

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RIBAMAR LAZANHA LUCATELI

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA DOXICICLINA COM ENXERTO
AUTÓGENO PARTICULADO NO REPARO ÓSSEO: ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

Alfenas/MG

2015

RIBAMAR LAZANHA LUCATELI

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA DOXICICLINA COM ENXERTO
AUTÓGENO PARTICULADO NO REPARO ÓSSEO: ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

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

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Lucateli, Ribamar Lanza.

Efeito da associação da doxiciclina com enxerto autógeno
particulado no reparo ósseo: estudo histomorfométrico em calvária
de ratos / Ribamar Lanza Lucateli. -- Alfenas/MG, 2015.

76 f.

Orientador: Ronaldo Célio Mariano.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Ossos - Enxerto. 2. Doxiciclina. 3. Ratos Wistar. 4. Transplante
Autólogo. I. Mariano, Ronaldo Célio. II. Título.

CDD 617.605



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 37130-000
Fone: (35) 3299-1392 . Fax: (35) 3299-1067



RIBAMAR LAZANHA LUCATELI

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DA DOXICICLINA COM ENXERTO
AUTÓGENO PARTICULADO NO REPARO ÓSSEO: ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO EM CALVÁRIA DE RATOS**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a 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. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 14 / 12 / 2015.

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

Assinatura:

Profa. Dra. Ana Maria Duarte Dias Costa
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano
UNIFENAS – MG

Assinatura:

Prof. Dr. Roberto Martins Lourenço
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL – MG

Assinatura:

Dedico essa conquista à Deus; fonte de inspiração e na certeza de que sempre existirá algo melhor reservado pra quem tem garra. Não existe obstáculo insuperável. Sem Você nada seria possível, nada me tornaria forte o suficiente para viver e superar desafios. Obrigado por me ouvir e ser meu “porto seguro”.

AGRADECIMENTOS

Obrigado **Deus** pela capacidade e oportunidade de dialogar contigo todos os dias, pela proteção, pelo entusiasmo “pelo viver”, por gozar de boa saúde, pelas lições de vida; por me dar o prazer de sorrir e fazer sorrir, pelo incentivo nos momentos difíceis e me confortar nas angústias; por me fornecer o sentimento da conquista e me aliviar no momento da perda. Obrigado Deus pelo Dom da Vida!

Obrigado à minha **Família**, por me fazer “forte”, por me dar garra para superar todos os desafios, por me ensinar princípios e valores dos homens, sem a educação nada seria possível.

Com palavras é difícil agradecer à minha noiva **Marina Angélica Marciano da Silva** por fazer parte da minha vida, pela paciência, pela compreensão, pelo empenho e dedicação em me ajudar, por estar incansavelmente ao meu lado nos momentos mais difíceis, e foram muitos, por ser meu “braço forte”, por me fazer feliz, enfim obrigado pelo seu amor, pelo nosso amor.

À **Universidade Federal de Alfnas** por meio de seu atual **Reitor Prof. Dr. Paulo Márcio de Faria e Silva** e ao Diretor da Faculdade de Odontologia **Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior** e à comissão de Pós-Graduação, na pessoa de seu atual presidente **Profa. Dra. Vivien Thiemy Sakai** pelo apoio à pesquisa, obrigado.

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano**, pela dedicação em sua orientação, ensino e compartilhamento de seus enormes conhecimentos, pessoa admirável por seu conhecimento e um grande exemplo que o esforço e dedicação valem à pena.

À **Sabrina Ferreira** e à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Júlio de Mesquita Filho** (Unesp) agradeço pela disponibilidade em realizar o processamento histológico das peças desta pesquisa. Muito obrigado, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos Docentes, em especial à **Profa. Dra. Tânia Mary Cestari**, e Funcionários do Departamento de Histologia da Faculdade de Odontologia

de Bauru, Universidade de São Paulo (FOB-USP), pela ajuda durante a execução de parte do trabalho, na aquisição das imagens.

Aos **Funcionários do Biotério** pela dedicação e paciência em nos ajudar para que tudo fosse possível.

Aos colegas **Pós-graduandos**, obrigado pela convivência e bons momentos compartilhados durante o Mestrado.

Aos animais que deram à vida em prol do desenvolvimento científico.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

“A vida é feita da mesma substância
que os sonhos, e entre um sonho e
outro decorre nossa curta existência”.

(William Shakespeare)

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar, por meio de análise descritiva e histomorfométrica, o efeito da doxiciclina a 10% com gel de natrosol associada ao enxerto autógeno em relação ao reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Um total de cinquenta animais foram selecionados. Um defeito de 5 mm de diâmetro foi confeccionado com trefina na calvária dos animais. Os animais foram divididos em 5 grupos (n= 10) de acordo com o material utilizado para preencher o defeito: G1 – Sem preenchimento (CO - coágulo sanguíneo/ controle); G2 – Doxiciclina a 10% em gel de natrosol (DOX); G3 – Gel de natrosol (NAT); G4 – Osso autógeno (OA) e G5 – Osso autógeno associado a doxiciclina a 10% em gel de natrosol (OA + DOX). Os animais foram mortos após 4 e 8 semanas pós-operatório. Foram realizadas análises qualitativas e quantitativas. A neoformação óssea foi calculada como a porcentagem de osso compreendido na área total do defeito original. A análise estatística foi realizada utilizando os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). O novo osso formado limitou-se às bordas dos defeitos cirúrgicos. Na análise das 4 e 8 semanas, o grupo OA + DOX apresentou a maior porcentagem de neoformação óssea (38,59% e 47,86%, respectivamente), com diferença estatística em relação ao grupo CO (19,52%) no período de 4 semanas e em relação aos grupos CO (18,80%), DOX (22,05%) e NAT (15,89%) no período de 8 semanas ($p < 0,05$). O estudo permitiu concluir que a associação da doxiciclina a 10% com osso autógeno aumenta significativamente o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos em relação aos defeitos não preenchidos (CO) e preenchidos com DOX e NAT.

Palavras-chave: Osso. Doxiciclina. Ratos Wistar. Enxerto Autólogo.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate, descriptively and histologically the effect of association of 10% doxycycline in natrosol gel with autogenous bone on bone repair of simulated critical-size defects in rat calvaria. A total of fifty albino rats were selected. A 5-mm diameter defect was created in the calvarium of each animal. The animals were divided into 5 groups (n = 10) according to the material used to fill the defect: G1 – Defect unfilled (CO - blood clot/ control); G2 – 10% Doxycycline in natrosol gel (DOX); G3 – Natrosol gel (NAT); G4 – Autogenous bone (OA) and G5 – Autogenous bone associated with 10% Doxycycline in natrosol gel (OA + DOX). The animals were killed at 4 and 8 weeks postoperatively. Qualitative and quantitative analyses were performed. The amount of new bone formed was calculated as a percentage of bone inside the total area of the original defect. Statistical analysis was performed using ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$). New bone formation was limited to the margins of the defect with no complete bone repair for all groups. At 4 and 8 weeks of analysis, the group OA + DOX showed high percentage of bone formation (38.59% and 47.86%, respectively), with statistical difference in comparison with the group CO (19.52%) at 4 weeks and with the groups CO (18.80%), DOX (22.05%) and NAT (15.89%) at 8 weeks ($p < 0.05$). The study suggest that the association of 10% doxycycline with autogenous bone improve significantly bone healing in critical-size defects in rat calvaria in comparison to defects not filled (CO) and filled with DOX and NAT.

Key words: Bone. Doxycycline. Rats, Wistar. Autologous Transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Cirurgia em Calvária	37
Figura 2	- Cavidade de 5mm de diâmetro com distância às marcações em amálgama correspondente a 2mm de cada lado da margem do defeito..	37
Figura 3	- Materiais utilizados na cirurgia.....	39
Figura 4	- Microscópio óptico com câmera digital acoplada utilizado nas análises descritiva e histomorfométrica..	41
Figura 5	- Análise histomorfométrica.....	42
Figura 6	- Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 4 semanas.....	45
Figura 7	- Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 8 semanas.....	47
Figura 8	- Média e desvio padrão dos grupos avaliados no período de 4 semanas	49
Figura 9	- Média e desvio padrão dos grupos avaliados no período de 8 semanas..	50
Figura 10	- Média e desvio padrão dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas..	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição dos animais em relação aos grupos e períodos experimentais.....36
- Tabela 2** - Média e desvio padrão da porcentagem de área correspondente ao osso neoformado nas margens do defeito cirúrgico nos respectivos grupos estudados nos períodos de 4 e 8 semanas.48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	TECIDO ÓSSEO	17
2.2	REPARO ÓSSEO	18
2.3	DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO	20
2.4	MATERIAIS DE ENXERTO.....	22
2.4.1	Osso autógeno	23
2.5	DOXICICLINA	25
3	PROPOSIÇÃO	31
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
4.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.....	36
4.3	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	39
4.4	ANÁLISE DESCRITIVA E HISTOMORFOMÉTRICA.....	40
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	ANÁLISE DESCRITIVA.....	44
5.1.1	4 Semanas.....	44
5.1.2	8 Semanas.....	46
5.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	48
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS.....	62
	ANEXO.....	74

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Defeitos ósseos extensos podem ser decorrentes de diversos fatores como grandes traumas, infecções, anomalias de desenvolvimento, patologias e ressecções oncológicas mutilantes (ADORNATO; MORCOS; ROZANSKI, 2007; FISHERO et al., 2015; HERFORD; BOYNE, 2008; LAZARIDES et al., 2014). Todos estes fatores resultam em comprometimento da função e da estética. Para o sucesso da reabilitação, o processo de neoformação óssea é essencial. O adequado reparo tecidual é dependente de um volume e uma qualidade óssea satisfatórios (LEKHOLM et al., 1996).

Os defeitos ósseos, quando muito extensos, não tem a capacidade de regeneração espontânea, sendo denominados, nestes casos, como defeitos críticos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Esses defeitos ósseos de grandes dimensões, congênitos ou oriundos de doenças ou traumas, costumam ser de difícil solução e que, deixados ao seu livre curso, não se resolvem ou o fazem muito lentamente e de forma incompleta. Nesse caso, o uso de biomateriais se faz necessário para substituição do tecido ósseo perdido ou para a estimulação da osteogênese de reparação.

Há no mercado uma variedade de biomateriais orgânicos e sintéticos diferentes quanto à origem, método de preparação, composição química, características estruturais e, portanto, quanto às propriedades e à resposta que evocam nos tecidos biológicos. Apesar dos avanços científico e tecnológico nesta área, ainda não existe um material que preencha todos os requisitos para garantir o sucesso de sua utilização clínica. Todos eles apresentam vantagens, mas também demonstram limitações, tornando-se constante a busca por substâncias que possam modular, alterar ou estimular a atividade osteogênica nos defeitos teciduais e/ou inibir a osteoclastogênese.

O padrão ouro e com resultados mais previsíveis ainda são obtidos com os enxertos ósseos autógenos que, não obstante, apresentam inconvenientes para sua utilização, o que faz surgir muita discussão sobre a utilização de diferentes enxertos como substitutos ósseos para se evitar a

instalação de defeitos em um segundo sítio cirúrgico (GROSS et al., 1997; VELICH et al., 2004; ZIJDERVELD et al., 2005). Permanece, portanto, o interesse pelo desenvolvimento de novos materiais que substituam o osso humano e/ou favoreçam a regeneração óssea.

As tetraciclinas tem sido estudadas em combinação com o osso autógeno. Dentre as tetraciclinas avaliadas, a doxiciclina apresenta resultados satisfatórios na literatura (AL-ALI; BISSADA; GREENWELL, 1989; BEZERRA et al., 2002; CHANG; YAMADA, 2000). Este antibiótico tem aprovação pela FDA e é empregado em baixas dosagens no tratamento periodontal devido à sua efetividade contra Gram negativos anaeróbios, comumente encontrados na placa subgengival (YAGAN; KESIM; LIMAN, 2014). Em relação aos seus efeitos no reparo ósseo, alguns estudos demonstram que a aplicação local estimula a osteogênese em defeitos ósseos e inibe a reabsorção óssea inflamatória, independentemente de suas propriedades antimicrobianas (AL-ALI; BISSADA; GREENWELL, 1989; BEZERRA et al., 2002). A doxiciclina induz a apoptose em osteoclastos, inibe a osteoclastogênese, reduz a produção de colagenase pelos osteoblastos e osteoclastos e retarda o recrutamento de osteoclastos após o procedimento cirúrgico (BETTANY et al., 2000; GREVSTAD; BOE, 1995).

A avaliação biológica de biomateriais de substituição óssea é amplamente estudada em calvária de ratos. A área permite a confecção de um defeito ósseo de tamanho crítico, definido como a menor ferida intra-óssea que não possui a capacidade de regenerar espontaneamente durante o tempo de vida do animal, havendo necessidade de utilização de um enxerto (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; REICHERT et al., 2009). A calvária de ratos possui uma quantidade pequena de osso trabecular, facilitando a acomodação do enxerto. Além disso, é uma região anatômica com similaridade morfológica e embrionária com a região craniofacial, limitados esforços mecânicos e relativa estabilidade das estruturas adjacentes (CESTARI, 2009). Com a análise histomorfométrica da calvária pode-se quantificar o osso neoformado e verificar a qualidade do tecido, determinando a eficácia do material implantado (SILVA et al., 2015).

Acredita-se, então, que estudos devem ser realizados com o objetivo de conseguir respostas esclarecedoras sobre a utilização do gel de

doxiciclina na regeneração óssea. A busca por informações seguras na utilização deste gel como inibidor da osteoclastogênese passa obrigatoriamente pelos estudos experimentais em animais, onde as respostas sobre sua real ação no reparo ósseo podem ser alcançadas e as suas particularidades conhecidas e melhoradas. A pesquisa se justifica, pois os estudos propostos podem esclarecer melhor o comportamento do gel de doxiciclina e osso autógeno, associados ou não, na regeneração de defeitos ósseos de tamanho crítico em calvárias de ratos.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta Revisão de Literatura serão abordados temas para melhor elucidação do trabalho, que ajudara de forma sistemática o leitor na compreensão da abordagem num todo.

2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso pode ser definido como um tecido vivo, dinâmico, com um abundante suprimento sanguíneo, e que sofre um processo de constante remodelação (ALBREKTSSON, 1983). Estímulos sistêmicos e locais são responsáveis pela atividade celular de remodelação óssea (DZIAK, 1993; MUNDY, 1991). A ação coordenada de osteoclastos e osteoblastos promove a constante renovação tecidual (MUNDY, 1991).

A remodelação celular ocorre em porções descontínuas do osso, e é regulada por citocinas locais produzidas no ambiente das células em remodelação. Estas citocinas são secretadas por células imunes e células ósseas. Além disso, alguns fatores de crescimento são incorporados na matriz óssea não colágena e são liberadas de uma forma ativa quando o osso é estimulado a reabsorver. Interações complexas entre essas citocinas e suas células alvo são responsáveis pelo delicado balanço entre formação e reabsorção óssea. Desordens na reabsorção óssea ocorrem devido a desequilíbrios entre as taxas de reabsorção e formação (MUNDY, 1991).

O osso é composto basicamente de quatro componentes microestruturais: células, matriz orgânica, matriz inorgânica e fatores sinalizadores solúveis (BUCKWALTER et al., 1996). O tecido ósseo é constituído de 70% de componentes inorgânicos e 30% de componentes orgânicos. Na porção orgânica, 2% são representados por componentes celulares e 98% de matriz extracelular, constituída predominantemente por colágeno, seguida por polissacarídeos, lipídeos e fosfolipídeos. Entre os componentes inorgânicos, encontra-se o cálcio e o fósforo, que formam a

hidroxiapatita (HA) ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) e outros elementos como magnésio, sódio, potássio e, em menor concentração, zinco, manganês, flúor e molibdênio (KAPLAN, 1991).

Macroscopicamente, o osso é composto por tecido ósseo cortical, correspondente a 80% de seu peso total no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. O restante da área é ocupado pelo tecido ósseo esponjoso, que corresponde aos demais 20% do peso. Quanto ao metabolismo, o osso esponjoso é oito vezes mais ativo, apresentando maior remodelação (BLACK, 1991).

2.2 REPARO ÓSSEO

A integridade do esqueleto é mantida pela contínua remodelação celular óssea que ocorre durante a vida do indivíduo e é caracterizada por uma ordenada sequência de eventos que se inicia com a reabsorção óssea pelos osteoclastos seguida da neoformação óssea pelos osteoblastos (MUNDY, 1991). Quando o tecido ósseo é lesionado, o processo de reparo é complexo e envolve respostas locais e sistêmicas. O tecido ósseo possui uma alta capacidade de regeneração, o que possibilita o restabelecimento de sua arquitetura e função originais. Este processo envolve a interação de células, fatores de crescimento e matrizes extracelulares. Embora haja alguma semelhança entre o reparo de tecidos duros e moles, o tecido ósseo pode regenerar-se de maneira indistinguível da que o derivou durante a embriogênese, enquanto os tecidos moles se reparam por meio da formação de cicatriz (HOLLINGER; WONG, 1996).

Histologicamente, o reparo de uma ferida óssea envolve um processo inflamatório, degradação dos tecidos não vitais presentes no local, migração e proliferação de células mesenquimais, diferenciação destas em células condrogênicas e osteogênicas, deposição de tecido cartilaginoso e ósseo e, finalmente, sua remodelação unindo os términos do defeito sem deixar cicatriz (HOLLINGER; WONG, 1996).

A injúria aos tecidos ósseos inicia uma resposta inflamatória com ativação do sistema complemento. Paralelamente, a lesão causa a ruptura de vasos locais responsáveis pela nutrição óssea causando a necrose de algumas células e a formação de um hematoma composto por eritrócitos, fibrina e plaquetas. As plaquetas são um depósito de fatores de reparo como PDGF, FGF e TGF β , que são responsáveis por regular a atividade celular (HOLLINGER; WONG, 1996). Este evento recruta macrófagos e osteoclastos para degradar as margens ósseas necróticas. Os macrófagos além de eliminarem os tecidos necróticos expressam fatores reguladores como a interleucina-1, necessária à angiogênese, ativação de fibroblastos e células condroprogenitoras e osteoprogenitoras (BEUSCHER et al., 1992; HOLLINGER; WONG, 1996).

Com a progressão do processo de reparo, células endoteliais, provenientes dos tecidos intactos circunjacentes ao tecido ósseo lesionado, migram, proliferam e formam novos capilares sanguíneos que penetram no hematoma. Durante esse período ocorre também migração de fibroblastos em direção ao hematoma (HOLLINGER; WONG, 1996). Na região do defeito ósseo há a formação de um tecido de granulação composto por tecido conjuntivo rico em fibroblastos, células inflamatórias e vasos sanguíneos. Células mesenquimais, provenientes do periósteo migram para o local por meio do fluxo sanguíneo. Tais células são consideradas osteoprogenitoras pois em combinação com proteínas ósseas morfogenéticas (BMP 1 a 7) são convertidas em osteoblastos ou condroblastos (WOZNEY et al., 1990).

O processo que finaliza o reparo restabelecendo os contornos é denominado remodelação. Nesta fase, as células e os moduladores bioquímicos atuam para restaurar os contornos ósseos. Os osteoblastos e os osteoclastos são os componentes celulares responsáveis pelo reparo e restabelecimento da forma e função ao tecido ósseo. A formação de osso pelos osteoblastos inclui a síntese e processamento intra-celular de colágeno tipo I. Além disso, os osteoblastos estão envolvidos na regulação da atividade osteoclástica por meio da produção de citocinas envolvidas na regulação da osteoclastogênese. Os osteoclastos, por sua vez, são as células responsáveis pelo processo de reabsorção óssea com capacidade tanto de dissolver a matriz mineral, por meio da diminuição do pH local, como

também de hidrolisar a matriz orgânica por meio da secreção de enzimas (DZIAK, 1993).

Alguns fatores podem dificultar a capacidade de regeneração do tecido ósseo e até mesmo o completo reparo pode não ocorrer. Dentre eles, o suprimento sanguíneo adequado, a estabilidade mecânica ou a alta proliferação do tecido conjuntivo local (HOLLINGER; WONG, 1996; PINHEIRO et al., 2003). Em relação à estabilidade mecânica, a fixação da região fraturada é imprescindível para o reparo adequado (HOLLINGER; WONG, 1996). As forças são preponderantes na formação de tecido cartilaginoso ou ósseo. Forças acima do considerado fisiológico causam mobilidade e afetam o reparo da lesão estimulando uma formação excessiva de cartilagem (HOLLINGER; WONG, 1996). Isto ocorre devido à ruptura dos vasos sanguíneos, produzindo um ambiente com baixa taxa de oxigênio, favorecendo a condrogênese. Em relação à proliferação de tecido conjuntivo local, a velocidade de proliferação do tecido conjuntivo é maior que a neoformação óssea. Nestes casos, pode-se formar um tecido fibroso na região, impedindo o reparo. A regeneração óssea guiada por meio da utilização de membranas permite que não ocorra uma invaginação de tecido conjuntivo na região do defeito ósseo, permitindo a neoformação óssea no local (BUSER, 2010).

2.3 DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Na Implantodontia a deficiência ou a falta de volume ósseo pode comprometer um adequado processo de osseointegração e, conseqüentemente, uma reabilitação oral satisfatória (BREINE; BRANEMARK, 1980). O processo de reparo ósseo inicia-se nas bordas da ferida e, no caso de defeitos extensos, o reparo ósseo, muitas vezes, não evolui para o centro da ferida, havendo a formação de uma matriz fibrocartilaginosa (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). Tal processo é denominado osteogênese endocondral. Este tipo de reparo ocasiona uma falha óssea ou deformidade indesejada. Defeitos ósseos críticos geralmente

resultam em comprometimento estético e funcional e necessitam de algum tipo de intervenção clínica como, por exemplo, a aplicação de um enxerto ósseo autógeno (SPICER et al., 2012).

Além do tamanho do defeito ósseo, outros fatores podem interferir com a quantidade e qualidade do reparo. Dentre esses fatores, a localização anatômica do defeito e sua estabilidade estão diretamente relacionadas ao sucesso do reparo. Pequenas movimentações dos fragmentos ósseos ou do biomaterial, quando submetidos a cargas biomecânicas, podem comprometer o sucesso da regeneração óssea (GOMES; FERNANDES, 2011). Além disso, a estrutura interna do tecido ósseo, o suprimento sanguíneo, o envolvimento do osso cortical e a presença ou ausência do perióstio também podem interferir com a reparação tecidual óssea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Os defeitos críticos foram originalmente descritos por Schmitz e Hollinger (1986) como “o menor defeito intra-ósseo que não se regenera espontaneamente durante a vida do animal”. Porém, alguns estudos discutem a funcionalidade de tal definição (COOPER et al., 2010; GOSAIN et al., 2003). Para Gosain et al., (2003), a afirmação de que o defeito crítico não se regenera durante a vida do animal não se aplica pois a maioria dos estudos tem duração limitada e não se estende durante um período compatível com o período de vida do animal. Assim, os autores sugerem uma alteração da definição de defeito crítico como sendo o tamanho de defeito que não possui a capacidade de se reparar durante o período de duração do estudo.

Os defeitos críticos foram desenvolvidos como um método para padronizar os testes de materiais com capacidade osteogênica. Diversos modelos de estudo foram propostos, dentre eles alvéolos dentários pós-exodontia em ratos e defeitos em fêmur ou tíbia de coelhos. Porém, tais modelos apresentam o inconveniente de possuírem capacidade de reparação espontânea (CESTARI, 2009). Atualmente, um dos modelos mais utilizados para a avaliação de reparo ósseo é o defeito de tamanho crítico em calvária de ratos (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CESTARI, 2009; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; MESSORA et al., 2008). Tais defeitos são confeccionados com trefina cirúrgica com uma extensão de 5 a 8 mm de

diâmetro, se estendendo nas duas corticais ósseas.

Uma das vantagens do defeito em calvária é que este modelo envolve um sítio ortotópico em que o processo de remodelação óssea progride até a regeneração do tecido perdido, enquanto que em sítios ectópicos, há uma tendência de reabsorção pelo organismo pela falta de estímulo funcional (CESTARI, 2009; WANG; GLIMCHER, 1999). A calvária apresenta osso cortical e medular, localiza-se em uma região de fácil acesso, sem grandes movimentações e contrações musculares, reduzindo as interferências no processo de reparo (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998). Além disso, a dura-máter é apontada como uma fonte de células mesenquimais que participam do processo de reparo da calvária (GOSAIN et al., 2003; WANG; GLIMCHER, 1999).

2.4 MATERIAIS DE ENXERTO

A extensão do defeito ósseo pode limitar a possibilidade de reparo espontâneo. Nestes casos, materiais de enxerto com potencial osteogênico são necessários para auxiliar no processo. Os materiais de enxerto podem ser utilizados de acordo com seu mecanismo de ação e podem ser divididos em osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores. Os enxertos osteogênicos são materiais orgânicos com capacidade de estimular diretamente os osteoblastos a produzirem tecido ósseo (HELMRICH et al., 2013). Enxertos osteoindutores apresentam capacidade de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, mesmo em sítios não ósseos. Por último, materiais de enxerto osteocondutores atuam como substrato ou arcabouço para células osteoprogenitoras poderem migrar, proliferar e maturar em osteoblastos maduros, permitindo a aposição de novo tecido ósseo na sua superfície.

Os materiais de enxerto podem ser ainda classificados de acordo com a sua origem em autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (biomateriais) (BAUER; MUSCHLER, 2000). No enxerto de osso autógeno remove-se o tecido ósseo de uma área doadora do próprio paciente para

implantá-lo na área receptora. Os enxertos alógenos ou homógenos são provenientes de outros indivíduos da mesma espécie, uma vez que eles são geneticamente diferentes. Os enxertos xenógenos são obtidos em espécies diferentes. Os enxertos aloplásticos são feitos de material sintético ou natural, sendo apenas osteocondutores, funcionando como um material de preenchimento.

Segundo Block e Kent (1997), um material de enxerto ideal deve apresentar: habilidade de produzir osso por meio da proliferação celular de osteoblastos viáveis transplantados ou pela osteocondução de células ao longo da superfície dos enxertos; manutenção do osso maduro ao longo do tempo sem perda através da função; capacidade de produzir osso por meio da osteocondução de células mesenquimais recrutadas; remodelar o osso inicialmente formado em osso lamelar maduro; habilidade de estabilizar implantes quando colocados simultaneamente com o enxerto; apresentar baixo risco de infecção; fácil disponibilidade; baixa antigenicidade e alta taxa de confiabilidade.

O estudo clássico de Urist (1965) foi fundamental para ampliar as perspectivas de utilização de materiais de enxerto como substitutos ósseos ou como indutores da neoformação óssea. Neste estudo, o autor introduziu a hipótese da osteogênese pós fetal por meio da autoindução. A teoria foi elaborada com base nos resultados de 70 estudos nos quais aproximadamente 300 animais foram empregados. Foram realizados implantes de matriz óssea desmineralizada em sítios não osteogênicos como o tecido muscular e em sítios osteogênicos como defeitos ósseos. Os implantes resultaram na deposição de tecido ósseo e cartilaginoso após um período de 4 a 6 semanas, indicando a capacidade de indução da neoformação óssea mesmo em regiões sem tecido ósseo nativo.

2.4.1 Osso autógeno

As extrações ou perdas dentárias muitas vezes ocasionam, principalmente no ano seguinte ao procedimento cirúrgico, uma grande perda

de osso alveolar e, conseqüentemente, uma grande dificuldade de reabilitação do paciente com próteses muco-suportadas ou implantes osseointegrados. Para devolver o estado normal ao paciente e conseguir uma reabilitação satisfatória, cirurgias prévias são necessárias e, para isso, surgem então os enxertos ósseos com materiais biocompatíveis com boas propriedades biomecânicas que devolverão o estado e função perdida do local comprometido em questão (TATULLO et al., 2012).

Tem-se então, para reabilitação, como padrão ouro de comparação o enxerto ósseo autógeno (BLOCK; KENT, 1997). Esse enxerto apresenta as vantagens do osso medular que são a capacidade de osteocondução, osteoindução e presença de células osteogênicas e a integridade estrutural fornecida pelo osso cortical, importante na reconstrução de defeitos ósseos amplos (GAZDAG et al., 1995). Além disso, os enxertos autógenos, revascularizam rapidamente e podem ser coletados em múltiplas formas (partículas, faixas e blocos) por serem de origem medular. Para Fox, Machon e Burbidge (1991), a grande supremacia biológica dos enxertos autógenos em cirurgia de reconstrução óssea baseia-se no fato de a matriz óssea enxertada ser não imunogênica por serem originários do próprio paciente. O osso autógeno está disponível para coleta na crista ilíaca, tuberosidade, sínfise ou ramo da mandíbula (MARX et al., 1992).

Invariavelmente, o osso autógeno pode ser considerado insuficiente para a reconstrução de grandes defeitos devido a disponibilidade muitas vezes restrita de áreas doadoras de osso (KESKIN et al., 2008; KUBLER et al., 1995; MANSON; CRAWLEY; HOOPES, 1986). Além disso, a maior morbidade resulta, em grande parte dos casos, na não aceitação do paciente de uma segunda ferida cirúrgica. Assim, inúmeras pesquisas têm sido realizadas na busca de materiais que substituam o osso autógeno nos procedimentos de enxertia (TATULLO et al., 2012).

Em estudos em animais, como opções de sítios de coleta de osso autógeno, temos o osso da calota craniana, osso ilíaco, tíbia e costela. Todos apresentam, cada qual, suas peculiaridades, vantagens e desvantagens (JACKSON; HELDEN; MARX, 1986; SAWIN; TRAYNELIS; MENEZES, 1998). O osso da calota craniana apresenta o melhor desempenho, tendo em vista suas vantagens, como: mesmo sítio cirúrgico,

ser rapidamente inserido, sequela da área doadora aceitável e ser biologicamente estável (DAHLIN; ALBERIUS; LINDE, 1991).

A bioengenharia de tecidos é conhecida por se tratar de uma área interdisciplinar que aplica conceitos de ciências biológicas e de engenharia e que contribui para o desenvolvimento de substitutos biológicos para diversos tecidos no intuito de restaurá-los, mantê-los ou até aumentar sua função (BARRILLEAUX et al., 2006). O grande desafio dessa ciência é desenvolver materiais que permitam a adesão, migração, crescimento e proliferação celular resultando em uma boa integração com os tecidos vizinhos.

2.5 DOXICICLINA

As tetraciclinas foram descobertas na década de 40 por Benjamin Minge Duggar em estudos de fungos presentes no solo de diversas regiões. Uma amostra revelou uma colônia fúngica com notável atividade antibacteriana contra bactérias causadoras do tifo e febre maculosa, que até então não havia cura. A descoberta da extensa atividade contra patógenos letais levou o pesquisador a denominar a substância desconhecida como um antibiótico de “amplo espectro”, tornando-se um dos primeiros antibióticos da história da medicina a alcançar este título. O antibiótico foi denominado Aeromicina (Clortetraciclina). No final da década de 40, a Aeromicina passou a ser comercializada pela indústria farmacêutica McCormick. Em pouco tempo, outras empresas químicas estavam anunciando suas próprias descobertas de antibióticos de amplo espectro. Na década de 50, Alexander Finlay e seus colegas da Charles Pfizer Company anunciaram a descoberta da Terramicina (Oxitetraciclina). Neste período, acreditava-se que modificações químicas de antibióticos diminuía sua atividade. Ao contrário do que se acreditava na época, Lloyd Conover da Pfizer produziu um análogo da Aeromicina, melhorando suas características farmacológicas e antibióticas. Tal substância foi denominada Tetraciclina. Este composto foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1954 como a primeira nova tetraciclina obtida por meio da modificação de um produto

natural, tornando-se um dos primeiros antibióticos semi-sintéticos comerciais utilizados na medicina (NELSON; LEVY, 2011).

Nas décadas seguintes, uma segunda geração de tetraciclinas semi-sintéticas foram sendo desenvolvidas. Charlie Stephens, químico da Pfizer, desenvolveu uma substância análoga com notável atividade, estabilidade e eficácia farmacológica denominada doxiciclina (NELSON; LEVY, 2011). Tal antibiótico foi aprovado pela FDA em 1967 e é amplamente utilizado até os dias atuais como um antibiótico com amplo espectro contra infecções bacterianas e uma ampla gama de micro-organismos causadores de infecções como anthrax e malária (NELSON; LEVY, 2011).

Entre o final da década de 70 e início da década de 80, diversos estudos demonstraram efeitos das tetraciclinas para o tratamento da doença periodontal. As suas atividades antimicrobianas incluíam a supressão de patógenos Gram negativos presentes na placa subgengival, concentração do antibiótico no fluido crevicular gengival e capacidade de ligar-se à superfície dentária e ser liberado lentamente (BAKER et al., 1983; GORDON et al., 1981; SLOTS et al., 1979; SLOTS; ROSLING; GENCO, 1983). Porém, também neste período, foram descobertas propriedades das tetraciclinas não relacionadas com a sua atividade antibacteriana, mas com grandes vantagens terapêuticas. As propriedades anti-inflamatórias, a capacidade de promover a ligação entre o tecido conjuntivo e a superfície dentária e a inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas colagenolíticas responsáveis pela degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea, foram algumas das propriedades descobertas nesta época (GOLUB et al., 1983; PLEWIG; SCHOPF, 1975; TERRANOVA et al., 1986).

Os primeiros relatos da atividade das tetraciclinas na inibição da destruição do tecido conjuntivo e da perda óssea ocorreram na década de 80. Porém, as observações preliminares se iniciaram ainda na década de 70. Golub e colaboradores examinavam alterações no metabolismo gengival associadas à diabetes e tiveram um achado inesperado ao verificarem a supressão da perda de colágeno em ratos diabéticos (GOLUB; GARANT; RAMAMURTHY, 1977; GOLUB et al., 1978; RAMAMURTHY; ZEBROWSKI; GOLUB, 1974). Golub et al. (1983) demonstraram a capacidade das

tetraciclina de inibir a atividade colagenolítica gengival ocasionada pela diabetes. No estudo, o antibiótico semi-sintético derivado das tetraciclina, a minociclina, foi administrado a ratos e humanos diabéticos. Nos ratos, a administração da minociclina suprimiu a atividade da enzima colagenolítica no tecido gengival e retardou a perda óssea e, em humanos, reduziu a atividade das MMPs no fluido gengival crevicular, efeito este, não produzido pela penicilina. Com os resultados destes estudos iniciais, Golub et al. (1983) propuseram que as tetraciclina, e não outros antibióticos, poderiam inibir a colagenase por meio de um mecanismo não vinculado às suas propriedades anti-microbianas, e que esta descoberta poderia proporcionar uma nova abordagem no tratamento de doenças como a periodontite e outras que envolvem a degradação do colágeno (GOLUB et al., 1990).

Estudos seguintes demonstraram que as tetraciclina, incluindo a minociclina e a doxiciclina, tinham ação inibitória sobre as enzimas colagenases em diversos tecidos como a gengiva e sobre componentes celulares como polimorfonucleares (PMNs), macrófagos, osteoblastos e condrócitos (GOLUB et al., 1983).

O mecanismo de inibição das MMPs é complexo. Os efeitos das tetraciclina nas MMPs ocorre por inibição direta de sua atividade e também por inibição de sua síntese. A inibição direta ocorre devido à ligação com os íons metálicos Ca^{+2} e Zn^{+2} , presentes nas MMPs. As colagenases dependem dos íons Zn^{+2} e Ca^{+2} para estabilizar a sua conformação molecular, necessária à sua atividade de degradação da matriz (TRAJANO, 2012).

Diferentes tecidos e células podem variar consideravelmente sua susceptibilidade à inibição da colagenase e diferentes membros da classe das tetraciclina podem diferenciar na sua eficácia anticolagenase (GOLUB et al., 1990). Estudos mostram uma diferença na inibição da colagenase extraída de células polimorfonucleares (PMNs) e de fibroblastos (SORSA et al., 1988). A concentração de fármaco necessária para inibir 50% da atividade das colagenases de PMNs é menor que a requerida para os fibroblastos (LEE et al., 1991).

Outro fator importante a ser considerado é a diferença existente na eficácia em inibir a ação das MMPs entre as diferentes classes de tetraciclina. Tetraciclina semi-sintéticas como a minociclina e a doxiciclina

apresentam uma efetividade maior para inibir a colagenase em comparação com as demais tetraciclinas. Golub et al. (1990) verificaram maior tempo de inibição da colagenase em bolsas periodontais com a utilização da minociclina e doxiciclina do que com outras tetraciclinas. Baseado em estudos *in vitro* com as tetraciclinas mais comumente prescritas, a doxiciclina mostra-se claramente como a mais potente (BURNS et al., 1989). A maior efetividade da doxiciclina tem sido atribuída à sua habilidade em se ligar mais fortemente ao Zn^{+2} que outras tetraciclinas, desestabilizando a conformação molecular das MMPs.

Pouco tempo após a descoberta das propriedades anticolagenase das tetraciclinas, a relevância de tal característica em relação à reabsorção óssea começou a ser explorada (GOLUB et al., 1990). A reabsorção óssea consiste em uma reação em cadeia dinâmica e complexa que envolve não apenas osteoclastos mas também outros tipos celulares. A ação das tetraciclinas na supressão da reabsorção óssea é atribuída a três fatores: inibição da atividade das MMPs, especialmente as colagenases, indução da apoptose de osteoclastos e regulação da osteoclastogênese (BETTANY et al., 2000; GOLUB et al., 1994; HOLMES et al., 2004).

Estudos de Bettany e Wolowacz (1998) e Bettany et al. (2000) demonstraram que a doxiciclina, além de atuar como inibidor da MMP, possui capacidade de induzir a apoptose de osteoclastos. Bettany e Wolowacz (1998) verificaram que a doxiciclina induziu a apoptose após 24 horas em culturas de monócitos e linhagens celulares de macrófagos. O mesmo efeito não foi observado em células mesenquimais, incluindo condrócitos, osteoblastos e fibroblastos. As observações do estudo sugeriram que a doxiciclina poderia induzir a apoptose de osteoclastos, célula que partilha um precursor comum com monócitos e macrófagos. Bettany et al. (2000) verificaram também a efetividade da doxiciclina em induzir a apoptose de osteoclastos e em inibir a reabsorção em culturas com concentrações de 2-5 $\mu\text{g/mL}$.

As evidências sugerem que as tetraciclinas podem suprimir a reabsorção óssea não apenas por meio da inibição da atividade de degradação enzimática dos osteoclastos (inibição das MMPs), mas também por meio de outros mecanismos como a ação sobre a diferenciação celular.

Os fatores envolvidos na osteoclastogênese são o receptor RANK, também denominado receptor de diferenciação de osteoclastos, o seu ligante RANKL, também chamado de fator de diferenciação de osteoclastos e a osteoprotegerina (OPG), também chamada de fator inibidor da osteoclastogênese, receptor para RANKL que inibe a RANKL de se ligar ao seu receptor RANK (WADA et al., 2006). Embora a medula óssea expresse níveis baixos de RANKL, esta desempenha um papel crítico para o metabolismo ósseo adequado. A ligação de RANKL ao receptor RANK fornece o sinal crucial para guiar a diferenciação dos osteoclastos a partir de células progenitoras hematopoiéticas (osteoclastogênese), bem como ativar os osteoclastos maduros (WADA et al., 2006). A OPG regula negativamente a ligação da RANKL com o receptor RANK, inibindo a osteoclastogênese. Estudos mostram que uma interrupção no eixo RANK-RANKL resulta em osteopetrose severa e erupção dentária em ratos como resultado de uma deficiência de osteoclastos (suspensão da osteoclastogênese) (DOUGALL et al., 1999; KONG et al., 1999). Por outro lado, ratos com deficiência de OPG, receptor chamariz para RANKL, apresentam osteoporose resultante do aumento no número de osteoclastos (MIZUNO et al., 1998). Holmes et al. (2004) verificaram *in vitro* que a doxiciclina é um potente inibidor da osteoclastogênese. Os efeitos foram observados em células mononucleares estimuladas com fator RANKL. A formação de osteoclastos foi inibida pela doxiciclina quando este fármaco foi adicionado em culturas de células mononucleares sanguíneas em uma concentração de 250 ng/mL. O efeito inibitório da doxiciclina sobre a RANKL e consequente interrupção da osteoclastogênese foi demonstrada também por Franco et al. (2011). Os autores verificaram uma inibição da atividade da enzima MMP-9 como responsável direto pela inibição da RANKL.

A redução no número de osteoclastos com a administração de doxiciclina foi verificada por Bezerra et al. (2002). Os autores avaliaram doses abaixo da capacidade anti-microbiana da doxiciclina (< 10mg/kg/dia) em ratos. Os animais que não receberam a medicação apresentaram significativamente maior perda óssea alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear intenso e aumento no número de osteoclastos. Mavragani, Brudvik e Selvig (2005) verificaram redução no número de osteoclastos e

também de odontoclastos na superfície dentária com a administração de baixas doses de doxiciclina.

Os efeitos de baixas doses de doxiciclina na proliferação e diferenciação de células precursoras em osteoblastos foram demonstrados por Gomes e Fernandes (2007), Almazin et al. (2009) e Park (2012). Gomes e Fernandes (2007) avaliaram o comportamento de células osteoblásticas da medula óssea humana na atividade funcional na presença de concentrações terapêuticas de doxiciclina (1-25 µg/mL). A exposição celular à doxiciclina induziu um aumento significativo no número de células osteoblásticas ativas, que produziu uma proporção de uma matriz mineralizada normal, sugerindo uma potencial aplicação terapêutica com o objetivo de aumentar a formação óssea. Almazin et al. (2009) avaliaram o efeito de sistemas de liberação local, incluindo a doxiciclina a 10% na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas. O estudo demonstrou que a doxiciclina a 10% aumentou a diferenciação e maturação celular. Park (2012) demonstrou, também, que baixas doses de doxiciclina apresentam efeitos positivos na diferenciação de células precursoras ósseas.

Os diversos efeitos da doxiciclina sobre a atividade de reparo ósseo impulsionaram a utilização desta substância no reparo ósseo. A utilização da doxiciclina a 10% associada ao gel de natrosol no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos foi estudada por Silva et al. (2015). Os autores avaliaram 24 ratos. Foram confeccionados defeitos com 6 mm de diâmetro com broca trefina na calvária dos animais. Estes foram divididos em 3 grupos de acordo com o tratamento aplicado aos defeitos (controle – sem tratamento, coágulo sanguíneo, gel de natrosol e doxiciclina a 10% associada ao gel de natrosol). Os animais foram eutanaziados após 4 e 8 semanas e o tecido ósseo da calvária foi avaliado por meio de tomografia computadorizada e análise histomorfométrica. Os resultados do estudo mostraram que os animais do grupo tratado com doxiciclina a 10% associado ao gel de natrosol apresentaram neoformação óssea significativamente maior (44%) em comparação com os grupos tratados com natrosol (33%) e controle (32%) no período de 4 semanas. No período de 8 semanas, novamente o grupo tratado com doxiciclina apresentou neoformação óssea significativamente maior (61%) que os grupos natrosol (34%) e controle (23%). O estudo

mostrou resultados promissores da doxiciclina a 10% em gel de natrosol em relação ao reparo ósseo e, de acordo com os autores, a associação deste antibiótico com materiais de enxerto poderia ser considerado e investigado uma vez que pode trazer o benefício do suporte do material de enxerto para a liberação do fármaco.

Neste mesmo estudo, a utilização do gel de natrosol como veículo para a doxiciclina foi proposta por Silva et al. (2015). O gel de natrosol (hidroxietil celulose) é um agente inerte e solúvel em água, amplamente utilizado como base e espessante para shampoos e sabonetes (MIYAMOTO et al., 1989). Esta substância têm sido frequentemente utilizada como base para o gluconato de clorexidina (DAMETTO et al., 2005; FERRAZ et al., 2001).

Os efeitos clínicos da doxiciclina no processo de reabsorção óssea têm sido também amplamente estudados. Ciancio e Ashley (1998) verificaram que a administração de doses sub-antimicrobianas de doxiciclina em pacientes com periodontite resultava em aumento das inserções e diminuição na profundidade de sondagem. Resultados semelhantes foram verificados por Gapski et al. (2009) e Golub et al. (2008). Resultados favoráveis foram também encontrados por Buchter et al. (2004) para o tratamento de peri-implantite por meio da combinação de enxerto ósseo autógeno com polímero biodegradável contendo doxiciclina, denominado Atridox. Por outro lado, Eickholz et al. (2014) e Payne et al. (2007) não encontraram diferenças na profundidade de sondagem e na inserção clínica com a administração de doxiciclina em comparação com placebo.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do estudo foi avaliar, por meio de análise descritiva e histomorfométrica, o efeito da doxiciclina a 10% com gel de natrosol associada ao enxerto autógeno em relação ao reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos.

4 Material e métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nesta seção, será exposto todo o desenvolvimento técnico laboratorial científico do trabalho exposto na dissertação.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG pelo número 590/2014 (ANEXO A). Para o presente trabalho foram utilizados 50 (cinquenta) ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso de aproximadamente 500 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas coletivas higienizadas, com 1 (um) animal por gaiola, em ambiente com temperatura 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 período experimental. Os animais foram aleatoriamente divididos em 5 (cinco) grupos experimentais, conforme o material a ser implantado, de 10 (dez) animais para cada grupo. Os animais foram subdivididos em períodos de 4 e 8 semanas, sendo 5 (cinco) animais para cada período por grupo (Tabela 1).

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

Grupo	Material	Nº total de animais	Nº de animais 4 semanas	Nº de animais 8 semanas
CO	Coágulo (controle)	10	5	5
DOX	Doxiciclina a 10% com gel de Natrosol	10	5	5
NAT	Natrosol	10	5	5
OA	Osso autógeno	10	5	5
OA + DOX	Osso autógeno + Doxiciclina a 10% com gel de Natrosol	10	5	5

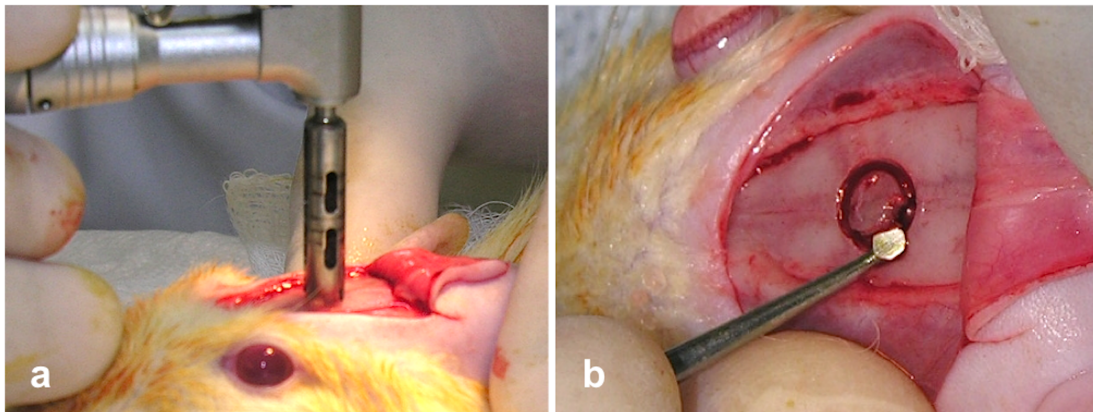
Fonte: Do autor.

4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados com associação de cloridrato de quetamina (70 mg/kg), solução anestésica, e cloridrato de xilazina (6 mg/kg), solução sedativa e relaxante muscular, por via intramuscular na face posterior da coxa. Após a anestesia, foi realizada a tricotomia da região frontoparietal dos animais e antisepsia com álcool iodado a 1% com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo. Em seguida foi realizada uma incisão em “U” na região mediana da calvária, com uma lâmina de bisturi nº 15. A incisão atingiu o perióstio, permitindo o deslocamento de um retalho de espessura total em direção posterior. Uma cavidade com 5 mm de diâmetro foi preparada na calvária com broca trefina, sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Figura 1). A profundidade da cavidade foi o suficiente para transpassar a espessura óssea da diploe e expor as meninges do fundo da cavidade. Foram feitas marcações em formato de “L” com broca

diamantada sob refrigeração a 2 mm anterior e 2 mm posterior das margens do defeito cirúrgico, sendo preenchidas com amálgama (Figura 2). O objetivo das marcações foi permitir a identificação das margens ósseas originais (MESSORA et al., 2008).

Figura 1 – Cirurgia em calvária

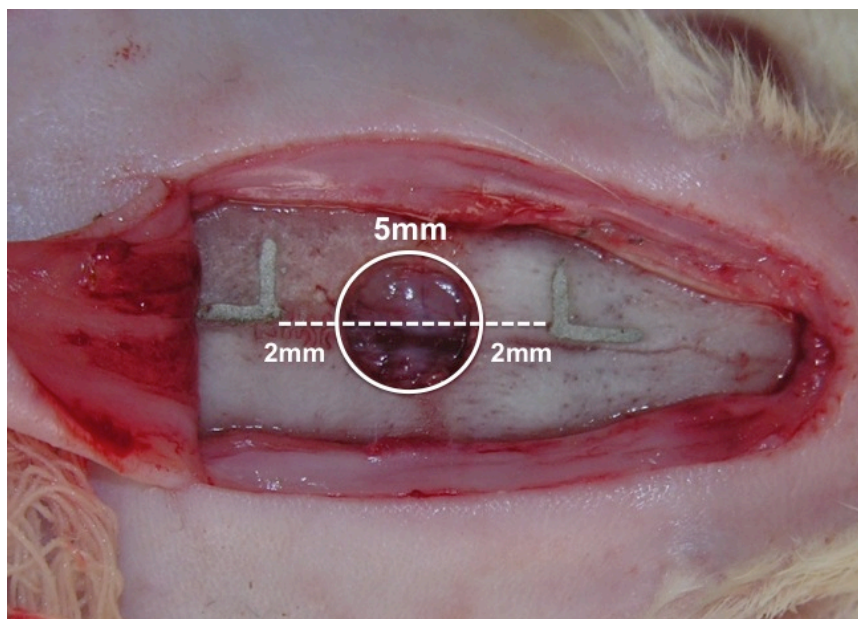


Fonte: Do autor.

Nota: (a) Confeção de cavidade em calvária com broca trefina.

(b) Remoção do osso da calota craniana.

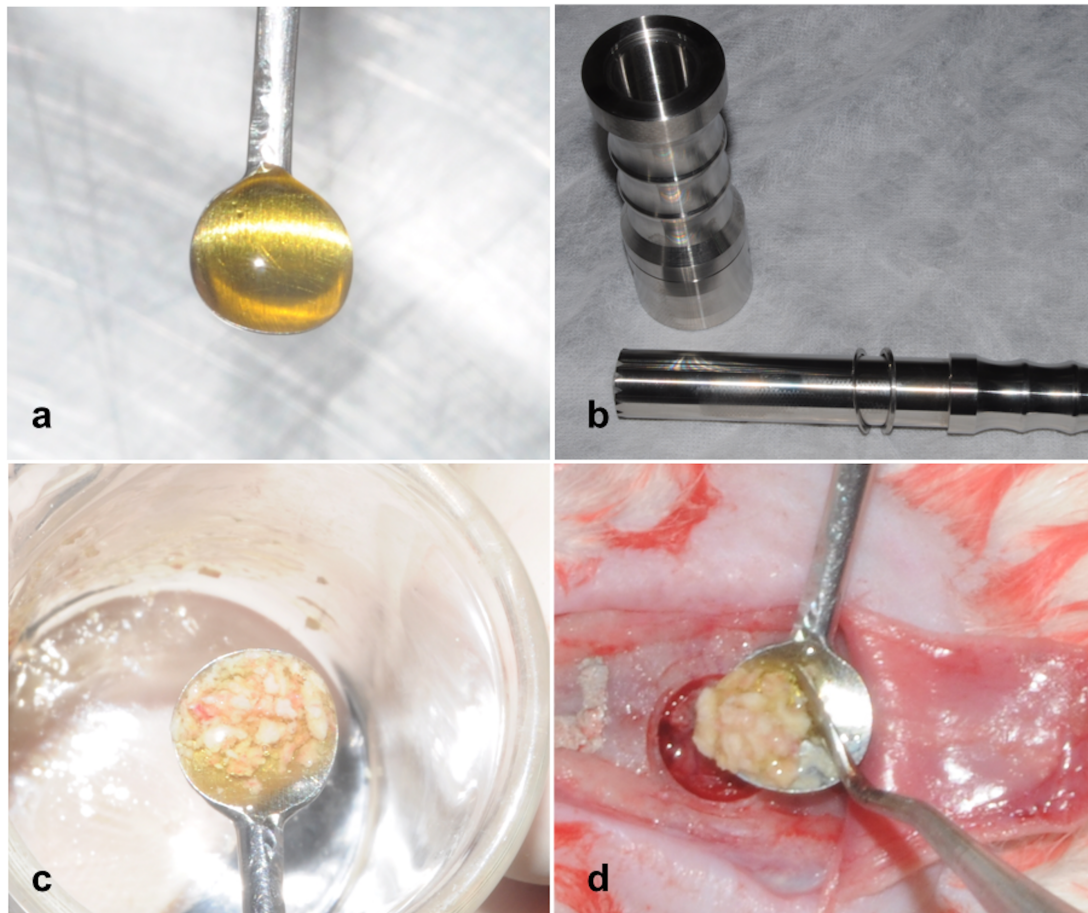
Figura 2 – Cavidade de 5mm de diâmetro com distância às marcações em amálgama correspondentes a 2mm de cada lado da margem do defeito.



Fonte: Do autor.

As cavidades foram preenchidas com os materiais conforme os grupos (Figura 3). O grupo controle foi deixado sem preenchimento da cavidade, de maneira a permitir a formação de um coágulo sanguíneo. No grupo com preenchimento com doxiciclina a 10% com gel de natrosol, um volume de 0,1mL do material manipulado foi inserido na cavidade com auxílio de um descolador Molt. No grupo contendo apenas gel de natrosol, um volume de 0,1mL do fármaco foi inserido diretamente na cavidade. Para o grupo em que as cavidades foram preenchidas com osso autógeno, o osso da calota craniana removido com a broca trefina foi triturado com auxílio de um triturador para osso e devolvido à cavidade. Para o grupo com preenchimento com doxiciclina a 10% com gel de natrosol associado ao osso autógeno, o mesmo foi triturado com triturador de osso e misturado a 0,1mL do fármaco e inserido na cavidade. Após o preenchimento das cavidades, as bordas das incisões foram suturadas com fio de seda 5-0.

Figura 3 – Materiais utilizados na cirurgia.



Fonte: Do autor.

Nota: (a) Instrumental Molt utilizado para preenchimento da cavidade com doxiciclina a 10% com gel de natrosol.

(b) Triturador de osso.

(c) Osso autógeno particulado associado à doxiciclina a 10% com gel de natrosol.

(d) Preenchimento da cavidade confeccionada na calvária de rato.

4.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após os períodos experimentais de 4 e 8 semanas, os animais foram mortos com inalação excessiva de CO₂. A região compreendendo o defeito cirúrgico foi removida e as peças fixadas em formol neutro a 10%, lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) a 18%. Em seguida, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram realizados cortes seriados no sentido longitudinal da peça com 6 µm de espessura, iniciados a partir do

centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pelas técnicas da Hematoxilina e Eosina (HE) para análise em microscopia óptica.

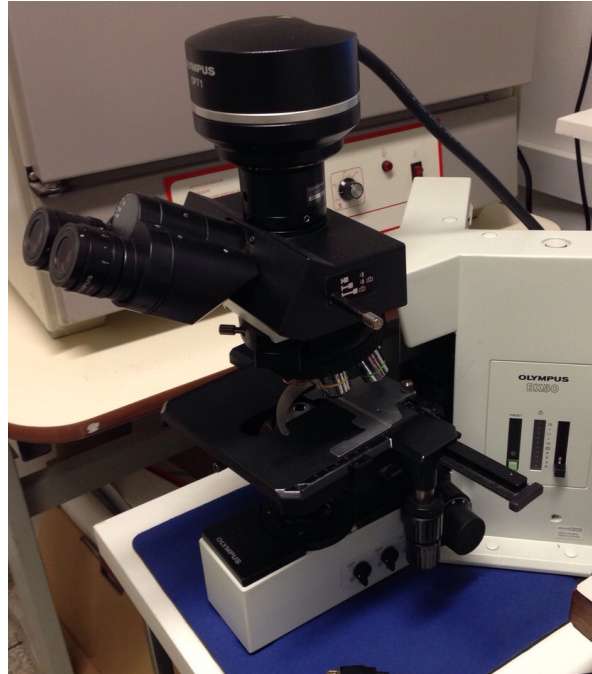
4.4 ANÁLISE DESCRITIVA E HISTOMORFOMÉTRICA

Os cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina foram avaliados morfológicamente de forma descritiva, qualitativamente em microscopia óptica (Olympus DP71, Tóquio, Japão), observando os seguintes aspectos:

- a) Qualidade e intensidade da reação inflamatória desenvolvida;
- b) Presença de fibroblastos e fibras colágenas;
- c) Intensidade e localização da angiogênese;
- d) Presença de tecido de granulação e formação de trabéculas ósseas;
- e) Tipo e qualidade do tecido formado no interior do defeito cirúrgico.

A análise histomorfométrica permitiu quantificar o tecido ósseo neoformado no interior do defeito ósseo cirurgicamente produzido nas calvárias dos animais. As análises histomorfométricas foram realizadas por um único examinador, em esquema cego, para o tipo de tratamento realizado. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Olympus DP71, Tóquio, Japão) acoplada a um microscópio óptico binocular (Olympus BX50, Tóquio, Japão) com um aumento original de 4x (lente objetiva N, Olympus) e salvas em um computador (Figura 4).

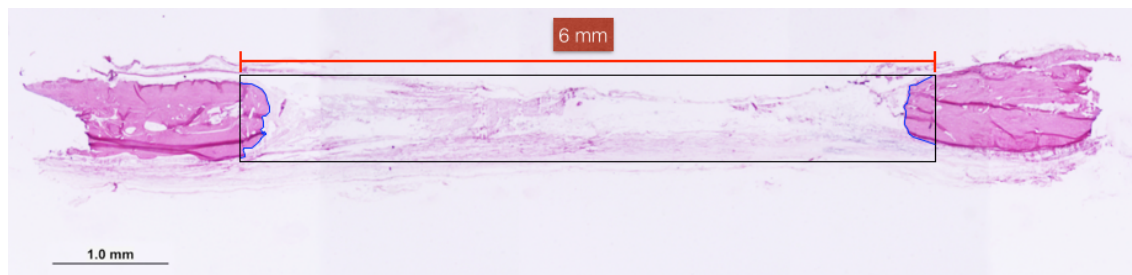
Figura 4 – Microscópio óptico com câmera digital acoplada utilizado nas análises descritiva e histomorfométrica.



Fonte: Do autor.

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. A área total do defeito cirúrgico confeccionado foi mensurada em mm^2 baseando-se nas margens direita e esquerda, seguindo as marcações confeccionadas estabelecidas pelas distâncias pré-mensuradas. Foi estabelecido um comprimento de 5mm para o defeito cirúrgico somado a 1mm decorrente de oscilação da trefina, totalizando 6mm de comprimento. A altura da área total foi determinada de acordo com a espessura da calota craniana (Figura 5). A área de osso neoformado presente na região delimitada na área total foi mensurada em mm^2 e convertida em porcentagem de área de novo osso em relação à área total do defeito cirúrgico (Figura 5).

Figura 5 – Análise histomorfométrica.



Fonte: Do autor.

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

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism 5. Os dados quantitativos foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov para verificação de distribuição normal. Para todos os testes foi considerado o nível de significância de 5%. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, estando dentro da curva de distribuição normal, também submetidos ao teste Tukey a 5% de significância.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Os resultados das análises descritivas e histomofométricas após os períodos de 4 e 8 semanas estão apresentados a seguir:

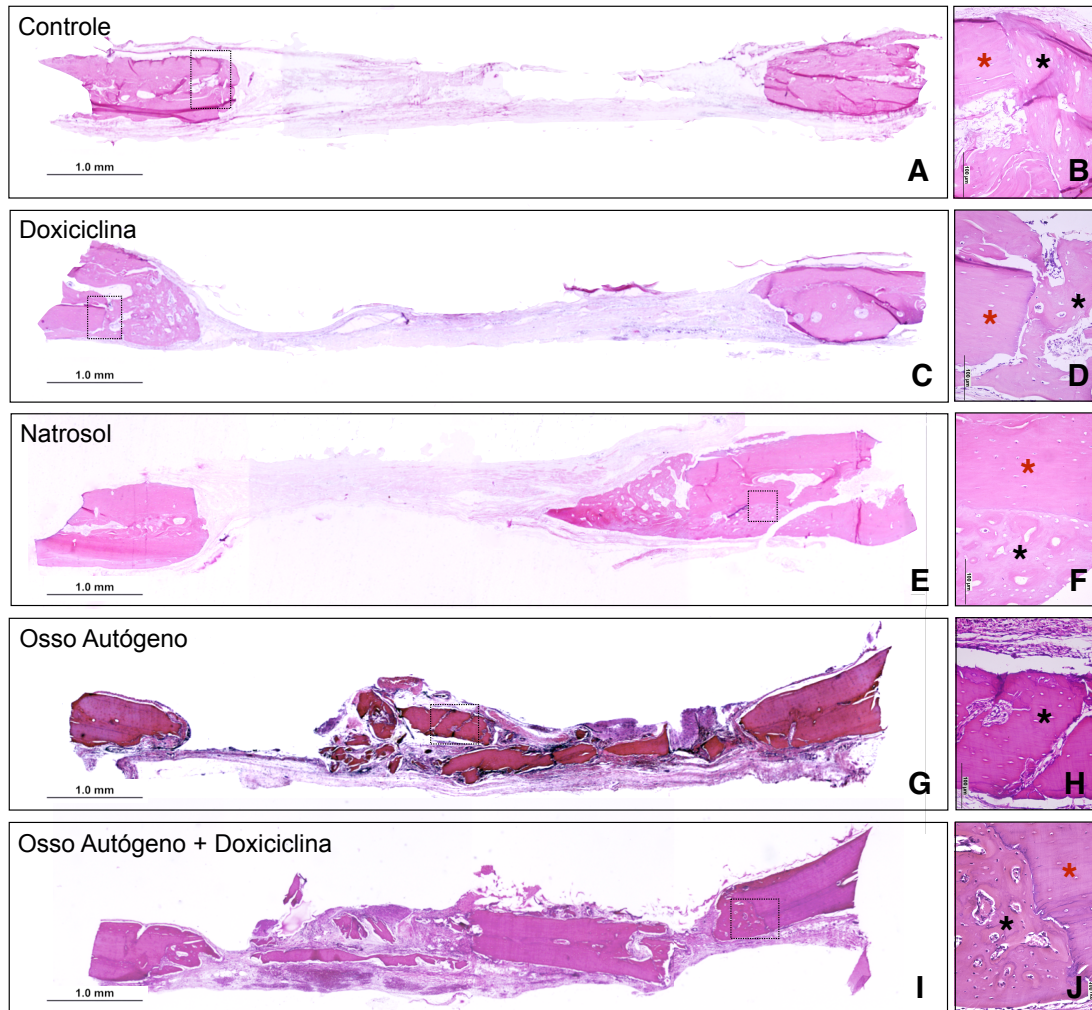
5.1 ANÁLISE DESCRITIVA

A imagem microscópica de cortes representativos dos espécimes de cada grupo nos períodos de 4 e 8 semanas são apresentados nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

5.1.1 4 Semanas

A análise microscópica dos cortes das calvárias dos espécimes dos grupos estudados no período de 4 semanas mostrou neoformação óssea nas bordas do defeito cirúrgico em sentido ao centro do defeito. O tecido ósseo neoformado apresentava um aspecto menos denso e mais vascularizado em relação ao osso nativo da calvária, permitindo a diferenciação da interface osso neoformado/nativo (Figura 6B, D, F, H e J). A neoformação tecidual foi discreta e restrita às margens do defeito para os grupos CO, DOX e NAT (Figura 6A, C, E). Os grupos OA e OA + DOX apresentaram uma neoformação óssea mais evidente. Nos espécimes destes grupos foi verificada a presença de partículas de osso autógeno circunscritas por tecido conjuntivo na região correspondente ao centro do defeito (Figura G e I).

Figura 6 – Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 4 semanas.



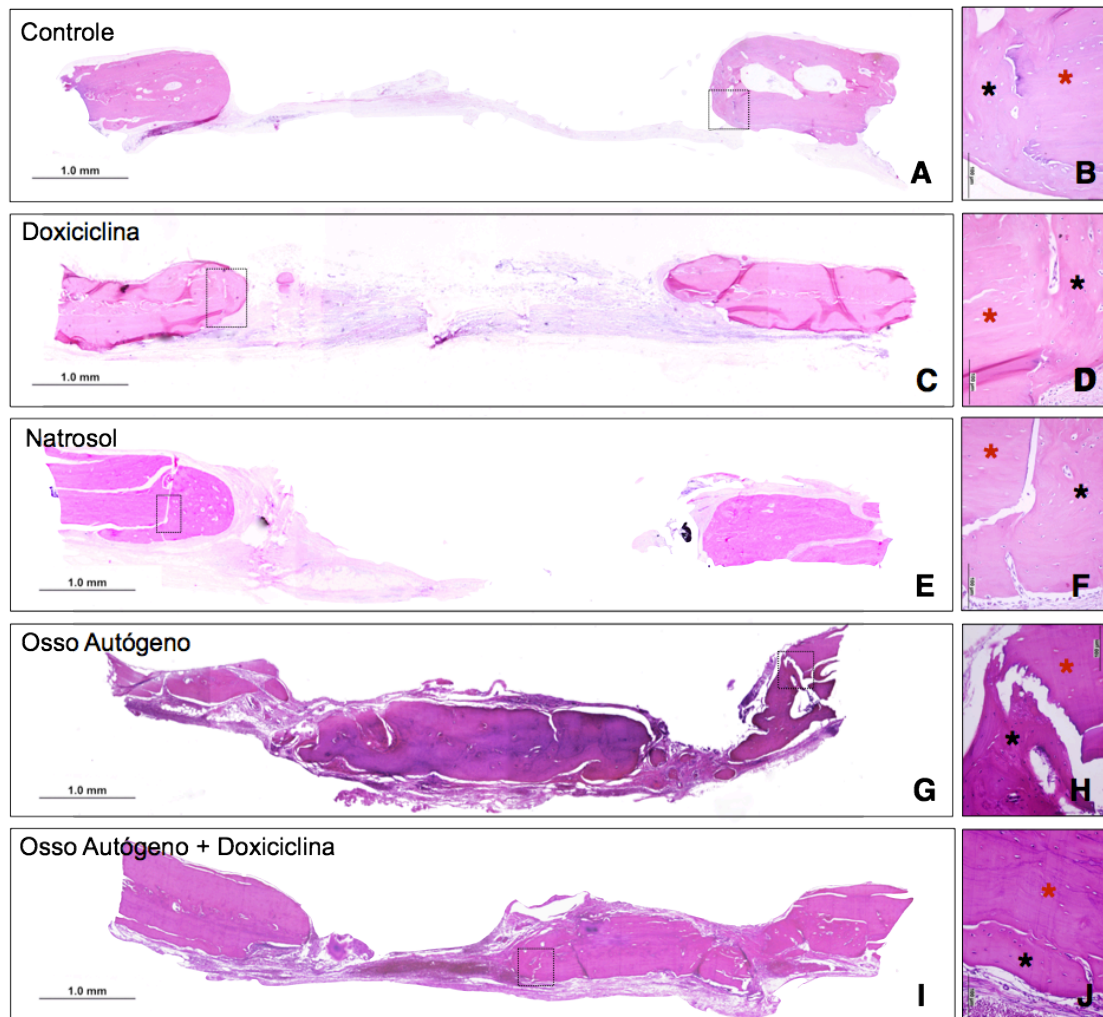
Fonte: Do autor.

Nota: É possível observar uma neoformação óssea discreta restrita às margens do defeito para os grupos CO (A), DOX (C) e NAT (E). Nas imagens de maior aumento (B, D, F e J) é possível notar a região de interface entre o osso nativo (asterisco vermelho) e o osso neoformado (asterisco preto). Maior porcentagem de osso neoformado pode ser observado nos grupos OA (G) e OA + DOX (I). Partículas de osso autógeno (H - asterisco preto) são observadas no centro do defeito cirúrgico nestes grupos. O aspecto menos denso do tecido neoformado (asterisco preto) em relação ao tecido nativo (asterisco vermelho) pode ser evidenciado em maior aumento (B, D, F e J). (A, C, E, G e I) Objetiva de 4x. (B, D, F, H e J) Objetiva de 40x. Coloração HE.

5.1.2 8 Semanas

A análise microscópica dos espécimes dos respectivos grupos no período de 8 semanas mostrou neoformação de tecido ósseo nas margens do defeito cirúrgico com maior intensidade em relação ao período anterior. Neste período, os grupos CO, DOX e NAT apresentaram uma neoformação óssea discreta e limitada às bordas do defeito (Figura 7A, C e E). Os grupos OA e OA + DOX apresentaram uma alta porcentagem de neoformação óssea em relação ao período anterior. Novamente pôde-se observar, nestes grupos, a presença de osso particulado na porção correspondente ao centro do defeito cirúrgico (Figura 7G e I).

Figura 7 – Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Nota: Nas imagens em aumento de 4x, é possível observar neoformação óssea mais evidente em relação ao período de 4 semanas. Nos grupos CO (A), DOX (C) e NAT (E) é possível notar neoformação óssea menos evidente em comparação com os espécimes dos grupos OA (G) e OA + DOX (I). Nas imagens em maior aumento (B, D, F, H e J) visualiza-se a região de interface entre o osso nativo (asterisco vermelho) e o osso neoformado (asterisco preto). (A, C, E, G e I) Objetiva de 4x. (B, D, F, H e J) Objetiva de 40x. Coloração HE.

5.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A média, o desvio padrão e as diferenças estatísticas da percentagem de neoformação óssea no período de 4 semanas estão representados na Tabela 2 e na Figura 8. A análise histomorfométrica dos espécimes mostrou que no período de 4 semanas o grupo OA + DOX apresentou a maior percentagem de neoformação óssea ($38,59 \pm 3,09$). Houve diferença estatisticamente significativa entre este grupo em relação ao CO e ao NAT, que apresentaram os menores valores ($19,52 \pm 4,36$ e $15,94 \pm 6,67$, respectivamente) ($p < 0,05$). Nas demais comparações não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

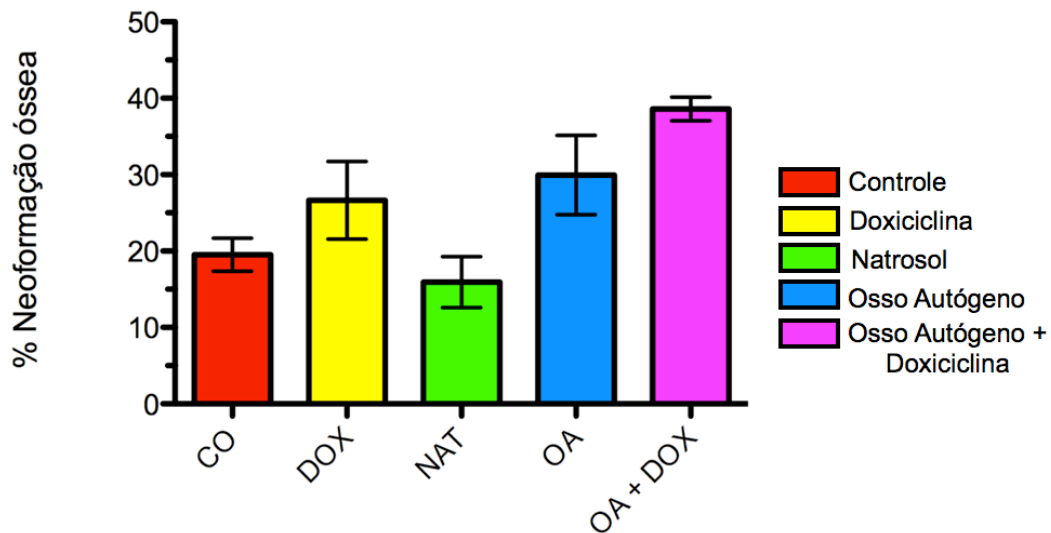
Tabela 2 – Média e desvio padrão da percentagem de área correspondente ao osso neoformado nas margens do defeito cirúrgico nos respectivos grupos estudados nos períodos de 4 e 8 semanas.

Grupo	4 semanas	8 semanas
CO	$19,52 \pm 4,36^{aA}$	$18,80 \pm 9,32^{acA}$
DOX	$26,65 \pm 10,18^{abA}$	$22,05 \pm 2,98^{acA}$
NAT	$15,94 \pm 6,67^{aA}$	$15,89 \pm 4,91^{cA}$
OA	$29,95 \pm 10,39^{abA}$	$43,46 \pm 19,46^{abA}$
OA + DOX	$38,59 \pm 3,09^{bA}$	$47,86 \pm 13,96^{bA}$

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 ($p < 0,05$).

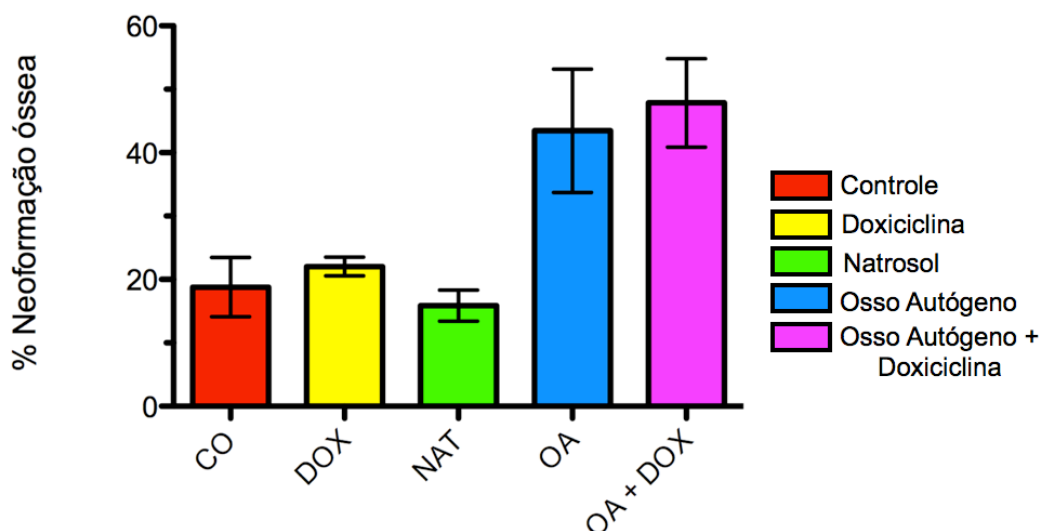
Figura 8 – Média e desvio padrão dos grupos avaliados no período de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

A média, o desvio padrão e as diferenças estatísticas da porcentagem de neoformação óssea no período de 8 semanas estão representados na Tabela 2 e na Figura 9. Os maiores valores de neoformação óssea foram verificados para o grupo OA + DOX ($47,86 \pm 13,96$) enquanto os menores para o grupo NAT ($15,89 \pm 4,91$). O grupo OA + DOX apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos CO, NAT e DOX ($p < 0,05$). Houve diferença estatística também entre os grupos OA e NAT ($p < 0,05$).

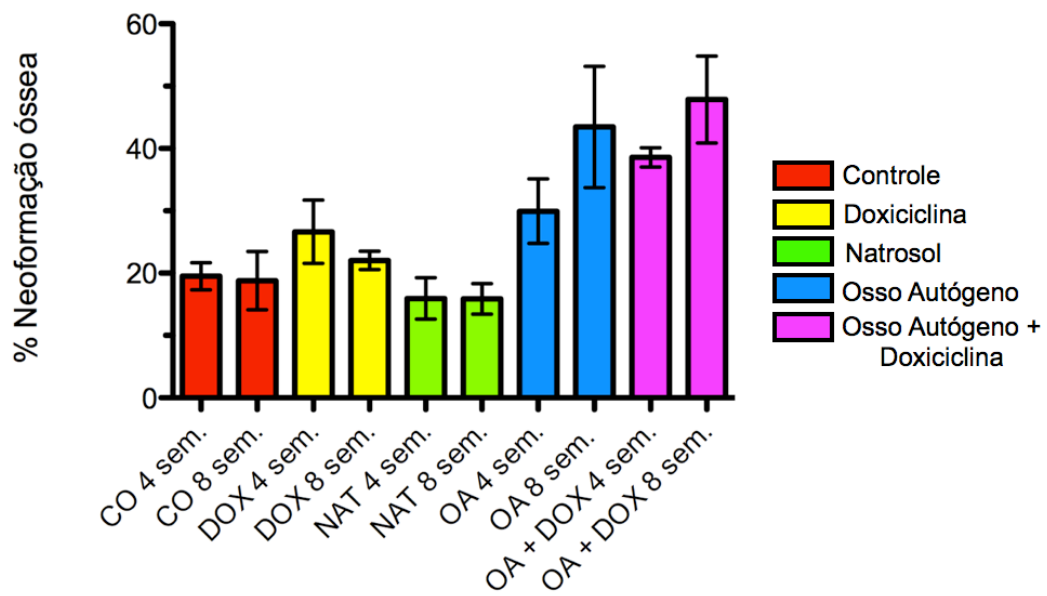
Figura 9 – Média e desvio padrão dos grupos avaliados no período de 8 semanas.



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 10. 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 para os grupos OA e OA + DOX. Os demais grupos apresentaram uma redução da porcentagem de neoformação óssea. Porém, o aumento ou a redução verificada para os grupos não foi estatisticamente significativa para nenhum dos grupos estudados ($p > 0,05$).

Figura 10 – Média e desvio padrão dos grupos avaliados nos períodos de 4 e 8 semanas.



Fonte: Do autor.

6 *Discussão*

6 DISCUSSÃO

O estudo teve como objetivo avaliar a associação da doxiciclina a 10% em gel de natrosol com osso autógeno particulado no reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico confeccionados em calvária de ratos. O reparo de defeitos ósseos extensos sempre foi um desafio para a cirurgia (BREINE; BRANEMARK, 1980; SPICER et al., 2012). A velocidade de neoformação óssea, menor em relação ao tecido conjuntivo, constitui um obstáculo ao processo de neoformação tecidual. Isto ocorre pois, em grande parte dos casos, há a formação de tecido fibroso na região do defeito, impedido o completo reparo com tecido ósseo (GOSAIN et al., 2003; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Para a avaliação do reparo ósseo é fundamental obter um sítio cirúrgico que forneça alguns fatores favoráveis à análise. Tais fatores são as dimensões adequadas para simular um defeito crítico, uma localização em que não haja interferências externas como carga mecânica e movimentações, e osso que envolva porção cortical e medular (CESTARI, 2009; GOMES; FERNANDES, 2011; GOSAIN et al., 2003).

Diversos modelos de estudo têm sido utilizados para avaliar o reparo ósseo como alvéolos dentários de ratos e tibia de coelhos (CARVALHO et al., 1997; WALSH et al., 2008). Porém, tais modelos de estudo apresentam dificuldade de padronização do tamanho do defeito, dificuldade para se obter um defeito sem capacidade de reparo espontâneo e interferência no reparo devido à carga mecânica a que as regiões são submetidas (CESTARI, 2009). A calvária de rato tem sido um sítio cirúrgico amplamente utilizado na avaliação da neoformação óssea (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; MESSORA et al., 2008). Neste modelo de estudo, um defeito é confeccionado no tecido ósseo com trefina com um diâmetro suficiente para não permitir o reparo ósseo espontâneo, havendo a necessidade de utilização de um material de enxerto para auxiliar no processo (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). As vantagens associadas a este modelo de estudo estão relacionadas primeiramente à espécie de animal

selecionada. Os animais utilizados nos estudos de reparo ósseo incluem uma ampla gama de mamíferos como cães e coelhos, porém roedores como ratos e camundongos oferecem vantagens distintas em relação aos demais. Os ratos são facilmente manipulados, menos onerosos em relação à sua manutenção e podem ser mantidos em grande número em um espaço limitado (CESTARI, 2009). Além disso, o ciclo reprodutivo é substancialmente mais curto, fornecendo animais suficientes para grandes grupos de estudo em uma quantidade razoável de tempo (HISTING et al., 2011). Outras vantagens deste modelo de estudo estão relacionadas à região utilizada para tal análise. A calvária apresenta uma área considerável de osso cortical e medular (CESTARI, 2009). A região é de fácil acesso cirúrgico, o que permite maior precisão na padronização dos defeitos. A calota apresenta pouca movimentação e carga mecânica, diminuindo as interferências da contração muscular no reparo e minimizando os riscos de fraturas ósseas, que comprometem a regeneração óssea (CESTARI, 2009; GOMES; FERNANDES, 2011). Além disso, a dura-máter é apontada como uma fonte de células mesenquimais indiferenciadas aptas a proliferarem e se diferenciarem em osteoblastos participando do processo de reparo da calvária (GOSAIN et al., 2003; WANG; GLIMCHER, 1999).

No estudo, defeitos com diâmetro de 5 mm foram confeccionados com broca trefina. Na literatura existe uma grande divergência em relação ao tamanho do defeito (HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990). É importante salientar que, independentemente do diâmetro selecionado, o fator determinante no sucesso da avaliação é a incapacidade do defeito de apresentar reparo ósseo espontâneo durante o período do experimento (GOSAIN et al., 2003). Diâmetros maiores que o utilizado no presente estudo são encontrados na literatura, variando de 6 a 10 mm (MESSORA et al., 2008; PATEL et al., 2008; SCHLEGEL et al., 2006; SILVA et al., 2015). Contudo, os resultados do estudo mostraram que nenhum dos defeitos se reparou por completo, mesmo no período de 8 semanas, demonstrando que o diâmetro de 5 mm foi suficiente para criar um defeito a ser considerado como de tamanho crítico.

Em relação ao método de análise, as avaliações histomorfométricas são amplamente preconizadas para avaliar a capacidade de neoformação

óssea (MESSORA et al., 2008; SILVA et al., 2015). A análise por meio do cálculo da área do defeito é um método bastante confiável pois permite calcular a área em que houve crescimento ósseo baseado na determinação do tamanho do defeito original (MELO et al., 2005; MESSORA et al., 2008; SILVA et al., 2015). Messora et al. (2008) propuseram uma metodologia de análise de defeitos em calvária que incluía a confecção de marcações em “L” em amálgama para pré-estabelecer distâncias em relação ao defeito, sendo tal metodologia seguida no presente estudo. É importante ressaltar que alguns aspectos da avaliação histomorfométrica foram realizados a fim de diminuir possíveis interferências nos resultados. Dentre eles, o cálculo da área total do defeito original foi realizado considerando a oscilação da trefina, resultando em um defeito de maior diâmetro que o da trefina, como reportado por Silva et al. (2015). Considerou-se um aumento de 1 mm no diâmetro total do defeito. Além disso, a espessura da calota foi considerada como a altura do defeito para o cálculo da área total do defeito original. Outro aspecto que facilitou a padronização dos defeitos foi o próprio sítio cirúrgico selecionado. Como mencionado anteriormente, a calota craniana oferece diversas vantagens em relação a demais sítios cirúrgicos, dentre elas a facilidade de acesso e uma ampla área para confecção de um defeito padronizado (CESTARI, 2009; MESSORA et al., 2008; SILVA et al., 2015).

No estudo, a substância derivada semi-sintética da tetraciclina, a doxiciclina, foi avaliada associada ou não ao osso autógeno no reparo ósseo em defeito de tamanho crítico. Inicialmente, as tetraciclinas foram utilizadas na Odontologia para o tratamento da doença periodontal devido às suas propriedades antimicrobianas (BAKER et al., 1983; SLOTS et al., 1979; SLOTS; ROSLING; GENCO, 1983). Posteriormente, com a descoberta de propriedades não relacionadas com a sua atividade antibacteriana, ampliaram as perspectivas terapêuticas deste fármaco. As propriedades anti-inflamatórias, a capacidade de promover a ligação entre o tecido conjuntivo e a superfície dentária e a inibição de metaloproteinases de matriz (MMPs), que são enzimas colagenolíticas responsáveis pela degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea, foram algumas das propriedades encontradas para as tetraciclinas (GOLUB et al., 1983; PLEWIG; SCHOPF, 1975; TERRANOVA et al., 1986).

A capacidade das tetraciclina, incluindo a doxiciclina, de inibir as MMPs e colagenases impulsionaram estudos relacionados ao tecido ósseo (BETTANY; WOLOWACZ, 1998; BETTANY et al., 2000; SILVA et al., 2015). A doxiciclina apresenta capacidade de inibição de enzimas colagenases (responsáveis pela degradação de tecido conjuntivo e reabsorção óssea), inibição da osteoclastogênese e indução da apoptose de osteoclastos (BETTANY; WOLOWACZ, 1998; FRANCO et al., 2011; GOLUB et al., 1983). Tais características são extremamente relevantes tratando-se de reparo tecidual ósseo. No estudo, a doxiciclina foi utilizada na concentração de 10%. Baixas doses de doxiciclina apresentam um resultado favorável na diferenciação de células osteoprogenitoras (GOMES; FERNANDES, 2007; PARK, 2012). Além disso, a concentração de 10% apresenta um efeito não citotóxico em osteoblastos, permitindo a sua diferenciação e maturação (ALMAZIN et al., 2009). Concentração semelhante de doxiciclina foi avaliada anteriormente por Silva et al. (2015) em relação ao reparo de defeitos em calvária de ratos, apresentando resultados favoráveis.

No estudo, a doxiciclina foi aplicada isoladamente no defeito ou associada ao osso autógeno. A doxiciclina utilizada isoladamente apresentou uma porcentagem de neoformação óssea inferior (26,65% e 22,05% em 4 e 8 semanas, respectivamente) ao verificado para os grupos em que o osso autógeno foi utilizado nos dois períodos avaliados (29,95% OA e 38,59% OA + DOX em 4 semanas e 43,46% OA e 47,86% OA + DOX em 8 semanas). Tais dados sugerem que a sua utilização isolada não apresenta um resultado tão favorável como aquele encontrado no grupo em que a doxiciclina foi associada ao enxerto ósseo. Um fator a ser considerado é que no caso da aplicação da doxiciclina isoladamente, o reparo ósseo fica exclusivamente às expensas do tecido ósseo nativo, ou seja, presente nas margens do defeito, o que em casos de defeitos extensos dificulta o reparo em sua extensão, em comparação com a utilização de enxertos. Sem a presença de um arcabouço para auxiliar na neoformação óssea, o processo de reparo torna-se mais difícil (SILVA et al., 2015). Neste caso, o tecido conjuntivo do retalho entra em contato com o centro do defeito, interferindo na neoformação óssea no local. Já na comparação com o grupo controle (19,52% em 4 semanas e 18,80% em 8 semanas), em que o reparo ocorreu apenas por meio de

coágulo sanguíneo, a doxiciclina apresentou valores elevados (26,65% em 4 semanas e 22,05% em 8 semanas), indicando que houve um efeito no reparo ósseo.

Outra substância avaliada no estudo foi o gel de natrosol. A doxiciclina foi utilizada na concentração de 10% e o gel de natrosol foi utilizado como veículo como proposto por Silva et al. (2015). O gel de natrosol (hidroxiethyl celulose) é um agente inerte e solúvel em água (DAMETTO et al., 2005; FERRAZ et al., 2001; MIYAMOTO et al., 1989). Sendo esta uma substância inerte, supôs-se que não haveria ação nenhuma no reparo tecidual. Os resultados mostraram que os espécimes em que o gel de natrosol foi utilizado para preencher as calotas, a porcentagem de neoformação óssea foi inferior (15,94% e 15,89% em 4 e 8 semanas, respectivamente) aos espécimes do grupo da doxiciclina nos períodos de 4 e 8 semanas (26,65% e 22,05% em 4 e 8 semanas, respectivamente). Este resultado sugere que o natrosol atua como uma substância inerte e que a doxiciclina é o componente indutor da neoformação óssea. Tais resultados corroboram com os encontrados por Silva et al. (2015), em que o reparo ósseo nos defeitos tratados com natrosol foi significativamente menor em relação aos defeitos em que a doxiciclina foi aplicada.

Como material de enxerto, foi avaliado o osso autógeno, sendo este associado ou não à doxiciclina a 10% em gel de natrosol. Ainda atualmente, o osso autógeno é considerado o padrão ouro como material para osteogênese (BLOCK; KENT, 1997; MISCH, 2010). Uma literatura extensa relata resultados favoráveis no reparo ósseo com a sua utilização (BLOCK; KENT, 1997; RESTOY-LOZANO et al., 2015). Defeitos extensos necessitam de um grande volume de enxerto para auxiliar no reparo. Neste sentido, a utilização do osso autógeno é limitada devido à disponibilidade, às vezes, restrita da área doadora de osso (BRODIE et al., 2005; KESKIN et al., 2008). Além disso, o inconveniente associado com a sua obtenção é a necessidade de acesso cirúrgico em uma área doadora, gerando desconfortos, o que ainda torna-se um fator que pode levar à utilização de biomateriais para substituí-lo (TATULLO et al., 2012).

Os resultados mostraram que a associação da doxiciclina a 10% com gel de natrosol com o osso autógeno foi capaz de elevar a porcentagem de

neoformação óssea nos defeitos de tamanho crítico tanto no período de 4 quanto de 8 semanas. Diferenças estatísticas foram encontradas entre este grupo (38,59%) e o controle (19,52%) e natrosol (15,94%) no período de 4 semanas e entre este grupo (47,86%) e o controle (18,80%), doxiciclina (22,05%) e natrosol (15,89%) no período de 8 semanas. Em relação ao grupo em que o osso autógeno foi utilizado isoladamente, a menor porcentagem de neoformação óssea verificada, embora não tenha sido estatisticamente significativa, sugere que a associação com a doxiciclina aumentou a capacidade de reparo do osso autógeno, como sugerido por Silva et al. (2015). Os processos específicos que levam a este aumento provavelmente estão relacionados às propriedades da doxiciclina de inibição de osteoclastogênese e indução da apoptose de osteoclastos (BETTANY; WOLOWACZ, 1998; FRANCO et al., 2011; GOLUB et al., 1983; SILVA et al., 2015). Os resultados encontrados corroboram com os relatos na literatura (BUCHTER et al., 2004; CIANCIO; ASHLEY, 1998; GAPSKI et al., 2009; GOLUB et al., 2008). Os resultados sugerem também que a atuação do osso autógeno na osteocondução, ou seja, como um arcabouço durante a neoformação óssea permitindo a infiltração de vasos sanguíneos, migração celular e manutenção do espaço, ampliou o reparo tecidual em comparação com a utilização da doxiciclina isoladamente. Além disso, a associação com a doxiciclina pode ter atuado como uma conexão biológica entre as partículas do enxerto, aumentando a capacidade de regeneração tecidual (SILVA et al., 2015).

As perspectivas da utilização terapêutica da doxiciclina para auxiliar no processo de reparo ósseo são amplas (BUCHTER et al., 2004; GAPSKI et al., 2009; SILVA et al., 2015). O estudo permitiu verificar uma ação da doxiciclina a 10% em gel de natrosol no reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico. Como mencionado anteriormente, defeitos ósseos extensos não possuem capacidade de reparar-se completamente sem o auxílio de um biomaterial (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986). A atividade da doxiciclina em associação com o osso autógeno foi bastante promissora para a neoformação óssea deste tipo de defeito, corroborando com o estudo anteriormente realizado por Silva et al. (2015). Embora haja diversos estudos que comprovem a eficácia da doxiciclina como inibidor de osteoclastogênese

e collagenases, e indutor de apoptose osteoclástica, a necessidade de mais estudos se faz fundamental para demonstrar sua ação em diferentes modalidades terapêuticas e se a associação da doxiciclina com diferentes materiais de enxerto são também favoráveis ao reparo ósseo (BETTANY; WOLOWACZ, 1998; BETTANY et al., 2000; GOLUB, et al. 1983; HOLMES et al., 2004; SILVA et al., 2015).

7 Conclusão

7 CONCLUSÃO

Por meio de análise descritiva e histomorfométrica, os resultados do estudo permitem concluir que a associação da doxiciclina a 10% em gel de natrosol com osso autógeno (OA + DOX) induz um aumento significativo na taxa de neoformação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos após um período de 4 e 8 semanas (38,59% e 47,86%, respectivamente), em relação aos defeitos não preenchidos (CO - 19,52% e 18,80% em 4 e 8 semanas, respectivamente) e preenchidos com doxiciclina a 10% em gel de natrosol (DOX - 26,65% e 22,05% em 4 e 8 semanas, respectivamente) e gel de natrosol (NAT - 15,94% e 15,89% em 4 e 8 semanas, respectivamente).

Referências

REFERÊNCIAS

- ADORNATO, M. C.; MORCOS, I.; ROZANSKI, J. The treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws with bone resection and autologous platelet-derived growth factors. **The Journal of the American Dental Association**, v. 138, n. 7, p. 971-977, 2007.
- AL-ALI, W.; BISSADA, N. F.; GREENWELL, H. The effect of local doxycycline with and without tricalcium phosphate on the regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 60, n. 10, p. 582-590, 1989.
- ALBREKTSSON, T. Direct bone anchorage of dental implants. **Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 50, n. 2, p. 255-261, 1983.
- ALMAZIN, S. M. et al. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 6, p. 999-1005, 2009.
- BAKER, P. J. et al. Tetracycline and its derivatives strongly bind to and are released from the tooth surface in active form. **Journal of Periodontology**, v. 54, n. 10, p. 580-585, 1983.
- BARRILLEAUX, B. et al. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 11, p. 3007-3019, 2006.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 371, p. 10-27, 2000.
- BETTANY, J. T.; WOLOWACZ, R. G. Tetracycline derivatives induce apoptosis selectively in cultured monocytes and macrophages but not in mesenchymal cells. **Advances in Dental Research**, v. 12, n. 2, p. 136-143, 1998.
- BETTANY, J. T. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, n. 1, p. 75-80, 2000.

BEUSCHER, H. U. et al. Transition from interleukin 1 beta (IL-1 beta) to IL-1 alpha production during maturation of inflammatory macrophages in vivo. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 6, p. 1793-1797, 1992.

BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 613-616, 2002.

BLACK J. **Composition and structure of bone**. New Jersey: Summit, 1991.

BLOCK, M. S.; KENT, J. N. Sinus augmentation for dental implants: the use of autogenous bone. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 55, n. 11, p. 1281-1286, 1997.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BREINE, U.; BRANEMARK, P. I. Reconstruction of alveolar jaw bone. An experimental and clinical study of immediate and preformed autologous bone grafts in combination with osseointegrated implants. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 14, n. 1, p. 23-48, 1980.

BRODIE, J. C. et al. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 73, n. 4, p. 409-421, 2005.

BUCHTER, A. et al. Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomised controlled trial. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, n. 5, p. 439-444, 2004.

BUCKWALTER, J. A. et al. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. **Instructional Course Lectures**, v. 45, p. 371-386, 1996.

BURNS, F. R. et al. Inhibition of purified collagenase from alkali-burned rabbit corneas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 30, n. 7, p. 1569-1575, 1989.

BUSER D. **20 anos de regeneração óssea guiada na Implantodontia**. 2

ed. São Paulo: Quintessence, 2010.

CARVALHO, T. L. et al. Histologic and histometric evaluation of rat alveolar wound healing around polyurethane resin implants. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 26, n. 2, p. 149-152, 1997.

CESTARI, T. M. **Aspectos celulares, teciduais e moleculares da osteogênese ectópica e ortotópica induzida pela matriz alogênica óssea e dentinária**. 2009. 369f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2009.

CHANG, C. Y.; YAMADA, S. Evaluation of the regenerative effect of a 25% doxycycline-loaded biodegradable membrane for guided tissue regeneration. **Journal of Periodontology**, v. 71, n. 7, p. 1086-1093, 2000.

CIANCIO, S.; ASHLEY, R. Safety and efficacy of sub-antimicrobial-dose doxycycline therapy in patients with adult periodontitis. **Advances in Dental Research**, v. 12, n. 2, p. 27-31, 1998.

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.

DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **Journal of Neurosurgery**, v. 74, n. 3, p. 487-491, 1991.

DAMETTO, F. R. et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 99, n. 6, p. 768-772, 2005.

DOUGALL, W. C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. **Genes & Development**, v. 13, n. 18, p. 2412, 2424, 1999.

DZIAK R. Biochemical and molecular mediators of bone metabolism. **Journal of Periodontology**, v. 64, n. 5, p. 407-415, 1993.

EICKHOLZ, P. et al. Enamel matrix derivative in propylene glycol alginate for treatment of infrabony defects with or without systemic doxycycline: 12- and 24-month results. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 5, p. 669-675, 2014.

FERRAZ, C. C. et al. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. **Journal of Endodontics**, v. 27, n. 7, p. 452-455, 2001.

FISHERO, B. A. et al. Current concepts of bone tissue engineering for craniofacial bone defect repair. **Craniofacial Trauma & Reconstruction**, v. 8, n. 1, p. 23-30, 2015.

FOX, S. M.; MACHON, R. G.; BURBIDGE, H. M. Allo-implant reconstruction of a femoral fracture following osteomyelitis. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 39, n. 3, p. 99-104, 1991.

FRANCO, G. C. 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.

GAPSKI, R. et al. Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 2, p. 149-156, 2009.

GAZDAG, A. R. et al. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 1995.

GOLUB, L. M.; GARANT, P. R.; RAMAMURTHY, N. S. Inflammatory changes in gingival collagen in the alloxan-diabetic rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 12, n. 5, p. 402-418, 1977.

GOLUB, L. M. et al. The effect of experimental diabetes on the molecular characteristics of soluble rat-tail tendon collagen. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 534, n. 1, p. 73-81, 1978.

GOLUB, L. M. et al. Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. **Journal of Periodontal Research**, v. 18, n. 5, p. 516-526, 1983.

GOLUB, L. M. et al. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. **Journal of Periodontal Research**, v. 25, n. 6, p. 321-330, 1990.

GOLUB, L. M. et al. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 732, p. 96-111, 1994.

GOLUB, L. M. et al. Subantimicrobial-dose doxycycline modulates gingival crevicular fluid biomarkers of periodontitis in postmenopausal osteopenic women. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1409-1418, 2008.

GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. **Archives of Oral Biology**, v. 52, n. 3, p. 251-259, 2007.

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, 2011.

GORDON, J. M. et al. Tetracycline: levels achievable in gingival crevice fluid and in vitro effect on subgingival organisms. Part I. Concentrations in crevicular fluid after repeated doses. **Journal of Periodontology**, v. 52, n. 10, p. 609-612, 1981.

GOSAIN, A. K. et al. Osteogenesis in calvarial defects: contribution of the dura, the pericranium, and the surrounding bone in adult versus infant animals. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 112, n. 2, p. 515-527, 2003.

GREVSTAD, H. J.; BOE, O. E. Effect of doxycycline on surgically induced osteoclast recruitment in the rat. **European Journal of Oral Sciences**, v. 103, n. 3, p. 156-159, 1995.

GROSS, T. S. et al. Strain gradients correlate with sites of periosteal bone formation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 12, n. 6, p. 982-988, 1997.

HELMRICH, U. et al. Osteogenic graft vascularization and bone resorption by VEGF-expressing human mesenchymal progenitors. **Biomaterials**, v. 34, n. 21, p. 5025-5035, 2013.

HERFORD, A. S.; BOYNE, P. J. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 4, p. 616-624, 2008.

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, 2011.

HOLLINGER, J.; WONG, M. E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 82, n. 6, p. 594-606, 1996.

HOLLINGER, J. O.; KLEINSCHMIDT, J. C. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 1, n. 1, p. 60-68, 1990.

HOLMES, S. G. et al. Chemically modified tetracyclines act through multiple mechanisms directly on osteoclast precursors. **Bone**, v. 35, n. 2, p. 471-478, 2004.

JACKSON, I. T.; HELDEN, G.; MARX, R. Skull bone grafts in maxillofacial and craniofacial surgery. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 12, p. 949-955, 1986.

KAPLAN, F. S. **Physical factors in bone remodeling**. New Jersey: Summit, 1991.

KESKIN, M. et al. Repairing critical-sized rat calvarial defects with a periosteal cell-seeded small intestinal submucosal layer. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 122, n. 2, p. 400-409, 2008.

KONG, Y. Y. et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, n. 6717, p. 315-323, 1999.

KUBLER, N. et al. Repair of human skull defects using osteoinductive bone alloimplants. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 23, n. 6, p. 337-346, 1995.

LEE H. M. et al. Specificity of the anti-collagenase activity of tetracyclines. **Journal of Dental Research**, v. 70, Special Issue, 1991.

LAZARIDES, A. et al. Custom facial reconstruction for osteosarcoma of the jaw. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 72, n. 11, p. 2375.e1-10, 2014.

LEKHOLM, U. et al. Soft tissue and marginal bone conditions at osseointegrated implants that have exposed threads: a 5-year retrospective study. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 11, n. 5, p. 599-604, 1996.

MANSON, P. N.; CRAWLEY, W. A.; HOOPES, J. E. Frontal cranioplasty: risk factors and choice of cranial vault reconstructive material. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 77, n. 6, p. 888-904, 1986.

MARX, C. W. et al. Do estrogens improve bone mineral density in osteoporotic women over age 65? **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 7, n. 11, p. 1275-1279, 1992.

MAVRAGANI, M.; BRUDVIK, P.; SELVIG, K. A. Orthodontically induced root and alveolar bone resorption: inhibitory effect of systemic doxycycline administration in rats. **European Journal of Orthodontics**, v. 27, n. 3, p. 215-225, 2005.

MELO, L. G. et al. Bone healing in surgically created defects treated with either bioactive glass particles, a calcium sulfate barrier, or a combination of both materials. A histological and histometric study in rat tibias. **Clinical Oral Implants Research**, v. 16, n. 6, p. 683-691, 2005.

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, 2008.

MISCH, C. M. Autogenous bone: is it still the gold standard? **Implant Dentistry**, v. 19, n. 5, p. 361, 2010.

MIYAMOTO, T. et al. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 23, n. 1, p. 125-133, 1989.

MIZUNO, A. et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 3, p. 610-615, 1998.

MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **Journal of Periodontal Research**, v. 26, n. 3 part. 2, p. 213-217, 1991.

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

PARK, J. B. Low dose of doxycycline promotes early differentiation of preosteoblasts by partially regulating the expression of estrogen receptors. **Journal of Surgical Research**, v. 178, n. 2, p. 737-742, 2012.

PATEL, Z. S. et al. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**, v. 43, n. 5, p. 931-940, 2008.

PAYNE, J. B. et al. Subantimicrobial dose doxycycline effects on alveolar bone loss in post-menopausal women. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 34, n. 9, p. 776-787, 2007.

PINHEIRO, A. L. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 21, n. 5, p. 301-306, 2003.

PLEWIG, G.; SCHOPF, E. Anti-inflammatory effects of antimicrobial agents: an in vivo study. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 65, n. 6, p. 532-536, 1975.

RAMAMURTHY, N. S.; ZEBROWSKI, E. J.; GOLUB, L. M. Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 9, n. 3, p. 199-206, 1974.

REICHERT, J. C. et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. **Biomaterials**, v. 30, n. 12, p. 2149-2163, 2009.

RESTOY-LOZANO, A. et al. Reconstruction of mandibular vertical defects for dental implants with autogenous bone block grafts using a tunnel approach: clinical study of 50 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, In Press, 2015.

SAWIN, P. D.; TRAYNELIS, V. C.; MENEZES, A. H. A comparative analysis of fusion rates and donor-site morbidity for autogeneic rib and iliac crest bone grafts in posterior cervical fusions. **Journal of Neurosurgery**, v. 88, n. 2, p. 255-265, 1998.

SCHLEGEL, K. A. et al. The monocortical critical size bone defect as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 102, n. 1, p. 7-13, 2006.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 205, p. 299-308, 1986.

SILVA, A. C. et al. Effect of Doxycycline in Gel Form in Regeneration Bone: Histomorphometric and Tomographic Study in Rats Calvary. **Journal of Periodontology**, v. 20, p. 1-17, 2015.

SLOTS, J. et al. Periodontal therapy in humans. I. Microbiological and clinical effects of a single course of periodontal scaling and root planing, and of adjunctive tetracycline therapy. **Journal of Periodontology**, v. 50, n. 10, p. 495-509, 1979.

SLOTS, J.; ROSLING, B. G.; GENCO, R. J. Suppression of penicillin-resistant oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with tetracycline. Considerations in endocarditis prophylaxis. **Journal of Periodontology**, v. 54, n. 4, p. 193-196, 1983.

SORSA, T. et al. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Periodontal Research**, v. 23, n. 6, p. 386-393, 1988.

SPICER, P. P. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1918-1929, 2012.

TATULLO, M. et al. Platelet Rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: clinical and histological evaluations. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 872-880, 2012.

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.

TRAJANO, V. C. C. **Avaliação da atividade osteogênica da doxiciclina em uma matriz de compósito biodegradável de poli (ε-caprolactona), poli (ácido lático-co-glicólico) e biocerâmica in vitro**. 2012. 155f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893-899, 1965.

VELICH, N. et al. Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 15, n. 1, p. 38-41, 2004.

WADA, T. et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 17-25, 2006.

WALSH, W. R. et al. Beta-TCP bone graft substitutes in a bilateral rabbit tibial defect model. **Biomaterials**, v. 29, n. 3, p. 266-271, 2008.

WANG, J.; GLIMCHER, M. J. Characterization of matrix-induced osteogenesis in rat calvarial bone defects: II. Origins of bone-forming cells. **Calcified Tissue International**, v. 65, n. 6, p. 486-493, 1999.

WOZNEY, J. M. et al. Growth factors influencing bone development. **Journal of Cell Science**, v. 13, p. 149-156, 1990.

YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in

experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 478-489, 2014.

ZIJDERVELD, S. A. et al. Maxillary sinus floor augmentation using a beta-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 20, n. 3, p. 432-440, 2005.

Anexo

ANEXO

ANEXO A – Cópia da Carta de aprovação do estudo no Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – 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



Alfenas, 17 de novembro de 2014.

Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Prezado Professor,

O projeto sob a sua coordenação, registrado sob o nº 590/2014, intitulado “Efeito da associação da doxiciclina com enxerto de osso autógeno particulado no reparo ósseo: estudo histomorfométrico em calvária de ratos”, com início previsto para 01/12/2014 e término previsto para 30/11/2015 foi apreciado e **Aprovado** pela CEUA-UNIFAL.

Após o término do projeto de pesquisa deverá ser enviado a CEUA um relatório final de protocolo de pesquisa. O prazo é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa.

Colocamo-nos a disposição para eventuais dúvidas.

Atenciosamente,

Estela R. Oliveira
Prof.^a Dr.^a Estela R. Oliveira
Presidente do 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 o Protocolo nº 590/2014, sob responsabilidade de Ronaldo Célio Mariano, referente ao projeto “Efeito da associação da doxiciclina com enxerto de osso autógeno particulado no reparo ósseo: estudo histomorfométrico em calvária de ratos” está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UNIFAL).

Alfenas, 17 de novembro de 2014.

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA-UNIFAL