



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas – MG
CEP 37.130-000 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299 - 1083



GIOVANNI ANTONIO NÍCOLI

**USO DE MEMBRANA DE POLIPROPILENO ASSOCIADA OU NÃO A
DOXICICLINA 10% OU OSSO BOVINO EM DEFEITO CRÍTICO DE RATAS
OVARIETOMIZADAS**

Alfenas/MG

2019

GIOVANNI ANTONIO NÍCOLI

**USO DE MEMBRANA DE POLIPROPILENO ASSOCIADA OU NÃO A
DOXICICLINA 10% OU OSSO BOVINO EM DEFEITO CRÍTICO DE RATAS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.

Linha de pesquisa: Bioengenharia de materiais odontológicos e reparação tecidual.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Paleari

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Alfenas/MG

2019

Nícoli, Giovanni Antonio.
N644a Uso de membrana de polipropileno associada ou não a doxiciclina 10%
ou osso bovino em defeito crítico de ratas ovariectomizadas / Giovanni
Antonio Nícoli. -- Alfenas/MG, 2019.
75 f. : il. –

Orientadora: André Gustavo Paleari.
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade
Federal de Alfenas, 2019.
Bibliografia.

1. Regeneração óssea. 2. Transplante ósseo. 3. Doxiciclina. I. Paleari,
André Gustavo. II. Título.

CDD-617.605



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL – MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Alfenas – MG
CEP 37.130-000 Fone: (35) 3299-1000 Fax: (35) 3299 - 1083



GIOVANNI ANTONIO NÍCOLI

AVALIAÇÃO DO REPARO ÓSSEO APÓS UTILIZAÇÃO DE MEMBRANA DE POLI-PROPILENO ASSOCIADA OU NÃO A DOXICICLINA 10% E OSSO BOVINO EM DEFEITO CRÍTICO DE RATAS OVARIETOMIZADAS: ESTUDO HISTOMÉTRICO E MICROTOMOGRAFICO.

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

Aprovado em: 03/06/19

Prof. Dr. André Gustavo Paleari
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: André Gustavo Paleari

Profª. Dra. Suzane Cristina Pigossi
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG

Assinatura: SP

Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de Uberlândia
UFU

Assinatura: Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

AGRADECIMENTOS

Á Deus;

Agradeço primeiramente a Deus, pelo direcionamento, coragem e energia para eu enfrentar mesmo após meus 38 anos, os desafios que a vida nos impõe. Colocando pessoas especiais ao meu lado para que eu sempre pudesse ver um caminho de soluções para todos os obstáculos.

Á minha família

As minhas filhas **Mariah e Valentina**, minhas fontes de inspiração e garra, vocês juntamente com sua mãe são para mim reservatório inesgotável de energia, tenho um amor incondicional por vocês. Tudo que faço é pensando no bem estar de vocês.

A minha querida e amada esposa **Naiana Viana Viola Nícoli**, professora desta distinta instituição de ensino superior, pessoa pela qual além do amor que eu tenho, tenho grande apreço e admiração profissional. Começamos nossa vida juntos e espero que nosso amor nos mantenha sempre unidos por todo sempre. Te amo !

Aos meus pais **Lila e Sílvio**, vocês me deram a oportunidade da vida, se sacrificaram, batalharam muito, abdicaram de tempo e de muitos sonhos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar para ter uma vida menos difícil do que a que tiveram no início da vida de vocês, não precisando passar por todas as dificuldades que vocês tiveram para vencer. Me ensinaram a trabalhar para melhorar a minha vida e principalmente a vida das outras pessoas que estão ao meu redor.

Ao meu grande companheiro, único irmão e professor de odontologia **Dr. Lélis Gustavo Nícoli**, pela amizade e parceria de sempre, pela cumplicidade em que tivemos ao longo de toda nossa vida, começamos pequeno e a cada dia estamos juntos crescendo e conquistando cada vez mais nosso espaço neste mundo tão exigente. Agradeço pelo apoio, incentivo, motivação e cumplicidade. Estamos juntos meu irmão!

À minha querida e saudosa secretária (*in memorian*) **Viviane Laudia Belarmino** pela parceria de sempre, pela dedicação e esforço no meu consultório enquanto eu cursava o mestrado. Deus sabia o quanto você era especial e lhe chamou precocemente para que ficasse ao seu lado em um plano superior, para de lá estar

nos abençoando e protegendo nas práticas da vida e da Odontologia. Muita gratidão por tudo que fez por mim e saudades eterna.

Á UNIFAL

Ao **Corpo docente do Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas** da **UNIFAL-MG** pelos valiosos ensinamentos que engradeceram minha formação profissional e pessoal.

Aos **colegas de turma**, pelas amizades construídas, alegrias compartilhadas. Em especial, gostaria de externar meus sentimentos aos amigos que fiz, Luis e Guilherme, meus fiéis escudeiros, companheiro inabaláveis nesta jornada de 2 anos mestrado. Compartilhamos angústias, ansiedades e sobretudo as dificuldades inerentes ao trabalho científico que desenvolvemos em conjunto. Vocês foram essenciais para conclusão de cada etapa do meu mestrado.

Aos **Funcionários da pós-graduação da UNIFAL-MG**, obrigado pela convivência agradável, pelo auxílio e acolhimento a todo momento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André, pessoa ímpar, companheiro das horas difíceis, incentivador e motivador incansável. Você foi de extrema importância para que esse trabalho pudesse ser concluído. Agradeço muito a Deus por ter colocado você no meu caminho, pessoa de bom senso, que me permitiu concluir o mestrado, sempre ouvindo e levando em consideração atentamente todos os meus pontos de vista. Que Deus esteja sempre ao seu lado! Muito grato por tudo!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ronaldo, agradeço pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência e dedicação em cada etapa do desenvolvimento desta pesquisa. Por ter aberto a mim, as portas do mestrado, me incentivando a enfrentar esse grande desafio.

Á UFU;

A Profa. Dra. Germana que me orientou em grande parte desse trabalho e que mesmo depois que se transferiu para Universidade Federal de Uberlândia (UFU) não me desamparou, continuando me orientando e até contribuindo com uma parceria entre a nossa Universidade e a UFU. Sou muito grato por tudo que fez por mim!

Ao professor Dr. João Adolfo Costa Hanemann, coordenador da pós-graduação, pelo apoio e incentivo. Por ter cedido o microscópio para que pudesse serem feitas as capturas histológicas.

Á empresa BoneHeal;

Representada pelo Prof. Munir, agradeço o apoio e confiança no fornecimento dos materiais estudados e confiar em nossa dedicação e seriedade para o desenvolvimento desta pesquisa.

RESUMO

Para realizar a reconstrução de defeitos ósseos críticos, especialmente em pacientes que apresentam distúrbios do metabolismo ósseo como a osteoporose, várias técnicas cirúrgicas e biomateriais têm sido desenvolvidos. O uso da membrana de polipropileno (*Bone Heal*®) associada a agentes osteoindutivos e/ou osteocondutivos como a Doxiciclina 10% e ao osso bovino podem promover uma adequada regeneração óssea em menor tempo clínico e com maior previsibilidade de sucesso em defeitos ósseos críticos. O objetivo desse estudo foi avaliar o uso isolado ou combinado da membrana não-reabsorvível de polipropileno (*Bone Heal*®) com gel de Doxiciclina 10% ou enxerto ósseo bovino sobre a regeneração óssea em defeitos críticos na calvária de ratas osteoporóticas. Foram utilizadas 105 ratas Wistar, após 16 semanas da cirurgia de ovariectomia foi confeccionado na calvária um defeito ósseo crítico de 6 mm. Os animais foram divididos em 7 grupos (n=15/grupo): Sham (controle positivo), OVX (controle negativo), OVX-MEMB (membrana *Bone Heal*®) OVX-BIO-MEMB (Bio-Oss e *Bone Heal*®); OVX-DOX-MEMB (Doxiciclina a 10%, e *Bone Heal*®); OVX-BIO (Bio-Oss) e OVX-DOX (Doxiciclina a 10%). Após os períodos experimentais de 4, 8 e 12 semanas foi realizada a eutanásia e a região correspondente ao defeito foi avaliado em relação ao volume de tecidos mineralizados (R-MTF) por meio de análise microtomográfica e a formação óssea que foi avaliada por análise histométrica. O teste de Kruskal-Wallis e o teste de Dunn foram utilizados para comparação entre os grupos nos diferentes períodos experimentais e dentro de cada grupo, variando-se os períodos experimentais. O software GraphPad Prism 6 foi utilizado para análise estatística ao nível de confiança de 95%. Na análise microtomográfica verificou no período de 4 semanas maiores valores R-MTF (%) no grupo OVX-MEMB em que OVX-DOX ($p < 0,05$). Na análise histométrica observou que o grupo OVX-BIO-MEMB apresentou maior quantidade de osso ($p < 0,05$) que o grupo OVX no período de 4 e 8 semanas de avaliação. Também foi verificado que o grupo OVX-DOX-MEMB no período de 4 semanas apresentou maior quantidade de tecido ósseo que o mesmo grupo no período de 12 semanas ($p < 0,05$). Conclui-se que, tanto a membrana de polipropileno, quanto Bio-Oss e Doxiciclina não apresentam diferença na regeneração óssea de ratas osteoporóticas, se comparadas ao coágulo sanguíneo. Além disso, a utilização de membrana de polipropileno associada ao Bio-Oss proporcionou uma maior formação óssea.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Transplante ósseo. Doxiciclina

ABSTRACT

In order to perform the reconstruction of critical bone defects, especially in patients with disorders of bone metabolism such as osteoporosis, several surgical techniques and biomaterials have been developed. The use of polypropylene membrane (Bone Heal®) associated with osteoinductive and/or osteoconductive agents such as Doxycycline 10% and bovine bone can promote adequate bone regeneration in a shorter clinical time and with greater predictability of success in critical bone defects. The objective of this study was to evaluate the use of the non-resorbable polypropylene membrane (Bone Heal®) with 10% Doxycycline gel or bovine bone graft on bone regeneration in calvarial defects of osteoporotic rats. 105 Wistar rats were used, after 16 weeks of ovariectomy surgery a critical bone defect of 6 mm was made in calvaria. The animals were divided into 7 groups (n=15/group): Sham (positive control), OVX (negative control), OVX-MEMB (Bone Heal® membrane) OVX-BIO-MEMB (Bio-Oss and Bone Heal®); OVX-DOX-MEMB (Doxycycline 10% and Bone Heal®); OVX-BIO (Bio-Oss) and OVX-DOX (Doxycycline 10%). After the experimental periods of 4, 8 and 12 weeks euthanasia was performed and the region corresponding to the defect was evaluated in relation to the volume of mineralized tissues (R-MTF) by means of microtomographic analysis and the bone formation that was evaluated by histometric analysis. The Kruskal-Wallis test and the Dunn test were used for comparison between the groups in the different experimental periods and within each group, varying the experimental periods. GraphPad Prism 6 software was used for statistical analysis at the 95% confidence level. In the microtomographic analysis, the R-MTF (%) values in the OVX-MEMB group were higher in the 4-week period when OVX-DOX ($p < 0.05$). In the histometric analysis it was observed that the OVX-BIO- MEMB group had a higher amount of bone ($p < 0.05$) than the OVX group in the 4 and 8 week evaluation periods. It was also found that the OVX-DOX-MEMB group in the 4 week period had a higher amount of bone tissue than the same group over the 12 week period ($p < 0.05$). It is concluded that, both the polypropylene membrane and Bio-Oss and Doxycycline do not present any difference in the bone regeneration of osteoporotic rats, when compared to the blood clot. In addition, the use of polypropylene membrane associated with Bio-Oss can promote a greater bone formation.

Keywords: Bone Regeneration. Bone Transplantation. Doxycycline.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Membrana de polipropileno (Bone Heal®)..... | 31 |
| Figura 2 | Bio-Oss® de pequena granulação proporcionado na quantidade exata para preencher o defeito..... | 32 |
| Figura 3 | Doxiciclina a 10% proporcionada na quantidade que foi colocada no defeito..... | 32 |
| Figura 4 | Modelo de incisão utilizada..... | 34 |
| Figura 5 | Trefina de 5 mm para confecção de defeito crítico de 6 mm na calvária da rata..... | 36 |
| Figura 6 | Defeito crítico com marcações em “L” com 2 mm para anterior e 2 mm para posterior..... | 37 |
| Figura 7 | Eutanásia | 37 |
| Figura 8 | Imagens do Microtomógrafo 1272 e software de captação..... | 38 |
| Figura 9 | Imagem da tela inicial do software Dataviewer®..... | 39 |
| Figura 10 | Esquema do defeito ósseo..... | 42 |
| Figura 11 | Esquema histometria | 43 |
| Figura 12 | Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico no grupo OVX-MEM no período de 4 semanas..... | 45 |
| Figura 13 | Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico no grupo OVX-DOX no período de 4 semanas..... | 45 |
| Figura 14 | Representação gráfica da comparação dos dados microtomográficos entre os grupos em diferentes períodos experimentais..... | 46 |
| Figura 15 | Representação gráfica da comparação dos dados microtomográficos entre os grupos em diferentes períodos experimentais..... | 47 |
| Figura 16 | Representação gráfica da comparação dos dados histométricos entre os grupos em diferentes períodos experimentais e dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais..... | 49 |
| Figura 17 | Representação gráfica da comparação dos dados histométricos entre os grupos em diferentes períodos experimentais e dentro de | |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| | cada grupo variando-se os períodos experimentais..... | 50 |
| Figura 18 | Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 4 semana | 53 |
| Figura 19 | Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 8 semana | 54 |
| Figura 20 | Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 12 semana | 55 |

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Distribuição dos grupos de acordo o experimento 31 realizado.....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Dados de mediana e dos quartis 1 e 3 do R-MTF de todos os 44 grupos e períodos de avaliação.....
- Tabela 2 Dados de mediana e dos quartis 1 e 3 da % osso de todos os 4 grupos e períodos de avaliação.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| AON | Área de neoformação óssea |
| ASBMR | Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral |
| AT | Área Total |
| BMP | Proteínas ósseas morfogenéticas |
| BV | Bone volume |
| DMO | Densidade mineral óssea |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| FGF | Fator de crescimento de fibroblastos |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| IGF | Fator de crescimento de insulina |
| Micro-CT | Microtomógrafo |
| OPG | Osteoprotegerina |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PP | Polipropileno |
| PTFE | Politetrafluoretileno |
| PUr | Poliuretana |
| RANKL | Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B |
| ROI | Região de interesse |
| ROG | Regeneração óssea guiada |
| ROT | Regeneração Óssea Tecidual |
| TGF-beta | fator de crescimento de transformação beta |
| TV | Tissue volume |
| VEGF | Fator de crescimento endotelial vascular |
| VOI | Volume de interesse |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 | BIOLOGIA E REPARAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA..... | 18 |
| 2.2 | OSTEOPOROSE..... | 21 |
| 2.3 | DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA..... | 22 |
| 2.4 | DOXICICLINA | 23 |
| 2.5 | HIDROXIAPATITA (BIO-OSS)..... | 25 |
| 2.6 | REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG)..... | 26 |
| 3 | OBJETIVO..... | 29 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODO..... | 30 |
| 4.1 | MODELO EXPERIMENTAL..... | 30 |
| 4.2 | INDUÇÃO CIRÚRGICA DA OSTEOPOROSE (OVARIECTOMIA)..... | 32 |
| 4.3 | FASE CIRÚRGICA PARA CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO..... | 33 |
| 4.4 | ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO NA CALVÁRIA..... | 37 |
| 4.4.1 | Aquisição das imagens..... | 38 |
| 4.4.2 | Processamento das imagens..... | 39 |
| 4.4.3 | Análise das imagens..... | 39 |
| 4.4.4 | Seleção do volume (VOI) e região de interesse (ROI)..... | 40 |
| 4.4.5 | Binarização das imagens..... | 40 |
| 4.4.6 | Análise morfométrica..... | 41 |
| 4.5 | ANÁLISE HISTOLÓGICA..... | 41 |
| 4.5.1 | Processamento histológico..... | 41 |
| 4.5.2 | Análise histomorfométrica..... | 42 |
| 4.6 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 43 |
| 5 | RESULTADOS..... | 44 |
| 5.1 | ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA..... | 44 |
| 5.2 | ANÁLISE HISTOMÉTRICA..... | 48 |
| 5.3 | ANÁLISE HISTOLÓGICA..... | 51 |

| | | |
|----------|-------------------------|-----------|
| 6 | DISCUSSÃO | 56 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 62 |
| | REFERÊNCIAS..... | 63 |
| | ANEXO A..... | 74 |

1 INTRODUÇÃO

No mundo, com um aumento da expectativa de vida da população, as comorbidades, tais como a osteoporose, tem se tornado um importante problema de saúde pública (MARTINI et al., 2009). A osteoporose é uma doença comum, caracterizada por um comprometimento sistêmico da microarquitetura óssea conforme Rachner, Khosla e Hofbauer (2011), onde a massa óssea diminui mais rapidamente do que é substituída (JONASSON; RYTHÉN, 2016). Nas mulheres, esta doença está associada à deficiência de estrogênio após a menopausa (LI et al., 2016). Dessa maneira, a menor resistência óssea associada à renovação celular alterada pode resultar na redução do volume da massa óssea, alterações na microarquitetura e/ou geometria, ou mesmo na combinação desses resultados (FONSECA et al., 2014).

Como consequência do aumento da expectativa de vida, o número de pacientes idosos a procura de tratamentos odontológicos reabilitadores, em que são necessários procedimentos de ganho ósseo, também aumentou nos últimos anos (SCALIZE et al., 2016). Li et al. (2016) consideraram que na osteoporose ocorre o desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea, resultando numa reabsorção óssea acelerada. Conforme Waugh e Sherratt (2006), a regeneração óssea guiada (ROG) é uma alternativa na presença de defeitos ósseos extensos, até mesmo em pacientes com o quadro de osteoporose (MARDAS et al., 2017).

A ROG é definida como um tratamento cirúrgico para defeitos ósseos em periodonto de inserção e proteção, no qual, a técnica se baseia na exclusão dos tecidos não desejáveis localizados na região onde se quer formar um tecido específico (ACEVEDO et al., 2004). Para tanto, se utiliza de uma barreira física, que podem ser uma membrana não absorvível ou absorvível, que impeça a proliferação de fibroblastos nos defeitos ósseos, que poderiam dificultar a osteogênese (DONOS; KOSTPOULOS; KARRING, 2002).

O politetrafluoretileno (PTFE), conhecido comercialmente como Teflon®, é utilizado comumente como uma barreira não reabsorvível e apresenta neutralidade química e biocompatibilidade (DIMITRIOU et al., 2012). Entretanto, as membranas reabsorvíveis requererem uma segunda intervenção cirúrgica, o que levou ao desenvolvimento de materiais absorvíveis. O polipropileno (PP) foi lançado no

mercado como membrana não-reabsorvível, podendo permanecer exposta ao meio bucal. Assim, esse material tem sido utilizado frequentemente após exodontias para a manutenção do rebordo alveolar em sítios que irão receber implantes, sem necessariamente ser associado à enxertia óssea (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010). Um estudo atual observou que a barreira de polipropileno é viável para uso em RGO e pode ser facilmente removido alguns dias depois cirurgia (DE LUCCA; DA COSTA MARQUES; WEINFELD, 2018).

Em situações em que se almeja um aumento significativo de volume ósseo, na presença de osteoporose, os biomateriais, além de serem osteocondutivos, deverão promover estímulos osteogênicos, osteoindutivos e inibir a osteoclastogênese (YIP et al., 2015). A fim de otimizar a regeneração óssea em defeitos críticos, estudos avaliaram a associação das membranas com materiais que proporcionem um maior formação óssea (LUCATELI et al., 2018; ARONI et al., 2019).

Atualmente, nos casos de defeitos ósseos críticos, o uso de barreiras tem sido combinado ao uso de enxertos ósseos, como o osso bovino (Bio-Oss). O enxerto ósseo atuará como arcabouço para que a regeneração óssea ocorra e a barreira, além de impedir a migração de fibroblastos para a região, manterá esse osso compartimentado em íntimo contato com o defeito, evitando sua migração para outros sítios (PHILIP et al., 2015).

A Doxíciclina a 10% é um antibacteriano que inibe a osteoclastogênese, uma característica que a torna favorável para uso na regeneração óssea, especialmente em quadros de deficiência de estrógeno onde a atividade osteoclástica está aumentada (PAYNE; GOLUB, 2011). Silva et al. (2016) por meio um estudo em ratos, relataram que a aplicação local do gel de Doxíciclina a 10% em defeitos ósseos críticos na região da calvária foi capaz de promover a regeneração óssea após oito semanas com diferença significativa para o controle. Estudos verificaram que a associação da Doxíciclina a 10% com osso autógeno aumenta significativamente o reparo ósseo em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos (LUCATELI et al., 2018; ZHANG; DING, KASUGAI, 2019).

O potencial regenerativo do osso osteoporótico e sua resposta a biomateriais e/ou técnicas regenerativas ainda não foram esclarecidos e o modelo de defeito de tamanho crítico pode ser uma ferramenta apropriada para atender a essa finalidade (CALCIOLARI et al., 2017). Portanto, a utilização de uma membrana de

polipropileno associada a biomateriais osteoindutivos (Doxiciclina a 10%) e/ou osteocondutivos (enxerto ósseo bovino), em defeitos críticos na presença de deficiência do estrógeno, como na osteoporose pós-menopausa, poderá contribuir para otimizar o processo de regeneração óssea. Conseqüentemente, haverá redução no tempo total da terapia regenerativa, permitindo previsibilidade de sucesso na posterior reabilitação com implantes dentais. Logo, a realização de estudos que avaliem o uso de barreiras físicas associadas à Doxiciclina a 10% e/ou enxerto ósseo bovino sobre o processo de reparação tecidual de defeitos críticos na presença de osteoporose são necessários.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta sessão, a revisão de literatura está dividida em tópicos para melhor compreensão do assunto.

2.1 BIOLOGIA E REPARAÇÃO TECIDUAL ÓSSEA

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea, sendo composto aproximadamente por 92% de material sólido e 8% de água. A parte sólida é dividida em aproximadamente 21% de material orgânico e 71% de material inorgânico (ANDRADE et al., 2007), sendo que estas duas fases se comunicam fornecendo propriedades mecânicas de elasticidade, resistência e dureza (HING, 2004).

Apesar do aspecto aparentemente inerte, o tecido ósseo está em constante remodelação, dependendo da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea (SILVA et al., 2005). A remodelação óssea consiste em três fases sucessivas: a reabsorção, a reversão e a formação. A reabsorção inicia com a migração de pré-osteoclastos à superfície do osso onde formam osteoclastos multinucleados que reabsorvem o osso. Os osteoclastos secretam ácido clorídrico que dissolve a matriz mineral do osso, enquanto proteases degradam a porção orgânica (KINUGAWA et al., 2012; UDAGAWA et al., 2013).

A reabsorção ocorre principalmente por ação dos osteoclastos, mas os osteócitos também podem reabsorver matriz óssea de forma localizada. Depois da reabsorção osteoclástica, há uma inversão de fase, sendo que agora os osteoblastos e pré-osteoblastos ocupam a superfície do osso (KINUGAWA et al., 2012). Estas células preparam a superfície para começarem a formação óssea e enviam sinais para migração e diferenciação dos osteoblastos. A fase de formação ocorre com a participação dos osteoblastos até que o osso reabsorvido seja completamente substituído por um osso novo. Osteoblastos são atraídos para a cavidade de reabsorção e, sob influência de vários hormônios e fatores de crescimento, diferenciam-se em osteoblastos ativos para preenchê-la com o novo osso. Após a conclusão desta fase, a superfície é coberta por células de revestimento achatadas e um período de repouso prolongado começa até que um

novo ciclo de remodelação óssea seja iniciado (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006).

No decorrer deste ciclo são encontrados três tipos de células ósseas: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, além de células mesenquimais provenientes da medula óssea e dos vasos sanguíneos capazes de se diferenciar em células osteogênicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoblastos são responsáveis pela formação do tecido ósseo, por sintetizar os componentes da matriz orgânica e controlar a sua mineralização. Estas células são derivadas do periósteo, endósteo e células mesenquimais indiferenciadas circulantes (HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). São células secretoras de proteínas colágenas e não colágenas, de proteoglicanos da matriz óssea, de metaloproteinasas que regulam fatores de crescimento e citocinas reguladoras do desenvolvimento osteoclástico. Sua diferenciação e desenvolvimento a partir de células osteoprogenitoras são dependentes da liberação das proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) e fatores de crescimento, como o fator de crescimento de insulina (IGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF). Os osteoblastos depositam matriz osteóide, a qual é mantida imóvel durante o processo de cicatrização, tornando-se uma estrutura mineralizada (PETERSON et al., 2003). Localizados na superfície óssea, promovem a deposição da matriz osteóide e podem, por fim, diferenciar-se em osteócitos (ANDRADE et al., 2007).

Os osteócitos são células que ficaram aprisionadas dentro da matriz óssea durante a sua mineralização com baixa atividade sintética e secretora. Possuem prolongamentos citoplasmáticos cujo arranjo permite participar da regulação da homeostasia do cálcio plasmático e perceber a carga mecânica incidida no osso transmitindo essa informação às outras células do tecido (ANDRADE et al., 2007; HADJIDAKIS; ANDROULAKIS, 2006). Estas células ocupam lacunas das quais partem canalículos, sendo cada lacuna ocupada por apenas um osteócito. Dentro dos canalículos os prolongamentos dos osteócitos estabelecem contatos através de junções comunicantes por onde podem passar pequenas moléculas e íons de um osteócito para o outro (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Os osteoclastos são células móveis, gigantes, multinucleadas e amplamente ramificadas, sendo originados da fusão de células da linhagem monocitofagocítica dos tecidos hematopoiéticos (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Seu mecanismo de

ação, na reabsorção da matriz óssea, deve-se à secreção para dentro desse microambiente fechado, de ácidos (H⁺), colagenase e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Osteoblastos e osteoclastos surgem de linhagens de células distintas e processos de maturação diferenciados. Os osteoblastos originam-se de células mesenquimais indiferenciadas, enquanto os osteoclastos da diferenciação dos monócitos hematopoiéticos. As diferenças entre as atividades osteoclástica e osteoblástica podem ser originadas de uma grande variedade de mudanças hormonais e nos fatores de crescimento, ou perturbações como processos inflamatórios, resultando em alterações ósseas caracterizadas pela redução ou aumento da massa óssea (ROODMAN, 1999).

O tecido ósseo, quando lesado, é capaz de se regenerar, fenômeno que demonstra sua permanente vitalidade (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A regeneração óssea é um termo aplicado ao processo biológico em que a estrutura e a função do tecido lesado ou perdido são completamente restauradas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A osteocondução é definida como a capacidade do enxerto auxiliar a cicatrização através do seu arcabouço micro e macroscópico permitindo a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação do osso, tais como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos, entre outros. A osteocondução é mais eficaz quando outras propriedades como a osteoindução e a osteogênese estão presentes no mesmo material. A osteoindução é o processo pelo qual células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos após serem expostas a moléculas provenientes do enxerto. Estes eventos celulares são mediados por vários fatores de diferenciação e crescimento como: o fator de crescimento de transformação beta (TGF-beta) e as BMPs (DIMITRIOU; TSIRIDIS; GIANNOUDIS, 2005).

A osteogênese é a formação de novo osso a partir de células mesenquimais indiferenciadas e células osteoprogenitoras vivas provenientes do enxerto ou oriundas do hospedeiro. Essas células têm um importante papel como progenitoras de osteoblastos e são responsáveis por metade do equilíbrio homeostático anabólico e também regulam a osteoclastogênese através da expressão do RANKL (ligante do

recetor ativador do fator nuclear kappa B) e osteoprotegerina (OPG). Diferentes conjuntos de mediadores moleculares interagem com células locais e circulantes para regular a cascata de cicatrização: estimuladores de inflamação (interleucina 1 e 6), TGF-beta, PDGF e fator de crescimento endotelialvascular (VEGF) (BIELBY; JONES; McGONABLE, 2007; MICLAU; HELNS, 2000).

2.2 OSTEOPOROSE

A osteoporose é uma doença metabólica e sistêmica que acomete os ossos do esqueleto, sendo caracterizada por baixa densidade óssea e deterioração da microarquitetura óssea, o que resulta na redução da resistência óssea e consequentemente no aumento da susceptibilidade à fratura (BOZIC; HREN, 2005). A osteoporose pós-menopausa é causada pela redução dos níveis do hormônio estrógeno, a qual é responsável pela alteração do equilíbrio entre os níveis de reabsorção e formação óssea para um nível aumentado de reabsorção óssea (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012; PACIFICI, 1996).

O estrogênio é um hormônio sistêmico crucial para a remodelação óssea, pois este hormônio mantém a homeostase óssea inibindo a reabsorção óssea excessiva por osteoclastos e a apoptose dos osteoblastos/ostócitos (FLORENCIO-SILVA et al., 2018).

Em ratas osteoporóticas, observa-se o aumento da fragilidade óssea na qual essas alterações na micro-arquitetura trabecular é pela retirada do estrogênio após ovariectomia (FONSECA et al., 2014). Um estudo ao investigar se as mudanças ósseas ocorrem no osso alveolar maxilar em ratas ovariectomizadas, num período de 12 semanas, verificaram através de análise em microtomógrafo (Micro-CT) e histológica que a ovariectomia neste período foi capaz de induzir a osteoporose no osso maxilar alveolar (DAI et al., 2014). Outro estudo comprovou a eficácia do modelo de ratas ovariectomizadas para induzir a osteoporose, num período de 30 dias através de análise histológica de tíbias, que mostraram características osteoporóticas (CALCIOLARI et al., 2017).

Ao contrário do efeito notório da osteoporose nos ossos longos, seu efeito nos ossos maxilares é contraditório. Estudos pré-clínicos com animais ovariectomizados relatam que a deficiência do hormônio estrógeno pode induzir reduções no volume

ósseo e alterações na microarquitetura óssea do côndilo ou osso alveolar, além de um aumento na porosidade do tecido ósseo cortical mandibular (KOSUGI et al., 2013; KURODA et al., 2003; DAI et al., 2014; TANAKA et al., 2002; DVORAK et al., 2011). Entretanto, outros estudos têm falhado em detectar algum efeito da ovariectomia sobre o côndilo ou processo alveolar em comparação aos ossos longos (FUJITA et al., 2001; JOHNSON et al., 2002).

Uma revisão sistemática com estudos clínicos avaliou a correlação entre a densidade mineral óssea (DMO) de sítios ósseos periféricos (ex: fêmur) e a DMO dos ossos mandibulares em mulheres com osteoporose pós-menopausa, no qual, encontram uma correlação positiva entre a DMO de sítios ósseos periféricos e dos ossos maxilares (CALCIOLARI et al., 2015).

2.3 DEFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA

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). Segundo 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 têm 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. Esses defeitos são confeccionados com trefina cirúrgica com uma extensão de 5 a 8 mm de diâmetro, se estendendo nas duas corticais ósseas (KASUYA et al., 2018; MESSORA et al.,

2008; WANG et al., 2017).

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). 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).

2.4 DOXICICLINA

A Doxiciclina é uma tetraciclina, e como tal, tem a capacidade de prevenir a perda óssea, mas o mecanismo envolvido nesse contexto ainda é pouco conhecido (ROODMAN, 2006). Pesquisas em culturas celulares mostraram que este fármaco não teve nenhum efeito sobre o número e superfície de osteoblastos, enquanto, por outro lado, diminuiu significativamente o número e superfície de osteoclastos (BANG et al., 2013; GOMES; FERNANDES, 2007; KINUGAWA et al., 2012; UDAGAWA et al., 2013). Estes resultados corroboram com o conceito de que a prevenção da perda de massa óssea pelas tetraciclina é devido principalmente à supressão da reabsorção óssea osteoclástica e não ao aumento direto de osteoblastos; mostrando que a remodelação óssea é tão importante quanto à osteogênese, pois para alcançar uma maior formação óssea, a atividade osteoblástica deve estar ativada enquanto que a atividade osteoclástica deve estar inibida, resultando, indiretamente, numa maior massa óssea (BANG et al., 2013; KINUGAWA et al., 2012).

Bettany e Wolowacz (1998) e Bettany et al. (2000) demonstraram que a Doxiciclina, além de atuar como inibidor da metaloproteinase, 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 µg/mL.

Um estudo verificou uma redução do número de osteoclastos após a administração de Doxiciclina. Neste trabalho, avaliaram doses abaixo da capacidade antimicrobiana da Doxiciclina (< 10mg/kg/dia) em ratos. Os animais que não receberam a medicação apresentaram significativamente um aumento no número de osteoclastos, perda óssea alveolar além de infiltrado inflamatório mononuclear intenso (BEZERRA et al., 2002). Por sua vez, outro estudo verificou além de uma redução no número de osteoclastos, também uma redução no número de odontoclastos na superfície dentária com a administração de baixas doses de doxiciclina (MAVRAGANI; BRUDVIK; SELVIG, 2005).

Baixas doses de Doxiciclina interferindo na proliferação e diferenciação de células precursoras em osteoblastos foram demonstrados por vários autores (ALMAZIN et al., 2009; GOMES et al., 2007; PARK et al., 2012). Tal fato pode ser comprovado em um estudo feito para observar 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 (GOMES et al., 2007). Em 2009, um estudo mostrou que a Doxiciclina a 10% aumentou tanto a diferenciação quanto a maturação de células osteoblásticas (ALMAZIN et al., 2009).

Um estudo ao comparar o uso a aplicação local da doxicilina, na forma de gel tendo, na regeneração óssea, associada ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss), com o um período experimental de 4 e 8 semanas, na análise microtomográfica, verificaram que com 8 semanas a média da formação óssea do Bio-Oss isolado foi estatisticamente igual ao Bio-Oss associado a Doxicilina (SILVA et al., 2016).

Um estudo atual avaliou a associou a Doxiciclina a 10% ao enxerto autógeno em relação ao reparo ósseo de defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. No qual, após análise histológica, os autores concluíram que está que associação aumentou significativamente o reparo ósseo em defeitos não preenchidos e

preenchidos com apenas com a Doxíciclina ou com gel de Natrosol (LUCATELI et al., 2018). Outro estudo atual avaliou associação da Doxíciclina com osso xenógeno, no qual, o defeito ósseo crítico na calvária foi recoberto por membrana de colágeno, após o preenchimento do defeito de acordo com os grupos experimentais, Bio-Oss ou Bio-Oss mais Doxíciclina. Os autores verificaram que associação proporcionar maior aumento ósseo vertical (ZHANG; DING; KASUGAI, 2019).

2.5 HIDROXIAPATITA (BIO-OSS)

Bio-Oss é um osso bovino desproteínado esterilizado com 75% a 80% de porosidade na forma de grânulos e blocos corticais e trabeculados (CLERGEAU et al., 1996). A produção de Bio-Oss ocorre por meio de um processo de esterilização física e de procedimentos químicos que resultam na completa eliminação das proteínas do osso bovino, ocasionando uma matriz óssea mineral, porosa, natural e não antigênica (MELLONIG, 2000). Este material é quimicamente e fisicamente similar ao osso humano a (PIATTELLI et al., 1999). Por esse motivo, este material apresenta alta osteocondutibilidade e promissor potencial para utilização na regeneração óssea guiada (KASUYA et al., 2018).

O Bio-Oss possui as características de manter o espaço para regeneração óssea; pré-determinar a forma anatômica desejada; servir de apoio para as membranas; orientação estrutural osteocondutora para a regeneração de tecido ósseo; substância transportadora de antibióticos, fatores de crescimento ou abordagens de terapia gênica, *scaffolds* (estrutura artificial capaz de suportar a formação de tecido tridimensional, que permite a fixação e migração) para abordagens de engenharia de tecidos (KOLK et al., 2012).

Este material tem sido utilizado para o tratamento de defeitos ósseos periodontais, preenchimento de fendas entre blocos de enxerto onlay, associado com membrana PTFE para aumento ósseo vertical da região posterior da mandíbula e preenchimento de alvéolos pós-extração dentária (MELLONIG, 2000; MAIORANA et al., 2005; SIMION et al., 2007; MARDAS; CHADHA; DONOS, 2010; PARK et al., 2010).

Em um estudo realizado por KASUYA et al. (2018) onde foi realizado um defeito crítico de 5 mm de diâmetro com posterior preenchimento do defeito com Bio-Oss e fixação de membrana de colágeno (membrana reabsorvível) para

estabilizar esse biomaterial, foi constatado através de avaliação histológica formação óssea tanto na periferia do defeito como também na região central, demonstrando que o Bio-Oss realmente atuou como um arcabouço estrutural para osteocondutibilidade na formação óssea, auxiliando no reparo.

2.6 REGENERAÇÃO ÓSSEA GUIADA (ROG)

A ROG baseia-se no conceito de osteopromoção, que se refere ao uso de meios físicos (membranas absorvíveis e não absorvíveis) para promover um selamento total de um local anatômico, prevenindo que outros tecidos, principalmente tecido gengival, interfiram na osteogênese, bem como no direcionamento da formação óssea (ACEVEDO et al, 2004).

O princípio da técnica de ROG foi baseado na Regeneração Óssea Tecidual (ROT), a qual está fundamenta no conceito de que a reparação da área lesionada depende do tipo de população celular com maior presença no local (CHEN, 2009). A ROT foi inicialmente demonstrada através de estudos experimentais de regeneração do periodonto de inserção em animais e, posteriormente, em humanos, e estes estudos comprovaram que ocorreu regeneração do periodonto de inserção (NYMAN, 1982).

Com o objetivo de alcançar a regeneração óssea, a ROG foi inserida como uma modalidade terapêutica (DONOS; KOSTPOULOS; KARRING, 2002). Posteriormente, demonstrou-se que a técnica de ROG pode promover aumento horizontal do rebordo alveolar, utilizando materiais de enxerto recoberto por algum tipo de membrana (ESPOSITO, 2009). Sendo assim, a ROG ficou estabelecida como uma técnica que tinha como objetivo a regeneração de defeitos ósseos através da aplicação de membranas oclusivas. A membrana é uma barreira física que, mecanicamente, elimina populações de células não osteogênicas derivadas de tecidos circunjacentes como células epiteliais e conjuntivas. Com isso, apenas as células osteogênicas promovem a ocupação e a reparação da ferida óssea (DONOS; KOSTPOULOS; KARRING, 2002).

Deste modo, a RGO consiste numa alternativa terapêutica para a recuperação do tecido ósseo perdido através da utilização de barreiras, que correspondem às membranas. Tal conduta impede a proliferação do tecido mole

entre as partículas do material por funcionar como barreira física, impedindo assim a formação de defeitos na área a ser recuperada pela neoformação óssea (DAHLIN et al., 1988). Esta técnica tem sido utilizada em associação com inúmeros materiais de enxerto, incluindo os xenoenxertos (BOLUKBASI et al., 2013).

As membranas utilizadas na ROG são classificadas como absorvíveis e não absorvíveis e, idealmente, devem apresentar as seguintes características: biocompatibilidade, caracterizada pela interação com o tecido hospedeiro sem criar respostas inflamatórias; perfil de degradação que acompanhe a neoformação do tecido, quando absorvíveis; propriedades mecânicas e físicas que favoreçam sua instalação; realizar a função de barreira para não colapsar, sustentando a arquitetura do defeito ósseo (BOTINO et al., 2012).

O uso das membranas previne a migração e a proliferação de tecidos menos especializados para a região do defeito ósseo, possibilitando a ocorrência da neoformação óssea sem interferências frequentemente proporcionadas por estes (DAHLIN; SIMION; HATANO, 2010). Membranas de vários materiais reabsorvíveis e não-reabsorvíveis tem sido empregadas para minimizar a reabsorção do enxerto, manter ou aumentar o contorno ósseo e prevenir a proliferação ou migração de tecidos menos especializados para a área de reparo ósseo (ZELLIN; GRITLI-LINDE; LINDE, 1995). Diversas análises histológicas, tanto em animais quanto em humanos, têm demonstrado que há formação de novo tecido no espaço mantido pela presença dessas membranas (SCHLIEPHAKE et al., 2000).

As membranas não reabsorvíveis são membranas desenvolvidas sinteticamente e que mantêm a própria forma e estrutura nos tecidos, sendo necessária uma segunda fase cirúrgica para a sua remoção (SCANTLEBURY, 1993). As mais utilizadas são as de PTFE, que é caracterizado como um polímero de alta estabilidade, apresenta resistência à degradação pelos tecidos hospedeiros e microrganismos, não induzindo respostas imunes, mantendo a integridade estrutural ao longo da instalação, além de possuir capacidade de manter espaços. Suas propriedades físico-químicas, térmicas e mecânicas as tornam um dos materiais mais inertes (DIMITRIOU et al., 2012).

No estudo de Monteiro et al. (2008), a ROG foi realizada com membranas não absorvíveis em defeitos cirúrgicos confeccionados em osso parietal de coelhos divididos em dois grupos: teste, onde se utilizou barreiras de poliuretano (PUr) e de PTFE e grupo controle, no qual foi deixado apenas o coágulo sanguíneo. Os

resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais. Entretanto, o recobrimento dos defeitos com barreiras demonstrou superioridade quantitativa e qualitativa do preenchimento ósseo e reparação mais rápida em relação ao grupo de controle, confirmando os benefícios do uso das membranas para ROG.

Dahlin et al. (2010) compararam membranas de PTFEe (Gore-Tex, W.L. Gore & Assoc.) e colágeno (BioGide®) associadas a enxerto ósseo xenógeno (BioOss®) com pelo menos 20% de osso autógeno. Um total de 20 pacientes receberam 41 implantes associados à ROG com período de 5 anos de análise. Os dados do estudo indicam que a aplicação da técnica de ROG com ambas as membranas e o enxerto ósseo são tratamentos previsíveis para defeitos ósseos localizados em conjunto a implantes dentários.

Um outro material que vem sendo utilizado é o polipropileno. Que é um tipo de material biocompatível, insolúvel e não-reabsorvível, sendo apresentado de várias formas e tamanhos. A adaptação deste material deve ser realizada com auxílio de tesoura, para que possa ser moldado na forma desejada (RUBIN; YAREMCHUCK, 1997).

A membrana em PP não absorvível vem sendo utilizada em casos de manutenção do osso alveolar pós exodontia, em que tem se mostrado viável no processo de ROG, através de relatos de casos (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010; ZEPPINI et al., 2014). Portanto, esse material tem se mostrado osteopromotor, impermeável, que não sofre degradação nos tecidos e que revelam a manutenção do osso alveolar pós-extração, características que influenciaram a escolha desse material para a presente pesquisa sobre sua real manutenção do alvéolo pós-extração dental (SALOMÃO; SIQUEIRA, 2010).

Um estudo recente avaliou o processo de formação óssea em defeitos experimentais criados em calvária de coelhos. No qual, os defeitos ósseos em um grupo foram cobertos pela membrana impermeável de polipropileno enquanto que no outro foram apenas fechados pelo retalho cutâneo. Os defeitos experimentais foram preenchidos apenas pelo coágulo sanguíneo. Após 21 e 42 dias da cirurgia foi realizada a análise histológica semiquantitativa, avaliando o processo inflamatório, a reparação e remodelação óssea, a presença de matriz osteóide, mineralização e a formação de tecido hematopoiético. Os autores concluíram que a barreira de

polipropileno é viável para uso em RGO e pode ser facilmente removido alguns dias depois cirurgia (DE LUCCA; DA COSTA MARQUES; WEINFELD, 2018).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso isolado ou combinado da membrana não-reabsorvível de polipropileno (Bone Heal®) com gel de Doxíciclina a 10% ou enxerto ósseo bovino sobre a regeneração óssea em defeitos críticos na calvária de ratas ovariectomizadas.

3.2 Objetivos específicos:

- a) quantificar o tecido ósseo neoformado/biomateriais no interior do defeito por meio do parâmetro BV/TV (bone volume/tissue). A quantidade de tecido ósseo neoformado e/ou biomateriais é expressa em porcentagem em relação ao tamanho do ROI.
- b) quantificar o tecido ósseo neoformado/biomateriais no interior do defeito por meio de análise histométrica.

4 MATERIAIS E MÉTODO

Todo o protocolo experimental foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização em Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL – MG) com o protocolo de registro nº 44/2017 (ANEXO A).

Para este estudo, foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus Novergicus Holtzaman*), nas quais foi possível mimetizar o quadro de osteoporose pós-menopausa, que ocorre em humanos, por meio do procedimento cirúrgico de ovariectomia (DUARTE et al., 2003). Nesse modelo animal, a calvária foi utilizada como região de interesse para a avaliação da regeneração óssea. O defeito ósseo crítico criado nessa região foi preenchido com biomateriais (Doxiciclina a 10% e Bio-Oss®) associados ao uso da membrana de polipropileno (Bone Heal®) e a regeneração óssea foi avaliada após 4, 8 e 12 semanas.

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

A unidade experimental correspondeu a 105 ratas (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), com peso entre 250 e 350 gramas (Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em um 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, conforme é preconizado no Manual de Utilização do Biotério Central da Unifal- MG. Os animais foram divididos aleatoriamente em 7 grupos de 15 animais e posteriormente, subdivididos de acordo com os períodos experimentais de 4, 8 ou 12 semanas pós-operatórios (n=5/subgrupo). Para o experimento foram utilizados 3 tipos de biomateriais: Membrana de polipropileno (Bone Heal®), cedida pelo Professor Munir Salomão junto a empresa Bone Heal idealizadora e fabricante do produto no Brasil , osso bovino liofinizado (Bio-Oss®) e Doxiciclina a 10% em gel de Natrosol (Figuras 1, 2 e 3). Dessa forma, os grupos experimentais foram dispostos de acordo

com o Quadro 1.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos de acordo o experimento realizado

| Grupo | Experimento |
|---------------|--|
| SHAM | Grupo submetido à cirurgia fictícia de ovariectomia com produção do defeito ósseo crítico na calvária, de 6mm (controle positivo) |
| OVX | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia, com produção do defeito ósseo crítico na calvária (controle negativo) |
| OVX-BIO | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia e preenchimento do defeito na calvária com osso bovino (Bio-Oss® com granulação pequena) |
| OVX-DOX | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia e preenchimento do defeito na calvária com gel de Doxiciclina a 10% |
| OVX-MEMB | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia e defeito na calvária protegido com membrana de polipropileno (Bone Heal®) |
| OVX-BIO-MEMB: | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia e preenchimento do defeito ósseo crítico na calvária com osso bovino (Bio-Oss® com granulação pequena) e protegido com a barreira de polipropileno (Bone Heal®) |
| OVX-DOX-MEMB | Grupo submetido à cirurgia de ovariectomia e preenchimento do defeito ósseo crítico na calvária com gel de Doxiciclina a 10% e protegido com a barreira de polipropileno (Bone Heal®) |

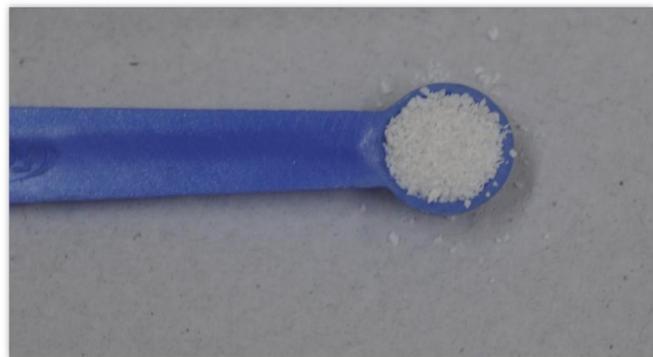
Fonte: Do autor

Figura 1- Membrana de polipropileno (Bone Heal®)



Fonte: Do autor

Figura 2 - Bio-Oss® de pequena granulação proporcionado na quantidade exata para preencher o defeito.



Fonte: Do autor

Figura 3 - Doxiciclina a 10% proporcionada na quantidade que foi colocada no defeito



Fonte: Do autor

4.2 INDUÇÃO CIRÚRGICA DA OSTEOPOROSE (OVARIECTOMIA)

Os animais com aproximadamente 8 semanas de idade foram submetidos à cirurgia de ovariectomia. Para isso, foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (6mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil) e quetamina (70mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil). Após anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia e antissepsia com polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, ioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil) nas áreas laterais e abdominal.

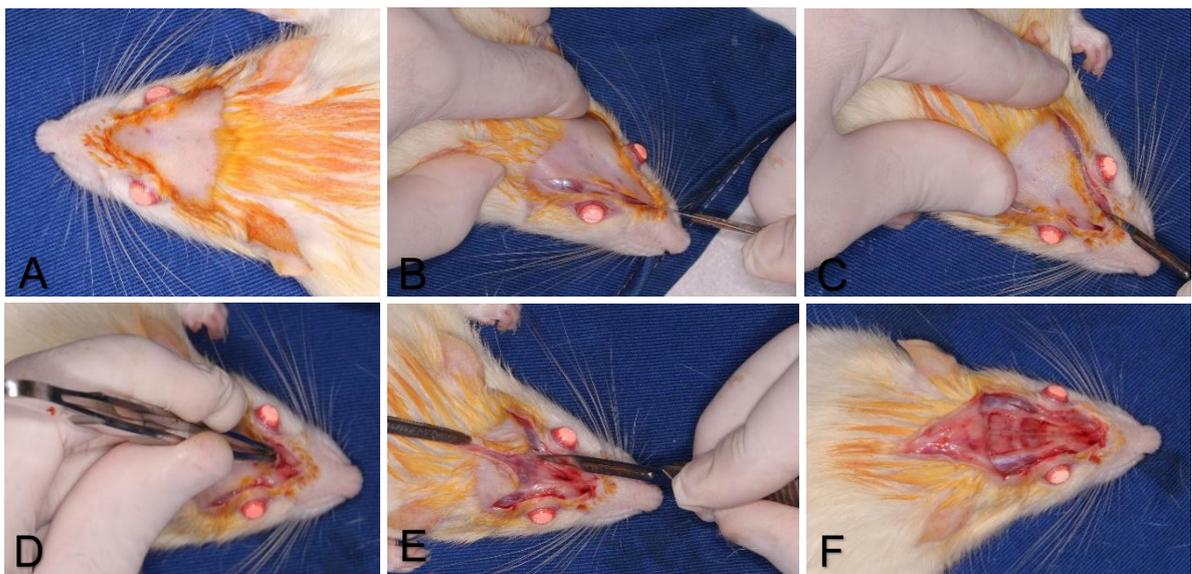
Posteriormente, foram realizadas incisões cutâneas bilaterais e divulsão dos tecidos para exposição e excisão dos ovários (KALU, 1991), sendo que as suturas internas foram feitas com fio de seda 4-0 (Ethicon, SP, Brasil). Ao final do procedimento, a pele foi suturada com fio de nylon 4-0 (Ethicon, SP, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com PVP-I. Em seguida, os animais foram medicados com doses do anti-inflamatório Flunisina meglumina (2,5mg/kg) por via subcutânea (Schering-Plough, Brasil), durante 3 dias a cada 12 horas, e dose única de uma solução de antibióticos (0,1 ml/kg) contendo benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g de peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), sulfato de diidroestreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) e sulfato de estreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, SP, Brasil).

Os animais do grupo SHAM sofreram uma cirurgia fictícia, nos quais os ovários foram expostos, mas não removidos a fim de simular o mesmo estresse dos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. Esse modelo experimental já foi descrito em estudos prévios de Luvizuto et al. (2011) e Van Houdt et al. (2016), provando a diminuição da concentração plasmática do estradiol após a castração, e levando a uma condição osteopênica. Todas as ratas foram mantidas no biotério por 16 semanas, tempo suficiente para o desenvolvimento da osteoporose.

4.3 FASE CIRÚRGICA PARA CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO

Após o período de 16 semanas da cirurgia de ovariectomia para indução da osteoporose, os 105 animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de xilazina (6mg/kg) (Rompum®, Bayer, Brasil) e quetamina (70mg/kg) (Dopalen®, Vetbrands, Brasil) para criação do defeito ósseo crítico na calvária. Após anestesia, os animais foram submetidos à tricotomia e antissepsia com polivinil-pirrolidona-iodo (PVP-I) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na região fronto-parietal da calvária dos animais. Adicionalmente, foi realizada anestesia local complementar na pele do animal com intuito de melhorar a hemostasia local. Posteriormente, uma incisão em “U” foi realizada (Figura 4A - F) com base caudal na região da calvária e um retalho de espessura total foi descolado em direção posterior permitindo a exposição do osso subjacente para criação de defeito ósseo de tamanho crítico.

Figura 4 – Modelo de incisão utilizada



Nota: A: Antissepsia com PVPI; B: Início de incisão lado esquerdo; C: Incisão finalizada; D: Pinçamento do retalho; E: Pinçamento do retalho com descolamento do periósteo; F: Rebatimento do retalho em “U”.

Fonte: Do autor

Para criação do defeito crítico de, foi utilizada uma broca trefina de 5 mm de diâmetro (Neodent, Curitiba, PR, Brasil) acoplada a um contra-ângulo de 20:1 (NSK) em motor elétrico NSK regulado com 2.000 RPM e torque de 45N, sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Fisiológico 0,9%, Equiplex®, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) (Figura 5A - C). Desde modo foi estabelecido um comprimento

de 5mm para o defeito cirúrgico somado a 1mm decorrente de oscilação da trefina, totalizando 6mm de diâmetro.

O defeito crítico foi realizado no centro da calvária para melhor padronização e para que fosse evitado a utilização de defeitos lateralizados na direita e na esquerda com grupos diferentes e possíveis misturas entre os mais diversos materiais testados.

Adicionalmente, marcações em formato de “L” foram feitas, utilizando baixa rotação e broca carbide tronco-cônica, a 2 mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico. O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividia o defeito cirúrgico ao meio. Posteriormente, essas marcações foram preenchidas com ionômero de vidro quimicamente ativado (Vidrion, Rio de Janeiro, Brasil) (SILVA et al., 2016) (Figura 6), com a finalidade de permitir a identificação do meio do defeito cirúrgico original e localização das margens ósseas originais do defeito durante o processamento e análise histológica.

Após a confecção do defeito, os grupos experimentais receberam os respectivos preenchimentos dos defeitos: OVX-MEMB (membrana *Bone Heal*®) OVX-BIO-MEMB (Bio-Oss e *Bone Heal*®); OVX-DOX-MEMB (Doxiciclina a 10%, e *Bone Heal*®); OVX-BIO (Bio-Oss) e OVX-DOX e as feridas cirúrgicas foram suturadas com fio de nylon 4.0 (Ethicon).

No caso dos grupos OVX-BIO-MEMB, OVX-DOX-MEMB, OVX-BIO (Bio-Oss) e OVX-DOX o defeito crítico foi preenchido com uma quantidade de biomaterial compatível com o volume ósseo removido pela trefina, correspondendo a uma porção do dosador utilizado para o pó do ionômero de vidro (Vidrion, Rio de Janeiro, Brasil). No caso do grupo OVX-BIO-DOX-MEMB, o dosador foi preenchido com partes iguais de Bio-Oss e Doxiciclina em um volume compatível com a colher de dosagem do ionômero de vidro.

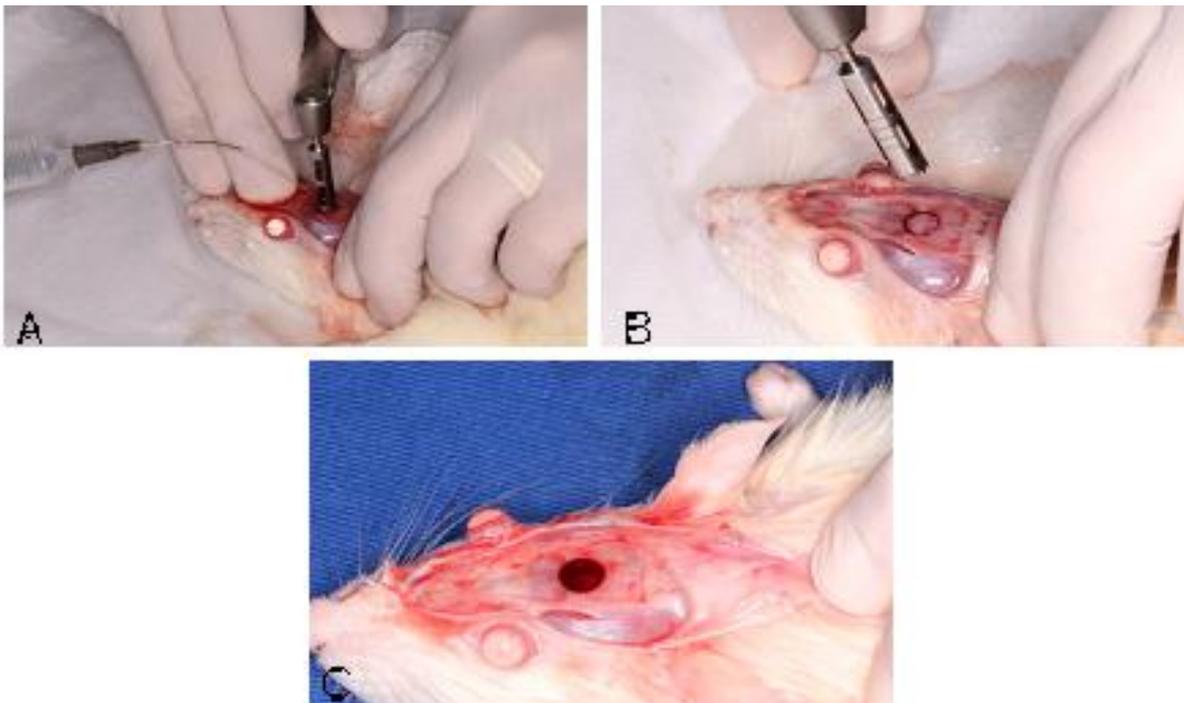
Após o preenchimento do defeito crítico com coágulo (OVX-MEMB) ou biomateriais (OVX-DOX-MEMB, OVX-BIO-MEMB), a membrana de PP foi recortada no tamanho de 10x10 mm. Tamanho esse necessário para recobrir a área do defeito crítico, com uma margem de segurança para sua fixação no periósteo por meio de suturas realizadas adjacente ao defeito crítico criado. Para melhor estabilização da membrana, foram realizados com fio de nylon 5-0 (Ethicon), 4 pontos de sutura, sendo dois anteriores e dois posteriores ao defeito crítico.

Em todos os grupos onde foram utilizadas a membrana de PP, ela permaneceu fixada no defeito crítico até o final dos períodos experimentais, não sendo retirada de maneira alguma antes da finalização dos períodos propostos.

Após a cirurgia, os animais receberam uma dose única de uma solução de antibióticos (0,1 ml/kg) contendo benzilpenicilina benzatina (156.000 UI/100g de peso corporal), benzilpenicilina procaína (78.000 UI/100 g de peso corporal), benzilpenicilina potássica (78.000 UI/100 g de peso corporal), sulfato de diidroestreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) e sulfato de estreptomicina (65 mg/100 g de peso corporal) (Pentabiótico, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, SP, Brasil), via intramuscular, e uma dose analgésica de 0,5 ml de fosfato de codeína (ampola 30mg/2mL), por via intramuscular. As doses analgésicas foram administradas ao final do procedimento, e por mais 3 dias, de 4/4 horas (MARIANO et al., 2010). O acompanhamento foi feito todos os dias na primeira semana do pós-operatório e de 15/15 dias, para avaliação clínica, alternando os animais, a fim de minimizar o estresse gerado pelo manejo laboratorial.

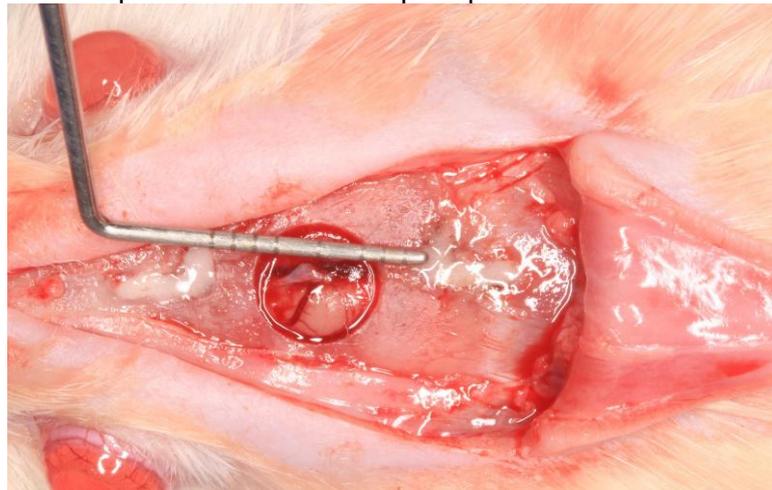
Após 4, 8 ou 12 semanas pós-operatórias, cinco animais de cada grupo foram eutanasiados utilizando câmara de CO² (Figura 7 A e B). As calvárias foram removidas e fixadas em solução de formol a 10% para posterior avaliação da região correspondente ao defeito crítico por meio de análise microtomográfica e histológica.

Figura 5 – Confeção do defeito crítico



Nota: A Broca trefina de 5 mm com irrigação abundante; B: Parte circunferencial da calvária após finalização do uso da trefina; C: Defeito crítico na calvária de 6mm após remoção da circunferência óssea trefinada.
Fonte: Do autor

Figura 6 - Defeito crítico com marcações em "L" com 2 mm para anterior e 2 mm para posterior



Fonte: Do autor

Figura 7 – Eutanásia



Nota: A: Câmara de CO₂; B: ratas posicionadas na gaiola dentro da câmara respectivamente.

Fonte: Do autor

4.4 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO NA CALVÁRIA

4.4.1 Aquisição das imagens

As imagens microtomográficas foram adquiridas por meio do microtomógrafo SkyScan 1272 (SkyScan, Kontich, Bélgica modelo 1272) (FIGURA 8A e B), utilizando como parâmetros de escaneamento tamanho pixel de 10 μm , voltagem de 70 kV, corrente elétrica de 142 μA e filtro de alumínio de 0,5 mm e 180° de rotação.

Para a aquisição das imagens microtomográficas, os espécimes (calvária) foram mantidos em posição utilizando papel umedecido, por permitir a estabilização do espécime e não interferir na imagem obtida (FIGURA 8C e D). Em seguida, as imagens obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente (3D) com tamanho de voxel de 10 μm^3 utilizando o software NRecon® (versão 1.6.10.4, Bruker, Bélgica (Figuras 8 E e F). Durante a reconstrução 3D, foi utilizada uma margem de segurança de 2 mm acima do início do defeito ósseo criado e composta por cerca de 680 a 780 fatias até alcançar o término do defeito ósseo avançando 2 mm abaixo.

Figura 8 - Imagens do Microtomógrafo 1272 e software de captação



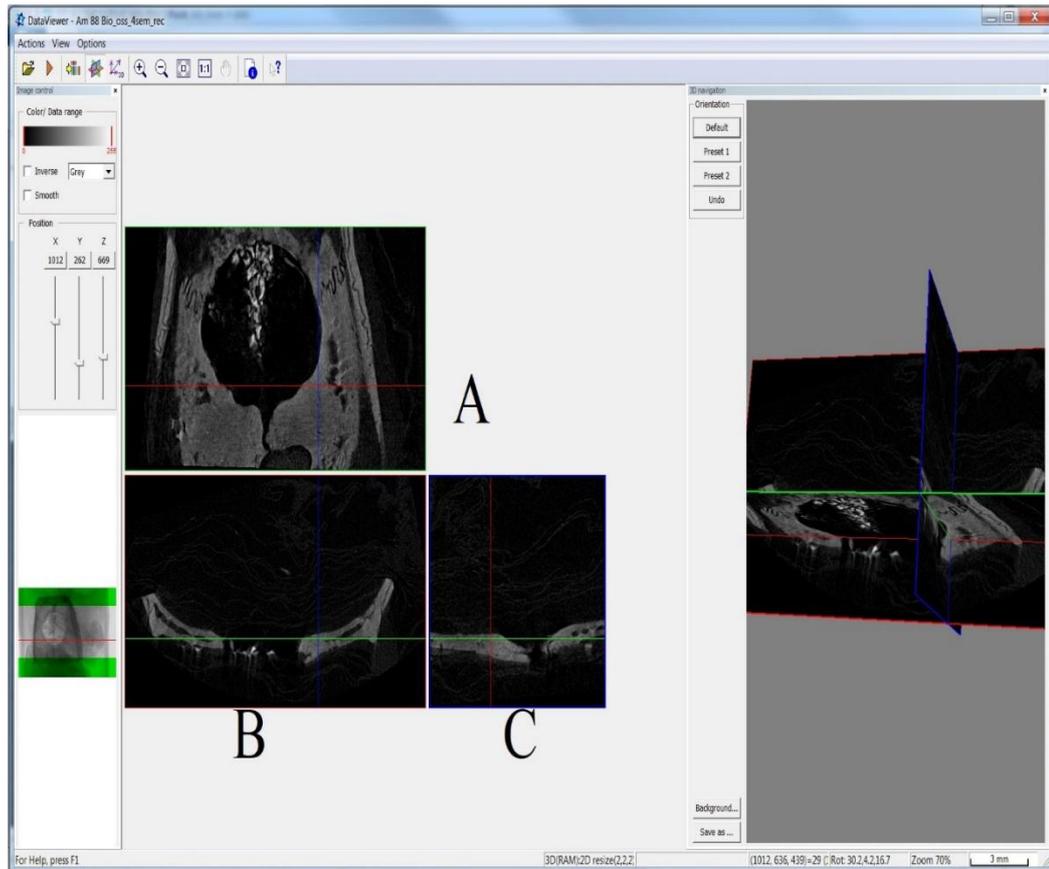
Nota: A: Microtomógrafo; B: Datacenter; C: Porta Amostra, D: Espécime fixado e em suporte; E-F: Software para escaneamento e captura.

Fonte: Do autor.

4.4.2 Processamento das imagens

Após a reconstrução 3D das imagens microtomográficas no software NRecon[®], essas foram alinhadas no *software* Dataviewer[®] utilizando o plano coronal como referência (Figura 9), pois ele permite selecionar todo o diâmetro do defeito. As imagens reposicionadas no plano coronal foram salvas para posterior análise morfológica no *software* CTan[®].

Figura 9 - Imagem da tela inicial do software Dataviewer[®]



Nota: Correção e posicionamento dos planos transaxial, sagital e coronal. A: plano coronal; B: Plano transaxial; C: Plano sagital.
 Fonte: Do autor

4.4.3 Análise das imagens

Após o reposicionamento e seleção do plano coronal, as imagens microtomográficas foram exportadas para *software* CTan® a fim de realizar as análises morfométricas. Desta forma foi possível quantificar estruturalmente nas imagens microtomográficas obtidas, o tecido ósseo mineralizado neoformado por meio dos parâmetros volumétricos (área, distância, percentual, volume das estruturas). Os parâmetros de microestrutura óssea (espessura trabecular, distância entre as trabéculas e número de trabéculas), não foram analisados porque levamos em consideração que a estrutura óssea que estava sendo analisada, no caso, a calvária, era predominantemente formada de osso cortical, na verdade, bicortical, existindo pouco osso trabecular, o que não justifica avaliarmos parâmetros que envolvem trabéculas. Tais parâmetros seguem os adotados pela Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral (ASBMR) (DEMPSTER et al., 2013; PARFITT et al., 2009).

4.4.4 Seleção do volume (VOI) e região de interesse (ROI)

Para cada espécime escaneado, foi determinado o volume de interesse (VOI) utilizando os slices referentes ao início (Top) e final (Bottom) do defeito como referência. O número médio de 100 cortes microtomográficos (slices), correspondente ao volume do defeito, foi utilizado para a análise morfométrica.

Posteriormente, a região de interesse (ROI) automaticamente para cada slice do VOI determinado. O ROI apresentou formato circular e diâmetro médio de 7,0 mm, correspondente ao tamanho do defeito ósseo confeccionado na calvária do animal, utilizando o plano coronal como referência.

4.4.5 Binarização das imagens

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

Para identificação do osso neoformado, o *threshold* de 60 até 255 foi utilizado.

4.4.6 Análise morfométrica

Como resultado na interpolação do desenho dos ROIs no VOI selecionado, foi possível a criação tridimensional da região do defeito ósseo. Assim, após a binarização das imagens, o *software* (Ctan) pode fazer a leitura dos voxels e

produzir dados volumétricos das regiões selecionadas e das diferentes estruturas analisadas (biomaterial, osso neoformado). Para determinar o volume de tecido mineralizado na região do defeito ósseo, o parâmetro BV/TV (bone volume/ tissue volume) foi selecionado e os resultados expressos em % (BOUXSEIN et al., 2010; DEMPSTER et al., 2013; PARFITT et al., 2009).

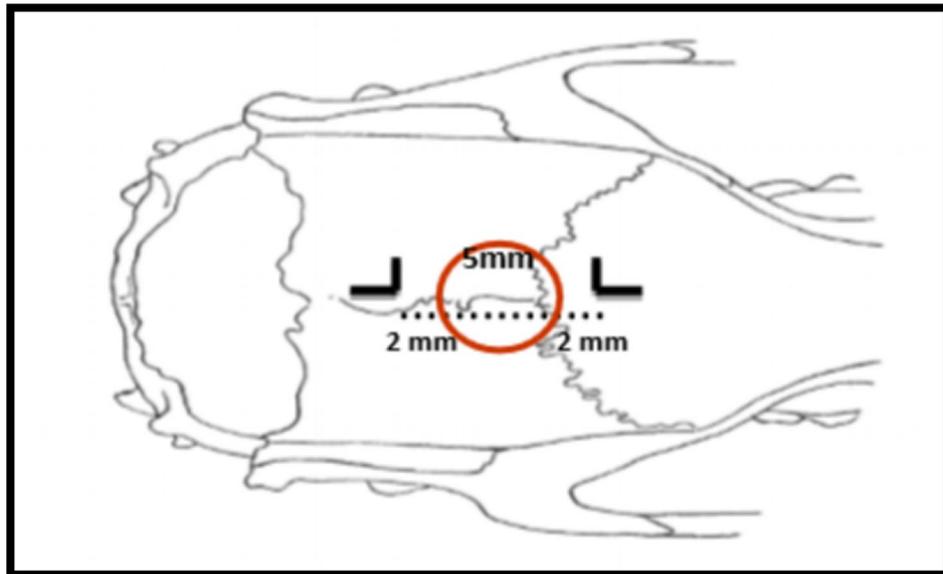
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.5.1 Processamento Histológico

Após as análises microtomográficas, as peças (calvárias) foram fixadas em formol neutro a 10% (Formol Estabilizado sol. 10%, Sciavico Comércio e Indústria Ltd., Sabará, MG, Brasil), lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 18% (Ludwig Biotecnologia LTDA, Alvorada, RS, Brasil). Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de cimento de ionômero de vidro com formato de “L” como referência.

Foram realizados cortes transversais que tangenciaram o eixo menor de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime apresente pelo menos 10 mm de extensão no sentido longitudinal. Assim, torna-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original (Figura 10). Após um período de descalcificação adicional de 30 dias, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrómetros de espessura foram feitos, iniciando a partir do centro do defeito cirúrgico original. Os cortes foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE), para análise com microscopia de luz.

Figura 10 - Esquema do defeito ósseo



Nota: Maior eixo de cada L são coincidentes que dividem o defeito ao meio, resultando em um comprimento longitudinal de 9 mm.
 Fonte: Adaptado de Messora et al., 2007.

4.5.2 Análise histomorfométrica

Foram utilizadas 2 Lâminas histológicas de cada rata, como cada grupo possuía 5 ratas, utilizamos 10 lâminas por grupo.

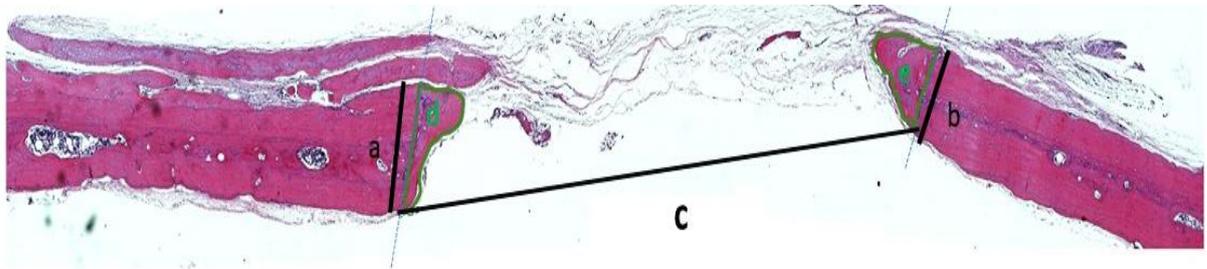
Previamente foram obtidas imagens histológicas (fotografadas) de cada região em aumento original de 10x por meio de uma câmera fotográfica digital (Axiocam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Após esse processo, a análise histomorfométrica foi realizada através do Software Imagen J, no qual, permitiu calcular a área de formação óssea.

A captura das imagens foi realizada por setores, visto que a área do defeito crítico era muito grande para poder ser capturada totalmente em um aumento de 10x. Então, após a captura das imagens por setor, as mesmas foram reconstruídas através do software Adobe Photoshop CS2 para que pudéssemos ter uma visão completa do defeito.

Subsequentemente, foi identificada e selecionada a área de interesse, no qual apresentava as trabéculas ósseas neoformadas dentro do defeito crítico presente na calvária, sendo delimitada da região anterior (próxima ao osso nasal) até a região posterior (próxima ao osso occipital). Após a demarcação da área de interesse, foi

realizada a mensuração do total da área de neoformação óssea, utilizando a ferramenta do *software Image J*. Ao final, os valores da área total e a média de neoformação óssea foram tabulados para realização da análise estatística.

Figura 11 – Esquema histometria



Nota: Área de neoformação óssea (AON) delimitada em verde dentro dos limites da área total (AT)

Fonte: Do autor

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, USA). Pelo reduzido tamanho da amostra, aplicou-se teste de Shapiro-Wilk para aferir a distribuição normal dos dados obtidos, como não apresentava uma distribuição normal, testes não paramétricos foram utilizados na análise inferencial dos dados. Portanto, os dados provenientes da análise microtomográfica e histológica foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e pelo teste de Dunn, tanto para comparação entre os grupos nos diferentes períodos experimentais, como também dentro de cada grupo, variando-se os períodos experimentais. Todos os testes estatísticos desse estudo foram aplicados ao nível de confiança de 95%.

5 RESULTADOS

Todos os animais toleraram bem ao procedimento cirúrgico e se mantiveram saudáveis durante todo o período experimental.

5.1 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA

Para análise microtomográfica foi utilizado o volume de tecidos mineralizados dentro do defeito crítico de calvária (R-MTF). Dessa forma, comparou-se inicialmente o R-MTF de todos os grupos em cada um dos períodos experimentais (TABELA 1).

Ao realizar a comparação entre os grupos experimentais no período de 4 semanas, observou-se um maior volume (%) de tecidos mineralizados dentro do defeito crítico no grupo OVX-MEMB (FIGURA 12) do que no grupo OVX-DOX (FIGURA 13) ($p < 0,05$) (Figura 14A). Entretanto, ao realizar a mesma análise para os demais períodos de avaliação, (8 e 12 semanas), não encontrou-se diferenças estatisticamente significantes (FIGURA 14 B e C).

Posteriormente, ao comparar os diferentes períodos experimentais dentro de um mesmo grupo, também não observou-se diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 1 e FIGURAS 15 A-G).

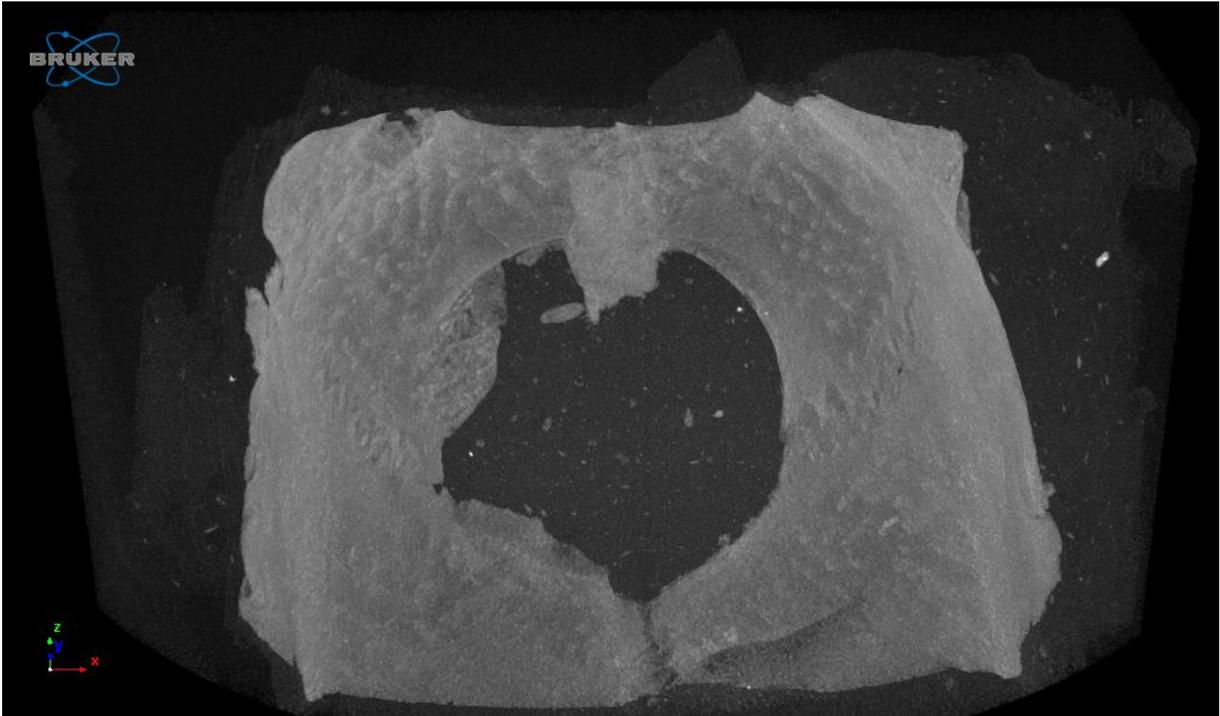
Tabela 1 - Dados de mediana e dos quartis 1 e 3 do R-MTF de todos os grupos e períodos de avaliação

| Período | Sham | Ovx | Ovx/Memb | Ovx/Bio /Memb | Ovx/Dox/ Memb | Ovx/Bio | Ovx/Dox |
|------------|------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| 4 semanas | 6.45 (5.73 - 17.84) | 7.55 (5.65 - 10.17) | 18.11 (8.67 - 20.69)* | 21.85 (21.21 -26.95) | 8.76 (8.76 - 21.99) | 9.76 (4.15 - 14.62) | 4.39 (3.90 - 5.34) |
| 8 semanas | 9.59 (5.34 - 11.18) | 8.38 (6.28 - 10.66) | 7.22 (4.33- 8.46) | 11.54 (9.77 - 13.43) | 7.34 (0.00 - 8.61) | 9.93 (9.81 - 10.22) | 7.03 (3.63 - 10.87) |
| 12 semanas | 7.62 (6.02 - 9.38) | 5.59 (4.67 - 10.60) | 5.07 (2.57 - 9.85) | 12.01 (7.98 - 12.75) | 4.84 (4.20 - 5.52) | 8.56 (5.35 - 11.54) | 11.07 (5.03 - 13.34) |

Fonte: Do autor

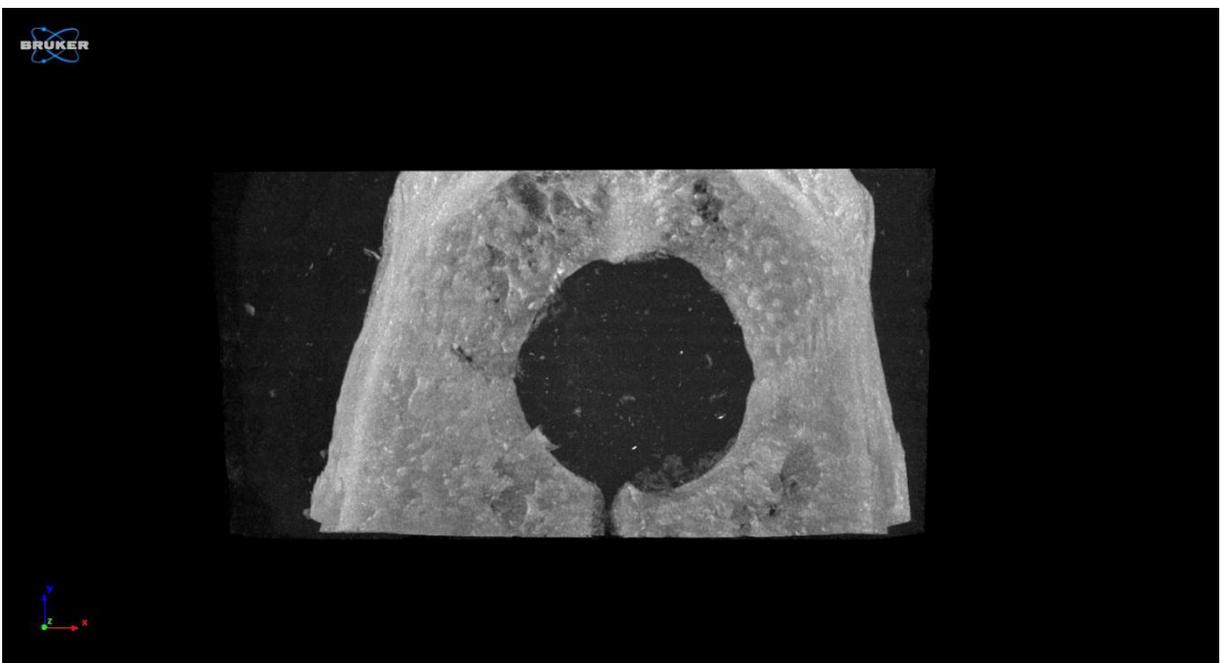
Nota: * indica diferença estatística entre os materiais em um mesmo período de avaliação

FIGURA 12 - Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico do grupo OVX-MEM no período de 4 semanas



Fonte: Do autor

FIGURA 13 - Imagens Microtomográficas Calvária com defeito crítico do grupo OVX-DOX no período de 4 semanas



Fonte: Do autor

FIGURA 14 A-C- Representação gráfica da comparação dos dados microtomográficos entre os grupos em diferentes períodos experimentais.

Figura 14A- 4 semanas

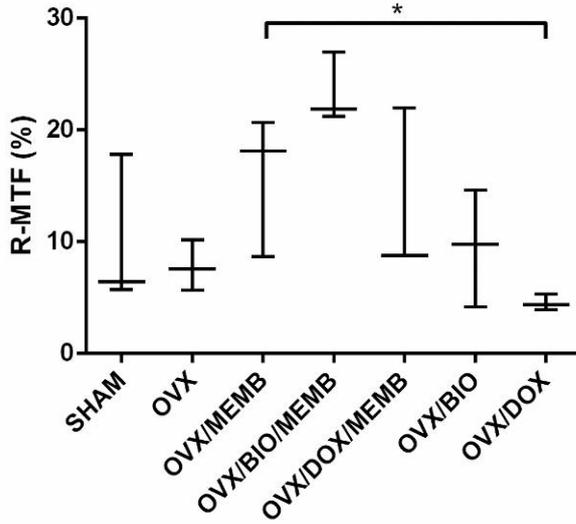


Figura 14B- 8 semanas

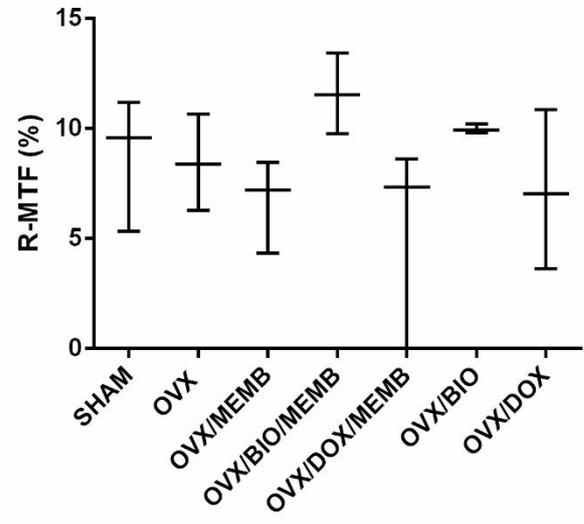
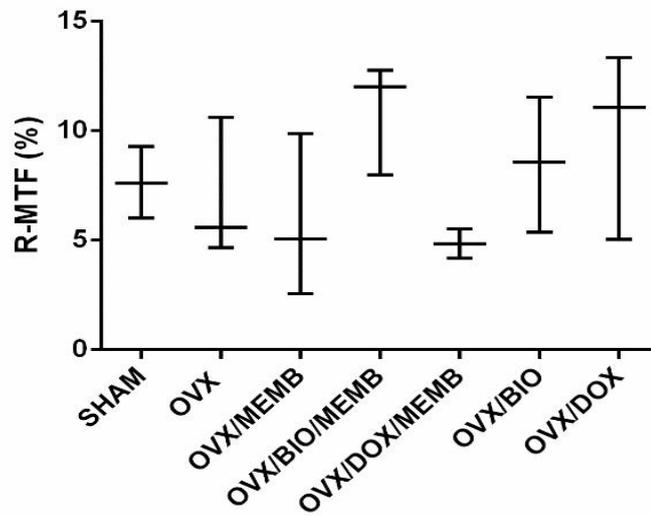


Figura 14C- 12 semanas



Fonte: Do autor

Nota: * Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

FIGURAS 15 A-G Representação gráfica da comparação dos dados microtomográficos dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais.

FIGURA 15A- SHAM

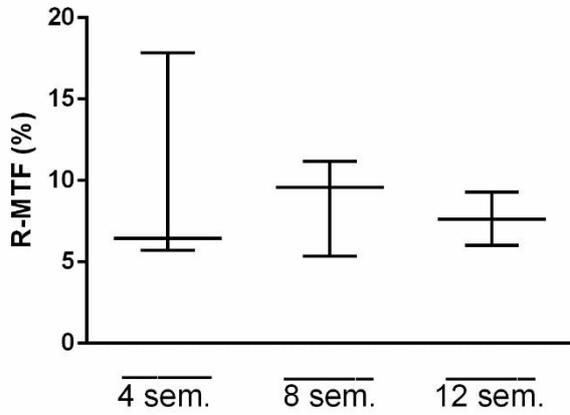


FIGURA 15B- OVX

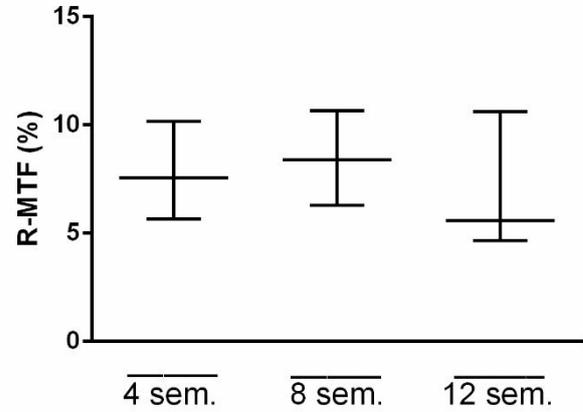


FIGURA 15C- OVX-MEMB

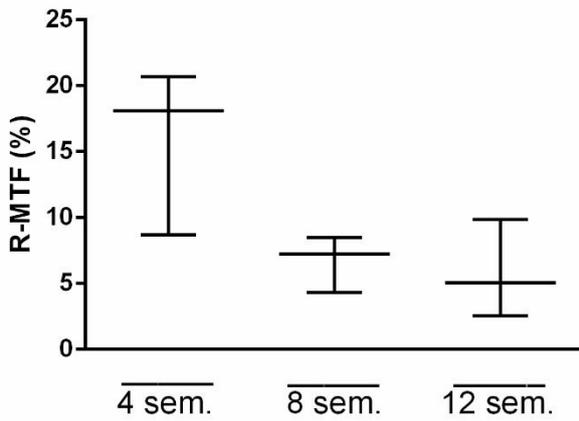


FIGURA 15D- OVX-BIO-MEMB

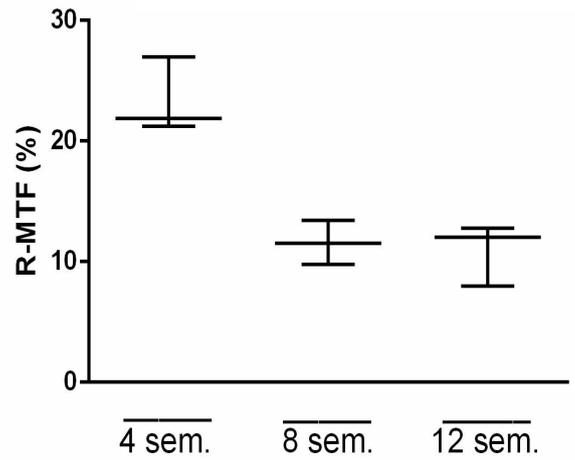


FIGURA 15E- OVX-DOX-

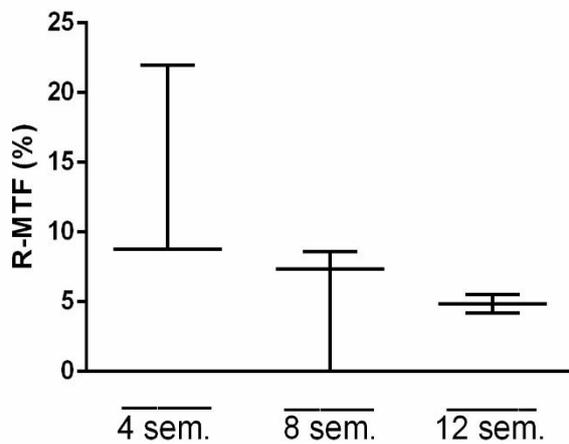


FIGURA 15F- OVX-BIO

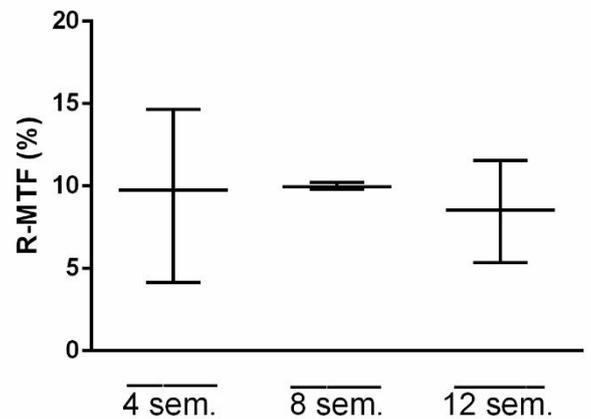
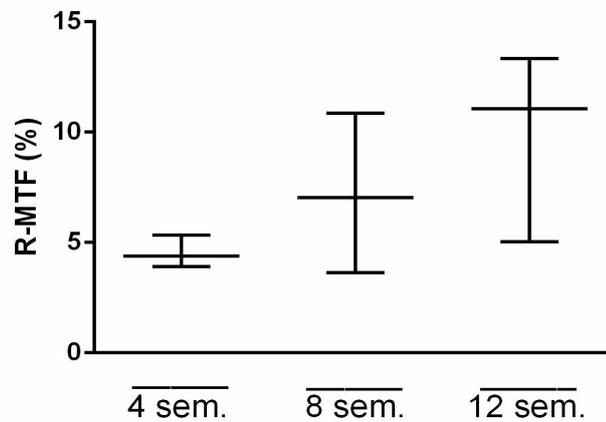


FIGURA 15G- OVX-DOX



Fonte: Do autor

Nota: * Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.2 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Para análise histomorfométrica foi utilizada a porcentagem da formação óssea em relação a área total (AON). Portanto, foi comparada inicialmente a AON (%) dos grupos em cada período experimental (TABELA 2 e FIGURAS 16A-C).

Observou-se que no período de 4 e 8 semanas o grupo OVX-BIO-MEMB apresentou maior formação óssea (%) do que o grupo OVX ($p < 0,05$) (Figuras 17A e B, respectivamente). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre eles nesses períodos. Considerando o período de 12 meses, também não observou-se diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (FIGURA 16C).

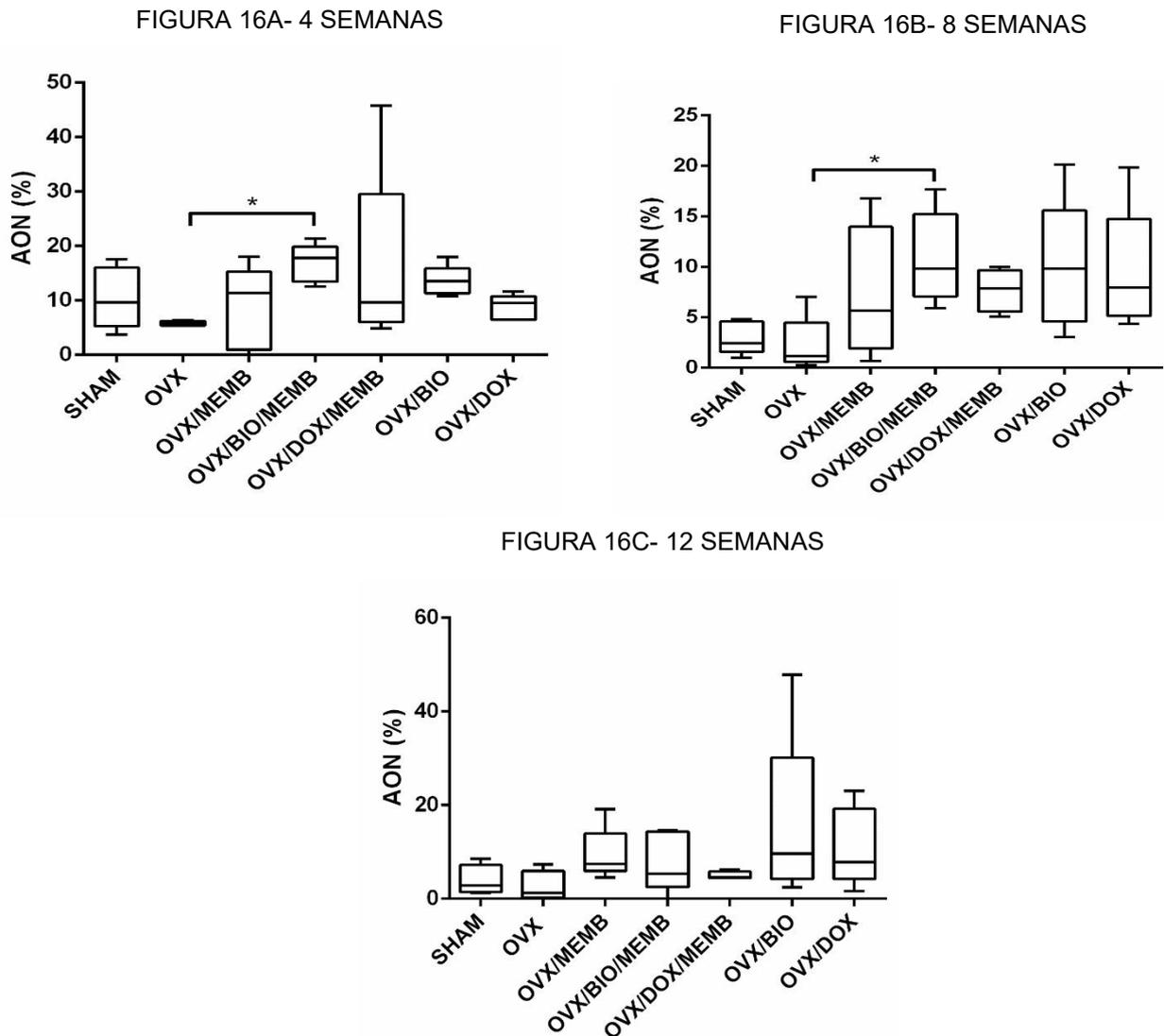
Tabela 2 - Dados de mediana e dos quartis 1 e 3 da % osso de todos os grupos e períodos de avaliação.

| Período | Sham | Ovx | Ovx/Memb | Ovx/Bio/ Memb | Ovx/Dox/ Memb | Ovx/Bio | Ovx / Dox |
|------------|------------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| 4 semanas | 9.61 (5.30 - 16.00) | 5.79 (5.41 - 6.23) | 11.38 (0.98 - 15.26) | 17.81 (13.45 - 19.90)* | 9.59 (6.06 - 29.52)# | 13.52 (11.32 - 15.90) | 9.50 (6.49 - 10.72) |
| 8 semanas | 2.45 (1.60 - 4.58) | 1.13 (0.59 - 4.46) | 5.64 (1.93- 13.95) | 9.83 (7.07 - 15.22)* | 7.86 (5.55 - 9.65) | 9.83 (4.60 - 15.59) | 7.94 (5.15 - 14.74) |
| 12 semanas | 2.84 (1.48 - 7.24) | 1.24 (0.24 - 5.90) | 7.47 (5.95 - 13.95) | 5.35 (2.51 - 14.31) | 4.58 (4.46 - 5.81) | 9.69 (4.21 - 30.19) | 7.84 (4.26 - 19.20) |

Fonte: Do autor

Nota: * indica diferença estatística entre os materiais em um mesmo período de avaliação, # indica diferença estatística entre os períodos de avaliação em um mesmo material ($p < 0.05$).

FIGURAS 16 A-C- Representação gráfica da comparação dos dados histométricos dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais.



Fonte: Do autor

Nota: * Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

As Figuras 17 A-G apresentam os resultados da análise histomorfométrica dos diferentes períodos experimentais dentro de um mesmo grupo.

Verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa apenas no grupo OVX-DOX-MEMB, sendo que, a porcentagem de tecido ósseo formada em relação a área total foi maior no período de 4 semanas do que se comparado ao período de 12 semanas do experimento ($p < 0,05$) (FIGURA 17 E).

FIGURAS 17A-G- Representação gráfica da comparação dos dados histométricos dentro de cada grupo variando-se os períodos experimentais.

FIGURA 17A- SHAM

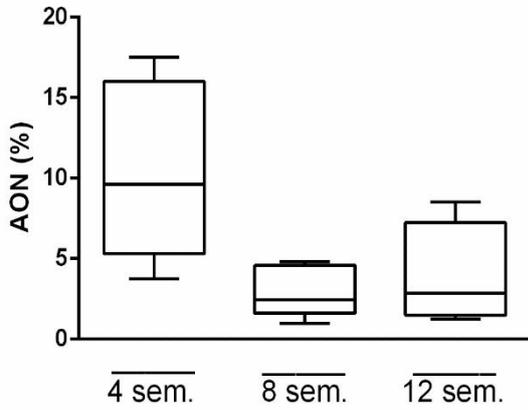


FIGURA 17B- OVX

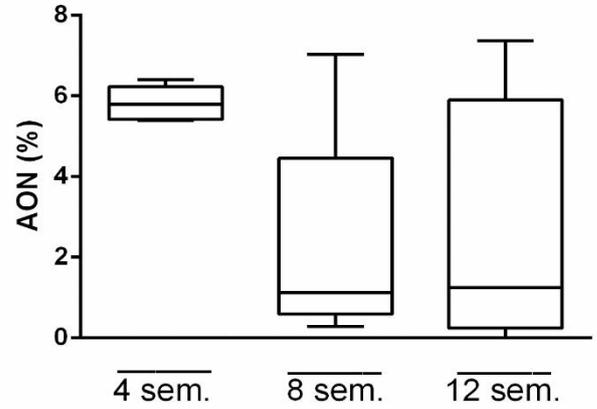


FIGURA 17C- OVX-MEMB

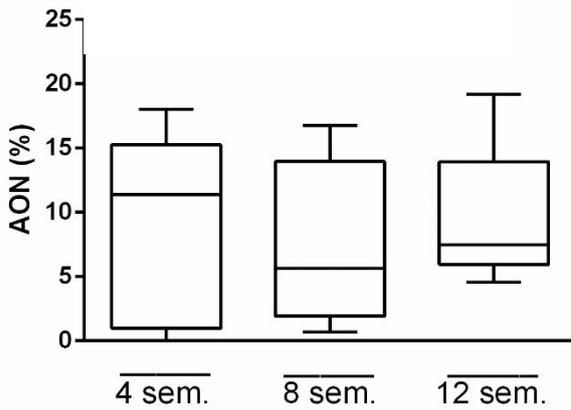


FIGURA 17D- OVX-BIO-MEMB

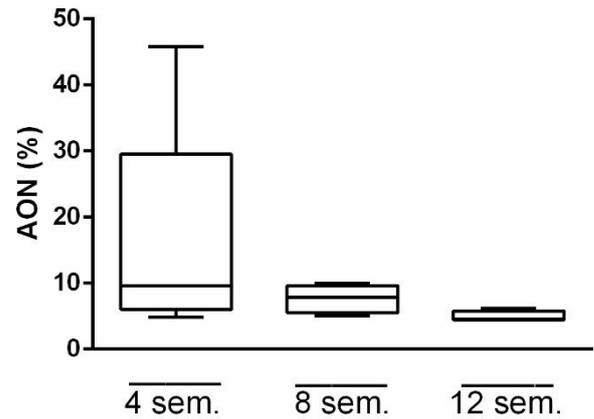


FIGURA 17E- OVX-DOX-MEMB

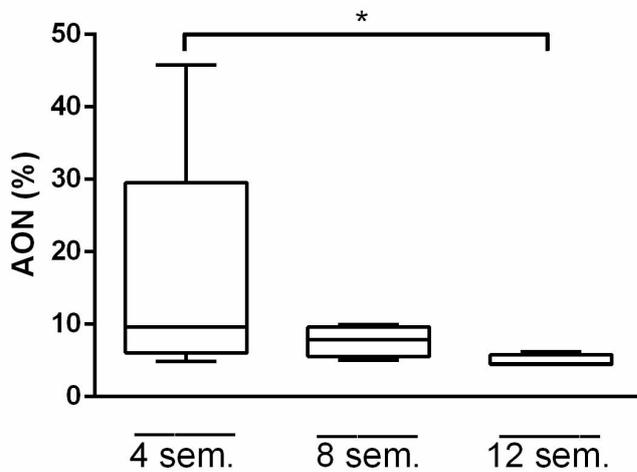


FIGURA 17F- OVX-BIO

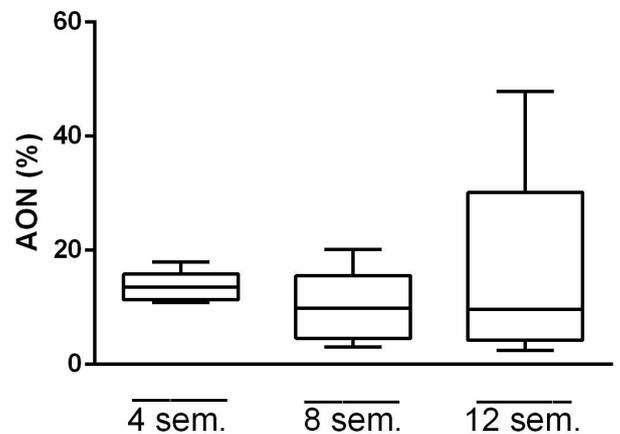
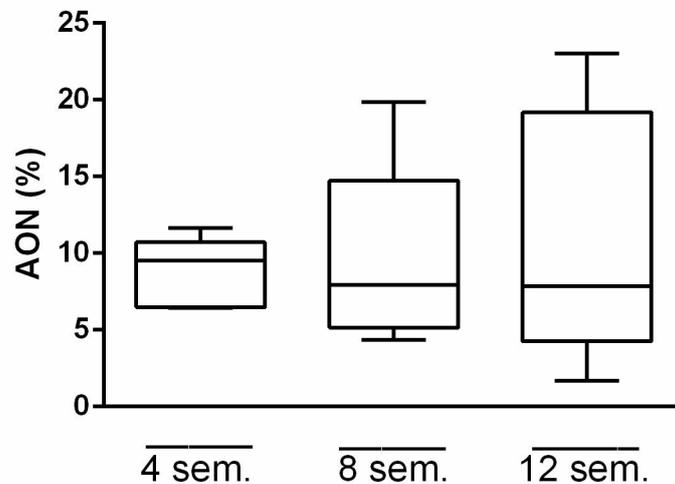


FIGURA 17G- OVX-DOX



Fonte: Do autor

Nota: * Indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.3 ANÁLISE HISTOLÓGICA

As Fotomicrografias (Figuras 18 a 20) são cortes representativos dos grupos estudados nos períodos de 4, 8 e 12. No qual, pela análise morfológica dos cortes histológicos dos defeitos na calvária observou-se um processo de reparo comum a todos os grupos estudados, onde o centro do defeito continha tecido conjuntivo com graus variados de infiltrado inflamatório e o osso recém formado concentrava-se nas bordas do defeito.

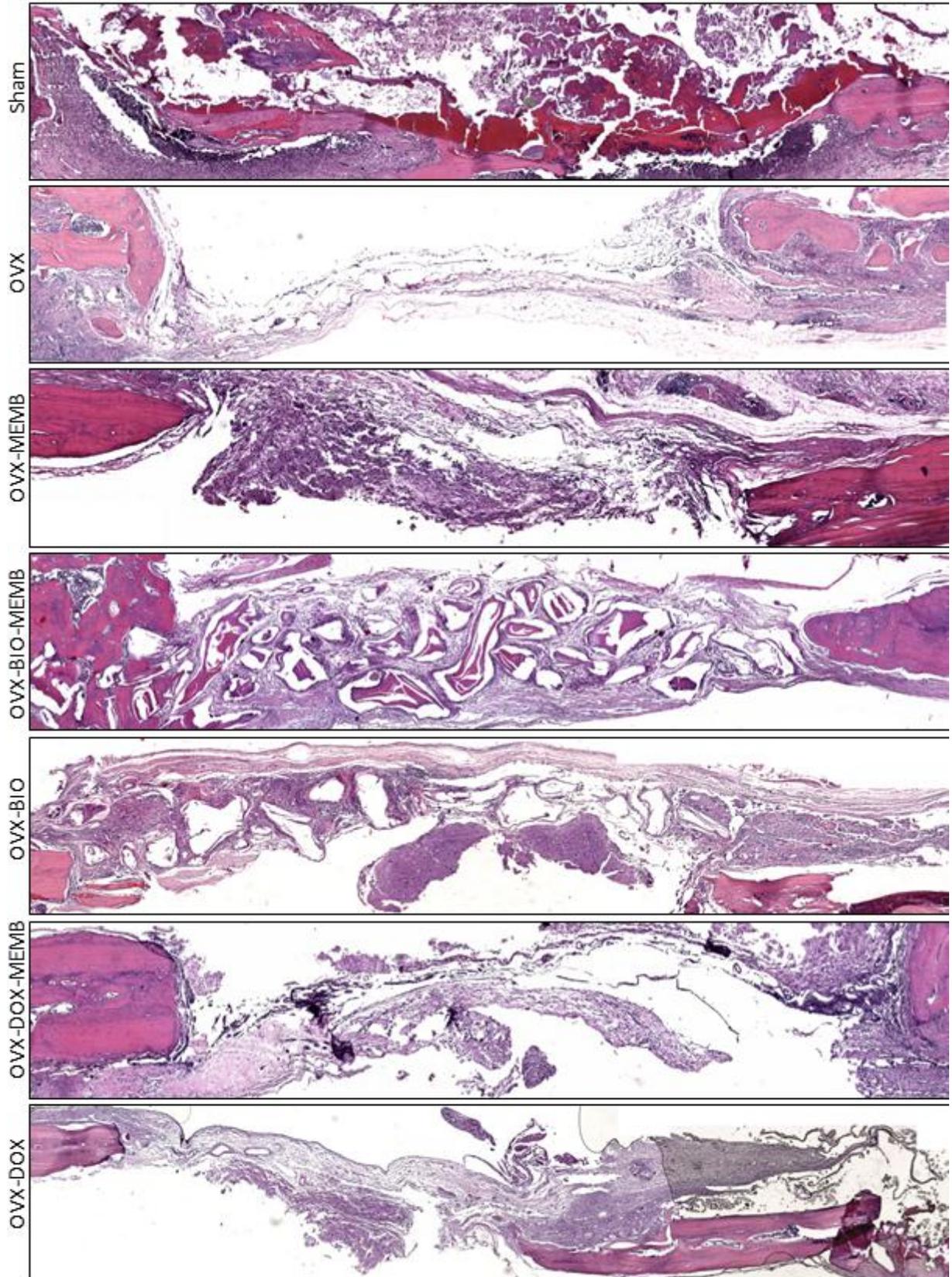
No grupo Sham o reparo foi progressivo, havia pouco osso recém-formado nas bordas e infiltrado inflamatório leve nos períodos de 4 e 8 semanas. No período de 12 semanas observou-se a presença de tecido conjuntivo maduro no centro do defeito e uma maior quantidade de osso nas bordas, que foi insuficiente para levar ao fechamento completo do defeito.

Nos defeitos que receberam a membrana PP observou-se infiltrado inflamatório moderado, acompanhado de uma menor quantidade de osso recém-formado nas bordas do defeito comparado aos outros grupos. Na presença da Doxíciclina o infiltrado foi amenizado, inclusive quando utilizada associada à

membrana. Nos grupos com o Bio-Oss, observou-se partículas do material encapsuladas em todos os períodos, acompanhado de um infiltrado leve a moderado e a presença de osso recém-formado permanecia restrita às bordas do defeito.

Figura 18 - Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de
4

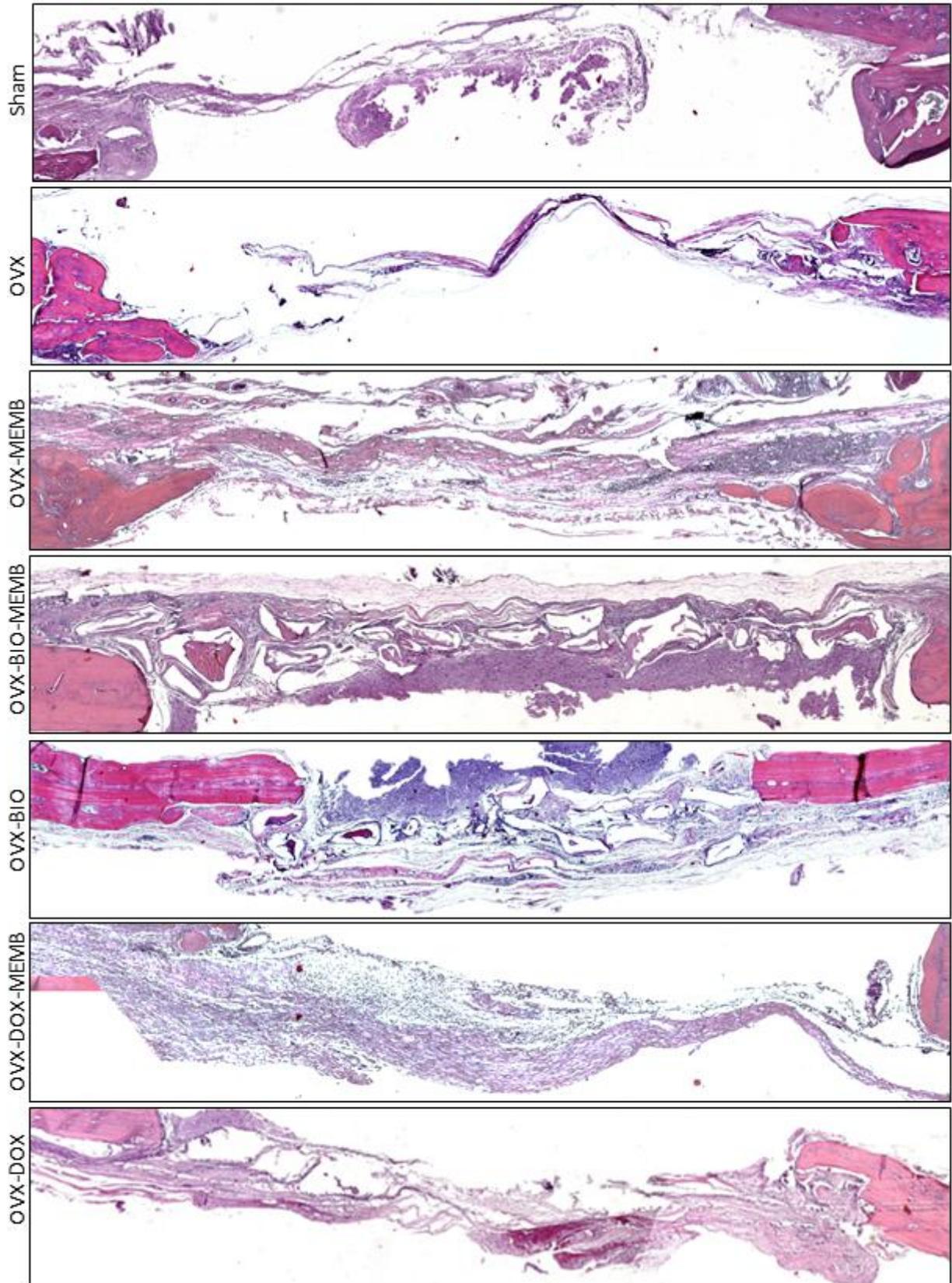
semanas



Fonte: Do autor

Nota: Coloração HE. Objetiva 10X.

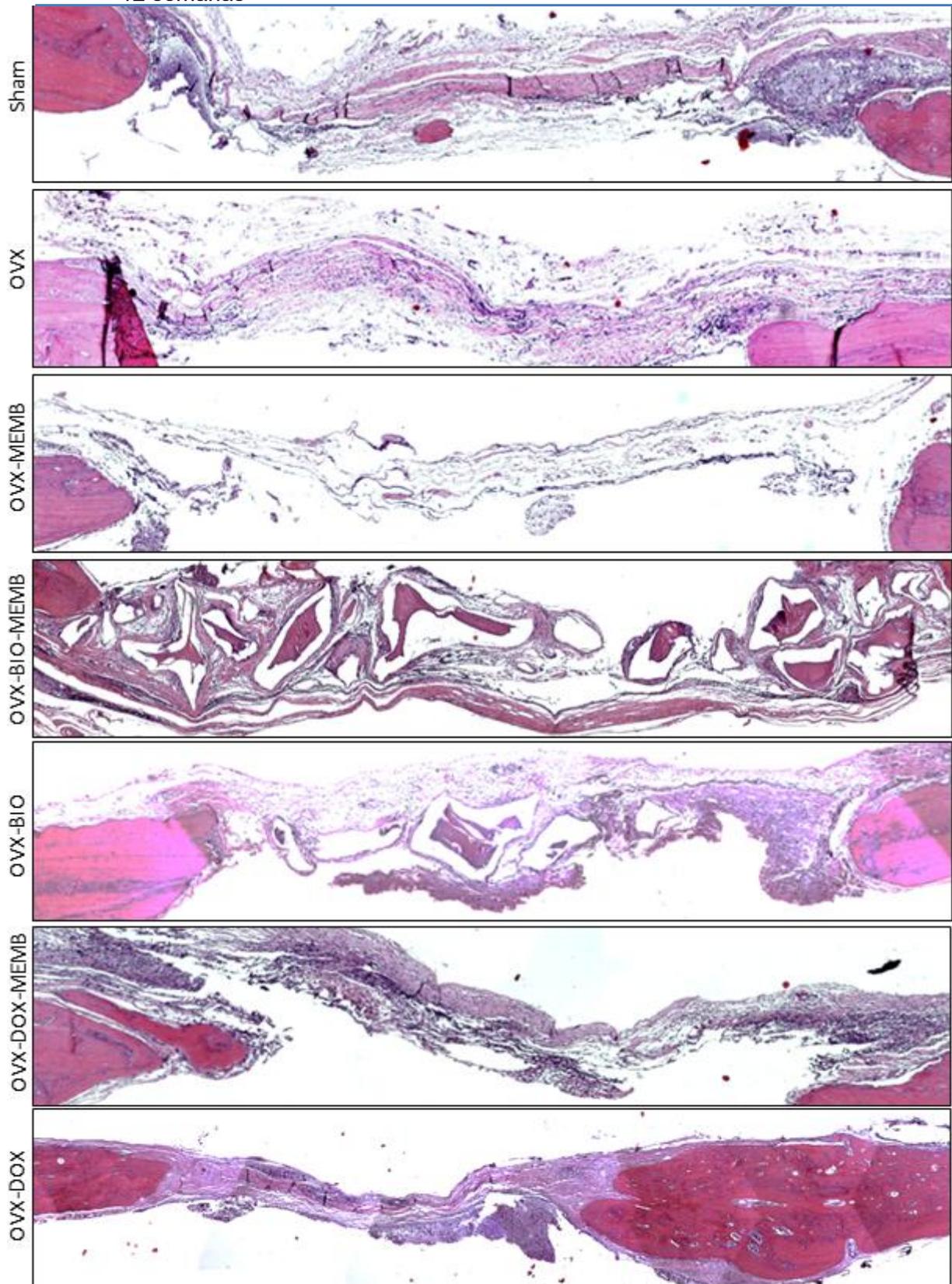
Figura 19 - Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 8 semanas



Fonte: Do autor

Nota: Coloração HE. Objetiva 10X.

Figura 20- Fotomicrografias de cortes representativos dos grupos estudados no período de 12 semanas



Fonte: Do autor

Nota: Coloração HE. Objetiva 10X.

6 DISCUSSÃO

A osteoporose é a doença esquelética sistêmica mais comum associada ao envelhecimento, que afeta milhões de mulheres após a menopausa em todo o mundo (LI et al., 2016). Segundo Dempster et al. (1995), a deficiência de estrogênio causa um aumento na reabsorção óssea de forma desproporcional, o que faz com que essa doença seja caracterizada pela baixa densidade óssea e pela deterioração de suas trabéculas (LI et al., 2016).

Deste modo, indivíduos idosos osteoporóticos estão cada vez mais propensos a procurar tratamento odontológico, incluindo a instalação de implantes e tratamento periodontal (SCALIZE et al., 2016). Portanto, levando-se em consideração que nos tratamentos odontológicos a qualidade e a remodelação óssea são essenciais para o sucesso da terapia, o presente trabalho buscou um modelo experimental que apresentasse uma condição osteoporótica.

Segundo trabalho de Scaliza et al. (2016), considerando que a osteoporose altera o metabolismo ósseo e que a ROG e a necessidade de um biomaterial, seja isolado ou combinado, aumente a disponibilidade óssea, o objetivo do presente estudo foi avaliar o uso isolado ou combinado da membrana não-reabsorvível de polipropileno com gel de Doxiciclina a 10% ou enxerto ósseo bovino sobre a regeneração óssea em defeitos críticos na calvária de ratas osteoporóticas, através de análise microtomográfica e histométrica.

Ratas ovariectomizadas representam um modelo experimental de osteoporose pós-menopausa, uma vez que a ovariectomia causa deficiência de estrogênio (DAI et al., 2014; KURODA et al., 2003). Por outro lado, em relação a avaliação da eficácia do uso de biomateriais em regeneração óssea, o defeito ósseo de tamanho crítico em calvária de ratos tem sido utilizado como um modelo experimental (ARONI et al., 2018; OLIVERIA et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Neste estudo, defeitos com diâmetro de 6 mm foram confeccionados com broca trefina. Na literatura há 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 em 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 3 a 10 mm

(MESSORA et al., 2008; SCHLEGEL et al., 2006; SILVA et al., 2016). 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, modificamos o material de preenchimento do L pois sabemos que quando se usa amálgama e faz-se análise microtomográficas, as imagens obtidas podem ficar deterioradas por artefatos gerados na captação dessas imagens.

O defeito crítico no presente trabalho foi realizado sem a colocação de membrana entre a dura-máter e o biomaterial, pois a dura-máter é apontada como uma fonte de células mesenquimais que participam do processo de reparo da calvária (GOSAIN et al., 2003). 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., 2016).

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., 2016). 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., 2016). 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 (SILVA et al., 2016).

Em relação ao período de avaliação, optou-se por utilizar os períodos de 4, 8 e 12 semanas, pois nas primeiras 4 semanas se trata do período inicial do processo de cura tecidual e da estabilidade dos materiais. Após 8 semanas ou mais pode ser apropriado para se avaliar a cicatrização tardia (BODDE et al., 2008).

Até o momento não existem estudos que avaliaram a utilização de membrana de polipropileno, seja isolada ou em associação com outros biomateriais, em defeitos críticos na presença de níveis reduzidos de estrógeno.

No presente estudo, ao avaliar o volume de tecidos mineralizados dentro do defeito crítico, por meio de análise em Micro-CT, foi verificado maiores valores R-MTF (%) no período de 4 semanas no grupo OVX-MEMB em comparação ao OVX-DOX. Diante disso, observa-se que uso da membrana de PP possibilitou maior formação óssea que a Doxíciclina, o que pode ser explicado pelo fato que a utilização de membranas permite isolar o defeito ósseo do tecido conjuntivo circundante, permitindo que às células precursoras de osso tenham acesso ao espaço destinado à regeneração óssea (SCALIZE et al., 2016).

Foi encontrado apenas um estudo sobre o uso da membrana de PP em defeitos experimentais, onde os autores compararam a regeneração óssea após o uso de membrana com os defeitos preenchidos por coágulo sanguíneo e observaram uma maior formação óssea após a utilização de membrana de PP no período de 21 dias se comparado ao grupo controle. Contudo, são necessários novos estudos para confirmar as vantagens deste material em comparação a outros materiais (DE LUCCA; DA COSTA MARQUES; WEINFELD, 2018).

A maioria dos estudos sobre o uso da membrana de PP encontrados na literatura foram sobre o seu uso após extração dentária, no intuito de preservar o rebordo alveolar, por conseguinte, contribuindo para estabilização do coágulo e regeneração do rebordo alveolar, mostrando resultados positivos ao reparo ósseo (SALAMÃO; SIQUEIRA, 2010; RENDA et al., 2015).

Por sua vez, outros estudos encontraram resultados satisfatórios considerando a nova formação do tecido ósseo reabsorvido através do uso de outros tipos de membranas em modelos experimentais com osteoporose. Scalize et al. (2016), ao avaliar a membrana obtida pela associação do polímero poli(flúoreto de vinilideno-trifluoretileno) e titanato de bário com membrana de PTFE em ratas osteoporóticas, observaram que após 4 semanas os grupos apresentarem parâmetros morfométricos similares entre si e que a membrana poli(flúoreto de vinilideno-trifluoretileno) é promissora para o reparo ósseo em uma situação de osteoporose. Mardas et al. (2017) observou o aumento significativo da neoformação após o uso PTFE em um estudo similar.

Não foram encontrados estudos que comparassem a atuação da Doxíciclina

em comparação ao uso de membrana na neoformação óssea. Conforme Scalize et al. (2016), apesar da Doxíciclina inibir efeitos da inflamação sobre osteoclastogênese e ter a capacidade de estimular a formação óssea, estudos verificaram que seu uso isolado não é capaz de potencializar a formação óssea comparação a outros materiais como o Bio-Oss e o osso autógeno, contudo, a sua associação com esses materiais mostraram melhores resultados (SILVA et al., 2016; ZHANG; DING, KASUGAI, 2019; LUCATELI et al., 2018).

Considerando a análise histológica, verificou-se que os grupos OVX-BIO-MEMB apresentaram maior quantidade de osso que o grupo OVX no período de 4 e 8 semanas de avaliação. Outros estudos também observaram que o uso de membrana; ou Bio-Oss ou associação de ambos tiveram efeitos benéficos em defeitos ósseos na presença de a osteoporose, mostrando melhor comportamento como arcabouço para a regeneração óssea (MARDAS et al., 2017; VAN HOULT et al., 2015; VAN HOULT et al., 2018; SCALIZE et al., 2016).

O Bio-Oss tem sido associado a outros materiais que possam colaborar para um aumento ósseo na regeneração óssea em defeitos ósseos como o plasma rico em fibrina, derivado de matriz do esmalte e Doxíciclina (OLIVEIRA et al. 2015; SHAHRIARI et al., 2012; ZHANG; DING; KASUGAI, 2019). Estudos observaram melhores resultados em relação formação óssea quando Bio-Oss é associado a uma membrana de colágeno ou PTFE, enquanto, Brkovic et al. (2012) não encontraram diferença significativas entre os grupos com ou sem membranas de barreira (KIM et al., 2017; LEE et al. 2015; NOOH et al., 2016; SCHOU et al., 2003).

Além disso, observou-se também nesse estudo, por meio da avaliação histométrica, que o grupo Ovx/Dox/Memb no período de 4 semanas apresentou maior quantidade de tecido ósseo que o mesmo grupo no período de 12 semanas. Isso pode ser explicado pelo fato de que a liberação contínua da Doxíciclina para o ambiente circundante é responsável por promover a neoformação osséa, contudo, a liberação contínua da Doxíciclina diminuiu com o tempo, sendo que, a Doxíciclina é rapidamente liberada nas primeiras 12 horas com o pico de liberação as 48 horas (ZHANG; DING, KASUGAI, 2019).

A respeito da concentração de Doxíciclina utilizada neste estudo, a concentração de 10% possui um efeito não citotóxico em osteoblastos, permitindo a sua diferenciação e maturação (ALMAZIN et al., 2009). Concentração semelhante de Doxíciclina foi avaliada anteriormente por Silva et al. (2016) em relação ao reparo

de defeitos em calvária de ratos, apresentando resultados favoráveis.

A utilização do gel de natrosol como veículo para a Doxíciclina foi proposta por Silva et al. (2016). O gel de natrosol (hidroxietil celulose) é um agente inerte e solúvel em água, amplamente utilizado como base e espessante para shampoos e sabonetes. Esta substância tem sido frequentemente utilizada como base para o gluconato de clorexidina (DAMETTO et al., 2005).

Nas demais análises não houve quaisquer outras diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e dentro de cada grupo variando-se o período de avaliação. Portanto, a regeneração óssea ocasionada pelo uso dos diferentes materiais testados nas ratas osteoporóticas foi igual ao grupo SHAM em que ocorreu a remineralização fisiológica. Esse achado por ser explicado devido ao fato que a deficiência de estrogênio diminui a autofagia e aumenta a apoptose dos osteócitos. Portanto a deficiência de estrogênio induz a apoptose de osteócitos, interferindo na manutenção da homeostase óssea (FLORENCIO-SILVA et al., 2018). Dessa maneira, o uso dos materiais em ratas osteoporóticas proporcionou um reparo semelhante ao fisiológico, não permitindo que o déficit de estrogênio atuasse de forma negativa na formação óssea.

A membrana do tipo não reabsorvível requer uma segunda intervenção cirúrgica pra sua remoção, portanto, a sua maior persistência no local pode provocar a deiscências nos tecidos moles (DIMITRIOU et al., 2012). De acordo com o fabricante a membrana Bone Heal deve ser removida após 7 a 15 dias, entretanto, no presente estudo a membrana foi retirada no momento da eutanásia, podendo este ser um fator limitante do estudo.

Também, deve se ressaltar que outra limitação deste trabalho foi o tamanho da amostra utilizada na avaliação microtomográfica, no qual, foram utilizados apenas 3 animais por grupo, devido ao elevado custo das análises em Micro-CT. Diferente a outros estudos similares, como o estudo de Silva et al. (2016) que utilizaram uma amostra de 4, ou estudo de Scalize et al. (2016) que usou uma amostra de 5 e Zhang, Ding e Kasugai (2019) que utilizaram amostra de 10 animais. Dessa forma, pelo reduzido tamanho da amostra, testes não paramétricos foram utilizados na análise inferencial dos dados.

O preenchimento de defeitos ósseos com biomateriais tem demonstrado um melhor reparo em relação aos defeitos críticos em calvária de ratos (ARONI et al., 2018; DE LUCCA; DA COSTA MARQUES; WEINFELD, 2018; LUCATELI et al.,

2018; OLIVERIA et al., 2015; SILVA et al., 2016). Deste modo, considerando que a associação de biomateriais produz um substituto ósseo biocompatível e osteocondutor e que pacientes osteoporóticos apresentam alterações no metabolismo ósseo, pesquisas comparando condições osteoporóticas tratadas a não tratadas, para examinar o efeito sobre o desempenho biológico de materiais substitutos ósseos são necessárias ((LI et al., 2013; VAN HOULT et al., 2018). Portanto o presente trabalho permitiu analisar diferentes associações no intuito de encontrar o melhor biomaterial para o tratamento de defeitos ósseos em condição osteoporótica.

Considerando as limitações deste estudo, os períodos avaliados e com base nos resultados, a associação de membrana com Bio-Oss pode ser uma alternativa eficaz para o tratamento de pacientes osteoporóticos. Além do mais, estudos sobre a associação de biomateriais com membrana, em tratamentos para ganho ósseo, envolvendo distúrbios ósseos sistêmicos, como a osteoporose, devem ser estimulados.

7 CONCLUSÃO

Considerando-se as limitações desse estudo, pode-se concluir que:

- a) de forma isolada, tanto a membrana de polipropileno, quanto Bio-Oss e Doxiciclina não apresentaram diferença na regeneração óssea de ratas osteoporóticas, se comparadas ao coágulo sanguíneo.
- b) a utilização de membrana de polipropileno associada ao Bio-Oss em ratas osteoporóticas promoveu maior formação óssea do que o coágulo sanguíneo.

REFERÊNCIAS

- ACEVEDO, R. A. Bases clínicas e biológicas da regeneração óssea guiada (ROG) associada a barreiras ou membranas. **Rev Br Periodontia**, v. 11, n. 43, p. 251-257, 2004.
- ALMAZIN, S. M. et al. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro. **J Periodontol.**, v. 80, n. 6, p. 999-1005, 2009.
- ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista ImplantNews**, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.
- ARONI, M. A. T. et al. Loading deproteinized bovine bone with strontium enhances bone regeneration in rat calvarial critical size defects. **Clin Oral Investig.**, v. 23, n. 4, p. 1605-1614, 2019.
- BANG, S. M. et al. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. **Clin Oral Investig.**, v. 25, n. 7, p. 831-837, 2014.
- BETTANY, J. T.; WOLOWACZ, R. G. Tetracycline derivatives induce apoptosis selectively in cultured monocytes and macrophages but not in mesenchymal cells. **Adv Dent Res.**, 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.
- BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Braz J Med Biol Res.**, v. 35, n. 5, p. 613-616, 2002.
- BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONABLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, p. 26-32, 2007.
- BODDE, E. W. et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 85, p. 206-217, 2008.
- BOLUKBASI, N. et al. The use of Platelet rich fibrin in combination with Biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: A histologic and

histomorphometric study. **Cur Ther Res Clin Exp.**, v. 75, p. 15-21, 2013.

BOTTINO, C. M. et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration – A material perspective. **Dent Mater.**, v. 28, n. 7, p. 703-721, 2012.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. **J Craniofac Sur.**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1988.

BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res.**, v. 25, n. 7, p. 1468-1486, 2010.

BOZIC, A. M., HREN, N. I. Osteoporosis and mandibles. **Dentomaxillofac. Radiol.** v. 35, n. 3, p. 178-184, 2005.

BRKOVIC, B. M. et al. Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. **Clin Oral Investig.**, v. 16, n. 2, p. 581–590, 2012.

CALCIOLARI, E. et al. A systematic review on the correlation between skeletal and jawbone mineral density in osteoporotic subjects. **Clin Oral Implants Res.**, v. 00, p. 1–11, 12 abr. 2015.

CALCIOLARI, E. et a. The effect of experimental osteoporosis on bone regeneration: Part 1, histology findings. **Clin Oral Implants Res.**, v. 28, n. 9, p. 101-110, 2017.

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.

CHEN, S. T. et al. Consensus statement and recommended clinical procedures regarding surgical techniques. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 24, p. 272-278, 2009.

CLERGEAU, L. P. et al. Healing response to anorganic implantation in Periodontal

intra bony defects in dogs. Part I. Bone regeneration. A microradiographic study. **J Periodontol.**, v. 67, n. 2, p.140-149, 1996.

COOPER, G. M. et al. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. **Plast Reconstr Surg.**, v. 125, n. 6, p. 1685-1692, 2010.

DAI, Q. G. et al. Ovariectomy induces osteoporosis in the maxillary alveolar bone: An in vivo micro-CT and histomorphometric analysis in rats. **Oral Dis.**, v. 20, n. 5, p. 514–520, 2014.

DAHLIN, C. et al. Healing of bone defects by guided bone regeneration. **Plast Reconstr Surg.**, v. 81, n. 5, p. 672-676, 1988.

DAHLIN, C.; SIMION, M.; HATANO, M. Long-term follow-up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5-year prospective clinical study. **Clin Impl Dent Relat Res**, v. 12, n. 4, p. 263-70, 2010.

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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 99, n. 6, p. 768-772, 2005.

DE LUCCA, L.; DA COSTA MARQUES, M.; WEINFELD, I. Guided bone regeneration with polypropylene barrier in rabbit's calvaria: A preliminary experimental study. **Heliyon**, v. 4, n. 6, p.1-16, 2018.

DEMPSTER, D. W. et al. Temporal changes in cancellous bone structure of rats immediately after ovariectomy. **Bone**, v. 16, n. 1, p. 157–161, 1995.

DEMPSTER, D. W. et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. **J Bone Miner Res.**, v. 28, n. 1, p. 2–17, 2013.

DIMITRIOU, R.; TSIRIDIS, E.; GIANNOUDIS, P. V. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, v. 36, n. 12, p.1392-1404, 2005.

DIMITRIOU, R. et al. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence.

BMC Med., v. 6, n.10, p.1-24, 2012.

DONOS, N.; KOSTPOULOS, L.; KARRING, T. Alveolar ridge augmentation by combining autogenous mandibular bone grafts and non-resorbable membranes. **Clin Oral Implants Res.**, v. 13, n.2, p. 185-191, 2002.

DUARTE, P. M. et al. Effect of estrogen and calcitonin therapies on bone density in a lateral area adjacent to implants placed in the tibiae of ovariectomized rats. **J Periodontol.**, v. 74, n. 11, p. 1618-1624, 2003.

DVORAK, G. et al. Cortical porosity of the mandible in an osteoporotic sheep model. **Clin Oral Implants Res.**, v. 22, n. 5, p. 500–505, 2011.

ESPOSITO, M. et al. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants – a Cochrane systematic review. **Eur J Oral Implantol.**, v. 2, n. 3, p. 167-184, 2009.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Effects of estrogen status in osteocyte autophagy and its relation to osteocyte viability in alveolar process of ovariectomized rats. **Biomed Pharmacother.**, v. 98, p. 406-415, 2018.

FONSECA, H. et al. Skeletal deterioration following ovarian failure: can some features be a direct consequence of estrogen loss while others are more related to physical inactivity? **J Bone Miner Metab.**, v. 33, n. 6, p. 605-614, 2014.

FUJITA, T. et al. Influence of oestrogen and androgen on modelling of the mandibular condylar bone in ovariectomized and orchietomized growing mice. **Arch Oral Biol.**, v. 46, n. 1, p. 57–65, 2001.

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. **Arch Oral Biol.**, v. 52, n. 3, p. 251-259, 2007.

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

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. Bone remodeling. **Ann New Y Acad Sci.**, v. 1092, p. 385-396, 2006.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos Transact A Math Phys Eng Sci.**, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.

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

JOHNSON, R. B. et al. Effect of estrogen deficiency on skeletal and alveolar bone density in sheep. **J Periodont.**, v. 73, n. 4, p. 383-91, 2002.

JONASSON, G.; RYTHÉN, M.; Alveolar bone loss in osteoporosis: a loaded and cellular affair? **Clin Cosmet Investig Dent.**, v. 13, n. 8, p. 95-103, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KALU, D. N. et al., In vivo effects of transforming growth factor-beta 2 in ovariectomized rats. **Bone Miner.**, v. 22, n. 3, p. 209-220, 1993.

KASUYA, S. et al. New Bone Formation Process Using Bio-Oss and Collagen Membrane for Rat Calvarial Bone Defect. **Implant Dent.**, v. 27, n. 2, p.158-164, 2018.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. 2. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends Endocrinol Met.**, v. 23, n. 11, p. 576-81, 2012.

KIM, J. J. et al. Ridge preservation of extraction sockets with chronic pathology using Bio-Oss® Collagen with or without collagen membrane: an experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res.**, n. 28, v. 6, p. 727-33, 2017

KINUGAWA, S. et al. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **J Immunol.**, v. 188, n. 4, p. 1772-1781, 2012.

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

KOSUGI, K. et al. A longitudinal study of the effect of experimental osteoporosis on bone trabecular structure in the rat mandibular condyle. **Cranio**, v. 31, n. 2, p. 140–150, 2013.

KURODA, S. et al. Bone mineral density of the mandible in ovariectomized rats: analyses using dual energy X-ray absorptiometry and peripheral quantitative computed tomography. **Oral dis.**, v. 9, n. 1, p. 24–28, 2003.

LEE, J. S. et al. Ridge regeneration of damaged extraction sockets using rhBMP-2: an experimental study in canine. **J o Clin Periodontol.**, v. 42, p. 678–687, 2015.

LI, K. C. et al. Healing of osteoporotic bone defects by baculovirus-engineered bone marrow-derived MSCs expressing MicroRNA sponges. **Biomat.**, v. 74, p. 155–166, 2016.

LUCATELI, R. L. et a., Doxycycline and Autogenous Bone in Repair of Critical-Size Defects. **Implant Dent.**, v. 27, n. 4, p. 461-466, 2018.

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

MAIORANA, C. et al. Reduction of autogenous bone graft resorption by means of Bio-Oss(r) Coverage: a prospective study. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, v. 25, n. 1, p. 19-25, 2005.

MARIANO, R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in the calvaria of diabetic rat. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v, 109, n. 1, p. 72-78, 2010.

MARTINI, L. A. et al. Prevalência de diagnostico auto-referido de osteoporose, Brasil. **RSP.**, v. 4, n. 2, p. 107-116, 2009.

MARDAS, N.; CHADHA, V.; DONOS, N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res.**, v. 21, n. 7, p. 688-698, 2010.

MARDAS, N. et al. Guided bone regeneration in osteoporotic conditions following treatment with zoledronic acid. *Clin Oral Implants Res.*, v. 28, n. 3, p. 362-371, 2017.

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

MELLONIG, J. T. Human histologic of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. ***Int J Periodontics Restorative Dent.***, v. 20, n. 1, p. 9-20. 2000.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria, ***J Periodontal Res.***, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2007.

MICLAU, T.; HELNS, J. A. Molecular aspects of fracture healing. ***Current Opinion In Orthopedics***, v. 11, p.367-371, 2000.

MONTEIRO, A. S. F. et al. Barreiras de poliuretano e PTFE para Regeneração Óssea Guiada: estudo histomorfométrico no osso parietal de coelhos. ***Ciência Odontológica Brasileira***, v. 11, n. 4, p. 6-12, 2008.

NOOH, N. et al. Real-Time Assessment of Guided Bone Regeneration in Standardized Calvarial Defects in Rats Using Bio-Oss With and Without Collagen Membrane: An In Vivo Microcomputed Tomographic and Histologic Experiment. ***Int J Periodontics Restorative Dent.***, n. 36, p. 139-149, 2016.

NYMAN, S. at al. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. ***J Clin Periodontol.***, v.9, n.3, p.257-65, 1982.

OLIVERIA, M. R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. ***Int J Oral Maxillofac Surg.***, v. 44, n. 5, p. 649-655, 2015.

PARFITT, A. M. et al. Bone histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units: Report of the asbmr histomorphometry nomenclature committee. ***J Bone Miner Res.***, v. 2, n. 6, p. 595–610, 2009.

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

PARK, J. B. Healing of extraction socket grafted with deproteinized bovine bone and acellular dermal matrix: histomorphometric evaluation. **Implant Dent.**, v. 19, n. 4, p. 307-313, 2010.

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

PIATTELLI, M. et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus lifting procedure: A histologic long-term report of 20 cases in man. **Int J Oral Maxillofac Implants.**, v. 14, n. 6, p. 835-840, 1999.

PHILIP, J. et al. Histologic Evaluation of Osseous Regeneration Following Combination Therapy With Platelet-Rich Plasma and Bio-Oss in a Rat Calvarial Critical-Size Defect Model. **J Oral Implantol.**, v. 41, n. 5, p. 543-549, 2015.

PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003.

RENDA, M. D. O. et al. Guided bone regeneration with polypropylene barrier intentionally exposed to the oral environment – Clinical case report. **Int J Clin Dent.**, v. 8, n. 1 p. 7-14. 2015.

RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: now and the future. **Lancet.**, v. 9, n. 377, p. 1276-1287, 2011.

ROODMAN, G. D. Cell biology of the osteoclast. **Exp Hematol.**, v. 27, n. 8, p. 1229-1241, 1999.

ROODMAN, G. D. Regulation of osteoclast differentiation. **Ann New Y Acad Sci.**, v. 1068, p. 100–109, 2006.

RUBIN, P. J.; YAREMCHUCK, M. J. Complications and toxicities of implantable biomaterials used in facial reconstructive and aesthetic surgery: a comprehensive review of the literature. **Plast Reconstr Surg.**, v. 100, n. 5, p. 1336-1353, 1997.

SALOMÃO, M.; SIQUEIRA, J. T. T. Recuperação do rebordo alveolar através de barreira exposta ao meio bucal. Novo paradigma? **Revista Catarinense de Implantodontia**, v. 1, n. 12, p. 26-28, 2010.

SCALIZE, P. H. et al. Poly(Vinylidene Fluoride-Trifluoroethylene)/barium titanate membrane promotes de novo bone formation and may modulate gene expression in osteoporotic rat model. **J Mater Sci Mater Med.**, v. 27, n. 12, p. 1-10, 2016.

SCANTLEBURY, T. V. 1982-1992: A decade of technology development for guided tissue regeneration. **J Periodontol.**, v.64, p.1129-1137, 1993.

SCHLEGEL, K. A. et al. The monocortical critical size bone as an alternative experimental model in testing bone substitute materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 1, p.7-13, 2006.

SCHLIEPHAKE, H. et al. Guided bone regeneration around endosseous implants using a resorbable membrane vs a PTFE membrane. **Clin Oral Implants Res.**, v. 11, n. 3, p. 230-241, 2000.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin Orthop Relat Res.**, v. 205, p. 299-308, 1986.

SCHOU, S. et al. Anorganic porous bovine-derived bone mineral (Bio-Oss) and ePTFE membrane in the treatment of peri-implantitis in cynomolgus monkeys. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, n. 5, p. 535-47, 2003.

SHAHRIARI, S. et al. Effect of the combination of enamel matrix derivatives and deproteinized bovine bone materials on bone formation in rabbits' calvarial defects. **Dent Res J.**, 2012 n. 9, v. 4, p. 422-426, 2012.

SILVA, A. C. et al. Effect of Doxycycline in gel form on bone regeneration: histomorphometric and tomographic study in rat calvaria. **J Periodontol.**, v. 87, n. 1, p. 74-82, 2016.

SILVA, R. V. et al. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. **Int J of Oral Maxillofac Surg.**, v. 34, n. 2, p. 78-184, 2005.

SIMION, M. et al. Vertical ridge augmentation by expanded-polytetrafluoroethylene membrane and a combination of autogenous bone graft and deproteinized anorganic bovine bone (Bio-Oss). **Clin Oral Implants Res.**, v. 18, n. 5, p. 620-629, 2007.

TANAKA, M. et al. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar

bone. **J Periodontal Res.**, v. 37, p. 161–165, 2002.

UDAGAWA, N. et al. Minocycline to be used a potential anti bone resorption agents due to the suppression of osteoclastic bone resorption. **J Oral Biosci.**, v. 55, n. 1, p. 16-22, 2013.

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

VAN HOUDT, C. I. A. et al. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss[®] for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 106, v. 1, p. 131–142, 2016.

VAN HOUDT, C. I. A. et al. The performance of CPC/PLGA and Bio-Oss[®] for bone regeneration in healthy and osteoporotic rats. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 106, n. 1, p. 131–142, 2018.

ZHANG, P.; DING, L.; KASUGAI, S. Effect of doxycycline doped bone substitute on vertical bone augmentation on rat calvaria. **Dent Mater J.**, v. 38, n. 2, p. 211-217, 2019.

ZELLIN, G.; GRITLI-LINDE, A.; LINDE A. Healing of mandibular defects with diferent biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. **Biomaterials**, v. 16, n. 8, p. 601-609, 1995.

ZEPPINI, L. A. S. Barreira de polipropileno – Uma nova abordagem para regeneração óssea guiada (ROG). **Revista de Odontologia da Academia Tiradentes de Odontologia**, v. 14, n. 5, p. 301-307, 2014.

WANG, D. et al. Bone regeneration in critical-sized bone defect enhanced by introducing osteoinductivity to biphasic calcium phosphate granules. **Clin Oral Implants Res.**, v. 28, n. 3, p. 251-260, 2017.

WAUGH, H. V.; SHERRATT, J. A. Macrophage dynamics in diabetic wound healing. **Bull Math Biol.**, v. 68, n. 1, p. 197-207, 2006.

YIP, I. et al. Healing of calvaria defect with various bone substitutes. **Clin Oral Impl Res.**, v. 26, n. 5, p. 606-614, 2015.

ANEXO A



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



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Regeneração óssea guiada por membrana de polietileno associada ou não a doxicilina a 10% e osso bovino em defeito ósseo crítico de ratas osteoporóticas: estudo histométrico, imunoistoquímico e microtomográfico”, registrada com o nº 44/2017, sob a responsabilidade de Ronaldo Célio Mariano, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

| | |
|-------------------------|---|
| Finalidade | () Ensino (X) Pesquisa científica |
| Vigência da autorização | De 28/08/2017 a 15/07/2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Rato Wistar / heterogênico |
| Nº de animais | 60 |
| Sexo | Fêmeas |
| Origem | Biotério Central da UNIFAL |

Alfenas, 28 de Agosto de 2017.


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