



**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



**GUILHERME MENALI GOMES**

**EFEITO DO GEL DE DOXICICLINA A 10% NA CALVÁRIA DE RATAS  
OSTEOPORÓTICAS: ESTUDO MICROTOMOGRÁFICO.**

Alfenas/MG

2019

**GUILHERME MENALI GOMES**

**EFEITO DO GEL DE DOXICICLINA A 10% NA CALVÁRIA DE RATAS  
OSTEOPORÓTICAS: ESTUDO MICROTOMOGRÁFICO.**

Dissertação de Mestrado, apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano.

Coorientador: Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann.

Alfenas/MG

2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

Gomes, Guilherme Menali.

Efeito do gel de doxíciclina a 10% na calvária de ratas osteoporóticas:  
estudo microtomográfico / Guilherme Menali Gomes. -- Alfenas, MG, 2019.  
89 f. : il. –

Orientador: Ronaldo Célio Mariano.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade  
Federal de Alfenas, 2019.

Bibliografia.

1. Doxíciclina. 2. Osteoporose. 3. Materiais Biocompatíveis. 4.  
Regeneração Óssea. I. Mariano, Ronaldo Célio. II. Título.

CDD 617.605



**GUILHERME MENALI GOMES**

EFEITO DO GEL DE DOXICICLINA A 10% NA CALVÁRIA DE RATAS OSTEOPO-  
RÓTICAS. ESTUDO MICROTOMOGRÁFICO.

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: 13/03/2019

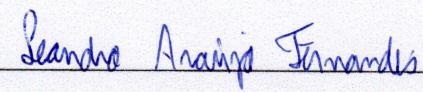
Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

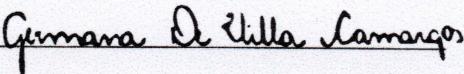
Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes

Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Germana de Villa Camargos

Instituição: Universidade Federal de Uberlândia  
UFU

Assinatura: 

## **Agradecimentos**

À Deus por proporcionar força e fé para superar as dificuldades.

Agradeço profundamente aos meus pais, Nilson e Elenisa, e minha irmã Michelle por serem meus pilares e amor incondicional, apoiando incansavelmente em todas as minhas fraquezas e momentos de dificuldades, incentivando a não desanimar perante os obstáculos. Agradeço por todos os esforços que foram passados para que eu pudesse estar aqui, pela abdicação de seus próprios sonhos e pelos valores que me atribuíram. Obrigado pelo amor, perseverança e por me ensinarem a ter paciência para solucionar as coisas. Obrigado, também, aos meus tios e tias, primos e primas e minhas avós que tanto me ajudaram e me aconselharam nesse período. Vocês são meu orgulho e se cheguei até aqui foi por ter vocês ao meu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr, Ronaldo Célio Mariano, pela oportunidade concedida de realizar uma pesquisa, proporcionando-me aprendizagem não somente técnica, mas, com certeza, na vida pessoal e profissional. Agradeço pelos anos de convivência, desde meu segundo ano de graduação, pelos incentivos dados e pelas experiências geradas, me ensinado desde quando aprendi a empunhar um bisturi e a ouvir os puxões de orelha “ olha o vício! ”. Obrigado pelo auxílio prestado neste trabalho, sobretudo, por nortear os caminhos aos quais seguirei.

Ao meu coorientador e coordenador do programa de mestrado, Prof. Dr, João Adolfo Costa Hanemman pela fibra e moral na condução dos eventos, pela ajuda concedida quando se podia e pela humildade diária, desde minha graduação até a formação de mestre, dignas de admiração.

Ao Prof. Dr. Denismar Alves Nogueira, grande amigo e mestre “jedi”. Agradeço demais pela amizade construída, por ser uma pessoa muito humilde e simples para administrar as situações. Obrigado por fazer a estatística ser menos complicada e muito obrigado por tudo que você me ensinou e me auxiliou. Aos momentos de tanta descontração e pelas amizades formadas com os funcionários e professores do ICEx Unifal, que, sem vocês, não poderia ter chegado até aqui.

À Prof. Dra. Francisca Isabel Ruela, agradeço imensamente pelos dois anos seguidos de estágio docente que puderam me evoluir e amadurecer nas relações interpessoais e no ensinamento aos alunos. Desde a graduação sendo sempre disponível e durante todo esse excelente tempo de convívio só pude aumentar minha admiração. Tenho enorme gratidão pela responsabilidade que me incumbiu diversas vezes, onde pude crescer como profissional e como pessoa, pela calma diária e por guiar meu caminho acadêmico, bem como aos

professores Geraldo S. Veronesi e João Ermelindo A. Costa que diariamente me ensinavam diversos atributos de modo tão simples, e aos funcionários da Clínica Integrada II da Odontologia.

Ao Prof. Carlos Silva, Carlinhos, meu grande amigo e aconselhador de plantão, à Profa. Dra. Daniela C. Barroso e ao Prof. Dr. Edmer S. Pereira Jr., diretor da Faculdade de Odontologia da UNIFAL, grato pelos conselhos que sempre foram muito carinhosos e solícitos comigo e que tanto fizeram e fazem por nossa amada faculdade.

À Profa. Dra. Germana V. Camargos por ter me auxiliado durante o percurso e pela parceria com a Universidade Federal de Uberlândia, UFU-MG, e à Profa. Dra. Juliana, obrigado por tudo.

Aos funcionários da radiologia, esterilização, biotério, estatística e clínica, e aos meus amigos pessoais que tanto me ajudaram e que colaboraram para conclusão deste trabalho, compartilhando momentos ímpares.

Aos meus amigos e amigas da turma do Mestrado, que passaram tantos momentos únicos ao longo desses anos, gratidão pelo convívio. Aos amigos e professores do curso de especialização em ortodontia no IMP que sempre me cobriram na correria diária. Em especial, aos colegas de projeto, Giovanni Nicoli e Luís Henrique Alves, meu “padrasto e avô”, que compartilharam tantas brincadeiras, esforços e experiências comigo, pessoais e profissionais ao longo dessa pesquisa. Gratidão por terem sido meus colegas durante todo o curso.

A todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa, ao longo desses anos. Obrigado pela confiança e apoio de cada um de vocês.

A Unifal-MG, meu berço acadêmico, que desde os tempos de Efoa me acolhe e me projetou como profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG, e todo corpo docente.

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

Meu leal, muito obrigado.

*“ O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou, mas sim,  
pelas dificuldades que superou no caminho. ”*

*Abraham Lincoln.*

## RESUMO

O progresso na área cirúrgica e reabilitadora odontológica tem possibilitado o emprego de agentes otimizadores do processo de reparação tecidual inclusive sob influências sistêmicas. A osteoporose é considerada uma doença de saúde pública. Mais prevalente com o avanço da idade e em períodos pós-menopausa interfere no mecanismo de reparação óssea, levando à baixa densidade mineral. A doxiciclina, produto com propriedades antibióticas, anti-inflamatórias apresenta funções relevantes sobre o tecido ósseo e se torna um recurso útil para ser analisado na reparação de defeitos ósseos críticos em situações de distúrbios metabólicos, como a osteoporose. O objetivo do trabalho foi analisar o efeito do gel de doxiciclina a 10% sobre a regeneração óssea de defeitos de tamanho críticos em calvárias de ratas ovariectomizadas. Foram utilizadas 68 ratas Wistar, das quais 45 foram ovariectomizadas (OVX) e 15 sham-ovariectomizadas (controle positivo). Foram eutanasiadas, após 8 semanas, 4 ratas OVX e 4 SHAM-OVX para caracterização microtomográfica da osteoporose no fêmur. Os demais animais foram submetidos à cirurgia para criação de um defeito ósseo crítico na calvária utilizando uma broca trefina de 6mm de diâmetro. Posteriormente, os 60 animais foram divididos em 4 grupos (n= 15): 1 – SHAM (cirurgia fictícia de ovariectomia e defeito preenchido por coágulo sanguíneo); 2 – OVX-CS (coágulo sanguíneo); 3 – OVX-DOX (gel de Doxiciclina a 10%) e OVX-AUT (osso autógeno). Os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais/período. Após 4, 8 e 12 semanas da cirurgia, foram eutanasiados e submetidos a análise microtomográfica. Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística com nível de significância de 5% (teste de Shapiro-Wilk, seguido por teste de Tukey e Anova). A análise microtomográfica mostrou maior volume ósseo (BV), percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV) para o grupo OVX-AUT com diferenças estatísticas para os demais grupos. Não houveram diferenças significantes entre os grupos OVX-DOX, SHAM e OVX-CS. Conclui-se que o do gel de doxiciclina a 10% não apresentou resultados superiores no desempenho como biomaterial no preenchimento de defeitos críticos das calvárias de ratas ovariectomizadas, ainda que verificada diferenças estatísticas em Tb.Th e Tb.Sp.

Palavras-chave: Doxiciclina. Osteoporose. Materiais Biocompatíveis. Regeneração Óssea.

## ABSTRACT

Progress in the surgical and dental rehabilitation area has enabled the use of optimizing agents of the tissue repair process even under systemic influences. Osteoporosis is considered a public health disease. More prevalent with advancing age and in postmenopausal periods interferes with the bone repair mechanism, leading to low mineral density. Doxycycline, a product with antibiotic and anti-inflammatory properties, has relevant functions on the bone tissue and becomes a useful resource to be analyzed in the repair of critical bone defects in situations of metabolic disorders, such as osteoporosis. The objective of this study was to analyze the effect of 10% doxycycline gel on bone regeneration of critical size defects in calvaria of ovariectomized rats. Sixty-eight Wistar rats were used, of which 45 were ovariectomized (OVX) and 15 sham-ovariectomized (positive control). Euthanasia, after 8 weeks, were 4 OVX and 4 SHAM-OVX rats for microtomographic characterization of osteoporosis in the femur. The remaining animals were submitted to surgery to create a critical bone defect in the calvaria using a 6mm diameter trephine drill. Subsequently, the 60 animals were divided into 4 groups (n = 15): 1 - SHAM (fictive surgery of ovariectomy and defect filled by blood clot); 2 - OVX-CS (blood clot); 3 - OVX-DOX (10% Doxycycline gel) and OVX-AUT (autogenous bone). The animals were divided into 4 groups with 5 animals / period. After 4, 8 and 12 weeks of surgery, they were euthanized and submitted to microtomographic analysis. The results were submitted to statistical analysis with significance level of 5% (Shapiro-Wilk test, followed by Tukey and Anova test). The microtomographic analysis showed higher bone volume (BV), percentage of bone volume in relation to tissue volume (BV / TV) for the OVX-AUT group with statistical differences for the other groups. There were no significant differences between the OVX-DOX, SHAM and OVX-CS groups. It was concluded that the 10% doxycycline gel did not present significant statistical results in its performance as biomaterial to fill critical bone defects of calvaria in rats female with bone metabolism altered by osteoporosis, even that was verified differences among groups and among the periods to trabecular thickness (Tb.Th) and to trabecular separation (Tb.Sp).

Keywords: Doxycycline. Osteoporosis. Biocompatible materials. Bone Regeneration.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Doxiciclina estrutural.....	29
Figura 2 –	Esquema da atividade das tetraciclinas atuando na relação RANK/RANL.....	34
Figura 3 –	Sequência de etapas de procedimentos de ovariectomia bilateral.....	41
Figura 4 –	Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos da porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV) dos animais OVX e SHAM.....	45
Figura 5 –	Imagens da caracterização da osteoporose após procedimento ovariectomia.....	45
Figura 6 –	Planejamento esquemático do defeito crítico.....	47
Figura 7 –	Sequência de etapas dos procedimentos operatórios da cirurgia de criação do defeito crítico na calvária das ratas osteoporóticas (“A” até “L”).....	47
Figura 8 –	Imagens do microtomógrafo da UFU – MG e software de captação (“A” até “F”).....	50
Figura 9 –	Imagem da tela inicial do software Dataviewer®. Correção e posicionamento dos planos (“A” – “D”).....	51
Figura 10 –	Imagem demonstrando o <i>threshold</i> , que pode produzir imagens subvalorizadas ou supervalorizadas.....	53
Figura 11 –	Representação esquemática do método em 3D. Aplicação dos círculos para delimitar a área calculada de Tb.Th e Tb.Sp.....	55
Figura 12 –	Gráfico de médias de volume ósseo (BV), em mm <sup>3</sup> , para os grupos experimentais.....	84
Figura 13 –	Gráfico de médias do BV/TV, em %, para os grupos experimentais.....	84
Figura 14 –	Gráfico de médias de BS para os grupos experimentais.....	85
Figura 15 –	Gráfico da média dos grupos do parâmetro Tb.Th para os grupos experimentais.....	85

Figura 16 –	Gráfico do parâmetro Tb.Th distribuído a média de cada grupo por período experimental.....	86
Figura 17 –	Gráfico do parâmetro Tb.Th para as médias dos períodos experimentais.....	86
Figura 18 –	Gráfico de médias da distância entre as trabéculas (Tb.Sp), expressa em mm, para os grupos.....	87
Figura 19 –	Gráfico das médias do número de trabéculas (Tb.N) por unidade de comprimento, expresso em 1/mm, para os grupos experimentais.....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos referentes porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV).....	44
Tabela 2 –	Banco de Dados microtomográficos obtidos da análise do CTan®.....	56
Tabela 3 –	Médias, mediana e desvio padrão do volume ósseo (BV), em mm <sup>3</sup> , de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	58
Tabela 4 –	Médias, mediana e desvio padrão do percentual de volume ósseo (BV/TV), em %, de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	55
Tabela 5 –	Médias, medianas e desvio padrão do volume ósseo (BS), em mm <sup>2</sup> , de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	59
Tabela 6 –	Médias, mediana e desvio padrão da espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	60
Tabela 7 –	Médias, medianas e desvio padrão da distância das trabéculas ósseas (Tb.sp), em mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	61
Tabela 8 –	Médias, medianas e desvio padrão do número de trabéculas ósseas (Tb.N), expresso em 1/mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE –	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística .....	15
FDA –	Food and Drug Administration .....	26
MMPs –	Metaloproteinases da matriz extracelular .....	28
RANKL –	Receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante .....	31
RANK –	Receptor de diferenciação de osteoclastos .....	31
OPG –	Osteoprotegerina .....	32
TNF $\alpha$ –	Fator de necrose tumoral alfa .....	33
RAR –	Raspagem e alisamento radicular .....	36
PVP-I –	Polivinilpirrolidona-iodado .....	41
ROI –	Região de interesse .....	43
VOI –	Volume de interesse .....	43
ASBMR –	Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral .....	52
E.D.T.A. –	Ácido etilenodiaminotetracético .....	56

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	CONCEITOS DE BIOMATERIAIS .....	18
2.2	HISTÓRICO E BUSCA POR SUBSTITUTOS ÓSSEOS .....	18
2.3	CARACTERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS .....	19
2.4	TIPOS DE BIOMATERIAS .....	20
2.5	OSTEOPOROSE .....	22
2.6	DOXICICLINA E AS TETRACICLINAS .....	26
2.6.1	<u>Histórico</u> .....	26
2.6.2	<u>Ação e características clínicas</u> .....	27
2.6.3	<u>Mecanismo de atuação das tetraciclina no processo de inibição da osteoclastogênese</u> .....	30
2.6.4	<u>Uso do gel de doxiciclina</u> .....	35
3	<b>OBJETIVO</b> .....	38
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	39
4.2	SELEÇÃO DOS ANIMAIS .....	40
4.3	INDUÇÃO CIRÚRGICA DA OSTEOPOROSE (OVARIECTOMIA) .....	40
4.3.1	<u>Análise Microtomográfica da verificação de osteoporose</u> .....	42
4.3.2	<u>Análise estatística para determinação da osteoporose</u> .....	44
4.4	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM CALVÁRIAS .....	46
4.5	EUTANÁSIA .....	49
4.6	PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS .....	49
4.7	ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO NAS CALVÁRIAS .....	49
4.7.1	<u>Obtenção das imagens microtomográficas</u> .....	49
4.7.2	<u>Preparo das imagens microtomográficas</u> .....	51
4.7.3	<u>Análise das imagens microtomográficas</u> .....	52

4.7.3.1	<b><u>Seleção dos slices (cortes microtomográficos) do defeito crítico na imagem</u></b> .....	52
4.7.3.2	<b><u>Binarização das imagens</u></b> .....	52
4.7.3.3	<b><u>Escolha e delimitação do ROI</u></b> .....	54
4.7.3.4	<b><u>Análise em 3D – Aquisição de parâmetros volumétricos e de densidade</u></b> .....	54
4.7.3.5	<b><u>Análise estatística da microtomografia</u></b> .....	55
5	<b>RESULTADOS</b> .....	56
5.1	<b>ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	56
5.1.1	<b><u>Volume ósseo (BV)</u></b> .....	57
5.1.2	<b><u>Porcentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV)</u></b> .....	58
5.1.3	<b><u>Superfície óssea (BS)</u></b> .....	58
5.1.4	<b><u>Espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th)</u></b> .....	58
5.1.5	<b><u>Distância das trabéculas ósseas (Tb.Sp)</u></b> .....	58
5.1.6	<b><u>Número de trabéculas ósseas (Tb.N)</u></b> .....	58
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	62
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73
	<b>APÊNDICE I</b> .....	82
	<b>APÊNDICE II</b> .....	84
	<b>ANEXO I</b> .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento da idade de vida da população, traz consigo desafios para a odontologia, especialmente para a área da reabilitação oral e implantodontia. No Brasil, sobretudo, ocorreu um avanço na expectativa de vida, onde em 1950 era de menos de 50 anos, passando a ser de 74,8 anos em 2013, e em 2016, essa média de vida do brasileiro passou para 75,8 anos, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017). Com o envelhecimento, alterações patológicas relacionadas ao metabolismo corporal podem influenciar a capacidade regenerativa do tecido ósseo (LINDHE, 2010). Essas alterações metabólicas acompanham o fluxo do avançar da idade, muitas das quais são inerentes ao organismo, como alterações pós-menopausa e do metabolismo ósseo e outras por patologias degenerativas, como doença de Paget, osteogênese imperfecta, (NEVILLE et al. 2010; ROUSSEAU; RETROUVEY, 2018). Dessa forma, com o aumento do crescimento e envelhecimento da população, cresce, também, a demanda por reabilitações implanto-suportadas frente as perdas teciduais, como em situações de defeitos de tamanho crítico, que se agravam em quadros de alterações do metabolismo como a osteoporose, despertando grande interesse na classe odontológica para contribuir nesse processo (JEFFCOAT, 2006; SHIBLI et al. 2008).

Ao longo da vida, o esqueleto humano passa por contínuos processos de remodelações ósseas, por meio da relação remodelação e reabsorção, decorrente da ação de osteoblastos e osteoclastos (MISCH, 2010, O'BRIEN, 2010). Na osteoporose há um desequilíbrio neste processo, onde há mais reabsorção do que aposição óssea. Dessa forma, a osteoporose resulta em baixa densidade óssea, a qual deixa o tecido ósseo mais frágil e susceptível às fraturas (KUMAR et al. 2013; COSTA et al. 2016). Essa doença é uma das mais comuns com o avanço da idade e assim como a diabetes mellitus, doenças degenerativas, devem ser consideradas para tratamentos reabilitadores, principalmente no âmbito das cirurgias ósseas reconstrutivas que associado a vários fatores como trauma, cistos, exodontias, infecções, cáries levam a perda óssea (PETERSON et al. 2005; LINDHE, 2010; DURAO et al. 2014; VAN HOUDT et al. 2018; ZHANG et al. 2018).

A osteoporose é uma doença crônica, multifatorial e sistêmica que altera a conformação da microarquitetura tecidual óssea. Como consequência dessa modificação óssea, aumenta a possibilidade de fraturas ou reabsorções ósseas. Assim, o paciente osteoporótico se torna um paciente de risco, dificultando ou até mesmo contra-indicando a reabilitação oral por meio de implantes (FRIBERG et al. 2001; JEFFCOAT, 2005; HOLAHAN et al. 2008), pois fundamenta-se na mesma hipótese de que essa doença metabólica tenha a capacidade de afetar o tecido de ossos gnáticos tanto quanto afeta outras partes do esqueleto, como coluna vertebral, fêmur, tibia (JEFFCOAT, 2006). Além disso, a osteointegração de implantes dentários em um osso osteoporótico é comprometida, visto que sua estrutura se assemelha a de um osso tipo IV (MISCH, 2010). Diversos estudos na odontologia têm apontado elevados índices de perdas de implantes osteointegrados em regiões com tecido ósseo de baixa densidade, como o tipo IV (FRIBERG et al. 1991; JAFFIN; BERMAN, 1991; QUIRYNEN et al. 1991; GAO et al. 2007; SHIBLI et al. 2007).

Fatores locais e sistêmicos, portanto, comprometem a função e a estética do paciente. Dentre os defeitos ósseos, destaca-se aqueles de tamanho crítico, que não possuem capacidade espontânea de regeneração óssea. Portanto, nesses casos, o uso de biomateriais torna-se essencial para que ocorra o processo de reparação e regeneração tecidual (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Assim, os biomateriais tem papel vital como otimizadores e guias para o processo de reparação óssea em portadores de alterações metabólicas ósseas, sobretudo perante a osteoporose. Atualmente existem soluções como a utilização de enxertos autógenos, alógenos, aloplásticos, xenogênicos e fatores de crescimento (CHOUKROUN et al. 2006; MARIANO et al. 2012; TATULLO et al. 2012; KOLK, et al. 2012; GHANAATI et al. 2014; SILVA et al. 2016; LUCATELI et al. 2018; TRAJANO et al. 2018). Entretanto, cada material apresenta suas particularidades e limitações, necessitando de mais estudos para melhor compreender os seus efeitos e suas associações para uso rotineiro nos tratamentos odontológicos.

Nesse contexto, pesquisas recentes têm apontado que a doxiciclina é um importante medicamento para reparação óssea, uma vez que atua inibindo a

osteoclastogênese (CHANG et al. 2000; BEZERRA et al. 2002), função de importante papel na regeneração tecidual, e podendo ser analisada em um quadro de alteração do metabolismo, como a osteoporese. Vários estudos indicam formação óssea por tetraciclinas, sobretudo a doxiciclina. Além disso, a doxiciclina possui funções já conhecidas como antibacteriana, anti-inflamatória, anti-colagenase e imunossupressora, com comprovado efeito na Odontologia, especialmente no tratamento de periodontites e periimplantites (Al-ALI; BISSADA; GREENWELL, 1989; NELSON e LEVY, 2011; KINUGAWA et al. 2012; GAIKWAD et al. 2013; MOIDEEN; KHAN; SIDDIQUI, 2013; SALMINEN et al. 2013; UDAGAWA et al. 2013; YAGAN; KESIM; LIMAN, 2013).

Contudo, no âmbito científico não há relatos de estudos do uso de doxiciclina em gel como um tipo de biomaterial preenchedor de defeitos críticos em animais com comprometimento do metabolismo ósseo, isto é, há estudo em ratos com metabolismo normal, mas não com osteoporose. Nesse tocante, a doxiciclina na forma de hidrogel a 10% foi usada para preencher defeitos ósseos de tamanho críticos na calvária de ratas osteoporóticas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONCEITOS DE BIOMATERIAIS

Os biomateriais são definidos como dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos (incluindo fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas, podendo ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais quimicamente modificados, tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos (PIRES et al. 2015).

Os biomateriais podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação em osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (LOURENÇO, 2002; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO et al. 2010; OGUN SALU, 2011).

Os materiais osteogênicos são orgânicos com a capacidade de estimular a neoformação óssea a partir dos osteoblastos. A osteogênese ocorre quando células viáveis, como osteoblastos, são transferidas do enxerto para o sítio receptor, onde podem estabelecer centros de formação óssea. A osteocondução ocorre quando o material de enxerto serve como arcabouço ou *scaffold* para o crescimento de células viáveis, que posteriormente se distribuem no interior do defeito ósseo. Dessa forma promovem uma área propensa à proliferação de células envolvidas no processo de reparo tecidual e no processo de formação vascular (angiogênese). A osteoindução envolve a formação de um novo osso pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de osso sobre a influência de agentes indutores (LANG et al. 1997; LOURENÇO, 2002; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO et al. 2010; OGUN SALU, 2011).

### 2.2 HISTÓRICO E BUSCA POR SUBSTITUTOS ÓSSEOS

O uso de biomateriais não é recente e sua aplicação na correção dos mais diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana remonta à antiguidade (RATNER et al. 2013).

A abordagem adotada no desenvolvimento e aplicação dos biomateriais antigamente era fundamentalmente do tipo tentativa e erro, entretanto, recentemente, os enfoques mudaram-se nesta área. No início do uso dos biomateriais, nos anos 50, buscavam-se os materiais bioinertes (foco no material em si). Com o passar do tempo, o foco passou a ser a bioatividade dos biomateriais, e mais atualmente, o objetivo tem sido a regeneração de um tecido funcional, desta forma, com foco no aspecto biológico. Isto é, inicialmente tinha-se por objetivo a obtenção de materiais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico com mínima resposta biológica do paciente. Com o passar do tempo, buscou-se aumentar a vida do enxerto por sua interação com a interface do tecido hospedeiro; em seguida, focou-se no desenvolvimento de materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos pelo tecido hospedeiro, e atualmente, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando-se, assim, materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica com estimulação em nível celular (RATNER et al. 2013).

### 2.3 CARACERÍSTICAS DOS BIOMATERIAIS

Dentre as características dos biomateriais destacam-se propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, com frequência associada à hemocompatibilidade, citotoxicidade, alergenicidade, estimulação de adesão e proliferação celular; as propriedades físicas, como morfologia da superfície, energia superficial, encaixe anatômico, rugosidade, porosidade, cor, transparência e permeabilidade, propriedades mecânicas como tensão de ruptura, alongamento e flexibilidade e propriedades químicas, como densidade, estabilidade, resistência à esterilização e forma de degradação quando em contato com o organismo. No que tange às propriedades biológicas, os biomateriais implantáveis podem ser classificados de acordo com o tipo de reação que acarretam nas células com as quais entram em contato sendo considerados como tóxicos aqueles que resultam na morte das células que circundam o implante e não tóxicos ou inertes os que causam a formação de um tecido fibroso em torno do implante.

Os biomateriais que despertam reconhecimento biológico por apresentarem em sua constituição fatores de adesão, sítios polianiônicos similares aos de polissacarídeos regulatórios ou sítios para a clivagem enzimática envolvidos na migração celular, por sua vez, são considerados como não tóxicos e bioativos. Tais dispositivos podem também sofrer mudança de fase *in situ* por exemplo, incluindo transformações de precursores para sólidos. Na última categoria, dos biomateriais classificados como não tóxicos e degradáveis, tem-se os que possibilitam que as células saudáveis circundantes ou nele presentes cresçam e substituam a matriz que constitui o biomaterial (HUBBELL, 1998).

## 2.4 TIPOS DE BIOMATERIAS

O enxerto autógeno é considerado o padrão ouro, dentro da literatura científica e no meio clínico, para enxertias ósseas. Serve, portanto, de parâmetro para comparação com outros biomateriais, uma vez que possuem as características ideais para um biomaterial como capacidade de osteogênese, osteoindução e osteocondução e todos os demais apresentam desvantagens a ele comparado. São bio-inertes, não tóxicos, angiogênicos. Porém, ele também possui limitações e poucas são suas desvantagens. O pós-operatório pode apresentar recuperação demorada e pode existir uma maior morbidade da área doadora quando se compara com a área receptora do enxerto (POLLOCK et al. 2008; MARIANO et al. 2010).

Entre os diferentes tipos de matérias-primas disponíveis para a obtenção de biomateriais, tem-se os metais que apresentam excelente desempenho mecânico, como alta resistência à fadiga e à fratura. Devido a estas características, os metais têm sido amplamente utilizados como componentes estruturais visando à substituição, reforço ou estabilização de tecidos rígidos, os quais são constantemente submetidos a altas cargas de tração e compressão. Existem, também, como precursores de biomaterial as cerâmicas cujas aplicações englobam as mais diversas áreas, como instrumentos de diagnóstico (termômetros, fibras para endoscopia), próteses ortopédicas, dispositivos para a reconstrução odontológica e maxilofacial. O vasto campo de aplicação se deve, em grande parte, às propriedades cristalográficas e à superior compatibilidade

química das cerâmicas com o meio fisiológico e com tecidos rígidos como ossos e dentes (SMITH, HASHEMI, 2012).

Quimicamente, os biomateriais cerâmicos são compostos inorgânicos, geralmente formados de elementos metálicos e não-metálicos unidos por ligações iônicas e/ou covalentes. Desta forma, comportam-se como materiais de baixa condutividade elétrica e térmica. De forma geral, as cerâmicas são menos densas do que a maioria dos metais e suas ligas. Estes materiais apresentam boa estabilidade dimensional, resistência ao desgaste e à compressão e estabilidade em ambientes ácidos. No entanto, as fortes ligações interatômicas formam estruturas cristalinas tridimensionais com alto grau de compactação, tornando-os duros, quebradiços e suscetíveis a fraturas, com pouca ou nenhuma deformação plástica (DEE et al. 2002).

Há ainda os biomateriais que advêm de polímeros, os ditos biomateriais poliméricos cujas principais vantagens, em comparação com os materiais cerâmicos ou metálicos, incluem a facilidade de fabricação para produzir formas variadas (partículas, filmes, fios, dentre outros), o processamento secundário, custo razoável e disponibilidade em encontrar materiais com propriedades mecânicas e físicas desejadas para aplicações específicas. (WONG, BRONZINO, 2007).

Os biomateriais cerâmicos mais utilizados são os de alumina, materiais quimicamente inertes, com grande estabilidade em meios fisiológicos e corrosivos; a zircônia, material com elevada resistência à flexão, tenacidade e resistência ao desgaste erosivo, que pode ser utilizado com sucesso em aplicações sujeitas a tensões mecânicas; os de fosfato de cálcio, materiais que apresentam excelente biocompatibilidade e comportamento bioativo, possibilitando elevados níveis de osseointegração e osteocondução; além dos biovidros e vitrocerâmicas, materiais que apresentam excelentes propriedades de interação com os tecidos vivos e osteoindução além do reparo e regeneração óssea, importantes à ortopedia, periodontia, reconstrução maxilo-facial, cirurgia da coluna vertebral e reconstruções otorrinolaringológicas. Contudo, possuem desvantagens, custo ainda é elevado e resultados *in vivo* requerem maiores

pesquisas quanto a sua taxa de sucesso em comparação com os demais (FABRIS et al. 2018)

Mais recentemente a literatura tem adotado os hidrogéis como estruturas importantes para transportar substâncias, células, elementos químicos, drogas que podem atuar como biomateriais.

Os hidrogéis podem absorver uma grande quantidade de água, mantendo sua integridade estrutural e são considerados suportes adequados (*scaffolds*) para aplicações na engenharia de tecidos principalmente devido a suas semelhanças estruturais com tecidos moles nativos, e são amplamente utilizados em muitas aplicações biomédicas, incluindo cultura celular, encapsulamento celular, liberação controlada de agentes terapêuticos e fabricação de dispositivos médicos (HUBBELL, 1995; KRETLOW et al. 2007; DELLATORE et al. 2008; BENCHERIF et al. 2008; BENCHERIF et al. 2009; BURDICK, PRESTWICH, 2011).

Os hidrogéis têm uma arquitetura macroporosa interconectada, que parece ser vantajosa em relação aos arcabouços de hidrogel nanoporosos em relação à sua capacidade de facilitar a infiltração e o tráfego celulares. Assim estudos já mostravam a potencial aplicação de hidrogéis como *scaffolds* de engenharia de tecidos (KATHURIA et al. 2009; BOLGEM et al. 2008; BOLGEN et al. 2009).

O Natrosol é um hidrogel à base de hidroxietilcelulose. É um polímero não iônico, solúvel em água e é o principal componente de muitas formulações farmacêuticas. O hidrogel tem sido usado no preparo de alguns produtos usados como biomateriais, sendo usado como base para incorporação de células osteoblásticas ou fatores de crescimento. Atua como um veículo de entrega para terapias e células, com liberação sustentada ao longo do tempo. Funcionam como arcabouço para permitir altas concentrações locais de proteínas importantes para o metabolismo local (FEKETE et al. 2017).

## 2.5 OSTEOPOROSE

O tecido ósseo possui características formidáveis de forma que ao longo da vida sofre inúmeras alterações, remodelando-se, renovando-se e readaptando-

se de acordo com a necessidade e função a ele concedida. É um dos tecidos onde mais ocorre *turnover* celular (MISCH, 2010). A bioquímica envolvendo o tecido ósseo é complexa, uma vez que difere entre tipos de osso e em regiões diferentes, onde atuam-se células diferentes em cada distinta região do corpo humano (PARFITT et al. 1994). O metabolismo do osso esponjoso é 8 vezes mais ativo, apresentando maior remodelação (BLACK, 1991). O osso é formado macroscopicamente por tecido ósseo cortical, equivalente a 80% de seu peso total no organismo humano, mas ocupa apenas 50% da área, sendo encontrado principalmente na diáfise dos ossos longos. Os outros 20% restante da área é ocupado pelo tecido ósseo esponjoso. Bem como, em um estado fisiológico normal, existe uma conexão entre reabsorção e formação relacionadas com a remodelagem óssea. Apesar disso, como por exemplo, na osteoporose há um relativo excesso de destruição óssea comparada com sua respectiva formação. Ocorrem anormalidades nesta coordenação e existem várias doenças metabólicas que podem prejudicar os ossos. Isso é causado, comumente, pelo desequilíbrio entre os processos de reabsorção e neoformação óssea (MUNDY, 1991).

Com exceção dos ossos da calvária, todos os ossos do esqueleto dos mamíferos são pré-formados em moldes de cartilagem de progenitores mesenquimais. Assim, sob estímulos apropriados também têm o potencial de se diferenciar em uma variedade de tipos de tecido, incluindo tecido fibroso, gordura e músculo (BOYCE; XING, 2008). Há uma crescente evidência de que uma cascata complexa de eventos relacionando fatores autócrinos e parácrinos do hospedeiro estejam envolvidos na regulação desse metabolismo (MUNDY, 1991). Entretanto, o levantamento entre reabsorção e formação não são completamente compreendidos. O desenvolvimento e estímulo dos osteoclastos que realizam um papel regulatório é o primeiro fenômeno celular da sequência de remodelagem óssea. O tecido que é removido é, subsequentemente, repostado pela ação das células osteoblásticas, o que leva à formação de elementos da matriz orgânica e sua eventual mineralização (DZIAK, 1993).

As ocorrências relacionadas com a formação óssea compreendem a síntese de fatores regulatórios de crescimento, os quais são estocados dentro da matriz óssea por curto período de tempo, quando então acontece a mineralização

dessa estrutura (MUNDY, 1991). Além disso, a atração dos precursores de osteoblastos para o sítio do defeito ósseo, a partir de um processo de quimiotaxia, e estimulação da proliferação e maturação destes precursores são capazes de sintetizar as proteínas ósseas, ou seja, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, fosfatase alcalina, proteoglicanos e outros componentes estruturais. Por outro lado, quanto à destruição óssea, está claro que os osteoclastos podem tornar-se ativados por mudanças na superfície mineral do osso. São formados a partir de precursores hematopoiéticos da medula, os quais interagem com os elementos formadores do sangue, como linfócitos, monócitos e granulócitos. Após a maturação dos precursores, a fase de reabsorção óssea osteoclástica ocorre por um período de dez dias. Nos últimos anos, houve um aumento marcante na compreensão sobre o papel das citocinas geradas no ambiente ósseo. Estas citocinas podem ser geradas por células imunes, tais como os linfócitos e monócitos na cavidade medular ou por outras células ósseas, particularmente as células da linhagem osteoblástica (MUNDY, 1991).

A osteoporose afeta cerca de 25 milhões de pessoas nos Estados Unidos e envolve mais de 1,3 milhão de fraturas anualmente. No Brasil, estima-se para os próximos anos que a quantidade de fraturas de quadril decorrente da osteoporose chegue a 140 mil fraturas de quadril por ano até 2020 (CLARK et al. 2009). A osteoporose contribui para que as fraturas decorrentes dessa enfermidade aumentem a presença de dor nas costas, redução na qualidade de vida e influência nas atividades diárias. (SATO et al. 2014). Com o aumento da expectativa de vida das populações de uma forma geral, estima-se que também aumente o número de indivíduos afetados por doenças crônico-degenerativas, que afetam o tecido ósseo, como a osteoporose. Atualmente, a OMS (Organização mundial da saúde) conceitua: pacientes osteoporóticos são àqueles que têm uma BMD (Densidade Mineral Óssea) abaixo de -2,5 desvios-padrão (T-score) comparado com a massa óssea de adultos jovens (RUSSO, 2001).

Estão envolvidos no desenvolvimento de osteoporose vários fatores, dos quais alguns podem ser alterados e outros não. Entre os fatores que não podem ser alterados e que podem aumentar o risco de desenvolver osteoporose, os mais relevantes são o gênero (especialmente o feminino), a idade aumentada, a baixa estatura, a etnia branca ou asiática e a hereditariedade. Dentre os fatores

alteráveis, os hormônios sexuais, a anorexia, a falta de cálcio, a ingestão de vitamina D, o uso de medicamentos (como glicocorticoides e anticonvulsivantes), o sedentarismo, o tabagismo e o uso abusivo de álcool, são os mais relevantes. (MONTILLA; ALDRIGHI; MARUCCI, 2004; COSTA et al. 2016). O climatério tem uma forte influência sobre a perda óssea em mulheres, em razão do desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, além de ser determinado por uma diminuição na produção de estrogênio. A influência do hipoestrogenismo no desenvolvimento de osteoporose está bem documentada. As principais causas de baixa massa óssea em mulheres na pré-menopausa consistem em distúrbios menstruais e baixo peso corporal (RUSSO, 2001; SATO et al. 2014)

Quanto ao que se refere ao estilo de vida, os estudos são enfáticos em afirmar que uma dieta pobre em cálcio e vitamina D é prejudicial para os ossos, bem como o excesso de proteínas, as fibras (especialmente aveia e espinafre) e o sódio, assim como a ingestão excessiva de cafeína e refrigerantes, que pode reduzir a absorção do cálcio ou mesmo aumentar sua excreção renal. Além disso, o consumo de álcool e de tabaco é fator de risco para osteoporose, na medida em que reduz os níveis de estrogênio e favorece a perda óssea. (FERNANDES, 2003; MONTILLA; ALDRIGHI; MARUCCI, 2004; COSTA et al. 2016).

O osso alveolar, em condições de ausência de alterações metabólicas, sofre uma grande perda óssea após alguns meses de cirurgias ou perdas dentárias. Isso se torna um grande empecilho para a reabilitação desses pacientes com próteses mucosuportadas e implantes osteointegrados. A osteoporose é um fator agravante. Assim, é necessárias cirurgias prévias para devolver a condição satisfatória que antes existia no paciente, principalmente utilizando recursos aliados aos enxertos ósseos, como os biomateriais, que possam proporcionar propriedades mecânicas satisfatórias para devolver a função perdida (TATULLO et al., 2012). O enxerto autógeno, por sua vez é considerado um recurso de alto padrão por possuir características satisfatórias capacidade de osteocondução, osteoindução e presença de células osteogênicas e a integridade estrutural fornecida pelo osso cortical, importante na reconstrução de defeitos ósseos amplos. Porém, apresenta algumas restrições, como pode ser insuficiente para reabilitar grandes defeitos devido a disponibilidade, muitas vezes restrita de áreas doadoras de osso, a maior morbidade gera, na maioria dos casos,

em rejeição do paciente por ter uma segunda ferida cirúrgica. Estudos em animais, como opções de sítios de coleta de osso autógeno, temos o osso da calota craniana que supre a desvantagem de ter um segundo leito cirúrgico, sendo rapidamente repostado o osso na calvária e havendo biocompatibilidade estável. (DAHLIN; ALBERIUS; LINDE, 1991; TATULLO et al. 2012).

## 2.6 DOXICICLINA E AS TETRACICLINAS

### 2.6.1 Histórico

No fim da década de 50, pesquisas envolvendo tetraciclina encontraram um avanço na segunda geração dos antibióticos, com a criação de tetraciclina semi-sintética. Schach Von Whittenau e Stephens em 1958 manipularam quimicamente tetraciclina, onde observaram que a remoção do grupo 6-hidroxila na estrutura química da tetraciclina, resultaria na formação da 6-deoxitetraciclina, uma tetraciclina otimizada, sendo um composto de propriedades farmacocinéticas extraordinárias e com maior atividade antimicrobiana que as tetraciclina originais.

Com essa descoberta, mais estudos foram realizados e Schach Von Whittenau et al. (1962) publicaram o processo de síntese da a-6-deoxi-5-oxitetraciclina, denominada doxiciclina. Esta foi aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para uso clínico, em 1967, adquirindo sucesso imediato na época, por tratar de doenças infecciosas que ainda não se tinha cura, como a febre maculosa e as riquetsioses. Não raro, é amplamente usada como antibiótico de largo espectro, na atualidade, contra infecções bacterianas e boa capacidade contra micro-organismos geradores de infecções, como anthrax e malária (NELSON; LEVY, 2011). Inicialmente este fármaco foi indicado para tratamento de doenças respiratórias, doenças venéreas e, posteriormente, para tratamento de periodontites (YAGAN et al. 2013).

Segundo Schach von Wittenau, e Delahunt (1966) obtém-se a doxiciclina de modo semi-sintético a partir da oxitetraciclina ou metaciclina, isolando-a como cloridrato, de peso molecular de 462,46g. De acordo com Franklin & Snow (1975), a doxiciclina é um isômero estrutural da tetraciclina, diferenciando das demais na posição do grupo hidroxila 1, situado no carbono 6 da tetraciclina e no carbono 5 na doxiciclina. Essa alteração faz com que a doxiciclina tenha maior estabilidade.

Além disso, a doxiciclina apresenta vantagens em comparação com as tetraciclina: elevado grau de lipossolubilidade, sendo de 5 a 10 vezes maior que as demais tetraciclina, alta capacidade de ligação em proteínas plasmáticas e pouca afinidade de ligação ao cálcio, sendo muito estável no soro humano e, ainda, segundo os autores, apresenta forma estrutural estável.

Ao contrário das tetraciclina, a doxiciclina é absorvida pelo organismo quase completamente (93%) no trato gastrointestinal após administração oral (FABRE et al. 1966). A meia vida de absorção do fármaco é de aproximadamente 50 minutos, detectando-o em soro 30 minutos após administração oral. Okhubo et al. (1969) demonstram que a doxiciclina pode oferecer efeitos adversos característicos aos das tetraciclina. Além desses efeitos comuns entre elas, a doxiciclina pode gerar hepatotoxicidade quando administrada em pacientes com insuficiência hepática ou renal. Fabre et al. (1971) relataram que a doxiciclina é eliminada por via renal e fecal, mas também pode ser excretada no leite materno sendo parcialmente inativada pelo metabolismo hepático.

### 2.6.2 Ação e características clínicas

Além do potencial efeito antibacteriano, a doxiciclina possui propriedades não antimicrobianas, administradas sistemicamente em baixas concentrações (subdoses), como a capacidade de inibir metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) em tecido gengival humano inflamado (GOLUB et al. 1994). Na posologia de 20 mg, duas vezes ao dia, possui efeitos antiinflamatórios, inibidor de MMPs, onde é indicada para tratamentos de periodontites crônicas (GOLUB et al. 2001), e de inflamações crônicas na pele (TAN et al. 2011). Nesta dose, está descrito que não ocorre surgimento de resistência microbiana à doxiciclina, podendo ser usada continuamente por 9 meses (THOMAS; WALKER; BRADSHAW, 2000).

Na década de 80, houveram os primeiros relatos de inibição da destruição do tecido gengival e da perda óssea com o uso das tetraciclina. Contudo, estudos preliminares se iniciaram ainda na década de 70, onde Golub et al. (1977), realizaram pesquisas em metabolismo gengival alterado associado a diabetes e obtiveram como resultado a supressão da perda de colágeno em ratos diabéticos (GOLUB; GARANT; RAMAMURTHY, 1977; GOLUB et al. 1978; RAMAMURTHY; ZEBROWSKI; GOLUB, 1974). A habilidade das tetraciclina, e da doxiciclina em

particular, em inibir a atividade das MMPs (metaloproteinases da matriz) foi identificada primeiramente no princípio dos anos 80 por Golub et al. (1983), e Ramamurthy e Golub (1983), onde fizeram a descoberta através de seu estudo administrando minociclina em ratos e humanos diabéticos, concluindo que nos ratos a droga supriu a atividade das enzimas colagenolíticas no tecido gengival e retardou a perda óssea e, em humanos, diminuiu a atividade das MMPs no fluido gengival crevicular, efeito este não produzido pela penicilina.

Como mencionado anteriormente através dos estudos iniciais, Golub et al. (1983) propuseram que as tetraciclinas especificamente poderiam inibir a colagenase por meio de mecanismos desconhecidos não vinculados às suas características anti-microbianas, e que esta descoberta poderia ser uma nova alternativa viável para tratamento de periodontites e outras doenças que envolvem a degradação do colágeno. A principal função das MMPs é catalisar a destruição das proteínas das células das membranas plasmáticas ou da matriz extracelular que é formada por proteínas colágenas e não-colágenas (BIRKEDAL-HANSEN et al. 1993; RYAN; GOLUB, 2000; SALVI; LANG, 2005). Os mecanismos não-antimicrobianos diretos e indiretos das tetraciclinas inibem a atividade das MMPs (metaloproteinases da matriz), impedindo a destruição do tecido conjuntivo e reabsorção do osso (RYAN; GOLUB, 2000). A habilidade das tetraciclinas em concentrar-se em tecidos é bem conhecida. Os dentistas podem tirar vantagem da elevada concentração de doxiciclina na saliva.

Complexos são os mecanismos de inibição das MMP (PETERSON et al. 2005). A atuação das tetraciclinas nas MMPs ocorre por inibição direta de sua atividade e também por inibição de sua síntese. A inibição direta ocorre devido à ligação com os íons metálicos  $\text{Ca}^{+2}$  (Cálcio) e  $\text{Zn}^{+2}$  (Zinco), presentes nas MMPs. Os íons  $\text{Zn}^{+2}$  e  $\text{Ca}^{+2}$  são moléculas nas quais as colagenases são dependentes para estabilizar a sua conformação molecular, necessária à sua atividade de degradação da matriz (TRAJANO, 2018).

A molécula de doxiciclina quimicamente possui uma forma anidra em sua porção superior (FIGURA 1), (BABU et al. 2002; GRIFFIN et al. 2010). Já na porção inferior, possui maior susceptibilidade para ligação de metais bivalentes, como o Zn e Ca, uma vez que ligações de oxigênio e hidrogênio são mais

facilmente rompidas, sobretudo, para serem ligadas à metais bivalentes (SAPADIN; FLEISCHMAJER, 2006). Esses metais bivalentes são quelados pelas tetraciclinas, que possui essa característica intrínseca nos 4 anéis aromáticos de sua molécula estrutural (FIGURA 1), originando complexos de quelato (PALM et al. 2008). Segundo os autores, são essas moléculas de metais bivalentes que conferem o potencial de antibiótico às tetraciclinas e inibem a síntese de proteína ribossomal em procariontos. Neste artigo ainda, os autores testaram a associação de vários metais bivalentes (magnésio, cálcio, estrôncio, bário, manganês, ferro, cobalto, níquel, cobre, zinco e cádmio), onde as respectivas constantes de associação formaram 3 ordens de magnitude, resultando, em condições fisiológicas, que os metais com maior afinidade pelas tetraciclinas são o bário, estrôncio e cádmio, seguidos de cálcio, magnésio, cobre, manganês e zinco. De todos os metais bivalentes testados, somente ferro, níquel e cobalto tiveram afinidade menos que a do zinco (5 vezes menos). Esse estudo demonstra que as tetraciclinas têm maior afinidade por outros metais bivalentes do que cálcio e zinco. Contudo, como os níveis fisiológicos de cálcio e zinco são muito maiores que os demais metais no organismo, sendo, assim, os metais que mais se ligam ao fármaco (PALM et al. 2008).

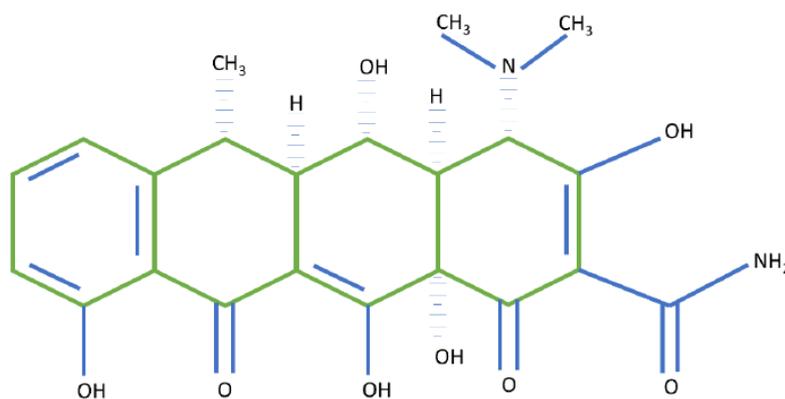


Figura 1 – Molécula química estrutural da doxiciclina

Fonte: BABU et al. 2002; GRIFFIN et al. 2010.

Mesmo sendo quelantes de íons  $Zn^{2+}$  (PETERSON et al. 2005), existe a ocorrência de competição dos pelo sítio catalítico das MMPs-7 ligados previamente aos íons  $Ca^{2+}$  nas tetraciclinas, inibindo, assim, a atividade das

MMPs-7, reforçando quão desconhecido por completo ainda são os mecanismos de inibição das MMPs (GARCÍA et al. 2005). Além disso, as tetraciclinas inibem a MMP-13 (GREENWALD et al. 1998) relacionada com a biologia do crescimento, juntamente com o colágeno tipo X, encontrado em menor quantidade em camundongos no estudo de Ionescu et al. (2012). Tal falta de expressão está ligada intimamente com o nanismo. É sabido que os condrócitos hipertrofiados é responsável por 60% do crescimento ósseo, 30% pela deposição mineral e 10% pela proliferação mineral (WILSMAN et al. 1996). Por conseguinte, a doxiciclina está densamente ligada a biologia do reparo ósseo. Estudos relatam sua ação na angiogênese e na modulação do colágeno, conforme o tempo de tratamento com doxiciclina passa, inibe a degradação de colágeno e a reabsorção da bolsa inflamatória (uma espécie de coágulo induzido), melhorando, assim, a qualidade do tecido (LAMPARTER, SLIGHT, WEBER, 2002).

Outro fator relevante a ser considerado é a diferença existente na eficácia em impedir a ação das MMPs entre as diferentes classes de tetraciclinas. A doxiciclina e a minociclina, exemplo de tetraciclinas semi-sintéticas, são mais efetivas na inibição de colagenases do que as demais tetraciclinas (TRAJANO et al. 2016). Foi verificado por Golub e colaboradores, em 1990, um tempo maior de inibição da colagenase em bolsas periodontais com a utilização da minociclina e doxiciclina em comparação com as demais tetraciclinas. Especialmente a doxiciclina mostra-se como a mais potente (BURNS et al. 1989). Essa maior potência da doxiciclina está ligada à habilidade de ligar-se ao íon  $Zn^{2+}$  mais fortemente do que as demais, desestabilizando a conformação molelucar das MMPs. Nesse raciocínio, após a descoberta da habilidade anticolagenase das tetraciclinas, começou-se a explorar tal característica com relação à reabsorção óssea (GOLUB et al. 1990). Através de pesquisas demonstrou-se que, em subdoses, a doxiciclina é capaz de inibir a colagenase e a degradação de colágeno, incluindo o colapso que ocorre durante a reabsorção óssea. A maioria dos estudos *in vivo* e *in vitro* executados nos anos anteriores mostrou que as tetraciclinas com propriedades anticolagenolíticas têm um efeito positivo no reparo ósseo (GOLUB et al. 1985; ALKAN et al. 2002).

### 2.6.3 Mecanismo de atuação das tetraciclinas no processo de inibição da osteoclastogênese

Além das funções de anticolagenase, inibindo as MMPs, as tetraciclinas, sobretudo, a doxiciclina, têm a capacidade de atuar no mecanismo de reparo ósseo prevenindo a perda óssea por meio da indução à apoptose dos osteoclastos (BETANY et al. 2000; GOLUB, et al. 2010). Betany 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, sugerindo assim que estes fármacos podem modular a reabsorção óssea não apenas por meio de inibição das MMPs, mas também através de outros mecanismos como a ação sobre a diferenciação celular. Por sua vez, os osteoclastos são células multinucleadas, dendríticas, derivadas de células hematopoéticas, sendo responsáveis pela reabsorção óssea e regulados pelos osteoblastos, responsáveis por formar osso (TEITELBAUM, ROSS, 2003; ROODMAN, 2006; CHAMBERS, 2010). Além disso, várias outras funções das tetraciclinas podem modular seus efeitos sobre o tecido ósseo, incluindo a indução de síntese de colágeno novo (SASAKI, RAMAMURTHY, GOLUB, 1992), inibição da atividade da fosfolipase A<sup>2</sup> (PRUZANSKI et al. 1992), inibição do gene de síntese de óxido nítrico (TRACHTMAN et al. 1996) e modulação das respostas citosólicas de Ca<sup>2+</sup> em osteoclastos (BAX et al. 1993).

O processo de remodelação óssea envolve diversas células e vias de ativação de moléculas sinalizadoras, onde ainda deixam lacunas abertas para desvendar todo o mecanismo. Estudos relatam que o osteócito são osteoblastos diferenciados incrustados na matriz osteóide, onde se comunicam com outros osteócitos e com osteoblastos, formando uma rede que regula a expressão de RANKL - proteína ligante para ativação de formação de osteoclastos maduros - também denominado receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante, ou somente fator nuclear Kappa B -, de forma a recrutar osteoclastos para o local (TATSUMI. S., et al. 2007; O'BRIEN, 2010). Apesar disso os mecanismos que controlam a iniciação, progressão e impedimento do remodelamento local permanecem pouco compreendidos. Os osteoclastos são células derivadas de precursores mononucleados na linhagem mieloide de células hematopoéticas que também originam macrófagos. Desde a descoberta do sistema RANK/RANKL que regula a formação e ativação de osteoclastos nas últimas décadas vêm abrindo portas para estudos do complexo sistema bioquímico ósseo. As células estromais

osteoblásticas expressam M-CSF, que é necessário para estimular células progênitoras (pré-osteoclastos) a se transformarem em osteoclastos, mas o M-CSF sozinho é incapaz de completar esse processo, onde é necessário a expressão da RANKL (YOSHIDA et al. 1990). A reabsorção óssea pelos osteoclastos ocorre após estes ligarem-se fortemente à superfície óssea, através de podossomas, englobando a parte a ser reabsorvida e liberando enzimas proteolíticas, catepsina K e ácido clorídrico na superfície óssea (TEITELBAUM; ROSS, 2003).

O RANKL, também chamado de fator de diferenciação de osteoclastos ou designado fator nuclear Kappa-B, existe como proteína homotrimérica e está, tipicamente, ligado a membrana de células T, osteoblastos e fibroblastos e é ativada ou secretada por células T ativas (WADA et al. 2006; TAKAYANAGI, 2007). Essa citocina é clivada e degradada por MMP-3 ou 7, e além de ser secretada pelos osteoblastos, é também expressa por células dos gânglios linfáticos, timo, glândulas mamárias, pulmão e em níveis mais baixos por baço e medula óssea. Porém, ainda que expressando níveis baixos na medula óssea, fonte de constantes proliferações celulares, ela desempenha papel crítico para o metabolismo ósseo em equilíbrio. A função principal da RANKL é servir de sinal para citodiferenciação de pré-osteoclastos (células progenitoras hematopoéticas) em osteoclastos e de ativar os osteoclastos maduros (WADA et al., 2006). O receptor RANK, também denominado receptor de diferenciação de osteoclastos, é uma proteína transmembrana da superfamília dos TNF. É expressa em menos tecidos que RANKL, porém é expresso em glândulas mamárias e em algumas células cancerígenas, como câncer de mama e de próstata (KIM et al. 2006). Ou seja, RANK é um receptor que está acoplado nos pré-osteoclastos e quando ligados pela RANKL ativam o fator Kappa-B e são induzidos a transformarem-se em osteoclastos totalmente diferenciados (CHAMBERS, 2010).

Além de produzirem a RANKL, os osteoblastos sintetizam também a osteoprotegerina (OPG), estabelecendo um equilíbrio entre osteoclastogênese (produção de RANKL) e OPG que inibe essa atividade. A OPG é secretada pelos osteoblastos e também por células do coração, rim, fígado e baço. A OPG regula negativamente a ligação da RANKL com o receptor RANK, inibindo a osteoclastogênese. Experimentos de ligação molecular mostraram que o OPG se

associa com o RANKL e funciona como um chamariz receptor, no qual ratos com deficiência de OPG, apresentam osteoporose resultante do aumento no número de osteoclastos (MIZUNO et al. 1998; O'BRIEN, 2010; SATO et al. 2014). Por outro lado, estudos demonstram que a interrupção no eixo RANK-RANKL resulta em osteopetrose e erupção dentária precoce em ratos, devido a diminuição de osteoclastos (cessamento da osteoclastogênese) (DOUGALL et al. 1999; KONG et al. 1999).

A OPG é um membro da família TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa), exercendo papel protetor no osso, tecido no qual atua com maestria se ligando ao RANKL e inibindo sua ação, devido a sua alta especificidade com RANKL, e, assim, impede diferenciação e acionamento dos osteoclastos (LERNER, 2005).

Antibióticos de tetraciclina, especialmente a doxiciclina, têm sido utilizados para tratar doenças de reabsorção óssea em parte por causa de sua atividade para suprimir osteoclastogênese induzida pelo receptor ativador do fator nuclear Kappa B ligante (RANKL). Estudos anteriores relataram que a doxiciclina é capaz de diminuir a perda óssea e aumentar a formação de osso (WILLIAMS et al., 1996). Além disso, a doxiciclina pode cessar a degradação da cartilagem, podendo ser útil no tratamento da osteoartrite, conforme estudos de Bezerra et al. (2002). Os autores avaliaram doses abaixo da capacidade anti-microbiana da doxiciclina (< 10mg/kg/dia) em ratos. Não receberam medicação os animais, apresentando, significativamente, maior perda óssea alveolar, infiltrado inflamatório mononuclear intenso e aumento no número de osteoclastos.

Amazin et al. (2009) avaliaram o efeito de sistemas de liberação local, incluindo a doxiciclina a 10% na proliferação e diferenciação de células osteoblásticas, concluindo que a doxiciclina a 10% elevou a diferenciação e maturação celular. Em 2011, o autor Franco realizou estudos *in vivo* e *in vitro* confirmando, originalmente, que a doxiciclina inibe a indução da RANKL na osteoclastogênese, por seu efeito inibitório sobre a atividade da enzima MMP-9, sem afetar a expressão da proteína MMP-9, independente da cascata de sinalização MAPK-NFATc1. Assim, a inibição de MMP-9 por esses fármacos (tetraciclinas), é a única responsável pela repressão de RANKL na osteogênese. A MMP-9 funciona como gene efetor da expressão dos osteoclastos e, como tal,

funciona como um regulador da osteogênese. Eles confirmaram também que apenas os compostos da família das tetraciclina, incluindo a doxiciclina, possuem efeito inibitório sobre RANKL, e que ela não afeta a homeostase do metabolismo ósseo.

Recentemente, Kinugawa et al. (2012) e Udagawa et al. (2013), mostraram conversão da via de diferenciação de macrófagos da medula óssea (BMMs), resultando em células dendríticas (CDs) em vez de osteoclastos. Isto é, a doxiciclina e minociclina inibiram a osteoclastogênese RANKL induzido. Sinais RANK são essenciais para as tetraciclina induzirem a diferenciação de BMMs em CDs, porém, sinais não identificados, podem promover essa diferenciação por RANKL e tetraciclina. Assim, em ambos os eventos, a remoção de sinais inibidores por tetraciclina e a indução de sinais estimuladores por RANKL podem ser obrigados a induzir a diferenciação de CDs. Na verdade, as tetraciclina modificam os sinais RANK-RANKL induzindo a diferenciação das BMMs em CDs (FIGURA 2).

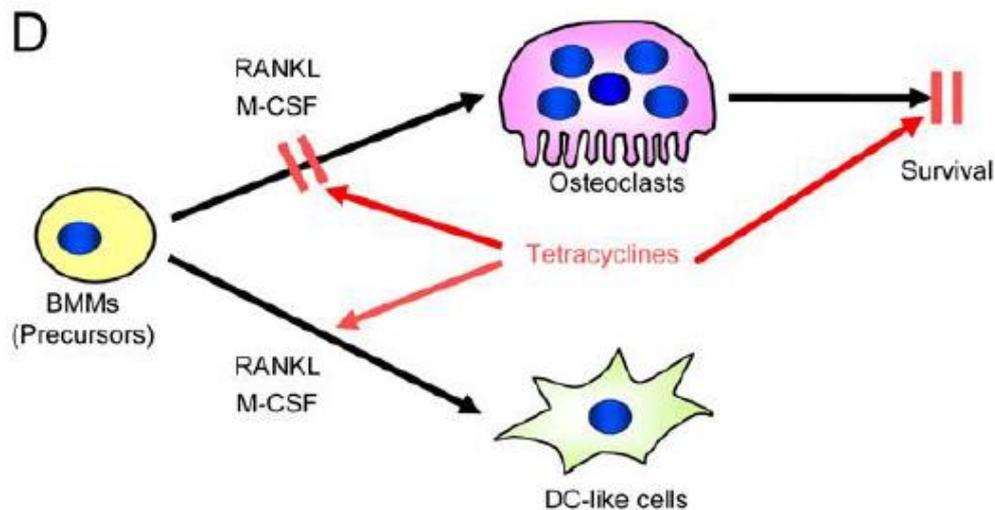


Figura 2 – Esquema da atividade das tetraciclina atuando na relação RANK/RANKL

Fonte: Kinugawa et al. 2012; Udagawa et al. 2013).

Estes estudos corroboram o conceito de que a doxiciclina não aumenta os níveis de osteoblastos e, sim, inibe a ação dos osteoclastos. Para conseguir 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; UDAGAWA et al. 2013).

#### 2.6.4 Uso do gel de doxiciclina

Um dos pioneiros no uso de doxiciclina (DOX) com dispositivos locais foi Polson et al. (1996). Em seu estudo em cães, avaliaram o potencial efeito do gel com hiclato de doxiciclina a 8,5% na terapia local contra periodontite crônica, onde obtiveram sucesso no tratamento após 4 meses de uso, tendo diminuição da sondagem periodontal. Em 1997, os autores fizeram o primeiro estudo em humanos, aplicando um dispositivo de aplicação controlada de doxiciclina (Antidrox®), um tipo de duas seringas unidas que misturavam hiclato de doxiciclina a 8,5% com veículo (37% poli-DL-lactídeo, dissolvido em 63% de NMP), aplicando sobre o fluido crevicular. Após 7 a 10 dias o gel era reabsorvido e como resultado obtiveram maior efetividade com o gel de DOX do que com o controle, com relação a nível de sondagem e inserção clínica.

Diversos estudos vieram testando a DOX tópica e diferentes concentrações. Com promissores resultados destaca-se o estudo de Akalin et al., 2004, comparando o uso de doxiciclina sistêmica (SD) com a local (LD) no tratamento de periodontite crônica. Foram divididos em 3 grupos, 45 pacientes, com 5 tratamentos: Doxiciclina sistêmica (SD), doxiciclina sistêmica mais raspagem e alisamento radicular (RAR), doxiciclina local (LD), doxiciclina local (LD) mais raspagem e alisamento radicular (RAR), e raspagem e alisamento radicular (RAR). Ao final de 7 semanas, os autores observaram que o tratamento com LD foi mais eficaz na redução de profundidade de sondagem que o SD. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre as duas terapias associadas à RAR. Concluíram que o uso local de doxiciclina é preferível ao sistêmico, uma vez que se mostrou efetivo na redução da profundidade de sondagem periodontal e não apresenta efeitos colaterais.

Pappalardo et al. (2006) pesquisaram com o intuito de avaliar os resultados clínicos e microbiológicos promovidos pela liberação local de antimicrobianos no tratamento de periodontites. Foram selecionados 36 indivíduos portadores de periodontite, sendo que 11 pacientes receberam aplicação local de

gel de doxiciclina a 10% em bolsas periodontais, outros 11 receberam aplicação de gel de clorexidina a 1,5% e 11 receberam apenas raspagem e alisamento radicular (RAR). Os pacientes que receberam doxiciclina 10% tiveram redução da perda de inserção e profundidade de sondagem de 1,4mm; os pacientes que receberam a clorexidina 1,5%, apresentaram 0,9mm de redução da perda de inserção e profundidade de sondagem e os pacientes submetidos à RAR apresentaram índices de redução menores que os demais grupos. Assim, os resultados sugerem que a liberação local de antimicrobianos pode promover benefícios adicionais à terapia mecânica convencional, sendo a associação de RAR com gel de doxiciclina (10%) apresentou melhor resultado.

Além disso, estudos recentes evidenciaram que a presença de doxiciclina no alvéolo após a exodontia em ratos aumentou significativamente a neoformação óssea quando comparado ao grupo onde o alvéolo não foi tratado com antibiótico (SHAHABOOEI et al. 2015; SILVA et al. 2016; LUCATELI et al. 2018).

Silva et al. (2016) avaliaram a utilização da doxiciclina a 10% associada ao gel de natrosol no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos com metabolismo ósseo normal. Os autores examinaram 24 ratos e confeccionaram defeitos ósseos com 6 mm de diâmetro com broca trefina na calvária dos animais. Dividiram, então, em 3 grupos de acordo com o tratamento aplicado aos defeitos (controle – sem tratamento, coágulo sanguíneo, gel de natrosol e doxiciclina a 10% associada ao gel de natrosol). Os animais foram eutanaziados após 4 e 8 semanas e o tecido ósseo da calvária foi avaliado por meio de microtomografia computadorizada e análise histomorfométrica. Os resultados do estudo mostraram que os animais do grupo tratado com doxiciclina a 10% associado ao gel de natrosol apresentaram neoformação óssea significativamente maior (44%) em comparação com os grupos tratados com natrosol (33%) e controle (32%) no período de 4 semanas. No período de 8 semanas, novamente o grupo tratado com doxiciclina apresentou neoformação óssea significativamente maior (61%) que os grupos natrosol (34%) e controle (23%). O estudo mostrou resultados promissores da doxiciclina a 10% em gel de natrosol em relação ao reparo ósseo, podendo ainda em estudos posteriores, serem associados à biomateriais, segundo os autores, visto que um pode servir de arca-bouço para a liberação da droga.

Perante a ampla necessidade de técnicas cirúrgicas reconstrutivas e conservadoras desenvolvidas para manter um volume ósseo satisfatório para reabilitação associada à escassez de estudos envolvendo a doxiciclina como biomaterial osteoindutivo em situações de alterações metabólicas no organismo, verifica-se a necessidade de investigar o comportamento desse material na reparação óssea de defeitos que não se cicatrizam espontaneamente em animais, que apresentam quadro compatível com osteoporose. Se a doxiciclina mostrou bom comportamento na reparação óssea de ratos sem alterações do metabolismo ósseo, diminuindo as atividades de osteoclasia e dando lugar à formação óssea (SILVA et al., 2016, LUCATELI et al. 2018), espera-se que possa contribuir na regeneração de defeitos dos animais com alteração no seu metabolismo ósseo provocado pela osteoporose. Intenciona-se estabelecer nestas situações específicas, quando a formação óssea é comprovadamente perturbada pelo quadro patológico sistêmico, recursos de melhorias locais de preenchimento dos defeitos ósseos, visto que a osteoporose tem se mostrado cada vez mais prevalente na população associada ao fato da existência de mutilações trazidas por diferentes causas que comprometem o complexo buco-maxilo-facial.

### **3 OBJETIVO**

Avaliar efeito do gel de doxiciclina a 10% na base de natrosol sobre a reparação óssea de defeitos de tamanho crítico em calvárias de ratas osteoporóticas através de análise microtomográfica sob parâmetros volumétricos e de densidade óssea.

## 4 METODOLOGIA

Todos os procedimentos cirúrgicos realizados nos animais, bem como seu pós-operatório foram realizados no Biotério Central da UNIFAL-MG. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG, com número de registro 45/2017 (ANEXO I).

A utilização de animais de laboratório para análise dessa substância medicamentosa representa uma etapa na escala até chegarmos aos estudos *in vivo* em humanos. Bem como, o método utilizado para obtenção da osteoporose com ovariectomia (OVX) bilateral e o tempo de estabelecimento da doença são modelos conhecidos na literatura por diversos autores, assim como Neto et al. (2006); Erdogan et al. (2007); Miron et al. (2014); Durão et al. (2014); Von Houdt et al. (2018). Para os procedimentos cirúrgicos de criação do defeito ósseo de tamanho crítico na calvária do animal, seguiu-se os modelos de Messoria et al. (2008) e Mariano et al. (2012), para criação da marcação em “L” (2mm de distância do defeito circular), e confecção do defeito ósseo, respectivamente.

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após os animais serem submetidos à cirurgia para criação de um defeito ósseo crítico na calvária, foram divididos em 4 grupos (n= 15) de acordo com o material utilizado para preencher o defeito:

- a) **Grupo SHAM:** animais com realização da cirurgia fictícia de ovariectomia, quando os ovários foram acessados cirurgicamente, mas não foram removidos e com defeito de 6mm nas calvárias preenchidos com coágulo sanguíneo;
- b) **Grupo OVX-CS:** com defeito crítico de 6mm preenchido apenas por coágulo sanguíneo;
- c) **Grupo OVX-DOX:** com defeito crítico de 6mm preenchido com gel de doxiciclina a 10%;
- d) **Grupo OVX-AUT:** com defeito crítico de 6mm preenchido apenas com osso autógeno removido da própria calvária.

O  $n$  amostral foi definido considerando os grupos de tratamento e os períodos de análise utilizando o software G Power ® 3.1.9.2. Para a análise através do teste estatística ANOVA com 2 fatores (grupos e tempo), considerando o tamanho do efeito=0.5, sendo  $\alpha=5\%$  e poder do teste de 80%, segundo os parâmetros apresentados na literatura científica, foram necessários 3 animais de cada período, pertencente a cada grupo, para análise microtomográfica e 5 animais para posterior análise histológica. Para a análise microtomográfica, 6 parâmetros foram considerados e os dados submetidos à ANOVA e teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

#### 4.2 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram selecionadas 68 ratas da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus Albinos*), fêmeas, com peso entre 150g a 200g, com idade entre 7 e 8 semanas para o estudo, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG. Na segunda cirurgia, após 8 semanas as ratas pesavam entre 250g a 350g com idade entre 16 a 17 semanas. As ratas foram alimentadas com a ração sólida para roedores e água *ad libitum*, durante todo o experimento e devidamente identificadas e mantidas em um ambiente com temperatura entre 22° e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro). A ração sólida fornecida é a padrão do biotério utilizada sem alteração de seus componentes. Contém nutrientes, vitaminas, aminoácidos, carboidratos, óleo e ácidos, com composição básica de cálcio (10-14 g/kg) e fósforo (6.000 mg/kg), proteína bruta (220 g/kg), extrato estéreo (50 g/kg), minerais (90 g/kg) e fibra bruta (70 g/kg) Foram acondicionadas em gaiolas, forradas com maravalha, no biotério da Unifal-MG. Após 8 semanas da cirurgia de ovariectomia bilateral, as ratas foram submetidas a cirurgia de criação dos defeitos ósseos nas calvárias, e em seguida acondicionadas em gaiolas individuais.

#### 4.3 INDUÇÃO CIRÚRGICA DA OSTEOPOROSE (OVARIECTOMIA)

A primeira cirurgia foi realizada com oito animais de, aproximadamente, 8 semanas de idade submetidos a ovariectomia bilateral. 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 antisepsia 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, abaixo da última costela do animal, onde era planejado a incisão para acesso cirúrgico.

Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais e divulsão dos tecidos para exposição e excisão dos ovários (n=4) (KALU, 1991). Ao final do procedimento, a pele foi suturada com mononylon 4-0 (Ethicon, SP, Brasil) e a ferida cirúrgica lavada com PVP-I. Em seguida, os animais foram medicados com doses do anti-inflamatório Tramadol (10mg/kg) nos períodos de 12h, 24h, 36h e 48h após o procedimento cirúrgico 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 (n=4) sofreram uma cirurgia fictícia, nos quais os ovários foram expostos, mas não removidos para simular o mesmo estresse cirúrgico dos demais grupos. Esse modelo experimental já foi descrito em estudos prévios (LUVIZUTO et al. 2011), 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 8 semanas após a cirurgia, tempo suficiente para o desenvolvimento da osteoporose (YU et al. 2012). A caracterização da osteoporose foi realizada por meio de análise microtomográfica do fêmur da rata. Abaixo consta as imagens das etapas cirúrgicas realizadas (FIGURA 3 de A-I)

Figura 3 – Sequência de etapas de procedimentos da ovariectomia bilateral;

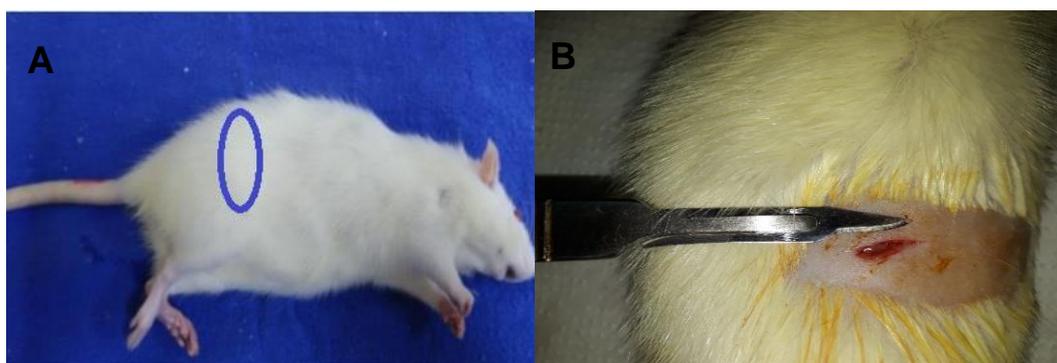
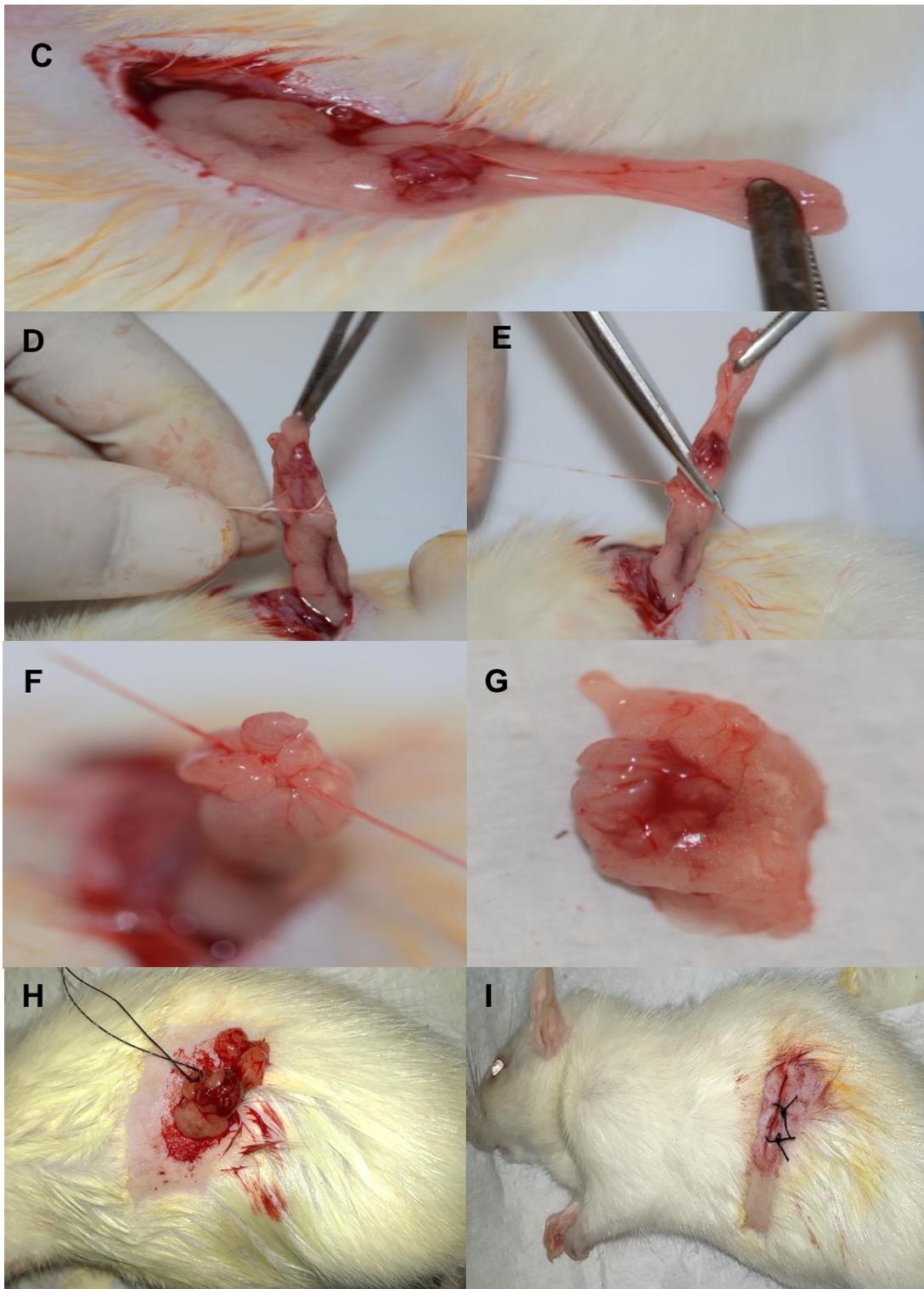


Figura 3 – Sequência de etapas de procedimentos da ovariectomia bilateral;



Fonte: Do autor.

Nota: A) Planejamento da região a ser acessada; B) Incisão linear; C) Identificação do ovário; D) Laqueadura; E) Remoção do ovário; F) Exérese do ovário; G) Ovário removido; H) Reposicionamento dos tecidos; I) Sutura final.

#### 4.3.1 Análise Microtomográfica da verificação de osteoporose

Para a caracterização da osteoporose foi necessária a utilização de 8 ratas adicionais além dos 60 animais descritos acima. Desses 8 animais adicionais, 4 foram grupo OVX e 4 do grupo SHAM. Ao final de 8 semanas, os animais foram eutanasiados. Posteriormente os fêmures foram removidos e armazenados em solução de formol tamponado à 10% (pH 7) (Merck, HE, Alemanha).

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

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

Utilizando-se do *software* CTan®, foi selecionada uma região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*) e um volume de interesse (VOI, do inglês *volume of interest*) na distal dos fêmures na qual se efetuou a análise morfométrica, utilizando-se como referência a placa de crescimento. Percorreu-se corte por corte através da placa de crescimento, no sentido metáfise-diáfise para atingir o plano de visualização de uma “ponte” de cartilagem de baixa densidade que se estende de um extremo ao outro do corte. Nos planos subsequentes, verificou-se a existência de uma organização do osso trabecular primário, permitindo determinar a referência para a placa de crescimento. O VOI para a análise do tecido ósseo trabecular iniciou-se a 1.5 mm abaixo do nível da placa de crescimento e se estendeu em direção à diáfise por uma distância de 3.3 mm (560 slices). A ROI foi determinada manualmente para cada *slice* do VOI delineando (ferramenta de desenho à mão livre) a área ocupada pelo tecido ósseo trabecular (HATORI et al. 2015) (FIGURA 4).

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

A segmentação para o osso trabecular distal do fêmur foi definida na escala de histograma de cinza (0-255), entre 60-255. Após a definição do VOI e a segmentação das imagens, em seguida foi executada a análise morfométrica para obtenção dos parâmetros: volume ósseo (mm<sup>3</sup>), volume ósseo/volume total (%). Todos os parâmetros foram calibrados automaticamente pelo sistema através do coeficiente de atenuação linear (FIGURA 5).

#### 4.3.2 Análise estatística para determinação da osteoporose

Posteriormente após a obtenção dos resultados dos parâmetros ósseos gerados pelo software, foi realizada análise estatística destes dados através do test t-Student para comprovação da indução da osteoporose entre os grupos OVX (4 animais) e SHAM (4 animais). Conforme a tabela 1, estatisticamente ficou comprovado que a cirurgia de ovariectomia induziu a osteoporose no período de 60 dias, validando o modelo de estudo proposto e que também foi validado por Durão e colaboradores (2014) (TABELA 1; FIGURA 4).

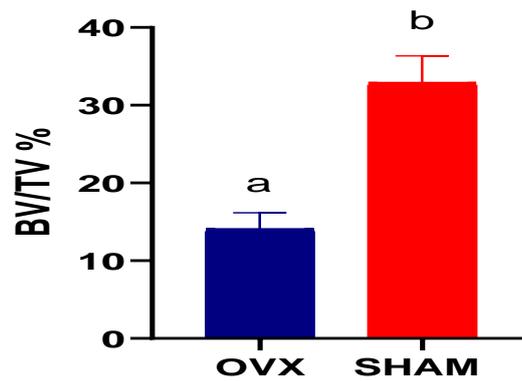
Tabela 1 – Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos referentes porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV) <sup>\*,\*\*</sup>

<b>Grupo</b>	<b>Semanas</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
OVX	4	14.02 <sup>A</sup>	± 2.079
SHAM	4	32.931 <sup>b</sup>	± 3.427

Fonte: Do Autor.

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

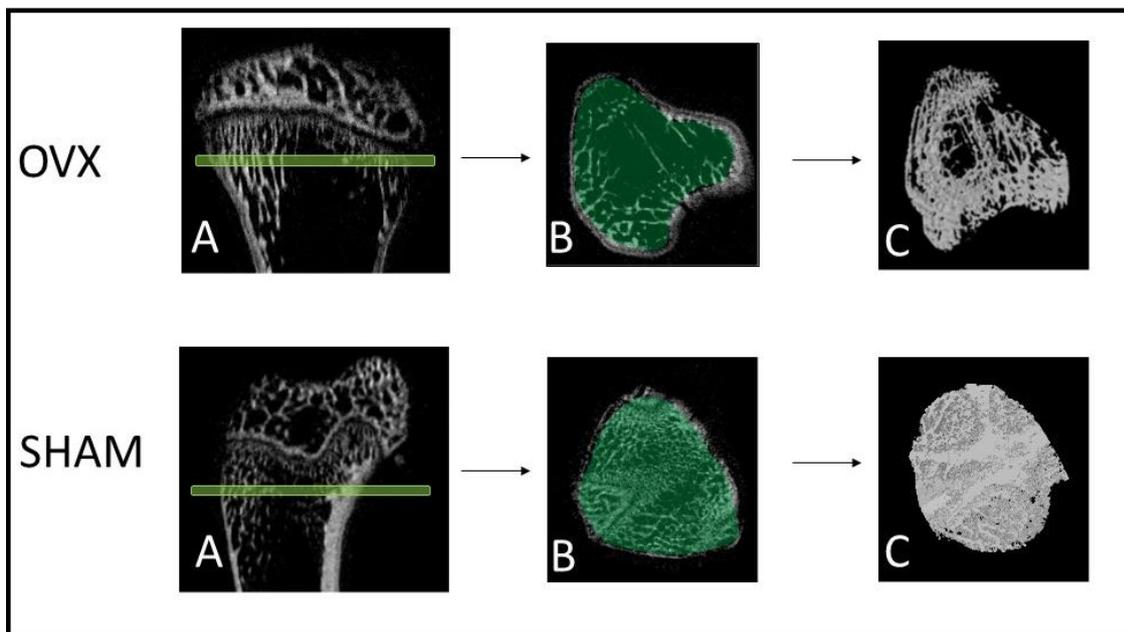
Figura 4 - Médias e desvio padrão dos dados microtomográficos da porcentagem do volume ósseo pelo volume tecidual (BV/TV) dos animais OVX e SHAM. \*\*\*



Fonte: Do Autor.

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

Figura 5 – Imagens da caracterização da osteoporose após procedimento ovariectomia;



Fonte: Do autor.

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

#### 4.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA CRIAÇÃO DO DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO EM CALVÁRIAS

Depois de 8 semanas da cirurgia de ovariectomia, 60 animais 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®, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil) na região fronto-parietal da calvária dos animais. Uma incisão em “U” foi realizada com base caudal na calvária do rato e um retalho de espessura total foi descolado em direção posterior. Foi confeccionado um defeito de tamanho crítico na calvária da rata (FIGURA 3). Para isso, utilizou-se broca trefina de 6 mm de diâmetro, acoplada em motor elétrico NSK® e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Fisiológico 0,9%, Equiplex®, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil). Marcações em formato de “L” foram feitas com broca carbide tronco-cônica a 2 mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico e preenchidas com ionômero de vidro (Vidrion®, Rio de Janeiro, Brasil), (SILVA et al. 2016). O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. Estas marcações foram úteis para a identificação do meio do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica.

Após a confecção do defeito, os grupos experimentais receberam os respectivos enxertos (OVX-AUT osso autógeno, OVX-DOX doxiciclina), e os grupos de controles (OVX-CS coágulo sanguíneo e SHAM cirurgia fictícia), cada defeito preenchido com um biomaterial diferente. As feridas foram suturadas com fio de nylon 4.0 (Ethicon®). 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 UIQ100 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 Tramadol (10mg/kg) nos períodos de 12h, 24h, 36h e 48h após o procedimento cirúrgico e

foram acompanhados todos os dias na primeira semana do pós-operatório e de 15 em 15 dias, para avaliação clínica, alternando os animais, a fim de minimizar o estresse gerado pelo manejo.

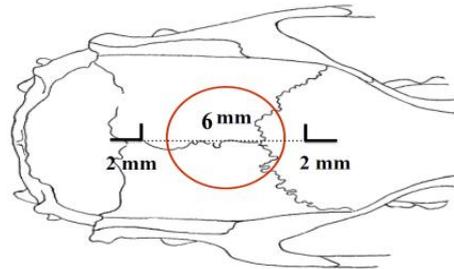


Figura 6 – Planejamento esquemático do defeito crítico.

Fonte: adaptado MESSORA et al. (2008).

Figura 7 - Sequência de etapas dos procedimentos operatórios da cirurgia de criação do defeito crítico na calvária das ratas osteoporóticas ("A" até "L");

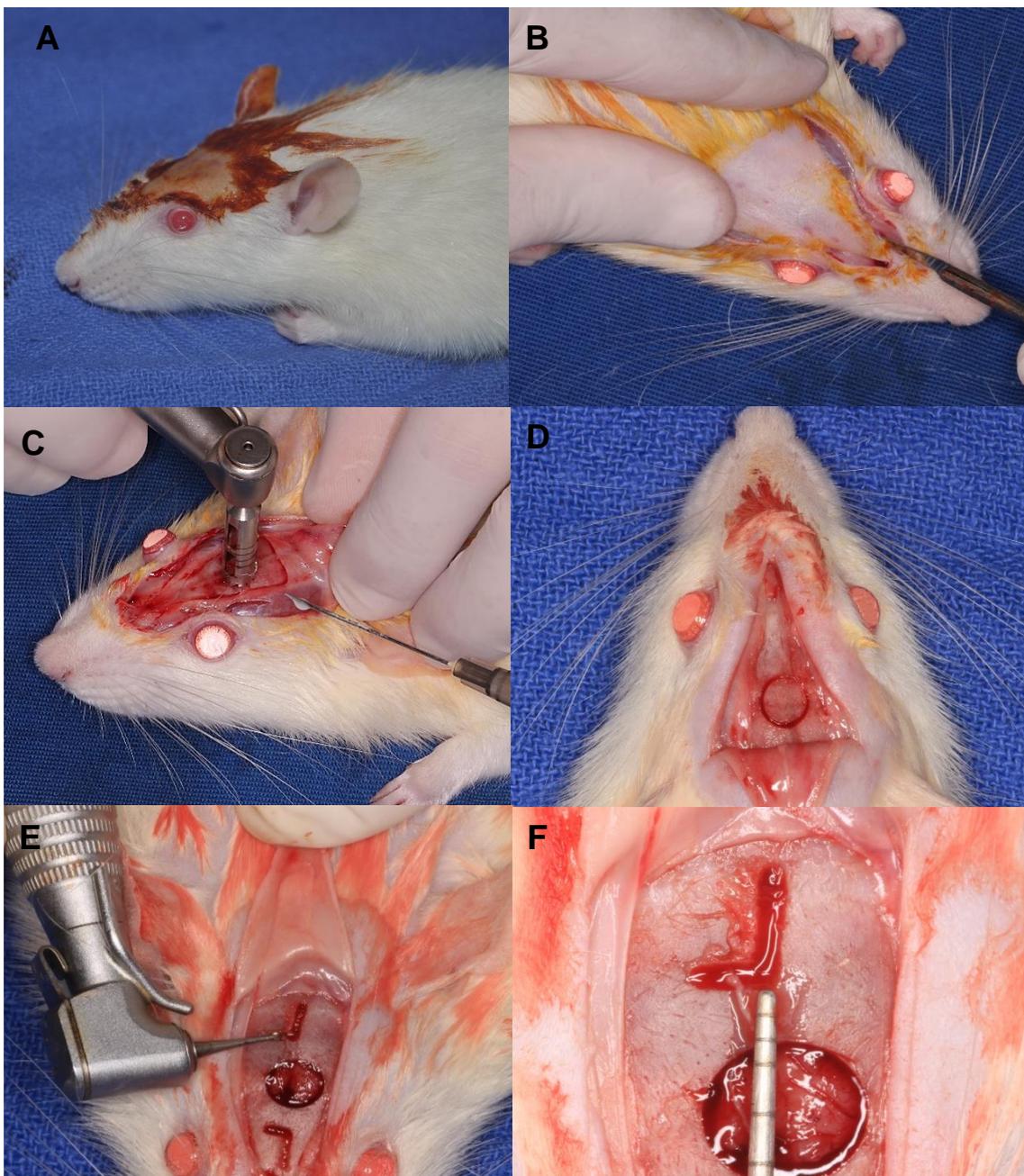
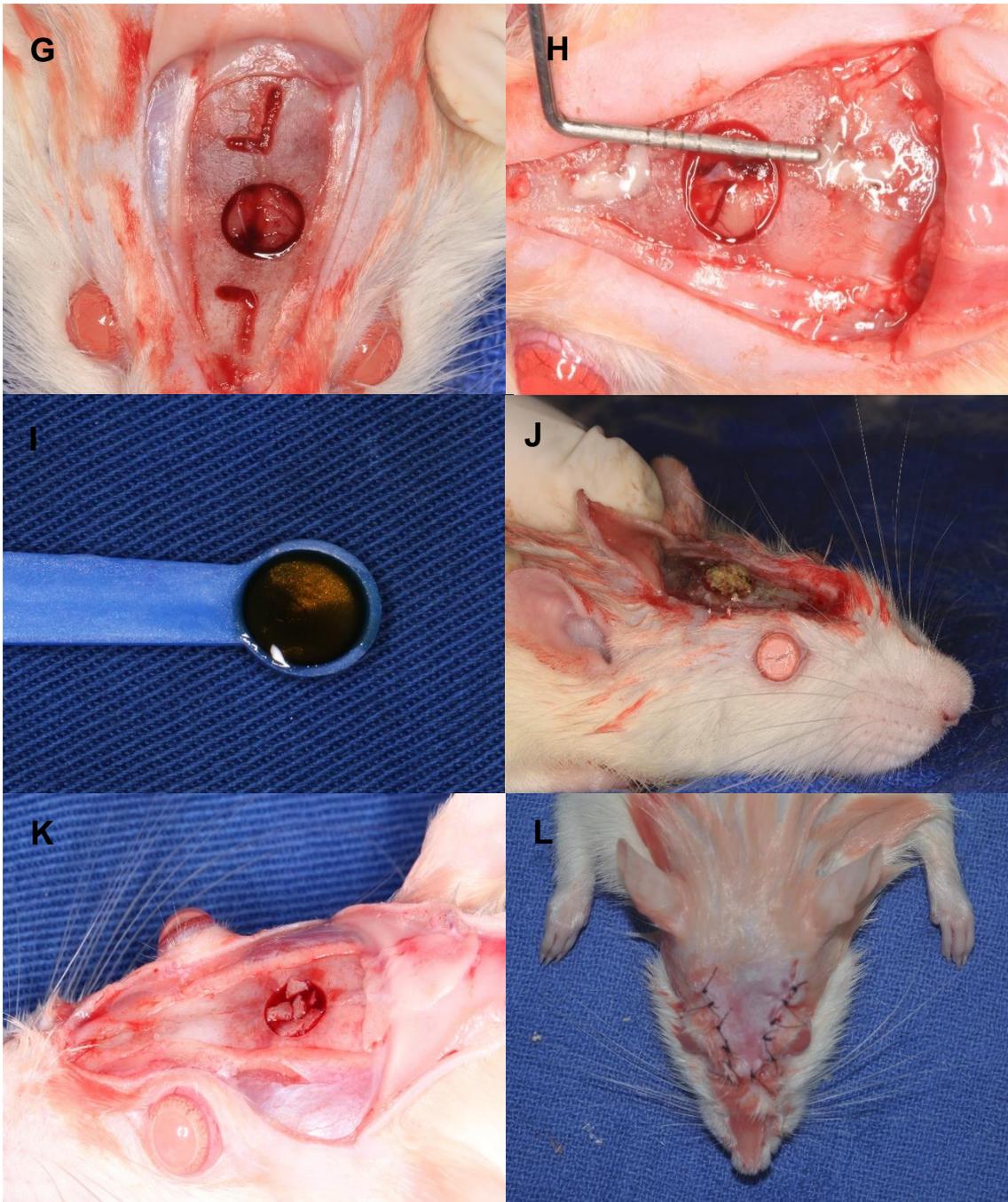


Figura 7 - Sequência de etapas dos procedimentos operatórios da cirurgia de criação do defeito crítico na calvária das ratas osteoporóticas ("A" até "L");



Fonte: Do autor.

Nota: A) Tricotomia e antissepsia; B) Incisão; C) Perfuração com broca trefina; D) Defeito de tamanho crítico; E) Marcação em "L"; F) Medição da distância da marcação; G) Marcações e defeito completos; H) Preenchimento com ionômero de vidro; I) Gel de doxiciclina 10%; J) Preenchimento do defeito com gel de doxiciclina 10%; K) Preenchimento do defeito com osso autógeno; L) Sutura.

Posteriormente às cirurgias, foi administrado analgésico cloridrato de tramadol (Tramadol, Teuto<sup>®</sup>, Brasil), IM, com 10mg/kg, posologia de 12/12 horas, durante 2 dias (DURAO et al. 2014).

#### 4.5 EUTANÁSIA

Todos os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO<sup>2</sup> (dióxido de carbono), do Biotério Central da UNIFAL-MG nos períodos de 4, 8 e 12 semanas de pós-operatório. Foi realizada a dissecação até obter somente o espécime e colocada em pote plástico identificado sob solução de paraformaldeído 4%.

#### 4.6 PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS

Após eutanásia, coletava-se a parte da calvária para estudos, onde todas as peças foram fixadas em paraformaldeído a 4% (Formol Estabilizado sol. 4%, Sciavicco Comércio e Indústria Ltda, Sabará, Minas Gerais, Brasil) e enviadas para análise microtomográfica inicialmente, seguido de análises histométrica, imunoistoquímica. Estas duas últimas análises não estarão neste manuscrito em decorrência do tempo hábil e fatores financeiros para concluí-lo, porém o trabalho segue o planejado, onde levará todas as análises para a publicação do artigo.

#### 4.7 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA DO DEFEITO ÓSSEO NAS CALVÁRIAS

##### 4.7.1 Obtenção das imagens microtomográficas

As peças foram analisadas na Universidade Federal de Uberlândia (UFU-MG), por meio do aparelho microtomógrafo  $\mu$ CT (SkyScan, modelo 1272, Bruker<sup>®</sup>, Kontich - Bélgica), sendo coletadas por um operador apenas, padronizando, assim, as imagens (FIGURA 15 “A”; “B”).

As imagens resultantes foram reconstruídas tridimensionalmente (3D) com tamanho de voxel de 10  $\mu\text{m}^3$  utilizando o *software* NRecon<sup>®</sup> (versão 1.6.10.4, Bruker<sup>®</sup>, Bélgica), seguidas da escolha do plano coronal para análise, utilizando o *software* DataViewer<sup>®</sup> (versão 1.5.1.2, Bruker<sup>®</sup>, Bélgica, 2014) e posteriormente submetidas à análise morfométrica, utilizando o *software* CT Analyser<sup>®</sup> (Ctan) (versão 1.15.4.0, Bruker<sup>®</sup>, Bélgica), (HATORI, et al. 2014). As referências de escaneamento usada no microtomógrafo Skyskan 1272 foram: tamanho de pixel

10  $\mu\text{m}$ , voltagem 70Kv, corrente elétrica de 142  $\mu\text{A}$  e filtro de alumínio de 0,5mm, em 180°. Parâmetros de escaneamento foram os volumétricos (BV, BV/TV, BS) e de densidade (Tb.Th, Tb.Sp, Tb.N) obtidos na análise 3D pelo CTan<sup>®</sup>.

Após a reconstrução, foi selecionada uma região de interesse (ROI, do inglês *region of interest*, região de interesse), e um volume de interesse (VOI, do inglês *volume of interest*, volume de interesse), na distal dos fêmures para a análise morfométrica, utilizando como referência a placa de crescimento (DURAO et al. 2014). A reconstrução em 3D permite visualização com magnificação das imagens escaneadas do defeito ósseo criado e do processo de reparação, sendo analisadas de forma qualitativa pelo software SkyScan<sup>®</sup> 2D/3D conferindo análise individual em cada grupo, examinando especificamente a região do defeito ósseo.

Para inserção dos espécimes no aparelho de microtomógrafo foi utilizado papel absorvente umedecido com paraformol 4%, para fixar a peça no porta-amostra do aparelho e cera utilidade, para conferir estabilização total da peça para evitar vibrações durante o processo de escaneamento (FIGURA 15 C, D). Após escaneamento das peças, foram reconstruídas projeções microtomográficas utilizando o *software* Nrecon<sup>®</sup>, com parâmetros de margem de segurança de 2mm acima do início do defeito ósseo criado e composta por cerca de 680 a 880 fatias até alcançar o término do defeito ósseo avançando 2 mm abaixo.

Figura 8 - Imagens do microtomógrafo da UFU – MG e software de captação;

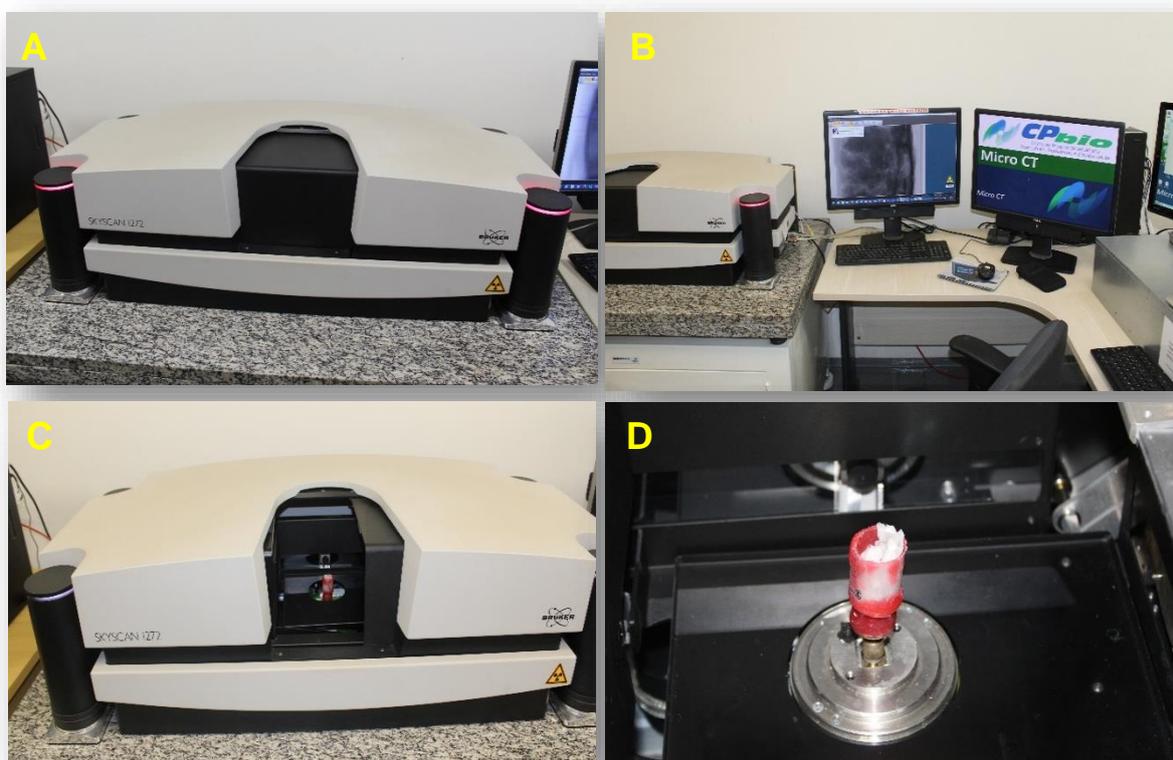
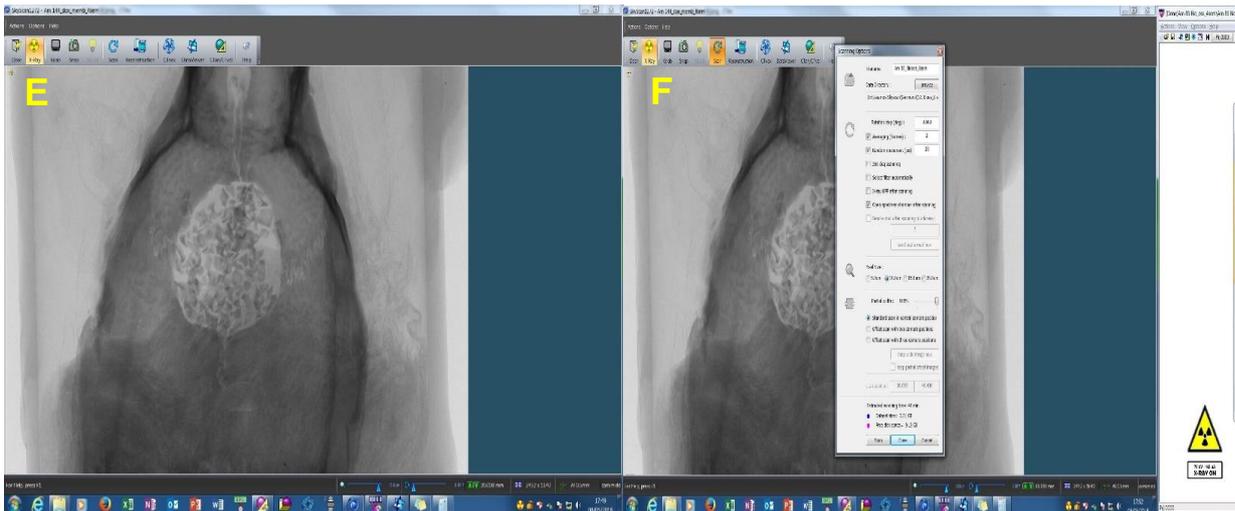


Figura 8 - Imagens do microtomógrafo da UFU – MG e software de captação;



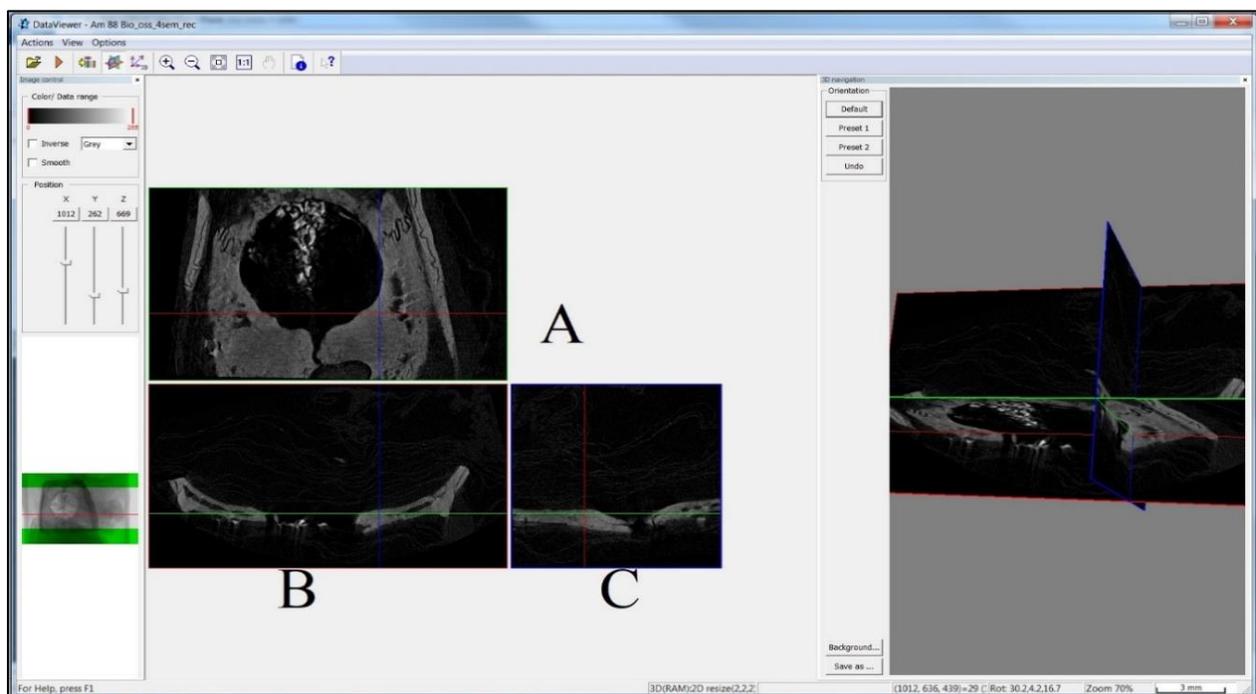
Fonte: Do autor.

- Nota: a) Microtomógrafo Skyskan 1272 da UFU – MG;  
 b) Computadores (datacenter) com softwares de captação de imagens;  
 c) Porta Amostra do microtomógrafo;  
 d) Espécime acoplado e fixado;  
 e) Captura da imagem pelo software NRecon®;  
 f) Escaneamento da imagem microtomográfica.

#### 4.7.2 Preparo das imagens microtomográficas

Para analisar uniformemente as imagens após sua captura, utilizou-se o software Dataviewer® que permite trabalhar as imagens para melhor posicioná-las e corrigi-las nos planos axiais, sagitais e coronais (FIGURA 16). O plano coronal foi escolhido para análise, pois comporta toda o diâmetro do defeito ósseo. Dessa forma, conseguiu-se determinar um ROI de 6mm de diâmetro sobre o defeito. Abaixo a imagem do software:

Figura 9 – Imagem da tela inicial do software Dataviewer®. Correção e posicionamento dos planos:



Fonte: Do autor

Nota: A) Plano coronal (plano utilizado); B) Plano transaxial; C) Plano sagital.

#### 4.7.3 Análise das imagens microtomográficas

Após reposicionamento e seleção do plano coronal, analisou-se as imagens através do *software* CTan<sup>®</sup> que permitiu quantificar estruturalmente as imagens microtomográficas e examinar:

- a) Tecido ósseo mineralizado neoformado – parâmetros: área, volume, distância, percentual das estruturas.
- b) Microarquitetura óssea – parâmetros: número de trabéculas, espessura trabecular e distância entre trabéculas.

Esses parâmetros utilizados são os mesmos adotados pela ASBMR (Sociedade Americana de Pesquisa Óssea e Mineral), como descrito pelos autores Dempster et al. (2013); Parfitt et al. (2009).

As imagens iniciais geradas pelo microtomógrafo foram processadas em formato bidimensional (2D) por meio de agrupamentos de pixels no formato de linhas com espessura de 0,020 mm (10µm) cada. Assim, o *software* agrupa todas as linhas selecionadas e através da binarização da imagem e seleção do ROI, gera uma imagem tridimensional (3D), por meio de unificação de voxels.

##### 4.7.3.1 Seleção dos slices (cortes microtomográficos) do defeito crítico na imagem

Os cortes microtomográficos (*slices*) relacionados à área do defeito crítico, foram escolhidos e agrupados em cada imagem dos diferentes espécimes, para, posteriormente, ser possível a realização da binarização das imagens e seleção do ROI. Esta seleção foi realizada pela marcação do corte microtomográficos correspondente ao início do defeito ósseo (*Top selection*) até a linha final desse (*Bottom selection*).

Todas as imagens analisadas tiveram a mesma quantidade de *slices*, para padronizar o tamanho de sua área examinada. Foi definido 100 slices por imagem, estabelecidos pela média de cortes de todas as imagens, para exame do *software*.

##### 4.7.3.2 Binarização das imagens

Após seleção dos cortes microtomográficos, foi realizada binarização das imagens, permitindo, assim, que o *software* transcreva os pixels em escala de cinza (*gray threshold*). O *software* lê os pixels de cada imagem e os converte em escalas de cinza, onde possam ser mensurados e analisados. 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. Neste estudo, a seleção do *threshold* para as 100 imagens foi realizada visualmente por comparação com a imagem original de acordo a metodologia descrita por Bouxsein et al., 2010, variando uma escala de cinza. Dessa forma, foi possível diferenciar o tecido mole do tecido duro mineralizado na região anatômica do defeito de 6mm na calvária, sendo cada imagem submetida a um mesmo *threshold*. Esse valor de *threshold* pode produzir imagens subvalorizadas ou supervalorizadas (FIGURA 10). Assim, os pixels marcados em branco representaram o tecido ósseo mineralizado ou biomaterial (dependendo de qual grupo estiver sob análise), enquanto que os pixels marcados em preto representaram o tecido não mineralizado (tecido mole). Seguindo esta metodologia foi possível identificar o osso neoformado, o osso nativo e o tecido mole.

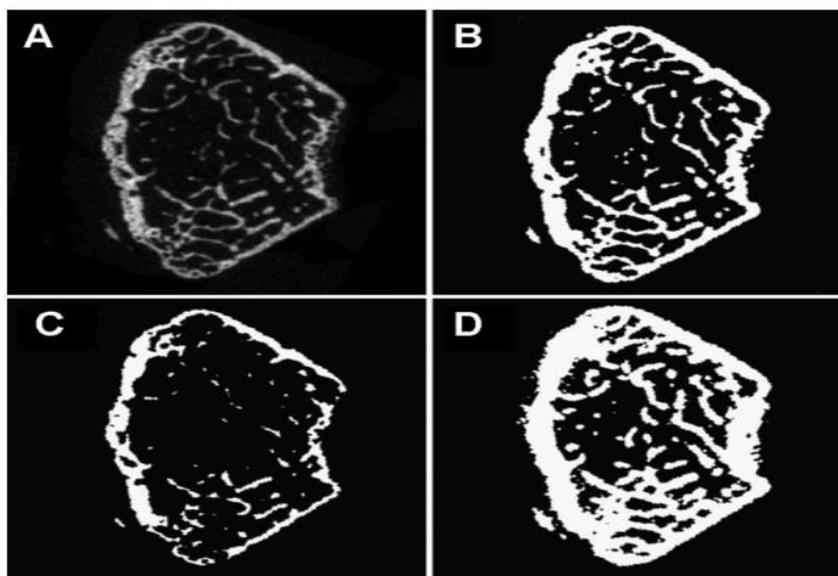


Figura 10 – Imagem demonstrando o *threshold*, que pode produzir imagens subvalorizadas ou supervalorizadas:

- Legenda:
- a) Imagem original;
  - b) Imagem binarizada com *threshold* correto;
  - c) Imagem binarizada com *threshold* elevado;
  - d) Imagem binarizada com *threshold* baixo.

Fonte: Bouxsein et al. 2010.

No tocante à densidade, o biomaterial presente possui densidade maior quando comparado à estrutura óssea neoformada. Logo para a identificação dos biomateriais, foi utilizado *threshold* de 152 até 255. Para identificação do osso neoformado, a *threshold* de 60 até 152 foram utilizados. Valores de *thresholds* entre 0 e 60 correspondiam aos tecidos mole e espaços vazios.

#### **4.7.3.3 Escolha e delimitação do ROI**

Foi definido um ROI de diâmetro 6mm, no formato circular no plano coronal, correspondendo ao formato do defeito ósseo original, permitindo, assim, que se analisasse com o *software* somente na região delimitada. Em seguida, foi acionado a função no *software* para definir essa mesma ROI (região óssea de interesse) para todas as 100 cortes microtomográficos que foram previamente selecionadas. Dessa forma, conseguiu-se transformar uma ROI em um VOI (volume de interesse ósseo), tridimensional, através da união dos pixels de cada ROI em todas os cortes selecionados, convertendo-os em *voxels* isotrópicos de  $10 \mu\text{m}^3$ . Essa transformação, permite, portanto, que o *software* realize a leitura dos *voxels* e produza dados volumétricos das regiões selecionadas e das diferentes estruturas analisadas, biomaterial e osso neoformado.

#### **4.7.3.4 Análise em 3D – Aquisição de parâmetros volumétricos e de densidade**

Depois de ter formado os VOIs, executou-se a análise em 3D, como adotada pela ASBMR. Como descrito por Parfitt et al. 2009; Bouxsein et al. 2010; Dempster et al. 2013, o *software* processou esses VOIs, com *threshold* 60-255, e como resultado gerou os seguintes parâmetros volumétricos e de densidade:

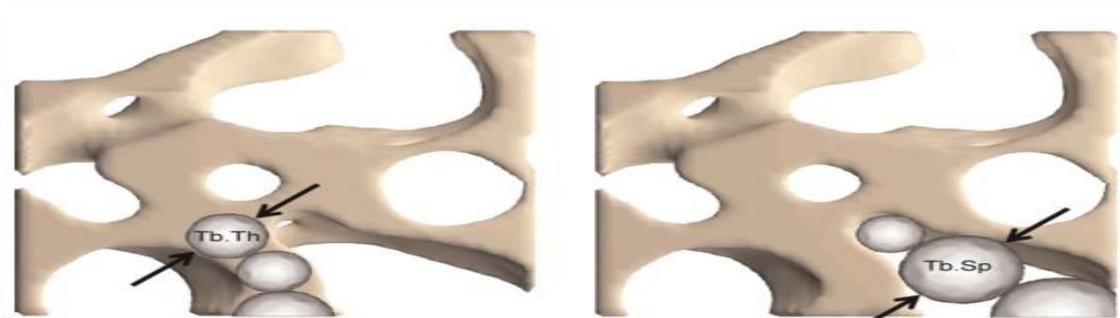
Parâmetros volumétricos:

- a) **Volume ósseo (BV – Bone Volume)**: quantidade de *voxels* presentes apenas no tecido ósseo mineralizado, expresso em  $\text{mm}^3$ ;
- b) **Superfície óssea (BS – Bone surface)**: quantidade de *voxels* dentro do volume total de interesse, área de superfície óssea, expressa em  $\text{mm}^2$ ;
- c) **Porcentagem de volume ósseo (BV/TV - Percent bone volume)**: volume ósseo dividido pelo volume total, expresso em %.

Parâmetros de microarquitetura óssea:

- d) **Espessura Trabecular (Tb.Th - *Trabecular thickness*)**: média da espessura das trabéculas, expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram dentro da trave óssea (FIGURA 26);
- e) **Distância entre Trabéculas (Tb.Sp - *Trabecular separation*)**: média da distância entre as trabéculas expressa em mm, determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram entre as traves ósseas (FIGURA 18);
- f) **Número de Trábelucas (Tb.N - *Trabecular number*)**: mensuração da média do número de trabéculas por unidade de comprimento, expresso em 1/mm.

Figura 11 - Representação esquemática do método em 3D. Aplicação dos círculos para delimitar a área calculada de Tb.Th e Tb.Sp;



Fonte: Bouxsein et al. 2010.

#### **4.7.3.5 Análise estatística da microtomografia**

A análise estatística foi realizada através do *software* R<sup>®</sup> (R CORE TEAM, 2018) com o pacote ExpDes (Ferreira; Cavalvanti; Nogueira, 2018). Para analisar estatisticamente, os resultados de cada variável (TV, BV, BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N) produzidos pelo *software* CTan<sup>®</sup> foram submetidos à avaliação descritiva para obtenção da média, desvio padrão mínimo e máximo. O método utilizado para avaliar a possível diferença entre grupos e tempos foi o teste Shapiro-Wilk, confirmando o teste de normalidade dos resíduos da análise, seguido do teste ANOVA (fatorial 3x2) em delineamento inteiramente casualizado seguido pelo teste post-hoc de Tukey com um nível de significância de 5%.

## 5 RESULTADOS

Os animais analisados foram mantidos saudáveis durante todo o período experimental (4, 8 ou 12 semanas), demonstrando boa tolerância ao procedimento cirúrgico e ausência de sinais de infecção após as intervenções.

### 5.1 ANÁLISE MICROTOMOGRÁFICA QUANTITATIVA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para obtenção dos dados, foram escaneados e usados 3 animais de cada grupo/período no microtomógrafo, e depois de submetidos aos processamentos dos *softwares*, realizou análise estatística de 3 ratas de cada grupo. A normalidade dos dados foi verificada. As médias percentuais e os desvios-padrões para todos os grupos e períodos, assim como o resultado da comparação entre os mesmos, foram calculados. Os valores de *threshold* utilizado foram de 60 a 255 no Ctan®.

A tabela 2 apresenta os dados referentes aos parâmetros volumétricos e de densidade microtomográficos identificados e utilizados para análise estatística: BV (volume ósseo), BV/TV (volume ósseo em relação ao volume tecidual), BS (Superfície Óssea), Tb.Th (Espessura trabecular), Tb.N (número de trabéculas) e Tb.Sp (Distância entre as trabéculas).

Tabela 2 – Banco de dados da análise CTan®

GRUPO	Am	Sem	BV	BV/TV	BS	Tb.Th	Tb.N	Tp.Sp
DOX	Am12	4	5.708	7.472	98.733	0.235	0.320	1.509
DOX	Am78	4	6.578	8.581	108.209	0.216	0.399	1.481
DOX	Am84	4	5.324	6.945	91.674	0.188	0.370	1.244
CS	Am15	4	5.789	7.551	134.754	0.157	0.482	1.634
CS	Am17	4	4.333	5.652	66.472	0.217	0.261	1.578
CS	Am18	4	7.792	10.166	108.430	0.265	0.384	1.328
SHAM	Am153	4	4.895	6.386	71.775	0.268	0.239	1.170
SHAM	Am155	4	4.359	5.686	112.802	0.171	0.334	1.524
SHAM	Am161	4	13.527	17.647	155.917	0.315	0.562	1.365
AUT	Am130	4	18.786	24.510	296.266	0.215	1.143	0.699
AUT	Am131	4	8.972	11.705	131.373	0.241	0.488	1.302
AUT	Am132	4	13.879	18.108	213.819	0.228	0.815	1.009
DOX	Am09	8	7.003	9.136	110.722	0.206	0.445	1.375
DOX	Am10	8	4.750	6.213	84.845	0.196	0.319	1.320
DOX	Am11	8	10.874	14.186	115.207	0.258	0.551	1.231
CS	Am29	8	4.791	6.284	73.979	0.240	0.263	1.643
CS	Am85	8	8.174	10.663	97.495	0.300	0.356	1.484

Continua.

Tabela 2 – Banco de dados da análise Ctan®

Conclusão.

CS	Am90	8	6.429	8.387	99.807	0.241	0.349	1.491
SHAM	Am147	8	4.182	5.455	49.228	0.325	0.168	1.685
SHAM	Am149	8	8.332	11.487	105.597	0.276	0.418	1.432
SHAM	Am152	8	7.518	10.048	84.564	0.319	0.316	1.579
AUT	Am107	8	16.577	21.625	174.852	0.354	0.613	0.936
AUT	Am108	8	20.510	24.279	216.938	0.335	0.725	0.781
AUT	Am109	8	5.081	17.288	80.231	0.248	0.700	0.680
DOX	Am02	12	11.170	15.012	157.166	0.240	0.627	0.956
DOX	Am04	12	10.955	15.608	170.601	0.202	0.774	1.294
DOX	Am05	12	4.622	6.030	58.966	0.327	0.185	1.724
CS	Am20	12	3.473	4.676	44.470	0.288	0.163	1.623
CS	Am22	12	7.794	10.601	107.561	0.256	0.416	1.483
CS	Am23	12	4.293	5.600	54.624	0.346	0.163	1.568
SHAM	Am77	12	8.510	12.019	114.191	0.273	0.441	0.932
SHAM	Am80	12	5.404	7.263	62.586	0.353	0.206	1.501
SHAM	Am82	12	7.208	9.488	70.643	0.427	0.223	1.631
AUT	Am52	12	15.807	20.834	185.776	0.292	0.715	0.831
AUT	Am54	12	9.163	12.489	114.538	0.324	0.386	1.156
AUT	Am55	12	15.585	20.332	187.002	0.296	0.689	0.855

Fonte: Do autor

Nota: Dados brutos de cada rata descritos em seu respectivo grupo e períodos experimentais. Este banco de dados foi submetido aos testes estatísticos mencionados no método. Abaixo, consta em cada parâmetro microtomográfico analisado as tabelas com os resultados obtidos para o efeito de grupo e para o efeito de período e se houve interação entre eles. Legenda: \*DOX: Grupo doxiciclina; \*CS: Grupo coágulo sanguíneo; \*SHAM: Grupo cirurgia fictícia; \*AUT: Grupo autógeno; \*AM: Amostra; \*SEM: Semana.

### 5.1.1 Volume ósseo (BV)

Para a variável volume ósseo (BV) não houve interação entre grupos e períodos (valor p interação >0.973). Para grupos existe diferença significativa (valor p grupo <0.001). As médias do volume ósseo (BV) neoformado, em mm<sup>3</sup>, e o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 3. A maior média de volume ósseo foi observada no grupo OVX-AUT, correspondendo a 13,817mm<sup>3</sup>, com diferença estatística em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos OVX-DOX, SHAM e OVX-CS, mesmo o grupo experimental OVX-DOX sendo numericamente diferente dos demais.

Quanto aos períodos não houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor p do período 0.967). Na Tabela 3 são apresentadas as médias dos grupos e períodos e os respectivos resultados do teste de Tukey.

Tabela 3 – Médias, medianas e desvios padrão do volume ósseo (BV), em mm<sup>3</sup>, de acordo com os períodos e grupos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
4	7.593	5.869	5.971	5.869360	<b>8.328 a</b>	6.782	3.277
8	6.677	7.542	6.464	7.542118	<b>8.685 a</b>	7.109	3.127
12	7.040	8.915	5.186	8.915100	<b>8.665 a</b>	7.978	3.097
<b>Média</b>	<b>7.103 b</b>	<b>13.817 a</b>	<b>5.874 b</b>	<b>7.442 b</b>			
<b>Mediana</b>	7.040	13.879	5.971	7.542			
<b>DP</b>	0.377	0.224	0.526	1.245			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia. Os gráficos estão dispostos pela ordem dos resultados (APÊNDICE II).

### 5.1.2 Percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV):

Para a variável percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV) não houve interação entre grupos e períodos (valor  $p > 0.838$ ). Para grupos existe diferença significativa (valor  $p < 0.00002$ ). A média de BV/TV, o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 4. A maior média de percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual foi observada no grupo OVX-AUT, correspondendo a 19.0183%, com diferença estatística em relação aos demais grupos ( $p < 0.05$ ). Não houve diferenças estatísticas entre os grupos OVX-DOX, SHAM e OVX-CS, mesmo o grupo experimental OVX-DOX sendo numericamente diferente dos demais. Quanto aos períodos não houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor  $p$  do período  $> 0.763$ ). Aplicando o teste de Tukey, não houve diferença estatística quando se considerou os períodos experimentais ( $p \geq 0,05$ ).

Tabela 4 – Médias e desvio padrão do percentual de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV), em %, de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
4	9.906	18.107	7.789	7.666	<b>10.867 a</b>	8.848	4.274
8	8.996	21.064	8.444	9.845	<b>12.087 a</b>	9.420	5.206
12	9.589	17.884	6.959	12.216	<b>11.662 a</b>	10.903	4.045
<b>Média</b>	<b>9.497 b</b>	<b>19.018 a</b>	<b>7.731 b</b>	<b>9.909 b</b>			
<b>Mediana</b>	9.589	18.107	7.789	9.845			
<b>DP</b>	0.377	1.449	0.608	1.858			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia.

### 5.1.3 Superfície óssea (BS)

Para a variável superfície óssea (BS) não houve interação entre grupos e períodos (valor p interação >0.735). Para grupos existe diferença significativa (valor p grupo <0.00068). A média de superfície óssea (BS) neoformado, em mm<sup>2</sup>, o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 5. A maior média de BS foi observada no grupo OVX-AUT, correspondendo a 177.866mm<sup>2</sup>, com diferença estatística em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos OVX-DOX, OVX-SHAM e OVX-CS, mesmo o grupo experimental OVX-DOX sendo numericamente diferente dos demais.

Quanto aos períodos não houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor p do período >0.341). Aplicando o teste de Tukey, não houve diferença estatística quando se considerou os períodos experimentais ( $p \geq 0,05$ ).

Tabela 5 – Médias, medianas e desvio padrão do volume ósseo (BS), em mm<sup>2</sup>, de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
<b>4</b>	113.497	213.819	103.218	99.538	<b>132.518 a</b>	108.358	47.217
<b>8</b>	79.796	157.340	90.426	103.590	<b>107.788 a</b>	97.008	29.825
<b>12</b>	82.473	162.438	68.885	128.910	<b>110.677 a</b>	105.692	37.262
<b>Média</b>	<b>91.922 b</b>	<b>177.866 a</b>	<b>87.510 b</b>	<b>110.680 b</b>			
<b>Mediana</b>	82.473	162.438	90.426	103.590			
<b>DP</b>	15.295	25.508	14.168	12.997			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia.

### 5.1.4 Espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th)

Para a variável espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th) não houve interação entre grupos e períodos (valor p interação >0.826). Para grupos existe diferença significativa (valor p grupo <0.021). A média de espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm, o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 6. Houve diferença estatística entre para o efeito de grupos e de períodos ( $p < 0.05$ ). O Grupo SHAM apresentou maior média em relação as demais médias dos grupos, sendo estatisticamente diferente do grupo doxíciclina que na média dos 3 períodos (4, 8

e 12 semanas) teve espessuras trabeculares menor em mm<sup>2</sup>. O grupo OVX-AUT e OVX-CS são, estatisticamente, comuns tanto com o grupo SHAM quanto ao grupo OVX-DOX.

Quanto aos períodos houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor p do período <0.003). Aplicando o teste de Tukey, houve diferença estatística quando se considerou os períodos experimentais (p < 0,05).

Tabela 6 – Médias, mediana e desvio padrão da espessura das trabéculas ósseas (Tb.Th), em mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
4	0.251	0.227	0.213	0.212	<b>0.226 b</b>	0.226	0.016
8	0.306	0.312	0.260	0.219	<b>0.274 ab</b>	0.274	0.038
12	0.351	0.304	0.296	0.256	<b>0.302 a</b>	0.302	0.034
<b>Média</b>	<b>0.303 a</b>	<b>0.281 ab</b>	<b>0.256 ab</b>	<b>0.229 b</b>			
<b>Mediana</b>	0.306	0.304	0.260	0.219			
<b>DP</b>	0.041	0.038	0.034	0.019			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia. Os gráficos estão dispostos pela ordem dos resultados. Com o passar do tempo, a média da espessura das trabéculas foi aumentando, onde o período experimental de 4 semanas é estatisticamente diferente de 12 semanas, e o período experimental de 8 semanas é comum tanto com 4 semanas quanto com 12 semanas, estatisticamente.

### 5.1.5 Distância das trabéculas ósseas (Tb.Sp)

Para a distância das trabéculas (Tb.Sp) não houve interação entre grupos e períodos (valor p interação >0.698). Para grupos existe diferença significativa (valor p grupo <0.00001). A distância das trabéculas ósseas (Tb.Sp) é determinada pelo diâmetro máximo de esferas que se enquadram entre as traves ósseas. A média de Tb.Sp, o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 7. A menor média de distância das trabéculas ósseas foi observada no grupo OVX-AUT, correspondendo a 0.915mm, com diferença estatística em relação aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre os grupos OVX-DOX, SHAM e OVX-CS. Quanto aos períodos não houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor p do período >0.962). Aplicando o teste de Tukey, não houve diferença estatística quando se considerou os períodos experimentais (p ≥ 0,05).

Tabela 7 – Médias, medianas e desvio padrão da distância das trabéculas ósseas (Tb.sp), em mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
4	1.353	1.000	1.513	1.411	<b>1.319 a</b>	1.382	0.193
8	1.565	0.799	1.539	1.308	<b>1.303 a</b>	1.423	0.308
12	1.354	0.947	1.558	1.324	<b>1.296 a</b>	1.339	0.221
<b>Média</b>	<b>1.424 a</b>	<b>0.915 b</b>	<b>1.536 a</b>	<b>1.348 a</b>			
<b>Mediana</b>	1.354	0.947	1.539	1.324			
<b>DP</b>	0.100	0.085	0.018	0.045			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia.

### 5.1.6 Número de trabéculas ósseas (Tb.N)

Para o número de trabéculas ósseas (Tb.N) não houve interação entre grupos e períodos (valor p interação >0.644). Para grupos existe diferença significativa (valor p grupo <0.00021). A média de Tb.N, o desvio padrão e as diferenças estatísticas em relação aos grupos estão apresentadas na Tabela 8. A maior média de número de trabéculas ósseas, medidas em 1/mm, foi observada no grupo OVX-AUT, correspondendo a 0.697 1/mm, com diferença estatística em relação aos demais grupos (p<0.05). Não houve diferença estatística entre os grupos OVX-DOX, SHAM e OVX-CS, mesmo o grupo experimental OVX-DOX sendo numericamente diferente dos demais. Quanto aos períodos não houve diferença significativa entre 4, 8 e 12 semanas (valor p do período >0.616). Aplicando o teste de Tukey, não houve diferença estatística quando se considerou os períodos experimentais (p ≥ 0,05).

Tabela 8 – Médias, medianas e desvio padrão do número de trabéculas ósseas (Tb.N), expresso em 1/mm, de acordo com os grupos e períodos experimentais.

Tempos	Tratamentos				Média	Mediana	DP
	SHAM	OVX-AUT	OVX-CS	OVX-DOX			
4	0.378	0.815	0.375	0.363	<b>0.483 a</b>	0.377	0.192
8	0.300	0.679	0.322	0.438	<b>0.435 a</b>	0.380	0.150
12	0.290	0.596	0.247	0.528	<b>0.415 a</b>	0.409	0.150
<b>Média</b>	<b>0.323 b</b>	<b>0.697 a</b>	<b>0.315 b</b>	<b>0.443 b</b>			
<b>Mediana</b>	0.300	0.679	0.322	0.438			
<b>DP</b>	0.039	0.090	0.053	0.068			

Fonte: Do autor.

Nota: Médias com letras diferentes, diferem significativamente pelo teste Tukey. DP – Desvio padrão. Os grupos estão dispostos na ordem da descrição na metodologia.

## 6 DISCUSSÃO

A Osteoporose tem se tornado cada vez mais prevalente em função dos avanços da Medicina e maior longevidade do ser humano (Kanis et al. 2008). É uma doença degenerativa óssea e mais frequente em mulheres, e pode eventualmente interferir com o sucesso da terapêutica reabilitadora com implantes dentários. Havendo, portanto, impedimento ou alteração no metabolismo ósseo causado pela osteoporose, admite-se que a remodelação ao redor dos implantes dentários esteja modificada, levando a chances maiores de falhas na reabilitação bucal. Na menopausa e no envelhecimento, o equilíbrio entre a reabsorção e a aposição ósseas está perturbado, havendo muito mais reabsorção que aposição, daí a perda de densidade óssea.

O mesmo se dá quando o paciente apresenta defeitos ósseos decorrentes de patologias buco-dentárias ou perdas dentárias associadas às doenças do metabolismo ósseo. A consequência é ter defeitos ósseos mais acentuados ou redução de massa óssea já comprometida (ALKAN et al. 2002; NETO et al. 2006; TATULLO et al. 2012; VAN HOUDT et al. 2018).

Na osteoporose, histomorfologicamente, podem encontrar córtexes mais finos, trabeculação do córtex, redução da massa óssea trabecular, diminuição da espessura das trabéculas ósseas propriamente ditas e redução das ligações inter-trabeculares. O equilíbrio existente no osso normal entre a reabsorção e aposição é inexistente no osso osteoporótico. Uma reabsorção óssea excessiva contrabalançada por uma ineficaz neoformação de osso traduz-se numa vincada perda de massa óssea (ERGOGAN et al. 2007).

Assim, a hipótese de empregar uma substância, mesmo que aplicada localmente, que reduz a atividade osteoclastogênica do tecido pode ser promissora. Em função dessa hipótese, justificou-se o presente estudo em que se empregou o gel de doxiciclina a 10% em defeitos críticos de calvárias de ratas ovariectomizadas, que apresentaram quadro compatível de osteoporose.

Desta maneira, pode-se perceber que 8 semanas após utilização da ovariectomia bilateral em ratas notou-se alteração da qualidade óssea nos fêmures dos animais. A percentagem de volume ósseo em relação ao volume

tecidual (BV/TV) obtida do fêmur das ratas ovariectomizadas (grupo OVX) foi  $14.02 \pm 2.079$  enquanto o valor obtido do fêmur das ratas que sofreram cirurgia fictícia (SHAM) foi  $32.931 \pm 3.427$ . Estudo de Neto et al. (2006) já evidenciara que o procedimento cirúrgico de ovariectomia reduziu significativamente (36%) a concentração sérica de estrogênio, sugerindo que ratas ovariectomizadas são um bom modelo para estudo de desordens causadas pela menopausa, fase fisiológica do organismo feminino em que os ovários cessam a produção tanto de estrogênio quanto de progesterona. O conteúdo de cálcio ósseo dos animais do grupo ovariectomizado foi menor e a atividade da fosfatase alcalina foi maior ( $p < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle. Esses resultados são um indicativo de aumento do metabolismo ósseo, ou seja, de processo de perda óssea. A radiodensidade, avaliada também naquele estudo, na epífise de todos os ossos suportam o que já foi descrito previamente para os resultados encontrados no conteúdo de cálcio ósseo. As ratas ovariectomizadas apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparadas aos animais do grupo controle.

. Verificou-se, portanto, que o modelo utilizado no presente estudo foi adequado devido ao fato de apresentar características de perda óssea semelhantes às ocorridas na osteoporose em mulheres pós-menopausa. Este modelo tem sido utilizado em diversos estudos e através dele tem sido possível avaliar, em uma condição específica de falha na osteogênese, o potencial regenerativo intrínseco do tecido ósseo e também identificar o comportamento biológico e a eficácia dos enxertos ósseos em situações clínicas com baixos níveis de estrogênio (DURÃO et al. 2014; ERGOĞAN et al. 2007; MIRON et al. 2014; VAN HOUDT et al. 2018). O período entre a cirurgia de ovariectomia e o prazo para a indução da osteoporose utilizado no presente estudo de oito semanas foram de acordo aos estudos de Durão et al. (2014) e Miron et al. (2014). Reafirma-se, então que neste período, foi possível observar uma diminuição na densidade óssea dos animais que sofreram a ovariectomia em comparação aos do grupo SHAM, conforme Tabela 1 e Figuras 4 e 5.

Salienta-se o fato desses animais roedores da raça Wistar serem animais de pequeno porte, diminuindo os custos da pesquisa e aumentando a facilidade de realização da mesma. A linhagem Wistar é uma das mais utilizadas

mundialmente em pesquisas de laboratório por sua fácil criação em laboratórios, fácil manipulação e não serem tão sensíveis e susceptíveis a fatores ambientais como os camundongos. Analisando-se somente superfície óssea entre os dois gêneros, observa-se diferença estatística entre estes, em que as fêmeas apresentaram menor média. A superfície óssea está relacionada com a atividade dos osteoclastos e osteoblastos e esta relação pode ser alterada por fatores hormonais, em que as fêmeas são mais susceptíveis a alterações que os machos, conforme citam Theill et al. (2002) e Lacerda et al. (2010). O mesmo raciocínio pode ser seguido para o número e separação de trabéculas. Queda do hormônio estrogênio, que afeta a regulação da OPG e desequilibra o sistema osteoclasto/osteoblasto, fazendo com que as fêmeas sejam mais susceptíveis a alteração óssea do que os machos, assemelhando ao que poderia ocorrer com mulheres na menopausa.

O modelo experimental de defeitos em calvárias tem sido utilizado em diferentes estudos sobre eficácia de biomateriais (LOURENÇO, 2002; MESSORA et al. 2007, LOURENÇO et al. 2010; OLIVEIRA et al. 2015; SILVA et al. 2016; FABRIS et al. 2018, LUCATELI et al. 2018). Esse modelo quando empregado no presente estudo também permitiu observar que todos os espécimes apresentaram fechamento incompleto nos períodos de 4, 8 e 12 semanas, evidenciando a condição específica do defeito crítico, assim chamado por se tratar da menor ferida óssea em um animal que não cicatriza espontaneamente em um determinado período de tempo (SOHN et al. 2010). No presente trabalho, além de ter pouca formação óssea vista nas imagens microtomográficas (restrita às margens do defeito) no grupo controle (OVX-CS), a evolução de 4 para 8 semanas, e de 8 para 12 semanas de observação não mostrou diferenças significativas no referido grupo, deixando claro a dificuldade de cicatrização óssea nesse tipo de defeito experimental, principalmente associado ao quadro de comprometimento do metabolismo ósseo trazido pela osteoporose. Pode ser considerado então que o modelo experimental utilizado de defeitos ósseos na calvária das ratas pareceu adequado para avaliação da regeneração óssea nesse estudo. Embora o que se esperava era um melhor comportamento do gel de doxiciclina nesse curto período de tempo analisado, visto que todos os gráficos gerados a partir das tabelas de resultados do

presente estudo demonstraram um crescimento ascendente das médias com o passar do tempo, visto que a doxiciclina apresenta uma resposta mais tardia e somada ao fato de estar em um osso fraco, osteoporótico, gerou maior grau de dificuldade de verificação de sua capacidade de auxílio na neoformação óssea (BETANY et al. 2000; GOLUB, et al. 2010; SILVA et al. 2016; ZHANG et a. 2018).

A técnica de confecção de canaletas em formato de “L”, posicionadas 2mm anterior e posteriormente ao defeito na calvária e preenchidas com ionômero de vidro em estudos realizados por Silva et al. (2016) ao invés de amálgama como inicialmente proposta por Messoria et al. (2007), permite resultados de identificação das margens do defeito cirúrgico original trazendo boa referência para a quantificação do osso neoformado e evita artefatos de imagem na microtomografia computadorizada trazidos por material de preenchimento metálico, como o amálgama, e que produziria interferência na interpretação das imagens tomográficas a serem analisadas em estudos futuros.

Quanto aos períodos experimentais aplicados no estudo em questão, muitos autores têm comprovado que um período de cicatrização de 2 a 4 semanas pode ser recomendado para avaliar a fase inicial da resposta de cura tecidual, bem como a estabilidade dos materiais ou reação do hospedeiro, enquanto 8 semanas ou mais pode ser apropriado para avaliar a cicatrização tardia, tais como a incorporação de osso, a reabsorção de materiais, a remodelação óssea ou a quantidade de regeneração óssea alcançada (BODDE et al. 2008; SOHN et al. 2010). Preferiu-se nesse estudo os períodos de avaliação de 4, 8 e 12 semanas para a análise microtomográfica considerando os principais parâmetros ósseos (BV, BV/TV, BS, e os parâmetros de densidade óssea), obtendo informações das fases inicial e tardia da cicatrização das feridas de calvária, como já utilizados em trabalhos anteriores de Oliveira et al. (2015) e Silva et al. (2016), Lucateli et al. (2018).

Vários estudos vêm analisando o comportamento de diferentes biomateriais que contribuem para as reconstruções ósseas na área Odontológica principalmente no campo da cirurgia bucomaxilofacial, implantodontia e periodontia. E se ainda hoje as pesquisas objetivam analisar a regeneração óssea associada com a utilização de substitutos ósseos são plenamente

justificáveis porque dentre os materiais disponíveis nenhum apresenta as características de um material ideal. O estudo de Silva et al (2016) analisou os efeitos da aplicação local do gel de doxiciclina, preparado com natrosol, sobre a regeneração óssea de defeitos críticos de calvária de ratos com metabolismo normal. Os autores observaram que o gel de doxiciclina à 10% teve um bom efeito na formação óssea desses defeitos. Em comparação, neste estudo o gel de doxiciclina a 10% foi testado em um osso com baixa densidade mineral e alta atividade osteoclástica, diferenciando-se da metodologia do estudo de Silva et al. (2016), mas, ainda assim, o grupo OVX-DOX apresentou tendência crescente durante o avançar dos tempos experimentais, embora não tenha encontrado diferença estatística com os grupos controles. A associação do gel de doxiciclina a 10% com o osso autógeno particulado, avaliada por Lucateli et al (2018), mostrou cicatrização óssea melhorada de forma significativa em defeitos críticos de calvária de ratos metabolicamente normais.

O presente estudo propôs, primariamente em análise microtomográfica, identificar o comportamento do gel de doxiciclina a 10% na formação óssea em defeitos de ratas ovariectomizadas, sendo um estudo inédito se tratando do uso de um hidrogel de doxiciclina nessa concentração, como material de favorecimento a neoformação óssea em defeitos de tamanho crítico de um osso com alteração metabólica (osteoporose). Devido a limites financeiros e de tempo hábil, não foi possível maior número de ratas para formar mais grupos de estudo, bem como este trabalho pertence a um grupo de pesquisa que tem uma sequência de grupos experimentais de enxertos sendo estudadas concomitantemente ao mesmo.

A hipótese lançada no presente estudo que o gel de doxiciclina a 10% pudesse contribuir de forma positiva para o preenchimento de defeitos de calvária de ratas osteoporóticas não foi comprovada. Não se conseguiu resultados importantes como aqueles mostrados nos estudos de Silva et al. (2016) e Lucateli (2018) nos defeitos de ratos com metabolismo normal.

Alguns aspectos precisam ser considerados. Um dos pontos críticos que interfere diretamente com o sucesso de qualquer tipo de terapia óssea regenerativa é o espaço disponível abaixo do retalho mucoperiosteal. De tal

modo, a capacidade de formação de um arcabouço ou *scaffold* pelo biomaterial utilizado para promover a regeneração óssea é de fundamental importância, uma vez que também permite a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos e osteoclastos (LOURENÇO, 2002; SARTORI et al., 2003; GIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; CARVALHO, et al., 2010; OGUNSALU, 2011). Desta maneira, o gel de doxiciclina, pela presença do Natrosol, contribuiria de alguma forma para manter o espaço sob o tecido mole da calvária da rata. O Natrosol, por ser um hidrogel não iônico à base de hidroxietilcelulose, e usado no preparo de formulações farmacêuticas como a empregada nesse estudo, funciona como um arcabouço quando inserido no defeito de calvária. O emprego do hidrogel à base de hidroxietilcelulose garantiu, nos trabalhos de Silva et al. (2016) e Lucateli et al. (2018), adequada função de veículo de entrega para a terapia com doxiciclina, com liberação sustentada e função de arcabouço para permitir concentrações locais de substâncias importantes, como proteínas e fatores de crescimento, para o metabolismo local (FEKETE et al. 2017). Mas no presente trabalho, a resistência do hidrogel Natrosol não se mostrou suficiente para propiciar um arcabouço importante na região do defeito, visto que o volume ósseo calculado pela análise microtomográfica (BV) do grupo OVX-DOX foi estatisticamente semelhante ao do grupo OVX-CS e menor que o do grupo OVX-AUT (as partículas do osso autógeno costumam manter os tecidos moles afastados garantindo adequada formação óssea nos defeitos. A resistência do hidrogel de hidroxietilcelulose não é a mesma encontrada nos hidrogéis à base de alginato empregados em alguns estudos com biomateriais (DARNELL et al. 2013; GUO et al. 2014). Assim, não se conseguiu no presente estudo garantir que o arcabouço de hidrogel fornecesse um ambiente 3D adequado que suportasse a adesão e a sobrevivência celular e nem fornecer caminhos bioquímicos que influenciassem a diferenciação celular e maturação do tecido como mostrado por Discher et al (2009) e Lutolf e Hubbell (2005).

Salienta-se que no grupo OVX-AUT a manutenção do espaço sob os tecidos ósseos foi melhor conseguida com as partículas ósseas autógenas, evidenciando na análise microtomográfica do parâmetro BV uma maior

quantidade de volume ósseo na região do defeito da calvária (média de 13.879, 14.056 e 13.518 mm<sup>3</sup> para 4, 8 e 12 semanas respectivamente). Mesmo sendo o osso particulado usado como enxerto autógeno um osso osteoporótico e inserido num defeito de calvária de rata osteoporótica. Isso mostra que o osso autógeno como enxerto ainda apresenta as principais propriedades necessárias para a regeneração tecidual (a osteocondução, a propriedade osteogênica e a capacidade osteoindutora do material).

Sabe-se que a principal forma de administração e a mais estudada da doxiciclina é a via sistêmica. Williams et al. (1996), Golub et al. (2010) e Payne e Golub (2011) avaliaram dosagens subclínicas sistêmicas da doxiciclina e identificaram seus efeitos na prevenção da perda óssea e no estímulo da neoformação óssea. A aplicação local da doxiciclina ainda foi pouco estudada. Silva et al. (2015) obtiveram bons resultados na reparação óssea em defeitos críticos de calvárias quando utilizaram gel de doxiciclina a 10%. Todavia, os experimentos foram realizados em animais com metabolismo ósseo normal, com uma metodologia diferente. A minociclina, outro derivado da tetraciclina, foi estudada através da aplicação local em defeitos ósseos periodontais, associados a terapia de reparação tecidual guiada e os melhores resultados de neoformação óssea foram obtidos quando a minociclina foi aplicada localmente na região dos defeitos em ratos normais (YOSHINARI et al. 2001).

Neste estudo a doxiciclina foi avaliada no reparo ósseo em defeito de tamanho crítico de rata com quadro de osteoporose. Com isso, pretendia-se abordar o processo de reparação óssea mediado pela ação desse antibiótico numa base de hidrogel (Natrosol) no modelo de ratas ovariectomizadas e comparar o processo de reparação obtido com o estabelecido em animais controle (SHAM). As ações anti-inflamatórias (GRIFFIN, 2010), anticolagenolíticas (CRAIG et al. 1998), neoformação óssea (SHAHABOOEI et al. 2015) e inibição das osteoclastogênese (SILVA et al. 2016) pela doxiciclina já são reconhecidas. Todavia, ainda não estão bem determinadas as possíveis interferências desses efeitos sobre a reparação óssea em casos de desequilíbrio do metabolismo ósseo como na osteoporose. Mesmo que sob os testes estatísticos aplicados o gel de doxiciclina não mostrou diferenças estatísticas, pôde-se verificar que numericamente apresentou resultados próximos aos do

padrão outro (enxerto autógeno), demonstrando graficamente que em todos os parâmetros apresentou ascendência. O tempo e a consistência do hidrogel a base de natrosol puro (sem adição de agentes oxidantes ou substâncias para conferir mais viscosidade) podem ter influído.

Optou-se pela análise em microtomografia computadorizada para esse trabalho. A  $\mu$ -CT é uma análise que possibilita a avaliação da microarquitetura óssea e permite também, em pesquisas ósseas, identificar e determinar o grau de mineralização e neoformação óssea (VERNA et al. 2002). Salienta-se que apenas o grupo OVX-DOX teve um aumento crescente de BV, BS e BV/TV nos diferentes períodos (BV: 4 semanas com média de  $5.870\text{mm}^3$ , 8 semanas com  $7.543\text{mm}^3$ , 12 semanas com  $8.916\text{mm}^3$ ; BS: 4 semanas com média de  $99.538\text{mm}^2$ , 8 semanas com  $103.591\text{mm}^2$ , 12 semanas com  $110.911\text{mm}^2$ ; BV/TV: 4 semanas com média de 7.666%, 8 semanas com 9.845%, 12 semanas com 12.217%). Com esta análise é possível obter imagens tridimensionais do osso sem destruir sua arquitetura e permite reconstruir a anatomia e morfologia dos tecidos. Além disso, a análise é feita de forma mais rápida se comparada a análise histológica, apresentando resultados semelhantes entre as duas análises, mesmo sendo realizada tridimensionalmente, isto é, sem interação de agentes físicos diretos sobre a amostra, como no caso de análise histológica e imunohistoquímica. Desta forma a  $\mu$ -CT tem sido utilizada como um método confiável e reprodutível (COWAN et al. 2007).

Os diferentes parâmetros investigados na análise microtomográfica nesse estudo permitiram mostrar que a inserção de partículas de osso autógeno retirado de ratas osteoporóticas (Grupo OVX-AUT) mostrou comportamento importante como material de preenchimento dos defeitos de calvárias. Além do BV, a percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual mostrou médias superiores aos demais grupos, bem como o parâmetro BS, salientando que nenhum dos defeitos foi preenchido totalmente por novo osso. Caracteriza-se que a utilização do osso autógeno, mesmo em condições de metabolismo alterado, permite melhorar o ambiente de defeitos ósseos em situações de osteoporose. O fornecimento de células osteoblásticas, condições de osteoindutividade e ambiente para que ocorra a osteocondução otimizam a reparação óssea local. Assim, apesar de vários biomateriais de enxerto

desenvolvidos nas últimas décadas, o osso autógeno ainda é altamente recomendado para o tratamento de defeitos de tamanho crítico (BLOCK, KENT, 1997; TATULLO et al. 2012; RESTOY-LOZANO et al. 2015). O osso autógeno apresenta ainda vantagens como qualidade óssea favorável, sem risco de transmissão ou antigenicidade, e previsibilidade no reparo de defeitos maiores ou maior atrofia (BLOCK, KENT, 1997). A osteogênese é uma característica exclusiva referentes a materiais orgânicos ou aos enxertos autógenos, os quais são capazes de induzir o crescimento ósseo, proveniente de células viáveis transferidas do interior do enxerto e, no início do processo de reparo ósseo, verifica-se intensa atividade celular e o processo de angiogênese (CHOUKROUN et al. 2006; TRAJANO et al 2016). No presente estudo o número de trabéculas (Tb.N) para o Grupo OVX-AUT se mostrou em maior número, mas a espessura dessas trabéculas não esteve melhor que a espessura encontrada no grupo SHAM evidenciando a qualidade um pouco deficiente desse osso.

Outra característica interessante observada é que o volume ósseo (BV) e a percentagem de volume ósseo em relação ao volume tecidual (BV/TV) do grupo OVX-AUT após a oitava semana se mostrou em redução. Isso pode ser explicado pelo fato de em períodos tardios existir uma franca remodelação do osso enxertado. E nesse caso a doença osteoporose, pelo desequilíbrio osteoblástico-osteoclástico, contribui com maior atividade clástica do osso, ao passo que o grupo OVX-DOX não teve oscilação de valores, tendenciado a um crescente e contínuo aumento com o tempo. Nos parâmetros da microarquitetura óssea, o grupo OVX-DOX manteve mais próximo ao grupo OVX-AUT, onde em Tb.Th obteve valores que aumentaram significativamente de 4 para 12 semanas. O Tb.Sp mostrou-se com médias menores no grupo OVX-AUT, por conta do arcabouço fornecido e em seguida o grupo OVX-DOX, SHAM e OVX-CS. O mesmo fato ocorreu em Tb.N, onde o grupo OVX-CS obteve valores inferiores aos demais grupos. Lucatelli et al. 2018 corroboram os resultados do grupo OVX-AUT.

O comportamento da doxíciclina visto no Grupo OVX-DOX quando se observa a evolução nos períodos experimentais, foi o único grupo que mostrou tendência de aumento progressivo dos parâmetros BV e BV/TV de 4 para 12 semanas. Mas acredita-se que a possível justificativa para a menor formação

óssea em animais osteoporóticos tratados com o gel de doxiciclina pode ser o aumento na atividade osteoclástica causada pela osteoporose, o que não foi superado pelas atividades de inibição da osteoclastogênese produzida pela doxiciclina. Van Houdt et al. (2018) e Zhang et al. (2018) avaliaram a reparação óssea em ratas osteoporóticas e identificaram acelerada degradação de biomateriais usados nos defeitos quando se comparou o período entre 4 e 12 semanas. Os autores ainda observaram que não somente a atividade osteoclástica possa ter sido responsável pela menor neoformação óssea, como também a menor atividade dos osteoblastos e menor capacidade deles em substituir o biomaterial por osso.

## **7 CONCLUSÃO**

Dentro dos limites desse estudo, conclui-se que os benefícios esperados do gel de doxicilina a 10% a base de natrosol não apresentaram alterações significativas que pudessem acelerar o processo de reparo ósseo ou estimular a maior neoformação óssea nos períodos experimentais propostos com desempenho no preenchimento de defeitos de tamanho críticos em calvárias de ratas com metabolismo ósseo alterado pela osteoporose.

## REFERÊNCIAS

- ALKAN A. et al. Histomorphometric Evaluation of the Effect of Doxycycline on the Healing of Bone Defects in Experimental Diabetes Mellitus: A Pilot Study. **J. Oral Maxillofac Surg.**, v. 60, p. 898-904, 2002.
- AL-ALI, W.; BISSADA, N. F.; GREENWELL, H. The effect of local doxycycline with and without tricalcium phosphate on the regenerative healing potential of periodontal osseous defects in dogs. **Journal of Periodontology**, v. 60, n. 10, p. 582-590, 1989.
- ALMAZIN, S. M. et al. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 6, p. 999-1005, 2009.
- BAX, C. M. et al. Tetracyclines modulate cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses in the osteoclast associated with “Ca<sup>2+</sup> receptor” activation. **Biosci Rep**, v. 13, p. 169 –174, 1993.
- BENCHERIF, S. A. et al. Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties. **Biomaterials**, v.29, n.12, p.1739–1749, 2008.
- BENCHERIF, S. A. et al. End-group effects on the properties of PEG-co-PGA hydrogels. **Acta Biomater**, v.5, n.6, p.1872–1883, 2009.
- BETTANY, N. M. et al. Tetracyclines induce apoptosis in osteoclasts. **Bone**, v. 27, p. 75–80, 2000.
- BEZERRA, M. M. et al. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 5, p. 613-616, 2002.
- BLACK, J. Composition and structure of bone. New Jersey, **Summit**, 1991.
- BLOCK, M. S., KENT, J. N. Sinus augmentation for dental implants: The use of autogenous bone. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 55, p.1281–1286, 1997.
- BODDE, E. W. et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 85, p. 206-217, 2008.
- BOLGEN, N. et al. Three-dimensional ingrowth of bone cells within biodegradable cryogel scaffolds in bioreactors at different regimes. **Tissue Eng Part A**, v.14, n.10, p.1743–1750, 2008.
- BÖLGEN, N., et al. Tissue responses to novel tissue engineering biodegradable cryogel scaffolds: An animal model. **J Biomed Mater Res A** v.91, n.1, p.60–68, 2009.
- BOSCH, C; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect. In testing bone-regenerating materials. **J Craniofac Surg.**, v.9, p.310-316, 1998.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res.**, v. 25, p. 1468–86, 2010.
- BOYCE, B. F.; XING, L. **Functions of RANKL/RANK/OPG** in bone modeling and remodeling Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 473, n.2, p. 139 – 146, 2008.
- BURNS, F. R. Inhibition of purified collagenase from alkali- burned rabbit corneas. **Invest Ophthalmol Vis Sci.**, v. 30, p. 1569–1575, 1989.

- BURDICK, J. A., PRESTWISH, G.D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. **Adv Mater** v.23, n.12, p.41–56, 2011.
- CARVALHO, P. S. P. et al. Biomateriais aplicados à implantodontia. **Revista Implantnews**, n. 7, p. 56-65, 2010.
- CAO, H.; KUBOYAMA, N. A. Biodegradable porous composite scaffold of PGA/beta-TCP for bone tissue engineering. **Bone**, v. 1, p. 386-95, 2010.
- CASTRO, M. M. et al. Imbalance between matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in hypertensive vascular remodeling. **Matrix Biol.**, v. 29, n. 3, p. 194-201, 2010.
- CHANG, C. C. et al. Monophenotypic profile of myeloid cells in granulocytic sarcoma by immunohistochemistry. Correlation with blast differentiation in bone marrow. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 114, n. 5, p. 807-11, 2000.
- CHOUKROUN, J. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.101, n.3, p.299-303, 2006.
- COSTA, A.M., et al. Na experimental model for the study of craniofacial deformities. **Acta Cir. Bras.**, v. 25, p. 264-268, 2010.
- COELHO, M. J.; PINA, C.; FERRAZ, M. P. **Efeito da doxiciclina e da minociclina em células osteoblásticas humanas: estudos in vitro**. 2006, 111f. Monografia (Faculdade de Ciências da Saúde – UFP, 2006), Alfenas-MG, 2018.
- CHAMBERS, T. J. The birth of the osteoclast. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1192: 19–26, 2010.
- CHOUKROUN, J. et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, v.101, n.3, p.56-60, 2006.
- CLARK, P. et al. The prevalence of radiographic vertebral fractures in Latin American countries: The Latin American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). **Osteoporosis International**, v. 20, n. 2, p. 275–282, February, 2009
- DAHLIN, C.; ALBERIUS, P.; LINDE, A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. **Journal of Neurosurgery**, v. 74, n. 3, p. 487-491, 1991.
- DARNELL, M. C. et al. Performance and biocompatibility of extremely tough alginate/polyacrylamide hydrogels. **Biomaterials**, v.34, n.33, p.8042-8, 2013.
- DELLATORE, S. M.; MILLER, W.M. Mimicking stem cell niches to increase stem cell expansion. **Curr Opin Biotechnol**, v.19, n.5, p.534–540, 2008.
- DISCHER, D. E.; MOONEY, D. J.; ZANDSTRA, P. W. Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. **Science**, v.324, p.1673, 2009.
- DOUGALL, W. C. et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. **Genes & Development**, v. 13, n. 18, p. 2412, 2424, 1999.
- 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, p. 1618-1624, 2003.

DURÃO, S.F. et al. The biomaterial-mediated healing of critical size bone defects in the ovariectomized rat. **Osteoporos Int.**, v. 25, p.1535–1545, 2014.

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

ERGOGAN, O., et al. A review of the association between osteoporosis and alveolar ridge augmentation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** V.104, n.6, p.738, 2007.

ESPOSITO M., et al. Histopathological observations on early oral implant failures. **Int J'Oral!Maxillofac Implants**, v.14, p. 798-810, 1999.

FABRIS, A. L. S. et al. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects. Study on rat calvaria. **J Appl Oral Sci**, v. 26, p. 1-12, 2018.

FEKETE, T. et al. Synthesis and characterization of superabsorbent hydrogels based on hydroxyethylcellulose and acrylic acid. **Carbohydrate Polymers**, v.166, p.300–308, 2017.

FRANCO, G. C. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation in vitro and in vivo. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 10, p. 1454-1464, 2011.

FRIBERG, B.; JEMT, T.; LEKHOLM, U. Early failures in 4,641 consecutively placed Brånemark dental implants: a study from stage 1 surgery to the connection of completed prostheses. **Int J Oral Maxillofac Implants.** V. 6, n.2, p. 142-2, 1991.

FRIBERG, B. et al. Brånemark implants and osteoporosis: a clinical exploratory study. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 3, n.1, p. 50-6, 2001.

GAIKWAD, S. P. et al. Effect of scaling and root planing combined with systemic doxycycline therapy on glycemic control in diabetes mellitus subjects with chronic generalized periodontitis: a clinical study. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v. 43, p. 79-86, 2013.

GAO, Y. et al. IFN-g stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. **J Clin Invest.**, v.117, n.1, p.122-132, 2007.

GHANAATI, S., et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cellbased tissue engineering by means of inflammatory cells. **J Oral Implantol.**, v.40, n.6, p.679-89, 2014.

GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update injury. **International Journal of the Cure of the Injured**, v. 365, p. 520-527, 2005.

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

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

- GOLUB, L. M. et al. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. **Journal of Periodontal Research**, v. 25, n. 6, p. 321-330, 1990.
- GOLUB, L. M. et al. A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-induced periodontitis in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 732, p. 96-111, 1994.
- GOLUB, L. M. et al. Doxycycline effects on serum bone biomarkers in postmenopausal women. **J. Dent. Res.**, v.89, p.644–649, 2010.
- GREENWALD, R. A. et al. In vitro sensitivity of the three mammalian collagenases to tetracycline inhibition: relationship to bone and cartilage degradation. **Bone**, v.22, p.33–38, 1998.
- GRENIER, D. et al. Inhibition of proteolytic, serpinolytic, and progelatinase-b activation activities of periodontopathogens by doxycycline and the non-antimicrobial chemically modified tetracycline derivatives. **J. Periodontol.**, v. 73, p. 79-85, 2002.
- GRIFFIN, M.O.; CEBALLOS, G.; VILARREAL, J.F. Tetracycline compounds with non-antimicrobial organ protective properties: Possible mechanisms of action. **Pharmacological Research.**, v.63, n.2, p. 102-107, 2010.
- GIANNOUDIS, P. V.; DINOPOULOS, H.; TSIRIDIS, E. Bone substitutes: an update injury. **International Journal of the Cure of the Injured**, v. 365, p. 520-527, 2005.
- GUO P; YUAN Y; CHI F. Biomimetic alginate/polyacrylamide porous scaffold supports human mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenesis. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. V.42, p.622-8, 2014.
- HIRAYAMA, F. et al. Yclodextrin conjugate based controlled release system: repeated and prolonged releases of ketoprofen after oral administration in rats. **J. Control Release**, v. 82, p. 407-16, 2002.
- HOLAHAN, C. M. et al. Effect of osteoporotic status on the survival of titanium dental implants. **Int. J. Oral. Maxillofac. Implants**, v.23, p.905–910, 2008.
- HOLLINGER, J.; WONG, M. E. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, v. 82, n. 6, p.594-606, 1996.
- HUBELL, J. Á. Biomaterials in tissue engineering. **Biotechnology (New York)** v.13, n.6, p.565–576, 1995.
- JAFFIN, R. A.; BERMAN, C.L. The excessive loss of Branemark fixtures in type IV bone: a 5-year analysis. **J Periodontol**. v.62, n.1, p.2-4, 1991.
- JEFFCOAT, M. The association between osteoporosis and oral bone loss. **J Periodontol**, 2005.
- JEFFCOAT MK. Safety of Oral Bisphosphonates: Controlled studies on alveolar bone. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v.21, p.349-353, 2006.
- KANIS, A.J. et al. A reference standard for the description of osteoporosis. **Bone**, v 42, n.3, p. 467-475, 2008.
- KATHURIA, N. et al. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. **Acta Biomater**, v.5, n.1, p.406–418, 2009.

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

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

KRETLOW, J. D. KLOUDA, L. MIKOS, A. G. Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. **Adv Drug Deliv Rev**, v.59,n.4–5, p.263–273, 2007.

KUMAR, C. Y. et al. Calcium sulfate as bone graft substitute in the treatment of osseous bone defects, a prospective study. **J. Clin. Diagn. Res.**, v.7, n.12, p. 2926-8, 2013.

LEE, H. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. **J. Periodontol.**, v.75, n. 3, p. 453-63, 2004.

LINDHE J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LOURENÇO, E. J. V. **Avaliação da osteogênese com Proteínas Ósseas Morfogenéticas (BMPs): Análise em defeitos na calvária e ao redor de implantes de titânio de coelhos**. 2002. 191 f. Tese (Doutorado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade Federal de São Paulo, Bauru, 2002.

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

LUTOLF, M. P.; HUBBELL, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. **Nat Biotechnol** v.23, p.47, 2005.

LUVIZUTO, E. et al. The effect of BMP-2 on the osteoconductiveproperties of  $\beta$ -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. **Biomaterials**, v.32, p.3855–3861, 2011.

MARIANO, R. C. 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 RadiolEndod**, n.109, p.72–78, 2010.

MARIANO, R. C.; MELO, W. M.; CARNEIRO-AVELINO, C. Comparative radiographic evaluation of alveolar bone healing associated with autologous platelet-rich plasma after impacted mandibular third molar surgery. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.70, p.19-24, 2012.

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

MESSORA et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **Journal of Periodontology Research**, v. 43, n. 2, p. 217-223, 2007.

- MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. **Journal of Periodontal Research**, v. 43, n. 6, p. 723-729, 2008.
- MISCH, C. E. **Implantes dentais contemporâneos**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- MIZUNO, A. et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 3, p. 610-615, 1998.
- MOIDEEN, S.; KHAN, R. A.; SIDDIQUI, A. A. Efficacy of metronidazole in combination with amoxicillin and doxycycline in adult periodontitis. **Journal of Basic & Applied Sciences**, v. 9, p. 99-104, 2013.
- MUNDY, G. R. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **Journal of Periodontal Research**, v. 26, n. 3 part. 2, p. 213-217, 1991.
- NAGASAWA, T. M.; ARAI, A. TOGARI. Inhibitory effect of minocycline on osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells. **Arch. Oral Biol.** v.56,p. 924–931, 2011.
- NANAMI, R. Experimental PTFE membrane in a surgically periodontal defect in rats. **Journal of Health Sciences Stitute**, v. 29, n. 4, p. 239-242, 2011.
- NELSON, M. L.; LEVY, S. B. The history of the tetracyclines. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1241, p. 17-32, 2011.
- NETTO, C.C., et al. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. **R. Ci. Méd. Biol.**, v. 5, n. 3, p. 231-238, set./dez, 2006.
- NEVILLE, W. B., et al. **Patologia oral & maxilofacial**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- O'BRIEN, C. A. Control of RANKL gene expression. **BONE**, v.46, p. 911-919, 2010.
- OGUNSALU, C. Bone Substitutes and Validation. Implant Dentistry - The Most Promising Discipline of Dentistry, book edited by **IlserTurkyilmaz**, p. 481-8, 2011.
- OKHUBO, H.; FUJIMOTO, Y.; OKAMOTO, Y. Fundamental and clinical studies on doxycycline. **CHEMOTHERAPY**. v.17, p. 216-19, 1969.
- OLIVEIRA, M. R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 5, p. 649 - 655, 2015.
- ONG, S. M. Doxycycline inhibits bone resorption by human interface membrane cells from aseptically loose hip replacements. **The journal of bone and joint surgery**, 2002.
- PAPPALARDO, S. et al. Local delivery of antimicrobial drugs in the treatment of chronic adult periodontitis. **MINERVA STOMATOL.**, v. 55, n.11-12, p. 655, 2006.
- PARFITT, A. M. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. **J Cell Biochem**, v. 3, p. 273- 286, 1994.

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

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, p.121-129, 2011.

PETERSON, L. J. et al. **Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PRESHAW, P. M. Antibiotics in the treatment of periodontitis. **Dent. Update**, v. 31, n. 8, p. 448-456, oct. 2004.

PRESHAW, P. M.; HEFTI, A. F.; BRADSHAW, M. H. Adjunctive subantimicrobial dose doxycycline in smokers and non-smokers with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 32, p. 610-616, 2005.

PRIPATNANONT, P. et al. Osteoconductive effects of 3 heat-treated hydroxyapatites in rabbit calvarial defects. **J Oral Maxillofac Surg.**, v.65, p. 2818-2424, 2007.

QUIRYNEN, M. Periodontal aspects of osseointegrated fixtures supporting an overdenture. A 4-year retrospective study. **J Clin Periodontol.**, v.18 n.10, p.719-28, 1991.

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

RESTOY-LOZANO A., et al. Reconstruction of mandibular vertical defects for dental implants with autogenous bone block grafts using a tunnel approach: Clinical study of 50 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v.44, p.1416–1422, 2015.

RIFKIN, B. R. A. et al. Modulation of bone resorption by tetracyclines. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.732, p. 165–180, 1994.

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

RUSSO, L. A. T. Osteoporose Pós-Menopausa: Opções Terapêuticas. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.45, n.4, p.401-406, 2001.

SALMINEN, A. et al. Subantimicrobial-dose doxycycline treatment increases serum cholesterol efflux capacity from macrophages. **Inflammation Research**, v. 62, p. 711–720, 2013.

SARTORI S., et al. Ten-years follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clin Oral Implants Res.**, v. 14, p. 369-372, 2003.

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

SATO, M. et al. Bone fractures and feeling at risk for osteoporosis among women in Japan: patient characteristics and outcomes in the National Health and Wellnes Survey. **Archives of osteoporosis**, v.9, p.199, dec. 2014.

SCHACH VON WHITTENAU, M. et al. CR-6 deoxytetracycline. III Stereochemistry at C6. **J. Ame. Chemm. Soc.**, v.84, p.2645-47, 1962.

SCHACH VON WHITTENAU, M.; DELAHUNT, C.S. Distribution of tetracyclines in tissues of dogs after repeated oral administration. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.152, p.194-197, 1966.

SHIBLI, J. A. et al. Influence of implant surface topography on early osseointegration: A histological study in human jaws. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater.**, v. 80, n.2, p. 377-385, 2007.

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

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

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

SCHMITT, C. M. et al. Anorganic bovine bone (ABB) vs. autologous bone (AB) plus ABB in maxillary sinus grafting. **Clinical Oral Implants Research**, p. 1-8, 2014.

SOHN, J. Y. et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. **J. Periodontal Implant. Sci.**, v. 40, n. 4, p. 180-187, 2010.

TATULLO, M., et al. Platelet rich Fibrin (P.R.F.) in reconstructive surgery of atrophied maxillary bones: Clinical and histological evaluations. **Int J Med Sci.**, v.9, n.872–880, 2012.

TEITELBAUM, S. L.; ROSS, F. P. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, p. 638–649, 2003.

THEILL, L.E., BOYLE, W.J., PENNINGER, J.M. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. **Annu Rev Immunol.** v. 20, p. 795-823, Oct, 2002.

TRAJANO V. C. C. Osteogenic activity of cyclodextrin-encapsulated doxycycline in a calcium phosphate PCL and PLGA composite. **Materials Science and Engineering**, v.64, n. 1, p. 370-375, 2016.

TRAJANO, V. C. C. **Avaliação da atividade osteogênica da doxiciclina em uma matriz de compósito biodegradável de poli (ε-caprolactona), poli (ácido láctico-co-glicólico) e biocerâmica in vitro.** 2012. 155f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. Alfenas-MG, 2018.

TRACHTMAN, H., et al. Chemically modified tetracyclines inhibit inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in cultured rat mesangial cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 229, p.243–248, 1996.

UDAGAWA, N. et al. Minocycline to be used a potential anti bone resorption agent due to the suppression of osteoclastic bone resorption. **Journal of Oral Biosciences**, v. 55, p. 16-22, 2013.

- VAN STEENBERGHE, D. et al. Impact of systemic diseases and medication on osseointegration. **Periodontol**, **2000**, v.33, p.163-171, 2003.
- VAN HOUTDT, 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 - Part B Appl Biomater.**, v.106, n.1, p.131-142, 2018.
- WADA, T. et al. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 1, p. 17-25, 2006.
- WALKER, C. B. et al. The effects of sustained release doxycycline on the anaerobic flora and antibiotic-resistant patterns in subgingival plaque and saliva. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 5, p. 768-774, May 2000.
- YAGAN, A.; KESIM, S.; LIMAN, N. Effect of low-dose doxycycline on serum oxidative status, gingival antioxidant levels, and alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 85, n. 3, p. 478-489, 2014.
- YANG, Y. et al. Morphological behavior of osteoblast-like cells on surface-modified titanium in vitro. **Biomaterials**, v. 23, p. 1383-1389, 2002.

## APÊNDICE I

Dados referentes aos parâmetros microtomográficos que foram obtidos da análise do software R ®.

Análise de **BV** (Volume Ósseo):

Tabela 9: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	344.05	114.683	8.0321	0.00070
<b>SEMANA</b>	2	0.96	0.482	0.0338	0.96685
<b>GRU./SEM.</b>	6	17.22	2.869	0.2010	0.97320
<b>Resíduo</b>	24	342.67	14.278		
<b>Total</b>	35	704.90			

**CV = 44.15%**

Fonte: do autor.

Análise de **BV/TV** (Porcentagem de Volume Ósseo):

Tabela 10: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	695.44	231.813	13.7808	0.00002
<b>SEMANA</b>	2	9.21	4.603	0.2737	0.76293
<b>GRU./SEM.</b>	6	45.37	7.562	0.4496	0.83808
<b>Resíduo</b>	24	403.71	16.821		
<b>Total</b>	35	1153.73			

**CV = 35.54 %**

Fonte: do autor.

Análise de **BS** (Superfície Óssea):

Tabela 11: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	47188	15729.5	8.0792	0.00068
<b>SEMANA</b>	2	4388	2193.9	1.1269	0.34059
<b>GRU./SEM.</b>	6	6900	1150.0	0.5907	0.73451
<b>Resíduo</b>	24	46726	1946.9		
<b>Total</b>	35	105203			

**CV = 37.71 %**

Fonte: do autor.

Análise de **Tb.Th** (Espessura Trabecular):

Tabela 12: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	0.026944	0.0089814	3.8983	0.02115
<b>SEMANA</b>	2	0.035311	0.0176555	7.6633	0.00267
<b>GRU./SEM.</b>	6	0.006443	0.0010739	0.4661	0.82642
<b>Resíduo</b>	24	0.055294	0.0023039		
<b>Total</b>	35	0.123992			

**CV = 17.96 %**

Fonte: do autor.

Análise de **Tb.N** (Número de Trabéculas):

Tabela 13: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	0.85789	0.285963	9.8004	0.00021
<b>SEMANA</b>	2	0.02890	0.014449	0.4952	0.61554
<b>GRU./SEM.</b>	6	0.12441	0.20735	0.7106	0.64440
<b>Resíduo</b>	24	0.70029	0.029179		
<b>Total</b>	35	1.71148			

**CV = 38.46 %**

Fonte: do autor.

### Análise de **Tp.Sp** (Separação Trabecular):

Tabela 14: Quadro de análise variância.

	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>Fc</b>	<b>Fr/Fc</b>
<b>GRUPO</b>	3	7.9933	0.66442	14.7531	0.00001
<b>SEMANA</b>	2	0.0035	0.00175	0.0389	0.96191
<b>GRU./SEM.</b>	6	0.1729	0.02881	0.6397	0.69750
<b>Resíduo</b>	24	1.0809	0.04504		
<b>Total</b>	35	3.2505			

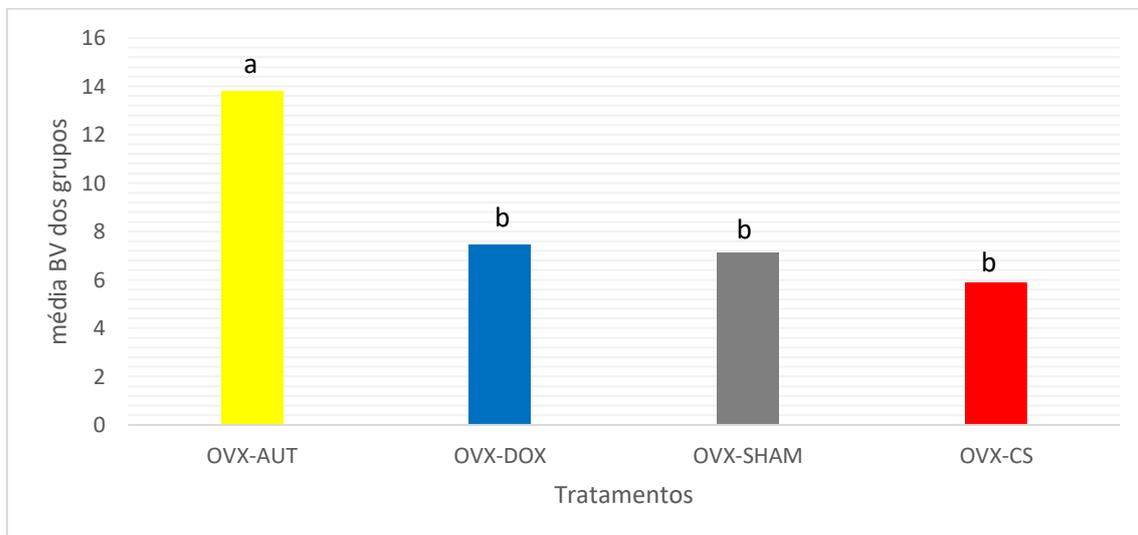
**CV = 16.25 %**

Fonte: do autor.

## APÊNDICE II

Abaixo consta os gráficos das médias de cada parâmetro microtomográfico avaliado apresentados na seção 'Resultados'.

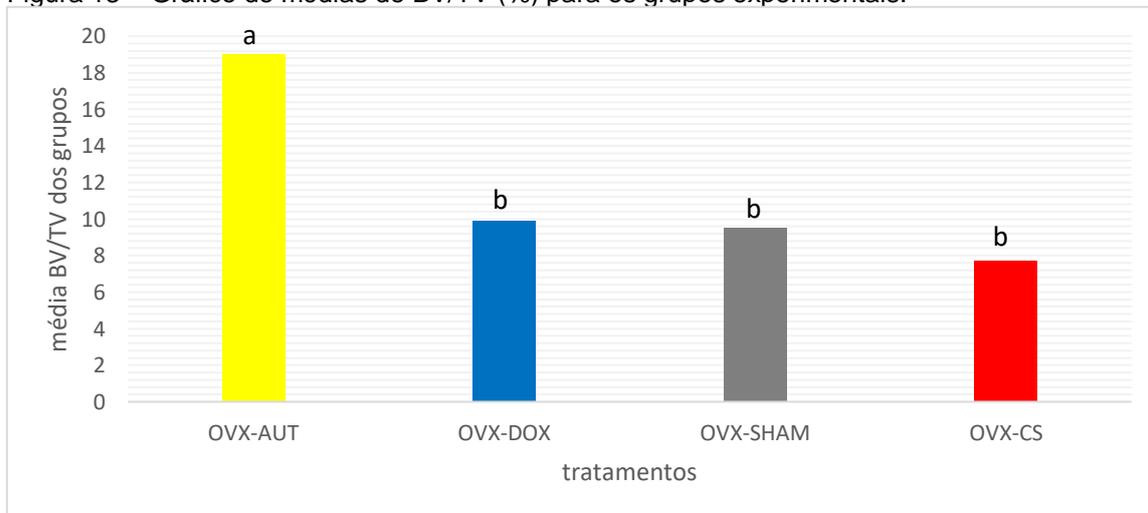
Figura 12 – Gráfico de médias de volume ósseo (BV) em mm<sup>3</sup> para os grupos



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos experimentais estão dispostos de acordo com o resultado. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si. Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p > 0,05$ ). O efeito período não teve diferença estatística significante no teste de Tukey.

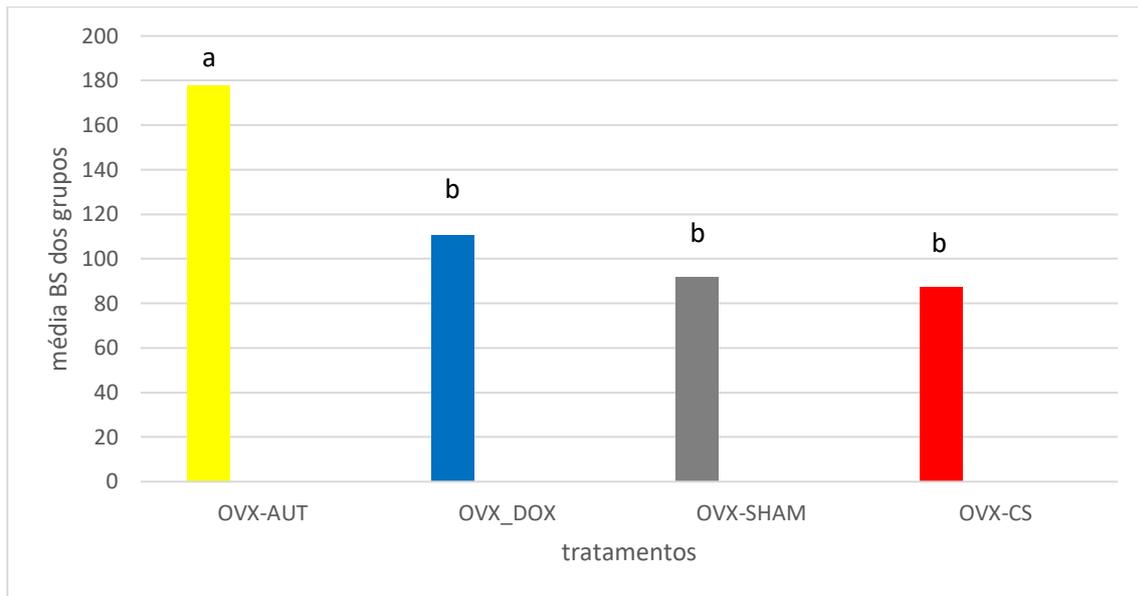
Figura 13 – Gráfico de médias do BV/TV (%) para os grupos experimentais.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos experimentais estão dispostos de acordo com o resultado. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si. Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p > 0,05$ ). O efeito período não teve diferença estatística significante no teste de Tukey.

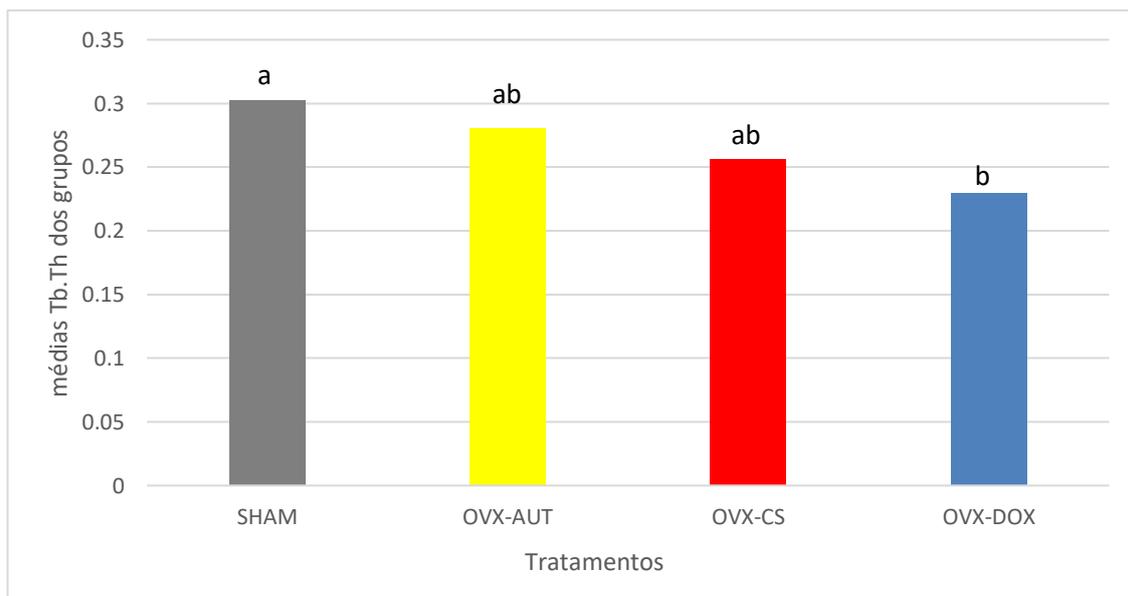
Figura 14 – Gráfico de médias de BS para os grupos experimentais



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos experimentais estão dispostos de acordo com o resultado. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si. Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p < 0,05$ ). O efeito período não teve diferença estatística significante no teste de Tukey.

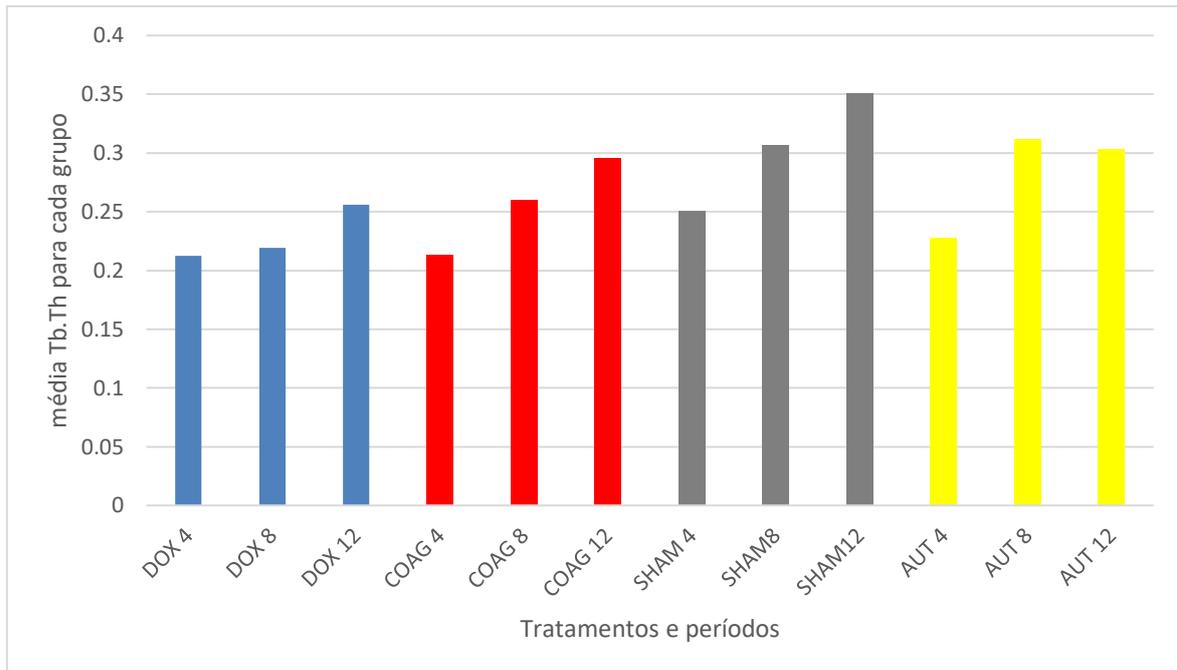
Figura 15– Gráfico da média dos grupos do parâmetro Tb.Th, expresso em mm, para os grupos experimentais.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos experimentais estão dispostos de acordo com o resultado. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si. Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p < 0,05$ ). O efeito de grupo e o efeito de período tiveram diferença estatística significante no teste de Tukey.

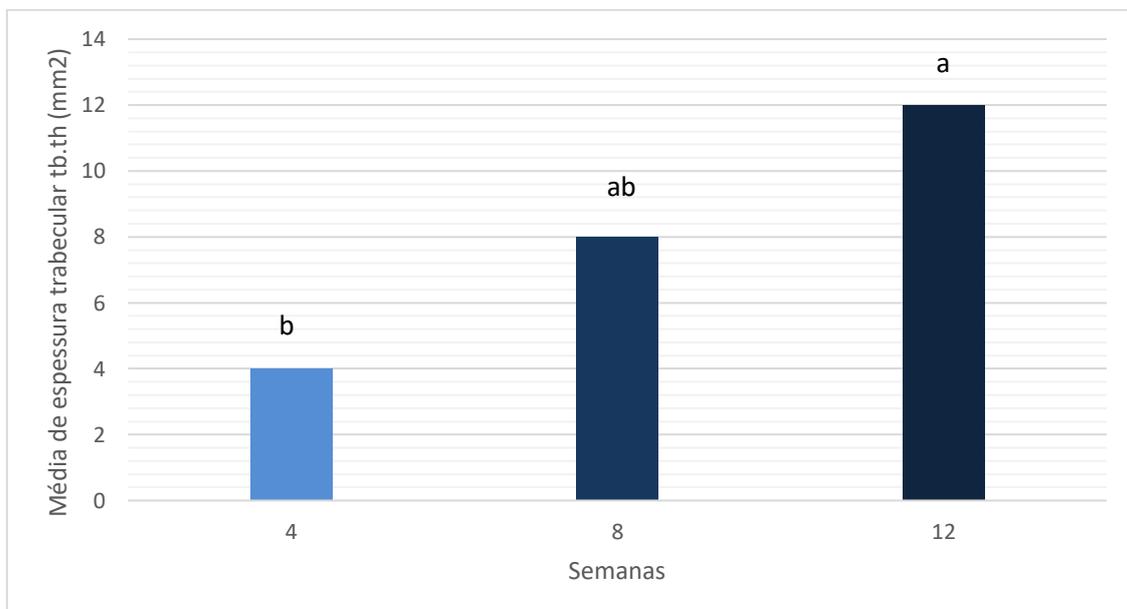
Figura 16 – Gráfico do parâmetro Tb.Th distribuído a média de cada grupo por período experimental.



Fonte: Do autor.

Nota: Este é o gráfico de comportamento de cada grupo em cada um dos períodos experimentais. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si.

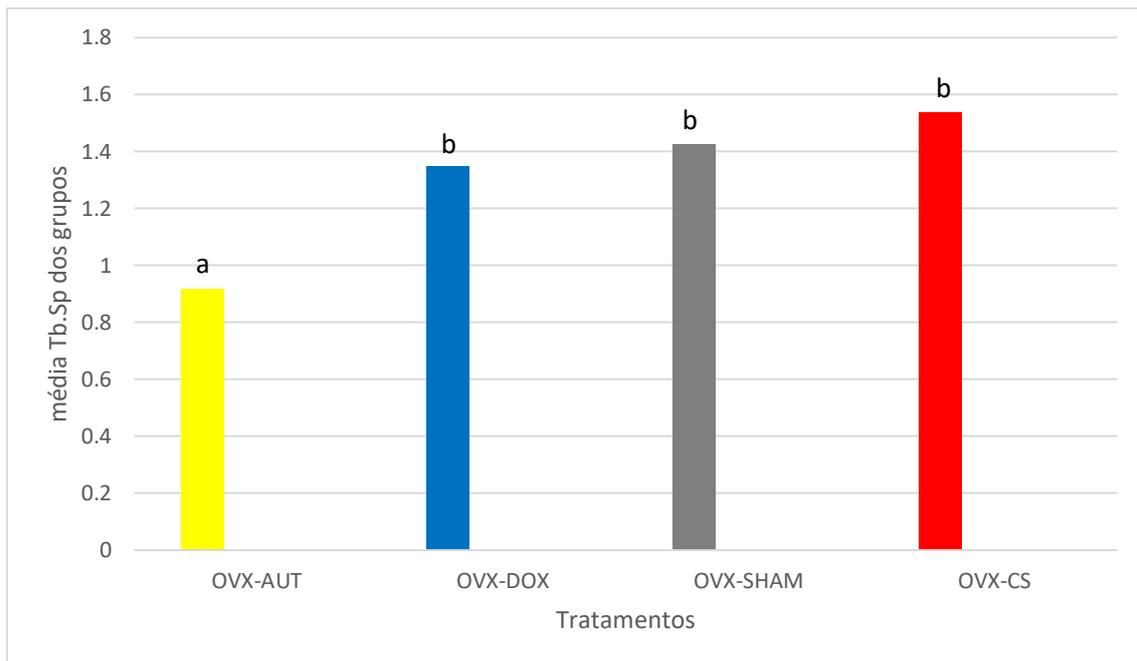
Figura 17 – Gráfico do parâmetro Tb.Th para as médias dos períodos experimentais.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Houve diferença estatística para período. Este é o gráfico das médias do efeito de período de todos os grupos em cada uma das semanas ( $p < 0,05$ ), onde foi constatado diferença estatística significativa no teste de Tukey.

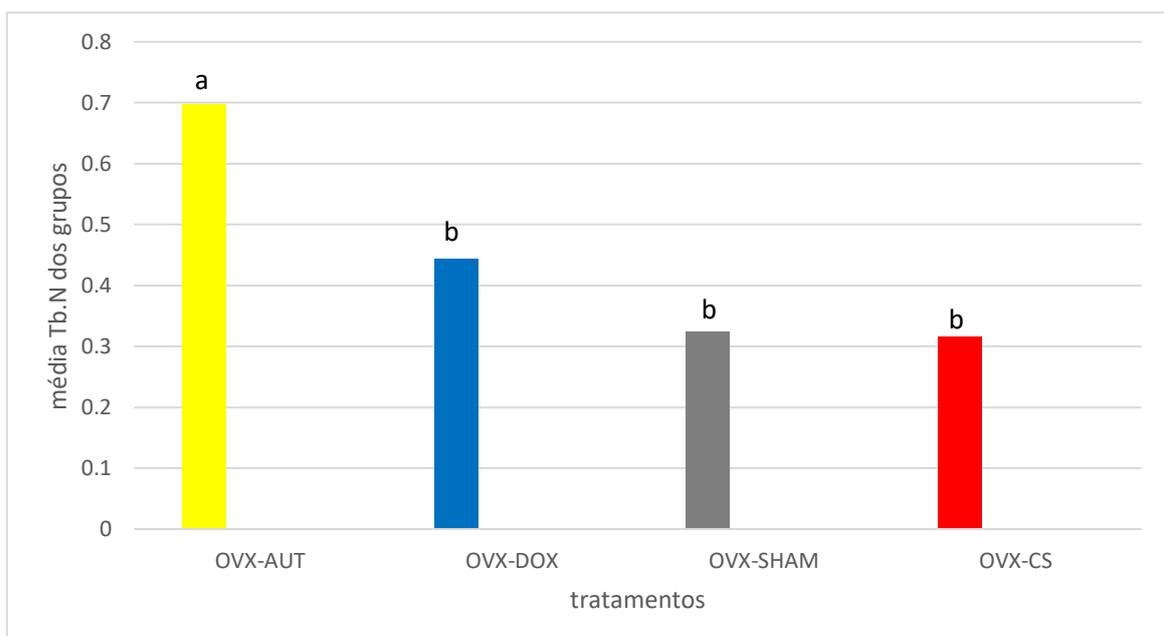
Figura 18 – Gráfico de médias da distância entre as trabéculas (Tb.Sp), expressa em mm, para os grupos.



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Os grupos experimentais estão dispostos de acordo com o resultado. Como não houve diferença estatística para interação grupo/período, as variáveis independem entre si. Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p < 0,05$ ). O efeito período não teve diferença estatística significativa no teste de Tukey.

Figura 19 – Gráfico das médias do número de trabéculas (Tb.N) por unidade de comprimento, expresso em 1/mm, para os grupos experimentais



Fonte: Do autor.

Nota: Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ). Este é o gráfico das médias do efeito de grupo ( $p < 0,05$ ). O efeito período não teve diferença estatística significativa no teste de Tukey.

## ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG - CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3269-1000 Fax: (35) 3269-1053



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Efeito da doxiciclina 10% na regeneração de calvárias de ratas osteoporóticas: estudo histométrico, imunoistoquímico e microtomográfico", registrada com o nº 45/2017, 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 24/08/2017 a 15/07/2019	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	68	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 24 de Agosto de 2017.

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



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

## CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled “Effect of doxycycline 10% in the regeneration of calvaries of osteoporotic rats: histometric, immunohistochemistry and microtomographic study”, registration number 45/2017, under the responsibility of Ronaldo Célio Mariano, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8<sup>th</sup>, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15<sup>th</sup>, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: ( ) Teaching	( X ) Scientific research
Expiration date	07/15/2019
Species/strain/breed	Wistar rat / Outbred
Number of animals	68
Sex	Female
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, August 24, 2017.

Leonardo Augusto de Almeida PhD  
 CEUA/UNIFAL Coordinator