ainda injeção intramuscular de Tramadol (10 mg/kg) (Vitalis, GO, Brasil) e após a confirmação da anestesia, os animais

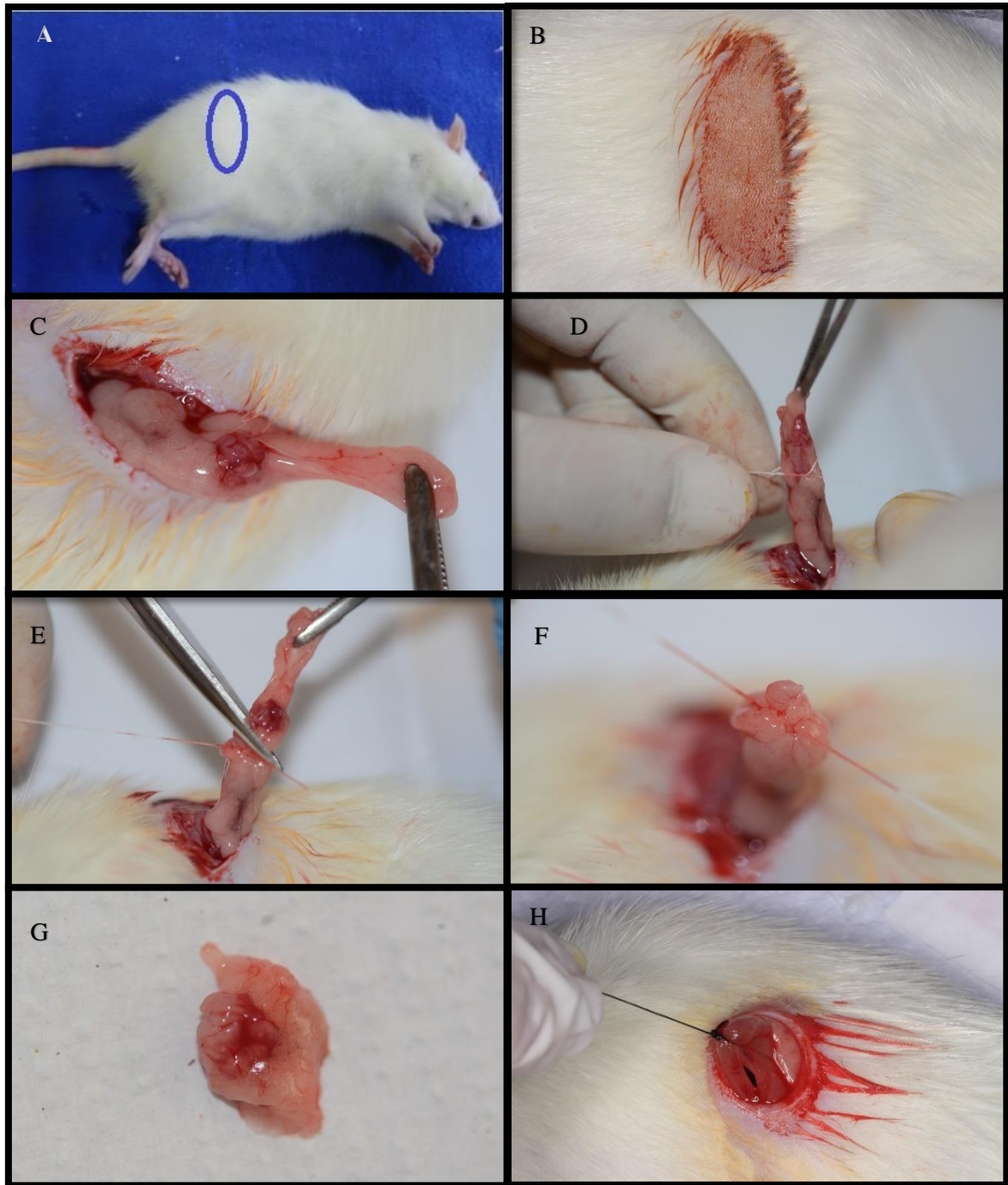
foram colocados em posição de decúbito ventral e submetidos à tricotomia bilateral, na região lombar utilizando-se de lâminas de barbear. Após a exposição bilateral de uma área de aproximadamente 3 cm de altura e 1cm de largura, a antisepsia foi feita com polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine, Rioquímica LTDA, São José do Rio Preto, Brasil).

Para se ter o acesso a cavidade abdominal procedeu-se uma incisão de 2cm de comprimento no ponto médio entre a borda inferior costal e a crista ilíaca e alguns milímetros lateralmente à margem lateral do músculo lombar, após a divulsão do tecido subcutâneo, com a utilização de uma pinça de dissecação romba, os músculos da parede abdominal posterior foram separados. O ovário estava localizado em um bloco de gordura logo abaixo dos músculos e exteriorizado por retração suave usando uma pinça. Em seguida, usando uma pinça mosquito, a trompa de Falópio foi clampeada e uma única ligadura foi realizada logo abaixo do ovário através de uma sutura cirúrgica de poliéster (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil), com a finalidade de contenção hemorrágica e permitiu a remoção do ovário e parte da trompa. Inicialmente a sutura foi realizada na camada muscular com fio reabsorvível Categute nº4 (Cirurgia-Brasil, Brasil) e em seguida a pele foi suturada com fio de mononylon 4-0 (Ethicon, SP, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com PVP-I. Para remoção de ambos ovários este procedimento foi realizado bilateralmente (LUVIZUTO et al., 2011; VAN HOUDT et al., 2016).

Ao final do procedimento os animais receberam dose única de solução de antibióticos (0,1 ml/kg) contendo benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g de peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), sulfato de diidroestreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) e sulfato de estreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, SP, Brasil) (FIGURA 2).

Nos animais do grupo SHAM, foi realizada a falsa ovariectomia ou cirurgia SHAM, sendo feitos os mesmos procedimentos da ovariectomia, incluindo a exposição dos ovários bilateralmente, com exceção da ligadura e remoção dos mesmos, com a finalidade dos animais sofrerem o mesmo estresse dos demais grupos estudados.

Figura 2 – Cirurgia de ovariectomia



Fonte: Do autor

Notas: (A) Localização incisão – Região Lombar; (B) Área depilada e antissepsia; (C) Exposição do ovário; (D) Ligadura da Tromba Uterina; (E) Excisão do Ovário; (F,G) Ovário excisado; (H) Início das suturas por planos.

4.3.2 Procedimento cirúrgico para criação do defeito ósseo crítico

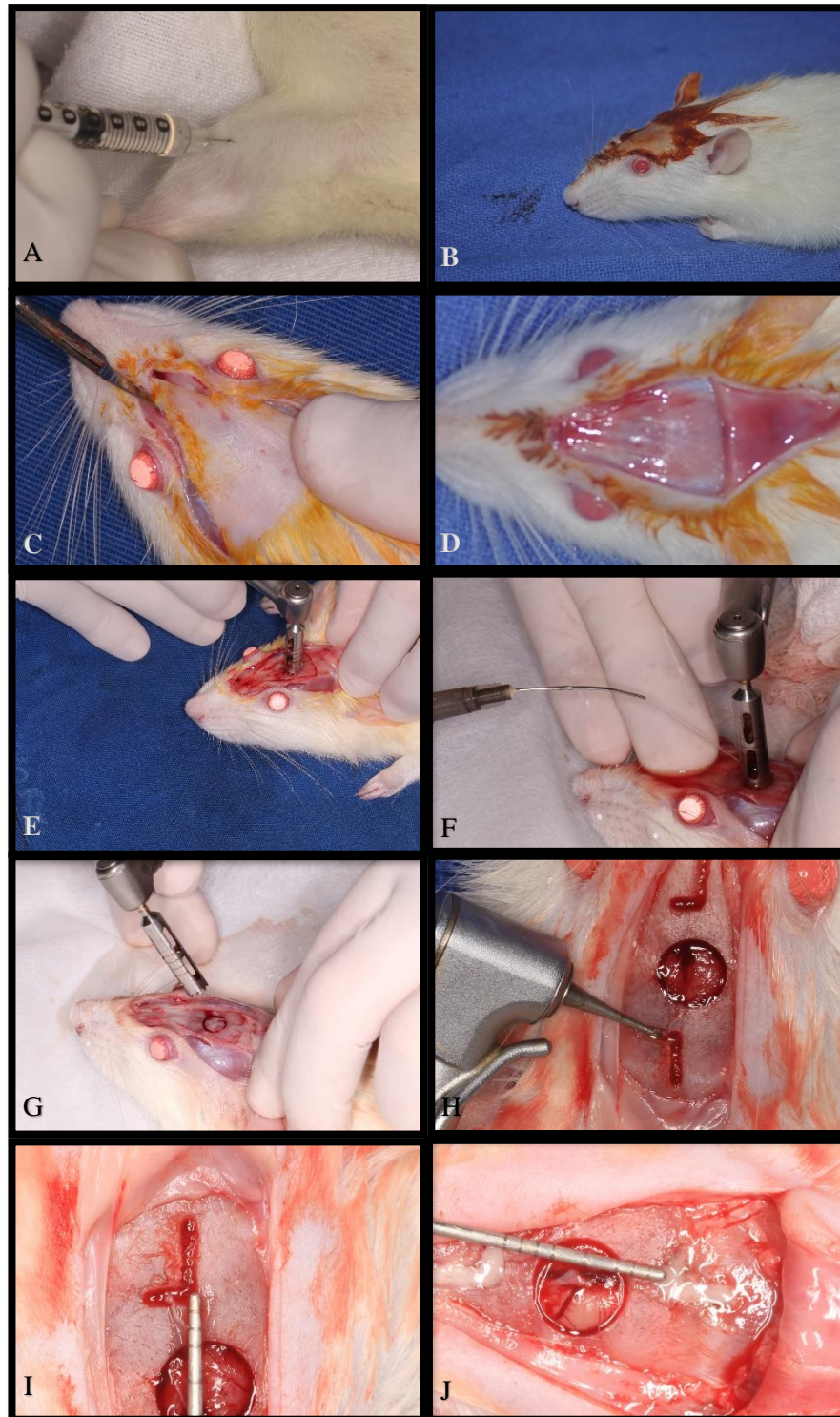
Após o período de 8 semanas da cirurgia de ovariectomia, os animais (n=50) foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (6 mg/kg) (Rompum®, Bayer S.A., Brasil) e Quetamina (70 mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil). Adicionalmente, injeção intramuscular do analgésico Tramadol (10 mg/kg) (Vitalis, GO, Brasil) foi realizada e após a confirmação da anestesia, os animais foram colocados em posição de decúbito ventral e submetidos à tricotomia, na região frontoparietal, sendo feita pela técnica do arrancamento dos pelos, seguida de antissepsia feita com polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine, Rioquímica LTDA, São José do Rio Preto, Brasil). Antes de iniciar o ato cirúrgico, os animais receberam complementação anestésica local, através da infiltração de anestésico Cloridrato de Lidocaína a 0,5% (2,0 mg/kg) (Hipolabor, MG, Brasil) na região frontoparietal, tendo como finalidade o controle da dor e diminuição do sangramento durante o procedimento operatório.

A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15 (Free-Bac, P.R.C., China), montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) foi feita uma incisão em “U”, no sentido occipito-frontal, com base caudal na calvária do rato. A incisão envolveu o periósteo permitindo o descolamento de um retalho de espessura total em direção posterior. Posteriormente utilizando uma broca trefina de 6 mm de diâmetro (3i, Neodent, Brasil), acoplada em contra-ângulo (INTRAmatic® 2068 FGBN, Kavo, Brasil) e micromotor (INTRAmatic® 181 DBN, Kavo, Brasil) e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Linhamax®, Eurofarma, Brasil), criou-se assim um defeito de tamanho crítico na calvária do animal, mantendo a integridade da dura-máter. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Foram confeccionadas marcações no formato “L” a 2 mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico e preenchidas com ionômero de vidro (Ionômero de Vidro para Restauração, S.S. White Vidrion R, Rio de Janeiro, Brasil).

O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide tronco-cônica (Broca Carbide Tronco Cônica p/ Alta Rotação nº 16 702, Dentsply, Brasil) acoplada em alta rotação (Turbina Extratorque 505, Kavo, Brasil) sob irrigação contínua com solução salina estéril. A finalidade destas marcações é a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica (MESSORA et al., 2008; SILVA et al., 2015) (FIGURA 3).

Os defeitos ósseos criados foram preenchidos com os biomateriais conforme os grupos (FIGURA 4). O grupo controle foi deixado sem preenchimento da cavidade, de maneira a permitir a formação de um coágulo sanguíneo. No grupo com preenchimento com Bio-Oss[®], uma medida previamente calibrada de 0,0013 mg foi inserida no defeito, sendo esta medida suficiente para preencher todo o defeito. No grupo Doxíciclina 10% um volume de 0,1 ml foi inserido diretamente no defeito, medida essa suficiente para o preenchimento do defeito. Para o grupo (BODOX), uma medida de 0,0013 mg de Bio-Oss[®] foi misturada em 0,01 ml de Doxíciclina 10% e inserido no defeito ósseo criado (FIGURA 4C). Após o preenchimento dos defeitos, os tecidos moles foram reposicionados e suturados por meio de pontos interrompidos simples com fio de Nylon 4.0 (Ethicon, São José dos Campos, SP, Brasil). Cada animal recebeu doses intramuscular de Tramadol (10 mg/kg) nos períodos de 12h, 24h, 36h e 48h após o procedimento cirúrgico e foram acompanhados todos os dias na primeira semana do pós-operatório e de 15 em 15 dias, para avaliação clínica, alternando os animais, a fim de minimizar o estresse gerado pelo manejo.

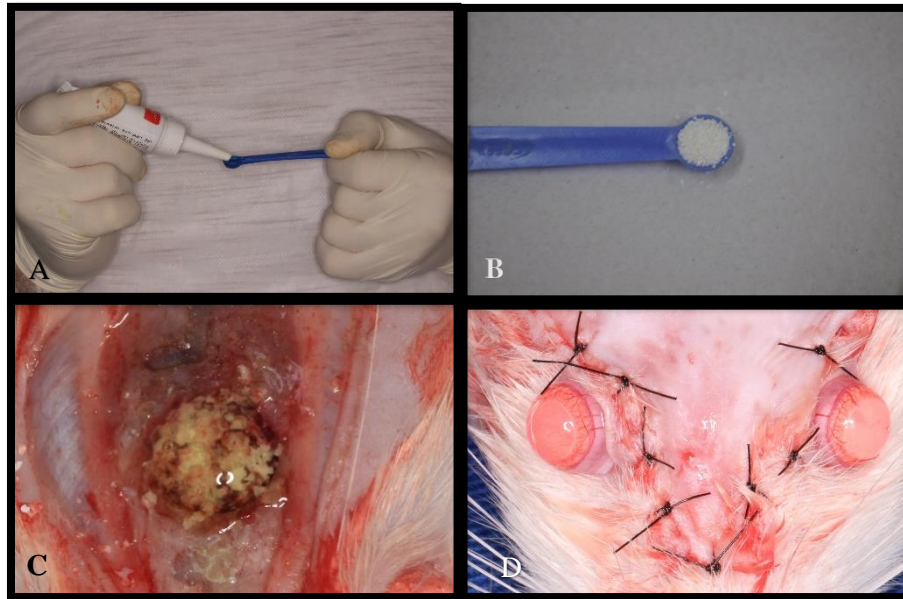
Figura 3 – Cirurgia de criação defeito ósseo.



Fonte: Autor

Notas: (A) Anestesia; (B) Área depilada e antissepsia; (C) Incisão; (D) exposição calvária; (E, F, G) Início da criação do defeito; (H, I) Marcações em L delimitando o centro do defeito; (J) Preenchimento das marcações com Ionômero de Vidro.

Figura 4 – Cirurgia de criação defeito ósseo – Aplicação dos biomateriais e sutura



Fonte: Autor.

Notas:(A) Medida Doxiciclina; (B) Medida Bio-Oss[®]; (C) Inserção no defeito biomaterial (Doxiciclina+Bio-Oss[®]); (D) Sutura concluída.

4.4 EUTANÁSIA

Após 4, 8 semanas pós-operatórias da criação do defeito ósseo crítico, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados nesses períodos por meio da inalação excessiva de gás carbônico (CO₂), conforme Manual de Eutanásia do Biotério Central da Unifal-MG.

4.4.1 Obtenção dos espécimes

Após a eutanásia dos animais, toda a calvária foi removida preservando a área do defeito crítico e as marcações em “L” criadas. Antes do processamento histológico das calvárias obtidas dos animais, foi realizada a avaliação da densidade tomográfica na região do defeito através de análise Microtomográfica (µCT).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DA OSTEOPOROSE: ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

Para a caracterização da osteoporose foi utilizado um fêmur de cada uma das 8 ratas além das 50 ratas pertencentes aos grupos de estudo. Desses 8 animais adicionais, 4 foram do grupo OVX (ovariectomia) e 4 foram do grupo SHAM (falsa-ovariectomia).

4.5.1 Aquisição das imagens

O microtomógrafo de raios-X tem como princípio de funcionamento as diferentes captações da radiação emitida, variando de acordo com a composição química e densidade do objeto analisado. Ao se realizar o exame μ CT o objeto é dividido virtualmente em “fatias” nas quais são observados parâmetros físicos como densidade e a porosidade de cada região interna do objeto, que inicialmente, são apresentadas na forma de imagens bidimensionais que podem ser compostas de modo a obter objetos virtuais em 3D, por meio de cálculos e algoritmos computacionais. Em se tratando de ossos, a estrutura trabecular, processos de osteopenia ou osteoporose e medição da densidade óssea podem ser feitas através deste exame.

O sistema de μ CT de raios X é constituído por um tubo de raios X de micro-foco, com uma fonte de alta tensão (200 kv), um porta-amostra com manipulador de precisão e um detector baseado em uma câmara CCD de 10Mp (4000x2300 pixels), interligados a um computador central de controle e aquisição de dados (servidor), interligado em rede a um *cluster* de computadores utilizados na reconstrução das imagens microtomográficas.

As imagens foram adquiridas por meio do aparelho de μ CT (SkyScan, Kontich, Bélgica modelo 1272) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e operacionalizado por apenas um operador, para padronização das imagens (FIGURA 7).

Para a caracterização da osteoporose, os animais foram eutanasiados com 8 semanas, através da câmara de CO₂. Posteriormente foram retirados seus fêmures e armazenados em solução de formol tamponado à 10% (pH7) (Merck, HE, Alemanha).

Os parâmetros de escaneamento utilizados no microtomógrafo Skyskan 1272, foram tamanho pixel de 10 μ m, voltagem de 70 kV, corrente elétrica de 142 μ A e filtro de alumínio de 0,5 mm. As imagens resultantes foram reconstruídas tridimensionalmente (3D) com tamanho de voxel de 10 μ m³ utilizando o software NRecon® (versão 1.6.10.4, Bruker, Bélgica) e posteriormente as imagens renderizadas foram submetidas à análise morfométrica utilizando o software CT Analyser®(CTan) (versão 1.15.4.0, Bruker, Bélgica).

Previamente ao início da análise morfométrica, as imagens reconstruídas foram visualizadas pelo software DataViewer® (versão 1.5.4.6, Bruker, Bélgica) que permitiu quantificar as medidas lineares dos eixos coronal, transaxial e sagital bem como a definição a seleção do eixo e posteriormente as análises foram feitas no software CTan.

Utilizando-se do software CTan, foi selecionada uma região de interesse (ROI, do inglês region of interest) e um volume de interesse (VOI, do inglês volume of interest) na distal dos fêmures na qual se efetuou a análise morfométrica, utilizando-se como referência a placa de

crescimento. Percorreu-se corte por corte através da placa de crescimento, no sentido metafíse-diáfise para atingir o plano de visualização de uma “ponte” de cartilagem de baixa densidade que se estende de um extremo ao outro do corte. Nos planos subsequentes, verificou-se a existência de uma organização do osso trabecular primário, permitindo determinar a referência para a placa de crescimento. O VOI para a análise do tecido ósseo trabecular iniciou-se a 1.5 mm abaixo do nível da placa de crescimento e se estendeu em direção à diáfise por uma distância de 3.3 mm (560 slices). A ROI foi determinada manualmente para cada slice do VOI delineando (ferramenta de desenho à mão livre) a área ocupada pelo tecido ósseo trabecular (HATORI et al., 2015). (FIGURA 6)

A análise do VOI do osso cortical em direção axial, também se utilizou a placa de crescimento como referência. A VOI de interesse para análise cortical iniciou-se 4,2 mm distalmente da placa de crescimento e se estendeu 1,5 mm em direção a diáfise (250 slices). Repetiu-se a seleção da ROI através da utilização da ferramenta de desenho a mão livre (HATORI et al., 2015). (FIGURA 6)

A segmentação para o osso trabecular distal do fêmur foi definida na escala de histograma de cinza (0-255), entre 60-255. Após a definição do VOI e a segmentação das imagens, em seguida foi executada a análise morfométrica para obtenção dos parâmetros: volume ósseo (mm^3), volume ósseo/volume total (%). Todos os parâmetros foram calibrados automaticamente pelo sistema através do coeficiente de atenuação linear. (FIGURA 6)

4.5.2 Análise estatística para determinação da osteoporose

Posteriormente após a obtenção dos resultados dos parâmetros ósseos gerados pelo software, foi realizada análise estatística destes dados através do test t-Student para comprovação da indução da osteoporose entre os grupos OVX (4 animais) e SHAM (4 animais). Conforme a tabela 2, estatisticamente ficou comprovado que a cirurgia de ovariectomia induziu a osteoporose no período de 60 dias, validando o modelo de estudo proposto e que também foi validado por Durão et al., (2014) (TABELA 2 E FIGURA 5).

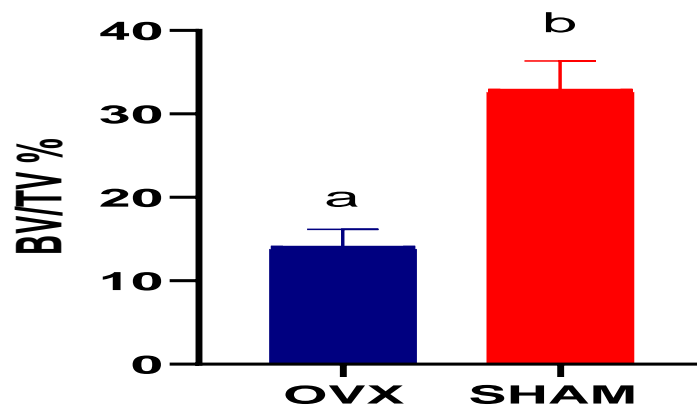
Tabela 2 – Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos referentes a porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV)^{*,**}

4 semanas			
Grupo	n	Média	Desvio Padrão
OVX	4	14.02 ^A	± 2.079
SHAM	4	32.931 ^b	± 3.427

Fonte: Do Autor.

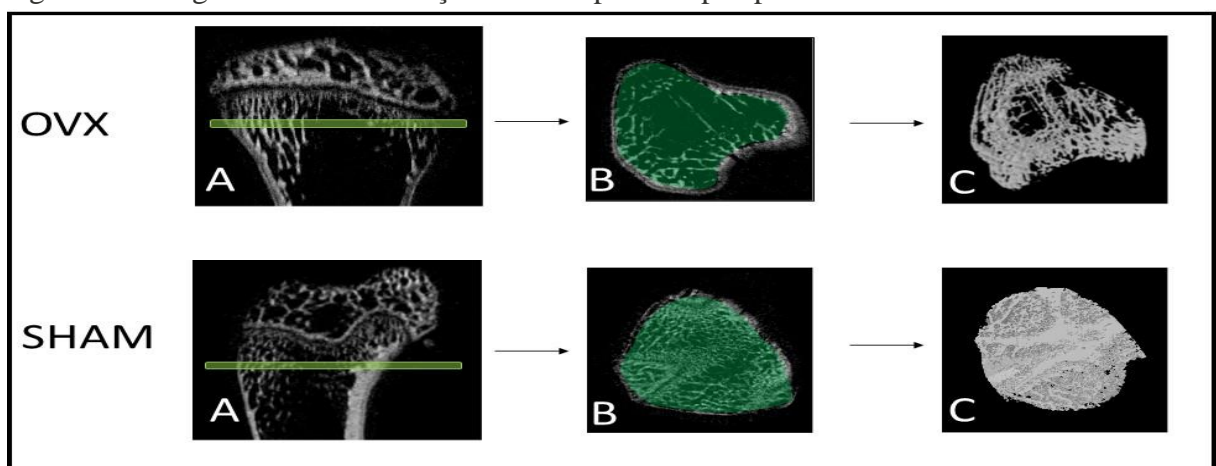
Nota: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$). * test t-Student., ** Caracterização osteoporose.

Figura 5 - Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos da porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV) dos animais OVX e SHAM.^{*,**}



Nota: Letra diferentes denotam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$). * test t-Student., ** Caracterização osteoporose.

Figura 6 – Imagens da caracterização da osteoporose após procedimento ovariectomia



Fonte: Do autor.

Nota: Grupo OVX (Ovariectomizada) – Baixa densidade óssea. Planos: A-Sagital; B-Coronal; C-Reprodução trabeculado ósseo.

Grupo SHAM (cirurgia fictícia) – Densidade óssea normal. Planos: A-Sagital; B-Coronal; C-Reprodução do trabeculado ósseo.

4.6 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO NA CALVÁRIA

As imagens também foram adquiridas por meio do aparelho de μ CT (SkyScan, Kontich, Bélgica modelo 1272) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e operacionalizado por apenas um operador, para padronização das imagens (FIGURA 7).

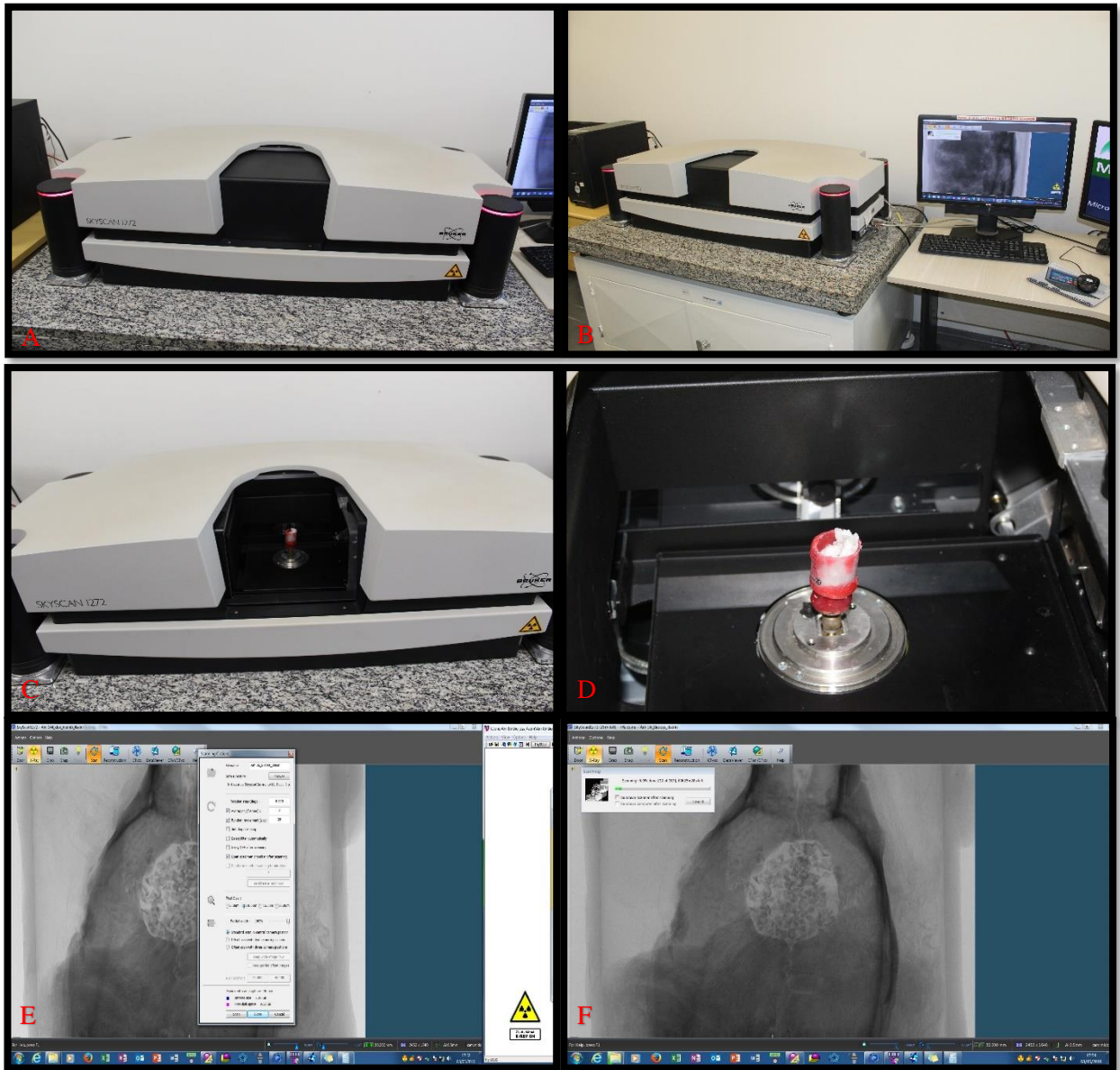
4.6.1 Aquisição das imagens

Os parâmetros de escaneamento utilizados no microtomógrafo Skyskan 1272 foram tamanho pixel de 10 μm , voltagem de 70 kV, corrente elétrica de 142 μA e filtro de alumínio de 0,5 mm, em 180°. As imagens resultantes foram reconstruídas tridimensionalmente (3D) com tamanho de voxel de 10 μm^3 utilizando o software NRecon[®] (versão 1.6.10.4, Bruker, Bélgica) e posteriormente as imagens renderizadas foram submetidas à análise morfométrica utilizando o software CT Analyser[®](CTan) (versão 1.15.4.0, Bruker, Bélgica).

Os softwares CTan[®], Dataviewer[®] e Ctvox[®] foram utilizados para a visualização tridimensional e a análise qualitativa e quantitativa da anatomia da região do defeito ósseo criado. A utilização completa dos softwares para análise quantitativas SkyScan[®] 2D/3D e visualizações em 3D propiciou identificar e determinar a reparação óssea em cada grupo avaliado.

Os espécimes (calvária) foram posicionados e fixados no porta-amostra (Figura 7 C, D) apropriado para o equipamento, utilizando cera utilidade, a fim de permitir maior estabilização do espécime e prevenir qualquer movimentação durante o escaneamento. Após o escaneamento, as projeções microtomográficas foram reconstruídas utilizando o software Nrecon[®]. Para isso, uma margem de segurança de 2 mm acima do início do defeito ósseo criado e composta por cerca de 680 a 780 fatias até alcançar o término do defeito ósseo avançando 2 mm abaixo (FIGURA 8).

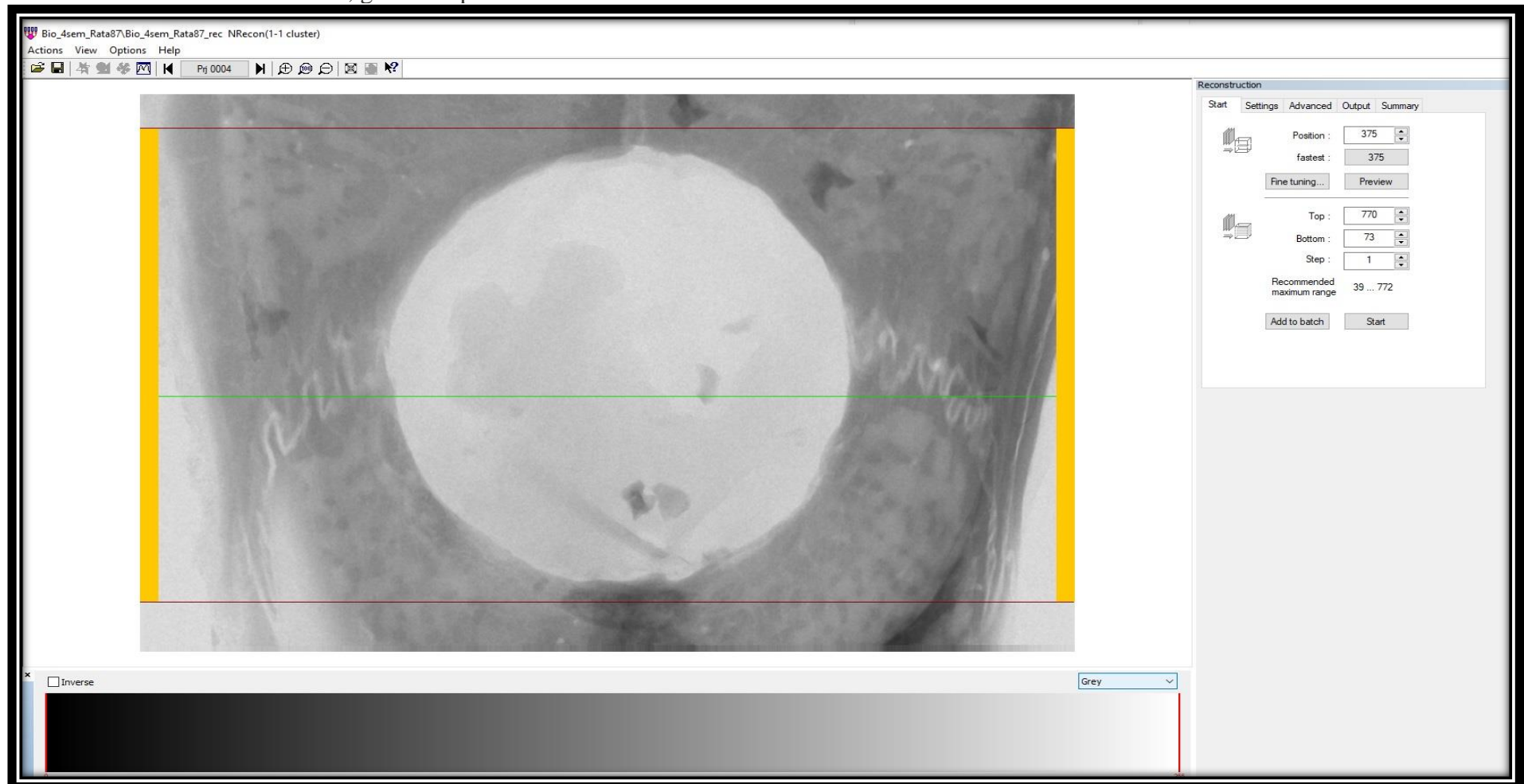
Figura 7 - Imagens Microtomógrafo e software de captação



Fonte: Do autor

Notas: (A, B) Microtomógrafo e datacenter; (C,D) Porta Amostra e espécime fixado e suporte; (E,F) Software para escaneamento e captura

Figura 8 - Imagem da tela inicial do software NRecon®. Definindo a área a ser reconstruída da região do defeito, sendo 2 mm acima e 2 mm abaixo do defeito ósseo criado, gerando aproximadamente 680 a 780 fatias.

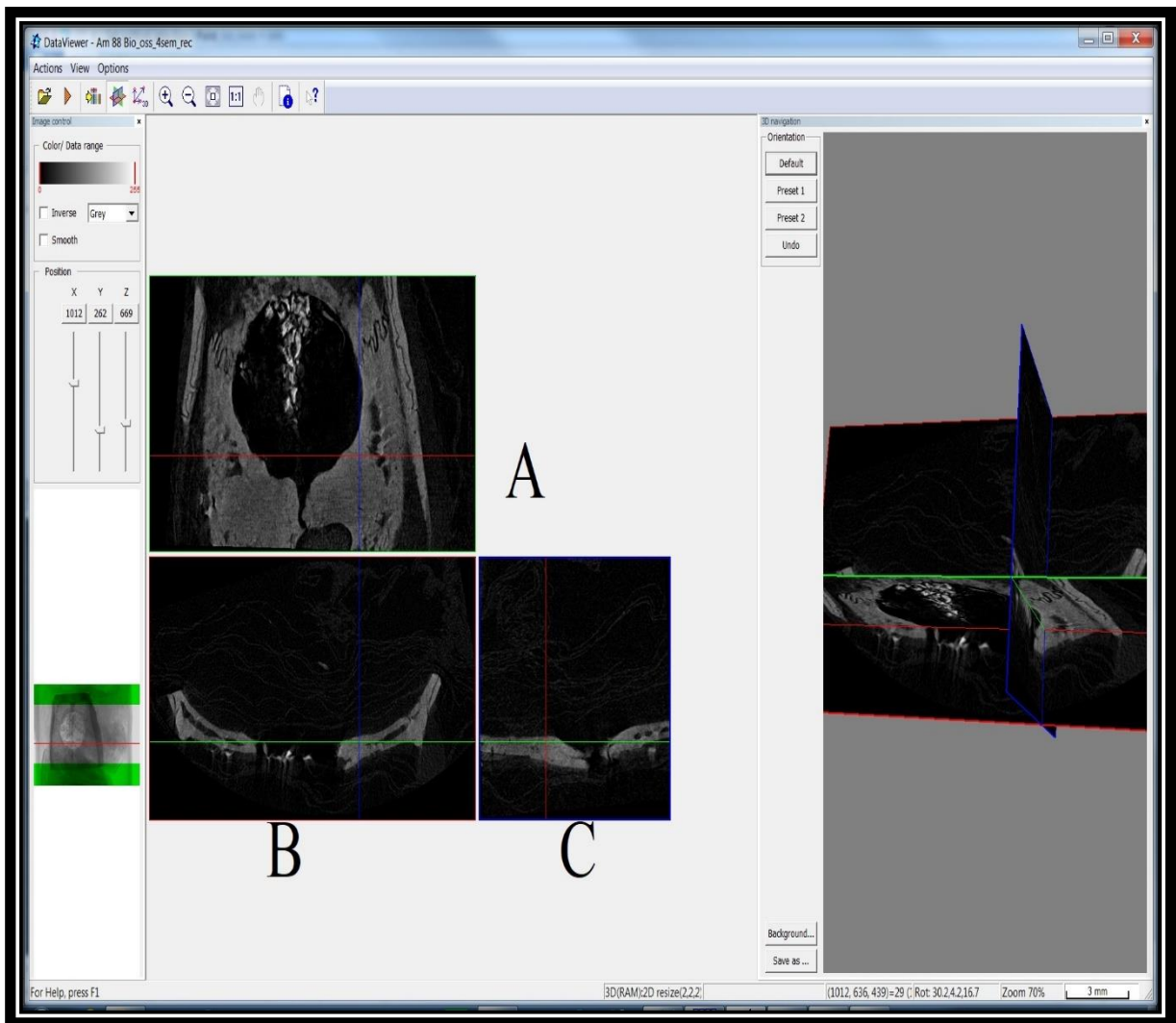


Fonte: Do autor.

4.6.2 Processamento das imagens

Após a captura e renderização das imagens pelo software NRecon[®], as imagens foram processadas pelo *software* Dataviewer[®] para correção e posicionamento dos planos transaxial, sagital e coronal visto na Figura 9. O plano coronal foi selecionado para análise das imagens pois permite selecionar todo o diâmetro do defeito. Com isso foi possível determinar um ROI de 6 mm de diâmetro sobre o defeito crítico. A seguir, as imagens reposicionadas foram salvas para posterior análise microestrutural pelo *software* CTan[®].

Figura 9 - Imagem da tela inicial do software Dataviewer[®]. Correção e posicionamento dos planos transaxial, sagital e coronal. A) plano coronal; B) plano transaxial; c) plano sagital.



Fonte: Do autor.

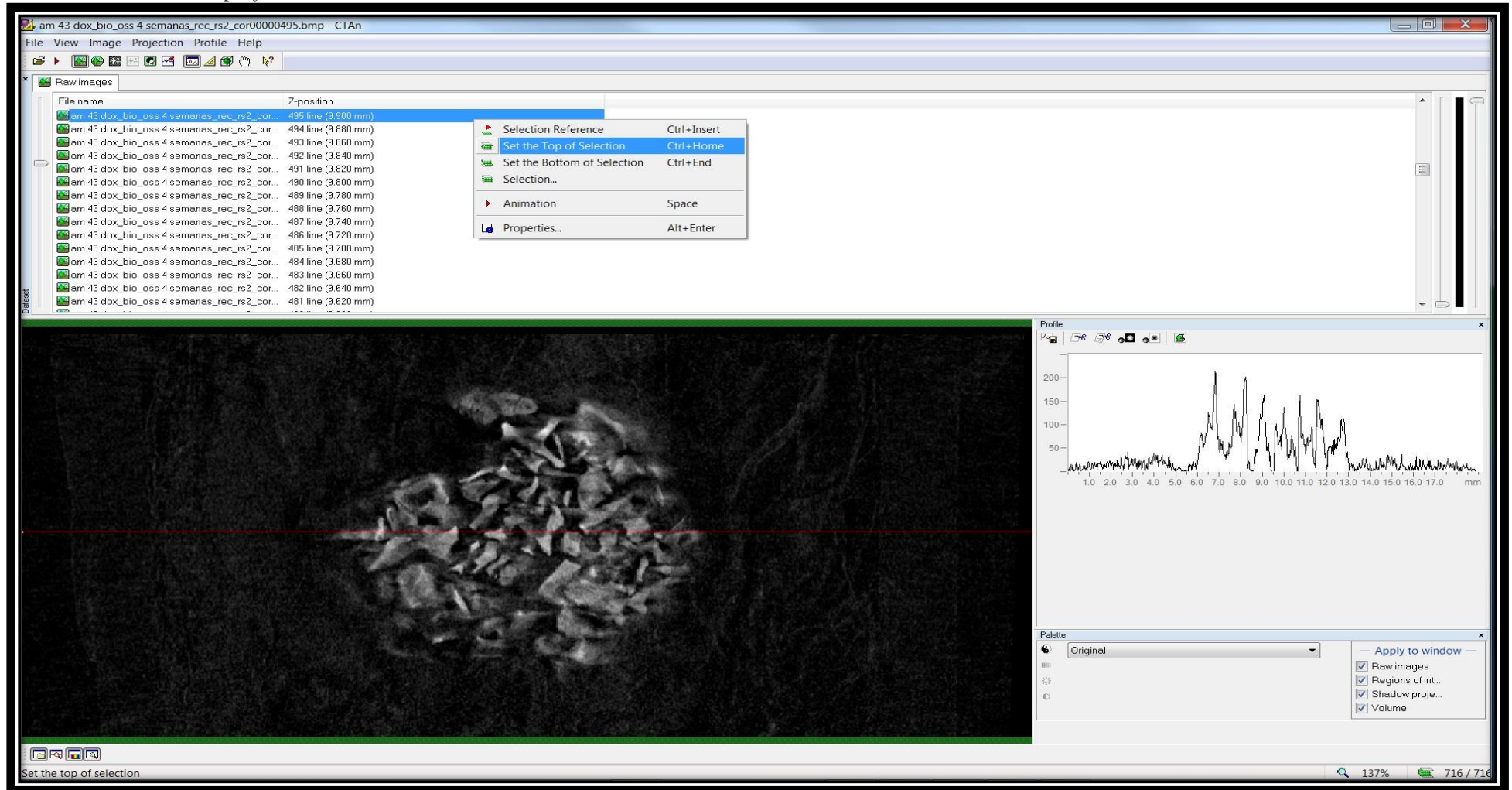
4.6.3 Análise das imagens

Após o reposicionamento e seleção do plano coronal, foi feita a análise das imagens pelo *software* CTan[®]. Desta forma foi possível quantificar estruturalmente nas imagens microtomográficas obtidas o tecido ósseo mineralizado neoformado utilizando parâmetros volumétricos (área, distância, percentual, volume das estruturas) e parâmetros de densidade óssea (espessura trabecular, distância entre as trabéculas e número de trabéculas). Tais parâmetros seguem os adotados pela Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR) (DEMPSTER et al., 2013; PARFITT et al., 2009). As imagens iniciais geradas pelo microtomógrafo foram processadas em formato bidimensional (2D) por meio de agrupamentos de pixels no formato de linhas com espessura de 0,020 mm (10µm) cada. Para efetuar a análise volumétrica, o *software* previamente unifica todas as linhas selecionadas e através da binarização da imagem e seleção do ROI gera uma imagem tridimensional (3D) por meio de um agrupamento de voxels.

4.6.3.1 Seleção dos cortes microtomográficos (slices) do defeito crítico na imagem (plano coronal)

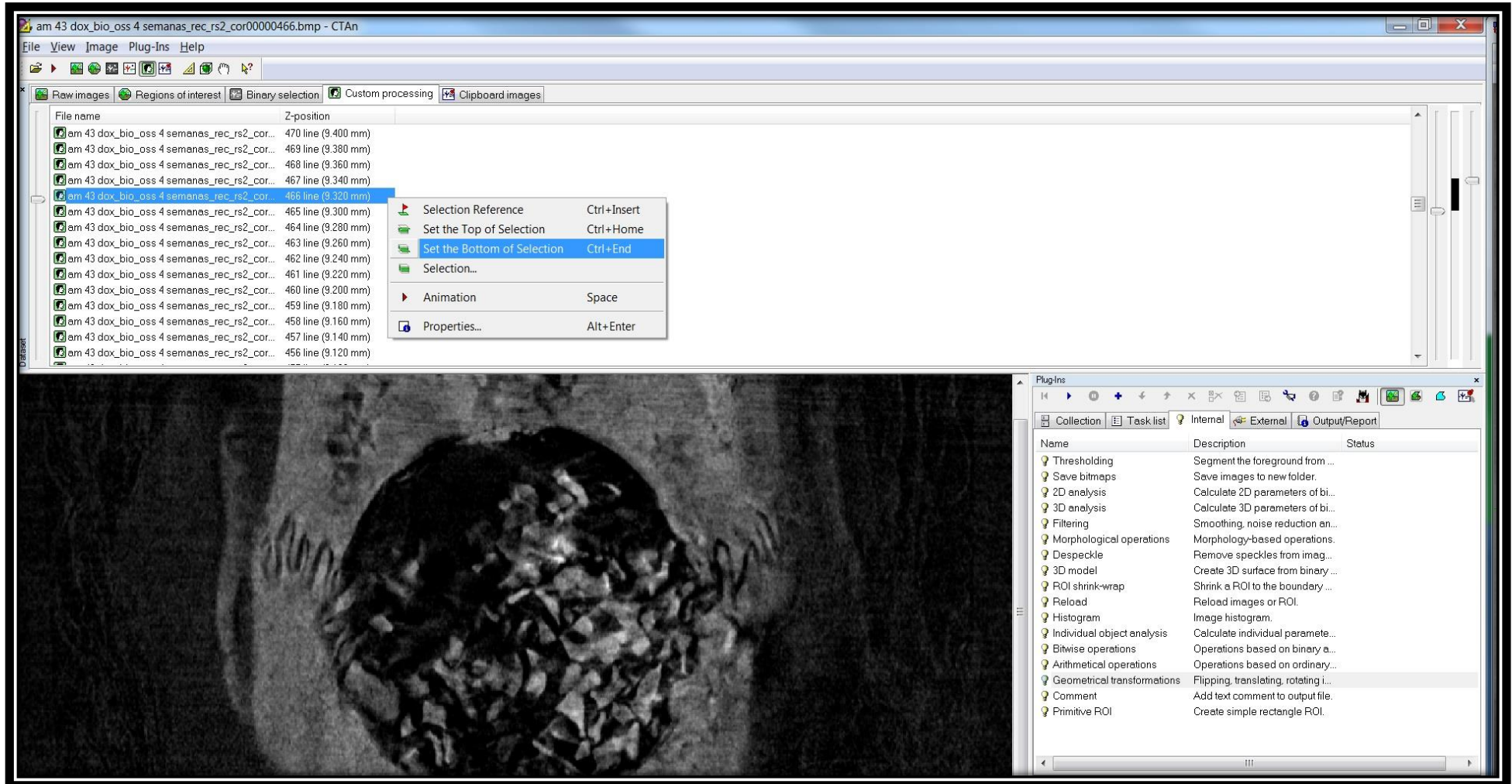
Para a realização da binarização das imagens e seleção do ROI, os cortes microtomográficos relacionados à área do defeito foram selecionados e agrupados em cada imagem dos diferentes espécimes. Esta seleção foi realizada pela marcação do corte microtomográficos correspondente ao início do defeito ósseo (Top) (FIGURA 10) até a linha final desse (Bottom) (FIGURA 11). Para existir uma padronização do tamanho da área de interesse a ser analisada, todas as imagens tiveram o mesmo número de cortes microtomográficos. O número de 100 cortes foi estabelecido pela média de cortes de todas as imagens e foi utilizado para a leitura do *software*.

Figura 10 - Imagem da tela CTan[®] utilizada para determinação e seleção dos cortes microtomográficos. Seleção do corte inicial utilizando a opção *Set the top of selection*.



Fonte: Do autor.

Figura 11 - Imagem da tela CTan[®] utilizada para determinação e seleção dos cortes microtomográficos. Seleção do corte final utilizando a opção *Set the bottom of selection*.

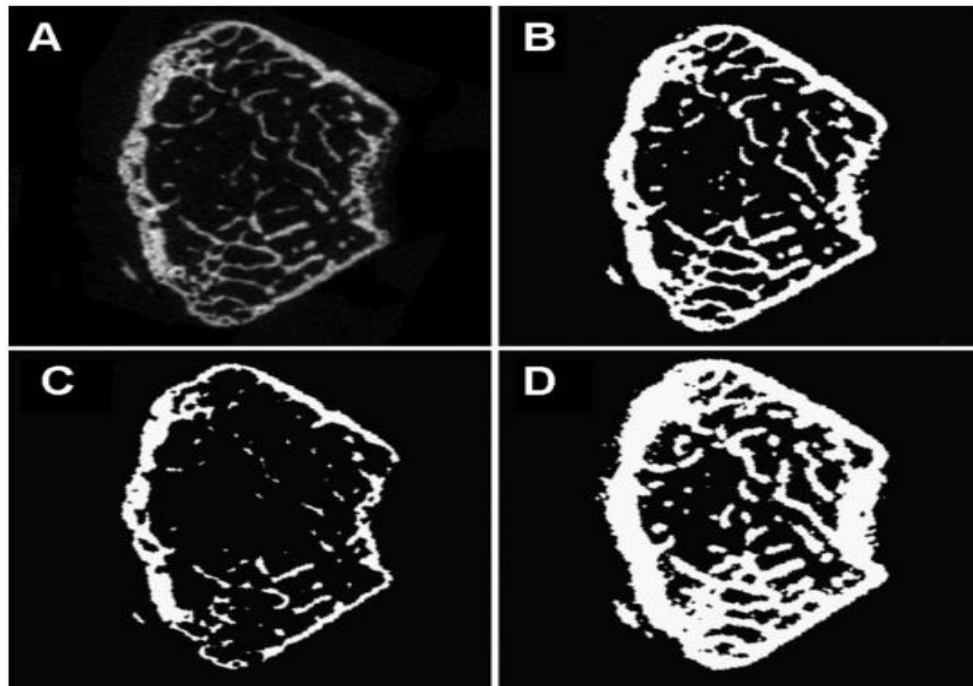


Fonte: Do autor.

4.6.3.2 Binarização das imagens.

Posteriormente, foi realizada a binarização da imagem, para que o *software* pudesse fazer a leitura dos pixels mediante a um ajuste fino da escala de cinza (*gray threshold*). O valor de cinza de uma imagem é proporcional ao coeficiente de atenuação linear do tecido. A escala dos valores de cinza no *software* de análise varia de 0 a 255. No presente estudo, a seleção do *threshold* para as 100 imagens foi realizada visualmente por comparação com a imagem original de acordo a metodologia descrita por Bouxsein et al., (2010) variando uma escala de cinza. Dessa maneira era possível diferenciar o tecido duro mineralizado do tecido mole, principalmente dentro do defeito crítico de 6 mm. Assim os pixels marcados em branco representaram o tecido ósseo mineralizado ou biomaterial, enquanto que os pixels marcados em preto representaram o tecido não mineralizado. Seguindo esta metodologia foi possível identificar o osso neoformado, o biomaterial Bio-Oss® e o tecido mole.

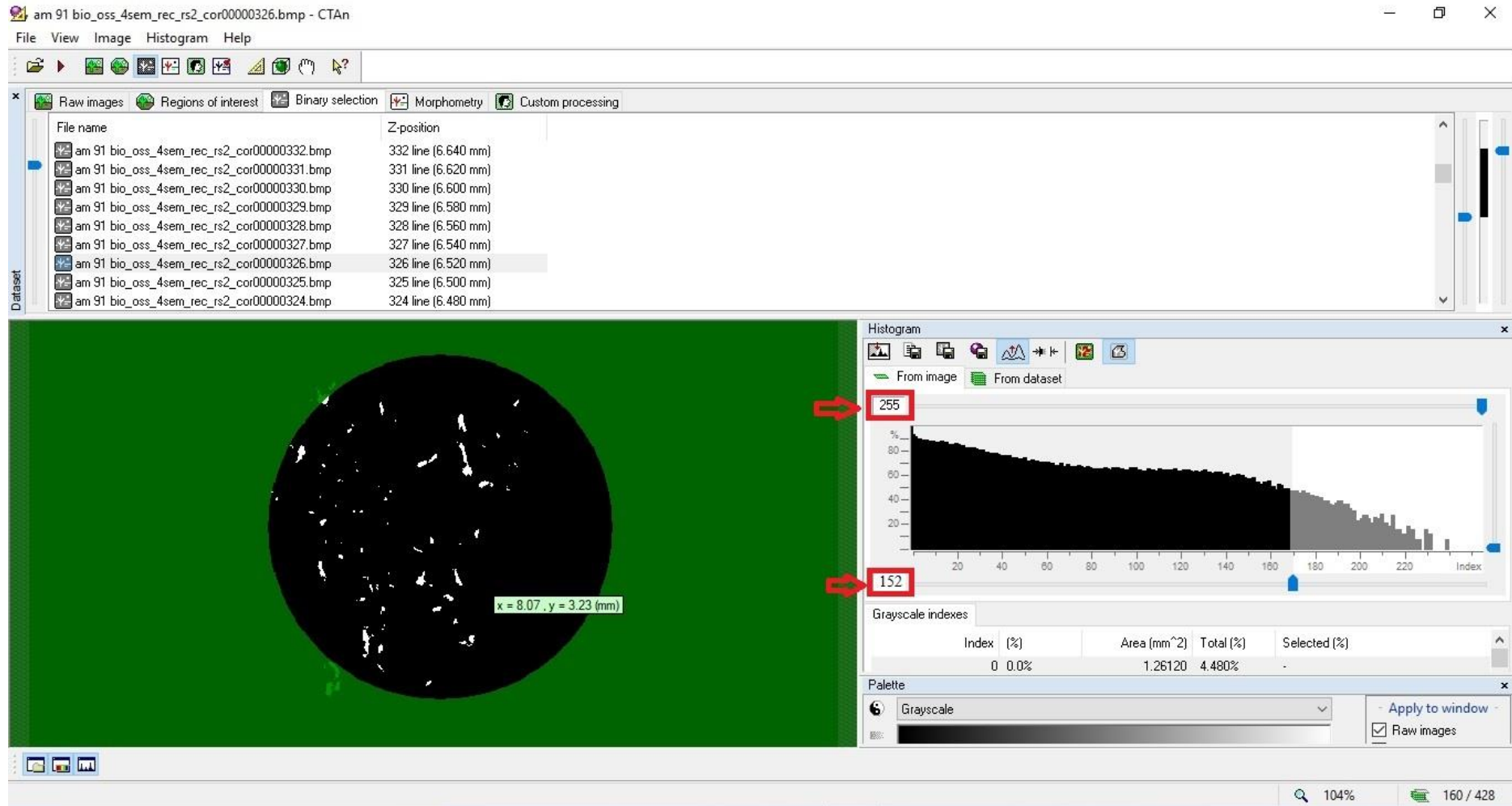
Figura 12 - A) Imagem original, B) Imagem binarizada com *threshold* correto, C) Imagem binarizada com *threshold* elevado, D) Imagem binarizada com *threshold* baixo.



Fonte: Bouxsein et al., (2010).

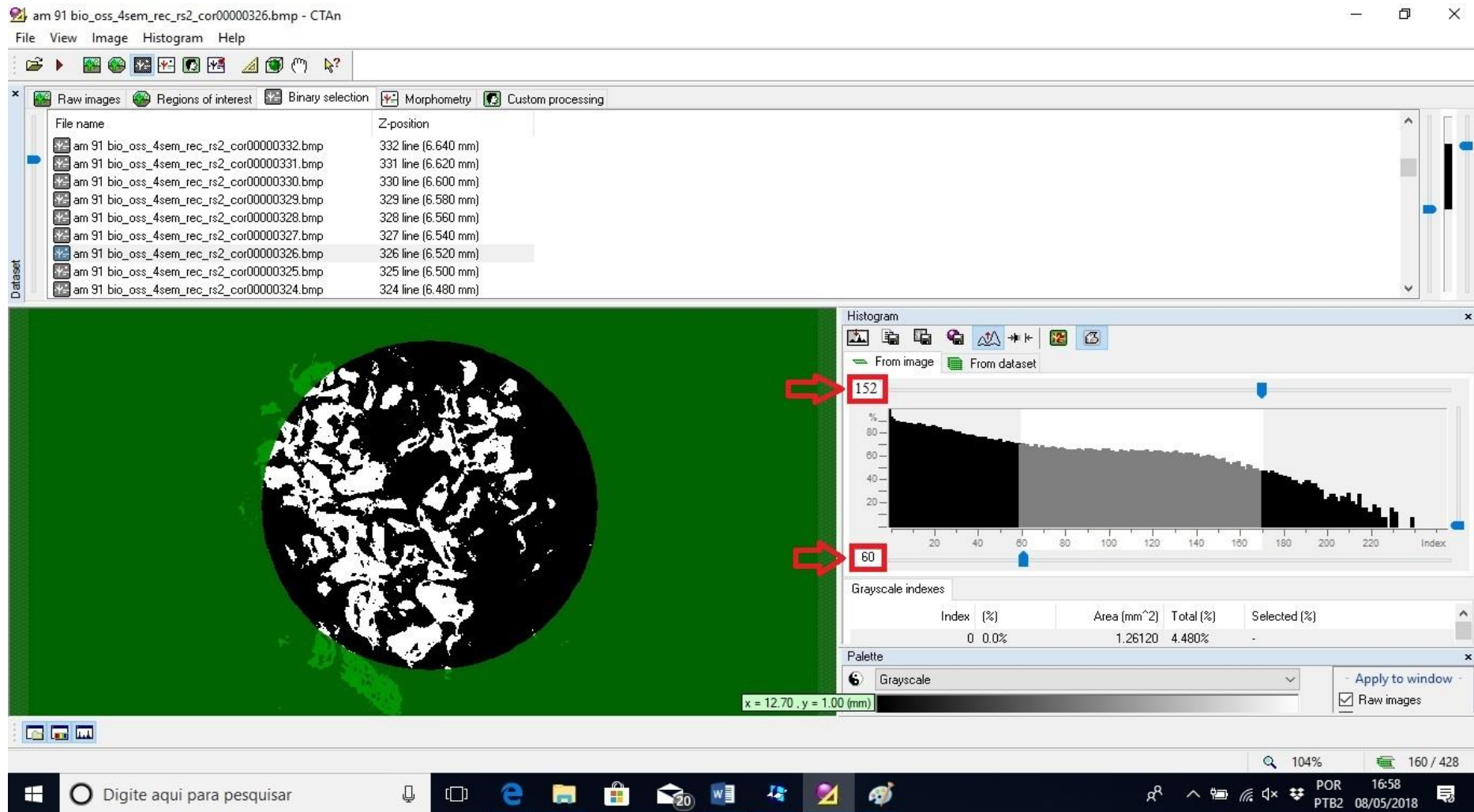
A densidade do biomaterial presente é maior quando comparado à estrutura óssea neoformada. Logo para a identificação dos biomateriais foi utilizado *threshold* de 152 até 255 (FIGURA 13). Para identificação do osso neoformado, a *threshold* de 60 até 152 forma utilizados (FIGURA 14). Valores de *thresholds* entre 0 e 60 correspondiam aos tecidos mole e espaços vazios.

Figura 13 - Imagem da tela CTan[®] utilizada para seleção dos *threshold* (*biomaterial*). As setas vermelhas indicam o histograma e os valores selecionados para a imagem em destaque. Sendo que os valores de cinza estão entre a média de 152 a 255.



Fonte: Do autor.

Figura 14 - Imagem da tela CTan[®] utilizada para seleção dos *threshold* (*osso neoformado*). As setas vermelhas indicam o histograma e os valores selecionados para a imagem em destaque. Sendo que os valores de cinza estão entre a média de 60 a 152.



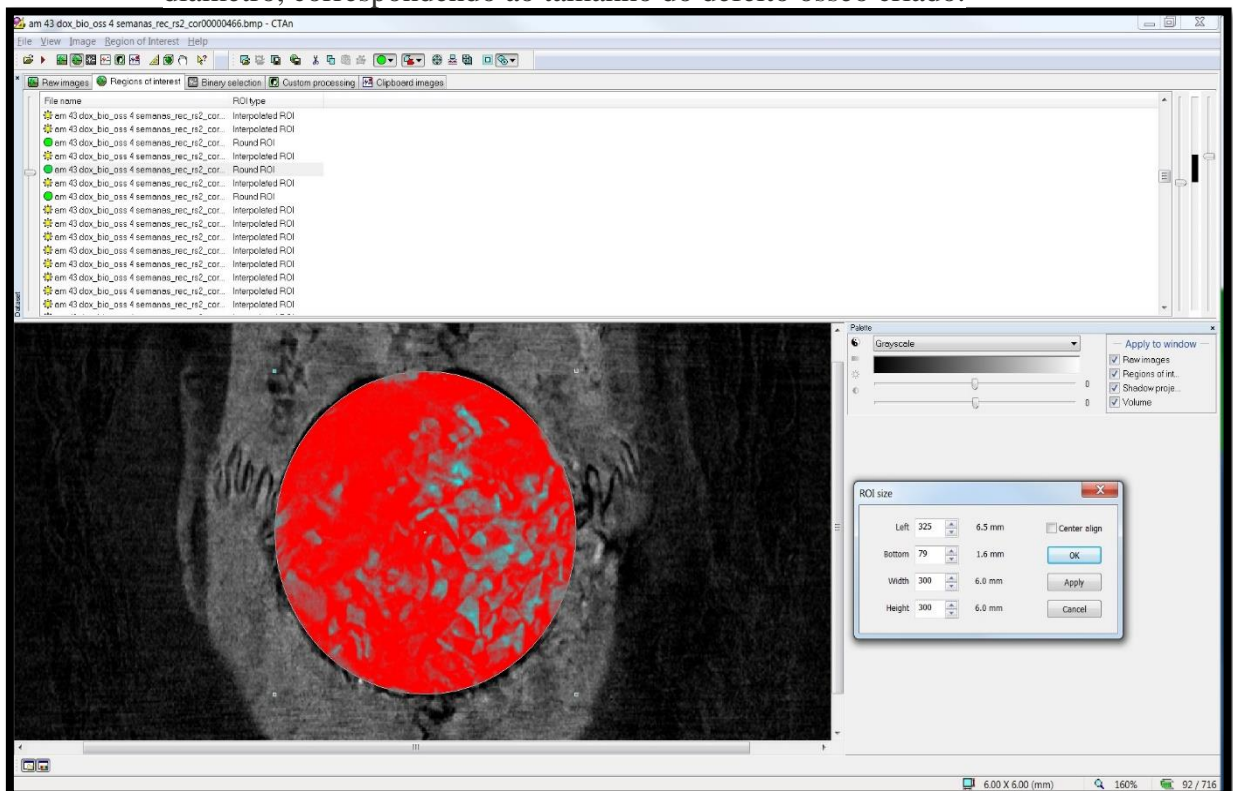
Fonte: Do autor.

4.6.3.3 Seleção e definição das ROIs

Após a binarização das imagens foi definida uma ROI no formato circular no plano coronal, apresentando um diâmetro médio de 6,0 mm correspondente ao tamanho do defeito ósseo confeccionado na calvária do animal. A determinação das ROIs serviu para análise e leitura do software ocorresse apenas nas áreas selecionadas (FIGURA 15).

Posteriormente à seleção e posicionamento correto da ROI, foi aplicado comando no software para aplicar estas dimensões em todas os 100 cortes microtomográficos selecionados previamente. Deste modo foi transformada um ROI em um VOI (Volume de interesse ósseo) tridimensional, por meio da união dos pixels de cada ROI em todas os cortes selecionados, convertendo-os em voxels isotrópicos de $10 \mu\text{m}^3$. Assim, o software pode fazer a leitura dos voxels e produzir dados volumétricos das regiões selecionadas e das diferentes estruturas analisadas (biomaterial, osso neoformado).

Figura 15 - Imagem da tela CTan[®] utilizada para seleção dos ROIs. Secção circular de 6 mm diâmetro, correspondendo ao tamanho do defeito ósseo criado.



Fonte: Do autor

4.6.4 Análise em 3D – Obtenção dos parâmetros volumétricos e de densidade

Após a formação dos VOIs, realizou-se a análise morfológica em 3D, adotada pela ASBMR. Os VOIs foram submetidos ao processamento pelo software, que como resultado gerou os parâmetros volumétricos e de densidade óssea (BOUXSEIN et al., 2010; DEMPSTER et al., 2013; PARFITT et al., 2009):

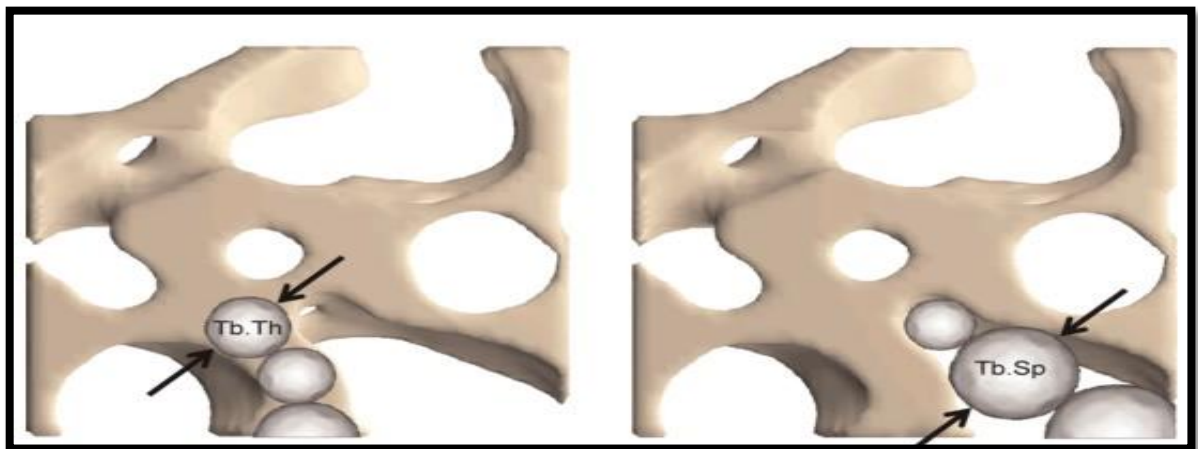
1-Parâmetros volumétricos:

- **Volume ósseo (BV):** quantidade de voxels presentes apenas no tecido ósseo mineralizado, expresso em mm^3 ;
- **Superfície óssea (SO):** quantidade de pixels presentes apenas em osso neoformado na superfície, expresso em mm^2 .

2-Parâmetros de densidade óssea:

- **Espessura trabecular (Tb.Th):** média da espessura das trabéculas, expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram dentro da trave óssea (FIGURA 16);
- **Distância entre as trabéculas (Tb.Sp):** média da distância entre as trabéculas expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram entre as traves ósseas (FIGURA 16);
- **Número de trabéculas (Tb.N):** mensuração da média do número de trabéculas por unidade de comprimento, expresso em $1/\text{mm}$.

Figura 16 - Representação esquemática do método em 3D. Aplicação das esferas para calcular a Tb.Th e Tb.Sp.



Fonte: Bouxsein et al., (2010).

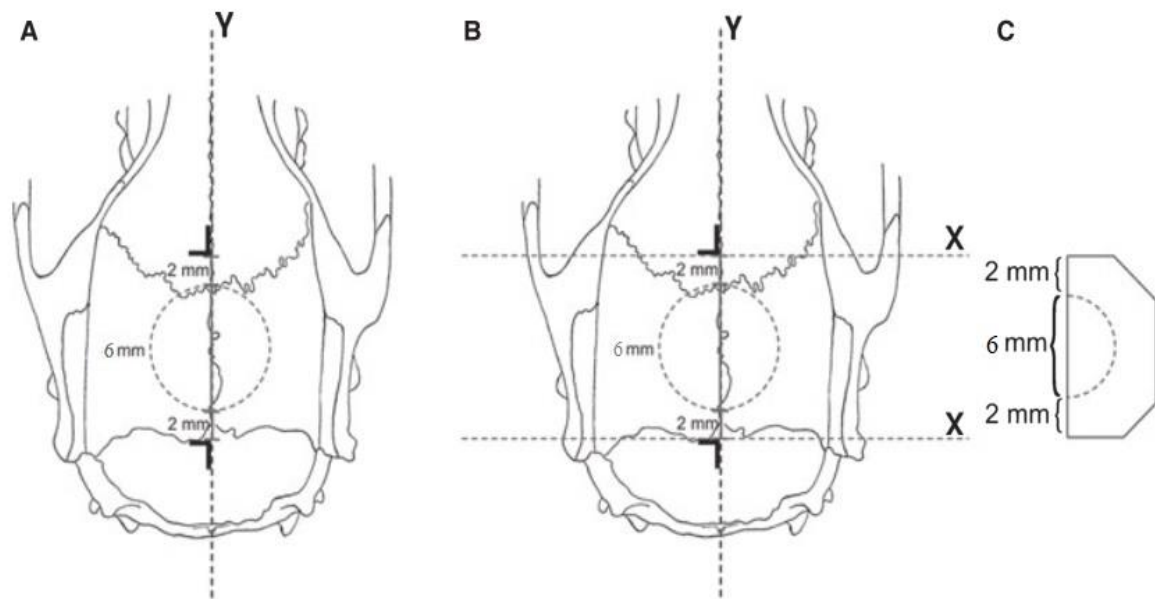
4.6.4.1 Análise estatística – Análise microtomográfica

Os resultados de cada parâmetro (BV, SO, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N) produzidos pelo *software* CTan foram submetidos à análise estatística para obtenção da média, desvio padrão, mínimo e máximo. Após a confirmação da normalidade dos dados utilizando o teste Shapiro-Wilk, os dados das médias dos parâmetros de todos os grupos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e complementados pelo teste Tukey que foi utilizado para a comparação entre os diferentes grupos, com nível de significância 5%. Depois foram realizadas as correlações de cada parâmetro intergrupo, por meio do coeficiente de Spearman. O valor do coeficiente de correlação (r) varia de -1,0 a +1,0 onde o zero significa ausência total de correlação. O coeficiente de correlação entre 0,3 e 0,5 indica correlação fraca, entre 0,5 e 0,7 moderada e acima de 0,7 a correlação é elevada. A correlação pode ser positiva (o aumento de uma variável, aumenta a outra) ou negativa (o aumento de uma variável, diminui a outra). Em seguida foi aplicado um modelo de regressão linear. Toda a análise estatística foi realizada por meio do *software* GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) e todos os testes estatísticos desse estudo foram aplicados ao nível de confiança de 95%.

4.7 PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS

Após as captações microtomográficas, os espécimes foram processados, as peças que estavam fixadas em formol tamponado à 10% (pH7) (Merck, HE, Alemanha) foram lavadas em água corrente e a descalcificação foi realizada em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A) a 18% (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). Posteriormente a descalcificação inicial, os espécimes foram divididos no sentido longitudinal em dois blocos, tendo como referência exatamente o centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de ionômero de vidro com formato de “L” como referência. Ainda assim, foram realizados cortes transversais que tangenciaram o menor eixo de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime possuísse 10 mm de extensão no sentido longitudinal (FIGURA 17). Este procedimento, permitiu determinar precisamente os limites do defeito cirúrgico original. Uma descalcificação adicional foi necessária e posteriormente as peças foram processadas e incluídas em parafina. Cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrometros de espessura foram realizados, iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE) para a análise microscópica.

Figura 17 - Representação esquemática do processamento das calvárias.



Fonte: Adaptado de Messora et al., (2008).

Notas: (A) Corte longitudinal ao longo eixo da linha central (Y) do defeito de tamanho crítico. (B) Cortes transversais (X). (C) Dimensões do espécime a ser embebido em parafina.

4.8 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Os cortes histológicos foram selecionados de maneira que o defeito cirúrgico original pudesse ser avaliado histometricamente em toda a sua extensão. As imagens foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam MRc 1.4Mb – Carl Zeiss, Göttingenm, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axio Lab – Carl Zeiss, Göttingenm Alemanha) com um aumento original de 10x (lente objetiva N – Achoroplan) e salvas em computador. A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio de um software Image J 1.48 (National Institute of Mental Health, Maryland, EUA). O programa permitiu o cálculo da área de formação óssea. Os seguintes critérios baseados nos trabalhos de Melo et al., (2005), Messora et al., (2007) e Silva et al., (2016) foram utilizados para padronizar a análise histométrica das imagens digitalizadas:

A) A área total (AT) a ser analisada correspondeu à área total do defeito cirúrgico. Esta área foi determinada pela identificação das superfícies interna e externa da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Estas superfícies foram

conectadas com linhas desenhadas seguindo suas curvaturas. Foram então medidos a partir das extremidades dos espécimes 2 mm em direção ao centro do defeito para estabelecer os limites do defeito cirúrgico original. A altura da área total foi determinada de acordo com a espessura da calota craniana. A área de osso (AO) foi delineada dentro dos limites da área total (AT) (FIGURA 18).

- B) A AT foi medida em μm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AO também foi medida em μm^2 e calculada como porcentagem de AT.
- C) As partículas remanescentes de Bio-Oss[®] foram medidas em μm^2 e calculada como porcentagem de AT.

Figura 18 – Análise histométrica – Padronização do defeito para análise histométrica.

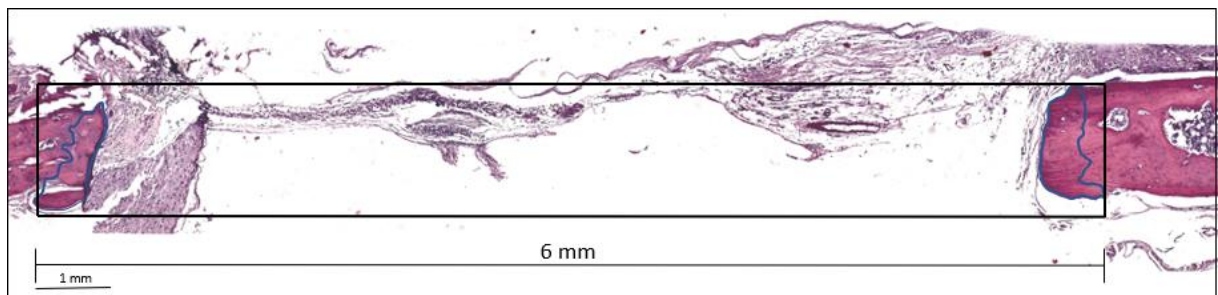


Foto: Autor

Nota: Utilizando o software Image J, com o estabelecimento da área total (AT) do defeito cirúrgico (linhas em preto), considerando um comprimento total de 6 mm e uma altura de acordo com a espessura da calota craniana. No interior da área total, foi delimitada a área de osso neoformado (AO) no defeito (linha azul).

4.8.1 Análise estatística

A área de neoformação óssea ou área de osso (AO) foi representada pela porcentagem da área de novo osso em relação à área total do defeito cirúrgico, envolvendo os cortes histológicos localizados em toda a extensão do defeito cirúrgico original. Os dados obtidos referentes aos 5 grupos: SHAM, OVX-CS, OVX-BIO, OVX-DOX e OVX-BODOX nos 2 períodos de avaliação (4 e 8 semanas) foram submetidos a testes paramétricos na análise inferencial dos dados. Após a avaliação da normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, estes foram submetidos ao teste de ANOVA e complementado pelo teste de Tukey que foi utilizado para a comparação entre os grupos em diferentes períodos experimentais. Na análise intragrupo variando-se os períodos experimentais na análise histométrica, foi utilizado

o teste t-Student para análise inferencial dos dados. O software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para análise estatística desse estudo e todos os testes estatísticos desse estudo foram aplicados ao nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Os animais se mantiveram saudáveis durante todo o período experimental (4 ou 8 semanas), demonstrando boa tolerabilidade ao procedimento cirúrgico e ausência de sinais de infecção após as intervenções.

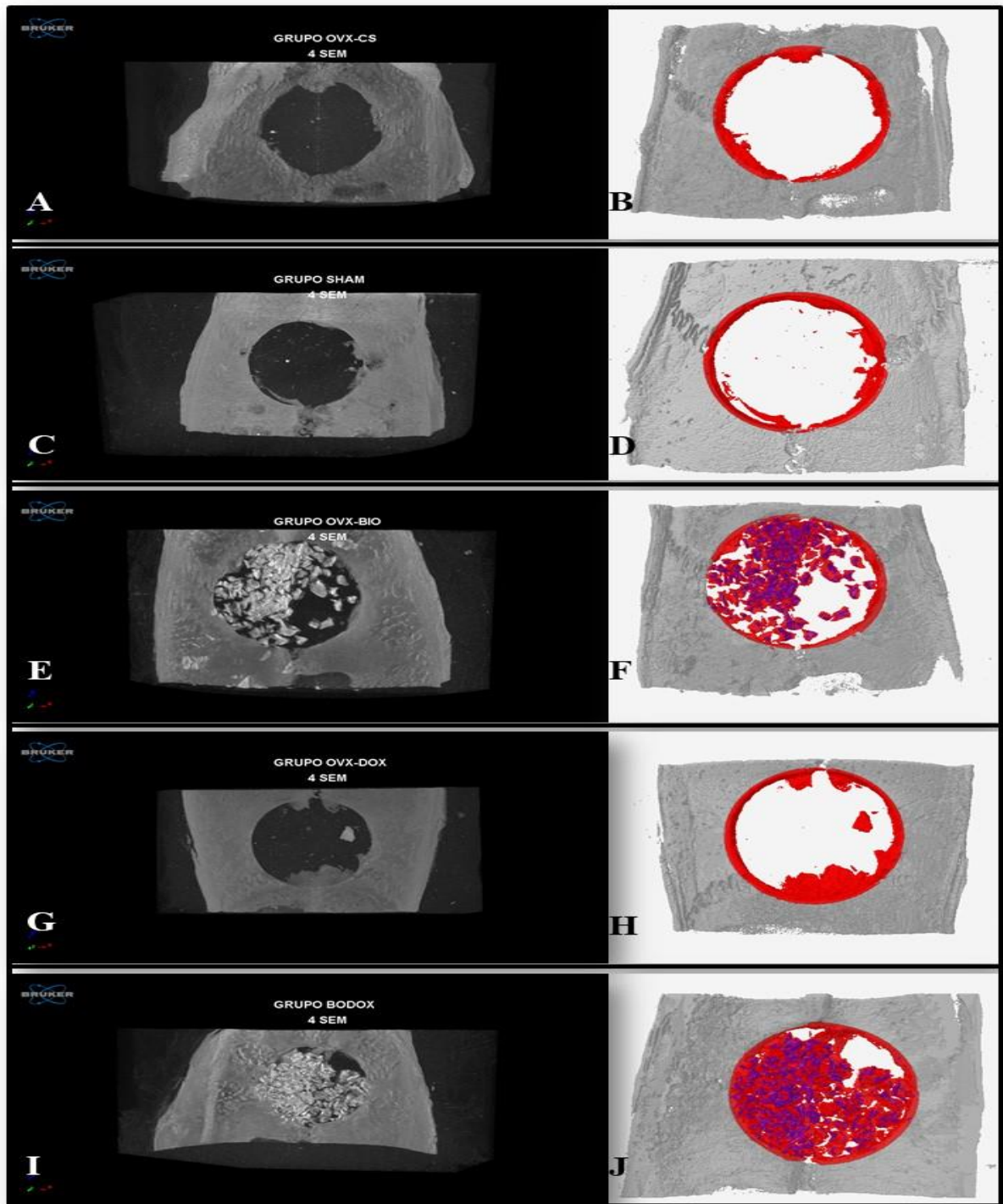
5.1 AVALIAÇÃO MICROTOMOGRÁFICA QUALITATIVA

As imagens microtomográficas representativas dos espécimes de cada grupo nos períodos de 4 e 8 semanas são apresentados nas Figuras 19 e 20, respectivamente.

5.1.1 Período de 4 semanas

As imagens microtomográficas qualitativas dos espécimes dos grupos estudados no período de 4 semanas, mostraram neoformação óssea nas bordas do defeito cirúrgico em sentido ao centro do defeito. A neoformação óssea foi discreta e restrita às margens do defeito nos grupos OVX-CS, SHAM (FIGURA 19 - A, B, C, D), no grupo OVX-DOX (FIGURA 19 - G, H), visualmente, houve uma maior neoformação óssea em relação aos grupos OVX-CS e SHAM. Os grupos OVX-BIO e OVX-BODOX apresentaram uma neoformação óssea mais evidente, além da presença de partículas de Bio-Oss® circunscritas por pequenas porções de osso neoformado (FIGURA 19 - F, I, J).

Figura 19 - Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico dos grupos estudados no período de 4 semanas.



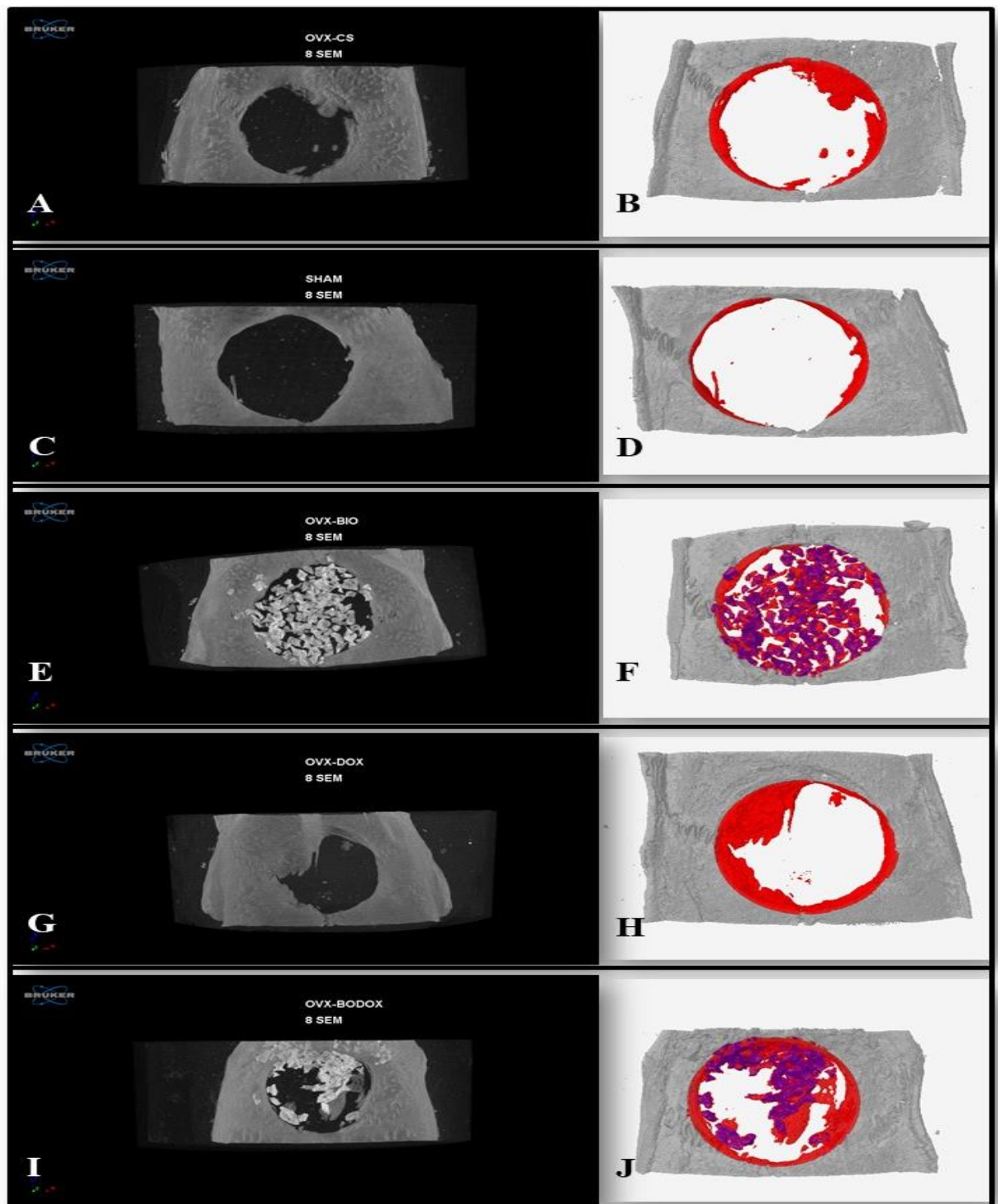
Fonte: Do autor.

Nota: Imagens microtomográficas - reconstrução em projeção de máxima intensidade (MIP) (A, C, E, G e I). Reconstrução microtomográficas, visão em plano coronal do defeito crítico, delimitação da área do defeito crítico (máscara circular), áreas em vermelho correspondente ao osso neoformado e a áreas em roxo representam as partículas de Bio-Oss[®] remanescentes (B, D, F, H e J).

5.1.2 Período de 8 semanas

As imagens microtomográficas dos espécimes dos grupos estudados no período de 8 semanas, mostraram neoformação óssea nas bordas do defeito cirúrgico em sentido ao centro do defeito, com discreto aumento em relação ao período anterior de 4 semanas. A neoformação óssea também foi discreta e restrita às margens do defeito nos grupos OVX-CS, SHAM (FIGURA 20 - A, B, C, D). No grupo OVX-DOX (FIGURA 20 - G, H) houve uma maior neoformação óssea em relação ao período anterior e se aproximou aos grupos OVX-BIO e OVX-BODOX, que apresentaram uma neoformação óssea mais evidente, além da presença de partículas de Bio-Oss[®] circunscritas por pequenas porções de osso neoformado (FIGURA 20 - E, F, I e J).

Figura 20 - Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico dos grupos estudados no período de 8 semanas



Fonte: Do autor.

Nota: Imagens microtomográficas - reconstrução em projeção de máxima intensidade (MIP) (A, C, E, G e I). Reconstrução microtomográficas, visão em plano coronal do defeito crítico, delimitação da área do defeito crítico (máscara circular), áreas em vermelho correspondente ao osso neoformado e a áreas em roxo representam as partículas de Bio-Oss[®] remanescentes (B, D, F, H e J).

5.3 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi verificada. As médias percentuais e os desvios-padrões para todos os grupos e períodos (4 e 8 semanas), assim como o resultado da comparação entre os mesmos foram calculados.

A porcentagem de formação óssea levando-se em conta o Volume ósseo (BV) e Superfície Óssea (SO) e os parâmetros relacionados a densidade óssea através das medidas trabeculares: Espessura trabecular (Tb.Th), Distância entre as trabéculas (Tb.Sp), Número de trabéculas (Tb.N) estão no APÊNDICE A.

5.3.1 Volume ósseo (BV)

As médias de volume ósseo (BV) neoformado, em mm^3 , o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos períodos experimentais estão apresentadas na Tabela 2. Observou-se que a maior média de BV em ambos períodos (4 e 8 semanas) foi encontrada no grupo OVX-BIO, correspondendo a $6,030 \text{ mm}^3$ e $5,504 \text{ mm}^3$, respectivamente (TABELA 3).

Tabela 3 - Médias, desvio padrão e diferenças estatísticas dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro volume ósseo (BV), em mm^2 segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	3	1.3650 ^{aA}	± 1.165	3	1.1710 ^{aA}	± 0.9633
OVX-CS	3	1.1740 ^{aA}	± 1.189	3	1.6470 ^{abA}	± 0.7559
OVX-DOX	3	1.3254 ^{aA}	± 0.183	3	3.2035 ^{abA}	± 1.7192
OVX-BIO	3	6.0300 ^{bA}	± 1.927	3	5.5041 ^{bA}	± 0.3318
OVX-BODOX	3	3.3010 ^{abA}	± 3.683	3	3.2420 ^{abA}	± 2.2467

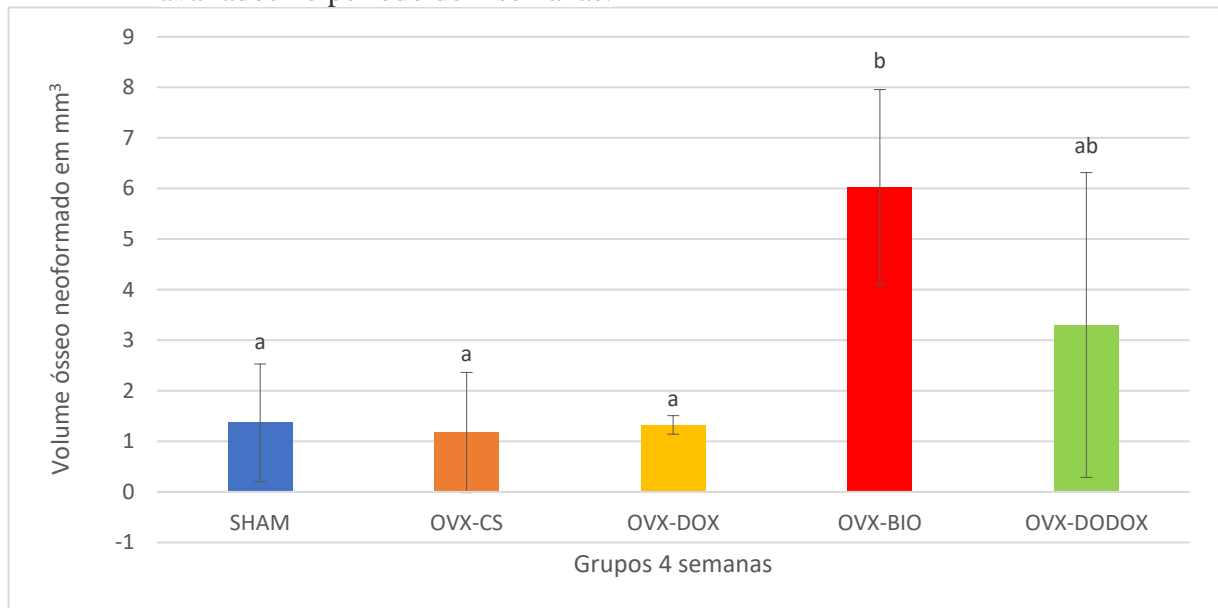
Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$) segundo o teste Tukey.

Após a submissão dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro BV à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados nos períodos experimentais de 4 semanas ($p=0,0096$) e 8 semanas ($p=0,0006$). Portanto, foi realizado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância para poder observar entre quais grupos e períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 3).

No período experimental de 4 semanas o BV no grupo OVX-BIO (6,0300 mm³) foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) do que os encontrados nos grupos SHAM e OVX-CS (1,3650 mm³ e 1,1740 mm³, respectivamente) e OVX-DOX (1.3254 mm³). Observou-se também que o volume ósseo entre os grupos OVX-BIO e OVX-BODOX não mostram diferenças significantes ($p > 0,05$) (FIGURA 21).

Figura 21 - Médias e desvio padrão do Volume ósseo (BV) neoformado (mm³) dos grupos avaliados no período de 4 semanas.

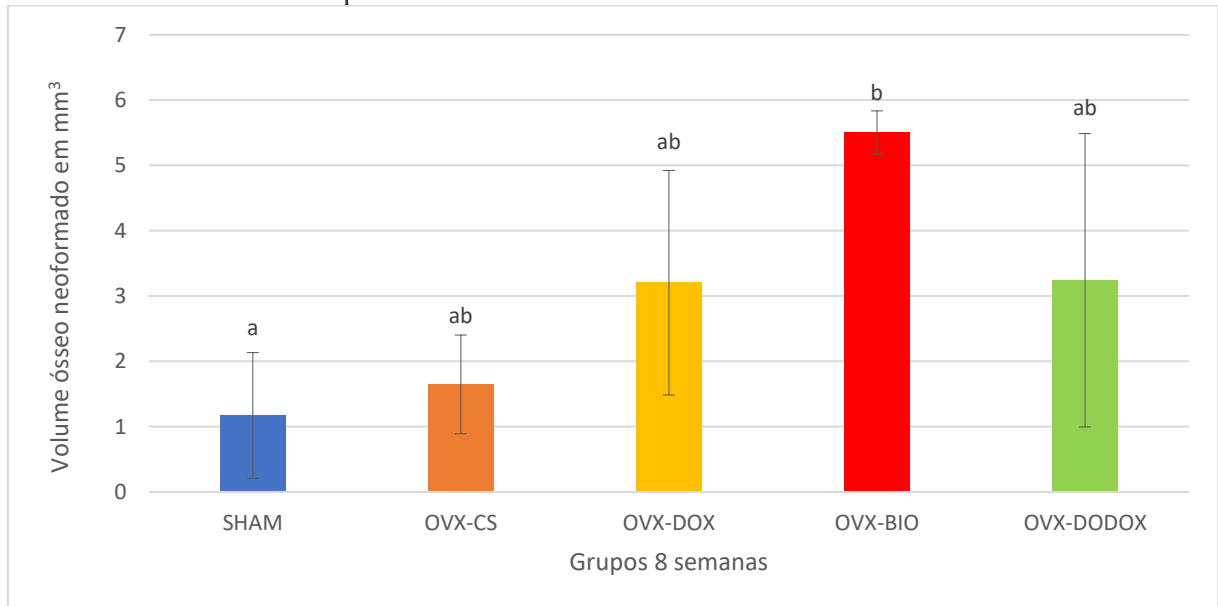


Fonte: Do autor

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

De forma semelhante no período experimental de 8 semanas, a maior média de BV foi observada no grupo OVX-BIO (5,5041 mm³), sendo esta estatisticamente maior que no grupo SHAM (1.171 mm³) ($p < 0,05$). Entre os grupos OVX-CS (1,6470 mm³), OVX-BIO (5.5041 mm³), OVX-DOX (3.2035 mm³) e OVX-BODOX (3.2420 mm³) não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no período experimental de 8 semanas ($p > 0,05$), embora numericamente o BV ósseo foi observado nos espécimes do grupo OVX-BIO (FIGURA 22).

Figura 22 - Médias e desvio padrão do Volume ósseo (BV) neoformado (mm^3) dos grupos avaliados no período de 8 semanas.

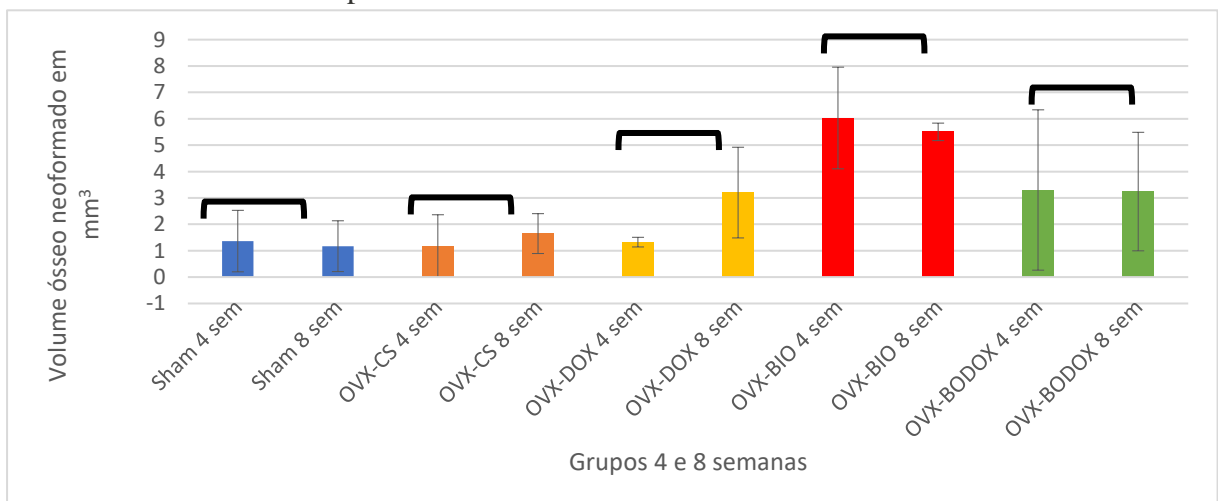


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

A análise intragrupo não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ao variar-se os períodos de avaliação entre 4 e 8 semanas (FIGURA 23).

Figura 23 - Médias e desvio padrão do Volume ósseo (BV) neoformado (mm^3) dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas. *



Fonte: Do autor.

Nota: ** representam as diferenças estatísticas entre os períodos de 4 e 8 semanas (intragrupo) ($p < 0,05$). * Análise estatística t-Student.

5.3.2 Superfície óssea (SO)

Os resultados da média da superfície óssea (SO) neoformada, medida em mm², o desvio-padrão e as diferenças estatísticas em relação aos períodos experimentais estão apresentados na Tabela 4. Observou-se que a maior média de SO em ambos períodos (4 e 8 semanas) foi encontrada no grupo OVX-BIO, correspondendo a 86.961 mm² e 63.794 mm² respectivamente (TABELA 4).

Tabela 4 - Médias, desvio padrão e diferenças estatísticas dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro superfície óssea (SO) segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	3	26.329 ^{aA}	± 7.878	3	23.951 ^{aA}	± 13.312
OVX-CS	3	19.789 ^{aA}	± 10.160	3	29.508 ^{aA}	± 7.958
OVX-DOX	3	39.012 ^{aA}	± 8.925	3	49.835 ^{aA}	± 11.936
OVX-BIO	3	86.960 ^{bA}	± 7.954	3	63.794 ^{aB}	± 4.499
OVX-BODOX	3	27.622 ^{aA}	± 10.299	3	48.377 ^{aA}	± 17.214

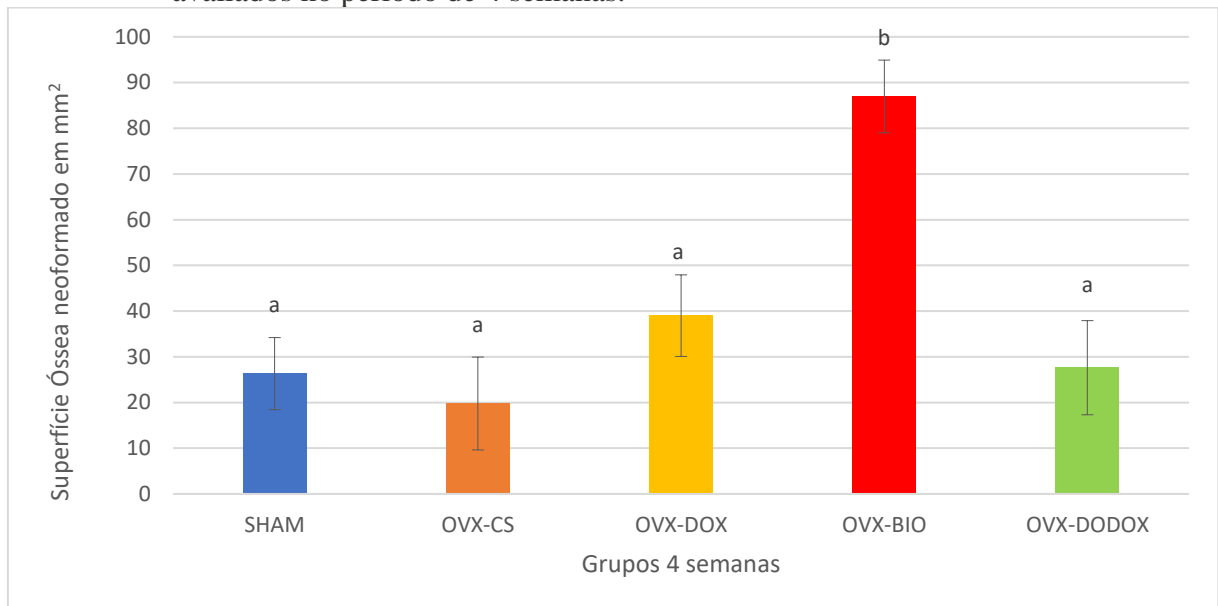
Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$) segundo o teste Tukey.

Após a submissão dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro SO à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados nos períodos experimentais de 4 semanas ($p=0.0007$) e 8 semanas ($p=0.0825$). Logo então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar entre quais grupos e períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 4).

Na avaliação dos períodos separadamente, observou-se que no período experimental de 4 semanas a SO neoformada no grupo OVX-BIO (86.961 mm²) foi maior e com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do que as encontradas nos grupos SHAM (26.3285 mm²), OVX-CS (19.7887 mm²), OVX-DOX (39.012 mm²) e OVX-BODOX (27.6224 mm²) (FIGURA 24).

Figura 24 - Média e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm^2) dos grupos avaliados no período de 4 semanas.

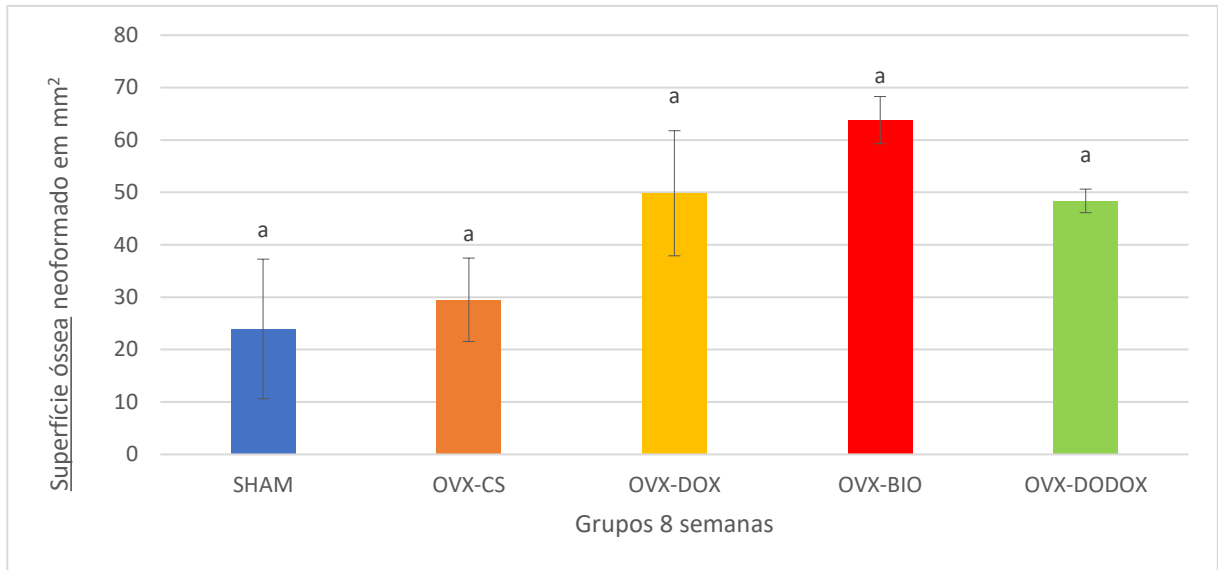


Fonte: Do autor

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

De forma semelhante no período experimental de 8 semanas, a maior média de SO foi observada no grupo OVX-BIO (63.794 mm^2), porém, não ocorreu diferença estatisticamente semelhante aos demais grupos avaliados ($p > 0,05$) (FIGURA 25).

Figura 25 - Médias e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm^2) dos grupos avaliados no período de 8 semanas.

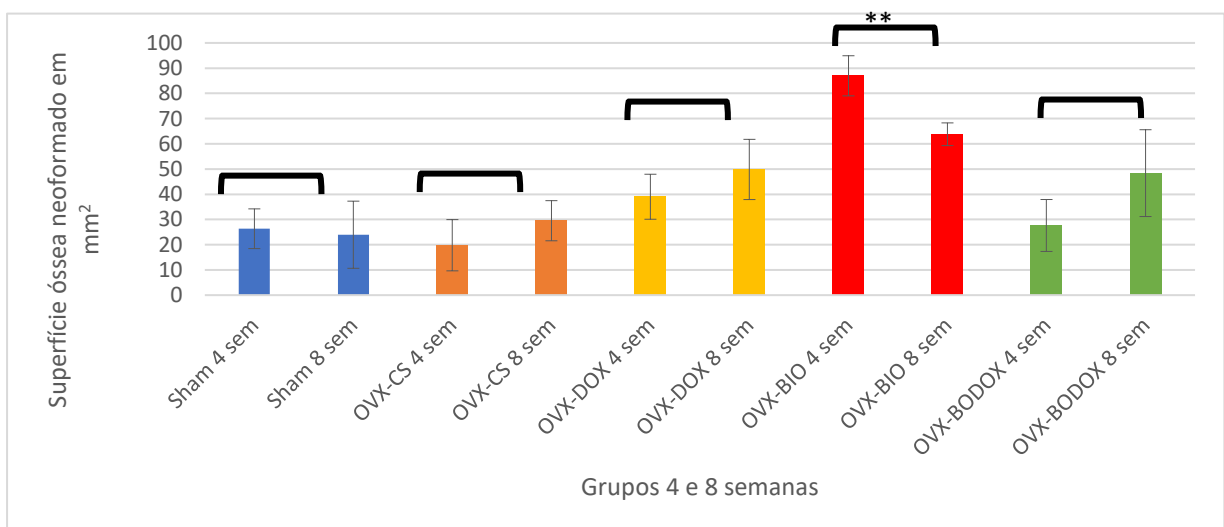


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

A análise intragrupo mostrou diferença estatisticamente significativa no grupo OVX-BIO ($p < 0,05$), nos demais grupos não ocorreu diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) ao variar-se os períodos de avaliação entre 4 e 8 semanas (FIGURA 26).

Figura 26 - Médias e desvio padrão da superfície óssea (SO) neoformada (mm^2) dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas. *



Fonte: Do autor.

Nota: ** representam as diferenças estatísticas (intragrupo) entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$). * Análise estatística t-Student.

5.3.3 Espessura Trabecular (Tb.Th)

As médias e desvios padrão da Espessura Trabecular (Tb.Th), medidas em mm, em relação aos períodos experimentais estão apresentadas na Tabela 5. Observa-se que a maior média de Tb.Th no período de 4 semanas foi encontrada no grupo OVX-BODOX (0.1748 mm) e no período de 8 semanas o grupo OVX-DOX (0.2021 mm) apresentou a maior média (TABELA 5).

Tabela 5 - Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos relacionados ao parâmetro espessura trabecular (Tb.Th) segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	3	0.1421 ^{aA}	± 0.03942	3	0.1622 ^{aA}	± 0.0707
OVX-CS	3	0.1401 ^{aA}	± 0.03273	3	0.2018 ^{aA}	± 0.0498
OVX-DOX	3	0.1476 ^{aA}	± 0.04390	3	0.2021 ^{aA}	± 0.0347
OVX-BIO	3	0.1656 ^{aA}	± 0.00390	3	0.1841 ^{aB}	± 0.0098
OVX-BODOX	3	0.1748 ^{aA}	± 0.02219	3	0.1711 ^{aA}	± 0.0225

Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$) segundo o teste Tukey.

Após a submissão dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro Tb.Th à análise de variância (ANOVA), não foi observada diferenças estatisticamente significantes dos dados entre os grupos no período de 4 semanas ($p=0.5650$) e também não houve diferença estatística entre os grupos no período de 8 semanas ($p=0.704$) (TABELA 5).

Na análise intragrupo entre os períodos de 4 e 8 semanas, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) somente no grupo OVX-BIO 4 semanas (0.1656 mm) e OVX-BIO 8 semanas (0.1841 mm), nos demais grupos não houveram diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$) (TABELA 5).

5.3.4 Número de Trabéculas (Tb.N)

As médias do número de trabéculas (Tb.N), medidas em $\frac{1}{mm}$, os desvios padrão e diferenças estatísticas em relação aos períodos experimentais estão apresentados na Tabela 6.

Foi possível observar que a maior média do Tb.N em ambos períodos (4 e 8 semanas) foi obtida no grupo OVX-BIO, correspondendo a $0.5316 \frac{1}{mm}$ e $0.5311 \frac{1}{mm}$ respectivamente (TABELA 6).

Tabela 6 - Médias, desvio padrão e diferença estatística dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro número de trabéculas (Tb.N) em mm, segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	3	0.1026 ^{aA}	± 0.0410	3	0.1015 ^{aA}	± 0.0862
OVX-CS	3	0.1352 ^{aA}	± 0.1121	3	0.1382 ^{aA}	± 0.0426
OVX-DOX	3	0.1689 ^{aA}	± 0.0567	3	0.2720 ^{abA}	± 0.1024
OVX-BIO	3	0.5316 ^{bA}	± 0.0037	3	0.5311 ^{bA}	± 0.0086
OVX-BODOX	3	0.1662 ^{aA}	± 0.0775	3	0.3197 ^{abA}	± 0.1969

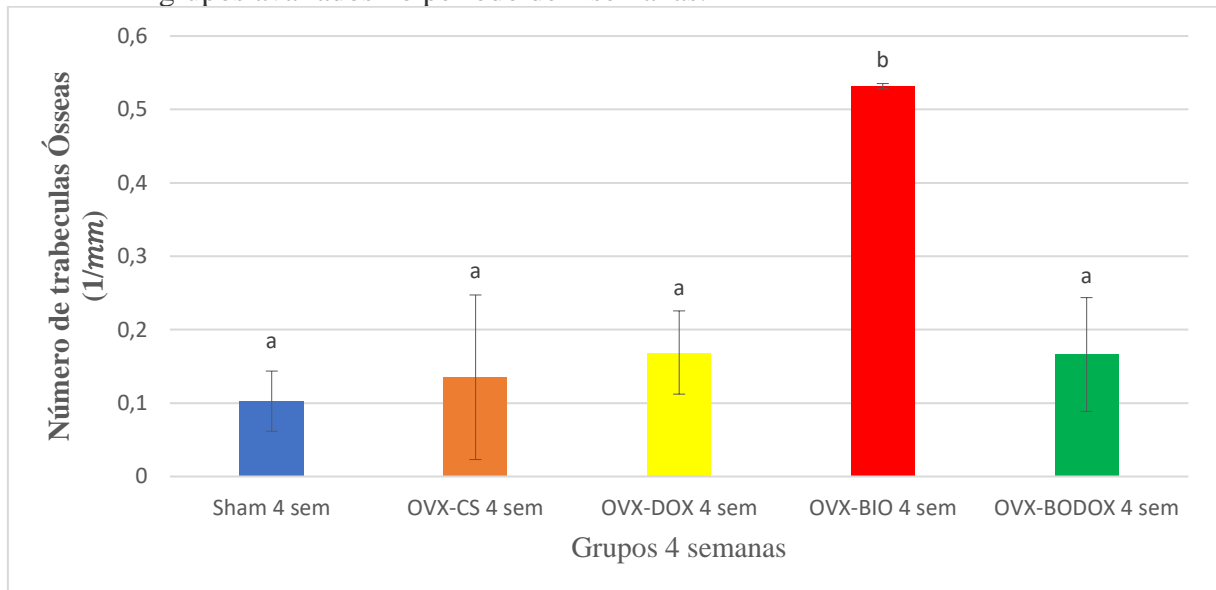
Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$) segundo o teste Tukey.

Após a submissão dos dados da microtomografia relacionados ao Tb.N à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dados nos períodos experimentais de 4 semanas ($p=0.0001$) e 8 semanas ($p=0.0130$). Logo então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar entre quais os grupos e períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 6).

Na avaliação no período de 4 semanas, observou-se que a maior média do Tb.N foi no grupo OVX-BIO ($0.5316 \frac{1}{mm}$) e esta foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) do que os outros grupos avaliados (SHAM, OVX-CS, OVX-DOX, OVX-BODOX) (FIGURA 27).

Figura 27 - Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 4 semanas.

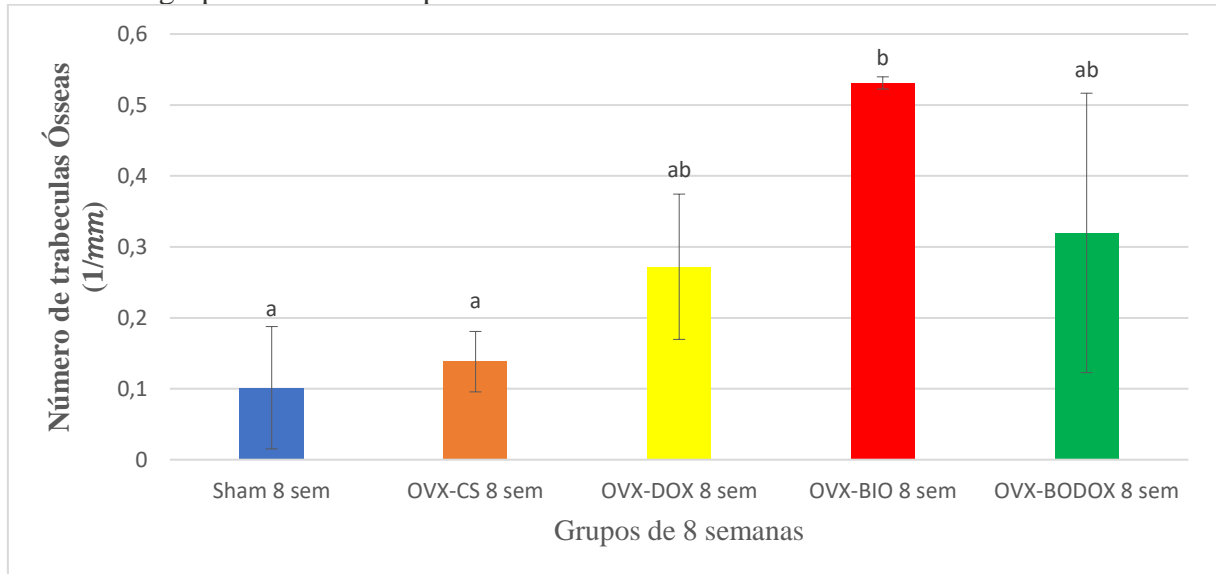


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

De forma semelhante no período experimental de 8 semanas, a maior média Tb.N foi observada no grupo OVX-BIO ($0,5311 \frac{1}{mm}$), sendo esta estatisticamente maior ($p < 0,05$) que nos grupos SHAM e OVX-CS ($0,1015 \frac{1}{mm}$ e $0,1382 \frac{1}{mm}$, respectivamente). Entre os demais grupos não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (FIGURA 28).

Figura 28 - Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 8 semanas.

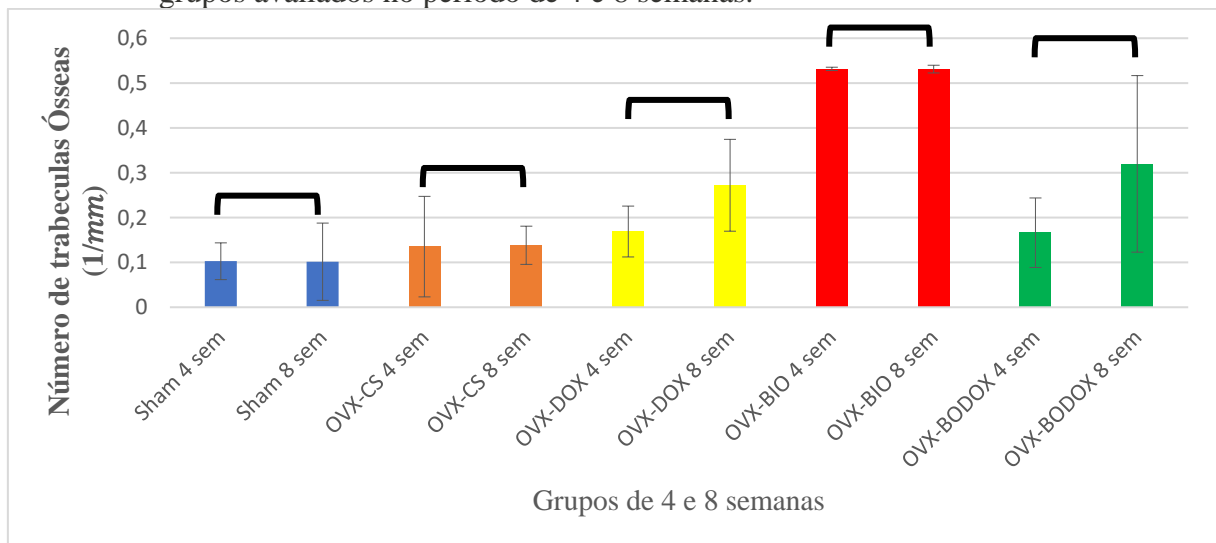


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

A análise intragrupo não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ao variar-se os períodos de avaliação entre 4 e 8 semanas (FIGURA 29).

Figura 29 - Médias e desvio padrão do número de trabéculas neoformadas (Tb.N) em $\frac{1}{mm}$ dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas. *



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas (intragrupo) entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$). * Análise intragrupos; teste -t Student.

5.3.5 Separação trabecular (Tb.Sp)

As médias da separação das trabéculas (Tb.Sp), medidas em mm, os desvios padrão e diferenças estatísticas em relação aos períodos experimentais, pode-se observar que a menor média encontrada tanto no período de 4 e 8 semanas foi obtida no grupo OVX-BIO, correspondendo a 0.6798 mm e 0.7432 mm respectivamente (TABELA 7). Neste parâmetro analisado, a menor média corresponde a um osso com maior densidade, ocasionando uma menor separação trabecular.

Tabela 7 – Média, desvio padrão e diferenças estatísticas dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro separação trabecular (Tb.Sp) segundo os períodos experimentais

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	3	1.3740 ^{abA}	±0.3046	3	1.5760 ^{aA}	±0.1620
OVX-CS	3	1.5380 ^{aA}	±0.2865	3	1.4790 ^{aA}	±0.1290
OVX-DOX	3	1.3990 ^{aA}	±0.1578	3	1.2230 ^{abA}	±0.1003
OVX-BIO	3	0.6798 ^{bA}	±0.1252	3	0.7432 ^{bA}	±0.0185
OVX-BODOX	3	1.0130 ^{abA}	±0.4792	3	1.0950 ^{abA}	±0.4528

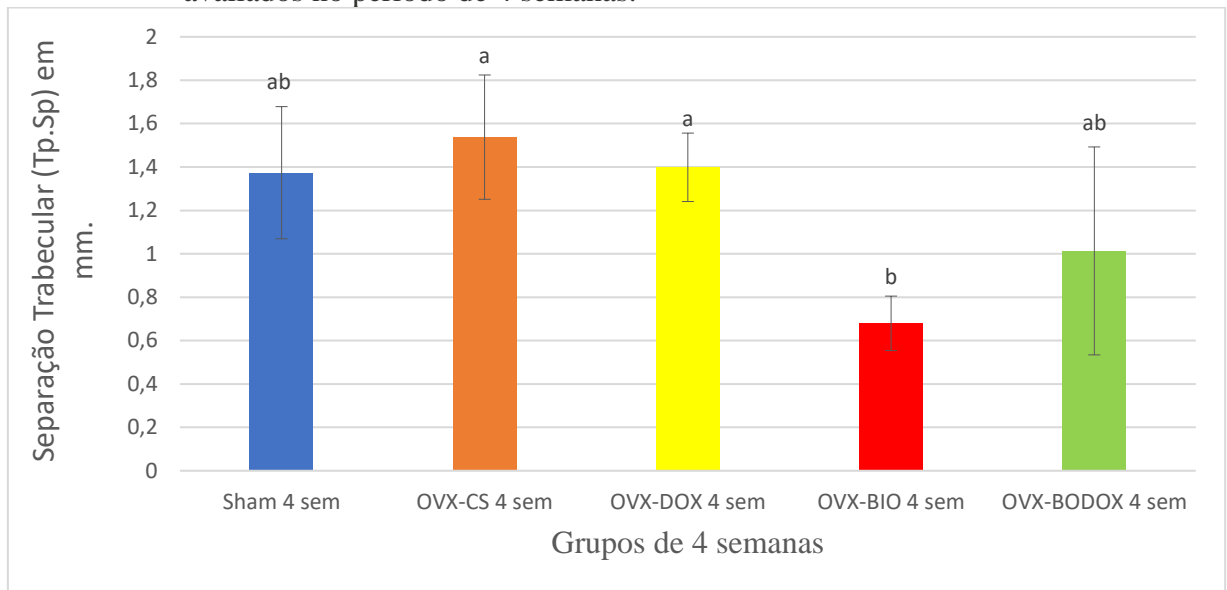
Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$) segundo o teste Tukey.

Após a submissão dos dados da microtomografia relacionados ao parâmetro separação das trabéculas (Tb.Sp) à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os dados no período experimental de 4 semanas ($p=0,0176$) e no período de 8 semanas ($p=0.213$). Logo então foi realizado o teste de Tukey a 5% de significância para poder observar entre quais períodos ocorreram estas diferenças (TABELA 7).

Na avaliação do período experimental de 4 semanas, a Tb.Sp no grupo OVX-BIO (0.6798 mm) foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que aquela encontrado nos grupos OVX-DOX e OVX-CS (1.3987 mm e 1.5378 mm, respectivamente). Entre os demais grupos não foram encontradas diferenças estatísticas significantes ($p > 0,05$) (FIGURA 30).

Figura 30 – Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp) em mm, dos grupos avaliados no período de 4 semanas.

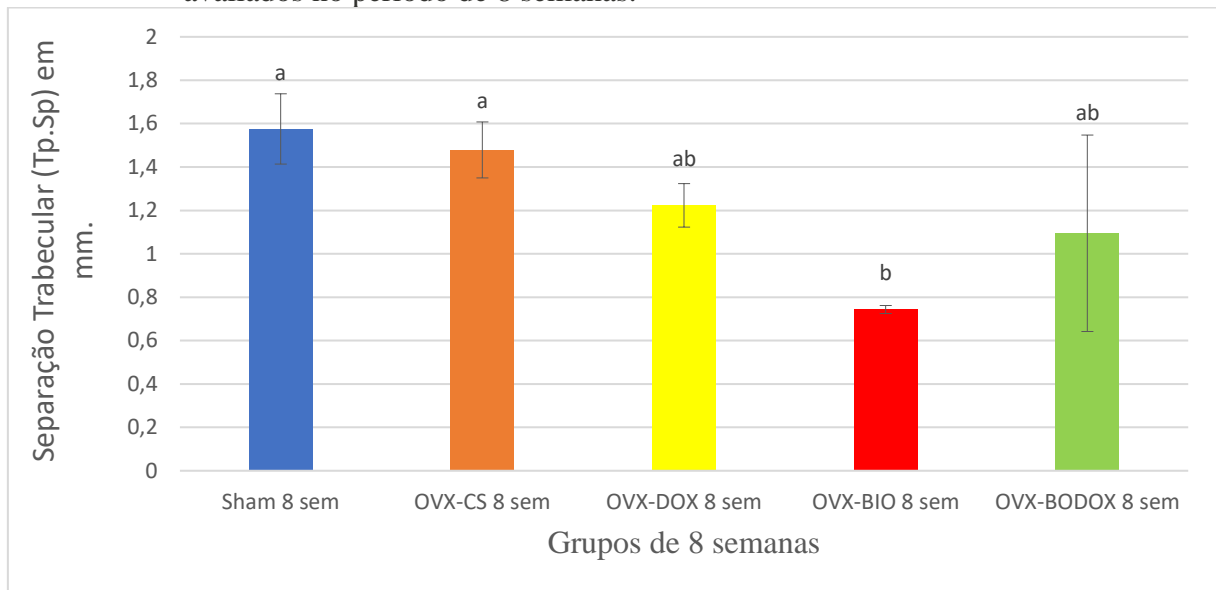


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

De forma semelhante no período experimental de 8 semanas, a menor média relacionada a Tb.Sp foi observada no grupo OVX-BIO (0.7432 mm), sendo esta estatisticamente menor que a média dos grupos SHAM e OVX-CS (1.5756 mm e 1.4790 mm, respectivamente) ($p < 0,05$). Entre os demais grupos não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) (FIGURA 31).

Figura 31 – Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp) em mm, dos grupos avaliados no período de 8 semanas.

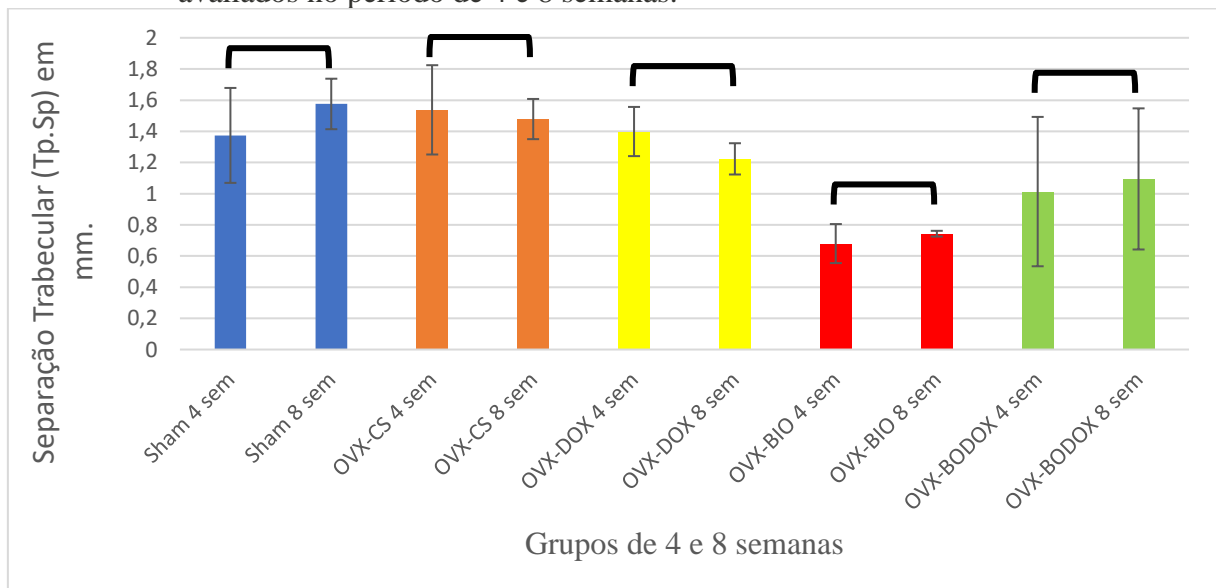


Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

A análise intragrupo não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) ao variar-se os períodos de avaliação entre 4 e 8 semanas (FIGURA 32).

Figura 32 – Médias e desvio padrão da separação trabecular (Tb.Sp), em mm, dos grupos avaliados no período de 4 e 8 semanas. *



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas (intragrupo) entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$). * Análise estatística t-Student

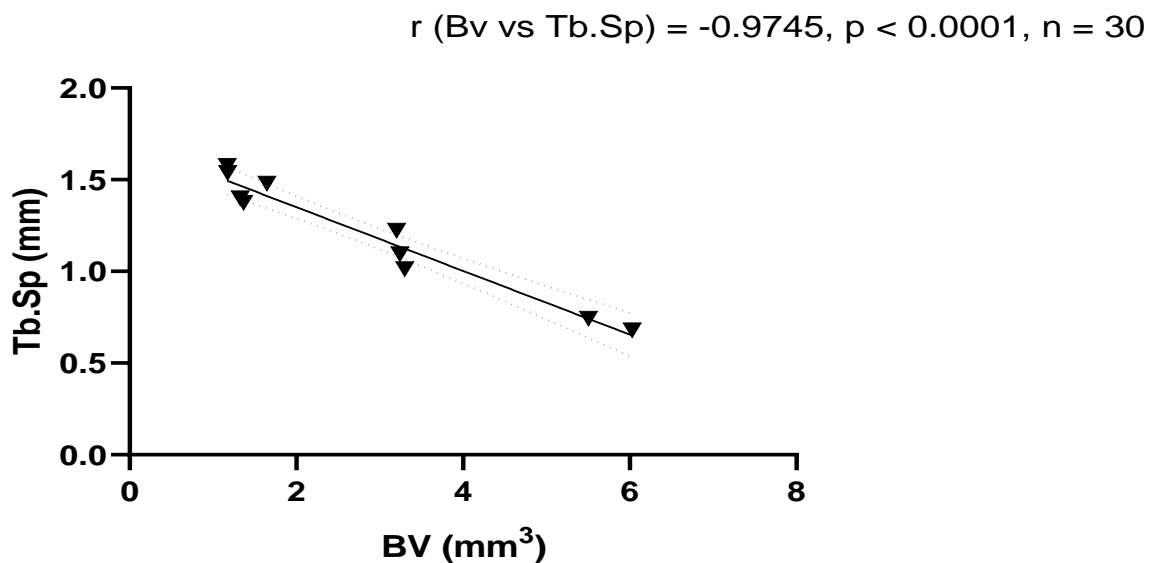
5.4 CORRELAÇÕES ENTRE OS PARÂMETROS VOLUMÉTRICOS E DE DENSIDADE ÓSSEA

Foram realizadas correlações entre o parâmetro volumétrico BV e os parâmetros de densidade óssea, distância entre as trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N) por meio do teste de Spearman. As correlações são relações numéricas entre duas variáveis quantitativas para ($p < 0,05$).

5.4.1 Correlação entre BV e Tb.Sp intergrupos

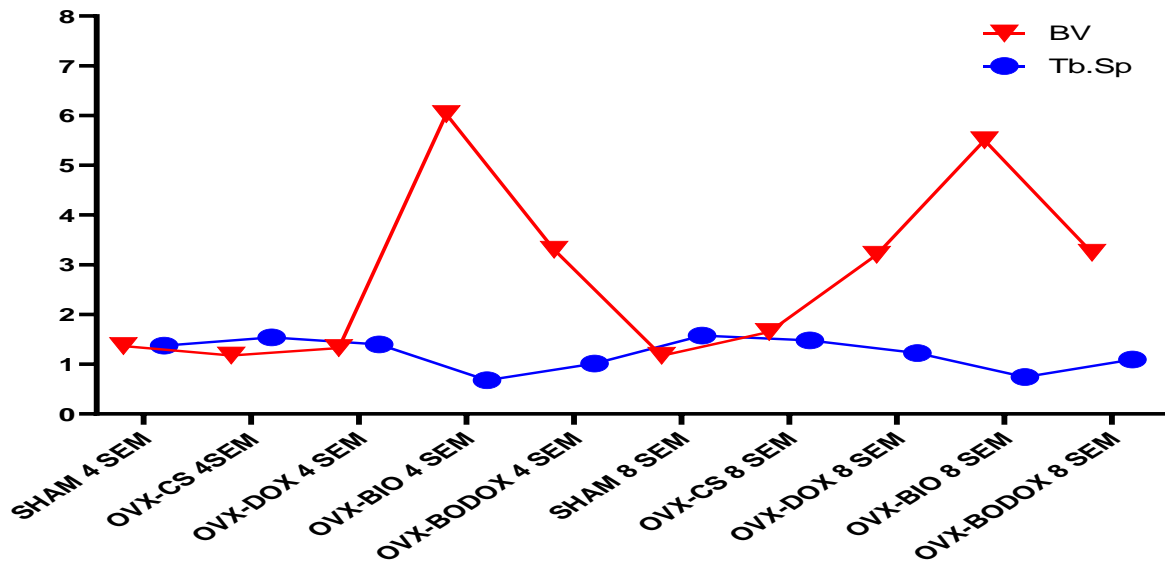
Houve uma correlação negativa e elevada intergrupos ($r = -0,9745$, $p = 0.0001$) entre o BV e Tb.Sp. Quanto maior a distância entre as trabéculas, maior foi a presença de espaço medular, sugerindo um menor volume ósseo (FIGURAS 33 e 34).

Figura 33 – Gráfico de correlação entre a BV e Tb.Sp, análise realizada intergrupos.



Fonte: Do autor.

Figura 34 – Gráfico em linhas das médias de BV e Tb.Sp, análise realizada intergrupos.



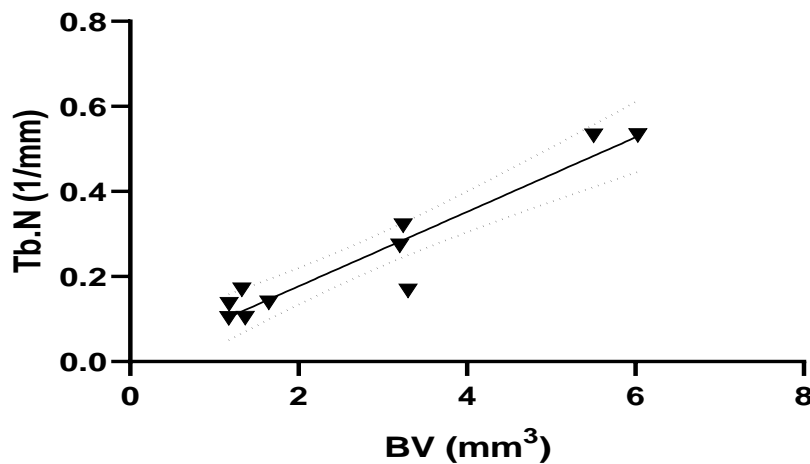
Fonte: Do autor.

5.4.2 Correlação entre BV e Tb.N intergrupos

Houve uma correlação positiva e elevada intergrupos ($r = 0.9522$, $p < 0.0001$) entre o BV e Tb.N. Quanto maior for o número de trabéculas, maior é o volume ósseo, pressupondo uma maior quantidade de tecido ósseo, sugerindo uma maior densidade óssea (FIGURAS 35 e 36).

Figura 35 – Gráfico de correlação entre a BV e Tb.N, análise realizada intergrupos.

$$r (\text{Bv vs Tb.N}) = + 0.9522, p < 0.0001, n = 30$$

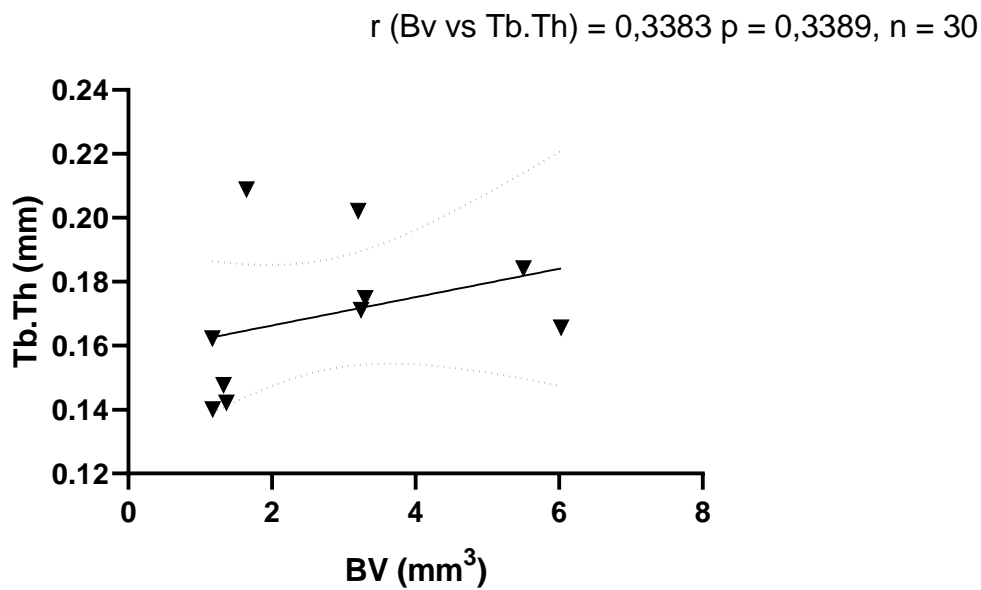


Fonte: Do autor.

5.4.3 Correlação entre BV e Tb.Th intergrupos

Entre os parâmetros BV e Tb.Th não ocorreu correlação estatisticamente significativa ($r = 0,3383$, $p <= 0,3389$) (FIGURAS 36).

Figura 36 – Gráfico de correlação entre a BV e Tb.Th, análise realizada intergrupos.



5.4.4 Modelo de Regressão

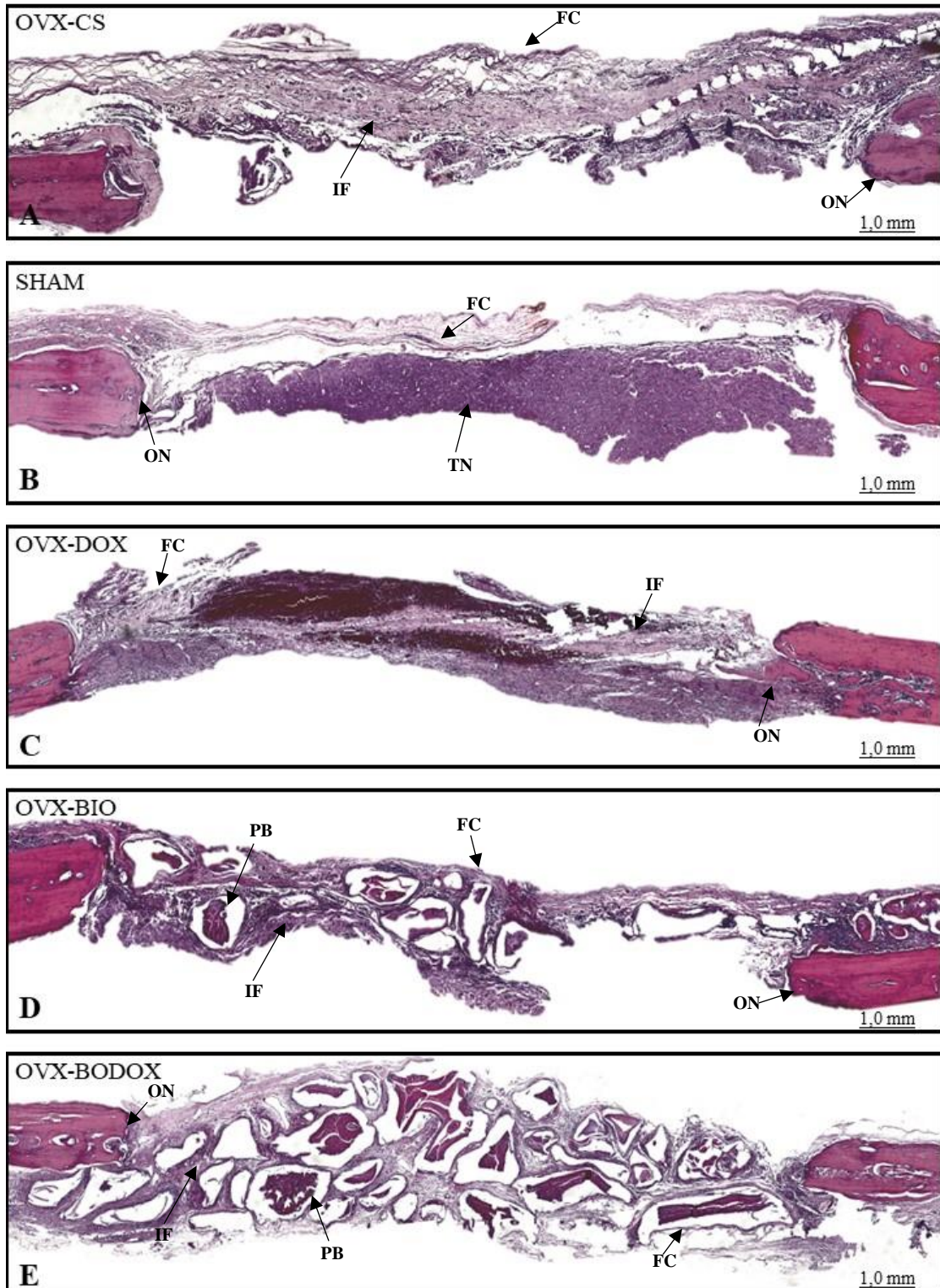
As variáveis quantitativas (Tb.N e Tb.Sp) apresentaram correlações com BV, apenas a variável Tb.Th não houve correlação, porém, o modelo de regressão linear simples serve para verificar se a variável dependente (BV) é explicada pelas variáveis independentes. Pelo método de Stepwise, definiu-se que 75,2% da variabilidade é dependente da variável BV. Verificou-se também, que a distribuição amostral dos resíduos foi normal, homocedástica e que os erros são descorrelacionáveis.

5.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA - DESCRITIVA

As imagens microscópicas (lâminas histológicas) dos cortes histológicos representativos dos espécimes de cada grupo estudado nos períodos de 4 e 8 semanas foram apresentados nas Figuras 37 e 38.

Nos cortes histológicos dos defeitos ósseos em calvária, independente do tratamento e do tempo de reparo, observou-se a presença de tecido de granulação no centro do defeito contendo fibroblastos, fibras colágenas delicadas e capilares sanguíneos. Este apresentava-se com infiltrado inflamatório crônico, composto principalmente por linfócitos e macrófagos, os quais apareciam formando células gigantes multinucleadas em vários cortes analisados. Em uma análise visual, o infiltrado inflamatório pareceu ser menos acentuado nos defeitos que receberam o gel de Doxíciclina 10%. Nos defeitos ósseos que receberam as partículas de Bio-Oss[®] observou-se que estas estavam envolvidas por células inflamatórias e/ou por finas fibras colágenas, o que pareceu ser uma tentativa de encapsulamento dessas partículas. No entanto, nas proximidades dessas observou-se tecido fibroso, diversos capilares sanguíneos e algumas ilhas isoladas de tecido ósseo recém-formado. O tecido ósseo recém-formado, quando presente, estava localizado na maioria das vezes nas bordas do defeito e na superfície do osso da calvária. Este apresentava trabéculas irregulares com osteócitos presentes na matriz óssea mineralizada e osteoblastos na superfície. Osteoclastos foram raramente observados no osso recém-formado na região do defeito, indicando a predominância do processo de formação óssea até 8 semanas de reparo. Não houve o reparo completo do defeito ósseo em nenhuma ocasião.

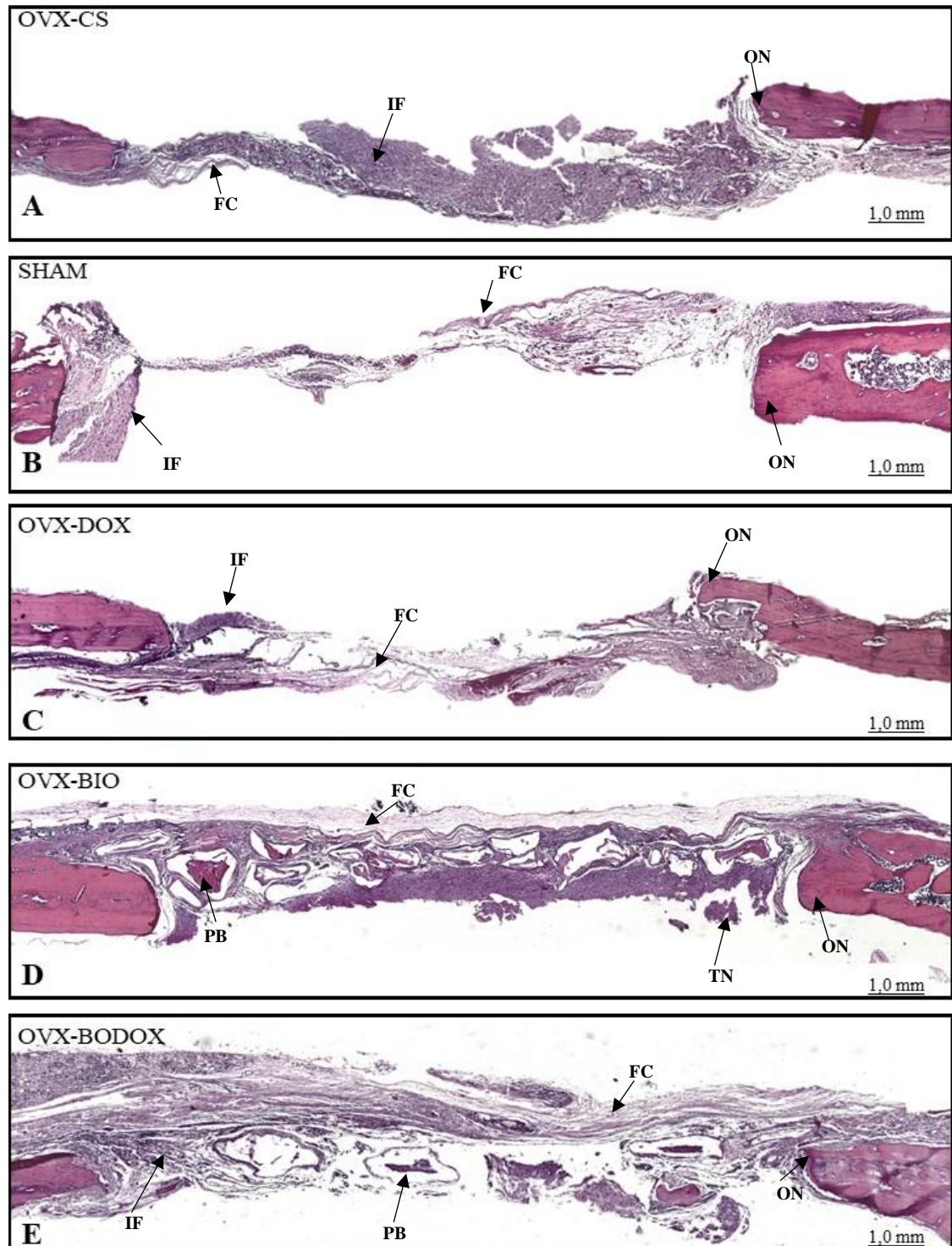
Figura 37 - Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 4 semanas.



Fonte: Autor

Nota: (FC) Fibras Colágenas; (ON) Osso Neoformado; (IF) Infiltrado inflamatório; (TN) Tecido nervoso; (PB) Partículas de Bio-Oss.

Figura 38 - Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 8



Fonte: Autor

Nota: (FC) Fibras Colágenas; (ON) Osso Neoformado; (IF) Infiltrado inflamatório; (TN) Tecido nervoso; (PB) Partículas de Bio-Oss.

5.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA – HISTOMETRIA

A média, o desvio-padrão, e as diferenças estatísticas da porcentagem da neoformação óssea (AO) em ambos períodos (4 e 8 semanas) estão representadas na tabela 8. A porcentagem de formação óssea levando-se em conta a área neoformada (AO) e os dados dos remanescentes das partículas de Bio-Oss® estão no APÊNDICE B.

Tabela 8 – Médias e desvio padrão dos dados da histometria relacionados a porcentagem da neoformação óssea (AO) segundo os períodos experimentais

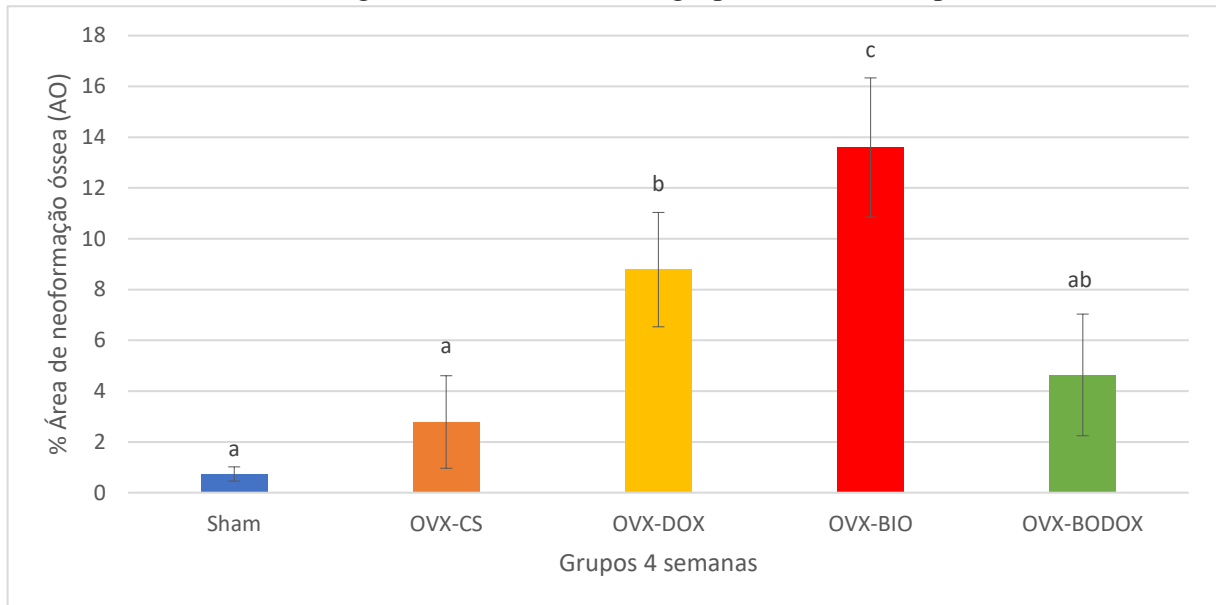
Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
SHAM	5	0.736 ^{aA}	± 0.281	5	1.944 ^{aB}	± 0.562
OVX-CS	5	2.784 ^{aA}	± 1.822	5	2.991 ^{abA}	± 2.884
OVX-DOX	5	8.784 ^{aA}	± 2.252	5	9.542 ^{abA}	± 6.092
OVX-BIO	5	13.592 ^{cA}	± 2.742	5	10.420 ^{bA}	± 6.458
OVX-BODOX	5	4.638 ^{abA}	± 2.396	5	4.708 ^{abA}	± 1.970

Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos em cada período ($p < 0,05$). As letras maiúsculas diferentes em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$).

O resultado da análise histométrica no período de 4 semanas mostrou que o grupo OVX-BIO obteve a maior porcentagem de neoformação (AO) ($13,592 \pm 2.742$). Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos OVX-BIO e OVX-DOX em relação ao grupo SHAM. O grupo OVX-BIO também apresentou maior quantidade de osso que os grupos OVX-CS e OVX-DOX e OVX-BODOX após 4 semanas ($p < 0,05$). Nas demais comparações não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (FIGURAS 39 e 40).

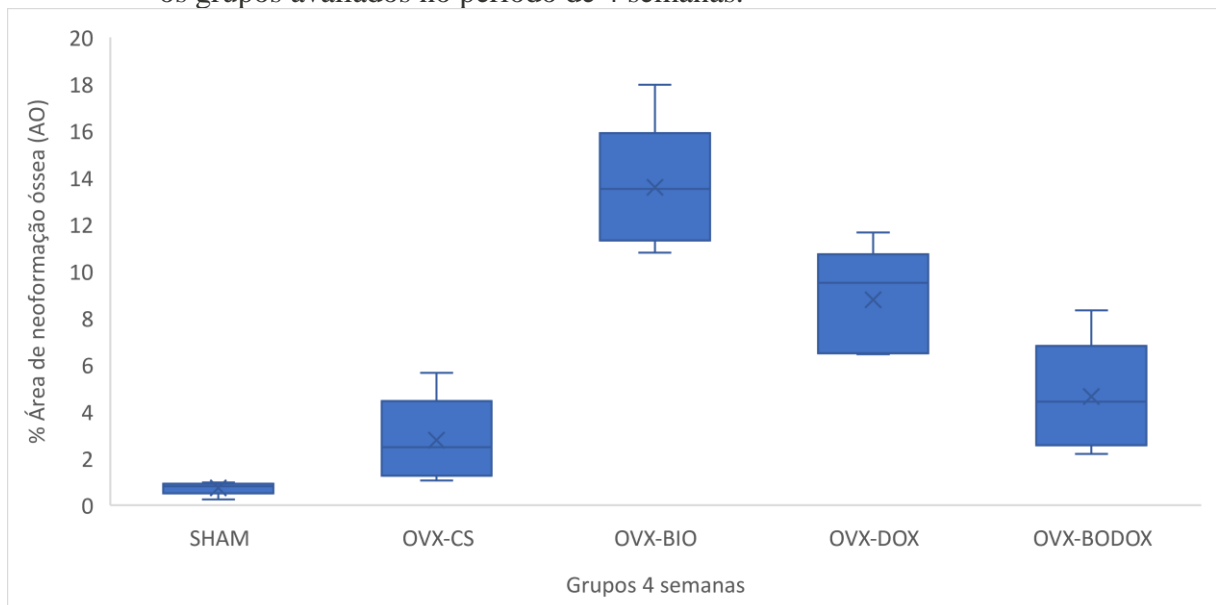
Figura 39 – Média, desvio padrão e diferenças estatísticas da porcentagem da neoformação óssea (AO) segundo a histometria dos grupos avaliados no período de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

Figura 40 – Gráfico Box-Plot referente a área de osso neoformado segundo a histometria entre os grupos avaliados no período de 4 semanas.

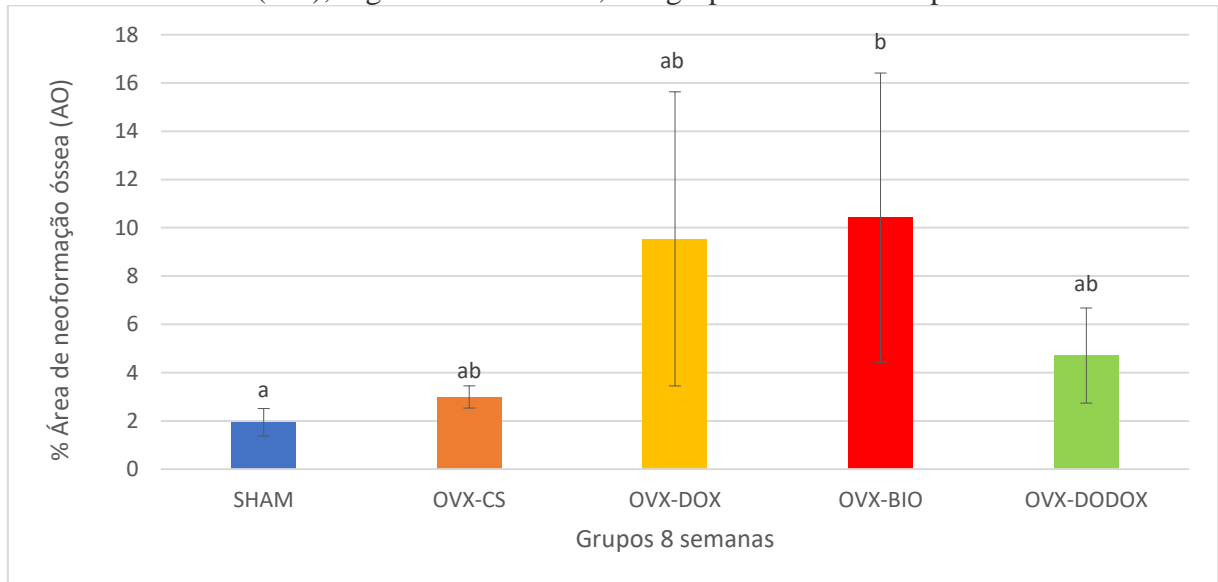


Fonte: Do autor.

De forma semelhante no período experimental de 8 semanas, os maiores valores de neoformação óssea foram verificados para o grupo OVX-BIO ($10,042 \pm 6,458$) enquanto os

menores para o grupo SHAM ($1,944 \pm 0,562$). O grupo OVX-BIO apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo SHAM ($p < 0,05$). Nas demais comparações não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) (FIGURAS 41 e 42)

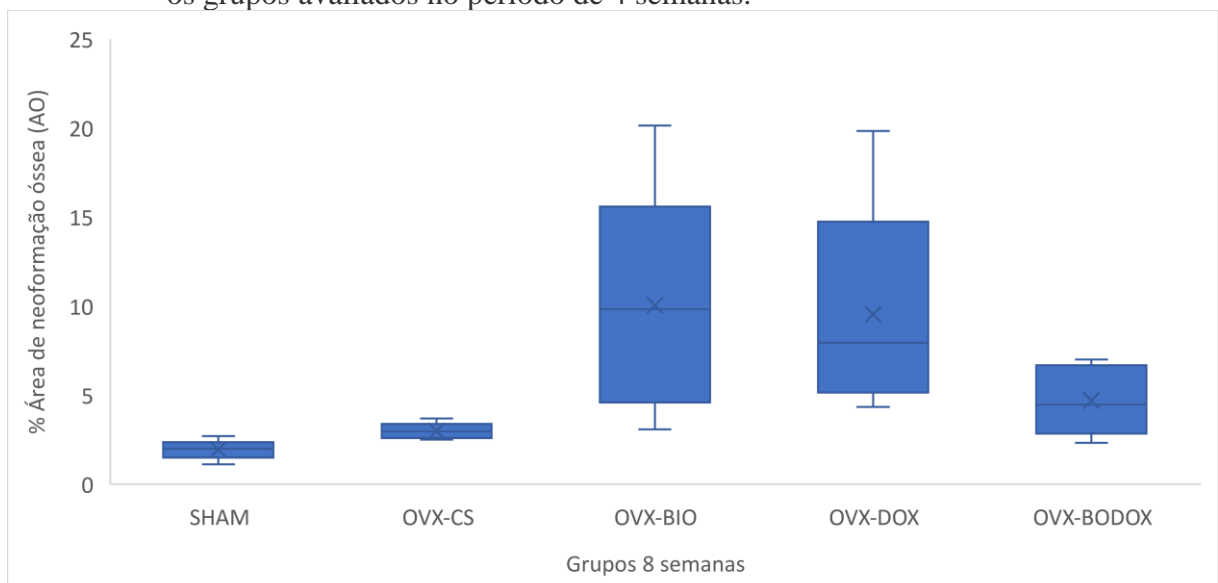
Figura 41 – Média, desvio padrão e diferenças estatísticas da porcentagem da neoformação óssea (AO), segundo histometria, dos grupos avaliados no período de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas entre os grupos no período ($p < 0,05$).

Figura 42 - Gráfico Box-Plot referente a área de osso neoformado, segundo a histometria, entre os grupos avaliados no período de 4 semanas.

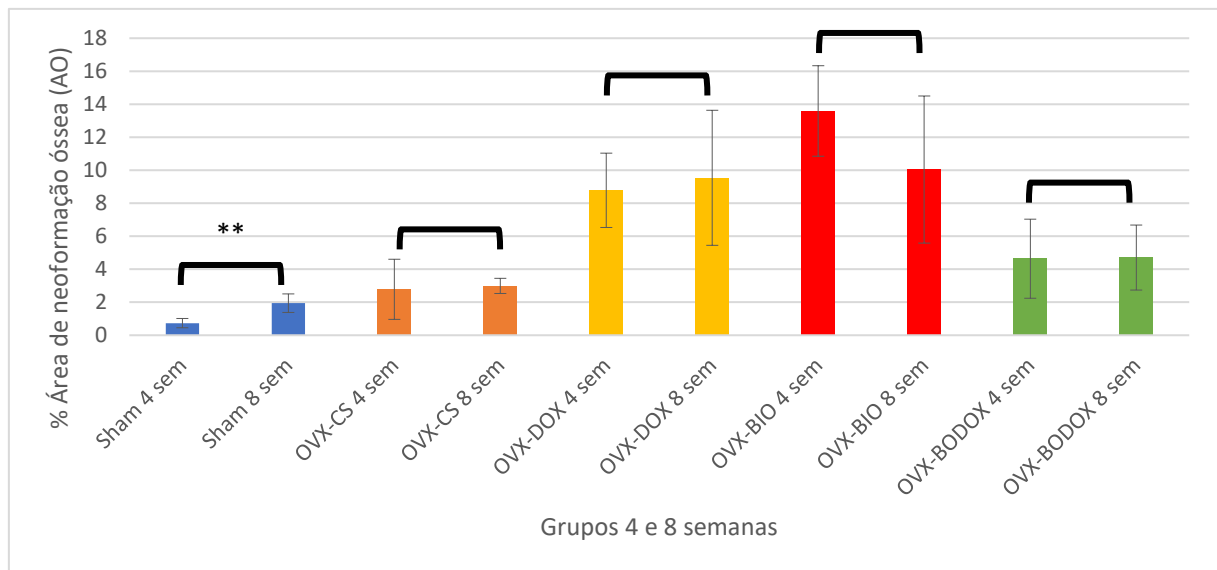


Fonte: Do autor.

A média e o desvio padrão da porcentagem de neoformação óssea nos períodos de 4 e 8

semanas estão representados na Figura 43. A comparação entre os períodos de 4 e 8 semanas, mostrou que houve aumento na porcentagem de neoformação óssea do período de 4 para 8 semanas apenas para o grupo SHAM ($p < 0,05$). Para os demais não houve diferença estatisticamente significativa dentro de cada grupo variando o período de avaliação ($p > 0,05$) (FIGURAS 43).

Figura 43 – Média e desvio padrão da área de neoformação óssea (AO) em %, segundo a histometria, dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas. *



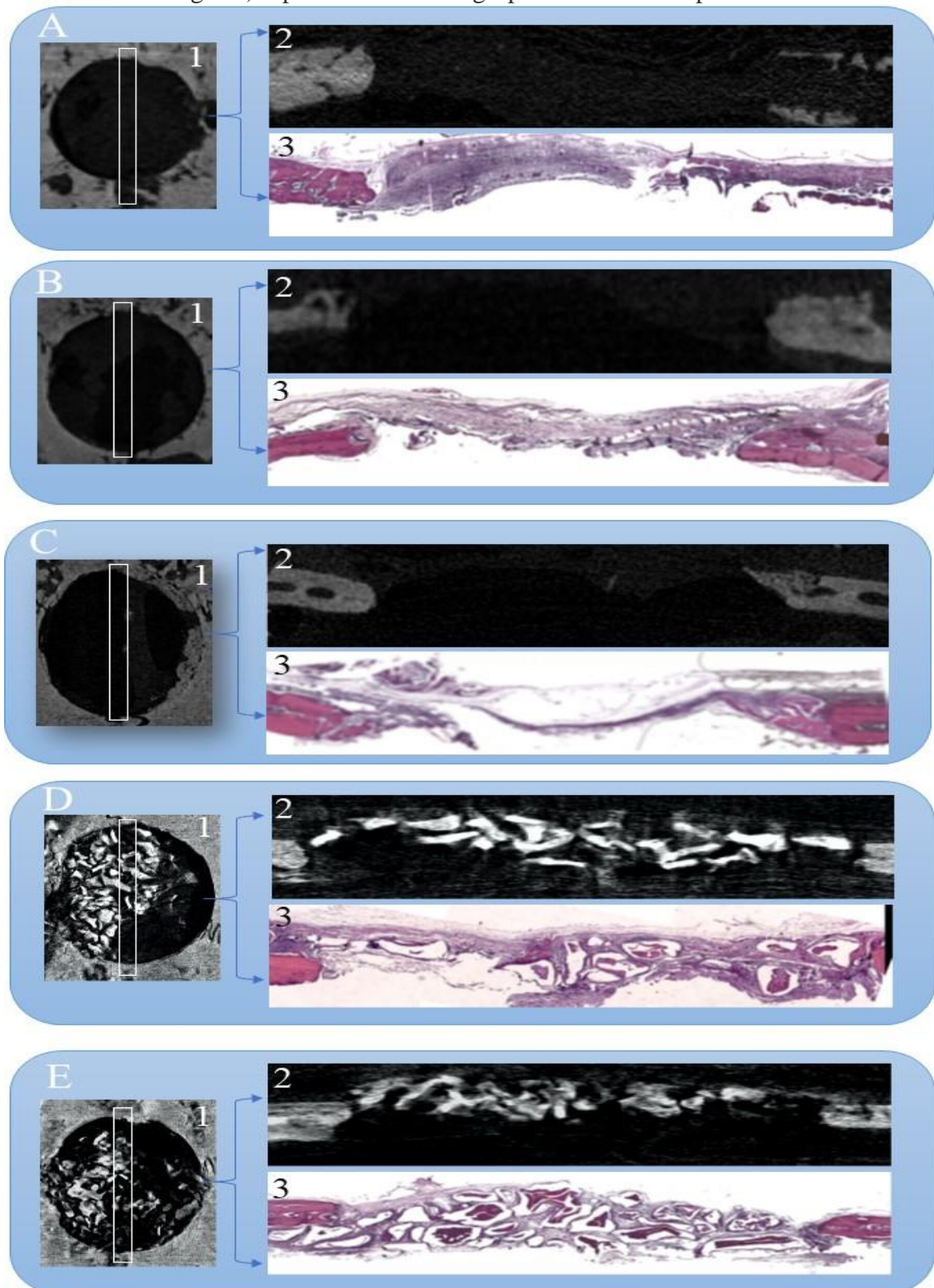
Fonte: Do autor.

Nota: ** representam as diferenças estatísticas (intragrupo) entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$), * Análise estatística t-Student

Para melhor representação dos dados histométricos e microtomográficos dos resultados encontrados, as Figuras 44 e 45 incluem as imagens representativas dos espécimes de cada grupo, respectivamente nos períodos de 4 e 8 semanas. As imagens microtomográficas estão nos planos coronal e sagital. As imagens sagitais coincidem com as imagens microscópicas dos mesmos espécimes no mesmo plano de corte. Essas imagens permitem destacar semelhanças do osso neoformado, partículas de osso bovino remanescentes e osso nativo. Foi evidente a maior neoformação óssea localizada nas bordas do defeito e em direção ao centro, sem o completo preenchimento do defeito ósseo.

A Figura 46 mostra os dados estatísticos encontrados nas análises microtomográficas, considerando o parâmetro BV/TV, e análise histométrica. Observou-se uma equivalência da representação dos resultados.

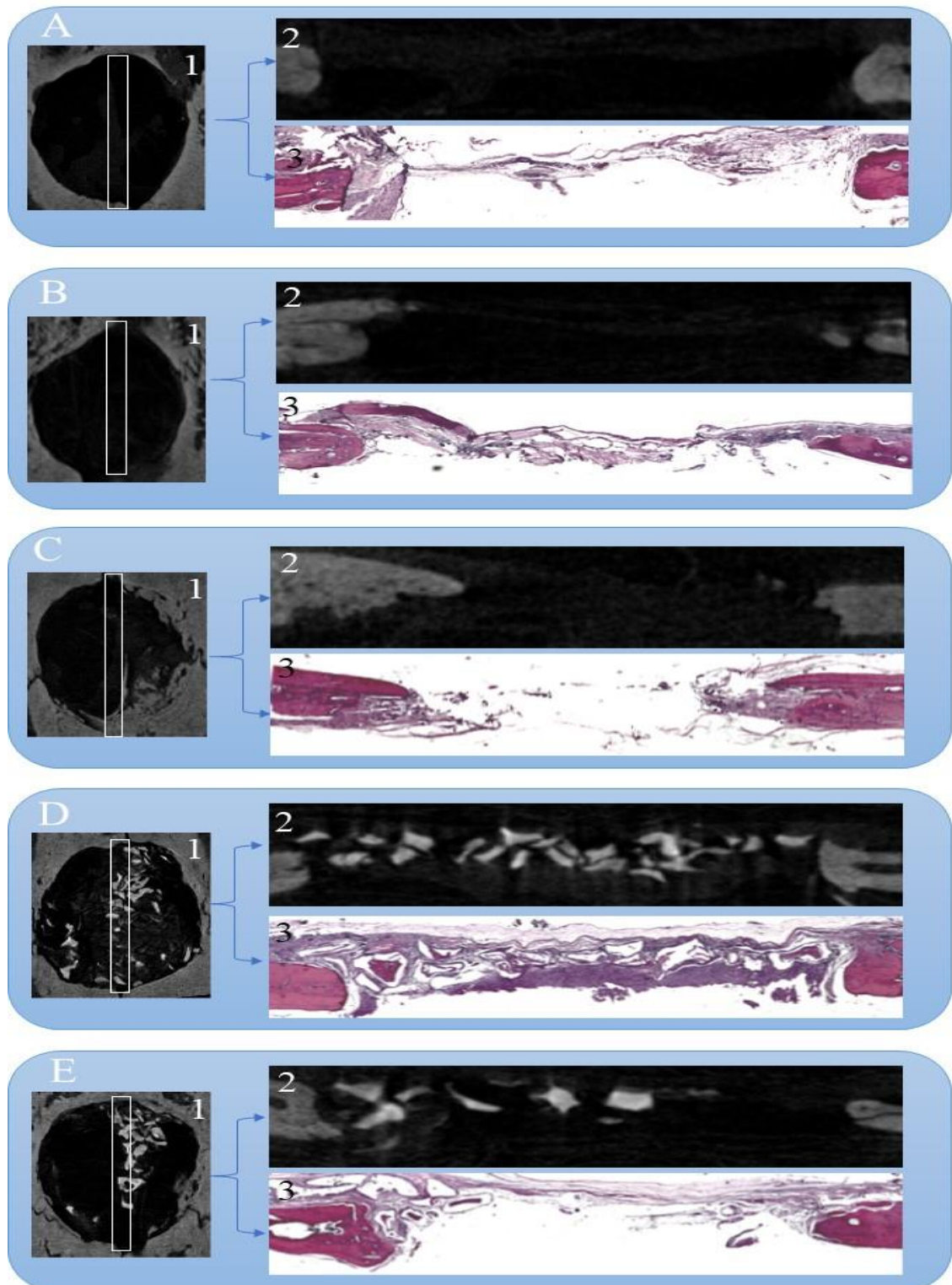
Figura 44 – Imagens microtomográficas e fotomicrografias de cortes (microtomográficos e histológicos) representativos dos grupos estudados no período de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Grupo SHAM (A), Grupo OVX-CS (B), Grupo OVX-DOX (C), Grupo OVX-BIO (D), Grupo OVX-BODOX (E). Cortes: 1-Microtomográfico (Plano Coronal); 2-Microtomográfico (Plano Sagital); 3-Histológico (Plano Sagital).

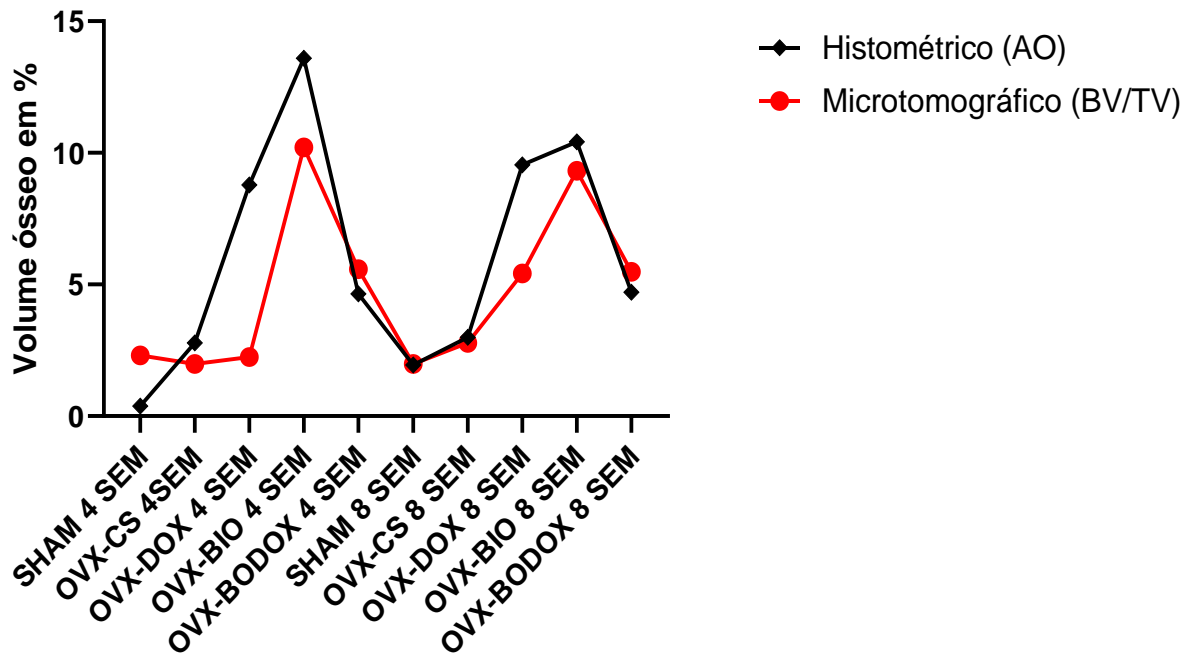
Figura 45 – Imagens microtomográficas e fotomicrografias de cortes (microtomográficos e histológicos) representativos dos grupos estudados no período de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Grupo SHAM (A), Grupo OVX-CS (B), Grupo OVX-DOX (C), Grupo OVX-BIO (D), Grupo OVX-BODOX (E). Cortes: 1-Microtomográfico (Plano Coronal); 2-Microtomográfico (Plano Sagital); 3-Histológico (Plano Sagital).

Figura 46 – Neoformação óssea avaliada pelas análises microtomográficas (BV) e histométrica (AO), representativos dos grupos estudados nos períodos 4 e 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Resultados da análise Microtomográfica X análise histométrica.

5.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA - PARTÍCULAS DE BIO-OSS® REMANESCENTES

A média, desvio-padrão e as diferenças estatísticas da porcentagem dos remanescentes das partículas de Bio-Oss® estão representados na tabela 9 e na figura 47.

Tabela 9 – Médias e desvio padrão dos dados da histometria relacionados a porcentagem dos remanescentes das partículas de Bio-Oss® segundo os períodos experimentais*

Grupo	4 semanas			8 semanas		
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão
OVX-BIO	5	15.920 ^A	± 5.192	5	14.100 ^A	± 11.600
OVX-BODOX	5	13.530 ^A	± 19.770	5	5.606 ^A	± 5.747

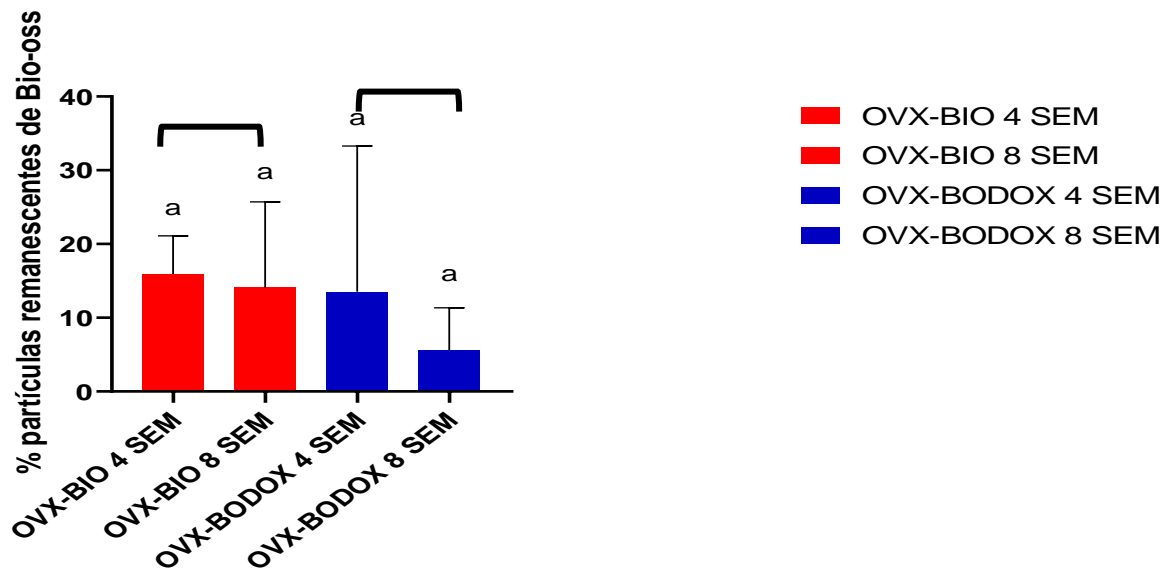
Fonte: Do autor.

Nota: As letras maiúsculas diferentes em cada linha representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$). * Teste-t de Student.

A comparação entre os períodos de 4 e 8 semanas, das partículas remanescentes de Bio-Oss®, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os períodos ($p > 0,05$).

Contudo numericamente nos grupos de 4 semanas os valores foram maiores que nos grupos de 8 semanas.

Figura 47 – Média e desvio padrão das partículas remanescentes de Bio-Oss® em % dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: As letras minúsculas diferentes em cada coluna representam as diferenças estatísticas no mesmo grupo entre os períodos de 4 e 8 semanas ($p < 0,05$). * Teste-t de Student.

6 DISCUSSÃO

Atualmente, a reabilitação oral com próteses implatossuportadas tornou-se uma das principais alternativas de tratamento e reposição de dentes perdidos. Contudo, a necessidade de se encontrar osso com qualidade e quantidade suficientes são imprescindíveis para o profissional que busca reabilitar pacientes com implantes, principalmente se estes pacientes possuírem desordens patológicas ósseas que prejudicam e proporcionam um maior tempo de reparação óssea. Apesar da existência de diversos substitutos ósseos, todos apresentam vantagens e desvantagens, o que justifica o grande número de pesquisas que buscam novos biomateriais para esta finalidade (YIP et al., 2015). Mesmo sabendo que existem diferenças na morfologia e metabolismo ósseo entre pacientes normais e osteoporóticos, infelizmente poucos estudos são direcionados para reparação óssea e osteoporose, especialmente na utilização de biomateriais como substitutos ósseos (DURÃO et al., 2014).

Assim, para determinar se um material recentemente desenvolvido está de acordo com os requisitos da biocompatibilidade, estabilidade, segurança e previsibilidade existe a necessidade desses serem submetidos a testes rigorosos e padronizados, tanto *in vitro* como *in vivo*. Porém, os resultados de estudos *in vitro* podem ser difíceis de extrapolar para a situação *in vivo*, a utilização de modelos animais é ainda, muitas vezes um procedimento essencial que precede o uso clínico em seres humanos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; GARDEL et al., 2014).

Como descrito previamente, este trabalho objetivou avaliar basicamente o efeito do gel de Doxíciclina a 10%, associado ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss[®]), em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratas ovariectomizadas, através de análises histométrica e microtomográfica.

A utilização do modelo experimental para este fim foi apropriado, já que modelos bem conduzidos e totalmente validados com o uso de animais, principalmente os de pequeno porte, como ratas, são essenciais para o estudo comportamental biológico, o desenvolvimento de novos substitutos ósseos e a possibilidade de induzir o animal ao quadro de osteoporose através da remoção cirúrgica dos ovários (KALU, 1991). Além disso, os animais apresentam como vantagens o fácil manejo, a prolificidade, a docilidade, o baixo consumo alimentar, a pequena área para criação, a fisiologia conhecida e o ciclo reprodutivo curto quando comparado a outros animais (HISTING et al., 2011).

A indução da osteoporose realizada através da ovariectomia é um modelo útil devido ao fato de apresentar características de perda óssea semelhantes às aquelas ocorridas na osteoporose

em mulheres pós-menopausa. Trata-se de um modelo pré-clínico aprovado pelo FDA para estudar como o declínio na produção endógena de estrogênio pelos ovários na menopausa leva à osteoporose pós-menopausa e como intervenções potenciais podem preservar o metabolismo ósseo neste estado patológico (KALU, 1991; JOHNSTON; WARD, 2015). Este modelo tem sido utilizado em diversos estudos e através dele tem sido possível avaliar, em uma condição específica de falha na osteogênese, o potencial regenerativo intrínseco do tecido ósseo e também identificar o comportamento biológico e a eficácia dos enxertos ósseos em situações clínicas com baixos níveis de estrogênio (ERDOĞAN et al., 2007; DURÃO et al., 2014; MIRON et al., 2014; VAN HOUDT et al., 2016). O período entre a cirurgia de ovariectomia e o prazo para a indução da osteoporose utilizado no presente estudo foi de oito semanas conforme os estudos de Durão et al., (2014) e Miron et al., (2014). Neste período, foi possível observar uma diminuição na densidade óssea dos animais que sofreram a ovariectomia em comparação aos do grupo SHAM, conforme Tabela 2 e Figuras 5 e 6.

Os defeitos críticos em calvária são muito utilizados em estudos relacionados a eficácia de biomateriais, sendo considerado talvez, o modelo *in vivo* pré-clínico mais utilizado para o estudo do comportamento de biomateriais e a capacidade de melhorar a neoformação óssea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). São definidos como a menor ferida intraóssea em um animal que não cicatriza espontaneamente quando não tratada por um determinado período de tempo (MESSORA et al., 2008; PARK et al., 2009; MARIANO et al., 2010; DURÃO et al., 2014; VAJGEL et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015). Assim, no presente estudo, todos os espécimes apresentaram defeitos de tamanho crítico, já que todos tiveram fechamento incompleto dos defeitos nos períodos analisados. Nos grupos controle negativo e positivo (OVX-CS e SHAM), pode-se observar pequena formação óssea restrita as margens do defeito. Como também foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos controles e experimentais nas análises microtomográfica e histométrica ficou melhor evidenciado a dificuldade de cicatrização óssea nesse tipo de defeito experimental (TABELAS 3 e 8). Desta forma, o modelo experimental utilizado de defeitos ósseos na calvária de ratas foi adequado para avaliação da reparação óssea utilizando o gel de DOX e Bio-Oss®.

Outras vantagens deste modelo de estudo estão relacionadas à região na qual o defeito crítico foi confeccionado. A calvária apresenta uma área satisfatória de osso cortical e em menor quantidade osso medular, desenvolvendo-se através de uma ossificação intramembranosa, semelhante a origem embrionária da maxila e do corpo da mandíbula. O acesso cirúrgico é relativamente simples, permitindo maior padronização dos defeitos. Durante o período pós cirúrgico a calota craniana apresenta pouca movimentação e carga mecânica, com mínima

interferência da contração muscular no reparo (GOMES; FERNANDES, 2011).

A confecção de canaletas na calvária em formato de “L”, posicionadas 2 mm anterior e posteriormente ao defeito e preenchidas com ionômero de vidro (SILVA et al., 2015) foi utilizada para definição das margens do defeito cirúrgico original, tal procedimento proporciona boa referência para a quantificação do osso neoformado nos cortes histológicos, evitando-se assim artefatos de imagem na microtomografia computadorizada trazidos por material metálico, como o amálgama, que produziria alterações na interpretação das imagens microtomográficas. A substituição do amálgama, utilizado por Messoria et al., (2008) pelo ionômero de vidro também permitiu a utilização dos mesmos animais para a realização das análises microtomográficas e histológicas.

Com relação aos métodos de análise, a microtomografia permite o diagnóstico e análise de diferentes biomateriais, proporcionando um método não invasivo, não destrutivo e que permite a visualização dos espécimes em 3D. Dessa forma a microtomografia é uma técnica de excelência no estudo do tecido ósseo (BEDINI et al., 2009). A μ -CT é uma análise que possibilita a avaliação da microarquitetura óssea e permite também, em pesquisas ósseas, identificar e determinar o grau de mineralização e neoformação óssea (VERNA et al., 2002). Com esta análise é possível obter imagens tridimensionais do osso sem destruir sua arquitetura e permite reconstruir a anatomia e morfologia dos tecidos. Além disso, a análise é feita de forma mais rápida se comparada a análise histológica, apresentando resultados semelhantes entre as duas análises. Desta forma a μ -CT tem sido utilizada como uma método confiável e reprodutível (COWAN et al., 2007).

No presente estudo foi utilizado um voxel isotrópico de $10 \mu\text{m}^3$. Com esta resolução foi possível detectar pequenas formações ósseas e diferenciar o Bio-Oss[®] do osso neoformado nos diferentes grupos experimentais analisados. Segundo Umoh et al., (2009), um voxel isotrópico de $45 \mu\text{m}^3$ foi suficiente para se obter correlações estatisticamente significativas e elevadas, entre a microtomografia e a histometria na análise da microarquitetura óssea em calvária de ratos. Apesar de não ser o objetivo do presente estudo, a comparação visual dos resultados entre a μ -CT e histometria mostraram semelhança na neoformação óssea (FIGURAS 44,45,46).

Além da microtomografia, no presente estudo, realizou-se a análise histométrica por ser amplamente preconizada para avaliar a capacidade de neoformação óssea. Com a utilização desta técnica é possível determinar a área que houve crescimento ósseo de forma bastante confiável e baseando-se na área de defeito ósseo original (MESSORA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2015; SILVA et al., 2015).

A reabsorção óssea após a perda dos elementos dentários e ou a necessidade de

reconstruções ósseas extensas, exigem o desenvolvimento e a utilização de biomateriais que possam recuperar o tecido ósseo e propiciar ao paciente a possibilidade de reabilitação oral através de implantes osseointegrados. Sendo assim, as pesquisas associadas aos substitutos ósseos são frequentes e justificáveis, principalmente porque dentre os biomateriais disponíveis nenhum apresenta as características de um material ideal. Logo, isso também explica os estudos realizados que avaliam a associação de diferentes substitutos ósseos (BAUER, 2007; PARK et al., 2009; SILVA et al., 2015; VAN LIESHOUT; ALT, 2016).

Neste contexto, a DOX foi avaliada, associada ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss[®]) no reparo ósseo em defeito de tamanho crítico de rata com quadro de osteoporose. Com isso, pretende-se abordar o processo de reparação óssea mediada por biomateriais no modelo de ratas ovariectomizadas e comparar o processo de reparação obtido com o estabelecido em animais controle (SHAM). As ações anti-inflamatórias (GRIFFIN, 2010), anticolagenolíticas (CRAIG et al., 1998), neoformação óssea (SHAHABOOEI et al., 2015) e inibição das osteoclastogênese (SILVA et al., 2015) pela DOX já são reconhecidas. Todavia, ainda não estão bem determinadas as possíveis interferências desses efeitos sobre a reparação óssea em casos de desequilíbrio do metabolismo ósseo como na osteoporose. Diferente das demais que foram feitas em ratos normoreativos, esta pesquisa propôs verificar, em defeitos ósseos, a ação da DOX, na forma de gel e sua associação com enxerto bovino em ratas osteoporóticas.

Os períodos experimentais utilizados foram de 4 e 8 semanas, justificando-se em estudos que a formação óssea em calvárias vazias atingem o platô durante este período, no qual se observa mínima formação óssea em períodos maiores que os analisados (COOPER et al., 2010).

Alguns estudos anteriores abordaram a reparação óssea mediada por biomateriais em condições osteoporóticas em modelos de tamanho subcrítico (abaixo de 3 mm de diâmetro), produzindo resultados distintos e contraditórios. Ainda assim, alguns trabalhos falharam em apontar diferenças estatísticas entre o processo de formação óssea mediada por biomateriais em condições osteoporóticas, em comparação aos grupos controle (SHAM) (HAYASHI et al., 1989, 1994; LUIZE et al., 2008; FUEGL et al., 2011). Outros autores enfatizam ganhos na reparação óssea em condições osteoporóticas com a utilização dos biomateriais como hidroxiapatita e vidros bioativos (FINI et al., 2000; RIBEIRO et al., 2012), biocerâmicas (IWASHITA et al., 1992) e matriz derivada de esmalte (MIRON et al., 2014). Variações nos resultados apresentados na literatura podem ser parcialmente justificadas por diferenças no desenho experimental, modelos animais distintos, metodologias diversas para indução da osteoporose, biomateriais, defeitos ósseos e períodos de avaliação diferentes, tornando difícil correlações diretas entre os estudos (DURÃO et al., 2014).

Sendo assim, em condições osteoporóticas, Van Houdt et al., (2015) encontram melhores respostas na reparação óssea com a utilização do Bio-Oss[®], que proporcionou uma maior neoformação óssea no defeito crítico em comparação ao grupo controle. Este resultado assemelha-se ao encontrado neste trabalho, que através da análise microtomográfica e histométrica entre os grupos experimentais, demonstrou que os grupos que utilizaram Bio-Oss[®] (OVX-BIO e OVX-BODOX) apresentaram maior quantidade de volume ósseo neoformado ($p < 0,05$) comparado aos grupos controle em ambos períodos experimentais (TABELAS 3,8 e FIGURAS 19,20,21,22,39,40,41,42). Estes resultados satisfatórios são justificados pela capacidade do biomaterial utilizado em permitir a formação de um arcabouço ou *scaffold*, garantindo a vascularização e migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso (CARVALHO et al., 2010). Além disso, a presença dos grânulos de Bio-Oss[®] promovem uma superfície de íons de Cálcio, possivelmente facilitando a formação óssea em torno dos grânulos, caracterizando a propriedade osteocondutora do Bio-Oss[®] que é imprescindível para formação óssea futura (TAPETY et al., 2004; DO DESTERRO et al., 2014).

Os parâmetros de densidade óssea foram avaliados através de correlações e estas foram estatisticamente significativas, exceto a correlação Tb.Th e BV como mostrado nas Figuras 31, 32, 33 e 34 e seguiram os padrões de microarquitetura do tecido ósseo. Na análise dos parâmetros trabeculares mensurados pela análise microtomográfica, a correlação entre a distância inter-trabecular (Tb.Sp) e o volume ósseo (BV) foi inversamente proporcional ($r = -0,9745$, $p < 0,0001$), ou seja, um maior volume ósseo relacionado a menor separação inter-trabecular. Na correlação entre o número de trabéculas (Tb.N) e o volume ósseo (BV) houve uma relação positiva, na qual o aumento do número de trabéculas relaciona-se ao aumento do volume ósseo ($r = +0,9522$, $p < 0,0001$) seguindo as correlações encontradas por Hildebrande et al., (2009). Somente a correlação Tb.Th e BV ($r = 0,3383$, $p = 0,3389$) mostrada na Figura 35, não apresentou coerência com os padrões da microarquitetura óssea propostos por Brandi (2009), pois um aumento na Tb.Th reflete em um maior BV.

No presente estudo a neoformação óssea avaliada intragrupos (OVX-DOX, OVX-BIO E OVX-BODOX) foi semelhante entre os períodos experimentais de 4 e 8 semanas conforme as tabelas 3 e 8. Este resultado assemelha-se aos encontrados no estudo de Van de Watering et al., (2013) que testaram o cimento fosfato de cálcio (CFC) como substituto ósseo em ratas osteoporóticas. Ao se comparar a neoformação óssea entre os períodos experimentais iniciais (4 semanas) e períodos tardios (12 semanas) também não foram encontradas diferenças estatísticas na quantidade de osso neoformado. Porém, estudos realizados em animais em

condições sistêmicas normais, a neoformação óssea encontrada nos períodos mais tardios foi maior que nos períodos iniciais (SILVA et al., 2015; VAN DE WATERING et al., 2012).

Uma possível justificativa para a menor formação óssea em animais osteoporóticos em períodos de 8 semanas, pode ser o aumento na atividade osteoclástica e também uma maior degradação dos biomateriais presentes. Van Houdt et al., (2018) avaliaram a reparação óssea entre ratas osteoporóticas (OVX) e identificaram acelerada degradação do biomaterial (Bio-Oss[®]) quando se comparou o período entre 4 e 12 semanas. Os autores ainda observaram que não somente a atividade osteoclástica possa ter sido responsável pela menor neoformação óssea, como também a menor atividade dos osteoblastos e menor capacidade deles em substituir o biomaterial por osso.

Procurando identificar se a osteoporose provoca uma maior degradação dos biomateriais, Zhang et al., (2018) também estudaram a reparação óssea em situações com este distúrbio do metabolismo ósseo. Avaliaram três biomateriais, no processo de reparação óssea, em defeitos críticos criados em fêmures de ratas osteoporóticas. Os biomateriais testados foram de origem xenógena (Bio-Oss[®]), alógena (osso desmineralizado liofilizado, LifeNet), e aloplástico (Fosfato de Cálcio Bifásico, BCP, Vivoss). Os períodos avaliados histologicamente foram de 3 e 6 semanas e os resultados indicaram que os biomateriais sintéticos (BCP) apresentaram propriedades osteocondutoras e promoveram no período de 3 semanas, neoformação óssea semelhante aos outros biomateriais testados. Contudo, no período de 6 semanas, os animais osteoporóticos apresentaram uma maior degradação das partículas do BCP quando comparadas ao Bio-Oss[®] e ao osso desmineralizado. Segundo os autores, o BCP não está recomendado para ser utilizado em situações em que a osteoporose esteja presente, devido maior degradação das partículas, provocada pela presença de uma maior atividade osteoclástica. Em nosso estudo, a análise do Bio-Oss[®] presente na região do defeito, apresentou valores numéricos que indicam uma maior degradação das partículas no período experimental tardio (8 semanas) quando comparado ao período experimental de 4 semanas (TABELA 9 e FIGURA 47). Mas mesmo demonstrando taxas de degradação maiores em períodos tardios observou-se no presente estudo maiores médias de BV (TABELA 3 e FIGURAS 21 e 22) e de neoformação óssea (AO) (TABELA 8 e FIGURAS 39, 40, 41 e 42) no grupo OVX-BIO.

O gel de DOX também foi avaliado no processo de reparação ósseo. Sabe-se que a principal forma de administração e a mais estudada da DOX é a via sistêmica. Alguns estudos avaliaram dosagens subclínicas sistêmicas de DOX e identificaram seus efeitos na prevenção da perda óssea e também no estímulo da neoformação óssea. (GOLUB et al., 2010; PAYNE; GOLUB, 2011; WILLIAMS et al., 1996). A aplicação local da DOX ainda foi pouco explorada

e estudada. Em seu estudo, Silva et al (2015) obtiveram melhores resultados na reparação óssea em defeitos críticos de calvárias, quando utilizaram gel de DOX a 10% em comparação ao grupo coágulo (controle). Todavia, os experimentos foram realizados em animais com metabolismo ósseo normal. A minociclina, outro derivado da tetraciclina, foi estudada através da aplicação local em defeitos ósseos periodontais, associados a terapia de reparação tecidual guiada e os melhores resultados de neoformação óssea foram obtidos quando a minociclina foi aplicada localmente na região dos defeitos em ratos normais (YOSHINARI et al., 2001). No presente estudo, através das análises microtomográfica e histométrica, avaliou-se os resultados e no período de 4 semanas, a DOX não apresentou diferenças estatísticas ($p > 0,05$) quando comparada aos grupos controle; contudo em períodos de 8 semanas houve diferença significativa ($p < 0,05$) ocorrendo uma maior neoformação óssea no grupo DOX comparado ao grupo controle (FIGURAS 20,22,41,42) e semelhante estatisticamente aos grupos OVX-BIO e OVX-BODOX. Estes resultados corroboram os encontrados por Silva et al (2015) e possivelmente estão relacionados às propriedades da DOX de inibir osteoclastogênese e induzir a apoptose dos osteoclastos (BETTANY et al., 2000; GOLUB et al., 2016; PAYNE; GOLUB, 2011; SILVA et al., 2015).

Acredita-se que a DOX possa ter contribuído para a redução da osteoclastogênese, garantindo entre o intervalo de 4 para 8 semanas melhoria na formação óssea do grupo OVX-DOX, como observado nas análises microtomográficas – nos parâmetros BV e Tb.Th (Tabelas 3 e 5 e Figuras 21 e 22) e histométricas (Tabela 8 e Figuras 39, 40, 41 e 42). Ressalta-se maior espessura das trabéculas no período de 8 semanas no grupo OVX-DOX. Mas quando associada ao osso bovino (OVX-BODOX), isso não ocorreu. Fato que pode ser interpretado de acordo com as informações de Van Houdt et al., (2018) que afirmaram existir acelerada degradação das partículas do biomaterial (Bio-Oss[®]) nos períodos mais tardios. A atividade osteoclástica aumentada na osteoporose e menor atividade dos osteoblastos poderiam ser os responsáveis pela menor neoformação óssea encontrada nos grupos OVX-BODOX. Entende-se, então que aos benefícios esperados do gel de doxiciclina, quando associado ao osso bovino, não superaram a capacidade degradativa das partículas causadas pelo metabolismo ósseo alterado pela osteoporose.

Apesar da média de volume ósseo do grupo OVX-DOX não ter sido significativa, o teste de correlação de Spearman entre as variáveis BV e Tb.Th não apresentou uma correlação estatisticamente significativa ($p > 0,05$). E esse resultado se deu em função do grupo OVX-DOX que mostrou maiores médias de espessura trabecular em 8 semanas e menor volume ósseo. Esperava-se que essa correlação fosse estatisticamente significativa ($p < 0,05$) seguindo

os parâmetros de microarquitetura óssea propostos por Brandi (2009) e elucidasse o aspecto da densidade óssea.

Apesar dos resultados encontrados, novos estudos deverão ser realizados com o propósito de investigar e avaliar o comportamento tanto do gel de DOX a 10% como da associação com osso bovino em situações de distúrbios do metabolismo ósseo como a osteoporose, através de avaliações imunistoquímicas. Além disso, estudos com análises tardias (12 e 16 semanas) deverão ser realizados. Investigações sobre a associação do uso local da doxiciclina e outros biomateriais com tratamentos sistêmicos para controle da osteoporose devem ser estimulados.

7 CONCLUSÃO

Considerando as limitações deste estudo e períodos avaliados, pode-se concluir que o gel de Doxiciclina a 10% isolado mostrou resultados semelhantes aos resultados de sua associação com o osso bovino quando empregados localmente em defeitos críticos de calvárias de ratas osteoporóticas. Mas demonstrou resultados inferiores ao preenchimento com osso bovino isolado nos períodos iniciais.

REFERÊNCIAS

AASETH, J.; BOIVIN, G.; ANDERSEN, O. Osteoporosis and trace elements - An overview. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 26, n. 2012, p. 149-152, 2012.

ALMEIDA, M.; BRIEN, C. A. O. Basic Biology of Skeletal Aging : Role of Stress Response Pathways. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 68, n.10, p. 1197–1208, 2013.

BACCARO, L. F. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis : a viewpoint from Brazil. **Clinical Interventions in Aging**, v. 10, p. 583–591, 2015.

BARBATO, L. Periodontitis and bone metabolism. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 12, n. 2, p. 174–177, 2015.

BAUER, T. W. Bone graft substitutes. **Skeletal Radiology**, v. 36, n. 12, p. 1105–1107, 2007.

BAX, C. M. et al. Tetracyclines modulate cytosolic Ca²⁺ responses in the osteoclast associated with “Ca²⁺ receptor” activation. **Bioscience Reports**, v. 13, p. 169–174, 1993.

BEDINI, R. et al. The use of microtomography in bone tissue and biomaterial three-dimensional analysis. **Annali dell’Istituto superiore di sanita**, v. 45, n. 2, p. 178–84, 2009.

BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcified Tissue International**, v. 94, n. 1, p. 25–34, 2014.

BENISCH, P. et al. The Transcriptional Profile of Mesenchymal Stem Cell Populations in Primary Osteoporosis Is Distinct and Shows Overexpression of Osteogenic Inhibitors. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

BERNABÉ, P. F. E. et al. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: A histological and histometric study in rat tibiae. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 3, p. 384–388, 2012.

BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 75–80, 2000.

BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential

applications. **Stem cells**, v. 19, n. 3, p. 180–192, 2001.

BIKOWSKI, J. B. Subantimicrobial dose doxycycline for acne and rosacea. **Skinmed**, v. 2, n. 4, p. 234–45, 2003.

BODINE, P. V. N.; KOMM, B. S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 7, n. 1–2, p. 33–39, 3 jan. 2007.

BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010.

BRANDI, L. B. Microarchitecture, the key to bone quality. **Rheumatology**, 48: 3-8, 2009

BRANDT, K. D. et al. Effects of doxycycline on progression of osteoarthritis: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. **Arthritis and rheumatism**, v. 52, n. 7, p. 2015–25, jul. 2005.

BURGE, R. et al. Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 22, n. 3, p. 465–475, mar. 2007.

CARVALHO, P. S. P. DE et al. Biomateriais aplicados a Implantodontia Biomaterials applied to Implantology. **Revista Implantnews**, v. 7, p. 56–65, 2010.

CASTRO, M. M. et al. Matrix metalloproteinase inhibitor properties of tetracyclines: Therapeutic potential in cardiovascular diseases. **Pharmacological Research**, v. 64, n. 6, p. 551–560, dez. 2011.

CATON, J. G. et al. Treatment With Subantimicrobial Dose Doxycycline Improves the Efficacy of Scaling and Root Planing in Patients With Adult Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 4, p. 521–532, 2000.

CAULEY, J. A. et al. Effects of Estrogen Plus Progestin on Risk of Fracture and Bone Mineral Density. **Jama Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 290, n. 13, p. 1729–1738, 2003.

CHEN, J. H. et al. Boning up on Wolff's Law: Mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. **Journal of Biomechanics**, v. 43, n. 1, p. 108–118, 2010.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 2, p. 232–260, 2001.

COOPER, G. M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: Revisiting the concept of a critical-size defect. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 6, p. 1685–1692, 2010.

COWAN, C. M. et al. MicroCT Evaluation of Three-Dimensional Mineralization in Response to BMP-2 Doses *In Vitro* and in Critical Sized Rat Calvarial Defects. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 3, p. 501–512, 2007.

CRAIG, R. G. et al. A chemically modified tetracycline inhibits streptozotocin-induced diabetic depression of skin collagen synthesis and steady-state type I procollagen mRNA. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1402, n. 3, p. 250–260, 1998.

D'AMELIO, P. et al. Spontaneous osteoclast formation from peripheral blood mononuclear cells in postmenopausal osteoporosis. **Faseb Journal**, v. 19, p. 410–412, 2005.

D'AMELIO, P. et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. **Bone**, v. 43, p. 92–100, 2008.

DALLAS, S. L.; BONEWALD, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 437–443, 1 abr. 2010.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 5, p. 577–587, 2008.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, 2013.

DERVIS, E.; FARMAN, E. A. G. Oral implications of osteoporosis. **Oral and Maxillofacial Radiology**, v. 100, n. 3, p. 349–356, 2005.

- DI CAPRIO, R. et al. Anti-inflammatory properties of low and high doxycycline doses: an in vitro study. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 329418, 2015.
- DO DESTERRO, F. DE P. et al. Can inorganic bovine bone grafts present distinct properties? **Brazilian dental journal**, v. 25, n. 4, p. 282–8, 2014.
- DUGGAR, B. M. Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. **Annals of New York Academic Science**, v. 51, n. 2, p. 177–181, 1948.
- DURÃO, S. F. et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 5, p. 1535–1545, 2014.
- EDER, A.; WATZEK, G. Treatment of a patient with severe osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: a case report. **International Journal Oral and Maxillofacial Implants**, v. 14, p. 587–90, 1999.
- EGHBALI-FATOURECHI, G. et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 111, p. 1221–30, 2003.
- ERDOĞAN, Ö. et al. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 104, n. 6, 2007.
- ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 11, n. 4, p. 219–227, 2010.
- FEDERICI, T. J. The non-antibiotic properties of tetracyclines: clinical potential in ophthalmic disease. **Pharmacological research**, v. 64, n. 6, p. 614–23, dez. 2011.
- FINI, M. et al. The effect of osteopenia on the osteointegration of different biomaterials: histomorphometric study in rats. **Journal of Materials Science.**, v. 11, n. 9, p. 579–85, set. 2000.
- FRANCO, G. C. N. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by Doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 10, p. 1454–1464, 2011.

- FRANKLIN, T. J.; SNOW, G. A. Biochemistry of antimicrobial action. **Chapman and Hall Ltd**, p. 224, 1975.
- FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried Alive : How Osteoblasts Become Osteocytes. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006.
- FUEGL, A. et al. The impact of ovariectomy and hyperglycemia on graft consolidation in rat calvaria. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 5, p. 524–529, maio 2011.
- GARDEL, L. S. et al. Use of Perfusion Bioreactors and Large Animal Models for Long Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 20, n. 2, p. 126–146, 11 abr. 2014.
- GARNERO, D.; PATRICK, P. D. Osteoporosis. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 26, n. 4, p. 913–936, 1997.
- GATES, B. J. et al. Review of osteoporosis pharmacotherapy for geriatric patients. **The American Journal of Geriatric Pharmacotherapy**, v. 7, n. 6, p. 293–323, 2009.
- GIRO, G. et al. Impact of osteoporosis in dental implants: A systematic review. **World Journal of Orthopedics**, v. 6, n. 2, p. 311, 18 mar. 2015.
- GOLUB, L. M. et al. A chemically modified nonantimicrobial tetracycline (CMT-8) inhibits gingival matrix metalloproteinases, periodontal breakdown, and extra-oral bone loss in ovariectomized rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 878, p. 290–310, 1999.
- GOLUB, L. M. et al. Doxycycline effects on serum bone biomarkers in post-menopausal women. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 6, p. 644–649, 2010.
- GOLUB, L. M. et al. Non-antibacterial tetracycline formulations : host-modulators in the treatment of periodontitis and relevant systemic diseases. **International Dental Journal**, v. 66, p. 127–135, 2016.
- GOMES, K. D. N. et al. Doxycycline induces bone repair and changes in Wnt signalling. **International Journal of Oral Science**, v. 9, n. 3, p. 158–166, 2017.
- GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance

of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory animals**, v. 45, n. 1, p. 14–24, jan. 2011.

GONG, Y. et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 513–23, 16 nov. 2001.

GREENWALD, A. S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. **The Journal of Bone Joint Surgery**, v. 83, n. 2, p. 98–103, 2001.

GRIFFIN, M. O. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **American Journal Physiologic Cellular**, v. 299, n. 3, p. 539–548, 2010.

GRISA, A.; VEITZ-KEENAN, A. Is osteoporosis a risk factor for implant survival or failure? **Evidence-Based Dentistry**, v. 19, n. 2, p. 51–52, jun. 2018.

GUIGLIA, R. et al. Osteoporosis, jawbones and periodontal disease. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, v. 18, n. 1, p. 93–99, 2013.

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1092, p. 385–396, 2006.

HAKEDA, Y. et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 251, p. 796–801, 1998.

HÄMMERLE, C. H.; LANG, N. P. Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials. **Clinical oral implants research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 2001.

HATORI, K. et al. Single and combined effect of high-frequency loading and bisphosphonate treatment on the bone micro-architecture of ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 1, p. 303–313, 2015.

HAYASHI, K. et al. The affinity of bone to hydroxyapatite and alumina in experimentally induced osteoporosis. **The Journal of arthroplasty**, v. 4, n. 3, p. 257–62, set. 1989.

HAYASHI, K. et al. Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. **Biomaterials**, v. 15, n. 1, p. 11–6, jan. 1994.

HILDEBRAND, T. et al. Direct Three-Dimensional Morphometric Analysis of. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 7, 2009.

HILL, T. P. et al. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. **Developmental Cell**, v. 8, n. 5, p. 727–738, 2005.

HISTING, T. et al. Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. **Bone**, v. 49, n. 4, p. 591–599, 1 out. 2011.

HØIBERG, M. P. et al. Diagnostic devices for osteoporosis in the general population: A systematic review. **Bone**, v. 92, p. 58–69, 2016.

HOLMES, S. G. et al. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**, 2004.

HUANG, Q.-Y.; KUNG, A. W. C. Genetics of osteoporosis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 295–306, 2006.

IWASHITA, Y. et al. Osteoconduction of bioceramics in normal and osteopenic rats: comparison between bioactive and bioinert ceramics. **Journal of applied biomaterials**, v. 3, n. 4, p. 259–68, 1992.

JAKOB, F. et al. Bone tissue engineering in osteoporosis. **Maturitas**, v. 75, n. 2, p. 118–124, 2013.

JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss. **Journal of Periodontal Research**, v. 76, n. 11, p. 2125–2132, 2005.

JEREMIAH, M. P.; UNWIN, B. K.; GREENAWALD, M. H. **Diagnosis and Management of Osteoporosis**, 2015. Disponível em: <www.aafp.org/afp>

JEVON, M. et al. Osteoclast formation from circulating precursors in osteoporosis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 32, p. 95–100, 2003.

JOHNSTON, B. D.; WARD, W. E. The ovariectomized rat as a model for studying alveolar bone loss in postmenopausal women. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

JOINER, D. M. et al. Bone marrow stromal cells from aged male rats have delayed mineralization and reduced response to mechanical stimulation through nitric oxide and ERK1/2 signaling during osteogenic differentiation. **Biogerontology**, v. 13, n. 5, p. 467–478, 2012.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. p. 111–28.

KALU, D. N. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. **Bone Miner.**, v. 15, n. 0169–6009 (Print), p. 175–191, 1991.

KALU, D. N.; ORHII, P. B. Calcium absorption and bone loss in ovariectomized rats fed varying levels of dietary calcium. **Calcified Tissue International**, v. 65, p. 73–77, 1999.

KANIS, J. A. et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis International**, v. 24, n. 1, p. 23–57, 2013.

KHAJURIA, D. K.; RAZDAN, R.; MAHAPATRA, D. R. Medicamentos para o tratamento da osteoporose: revisão. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 51, n. 4, p. 372–382, 2011.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, p. 505–5, 2001.

KINUGAWA, S. et al. Tetracyclines Convert the Osteoclastic-Differentiation Pathway of Progenitor Cells To Produce Dendritic Cell-like Cells. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 4, p. 1772–1781, 2012.

KLEIN-NULEND, J.; BACABAC, R. G.; BAKKER, A. D. Mechanical loading and how it affects bone cells: The role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. **European Cells and Materials**, v. 24, p. 278–291, 2012.

KOBAYASHI, Y. et al. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. **Journal of biochemistry**, v. 159, n. 4, p. 387–92, abr. 2016.

KOLK, A. et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 8, p. 706–718, dez. 2012.

KOMORI, T. et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, p. 775–64, 1997.

KRAKAUER, T.; BUCKLEY, M. Doxycycline is anti-inflammatory and inhibits staphylococcal exotoxin-induced cytokines and chemokines. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 11, p. 3630–3, nov. 2003.

KRAMER, I. et al. Osteocyte Wnt / β -Catenin Signaling Is Required for Normal. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 12, p. 3071–3085, 2010.

KUBOTA, T.; MICHIGAMI, T.; OZONO, K. Wnt signaling in bone metabolism. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 3, p. 265–271, 2009.

LASH, R. W. et al. **Diagnosis and Management of Osteoporosis**. Prim. Care Clin. Off. Pract. **Anais...**2009

LAU, E. M. C.; COOPER, C. The epidemiology of osteoporosis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 323, p. 65–74, 1996.

LI, X. et al. Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis*. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 4, p. 578–588, 1 abr. 2009.

LI, X. et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody increases bone formation, bone mass, and bone strength in aged male rats. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 12, p. 2647–2656, 1 dez. 2010.

LIOUBAVINA-HACK, N. et al. Effect of Bio-Oss® with or without platelet-derived growth factor on bone formation by “guided tissue regeneration”: A pilot study in rats. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 12, p. 1254–1260, 2005.

LONG, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 27–38, 2012.

LUCATELI, R. L. et al. Doxycycline and autogenous bone in repair of critical-size defects. **Implant Dentistry**, v. 27, n. 4, p. 461–466, 2018.

LUIZE, D. S. et al. Influence of Ovariectomy on Healing of Autogenous Bone Block Grafts in the Mandible : A Histomorphometric Study in an Aged Rat Model. **The International**

Journal of Oral & Maxillofacial Implants, v. 23, p. 207–215, 2008.

LUVIZUTO, E. R. et al. Raloxifene therapy inhibits osteoclastogenesis during the alveolar healing process in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 10, p. 984–990, 2011.

MANFRO, R. et al. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. **Journal of Maxillofacial and Oral Surgery**, v. 13, n. 4, p. 464–470, 2014.

MARIANO, R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v. 109, n. 1, p. 72–78, 2010.

MELTON, L. J. et al. Perspective how many women have osteoporosis? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 9, p. 1005–1010, 3 dez. 2009.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 6, p. 723–729, 1 dez. 2008.

MIRON, R. et al. Effect of enamel matrix derivative on periodontal wound healing and regeneration in an osteoporotic model. **Journal of Periodontology**, v. 85 n. 11, p. 1603–1611, 2014.

MORENO-SÁNCHEZ, M. et al. Bifosfonatos e implantes dentales, son incompatibles? Revisión de la literatura. **Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial**, v. 38, n. 3, p. 128–135, 2016.

NARDONE, V.; D´ASTA, F.; BRANDI, M. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, v. 69, n. 6, p. 438–446, 2014.

NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **New York Academy of Sciences**, v. 1241, p. 17–32, 2011.

NIH, N. I. OF H. **Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy**. American Medical Association. **Anais...**2001

NOF, N. O. F. **America's Bone Health: The State of Osteoporosis and Low Bone Mass in**

Our Nation. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation. **Anais...**2002

OLIVEIRA, M. R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 5, p. 649–655, 2015.

OMINSKY, M. S. et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and bone strength. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 25, n. 5, p. 948–959, 1 maio 2010.

ORSINI, G. et al. Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss® particles in sinus augmentation. **Oral Diseases**, v. 13, n. 6, p. 586–593, 2007.

PAPAPETROU, P. D. Bisphosphonate-associated adverse events. **Hormones**, v. 8, n. 2, p. 96–110, 2009.

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 595–610, 3 dez. 2009.

PARK, J. W. et al. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. **Clinical Oral Implants Research**, v. 20, n. 4, p. 372–378, 2009.

PAYNE, J. B. et al. The Link Between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: A Periodontist's Perspective. **Current oral health reports**, v. 2, n. 1, p. 20–29, 24 mar. 2015.

PAYNE, J. B.; GOLUB, L. M. Using tetracyclines to treat osteoporotic/osteopenic bone loss: From the basic science laboratory to the clinic. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 121–129, 2011.

POLYZOIS, I. et al. Effect of Bio-Oss® on osseointegration of dental implants surrounded by circumferential bone defects of different dimensions: An experimental study in the dog. **Clinical Oral and Implants Research**, v. 18, n. 3, p. 304–310, 2007.

PRUZANSKI, W. et al. Inhibition of enzymatic activity of phospholipases A2 by minocycline and doxycycline. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, p. 1165–1170, 1992.

RAISZ, L. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **Journal Of Clinical Investigation**, v. 115, n. 12, p. 3318–3325, 2005.

RECKER, R. R.; BARGER-LUX, M. J. S. O. Bone remodelling findings in osteoporosis. **Academic Press**, p. 59–70, 2001.

RIBEIRO, D. C. P. et al. Study of the osteoconductive capacity of hydroxyapatite implanted into the femur of ovariectomized rats. **Microscopy research and technique**, v. 75, n. 2, p. 133–7, fev. 2012.

RICHARDS, C.; PANTANOWITZ, L.; DEZUBE, B. J. Antimicrobial and non-antimicrobial tetracyclines in human cancer trials. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 151–156, fev. 2011.

RICHARDSON, C. R. et al. Clinical evaluation of Bio-Oss: a bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, n. 7, p. 421–428, 1999.

RUDNICKI, M. A.; WILLIAMS, B. O. Wnt Signaling in Bone and Muscle. **Bone**, v. 80, p. 80–86, 2015.

SAIKA, M. et al. 17β -estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor α . **Endocrinology**, v. 142, p. 2205–12, 2001.

SASAKI, T.; RAMAMURTHY, N. S.; GOLUB, L. M. Tetracycline administration increases collagen synthesis in osteoblasts of streptozotocin-induced diabetic rats: a quantitative autoradiographic study. **Calcified Tissue International**, v. 50, p. 411–419, 1992.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 205, p. 299–308, abr. 1986.

SHAHABOOEI, M. et al. A histomorphometric study of the effect of doxycycline and erythromycin on bone formation in dental alveolar socket of rat. **Advanced biomedical research**, v. 4, p. 71, 2015.

SHEVDE, N. K. et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Cell Biology**, v. 97, n. 14, p. 7829–34, 2000.

SILVA, A. C. et al. Effect of Doxycycline in Gel form in Regeneration Bone:

Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary. **Journal of Periodontology**, 2015.

SODEK, J.; MCKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontology**, v. 24, p. 99–126, 2000.

SRIVASTAVA, S. et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced JNK activation. **Journal of Biology Chemistry**, v. 276, p. 8836–40, 2001.

TAN, K. B. et al. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. **Gene**, v. 204, p. 35–36, 1997.

TAN, S. H. et al. Wnts produced by Osterix-expressing osteolineage cells regulate their proliferation and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 49, p. E5262-71, 9 dez. 2014.

TAPETY, F. I. et al. A histological evaluation of the involvement of Bio-Oss® in osteoblastic differentiation and matrix synthesis. **Clinical Oral Implants Research**, v. 15, n. 3, p. 315–324, 2004.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. **Science**, v. 289, p. 1504–8, 2000.

TERRANOVA, V. P. et al. A biochemical approach to periodontal regeneration: Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. **Journal of Periodontal Research**, v. 21, n. 4, p. 330–337, 1986.

TRACHTMAN, H. et al. Chemically modified tetracyclines inhibit inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cultured rat mesangial cellse. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 229, p. 243–248, 1996.

TSOLAKI, I. N.; MADIANOS, P. N.; VROTSOS, J. A. Outcomes of Dental Implants in Osteoporotic Patients. A Literature Review. **The Journal of Prosthodontics**, v. 18, p. 309–323, 2009.

UMOH, J. U. et al. *In vivo* micro-CT analysis of bone remodeling in a rat calvarial defect model. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 7, p. 2147–2161, 7 abr. 2009.

VÄÄNÄNEN, H. K. et al. The cell biology of osteoclast function. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 377–381, 2000.

VAJGEL, A. et al. A systematic review on the critical size defect model. **Clinical Oral Implants Research**, v. 25, n. 8, p. 879–893, 2014.

VAN DE WATERING, F. C. J. et al. Calcium phosphate/poly(d , l -lactic-co-glycolic acid) composite bone substitute materials: evaluation of temporal degradation and bone ingrowth in a rat critical-sized cranial defect. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, n. 2, p. 151–159, fev. 2012.

VAN DE WATERING, F. C. J. et al. The biological performance of injectable calcium phosphate/PLGA cement in osteoporotic rats. **Biomedical Materials (Bristol)**, v. 8, n. 3, 2013.

VAN DER STOK, J. et al. Bone substitutes in the Netherlands - A systematic literature review. **Acta Biomaterialia**, v. 7, n. 2, p. 739–750, 2011.

VAN HOUDET, C. I. A. et al. Bone regeneration and gene expression in bone defects under healthy and osteoporotic bone conditions using two commercially available bone graft substitutes. **Biomedical Materials**, v. 10, n. 3, p. 035003, 2015.

VAN HOUDET, C. I. A. et al. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss?? for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, p. 1–12, 2016.

VAN HOUDET, C. I. A. et al. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss® for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 1, p. 131–142, 2018.

VAN LIEROP, A. H. et al. Patients with sclerosteosis and disease carriers: Human models of the effect of sclerostin on bone turnover. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 12, p. 2804–2811, 2011.

VAN LIESHOUT, E. M. M.; ALT, V. Bone graft substitutes and bone morphogenetic proteins for osteoporotic fractures: What is the evidence? **Injury**, v. 47, p. S43–S46, 2016.

VERNA, C. et al. Healing patterns in calvarial bone defects following guided bone regeneration in rats: A micro-CT scan analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 9, p. 865–870, 2002.

VERONESI, F. et al. Mesenchymal stem cells in the aging and osteoporotic population. **Critical reviews in eukaryotic gene expression**, v. 21, n. 4, p. 363–77, 2011.

WENNERBERG, A.; ALBREKTSSON, T. Current challenges in successful rehabilitation with oral implants. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 38, n. 4, p. 286–294, 2011.

WHO. WHO SCIENTIFIC GROUP ON THE ASSESSMENT OF OSTEOPOROSIS AT PRIMARY HEALTH Care Level. **World Health Organization**, v. May, n. May 2004, p. 5–7, 2004.

WILLIAMS, S. et al. Minocycline prevents the decrease in bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized aged rats. **Bone**, v. 19, n. 6, p. 637–644, 1996.

XIONG, J.; O&APOS;BRIEN, C. A. Osteocyte RANKL: New insights into the control of bone remodeling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 27, n. 3, p. 499–505, 2012.

YANG, J.; PHAM, S. M.; CRABBE, D. L. Effects of oestrogen deficiency on rat mandibular and tibial microarchitecture. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 32, n. 4, p. 247–51, 2003.

YASUDA, H. et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Cell Biology**, v. 95, p. 3597–602, 1998.

YIP, I. et al. Defect healing with various bone substitutes. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 5, p. 606–614, 2015.

YOSHINARI, N. et al. Effect of Repeated Local Minocycline Administration on Periodontal Healing Following Guided Tissue Regeneration. **Journal of Periodontology**, v. 72, n. 3, p. 284–295, 2001.

ZHANG, Q. et al. Histomorphometric Study of New Bone Formation Comparing Defect Healing with Three Bone Grafting Materials: The Effect of Osteoporosis on Graft Consolidation. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, 2018.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)/UNIFAL-MG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL




CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da associação da Doxiciclina com osso bovino particulado na regeneração de defeitos ósseos em calvárias de ratas osteoporóticas: estudo histométrico, imunohistoquímico e microtomográfico ", registrada com o nº 43/2017, sob a responsabilidade de Ronaldo Célio Mariano, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 20/07/2017 a 15/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico
Nº de animais	83
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 11 de Julho de 2017.


 Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador CEUA-UNIFAL

APÊNDICE A – Distribuição das medidas microtomográficas segundo os grupos e períodos experimentais.

	GRUPO SHAM		GRUPO OVX-CS		GRUPO OVX-DOX		GRUPO OVX-BIO		GRUPO OVX-BODOX	
	4 SEMANAS	8 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS
Volume Total(TV):	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871
Volume ósseo(BV):	0.38833	1.9700	0.84295	1.4740	1.11579	2.67809	4.84920	5.52466	1.42200	0.960000
R1 Superfície óssea	46.10308	26.69903	79.38703	61.2971	77.87688	45.87938	166.3746	163.94170	267.86971	63.23406
Espessura Trabecular (Tb.Th):	0.11047	0.22700	0.12778	0.16580	0.13619	0.17765	0.16113	0.18180	0.14917	0.14611
Número trabecular (Tb.N):	0.06246	0.15415	0.12896	0.16693	0.14553	0.26776	0.53529	0.53978	0.1675	0.11685
Separação Trabecular (Tb.Sp):	1.06983	1.41337	1.68988	1.34760	1.21658	1.28304	0.72936	0.75128	1.19857	1.61730
Volume Total(TV):	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871
Volume ósseo(BV):	1.05129	1.44171	0.18664	0.99158	1.40758	1.80829	4.98670	5.82432	0.9370	5.45000
R2 Superfície óssea	71.75043	72.43213	34.30555	63.99827	61.40527	33.84951	160.29279	152.0686	108.91226	155.00034
Espessura Trabecular (Tb.Th):	0.12958	0.17290	0.11531	0.2182	0.19606	0.18694	0.16777	0.19482	0.18692	0.18990
Número trabecular (Tb.N):	0.14268	0.14832	0.02894	0.15840	0.12762	0.17182	0.52798	0.53102	0.08974	0.50996
Separação Trabecular (Tb.Sp):	1.67899	1.57611	1.71614	1.48338	1.48405	1.27932	0.77262	0.72204	1.37245	0.84261
Volume Total(TV):	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871	56.29871
Volume ósseo(BV):	2.6540	0.10139	2.94937	2.47535	1.45289	5.12401	8.2540	5.12401	7.54400	3.31476
R3 Superfície óssea	114.77651	57.44466	72.86971	81.52840	88.41203	65.5574	274.05963	162.67918	50.57210	94.30919
Espessura Trabecular (Tb.Th):	0.18627	0.08673	0.17719	0.12408	0.11051	0.24177	0.16801	0.17555	0.18824	0.17721
Número trabecular (Tb.N):	0.10270	0.00207	0.24990	0.08931	0.23535	0.3674	0.53150	0.52250	0.24297	0.3326
Separação Trabecular (Tb.Sp):	1.37245	1.73742	1.20728	1.60540	1.49546	1.10752	0.53746	0.75639	0.46927	0.82384

Fonte: Do autor.

Notas: R1: Rata 1; R2: Rata 2; R3:Rata 3

APÊNDICE B – Distribuição das medidas histométricas segundo os grupos e períodos experimentais.

		Área óssea neoformada (AO)		Remanescentes de Bio-Oss	
		4 SEMANAS	8 SEMANAS	4 SEMANAS	8 SEMANAS
R1	SHAM	0.97	2.03	0	0
R2	SHAM	0.78	1.12	0	0
R3	SHAM	0.87	1.87	0	0
R4	SHAM	0.25	2	0	0
R5	SHAM	0.81	2.7	0	0
R1	OVX-CS	5.66	3.698	0	0
R2	OVX-CS	2.48	2.98	0	0
R3	OVX-CS	1.48	2.498	0	0
R4	OVX-CS	3.25	3.09	0	0
R5	OVX-CS	1.05	2.69	0	0
R1	OVX-DOX	6.53	9.63	0	0
R2	OVX-DOX	9.78	19.84	0	0
R3	OVX-DOX	11.66	7.94	0	0
R4	OVX-DOX	6.452	5.95	0	0
R5	OVX-DOX	9.5	4.35	0	0
R1	OVX-BIO	17.97	6.12	21.3289	24.29281
R2	OVX-BIO	10.8	4.95	8.80654	27.80410
R3	OVX-BIO	13.83	11.04	16.048590	9.179972
R4	OVX-BIO	11.84	20.14	19.76740	0.000000
R5	OVX-BIO	13.52	9.83	14.37610	9.242846
R1	OVX-BODOX	2.93	7.01	0.00000	0.000000
R2	OVX-BODOX	5.3	3.37	11.98299	7.711310
R3	OVX-BODOX	2.2	2.33	47.92632	0.00000
R4	OVX-BODOX	4.43	6.36	1.78818	6.740471
R5	OVX-BODOX	8.33	4.47	5.95056	13.57530

Fonte: Do autor.

Notas: R1: Rata 1; R2: Rata 2; R3:Rata 3; R4:Rata 4; R5: Rata 5