

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS / UNIFAL-MG

AMANDA DE CARVALHO SILVA

**GEL DE DOXICICLINA A 10% COMO INIBIDOR DA OSTEOCLASTOGÊNESE NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA, ASSOCIADO OU NÃO AO BIO-OSS - ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E TOMOGRÁFICO EM RATOS**

Alfenas/MG

2015

AMANDA DE CARVALHO SILVA

**GEL DE DOXICICLINA A 10% COMO INIBIDOR DA OSTEOCLASTOGÊNESE NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA, ASSOCIADO OU NÃO AO BIO-OSS - ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E TOMOGRÁFICO EM RATOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Odontologia.
Orientador: Profº. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Alfenas/MG

2015

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

Silva, Amanda de Carvalho

Gel de doxiciclina a 10 % como inibidor da osteoclastogênese na regeneração óssea, associado ou não ao Bio-Oss – Estudo tomográfico e histomorfométrico em ratos. / Amanda de Carvalho Silva. -- Alfenas/MG, 2015.

96 f.

Orientador: Ronaldo Célio Mariano.

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

Bibliografia.

1. Doxiciclina. 2. Regeneração Óssea. 3. Materiais Biocompatíveis.
I. Mariano, Ronaldo Célio. II. Título.

CDD-617.605

AMANDA DE CARVALHO SILVA

**GEL DE DOXICICLINA A 10% COMO INIBIDOR DA OSTEOCLASTOGÊNESE NA
REGENERAÇÃO ÓSSEA, ASSOCIADO OU NÃO AO BIO-OSS - ESTUDO
HISTOMORFOMÉTRICO E TOMOGRÁFICO EM RATOS.**

A Banca Examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 26/06/15

Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Marcela Filié Haddad

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: Marcela Filié Haddad

Prof. Dr. Leonardo Perez Faverani

Instituição: Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho" - UNESP

Assinatura: 

A **Deus**, meu Senhor fiel e verdadeiro amigo, dedico primeiramente este trabalho, que por seu amor e cuidado para comigo, me concedeu forças e oportunidade para a sua realização. À minha **família** amada, em especial, aos meus pais, que estiveram sempre presentes, me apoiando, incentivando aos meus objetivos e muito trabalharam para que eu pudesse alcançá-los. Ao meu **esposo**, Everton, por toda a sua paciência, amor e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Deus,

Agradeço-te por estar no meu caminho e conduzi-lo, pois sem ti nada seria possível.

“Lâmpada para os meus pés é tua palavra, e luz para o meu caminho.”

(Salmos, cap. 119, v. 105)

Família

Em especial aos meus pais, **Moisés e Betânia,**

Papai e mamãe, obrigada por todo apoio e amor incondicionais. Obrigada por me ampararem em todos os momentos da minha vida, por me ensinarem a cultivar a paciência, o bem, a honestidade; por se esforçarem exaustivamente para eu ser e ter o melhor em tudo!

Aos meus irmãos **Moisés Júnior, Márcio e Osmanda** e aos meus sobrinhos **Isabelle e Nicolas,**

Sem vocês, com certeza, grande parte dos meus momentos de alegria não estaria presente.

Ao meu sogro **Jesiel** e à minha sogra **Esdra,**

A vocês todo meu amor e gratidão. Não tenho palavras para agradecer o quanto vocês fizeram e fazem por mim. Obrigada por me receberem como uma filha.

Amor de família é a coisa mais inexplicável do mundo, nem um pai consegue dizer para um filho o quanto o ama, nem o filho sabe dizer ao pai, então simplesmente demonstram.

Esposo

Ao **Everton,**

Amor, obrigada por estar sempre ao meu lado, me incentivando a buscar meus sonhos e por compreender minha ausência.

A frase mais sincera que existe, aquela que faz a diferença todos os dias, não importa a hora em que seja dita, não importa o tempo que resta, as dificuldades que venha, ela sempre vencerá obstáculos: Eu Te Amo!

Amigos

Marina,

Com certeza o seu incentivo para que eu fizesse o mestrado foi essencial para eu chegar onde estou. Muito obrigada pelas conversas, conselhos e muito mais pela sua pura e sincera amizade. E também pela sua participação efetiva na realização deste trabalho.

Lysandro,

Nossa convivência no mestrado, apesar de por pouco tempo, já o tornou meu amigo. Obrigada pela paciência, momentos de tantas risadas e por toda experiência a mim transmitida. Sua ajuda foi essencial na realização deste trabalho.

Talvez eu não tenha tantos amigos. Mas os que eu tenho são os melhores que alguém poderia ter...

Agradecimentos Especiais

Ao meu amigo e orientador Prof^o. Dr. Ronaldo Célio Mariano:

Professor, obrigada pelo privilégio de ser sua orientada e por todas as oportunidades a mim concedidas. Saiba que os seus ensinamentos foram muito além dos conteúdos da ementa curricular. Tive aprendizados importantes para a vida. A sua missão vai muito além da missão de um professor, você é um verdadeiro mestre. Você soube despertar a minha admiração de um modo único, e se tornou uma inspiração para mim.

Aos professores Roberto Lourenço e Victor Humberto Orbegoso Flores

”Ensinar não é transferir conhecimentos, mas criar as possibilidades para a sua produção ou a sua construção. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender.”

Paulo Freire

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas, sob coordenação dos professores **Vivien Sakai** e **João Adolfo Costa Hanemann** e todo o corpo docente.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas, sob direção do professor **Mânio de Carvalho Tibúrcio**

À **Sabrina Ferreira**, doutoranda em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Faculdade de Odontologia da UNESP (Araçatuba) e ao seu orientador **Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Júnior** pela disponibilidade em realizar o processamento histológico das peças desta pesquisa.

Às amigas e funcionárias da Clínica de Cirurgia, **Nilcelene, Valdilene e Daiana**, pela companhia e disponibilidade em me ajudar.

Aos **funcionários do Biotério Central da Unifal-MG**.

Aos **alunos de graduação**, pela paciência e oportunidade de atuar com vocês, mais aprendendo do que ensinando.

A **CAPES**, pela concessão da bolsa que muito me auxiliou.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.”

(ISAAC NEWTON, 1727)

RESUMO

O grande número de cirurgias ósseas reconstitutivas impulsiona o desenvolvimento de novos biomateriais. Neste contexto, a doxiciclina, um isômero estrutural da tetraciclina, já tem sido pesquisada há várias décadas, sendo sua aplicabilidade local, na Odontologia, direcionada ao tratamento de periodontites e peri-implantites. No entanto, estudos recentes, mostraram que a mesma possui a propriedade de inibir a osteoclastogênese, além das demais já conhecidas, como antibacteriana, imunossupressora e anti-inflamatória. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi avaliar a aplicação local da doxiciclina, na forma de gel tendo como base o natrosol, na regeneração óssea, associada ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss), através de um estudo quantitativo e qualitativo em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Para isso foi utilizado um total de 40 ratos, os quais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 8 animais cada, de acordo com o tratamento recebido: CS (coágulo sanguíneo); NAT (natrosol); DOX (gel de doxiciclina a 10 %); BO (Bio-Oss); BODOX (Bio-Oss associado à doxiciclina). 4 animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia às 4 e 8 semanas de pós-operatório. Na análise tomográfica (TCCB), a média da densidade na região do defeito foi calculada como uma porcentagem em relação à densidade do osso nativo. Enquanto na análise histomorfométrica, a área de osso neoformado (AON) foi calculada como uma porcentagem da área total (AT). Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados mostraram que a média percentual da densidade tomográfica na região do defeito, ao final das 8 semanas, foi estatisticamente maior no grupo BO (47,8183%) quando comparada ao DOX (41,3580%), NAT (31,3870%) e CS (31,0045%) e semelhante ao BODOX (46,5909%). E quanto à neoformação óssea, o grupo DOX (38,7875%) apresentou a maior média de formação óssea, apesar de estatisticamente semelhante aos grupos BODOX (33,1345%), BO (23,8915%) e NAT (22,5271%), e estatisticamente maior que CS (14,1250%). Dentro dos limites deste estudo, observa-se que o gel de doxiciclina a 10% teve um bom efeito no preenchimento de defeitos ósseos em calvária de ratos, e sua associação com partículas de osso bovino (Bio-Oss) mostrou melhor comportamento como arcabouço para a regeneração óssea.

Palavras-chave: Doxiciclina. Regeneração Óssea. Enxerto ósseo. Materiais biocompatíveis. Tomografia Computadorizada.

ABSTRACT

The large number of reconstructive bone surgeries drives the development of new biomaterials. In this context, doxycycline, a structural isomer of tetracycline, has been researched for several decades, and its local application in dentistry is directed to the treatment of periodontitis and peri-implantitis. However, recent studies have shown that it has the feature of inhibiting osteoclastogenesis, in addition to those well-known features such as antibacterial, anti-inflammatory, anti-collagenase and immunosuppressive. Therefore, the aim of this study was to evaluate the local application of doxycycline in the form of gel based on the natrosol, in bone regeneration, with or without the particulate bovine bone (Bio-Oss), through a quantitative and qualitative study critical defects in rat calvaria. Therefore, 40 rats were randomly divided into 5 groups with 8 animals each, according to the treatment received: CS (blood clot); NAT (natrosol); DOX (10% doxycycline gel); BO (Bio-Oss); BODOX (Bio-Oss associated with doxycycline). Four animals from each group were euthanized at 4 and 8 weeks postoperatively. In tomographic analysis (CBCT), mean density in the region of the defect was calculated as a percentage relative to the native bone density. While in histomorphometric analysis, the newly formed bone area (NFBA) was calculated as a percentage of the total area (TA). The values obtained underwent analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test ($p < 0.05$) when ANOVA suggested statistical difference. The results showed the mean percentage of tomographic density in the region of the defect at the end of 8 weeks was higher for BO (47.8183%) when compared to DOX (41.3580%), NAT (31.3870%) and CS (31.0045%) and similar to BODOX (46.5909%). Regarding new bone formation, the DOX group (38.7875%) had the highest mean bone formation, although statistically similar to BODOX groups (33.1345%), BO (23.8915%) and NAT (22.5271%) and statistically higher than CS (14.1250%). Within the limits of this study, it is observed that the gel doxycycline 10% had a good effect in filling bone defects in rat calvaria, and its association with particles of bovine bone (Bio-Oss) showed better behavior as a framework for bone regeneration.

Keywords: Doxycycline. Bone regeneration. Bone graft. Biocompatible materials.

Computed

Tomography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da doxiciclina comparada à tetraciclina.....	20
Figura 2 -	Ação das tetraciclinas em progenitores comuns de osteoclastos e CDs.....	22
Figura 3 -	Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.....	35
Figura 4 -	Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.....	36
Figura 5 -	Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.....	37
Figura 6 -	Imagem tomográfica da calvária do animal: corte axial e áreas de análise delimitada.....	39
Figura 7 -	Imagem tomográfica da calvária do animal: corte sagital e áreas de análise delimitadas.....	40
Figura 8 -	Imagem tomográfica da calvária do animal: corte coronal e áreas de análise delimitadas.....	40
Figura 9 -	Processamento laboratorial padronizado de redução das peças....	42
Figura 10 -	Área de neoformação óssea (AON) delimitada em azul dentro dos limites da área total (AT).....	43
Figura 11 -	Imagem tomográfica do defeito ósseo: Corte axial de 2mm de espessura.....	47
Figura 12 -	Imagem tomográfica do defeito ósseo: Corte axial de 15mm de espessura.....	48
Figura 13 -	Gráfico de colunas das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais..	54
Figura 14 -	Gráfico de colunas das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.....	54
Figura 15 -	Gráfico de colunas das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.....	55
Figura 16 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CS no período experimental de 4 semanas.....	61
Figura 17 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CS no período	

	experimental de 8 semanas.....	62
Figura 18 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo NAT no período experimental de 4 semanas.....	63
Figura 19 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo NAT no período experimental de 8 semanas.....	64
Figura 20 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo DOX no período experimental de 4 semanas.....	65
Figura 21 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo DOX no período experimental de 8 semanas.....	66
Figura 22 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO no período experimental de 4 semanas.....	67
Figura 23 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO no período experimental de 8 semanas.....	68
Figura 24 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO DOX no período experimental de 4 semanas.....	69
Figura 25 -	Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO DOX no período experimental de 8 semanas.....	70
Figura 26 -	Visão panorâmica do defeito ósseo dos grupos CS, NAT, DOX, BO e BODOX no período experimental de 4 semanas.....	71
Figura 27 -	Visão panorâmica do defeito ósseo dos grupos CS, NAT, DOX, BO e BODOX no período experimental de 8 semanas.....	72
Figura 28 -	Gráfico de colunas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.....	77
Figura 29 -	Gráfico de colunas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.....	49
Tabela 2 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.....	49
Tabela 3 - Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.....	49
Tabela 4 - Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.....	50
Tabela 5 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.....	50
Tabela 6 - Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.....	51
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.....	51
Tabela 8 - Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.....	52
Tabela 9 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.....	53
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.....	74
Tabela 11 - Teste Tukey a 5% de significância para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.....	75
Tabela 12 - Médias percentuais e erro padrão dos dados da histometria de AON segundo os grupos experimentais.....	75
Tabela 13 - Análise de variância (ANOVA) para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais...	75
Tabela 14 - Teste Tukey a 5% de significância para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais...	76
Tabela 15 - Médias percentuais e erro padrão dos dados da histometria da AON segundo os períodos experimentais.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

αTNF	– Fator de necrose tumoral α
ANOVA	– Análise de variância
AON	– Área de osso neoformado
APCs	– Células Apresentadoras de Antígenos
AT	– Área total
BMMs	– Macrófagos derivados da medula óssea
BO	– Bio-Oss
BODOX	– Bio-Oss associado à DOX
C+	– Controle positivo
C-	– Controle negativo
CAx	– Corte axial
CCo	– Corte coronal
CDs	– Células Dendríticas
CEUA	– Comitê de Ética na Utilização de Animais
CS	– Coágulo sanguíneo
CSa	– Corte sagital
DOX	– Doxíciclina
FDA	– Food and Drug Administration
FGF	– Fator de crescimento de fibroblastos
HU	– Hounsfield
NAT	– Natrosol
OPG	– Osteoprotegerina
PDGF	– Fator de crescimento derivado de plaquetas
RANK	– Receptor do RANKL
RANKL	– Ativador do fator nuclear Kappa-B
TCCB	– Tomografia Computadorizada Volumétrica - 3D Cone Beam
TCH	– Cloridrato de tetraciclina
TGF	– Estimuladores de diferenciação
VEGF	– Fator de crescimento endotelial vascular
\bar{x}DDC	– Média da densidade tomográfica na região do defeito cirúrgico
\bar{x}DON	– Média da densidade óssea na região de osso nativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	TETRACICLINAS E SEUS DERIVADOS	18
2.1.1	Doxiciclina: Isômero estrutural da tetraciclina.....	19
2.1.2	Tetraciclina e inibição da osteoclastogênese.....	20
2.2	BUSCA CONSTANTE POR NOVOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS.....	22
3	OBJETIVOS.....	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	MODELO EXPERIMENTAL.....	32
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.2.1	Grupo Controle.....	32
4.2.2	Grupos Experimentais	32
4.3	PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	33
4.4	EUTANÁSIA.....	38
4.5	ANÁLISE TOMOGRÁFICA E ESTATÍSTICA.....	38
4.6	PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS.....	41
4.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	44
5.1	ANÁLISE TOMOGRÁFICA E ESTATÍSTICA.....	44
5.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS.....	56
5.2.1	Grupo CS.....	56
5.2.2	Grupo NAT.....	56
5.2.3	Grupo DOX.....	56
5.2.4	Grupo BO.....	57
5.2.5	Grupo BODOX	57
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS.....	58
5.3.1	Grupo CS.....	58
5.3.2	Grupo NAT.....	58
5.3.3	Grupo DOX.....	58
5.3.4	Grupo BO.....	59
5.3.5	Grupo BODOX.....	59

5.4	ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA.....	73
6	DISCUSSÃO.....	78
7	CONCLUSÕES.....	84
	REFERÊNCIAS.....	85
	ANEXO.....	94
	APÊNDICES.....	95

1 INTRODUÇÃO

Um dos mecanismos mais fascinantes no organismo é a alta capacidade do tecido ósseo se regenerar. No entanto, a doença periodontal, tumores, traumas, exodontias, anomalias de desenvolvimento, patologias, ressecções oncológicas e perda fisiológica de massa óssea, podem levar a defeitos ósseos perenes, os quais não possuem a capacidade de se regenerar espontaneamente. Especialmente na região bucomaxilofacial, a reabsorção severa de mandíbula e maxila, associada à perda dos dentes, pode levar a defeitos anatômicos significativos comprometendo a função e a estética e, em muitos casos, inviabilizando a reabilitação oral (LINDHE; KARRING; LANG, 2010).

Além disso, as reabilitações orais tradicionais, com próteses fixas ou removíveis, apoiadas sobre dentes e/ou mucosa, deixaram de ser o tratamento de escolha dos pacientes totais ou parcialmente edêntulos. Hoje, a Odontologia, na era da Implantodontia, despertou nesses pacientes a possibilidade de reabilitação do sistema estomatognático com próteses implanto-suportadas, as quais representam o tratamento que mais se aproxima da dentição natural (NARAIN; GARG; NARAIN, 2010).

Uma vez que as cirurgias ósseas reconstrutivas, antes da reabilitação oral com próteses implantossuportadas, são muitas vezes necessárias para evitar ou até mesmo recuperar a perda óssea vertical e horizontal e, principalmente, obter uma quantidade e qualidade ósseas adequadas, garantindo a estabilidade primária de inserção do implante, tornou-se constante a busca por novos biomateriais que possam modular, alterar ou estimular a atividade osteogênica nos defeitos teciduais e/ou inibir a osteoclastogênese (KIM et al., 2013; TETÈ et al., 2013).

Atualmente, como possíveis soluções utilizam-se enxertos autógenos, alógenos, aloplásticos, xenogênicos e fatores de crescimento. (SCHMITT et al. 2013). Mas, como o recrutamento de células, a modulação do processo inflamatório e a promoção do reparo, por cicatrização ou regeneração, são influenciados pelas suas características físicas, químicas e biológicas (KOLK et al., 2012), cada material apresenta vantagens e limitações, justificando o grande número de estudos

realizados para verificar o efeito de novos biomateriais, associados ou não, à outros biomateriais utilizados rotineiramente.

Considerando assim, o desenvolvimento e aprimoramento de diferentes biomateriais, pesquisas recentes têm mostrado que a doxiciclina, um isômero estrutural da tetraciclina, atua inibindo a osteoclastogênese, característica esta que a torna favorável na regeneração óssea. A doxiciclina tem sido continuamente estudada, principalmente em decorrência das suas características já bem conhecidas, como antibacteriana, anti-inflamatória, anti-colagenase e imunossupressora, com comprovado efeito na Odontologia, principalmente no tratamento de periodontites e periimplantites (Al-ALI; BISSADA; GREENWELL, 1989; KINUGAWA et al., 2012; GAIKWAD et al., 2013; MOIDEEN; KHAN; SIDDIQUI, 2013; SALMINEN et al., 2013; UDAGAWA et al., 2013; YAGAN; KESIM; LIMAN, 2013).

No entanto, até o momento, nenhum estudo tem sido relatado na literatura utilizando a doxiciclina na forma de gel a 10 %, como um biomaterial que favoreça a regeneração óssea, e não associado ao tratamento da doença periodontal ou periimplantar. Assim, acredita-se que a utilização deste gel, com todas as características já descritas, por si só, possa melhorar a regeneração óssea prevenindo a instalação de defeitos ósseos ou restaurando-os. Do mesmo modo, um enxerto ósseo bovino particulado (Bio-Oss), que é essencialmente osteocondutor, altamente poroso, que permite o crescimento vascular e celular em seu interior e que as trabéculas fornecem arcabouço para a condução e manutenção do espaço para o crescimento ósseo, quando associado a este material possa ter resultados ainda mais promissores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TETRACICLINAS E SEUS DERIVADOS

A história das tetraciclina envolve a contribuição coletiva de milhares de pesquisadores dedicados ao longo de mais de 60 anos. Descoberta como produto natural de actinomicetos, bactérias do solo, as tetraciclina foram relatadas pela primeira vez na literatura científica em 1948. A aureomicina, nome da primeira geração de tetraciclina, em referência à sua cor amarelo ouro, foi aprovada para uso clínico pela Food and Drug Administration (FDA) e foi um sucesso imediato na época, salvando inúmeras vidas de doenças infecciosas, dentre elas as riquetsioses tal como a febre maculosa, infecções para as quais não havia cura. Ficaram conhecidas principalmente por sua atividade antibacteriana de amplo espectro e foram comercializadas com sucesso clínico a partir do final dos anos 1940 ao início dos anos 1950 (NELSON; LEVY, 2011).

Na segunda geração, análogos semissintéticos e compostos mais recentes semi e sintéticos de terceira geração mostram a evolução contínua da estrutura das tetraciclina para derivados com maior potência, bem como sua eficácia contra bactérias resistentes, além das melhores propriedades farmacocinética e química. E ao mesmo tempo, pesquisas comprovaram seu mecanismo de ação: esse grupo de antibióticos atua ligando-se de modo reversível ao RNAr 16S da subunidade 30S e inibe a síntese proteica bacteriana (NELSON; LEVY, 2011).

Esse grupo de antibióticos apresenta diversas outras aplicabilidades, uma delas direcionada à imagiologia por fluorescência, uma técnica de rotulagem sequencial com múltiplas tetraciclina, que investiga formação de osso *in vivo*, permitindo medidas longitudinais morfométricas. Baseia-se na aplicação de diferentes tetraciclina em diferentes períodos, refletindo o tempo de deposição óssea (PAUTKE et al., 2010; SONVER et al., 2011; VENTURA et al., 2014).

Na Odontologia efeitos promissores com as tetraciclina também foram observados e continuamente pesquisados. Ainda em 1956, Fraleigh relatou ter observado vantagens na aplicação de curativos periodontais contendo tetraciclina,

ao mesmo tempo em que reações teciduais indesejáveis estavam presentes. Hoje, já está mais do que comprovado que em uso sistêmico, a tetraciclina é encontrada no fluido crevicular em concentrações bacteriostáticas, enquanto que local, ela atinge concentrações bactericidas, justificando a sua incorporação em uma variedade de sistemas de liberação lenta, tal como o Atridox®, para o tratamento de periodontites e mais recentemente em peri-implantites. Sua eficácia pode ser comprovada não somente devido às ações antibacterianas, mas também por apresentarem propriedades adicionais como atividade anti-inflamatória, anti-colagenase e imunossupressora, uma vez que reduzem a atividade dos fagócitos polimorfonucleares e a quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos (BASSETTI et al., 2013; BUCHTER et al., 2004; CATON; RYAN, 2011; PARK, 2010; DASHTI et al., 2010; FRALEIGH, 1956; HOBIOYD, 1971; KINUGAWA et al., 2012; MUTHUKURU; SUN, 2013; SCHAR et al., 2012; SUNDARARAJ et al., 2013; UDAGAWA et al., 2013; YAGAN; KESIM; LIMAN, 2013).

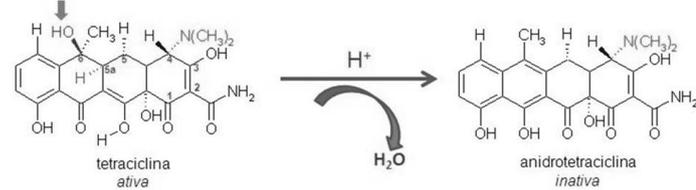
2.1.1 Doxiciclina: Isômero estrutural da tetraciclina

Em 1966 este antibiótico foi introduzido no mercado para uso clínico em humanos. Inicialmente era indicado para tratamento de doenças respiratórias, doenças venéreas e mais tarde para o tratamento de periodontites (MOIDEEN; KHAN; SIDDIQUI, 2013; YAGAN; KESIM; LIMAN, 2013).

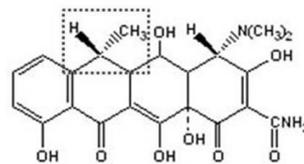
A doxiciclina, um isômero estrutural da tetraciclina, difere das demais quanto à posição do grupo hidroxila 1, situado no carbono 6 na tetraciclina e no carbono 5 na doxiciclina, característica que lhe confere maior estabilidade. Além disso, a doxiciclina apresenta maior grau de lipossolubilidade que as demais, chegando a 10 vezes mais, e alta capacidade de se ligar a proteínas plasmáticas, sendo altamente estável (FRANKLIN; SNOW, 1975) (FIGURA 1). Essas características explicam os resultados do uso tópico de doxiciclina a 8,5% estudado por Stoller et al. (1998). Os autores encontraram uma concentração de 700 vezes maior que a concentração inibitória mínima no fluido crevicular duas horas após aplicação, sendo que esta concentração permanecia alta após 18 horas e caía ao

sétimo dia, mas esta última concentração conservava-se ainda 150 vezes maior que a concentração inibitória mínima.

Figura 1– Estrutura química da doxiciclina comparada à tetraciclina.



Solução: uso de 6-desoxitetraciclina (Doxiciclina)



Fonte: Adaptado FRANKLIN; SNOW, 1975.

2.1.2 Tetraciclina e inibição da osteoclastogênese

As tetraciclina, incluindo a doxiciclina, previnem a perda óssea, mas o mecanismo envolvido é pouco conhecido. Sabe-se que os osteoclastos são células multinucleares de reabsorção óssea, derivadas a partir de células progenitoras hematopoiéticas e sua diferenciação é fortemente regulada por osteoblastos, os quais são células formadoras de osso (ROODMAN, 2006; CHAMBERS, 2010).

Uma das citocinas expressas pelos osteoblastos essenciais para a diferenciação de osteoclastos é o ativador do fator nuclear Kappa-B (RANKL). RANKL é uma citocina que está ligada à proteína de membrana de uma variedade de células como os osteoblastos, fibroblastos e células T, e é um mediador do processo de formação dos osteoclastos. Seu receptor é RANK, e a ligação RANK-RANKL na superfície de pré-osteoclastos ativa o fator nuclear Kappa B que leva a diferenciação dessas células. Ou seja, a ligação RANK-RANKL é o sinal que determina a diferenciação de células progenitoras de osteoclastos em osteoclastos totalmente diferenciados. Segundo Chambers (2010), RANK é o receptor nos osteoclastos e seus precursores, que interage com RANKL, o qual é sintetizado

pelos osteoblastos como uma proteína transmembrana. No osso, a expressão de RANKL pelos osteoblastos permite a diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos por ligação ao seu receptor, RANK, presente na superfície de pré-osteoclastos (LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2008).

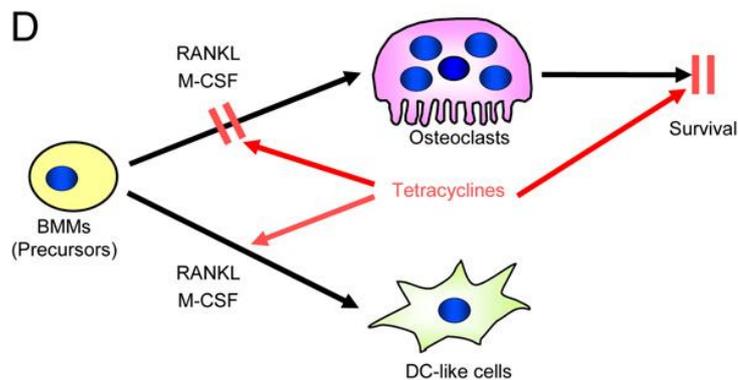
Os osteoblastos produzem também a osteoprotegerina (OPG), assim fica estabelecido um equilíbrio entre a produção de RANKL, a qual ativa a osteoclastogênese, e de OPG, que inibe esta atividade. A OPG é secretada pelos osteoblastos e exerce um efeito protetor no osso; é um membro da superfamília de receptores α TNF (Fator de Necrose Tumoral α) e, embora expressa em vários tecidos, tem um papel muito importante no sistema esquelético atuando como um receptor solúvel que se liga ao RANKL com alta especificidade, indisponibilizando-o para RANK e, assim, impede a diferenciação e ativação de osteoclastos (LERNER, 2005).

Além disso, estudos têm mostrado que os osteoclastos e células dendríticas (CDs) são derivados de células progenitoras comuns, tais como os macrófagos derivados da medula óssea (BMMs). E, como bem se sabe, as CDs desempenham um papel importante na imunidade natural aos microrganismos, na captura do antígeno e na indução de respostas dos linfócitos T às proteínas antigênicas. São encontradas em muitos órgãos linfóides periféricos. Possuem longas projeções citoplasmáticas, o que aumenta eficazmente sua área de superfície e colhem e internalizam ativamente componentes do ambiente tecidual extracelular por pinocitose e fagocitose. As CDs expressam vários receptores de superfície que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos e transduzem sinais ativadores para dentro da célula. Uma vez ativadas, as CDs se tornam móveis e migram para tecidos linfóides regionais, onde participam na apresentação de peptídeos derivados de antígenos proteicos. Ou seja, as CDs são células apresentadoras de antígeno (APCs) e, portanto, são os alvos preferidos para imunoterapia em pacientes com doenças autoimunes e em pacientes com câncer (GEISSMANN et al., 2010; PALUCKA; UENO; BANCHEREAU, 2011).

Recentemente, Kinugawa et al. (2012) e Udagawa et al. (2013), mostraram que as tetraciclinas convertem a via de diferenciação BMMs e essas células progenitoras comuns resultam em CDs em vez de osteoclastos. Isto é, a doxiciclina e minociclina inibiram a osteoclastogênese RANKL induzido. Sinais RANK são essenciais para as tetraciclinas induzirem a diferenciação de BMMs em

CDs, no entanto, sinais não identificados, podem promover essa diferenciação por RANKL e tetraciclinas. Assim, em ambos os eventos, a remoção de sinais inibidores por tetraciclinas, e a indução de sinais estimuladores por RANKL, podem ser obrigados a induzir a diferenciação de CDs. Na verdade, as tetraciclinas modificam os sinais RANK-RANKL induzindo a diferenciação das BMMs em CDs (FIGURA 2).

Figura 2- Ação de tetraciclinas em progenitores comuns de osteoclastos e CDs.



Fonte: KINUGAWA et al., 2012; UDAGAWA et al., 2013.

Apesar de diversos estudos anteriores afirmarem que a doxiciclina promove a osteogênese, pesquisas recentes em culturas celulares obtiveram como resultado que este fármaco não teve nenhum efeito sobre o número e superfície de osteoblastos, enquanto, por outro lado, diminuiu significativamente o número e superfície de osteoclastos. Estes resultados adicionais suportam o conceito de que a prevenção da perda de massa óssea pelas tetraciclinas é principalmente devido à supressão da reabsorção óssea osteoclástica e não ao aumento direto de osteoblastos. E a remodelação óssea é tão importante quanto à osteogênese, uma vez que para se alcançar uma maior formação óssea a atividade osteoblástica deve estar ativada enquanto que a atividade osteoclástica deve estar inibida, resultando, indiretamente, numa maior massa óssea (BANG et al., 2013; KINUGAWA et al., 2012; UDAGAWA et al., 2013).

A inibição da osteoclastogênese é, sem dúvidas, uma função extremamente vantajosa das tetraciclinas, pois, como bem se sabe a manipulação óssea, por si só, de diversos procedimentos cirúrgicos, é capaz de desencadear a atividade dos osteoclastos.

2.2 BUSCA CONSTANTE POR NOVOS SUBSTITUTOS ÓSSEOS

Historicamente, a prevenção e tratamento de perdas ósseas têm sido realizados através de procedimentos de enxertia óssea, sendo que o primeiro enxerto ósseo já registrado ocorreu em 1668 por Job Van Meekeren, um cirurgião holandês. Desde então, o enxerto ósseo representa um procedimento padrão frequentemente utilizado para se obter a regeneração óssea, empregado nas mais diversas especialidades médicas e odontológicas (BOER, 1988; FINKEMEIER, 2002; JENSEN et al., 2012).

Os enxertos ósseos, que também podem ser denominados de substitutos ósseos, desde que sejam biocompatíveis, possuam boas propriedades biomecânicas e capacidade de devolver a funcionalidade ao osso, têm tido uma aplicabilidade na Odontologia direcionada principalmente às cirurgias ósseas reconstrutivas dos maxilares previamente à colocação de implantes dentários, à regeneração periodontal e à reconstrução do rebordo alveolar em fissuras labiopalatinas congênitas (FINKEMEIER, 2002; JENSEN et al., 2012).

Mas desde já, é de fundamental importância entender que enxerto ósseo é um procedimento, e que implica na aplicação de osso autógeno ou outro substituto ósseo, obtido a partir de fonte natural ou sintética, numa área com defeito ósseo. O enxerto ósseo não deve ser confundido com a regeneração óssea. A regeneração óssea é a real formação de novo osso no defeito enxertado, e o enxerto ósseo não conduz necessariamente o osso à regeneração (OGUN SALU, 2011).

Na formação de novo osso, células mesenquimais indiferenciadas e células progenitoras vivas provenientes do enxerto ou oriundas do hospedeiro, possuem importante papel, juntamente com diferentes conjuntos de mediadores moleculares, tais como estimuladores da inflamação (interleucina 1 e 6), estimuladores de diferenciação (TGF-beta), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e é claro, a manutenção do espaço destinado à neoformação óssea. Isso é claramente observado na fase aguda do reparo ósseo, uma vez que as diminuições do sangue e da tensão de oxigênio levam a uma hipóxia tecidual, a qual promove a liberação de numerosas citocinas e fatores de crescimento, que a partir daí irão induzir o processo de cura da inflamação, a

angiogênese, condrogênese e finalmente a osteogênese. Na verdade, esse processo de ossificação se dará de duas formas, já que os osteoblastos formarão osso diretamente através da ossificação intramembranosa, enquanto os condroblastos iniciam o processo de formação de cartilagem no local do defeito que posteriormente é substituída por osso através da ossificação endocondral (BIELBY; JONES; McGONABLE, 2007; MICLAU; HELNS, 2000).

Tendo isso em vista, os diferentes substitutos ósseos podem ser classificados quanto ao seu mecanismo de ação em: osteogênicos, osteoindutores e osteocondutores (CARVALHO, et al., 2010; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; LOURENÇO, 2002; OGUNSALU, 2011).

Os materiais osteogênicos são orgânicos e capazes de estimular a formação óssea a partir de osteoblastos. Refere-se ao crescimento de osso a partir de células viáveis transferidas dentro do enxerto. Ou seja, os osteoblastos e células-tronco presentes no enxerto e que sobrevivem ao processo de transplante são inicialmente os únicos responsáveis pela proliferação e formação de novo produto osteóide (CARVALHO, et al., 2010; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; LOURENÇO, 2002; OGUNSALU, 2011).

Já os osteoindutores, são aqueles capazes de induzir a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas (pluripotentes) ou osteoprogenitoras em osteoblastos, estimulando assim, a formação óssea no local ou mesmo num sítio heterotípico (CARVALHO, et al., 2010; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; LOURENÇO, 2002; OGUNSALU, 2011).

Por outro lado, os osteocondutores, auxiliam a cicatrização através de seu arcabouço ou *scaffold* micro e macroscópico permitindo a infiltração vascular e a migração interna de elementos celulares envolvidos na formação de osso como células mesenquimais indiferenciadas, osteoblastos, osteoclastos. Conduzem o crescimento do osso e permitem aposição óssea do osso existente, mas não induzem a formação óssea. Normalmente, este mecanismo de ação é mais eficiente quando os demais estão presentes, osteoindução e osteogênese (CARVALHO, et al., 2010; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; LOURENÇO, 2002; OGUNSALU, 2011).

Outra classificação frequentemente atribuída aos substitutos ósseos está relacionada à origem: autógenos ou autólogos (quando obtidos do próprio sujeito); homogêneo, homólogo ou aloenxerto (quando obtidos de indivíduos da mesma

espécie); heterógeno ou xenógeno (quando obtidos de indivíduos de espécie diferente); e, sintéticos ou aloplásticos (que possuem origem sintética) (CARVALHO et al., 2010; CONZ et al., 2010; FARDIN et al., 2010; OGUN SALU, 2011).

E é exatamente em decorrência das classificações quanto aos mecanismos de ação e à origem, que o substituto ósseo autógeno ainda permanece como padrão ouro, uma vez que todos os demais têm desvantagens a ele comparadas. Isso, porque possui os três elementos essenciais da regeneração óssea, a osteogênese, osteoindução e osteocondução, elementos esses, que, sem dúvida, favorecerão a ligação final entre o osso do hospedeiro e material de enxertia, processo denominado osteointegração. E esses mecanismos não ocorrerão de maneira distinta e separada, mas sim se sobrepondo uns aos outros. Na verdade, o mecanismo de crescimento ósseo no interior dos enxertos ósseos autógenos inclui três fases. Na fase I, algumas células osteoblásticas transplantadas sobrevivem nos primeiros 3 ou 4 dias através da nutrição pelo tecido vascular circundante e durante as 4 primeiras semanas são responsáveis pela proliferação e formação de novo produto osteóide. Este processo osteogênico estará relacionado ao número de células transplantadas e também da vascularização inicial. Em 4 semanas, esta fase diminui, uma vez que as células transplantadas morrem. Na fase II, proteínas indutivas e fatores de crescimento são liberados pelo osso transplantado, iniciando o processo osteoindutor, que começa na 2ª semana e se estende até 6 meses após a enxertia, momento de seu pico. E por fim a fase III, em que seu próprio *scaffold*, representado pela sua matriz inorgânica, preencherá o espaço destinado à regeneração óssea, permitindo a aposição óssea (JOHANSSON et al., 2001; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; MLADENOVIC et al., 2013; SBORDONE et al., 2009; SBORDONE et al., 2012; SBORDONE et al., 2013; SILVA et al., 2012; SMOLKA et al. 2006; LONG et al., 2014).

No entanto, apesar deste processo parecer estar bem próximo da perfeição, a coleta deste tipo de enxerto, além de estar associada à realização de uma nova ferida cirúrgica e à disponibilidade limitada, 8,5 - 20% dos casos apresentam complicações, incluindo a formação de hematomas, hemorragias, lesões nervosas, infecção, e dor no sítio doador, que por vezes é crônica, resultando, frequentemente, na não aceitação do paciente. Sem contar que a reabsorção significativa, muitas vezes observada em enxertos ósseos autógenos, também pode comprometer os resultados (JOHANSSON et al., 2001;

GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; MLADENOVIC et al., 2013; SBORDONE et al., 2009; SBORDONE et al., 2012; SBORDONE et al., 2013; SILVA et al., 2012; SMOLKA et al. 2006; LONG et al., 2014).

Mas, felizmente, a evolução tecnológica e a melhor compreensão da biologia de cura do osso, têm levado ao desenvolvimento de vários substitutos ósseos que estão atualmente disponíveis, e cada vez mais apresentando resultados próximos ao enxerto autógeno. Schmitt et al. (2013), por exemplo, compararam um representante de cada origem de enxerto (autógeno, homogêneo, heterogêneo e aloplástico). Seu estudo foi realizado através do Sinus Lift em pacientes de 38 a 79 anos em que a altura óssea residual da região posterior de maxila não ultrapassava 4 mm. Após 5 meses, realizaram coleta óssea da área enxertada com broca trefina de 14 mm de altura e analisaram. Puderam concluir que todos os materiais testados são adequados para o levantamento do assoalho do seio maxilar. O enxerto autógeno ainda pode ser considerado o padrão ouro na elevação do assoalho do seio maxilar em relação ao osso neoformado na região de interesse, mas os demais materiais substitutos testados foram praticamente iguais na eficácia e os pacientes que receberam o enxerto autógeno apresentaram maior morbidade que os demais.

Fato é que, nenhum substituto ósseo atualmente disponível apresenta todos os requisitos de um material ideal, sempre possuem vantagens, mas também desvantagens relacionadas com suas propriedades mecânica e biológica (GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; MLADENOVIC et al., 2013).

Mas dentro deste arsenal de materiais destinados à realização de enxertos ósseos, no campo da Odontologia, os xenoenxertos ganham destaque, pois mesmo sendo essencialmente osteocondutores, eliminam todas as desvantagens relacionadas com a obtenção do enxerto autógeno, desde a quantidade disponível até a morbidade resultante do sítio doador (MLADENOVIC et al., 2013).

A principal fonte de xenoenxertos comercializadas como biomaterial de substituição óssea na clínica é a de origem bovina. E dentre eles, o mais utilizado substituto ósseo a base de osso bovino inorgânico, tem sido o Bio-Oss (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça), um biomaterial inorgânico livre de patógenos que contém uma hidroxiapatita com estrutura cristalina e proporção cálcio/fósforo, composição química e estrutura física bastante semelhantes ao osso humano. É um material de enxerto que oferece um arcabouço para a migração de células e desenvolvimento

de osso lamelar, além de aumentar a densidade óssea. Na verdade, na matriz celular as proteínas de ligação permitem o recrutamento de osteoblastos pré-existentes do osso adjacente, os quais penetram entre as porosidades das partículas do enxerto e sintetizam matriz osteóide. Estas propriedades fazem do Bio-Oss, adequado material para a manutenção de espaço, facilitando a regeneração óssea, tal como sugerido por estudos histológicos, que demonstraram área óssea recém-formada em estreita relação com suas partículas justificando seu amplo emprego para aumento ósseo em cirurgias periodontais, dentoalveolares, em combinação com a instalação do implante e/ou outros tipos de enxertos (CHIAPASCO, 2009; DAHLIN; SIMION; HATANO, 2009; GALINDO-MORENO et al., 2010; JENSEN, 2013; LANGE et al., 2014; MLADENOVIC et al., 2013; ORSINI et al., 2005;).

Dentre as características de um substituto ósseo ideal pode-se citar em relação ao Bio-Oss: manutenção de espaço para regeneração óssea; pré- definição da forma anatômica desejada; apoio para as membranas; orientação estrutural osteocondutora para a regeneração de tecido ósseo; substância transportadora de antibióticos, fatores de crescimento ou abordagens de terapia genética, *scaffolds* para abordagens de engenharia de tecidos (FISCHER et al., 2011; KOLK et al., 2012; NAUJOKS et al., 2011).

O Bio-Oss é um material bem documentado e bem estabelecido, tanto isolado como associado a outros biomateriais, principalmente quando comparado ao enxerto autógeno e comprovação de suas propriedades. Neste contexto, Schmitt et al. (2014) compararam o enxerto autógeno ao heterógeno (Bio-Oss) no *Sinus Lift*. Este estudo foi realizado em humanos e o período de avaliação histológica correspondeu há seis meses. Após este período, amostras ósseas da região foram colhidas com broca trefina e analisadas imediatamente antes da colocação dos implantes. Depois de 5 anos e 2 meses \pm 7 meses, verificou-se que a taxa de sobrevivência dos implantes não apresentou diferenças estatísticas quando comparados os diferentes grupos. E com isso, os autores puderam concluir que a adição de osso autógeno ao osso heterógeno não apresentou nenhum efeito benéfico sobre o osso neoformado e a sobrevivência do implante em longo prazo. Além disso, a morbidade resultante da coleta do osso autógeno pôde ser evitada no grupo Bio-Oss.

Por outro lado, Jensen et al. (2013), em seus estudos, verificaram em mini porcos que no *Sinus Lift* a associação de diferentes porcentagens de enxerto

autógeno e heterógeno (Bio-Oss) interferem no contato inicial osso-implante após 12 semanas de análise. Além disso, este osso autógeno foi obtido de diferentes locais de modo a verificar se isto também influenciaria (intraoral - mandíbula/ extraoral – crista ilíaca). Os autores concluíram que o contato osso-implante foi significativamente maior com osso autógeno ou Bio-Oss misturado com osso autógeno, em comparação com Bio-Oss. E este contato, em sua fase mais precoce foi mais avançado com o uso de osso autógeno. Além disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre a origem do enxerto autógeno (intra ou extraoral).

Santis et al. (2012) e Santis et al. (2013) avaliaram a osseointegração de implantes em cães após a utilização de enxerto ósseo autógeno e enxerto ósseo bovino desproteínizado (Bio-Oss) em defeitos mandibulares obtidos com a extração dos molares e remoção da parede bucal. No entanto, os primeiros verificaram a utilização de ambos os materiais em sua forma em bloco e os segundos em sua forma particulada, todos com o uso concomitante de membranas de colágeno. Os resultados mostraram que os blocos ósseos autógenos usados para aumentar a crista óssea alveolar horizontal permitiram a osseointegração completa de implantes instalados após 3 meses. Mas os blocos semelhantes de osso bovino não promoveram a osseointegração, embora os implantes instalados permanecessem estáveis devido à integração óssea nos sítios de osso original, enquanto que as partículas de osso autógeno, bem como de osso bovinos usados para aumentar horizontalmente o processo ósseo alveolar permitiram a osseointegração de implantes no mesmo período.

Além disso, Mladenovic et al. (2013) propuseram investigar sistematicamente *in vitro*, a interface biológica do Bio-Oss, analisando o seu comportamento de dissolução e precipitação, além das respostas osteogênicas. Puderam confirmar com os seus resultados que este biomaterial, através das reações de dissolução e precipitação dos fluidos teciduais, favorece o processo inicial de formação óssea na interface biológica, uma vez que a análise elementar do meio de cultura de células demonstrou uma redução significativa de cálcio e de fósforo. A absorção de cálcio sobre as partículas Bio-Oss foi confirmada com a marcação isotópica radioativa. Em outras palavras, as partículas de Bio-Oss são capazes de absorver os íons de cálcio e fósforo presentes no fluido tecidual, favorecendo assim o processo inicial de neoformação óssea.

Galindo-Moreno et al. (2013) avaliaram a colonização celular e vascular do osso bovino inorgânico (Bio-Oss) após 6 meses em enxertos de elevação do assoalho do seio maxilar em humanos. Sabe-se que o grau de formação óssea entre as partículas depende das propriedades de osteocondução do material, isto é, da capacidade de manter o espaço destinado à neoformação óssea. A porosidade do material deve fornecer uma base para a vascularização e penetração de células associadas. Os autores concluíram após análise morfológica e imuno-histoquímica que após este período, foram observadas colonização por osteócitos e neovascularização bastante satisfatórias.

Ainda, Dashti et al. (2010), em seus estudos, avaliaram *in vitro*, a eficácia antimicrobiana do cloridrato de tetraciclina (TCH) adsorvido sobre enxertos ósseos com Bio-Oss contra uma variedade de bactérias patogênicas. Na literatura já está mais do que confirmado que o efeito local de antibióticos pode oferecer a vantagem de reduzir os efeitos secundários potenciais associados com a sua administração sistêmica. Assim, vários níveis de TCH foram adsorvidos, por imersão, nas partículas de Bio-Oss, em soluções aquosas de TCH com diferentes concentrações. A eficácia antimicrobiana foi testada contra duas bactérias Gram-negativas associadas com doenças periodontais: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e uma bactéria Gram-positiva associada com tecido mole e infecções ósseas: *Staphylococcus aureus*. Todas as concentrações testadas de TCH adsorvida pelo Bio-Oss resultaram numa redução de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *S. aureus*, e as concentrações mais elevadas foram, na maioria dos testes mais eficazes na redução ou eliminação do crescimento bacteriano. Além de seu papel osteocondutor, a absorção de TCH pelo Bio-Oss o torna funcional em evitar a antibioticoterapia profilática para a prevenção de infecções relacionadas a implantes ou ao biomaterial.

Assim sendo, pesquisas devem ser realizadas com o objetivo de se conseguir respostas sobre as vantagens da doxiciclina a 10%, na forma de gel, na regeneração óssea, bem como suas vantagens e limitações, indicações e ação em associação com substitutos ósseos. Sua utilização na Odontologia, especificamente no tratamento de periodontite e peri-implantite já está bastante esclarecida, no entanto, a amplificação desta aplicabilidade passa obrigatoriamente pelos estudos experimentais em animais, uma vez que podem proporcionar respostas sobre sua real ação no reparo ósseo. Hoje, a utilização de materiais de enxerto para evitar e

até mesmo restabelecer perdas ósseas nos rebordos alveolares, que possibilitam a reabilitação oral implanto-suportada, se tornou uma necessidade cada vez mais evidente. Portanto, considerando que a doxiciclina apresenta características bastante favoráveis para a regeneração óssea, tais como inibição da osteoclastogênese, antibacteriana, anti-colagenase e anti-inflamatória, e que o Bio-Oss, um enxerto essencialmente osteocondutor, oferece um arcabouço adequado para a migração de células, o presente estudo se justifica, pois apesar da diversidade de opções de enxertos, suas vantagens podem permanecer submersas sobre os demais, dificultando a escolha precisa entre eles para uso clínico.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho objetiva investigar o efeito do gel de doxiciclina a 10% e do enxerto ósseo bovino, associados ou não, na regeneração óssea de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MODELO EXPERIMENTAL

Todo protocolo experimental foi desenvolvido após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas - Unifal-MG (nº de registro: 555/2014 – ANEXO A).

Para a presente pesquisa foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, com peso entre 450 e 550 gramas (Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG – Unifal-MG). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Quarenta animais foram aleatoriamente divididos em 5 grupos, com 8 ratos em cada grupo, para serem submetidos a eutanásia em 2 períodos experimentais (4 e 8 semanas).

4.2.1 Grupo Controle

- a) CS (Coágulo Sanguíneo): a cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal não foi preenchida com nenhum biomaterial;

4.2.2 Grupos Experimentais

- a) NAT (Natrosol): a cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com a base do gel, ou seja, o natrosol;
- b) DOX (Doxiciclina): a cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com gel de doxiciclina a 10%;
- c) BO (Bio-Oss, Geistlich Pharma AG, Suíça): a cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com osso bovino particulado;
- d) BODOX (Bio-Oss associado a Doxiciclina): a cavidade cirúrgica de 6 mm de diâmetro na calvária do animal foi preenchida com gel de doxiciclina a 10% associada ao osso bovino particulado.

4.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

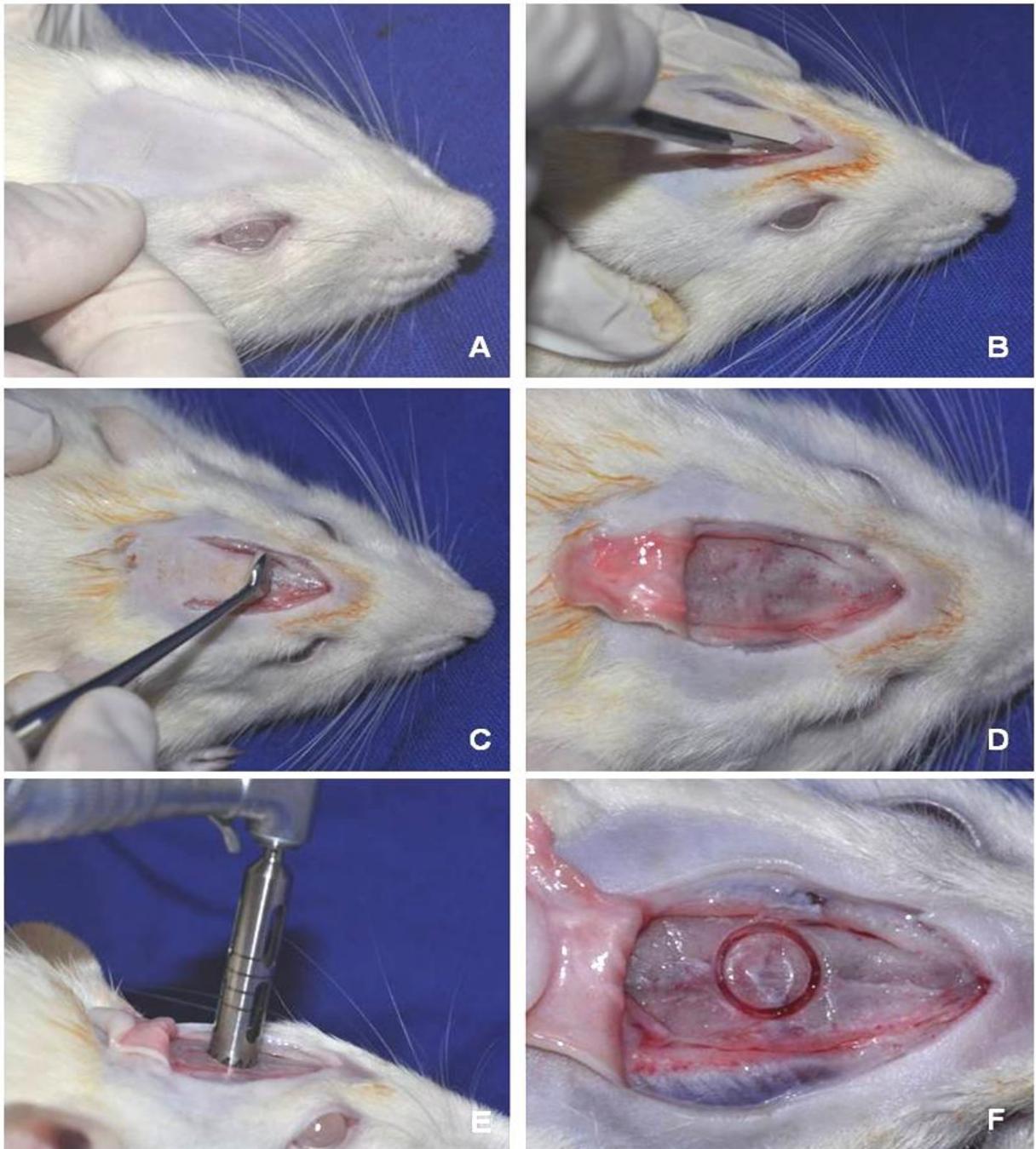
Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) (Rompum®, Bayer S. A., Brasil) e quetamina (70mg/kg) (Dopalen®, Sespo, Brasil). Posteriormente, a tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais foi realizada pela técnica de arrancamento dos pelos e a antisepsia feita com polivinilpirrolidona-iodado (PVPI) a 10% com 1% de iodo ativo (Riodeine, Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, Brasil).

A seguir, com uma lâmina de bisturi nº 15 (Free-Bac, P.R.C., China) realizou-se uma incisão em “U”, com base caudal na calvária do rato. A incisão atingiu o periósteo permitindo o descolamento de um retalho de espessura total em direção posterior.

Com broca trefina de 6mm de diâmetro (3i, Neodent, Brasil), acoplada em contra-ângulo (INTRAmatic® 2068 FGBN, Kavo, Brasil) e micromotor (INTRAmatic® 181 DBN, Kavo, Brasil) e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril (Linhamax®, Eurofarma, Brasil), foi preparado um defeito de tamanho crítico na calvária do animal. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. Marcações em formato de “L” também foram realizadas a 2mm anterior e a 2 mm posterior às margens do defeito cirúrgico e preenchidas com ionômero de vidro (Ionômero de Vidro para Restauração, S.S.White Vidrion R, Rio de Janeiro, Brasil). O maior eixo de cada “L” localizou-se sobre uma linha imaginária longitudinal crânio-

caudal que dividiu o defeito cirúrgico ao meio. As marcações foram feitas com uma broca carbide tronco-cônica (Broca Carbide Tronco Cônica p/ Alta Rotação n° 16 702, Dentsply, Brasil) acoplada em alta rotação (Turbina EXTRA torque 505, Kavo, Brasil) sob irrigação contínua com solução salina estéril. Estas marcações são úteis para a identificação do centro do defeito cirúrgico original durante o processamento laboratorial, permitindo localizar as margens ósseas originais do defeito durante a análise histológica (MESSORA et al., 2008). Depois de preenchidos os defeitos, com os respectivos materiais ou somente coágulo sanguíneo, de acordo com os animais de cada grupo, os tecidos moles foram reposicionados e suturados por meio de pontos interrompidos simples com fio de seda 3-0 (Suture Needles, Technew, Rio de Janeiro, Brasil). Vale ainda ressaltar que os animais receberam 0,5ml (ampola 30mg\2ml) de fosfato de codeína, por via intramuscular, no final do procedimento e 1 dose diária por 5 dias como droga analgésica (FIGURAS 3, 4 e 5).

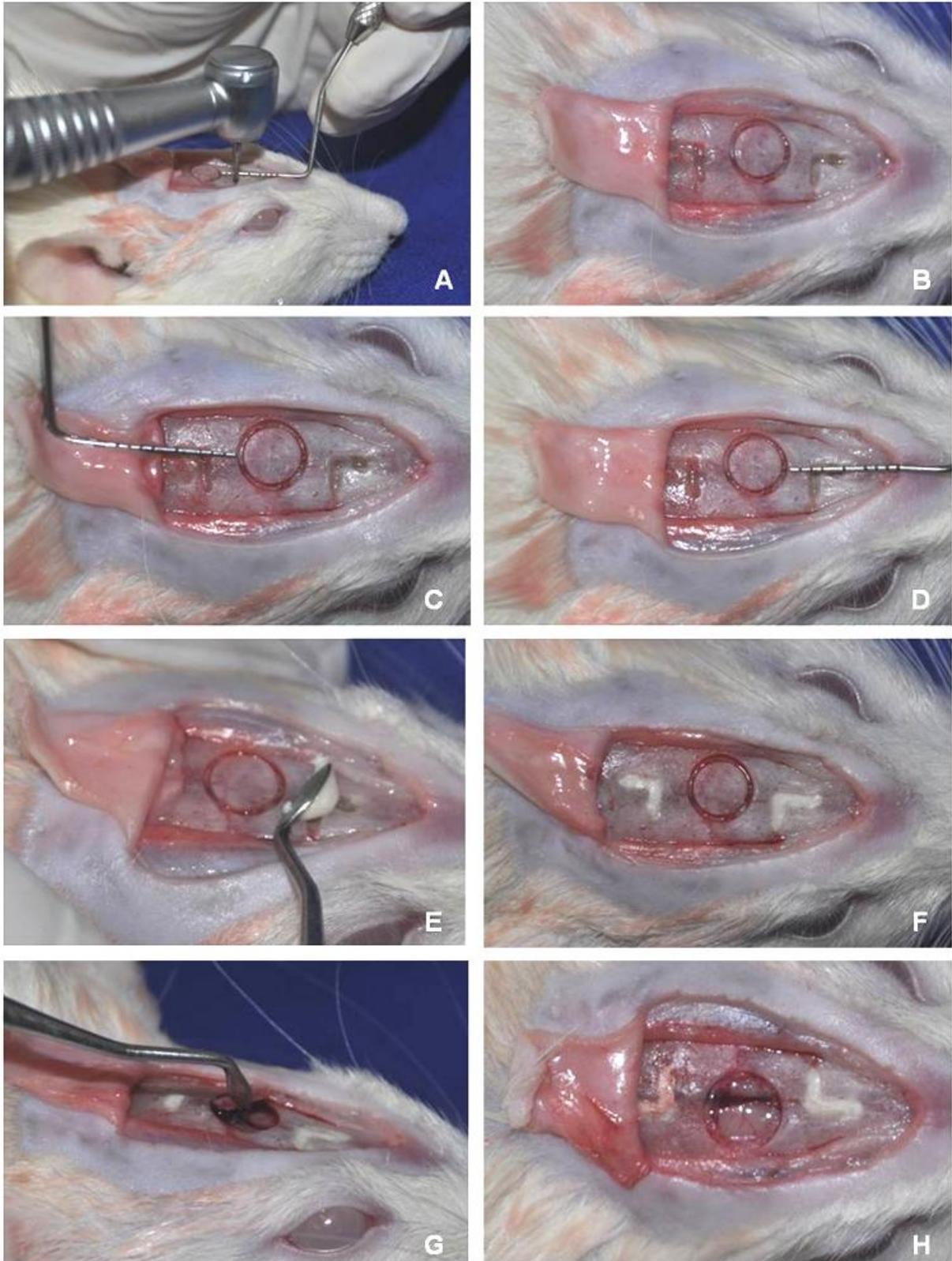
Figura 3 - Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.



Fonte: Do autor.

Notas:(A) Tricotomia; (B) Incisão; (C) Descolamento total do retalho; (D) Retalho descolado; (E) Osteotomia com broca trefina; (F) Osso osteotomizado.

Figura 4 - Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.



Fonte: Do autor.

Notas:(A, B, C e D) Confeção das canaletas em “L” 2 mm anterior e posterior às margens do defeito; (E e F) Preenchimento das canaletas com ionômero de vidro; (G) Exérese do tecido ósseo ostectomizado; (H) Aspecto final do defeito ósseo.

Figura 5 – Defeito ósseo criado na calvária dos animais: passos da técnica cirúrgica.



Fonte: Do autor.

Notas: (A) Aspecto do gel de doxiciclina a 10%; (B e C) Defeito ósseo preenchido com o gel de doxiciclina; (D) Defeito ósseo preenchido com as partículas de Bio-Oss; (E) Defeito ósseo preenchido com o gel de doxiciclina associada com as partículas de Bio-Oss; (F e G) Aspecto das partículas de Bio-Oss e natrosol respectivamente; (H) Sutura.

4.4 EUTANÁSIA

Os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ em 4 e 8 semanas de pós-operatório.

4.5 ANÁLISE TOMOGRÁFICA E ESTATÍSTICA

Antes do processamento das calvárias obtidas dos animais, a avaliação da densidade tomográfica na região do defeito foi realizada através da Tomografia Computadorizada Volumétrica – 3D Cone Beam (TCCB).

A aquisição das imagens foi realizada de forma padronizada. Para isso, utilizou-se um tomógrafo de feixes cônicos do tipo dedicado, modelo i-Cat Next Generation, marca Imaging Sciences International, com potência de 120 kVp, intensidade de 37 mAs, tempo de varredura de 29 segundos e resolução de voxel igual a 0,25 mm.

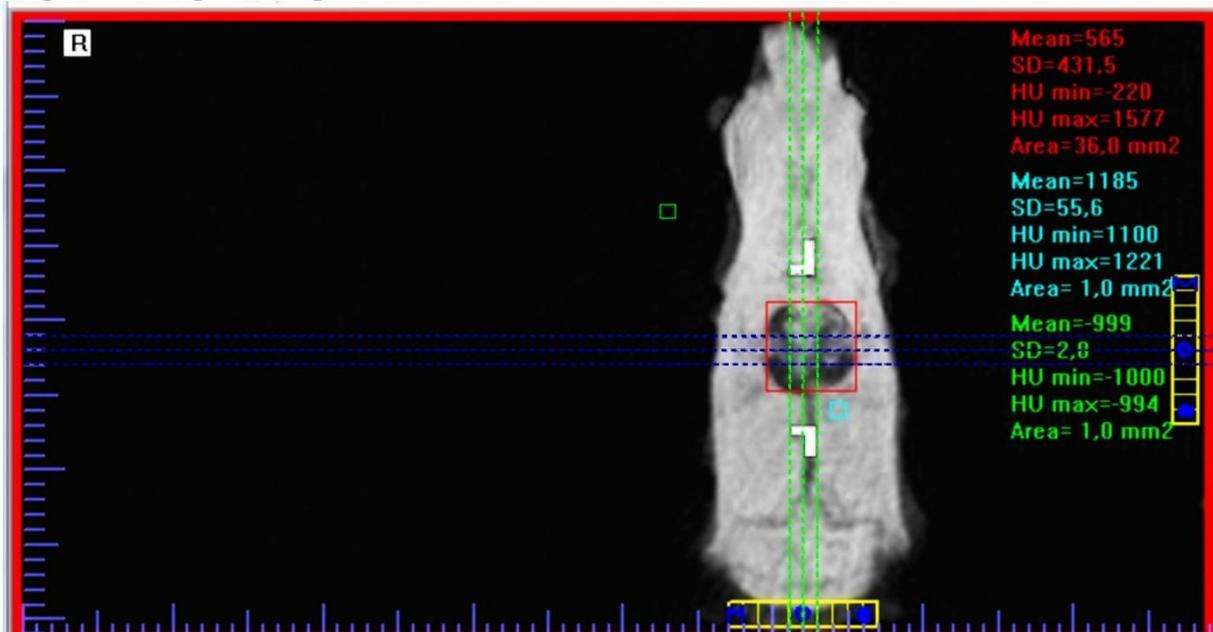
A análise foi realizada por um único examinador, em esquema cego para o tipo de tratamento realizado, depois de concluído o processo de reenderização pós-processamento das imagens tomográficas (modo de apresentação MIP e filtro HARD), utilizando o Programa i-CATVision.

Os seguintes critérios foram utilizados para padronizar a análise tomográfica:

- a) Todas as calvárias foram analisadas nos 3 cortes obtidos na TCCB, ou seja, axial, sagital e coronal, e por 3 vezes cada corte;
- b) Os *slices* ou cortes obtidos apresentavam 2mm de espessura;
- c) No corte axial, delimitou-se um quadrado com área de 36 mm² (6mm x 6mm), representado com a cor vermelha, de modo a englobar toda a região do defeito (FIGURA 6);
- d) Nos cortes sagital e coronal, foi delimitado um retângulo com área de 12mm² (2mmx6mm), também representado com a cor vermelha, de modo a englobar toda a região do defeito (FIGURA 7 e 8 respectivamente);

- e) Quatro medidas estatísticas de densidade óssea foram obtidas: média, desvio padrão, HU mínimo e HU máximo, sendo a unidade de medida utilizada o *Hounsfield* (HU), no entanto, na análise realizada, apenas a média foi utilizada;
- f) Em todos os cortes foram realizados dois quadrados de 1mm² (1mmx1mm). Um deles, para delimitar a densidade óssea média numa região de osso nativo, ou seja, de osso não osteotomizado, o qual foi representado com a cor azul; e o outro, para delimitar o fundo, representado pela cor verde;
- g) A média da densidade óssea na região de osso nativo (\bar{x} DON) foi medida em HU e considerada 100% da densidade. E a média da densidade tomográfica na região do defeito cirúrgico (\bar{x} DDC), também medida em HU, foi calculada como uma porcentagem da \bar{x} DON.

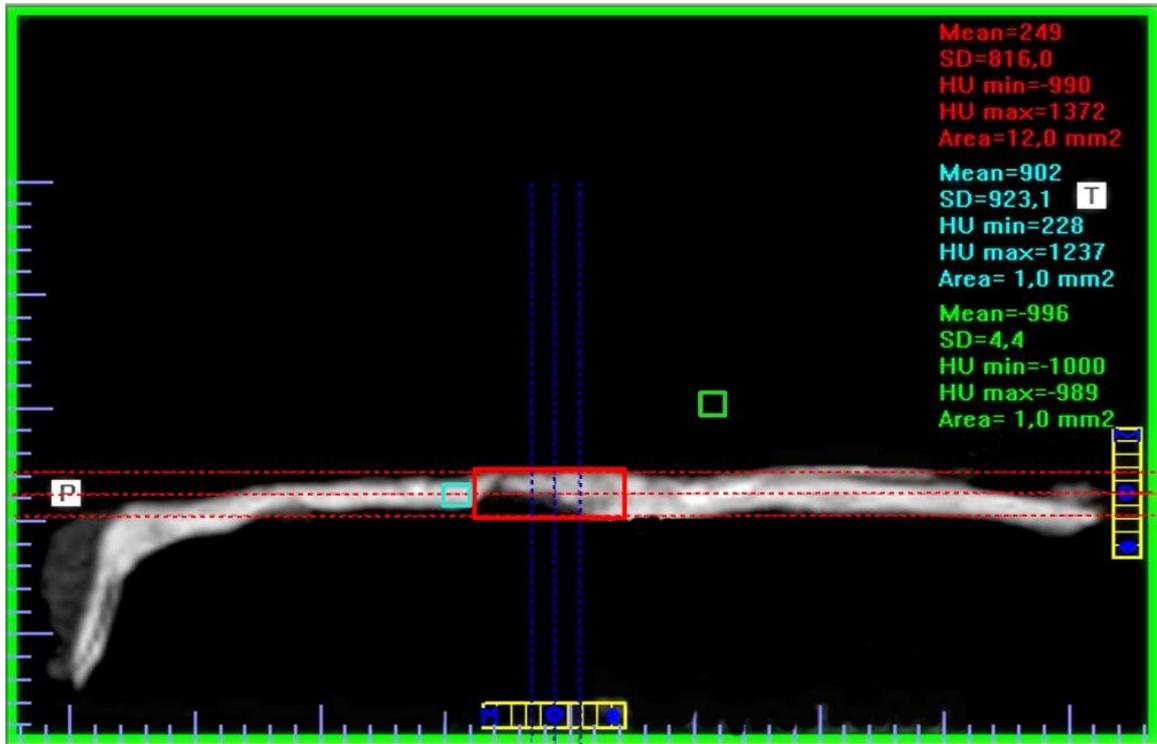
Figura 6 – Imagem tomográfica da calvária do animal: corte axial e áreas de análise delimitadas.



Fonte: Do autor.

Notas: Quadrado vermelho - região do defeito; quadrado azul – osso nativo; quadrado verde – fundo da imagem.

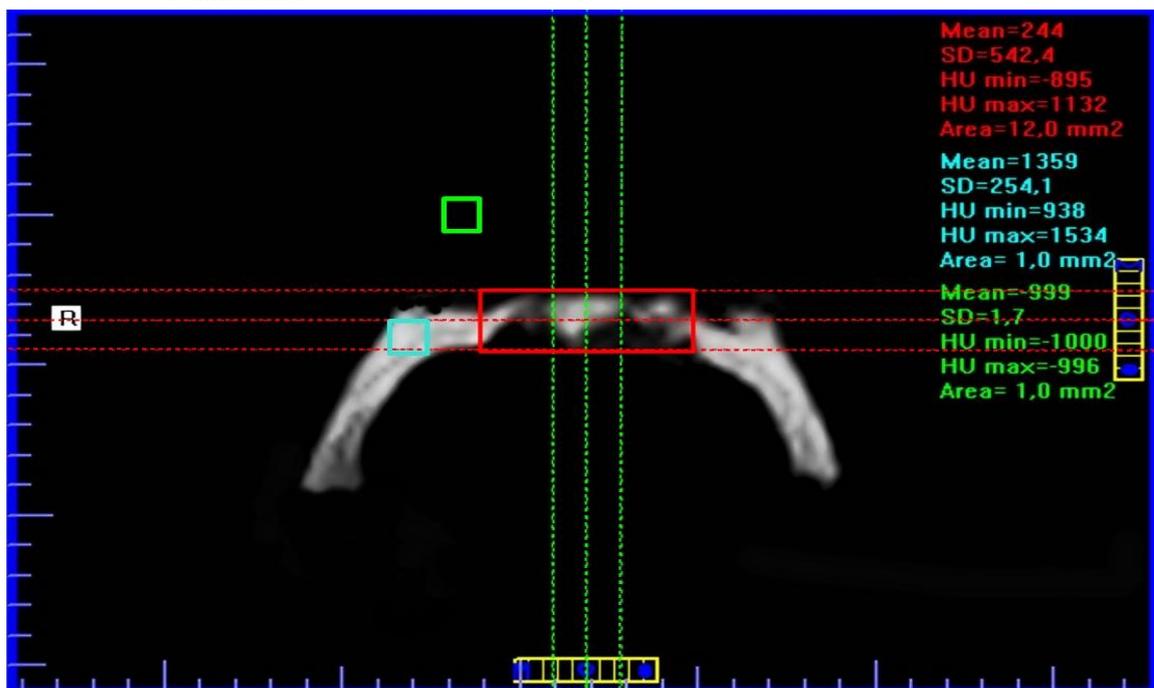
Figura 7 – Imagem tomográfica da calvária do animal: corte sagital e áreas de análise delimitadas.



Fonte: Do autor.

Notas: Retângulo vermelho - região do defeito; quadrado azul - osso nativo; quadrado verde - fundo da imagem.

Figura 8 – Imagem tomográfica da calvária do animal: corte coronal e áreas de análise delimitadas.



Fonte: Do autor.

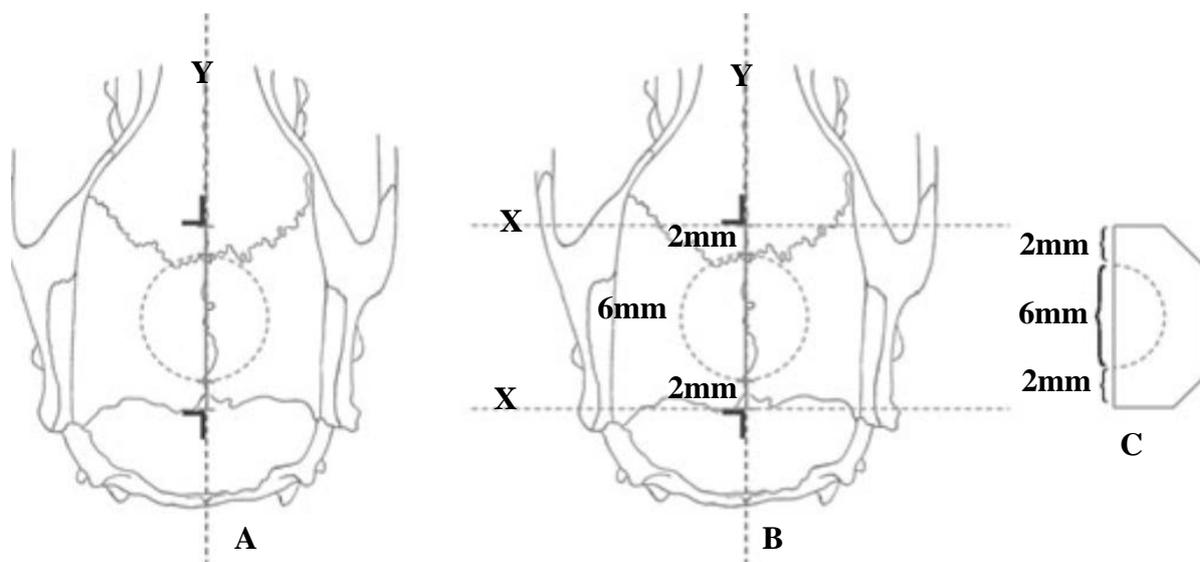
Notas: Retângulo vermelho - região do defeito; quadrado azul – osso nativo; quadrado verde – fundo da imagem.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste Tukey a 5% de significância, quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa ($p < 0,05$). Para isso, o programa Statgraphics versão 7.0 (Graphic Software Systems, Inc.) foi utilizado.

4.6 PROCESSAMENTO DAS CALVÁRIAS

As peças foram fixadas em formol neutro a 10% (Formol Estabilizado sol. 10%, Sciavicco Comércio e Indústria Ltda, Sabará, Minas Gerais, Brasil), lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). Após descalcificação inicial, cada peça foi dividida longitudinalmente em dois blocos, exatamente ao longo do centro do defeito cirúrgico original, usando-se os maiores eixos de cada marcação de ionômero de vidro com formato de “L” como referência. Foram realizados também cortes transversais que tangenciaram o menor eixo de ambas as marcações em “L”, de modo que cada espécime apresentasse 10 mm de extensão no sentido longitudinal (FIGURA 9). Assim, tornou-se possível a determinação precisa dos limites do defeito cirúrgico original. Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram então realizados cortes seriados no sentido longitudinal da peça com seis micrometros de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original, os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE), para análise com microscopia de luz.

Figura 9 - Processamento laboratorial padronizado de redução das peças.



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

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

4.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

As análises histológicas e histométricas foram realizadas por um único examinador, em esquema cego para o tipo de tratamento realizado.

As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (AxioCam MRc 1.4 Mb - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) acoplada à um microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) com um aumento original de 10X e 40X (lente objetiva N - Achromat) e salvas em um computador.

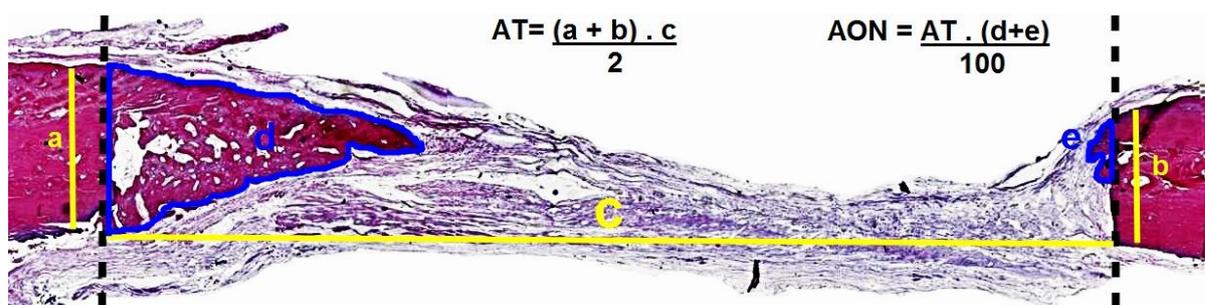
Os cortes histológicos foram avaliados morfologicamente de forma descritiva, qualitativamente em microscopia ótica, observando os seguintes aspectos:

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

A análise histomorfométrica foi realizada com o auxílio de um software “AxioVision Rel. 4.8”. Os seguintes critérios, baseados nos trabalhos de Melo et al. (2005) e Messoria et al. (2008), foram utilizados para padronizar a análise histomorfométrica das imagens digitalizadas:

- a) A área total (AT) a ser analisada correspondia a toda a área do defeito cirúrgico original, sendo que a mesma foi determinada primeiramente pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico e, em seguida, ligando-os com linhas desenhadas seguindo as suas respectivas curvaturas. Considerando o comprimento total dos espécimes histológicos foi medido 2 mm da margem direita e esquerda em direção ao centro, a fim de determinar as margens do defeito cirúrgico original. A área de osso neoformado (AON) foi delineada dentro dos limites da área total;
- b) A AT foi medida em μm^2 e considerada 100% da área a ser analisada. A AON foi também medida em μm^2 e calculada como uma porcentagem da AT (FIGURA 10).

Figura 10 – Área de neoformação óssea (AON) delimitada em azul dentro dos limites da área total (AT).



Fonte: Do autor.

Os dados percentuais obtidos de cada animal foram transformados em sua raiz quadrada. A significância das diferenças entre os grupos e os períodos foram determinados pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey à 5% de significância quando a ANOVA sugeriu uma diferença significativa ($p < 0,05$). Para isso, o programa Statgraphics versão 7.0 (Ghaphic Software Systems, Inc.) foi utilizado.

5 RESULTADOS

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

5.1 ANÁLISE TOMOGRÁFICA E ESTATÍSTICA

As figuras 11 e 12 representam as calvárias dos diferentes grupos experimentais com 2 e 15 mm de espessura respectivamente, nos períodos de 4 e 8 semanas pós-operatórias. E os resultados encontram-se expostos nas tabelas 1 a 9 e nas figuras 13 a 15.

Foram calculadas as médias percentuais da densidade tomográfica para todos os grupos e períodos.

A porcentagem de densidade de cada espécime segundo os grupos, períodos experimentais e cortes tomográficos são apresentadas no final do presente trabalho (APÊNDICE A), onde se pode observar que os espécimes com maior porcentagem de densidade pertencem aos grupos BO e BODOX de 8 semanas.

A tabela 3 e figura 13 mostram que a densidade tomográfica na região do defeito foi maior no grupo BO (47,8183%), seguido pelos grupos BODOX (46,5909%), DOX (41,3580%), NAT (31,3870%) e CS (31,0045%) respectivamente. Após a submissão destes dados à ANOVA, foi observada diferença estatística entre os dados ($\alpha=0,000$) (TABELA 1). Assim sendo, o teste de Tukey a 5% de significância foi aplicado. Diferença estatística significativa foi verificada entre os grupos BO (47,8183%), BODOX (46,5909%) e DOX (41,3580%) em relação aos grupos NAT (31,3870%) e CS (31,0045%). Porém, entre os grupos BO (47,8183%) e BODOX (46,5909%); BODOX (46,5909%) e DOX (41,3580%); e, NAT (31,3870%) e CS (31,0045%) não foram apontados diferenças estatísticas significantes.

E ao verificarmos as médias percentuais da densidade tomográfica em relação aos períodos experimentais, observa-se que a maior média percentual de densidade no período de 4 semanas esteve relacionada ao grupo BO (44,6884%),

enquanto no de 8 semanas, aos grupos BO e BODOX (50,9481% e 55,4291% respectivamente) (TABELA 5). A análise de variância (ANOVA) destes dados mostrou diferença estatística ($\alpha=0,000$) (TABELA 4). Foi então realizado o teste de Tukey a 5% de significância (TABELA 6).

No período experimental de 4 semanas, numericamente a maior média percentual de densidade foi notada no grupo BO (44,6884%). Os resultados mostraram neste período, diferenças estatísticas na densidade somente entre os grupos BO em relação aos grupos NAT (29,6752%) e CS (29,5768%).

Por outro lado, no período experimental de 8 semanas, o grupo BODOX (55,4291%) apresentou a maior média percentual de densidade, sendo esta significativamente maior que a média de densidade observada nos grupos DOX, NAT e CS (44,3657%, 33,0988% e 32,4323% respectivamente). Os grupos BO e DOX (50,9481% e 44,3657% respectivamente) também apresentaram maior média de densidade tomográfica, estatisticamente significativa, que os grupos NAT e CS (33,0988% e 32,4323% respectivamente). Além disso, os grupos BODOX e BO (55,4291% e 50,9481% respectivamente) se apresentaram estatisticamente semelhantes, bem como BO e DOX (50,9481% e 44,3657% respectivamente); e, NAT e CS (33,0988% e 32,4323% respectivamente) (TABELA 6 e FIGURA 14).

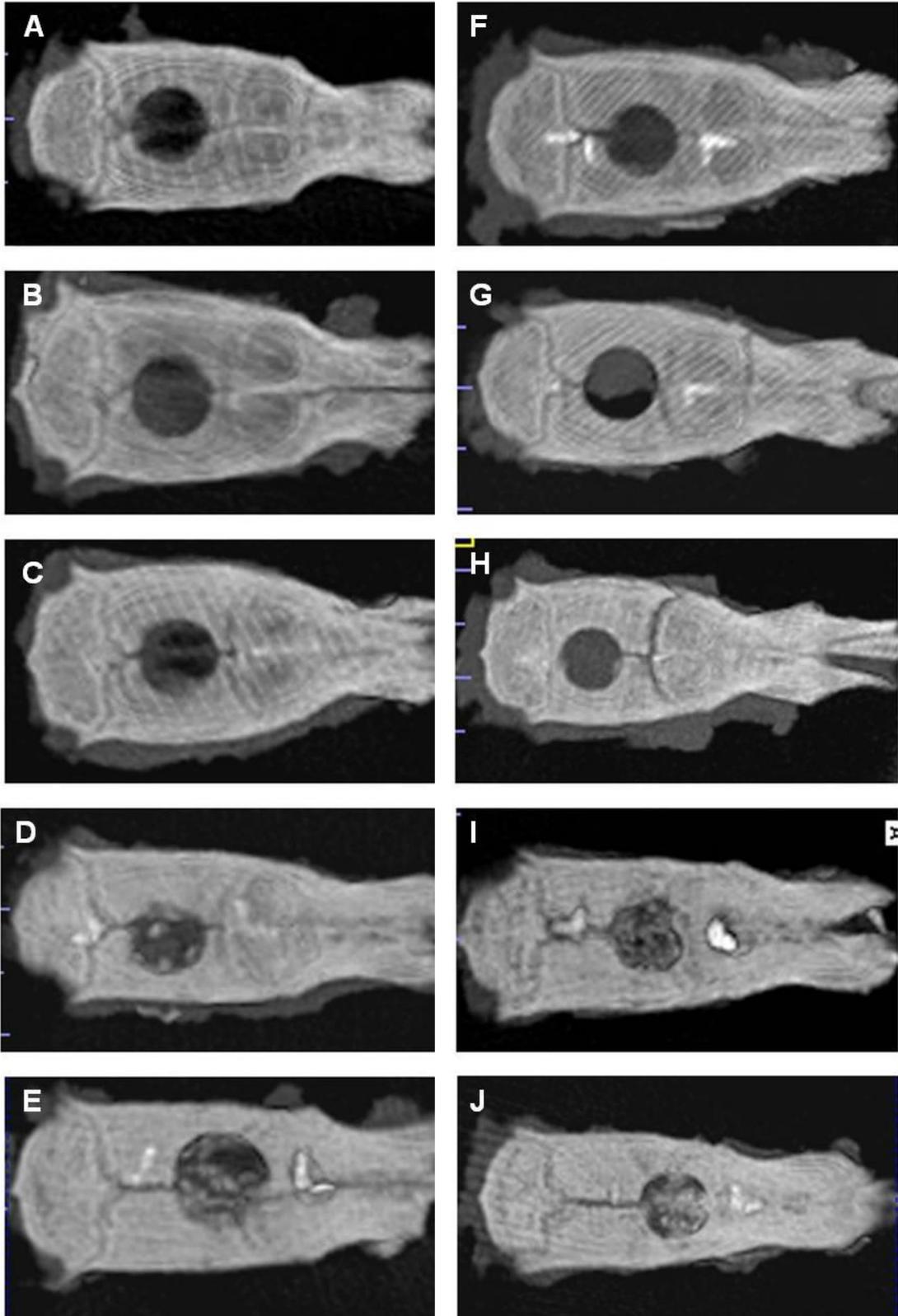
Esses dados, comparando os diferentes períodos entre si, apontaram diferenças estatísticas tanto nos períodos mais precoces (4 semanas) quanto nos períodos mais tardios (8 semanas) e com modificações interessantes entre eles. Além disso, quando comparado o mesmo grupo em períodos diferentes (4 e 8 semanas), diferenças estatísticas são notadas apenas em BODOX (37,7528% e 55,4291% respectivamente). Nos grupos BO, DOX, NAT e CS (44,6884% e 50,9481%; 38,3504% e 44,3657%; 29,6752% e 33,0988%; 29,5768 e 32,4323% respectivamente) diferenças estatísticas não foram apresentadas.

A densidade dos cortes tomográficos também foi avaliada. A tabela 9 representa as médias dos cortes segundo os grupos experimentais, sendo que os maiores valores de densidade foram observados nos cortes axiais de todos os grupos. Nesta mesma tabela, é possível observar que o maior valor de densidade pertence ao corte axial do grupo BODOX (61,0470%), seguido pelos grupos BO, DOX, NAT e CS (60,0929%, 57,1494%, 49,8626% e 44,2675% respectivamente). Nos cortes sagital e coronal o grupo BO apresentou os maiores valores de densidade (44,6816% e 38,6803% respectivamente), seguido pelos grupos BODOX,

DOX, CS e NAT (41,7018% e 33,2470%; 25,9817% e 19,5831%; 37,0239% e 33,6777; 19,5831% e 22,7644% respectivamente).

Esses dados foram submetidos à ANOVA e apresentaram valor menor que 0,05 (TABELA 7). O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi então aplicado e diferenças estatísticas foram identificadas. No corte axial, entre os grupos BODOX, BO e DOX (61,0470%, 60,0929% e 57,1494% respectivamente) em relação aos grupos NAT e CS (49,8626% e 44,2675% respectivamente); no corte sagital, entre os grupos BODOX, BO e DOX (41,7018%, 44,6816% e 33,2470% respectivamente) em relação aos grupos NAT e CS (24,7155% e 25,9817% respectivamente), e entre os grupos BODOX e BO (41,7018% e 44,6816% respectivamente) em relação ao grupo DOX (33,2470%); e no corte coronal, os grupos BODOX, BO e DOX (37,0239%, 38,6803% e 33,6777% respectivamente) apresentaram densidade estatisticamente maior que os grupos NAT e CS (19,5831% e 22,7644% respectivamente). Mas, pode-se também observar que não apresentou diferenças estatísticas, no corte axial, os grupos BODOX, BO e DOX (61,0470%, 60,0929% e 57,1494% respectivamente), assim como NAT e CS (49,8626% e 44,2675% respectivamente); no corte sagital, entre os grupos BODOX e BO (41,7018% e 44,6816% respectivamente) e entre os grupos NAT e CS (24,7155% e 25,9817% respectivamente); e no corte coronal, entre os grupos BODOX, BO e DOX (37,0239%, 38,6803% e 33,6777% respectivamente) e entre NAT e CS (19,5831% e 22,7644% respectivamente) (TABELA 8 e FIGURA 15).

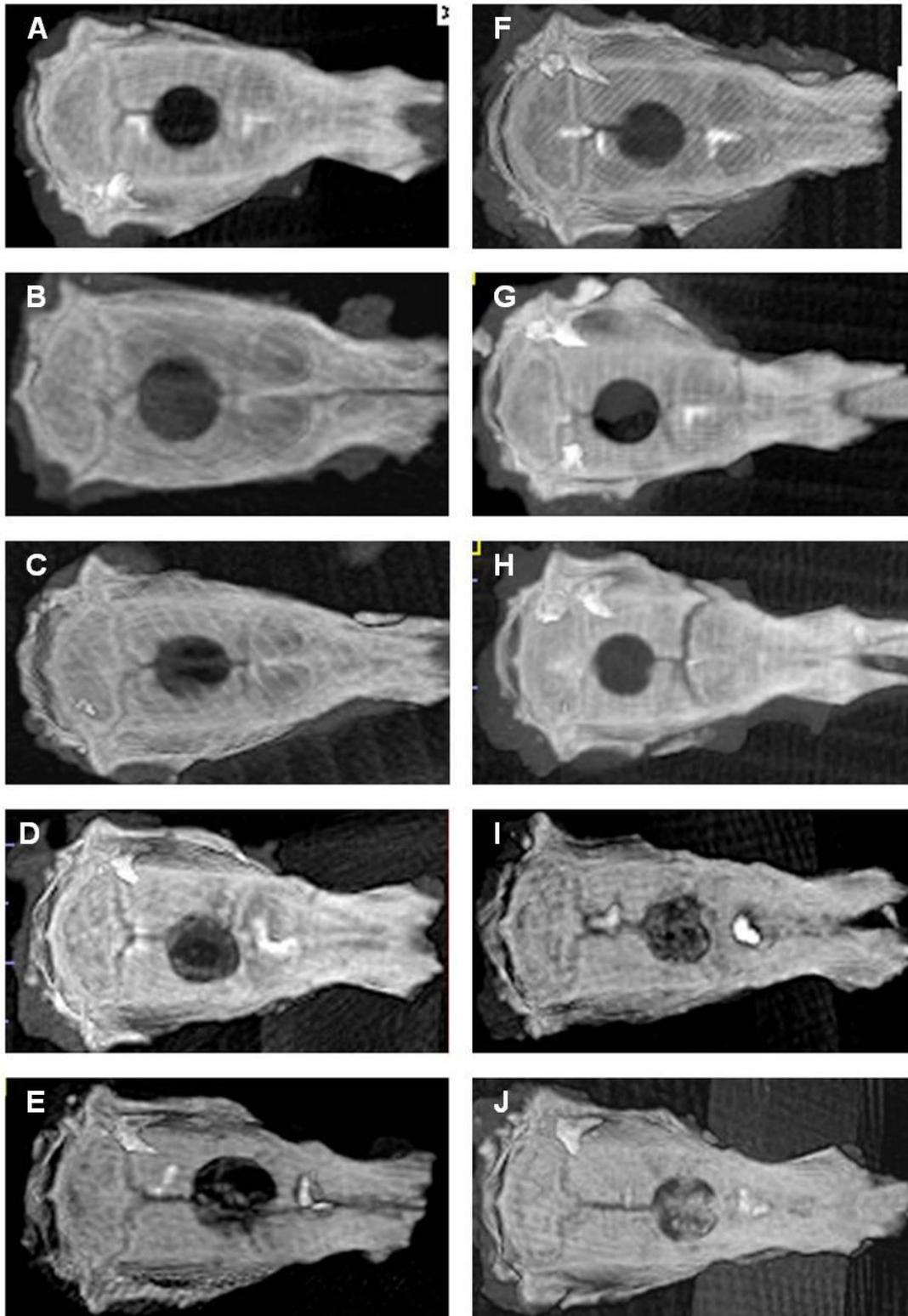
Figura 11 – Imagem tomográfica do defeito ósseo: Corte axial de 2mm de espessura.



Fonte: Do autor.

Notas: (A e F) CS de 4 e 8 semanas respectivamente; (B e G) NAT de 4 e 8 semanas respectivamente; (C e H) DOX de 4 e 8 semanas respectivamente; (D e I) BO de 4 e 8 semanas respectivamente; (E e J) BODOX de 4 e 8 semanas respectivamente.

Figura 12 – Imagem tomográfica do defeito ósseo: Corte axial de 15mm de espessura.



Fonte: Do autor.

Notas: (A e F) CS de 4 e 8 semanas respectivamente; (B e G) NAT de 4 e 8 semanas respectivamente; (C e H) DOX de 4 e 8 semanas respectivamente; (D e I) BO de 4 e 8 semanas respectivamente; (E e J) BODOX de 4 e 8 semanas respectivamente.

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Grupos	4	18779,9530	4694,9883	29,0790	0.0000
Resíduo	355	57316,9353	161,45615		
Total corrigido	359	76096,8880			

Fonte: Do autor.

Notas: *G.L.: graus de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 2 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.

Nível	N	\bar{x}DDC	Erro padrão
Grande Média	360	39,6318	0,6696
Grupos			
CS	72	31,0046	1,4974
NAT	72	31,3870	1,4974
DOX	72	41,3580	1,4974
BO	72	47,8183	1,4974
BODOX	72	46,5909	1,4974

Fonte: Do autor.

Notas: *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxíclicina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxíclicina.

Tabela 3 - Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC segundo os grupos experimentais.

Grupos	N	\bar{x}DDC	Homogeneidade
CS	72	31,0046	A
NAT	72	31,3870	A
DOX	72	41,3580	B
BO	72	47,8183	C
BODOX	72	46,5909	BC

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxíclicina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxíclicina.

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	A
Histometria X Períodos	9	26118,4240	2902,0471	20,3230	0,0000
Resíduo	350	49978,4640	142,7956		
Total corrigido	359	76096,8880			

Fonte: Do autor.

Notas: *G.L.: graus de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 5 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.

Períodos	N	\bar{x}DDC	Erro padrão
Grande média	360	39,6318	0,6298
Períodos			
CS 4sem.	72	29,5768	1,9916
CS 8sem.	72	32,4323	1,9916
NAT 4sem.	72	29,6752	1,9916
NAT 8sem.	72	33,0988	1,9916
DOX 4sem.	72	38,3504	1,9916
DOX 8sem.	72	44,3657	1,9916
BO 4sem.	72	44,6884	1,9916
BO 8sem.	72	50,9481	1,9916
BODOX 4sem.	72	37,7528	1,9916
BODOX 8sem.	72	55,4291	1,9916

Fonte: Do autor.

Notas: *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; *DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; *BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Tabela 6 – Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC segundo os períodos experimentais.

Períodos	N	\bar{x}DDC	Homogeneidade
CS 4sem.	72	29,5768	A
CS 8sem.	72	32,4323	A
NAT 4sem.	72	29,6752	A
NAT 8sem.	72	33,0988	A
DOX 4sem.	72	38,3504	AB
DOX 8sem.	72	44,3657	BC
BO 4sem.	72	44,6884	BC
BO 8sem.	72	50,9481	CD
BODOX 4sem.	72	37,7528	AB
BODOX 8sem.	72	55,4291	D

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Tabela 7 – Análise de variância (ANOVA) das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Períodos	14	60462,7000	4318,7643	95,3020	0,0000
Resíduo	345	15634,1880	45,31640		
Total corrigido	359	76096,8880			

Fonte: Do autor.

Notas: *G.L.: graus de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 8 – Teste Tukey a 5% de significância das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.

Cortes tomográficos	Grupos	N	\bar{x}DDC	Homogeneidade
CAx	CS	24	44,2675	DE
CSa	CS	24	25,9817	A
CCo	CS	24	22,7644	A
CAx	NAT	24	49,8626	E
CSa	NAT	24	24,7155	A
CCo	NAT	24	19,5831	A
CAx	DOX	24	57,1494	F
CSa	DOX	24	33,2470	B
CCo	DOX	24	33,6777	B
CAx	BO	24	60,0929	F
CSa	BO	24	44,6816	DE
CCo	BO	24	38,6803	BCD
CAx	BODOX	24	61,0470	F
CSa	BODOX	24	41,7018	CD
CCo	BODOX	24	37,0239	BC

Fonte: Do autor

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas.*CAx: corte axial; *CSa: corte sagital; *CCo: corte coronal; *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

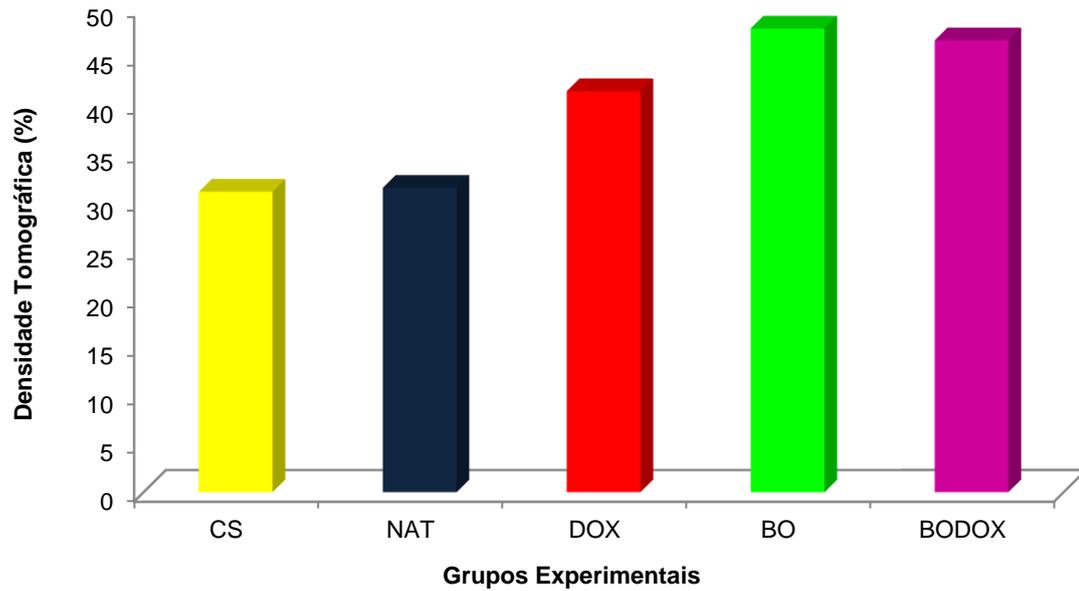
Tabela 9 - Médias percentuais e erro padrão das \bar{x} DDC dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.

Cortes tomográficos	Grupos	N	\bar{x}DDC	Erro padrão
Grande média		360	39,6318	0,3547
CAx	CS	24	44,2675	1,3741
CSa	CS	24	25,9817	1,3741
CCo	CS	24	22,7644	1,3741
CAx	NAT	24	49,8626	1,3741
CSa	NAT	24	24,7155	1,3741
CCo	NAT	24	19,5831	1,3741
CAx	DOX	24	57,1494	1,3741
CSa	DOX	24	33,2470	1,3741
CCo	DOX	24	33,6777	1,3741
CAx	BO	24	60,0929	1,3741
CSa	BO	24	44,6816	1,3741
CCo	BO	24	38,6803	1,3741
CAx	BODOX	24	61,0470	1,3741
CSa	BODOX	24	41,7018	1,3741
CCo	BODOX	24	37,0239	1,3741

Fonte: Do autor.

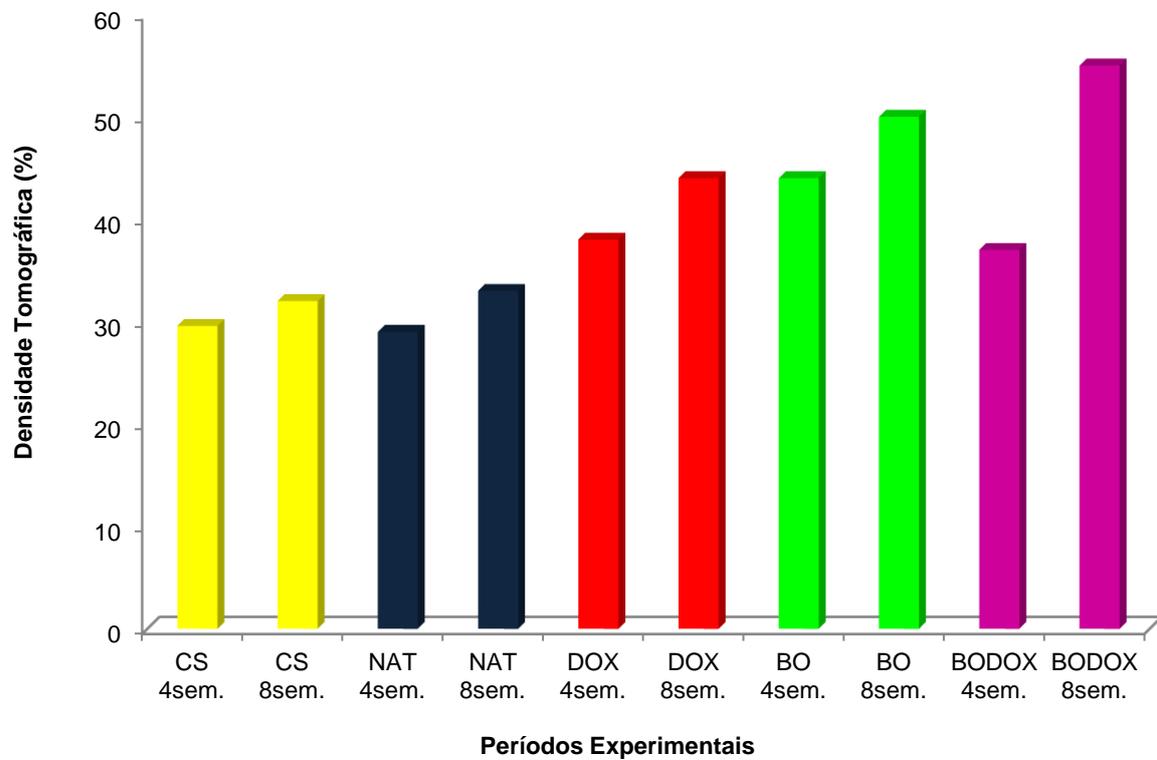
Notas: *CAx: corte axial; *CSa: corte sagital; *CCo: corte coronal; *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Figura 13 - Gráfico de colunas das $\bar{x}DDC$ segundo os grupos experimentais.



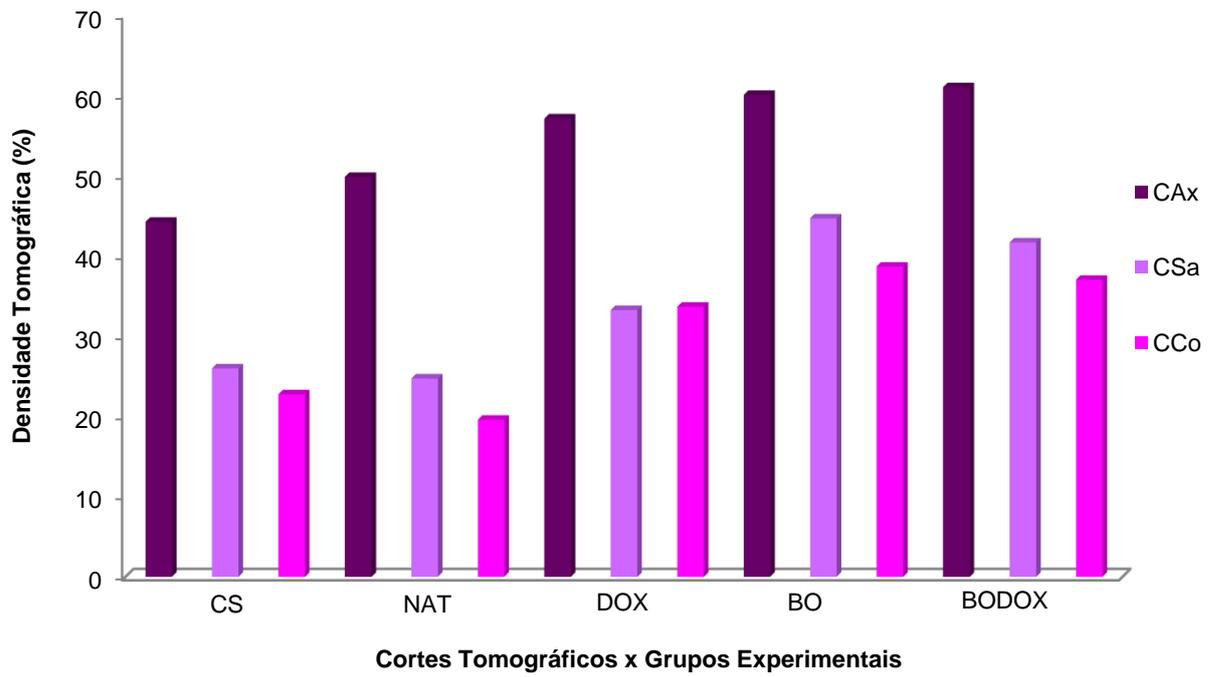
Fonte: Do autor

Figura 14 - Gráfico de colunas das $\bar{x}DDC$ segundo os períodos experimentais.



Fonte: Do autor

Figura 15 - Gráfico de colunas das $\bar{x}DDC$ dos cortes tomográficos segundo os grupos experimentais.



Fonte: Do autor

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 4 SEMANAS

5.2.1 Grupo CS

Observou-se em todos os espécimes a presença de discreto tecido ósseo imaturo restrito às margens do defeito cirúrgico. O padrão de neoformação óssea progrediu de maneira centrípeta, ou seja, das margens do defeito para o seu centro. Foi predominante a presença de tecido conjuntivo com um grande número de fibroblastos e poucas fibras colágenas, o qual apresentou espessura drasticamente menor que a da calvária original. Infiltrado inflamatório foi observado em alguns pontos. Nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico (FIGURA 16 e 26).

5.2.2 Grupo NAT

Apesar do padrão de neoformação óssea se apresentar de maneira bastante semelhante ao do grupo CS, foi observada neoformação óssea ligeiramente maior. O tecido conjuntivo apresentou-se desenvolvido, com maior evidência de fibras e em alguns pontos observou-se a presença de infiltrado inflamatório. A espessura do tecido de preenchimento se mostrou menor que a espessura da calvária. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito (FIGURA 18 e 26).

5.2.3 Grupo DOX

O padrão de neoformação óssea apresentou-se semelhante aos grupos CS e NAT, ou seja, de maneira centrípeta. No entanto, apesar de nenhum espécime apresentar fechamento completo do defeito, a formação óssea, embora ainda

próxima às margens, foi maior e tendeu a acompanhar a espessura da calvária original, além de algumas trabéculas ósseas isoladas terem sido observadas ao longo do defeito. O tecido conjuntivo mostrou-se com fibras colágenas bem organizadas e poucos fibroblastos. (FIGURA 20 e 26).

5.2.4 Grupo BO

Osso neoformado bem desenvolvido se apresentou restrito às margens do defeito. A espessura da calvária foi mantida, uma vez que as partículas de Bio-Oss® estavam distribuídas por todo o defeito. Foi observado em alguns pontos tecido conjuntivo rico em fibroblastos, frouxo e desorganizado, e em outros, características de maturidade, bem organizado com presença de matriz osteóide e osteoblastos. A maioria das partículas apresentava-se fissurada e com invaginação de tecido conjuntivo. Pontos esparsos de infiltrado inflamatório também estavam presentes. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito (FIGURA 22 e 26).

5.2.5 Grupo BODOX

Neoformação óssea bem desenvolvida foi observada em todos os espécimes. A espessura do novo osso e do tecido conjuntivo tendeu a acompanhar a espessura da calvária original. As partículas de Bio-Oss encontravam-se distribuídas ao longo do defeito, porém em menor quantidade que o grupo BO do mesmo período. Elas estavam circundadas por tecido conjuntivo maduro e muitas fibras colágenas, associados à grande quantidade de matriz osteóide. O aspecto fissurado das partículas e presença de centros escavados ao redor das mesmas com invaginação de tecido conjuntivo foi percebido em várias regiões. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito (FIGURA 24 e 26).

5.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA QUALITATIVA: 8 SEMANAS

5.3.1 Grupo CS

A neoformação óssea permaneceu restrita às margens do defeito, porém, em maior quantidade. Quanto ao tecido conjuntivo presente ao longo do defeito, apresentou-se com maior número de fibras colágenas e menor número de fibroblastos quando comparado a este mesmo grupo no período de 4 semanas, mas sua espessura permaneceu bem menor que a espessura da calvária original. Nenhum dos espécimes apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico (FIGURA 17 e 27).

5.3.2 Grupo NAT

Próximo às margens do defeito foi observado neoformação óssea. O tecido ósseo neoformado também apresentou características de imaturidade, uma vez que os osteócitos apresentavam-se dispostos aleatoriamente, sem nenhum padrão de organização. Além disso, a matriz óssea é heterogênea e aparece manchada com estrias basófilas delgadas. Tecido conjuntivo denso, organizado, com numerosas fibras colágenas apresentava-se distribuídas paralelamente ao longo do defeito e com espessura ligeiramente menor que o da calvária original. O fechamento completo do defeito não foi observado em nenhum espécime (FIGURA 19 e 27).

5.3.3 Grupo DOX

Os espécimes apresentaram neoformação óssea que se estendeu além dos limites das margens do defeito. Além disso, este tecido apresentou-se bastante maduro, com organização dos osteócitos, os quais ocupavam camadas bastante

distintas. O tecido conjuntivo que preenchia a pequena área em que o osso ainda não havia se formado, apresentava-se denso e organizado, repleto de fibras colágenas e pouquíssimos fibroblastos. Além disso, ambos os tecidos, ósseo e conjuntivo, tendiam a manter a espessura da calvária original. A progressão de neoformação óssea propiciou o quase fechamento do defeito cirúrgico na maioria dos espécimes (FIGURA 21 e 27)

5.3.4 Grupo BO

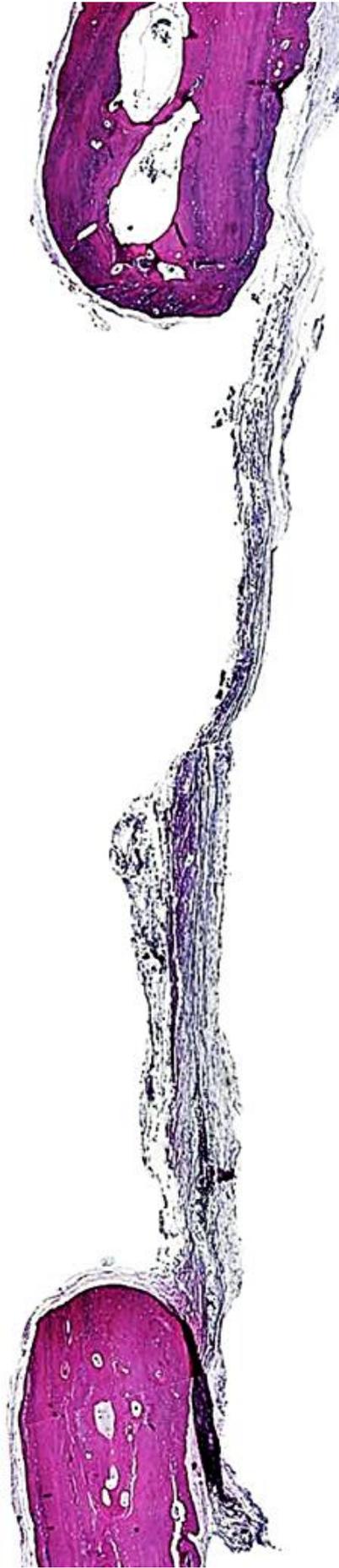
Apesar de a maior neoformação óssea localizar-se próximo às margens, de ambos os lados do defeito, e estendendo-se em direção ao seu centro, em vários pontos foram observadas trabéculas ósseas isoladas. As partículas de Bio-Oss apresentaram invaginação de tecido conjuntivo em seus centros escavados e fissuras, assim como no período correspondente às 4 semanas, no entanto, o tecido conjuntivo apresentou-se mais denso, organizado e com presença de matriz osteóide. A neoformação óssea também se apresentou em maior quantidade, ao redor, no interior das partículas e próximo às margens. Houve uma tendência de manutenção da espessura da calvária tanto no osso neoformado como no tecido conjuntivo circunvizinho. Mas nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito cirúrgico original (FIGURA 23 e 27).

5.3.5 Grupo BODOX

O novo osso foi depositado das margens do defeito em direção ao seu centro, assim como todos os demais grupos e períodos. Todos os espécimes mantiveram a espessura da calvária original no tecido ósseo neoformado e tecido conjuntivo. As partículas de Bio-Oss encontraram-se dispersas ao longo do defeito, sendo encontradas em menor número e tamanho quando comparadas ao grupo BO no mesmo período e ao grupo BODOX no período de 4 semanas. As partículas remanescentes apresentavam-se fissuradas e circundadas por centros escavados

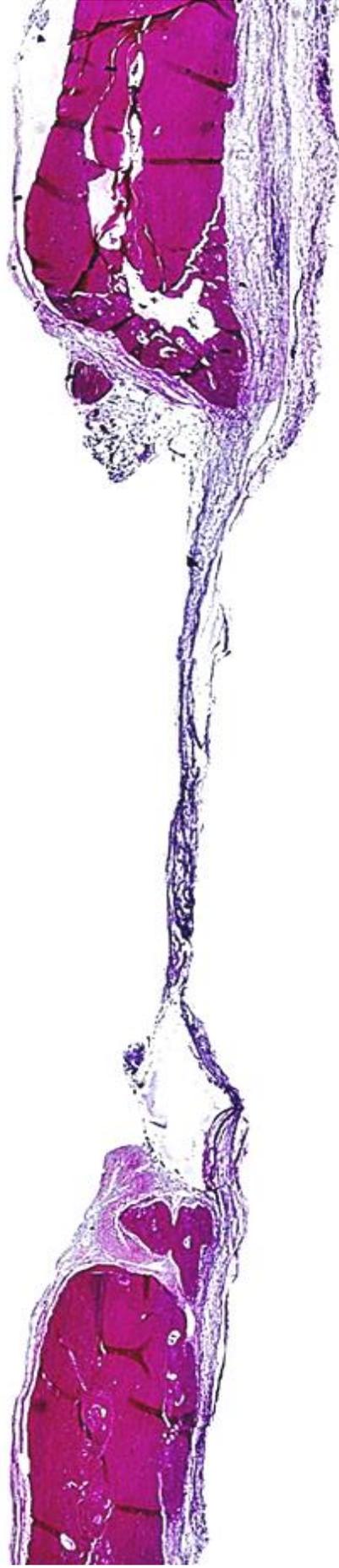
com tecido conjuntivo bem organizado e matriz osteóide em abundância. Em diversos pontos do defeito já havia ausência das partículas de Bio-Oss que deram lugar a formações ósseas isoladas. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito ósseo (FIGURA 25 e 27).

Figura 16 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CS no período experimental de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 17 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo CS no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 18 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo NAT no período experimental de 4 semanas.



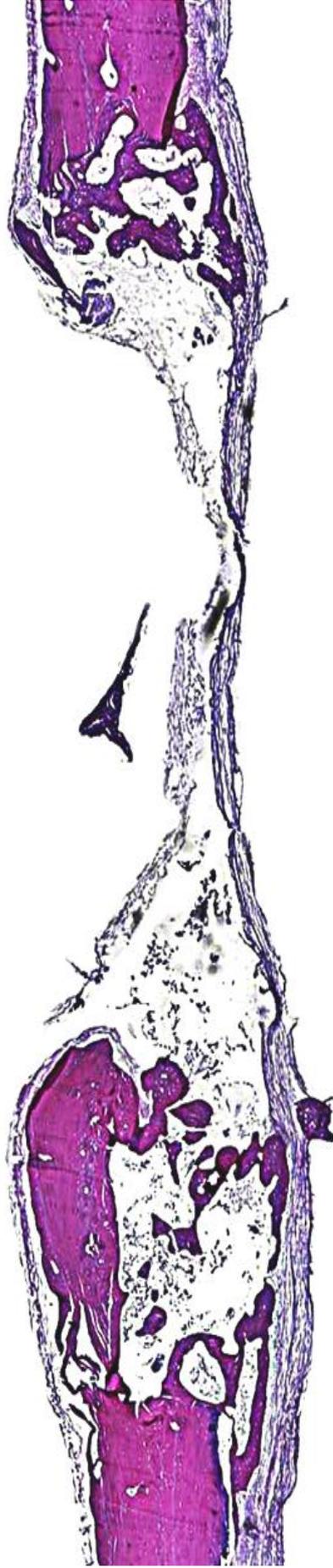
Fonte: Do autor.

Figura 19 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo NAT no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 20 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo DOX no período experimental de 4 semanas.



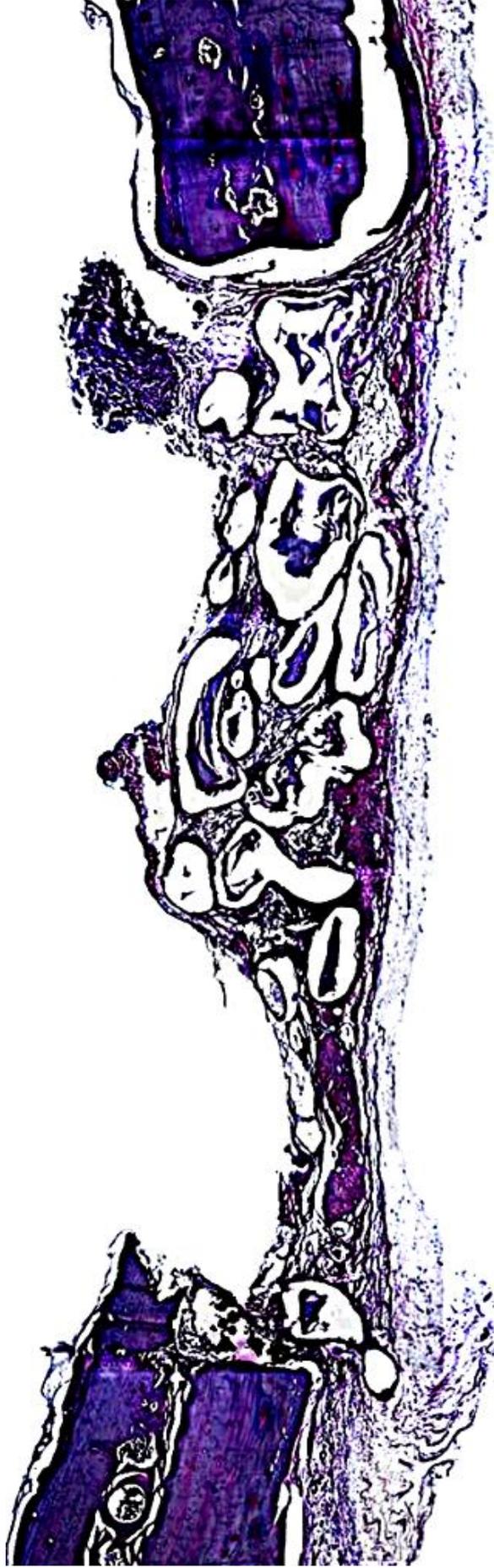
Fonte: Do autor.

Figura 21 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo DOX no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 22 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO no período experimental de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 23 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Figura 24 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO DOX no período experimental de 4 semanas.



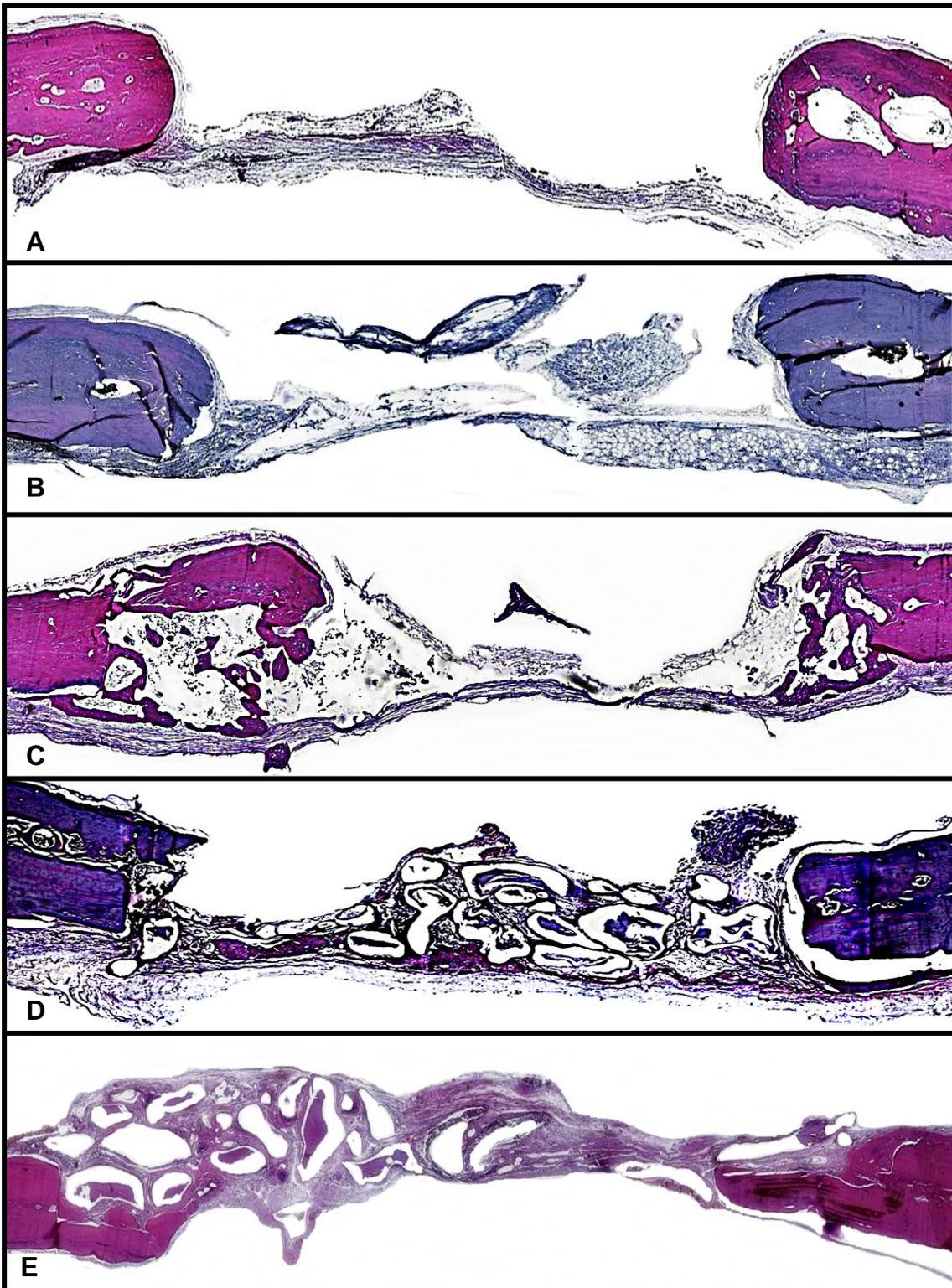
Fonte: Do autor.

Figura 25 – Visão panorâmica do defeito ósseo do grupo BO DOX no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

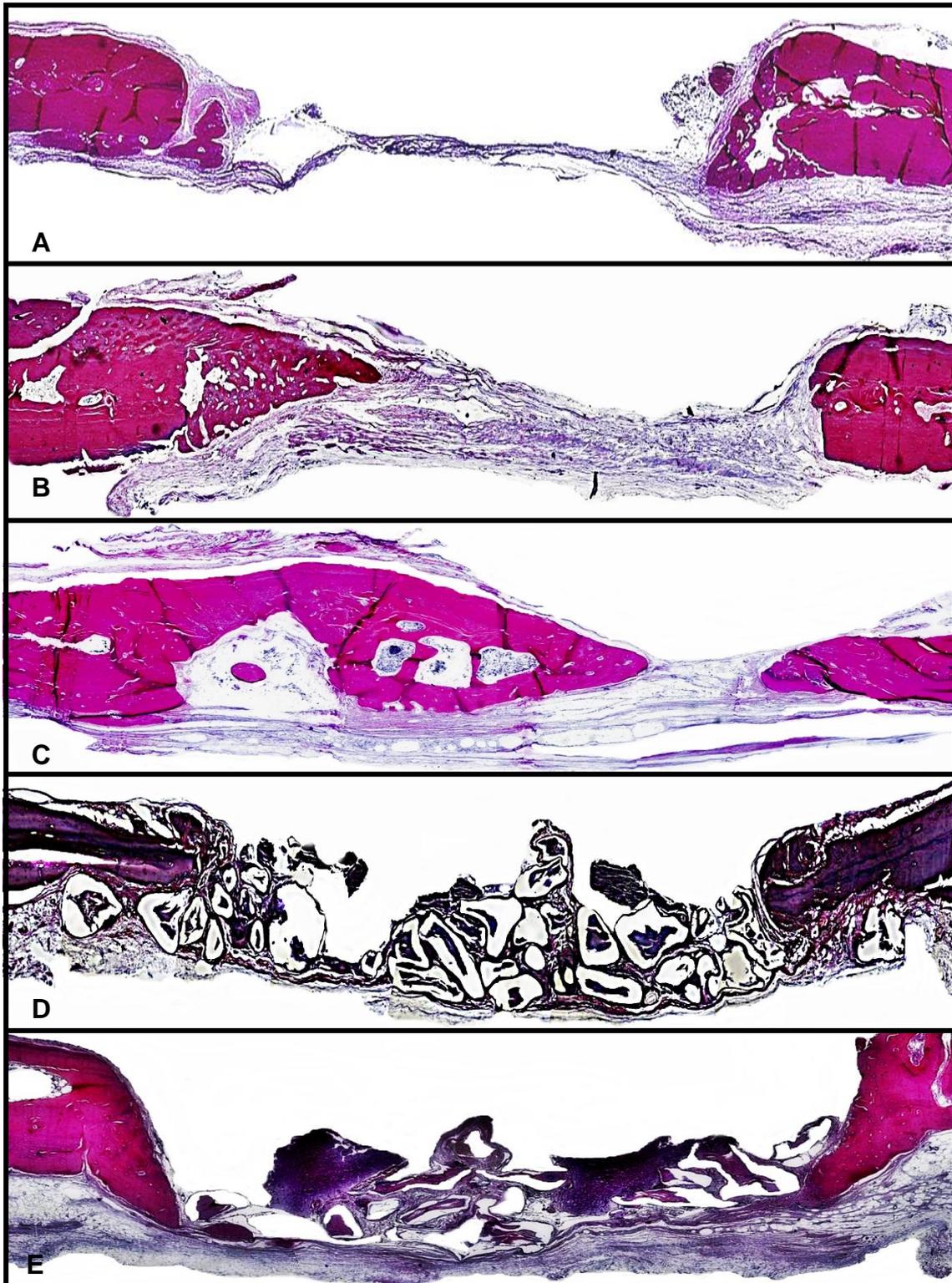
Figura 26 - Visão panorâmica do defeito ósseo no período experimental de 4 semanas.



Fonte: Do autor.

Notas: *(A) Grupo CS, (B) NAT, (C) DOX, (D) BO e (E) BODOX.

Figura 27 - Visão panorâmica do defeito ósseo no período experimental de 8 semanas.



Fonte: Do autor.

Notas: *(A) Grupo CS, (B) NAT, (C) DOX, (D) BO e (E) BODOX.

5.4 ANÁLISE HISTOMÉTRICA E ESTATÍSTICA

Foram calculadas as médias percentuais para todos os grupos e períodos.

A porcentagem de formação óssea de cada espécime segundo os períodos experimentais são apresentadas no final do presente trabalho (APÊNDICE B), bem como suas respectivas ATs e AONs, onde se pode observar que os espécimes com maior neoformação óssea pertencem ao grupo DOX e BODOX de 8 semanas.

Ao verificarmos as médias percentuais da histometria da AON em relação aos períodos experimentais, observa-se que a maior média percentual de formação óssea no período de 4 semanas foi observada no grupo BODOX (38,2689%), enquanto no de 8 semanas, no grupo DOX (61,1090%) (TABELA 12).

Após a submissão das raízes quadradas das médias percentuais da AON dos diferentes grupos experimentais à análise de variância (ANOVA), foi observada diferença estatística entre os dados ($\alpha=0,0192$) (TABELA 10). Assim sendo, o teste Tukey a 5% de significância foi aplicado. Pode-se observar na tabela 11 que a formação óssea foi maior no grupo DOX (38,7875%), seguido pelos grupos BODOX (33,1345%), BO (23,8915%), NAT (22,5271%) e CS (14,1250%) respectivamente.

Ainda considerando os grupos experimentais, foi observada diferença estatística significativa ($p<0,05$) na média percentual de neoformação óssea do grupo DOX (38,7875%) e BODOX (33,1345%) em relação ao grupo CS (14,1250%). Porém, entre os grupos DOX (38,7875%), BODOX (33,1345%), BO (23,8915%) e NAT (22,5271%) não foram apontadas diferenças estatísticas significantes ($p>0,05$), apesar dos grupos DOX e BODOX apresentarem as maiores médias percentuais de neoformação óssea. Semelhantemente, os grupos BO (23,8915%), NAT (22,5271%) e CS (14,1250%) também não apresentaram diferenças estatísticas (TABELA 11 e FIGURA 28).

Levando-se em consideração os períodos experimentais, a análise de variância (ANOVA) mostrou diferença estatística entre os dados ($\alpha=0,000$) (TABELA 13). Foi então realizado o teste Tukey a 5% de significância, (TABELA 14).

No período experimental de 4 semanas, numericamente a maior média percentual de novo osso foi notada no grupo BODOX (28,0001%). Os resultados já mostraram neste período, diferenças estatísticas na neoformação entre o grupo

DOX (16,4661%) em relação ao CS (5,1351%), além do BODOX (28,0001%) em relação ao NAT e CS (10,4497% e 5,1351% respectivamente). Enquanto DOX, BO e BODOX (16,4661%, 15,2869% e 28,0001% respectivamente); e, DOX, BO e NAT (16,4661%, 15,2869%, 10,4497% respectivamente) se apresentaram estatisticamente semelhantes.

Por outro lado, no período experimental de 8 semanas, o grupo DOX (61,1090%) apresentou a maior média percentual de novo osso, sendo esta significativamente maior que a média de formação óssea observada nos grupos BO, NAT e CS (32,4961%, 34,6146% e 23,1149% respectivamente). Além disso, os grupos DOX e BODOX (61,1090% e 38,2689% respectivamente) se apresentaram estatisticamente semelhantes, bem como BO, NAT e CS (32,4961%, 34,6146% e 23,1149% respectivamente) (TABELA 15 e FIGURA 29).

Esses dados, comparando os diferentes períodos entre si, apontaram diferenças estatísticas tanto nos períodos mais precoces (4 semanas) quanto nos períodos mais tardios (8 semanas), e com modificações interessantes entre eles. Além disso, quando comparado o mesmo grupo em períodos diferentes (4 e 8 semanas), diferenças estatísticas são notadas em DOX (16,4661% e 61,1090% respectivamente), NAT (10,4497% e 34,6146% respectivamente) e CS (5,1351% e 23,1149% respectivamente); no entanto, nos grupos BO e BODOX (16,4661%, 32,4961% e 28,0001%, 38,2689% respectivamente) diferenças estatísticas não foram apresentadas.

Tabela 10 – Análise de variância (ANOVA) para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Grupos	4	30,7402	7,6850	3,3880	0,0192
Resíduo	35	79,3918	2,2683		
Total corrigido	9	110,1320			

Fonte: Do autor.

Notas: *G.L.: graus de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 11 - Teste Tukey a 5% de significância para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.

Grupos	N	√Média percentual da AON	Homogeneidade
CS	8	3,4861	A
NAT	8	4,4596	AB
DOX	8	5,8962	B
BO	8	4,7076	AB
BODOX	8	5,7225	B

Fonte: Do autor.

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Tabela 12 - Médias percentuais e erro padrão dos dados da histometria de AON segundo os grupos experimentais.

Nível	N	Média	Erro padrão
Grande Média	40	26,4931	1,3273
Grupos			
CS	8	14,1250	5,5796
NAT	8	22,5271	5,5796
DOX	8	38,7875	5,5796
BO	8	23,8915	5,5796
BODOX	8	33,1345	5,5796

Fonte: Do autor.

Notas: *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Tabela 13 – Análise de variância (ANOVA) para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais.

Causas da variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de f	α
Histometria X Períodos	9	93,9877	10,4430	19,4060	0,0000
Resíduo	30	16,1443	0,5381		
Total corrigido	39	110,1320			

Fonte: Do autor.

Notas: *G.L.: graus de liberdade *S.Q.: soma dos quadrados *Q.M.: média dos quadrados.

Tabela 14 – Teste Tukey a 5% de significância para as raízes quadradas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais.

Períodos	N	$\sqrt{\text{Média percentual da AON}}$	Homogeneidade
CS 4sem.	4	2,2559	A
CS 8sem.	4	4,7364	BCD
NAT 4sem.	4	3,0618	AB
NAT 8sem.	4	5,8675	D
DOX 4sem.	4	4,0433	BC
DOX 8sem.	4	7,7492	E
BO 4sem.	4	3,9075	ABC
BO 8sem.	4	5,6676	CD
BODOX 4sem.	4	5,2688	CD
BODOX 8sem.	4	6,1762	DE

Fonte: Do autor

Notas: Letras diferentes denotam diferenças estatísticas. *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

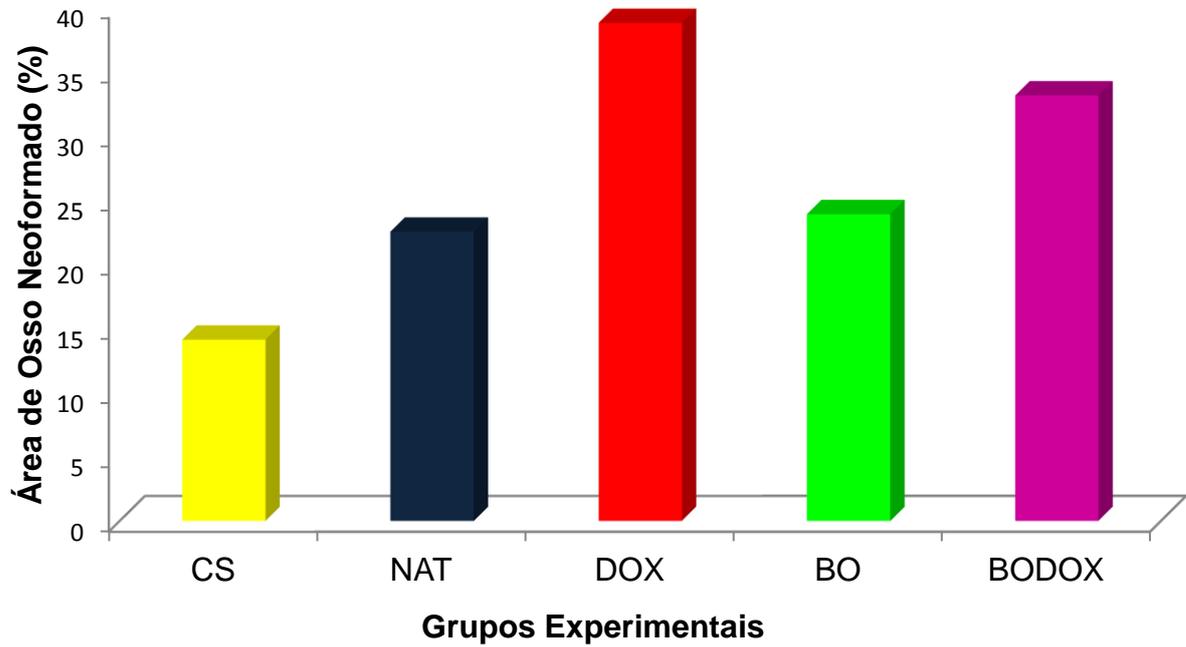
Tabela 15 - Médias percentuais e erro padrão dos dados da histometria da AON segundo os períodos experimentais.

Períodos	N	Média	Erro padrão
Grande Média	40	26.4941	1.3273
Períodos			
CS 4sem.	4	5,1351	4,1974
CS 8sem.	4	23,1149	4,1974
NAT 4sem.	4	10,4497	4,1974
NAT 8sem.	4	34,6146	4,1974
DOX 4sem.	4	16,4661	4,1974
DOX 8sem.	4	61,1090	4,1974
BO 4sem.	4	15,2869	4,1974
BO 8sem.	4	32,4961	4,1974
BODOX 4sem.	4	28,0001	4,1974
BODOX 8sem.	4	38,2689	4,1974

Fonte: Do autor.

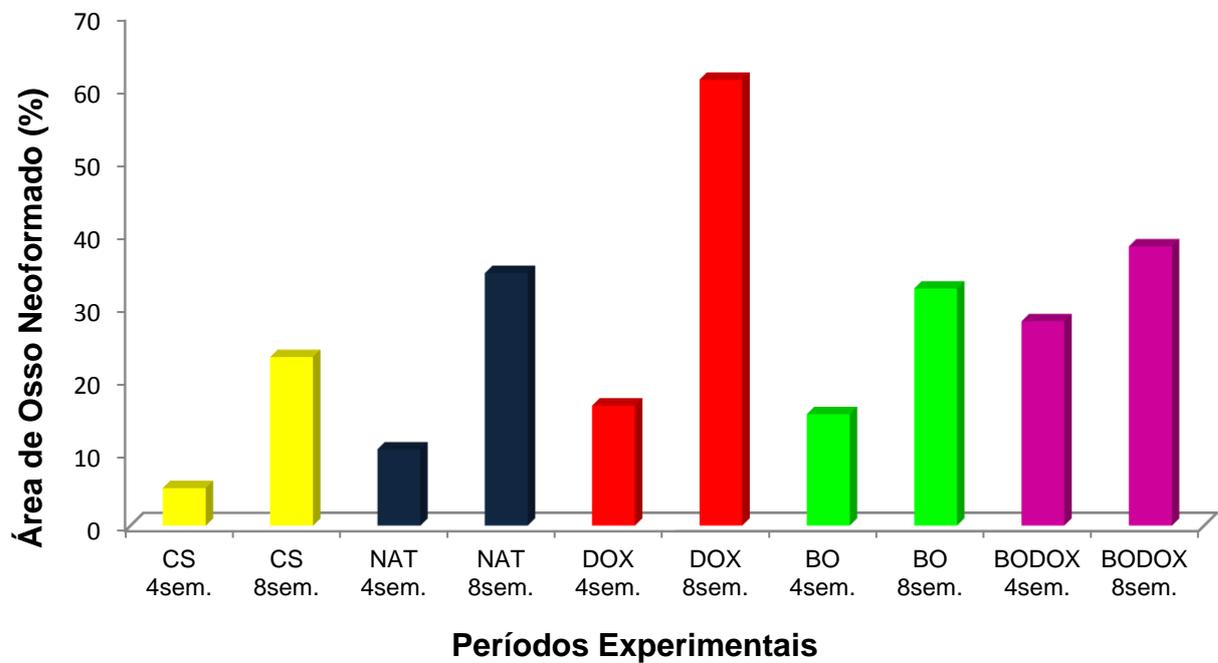
Notas: *CS: Grupo Coágulo Sanguíneo; *NAT: Grupo Natrosol; * DOX: Grupo Doxiciclina; *BO: Grupo Bio-Oss; * BODOX: Grupo Bio-Oss associado ao gel de Doxiciclina.

Figura 28 - Gráfico de colunas das médias percentuais da AON segundo os grupos experimentais.



Fonte: Do autor.

Figura 29 - Gráfico de colunas das médias percentuais da AON segundo os períodos experimentais.



Fonte: Do autor.

6 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, a reabilitação oral com próteses implanto-suportadas tornou-se uma das principais opções de tratamento em substituição de dentes perdidos. No entanto, para lidar com as limitações anatômicas, vários procedimentos coadjuvantes para o aumento do osso alveolar atrófico, antes da colocação do implante, têm sido essenciais. Estes procedimentos incluem enxertos autógenos, técnicas de elevação do assoalho do seio maxilar, regeneração óssea guiada e preservação do rebordo alveolar. Mas, apesar do grande número de substitutos ósseos disponíveis, todos apresentam vantagens e desvantagens, explicando o grande número de pesquisas que buscam novos biomateriais para esta finalidade (YIP et al., 2014).

Contudo, a fim de determinar se um material recentemente desenvolvido está de acordo com os requisitos da biocompatibilidade, estabilidade, segurança e previsibilidade os mesmos devem ser submetidos a testes rigorosos, tanto *in vitro* como *in vivo*. E resultados de estudos *in vitro* podem ser difíceis de extrapolar para a situação *in vivo*. Por esta razão, a utilização de modelos animais é, ainda, muitas vezes um passo essencial que precede o uso clínico em seres humanos (GARDEL et al., 2014; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990).

E como descrito anteriormente, este trabalho objetivou avaliar basicamente o efeito do gel de doxíciclina a 10%, associado ou não ao osso bovino particulado (Bio-Oss), em defeitos ósseos de tamanho crítico na calvária de ratos através de um estudo tomográfico, histológico e histométrico.

O modelo experimental utilizado para este fim foi apropriado, já que modelos bem conduzidos e totalmente validados com o uso de animais, principalmente os de pequeno porte, como ratos, são essenciais para o estudo comportamental biológico e o desenvolvimento de novos substitutos ósseos, uma vez que apresentam como vantagens o fácil manejo, a prolificidade, a docilidade, o baixo consumo alimentar, a pequena área para criação, a fisiologia conhecida e o ciclo reprodutivo curto quando comparado a outros animais (HISTING et al., 2011).

O defeito de tamanho crítico, definido como a menor ferida intraóssea em um animal que não cicatriza espontaneamente quando não tratada por um determinado período de tempo, tem sido muito utilizado como um modelo

experimental para avaliar a eficácia dos biomateriais desenvolvidos recentemente (BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1988; BODDE et al., 2008; HOLLINGER; KLEINSCHMIDT, 1990; LE GUEHENNEC et al., 2005; MESSORA et al., 2008; SOHN et al., 2010). Estas definições confirmam que o defeito cirúrgico criado na calvária dos animais da presente pesquisa são defeitos de tamanho crítico, já que todos os espécimes avaliados apresentaram fechamento incompleto nos períodos analisados. Ou seja, o modelo experimental utilizado de defeitos ósseos na calvária de ratos foi adequado para avaliação da regeneração óssea com a utilização do gel de doxiciclina.

Além disso, a técnica de confecção de canaletas em formato de “L”, 2mm anterior e posterior ao defeito, preenchidas com amálgama, proposta por Messori et al. em 2008, tem sido amplamente utilizada e com ótimos resultados de identificação das margens do defeito cirúrgico original. No entanto, no presente trabalho a proposta de modificar o material de preenchimento destas canaletas, foi decorrente de que materiais metálicos, como o amálgama, causam artefatos de imagem na tomografia computadorizada, o que certamente produz interferência na densidade tomográfica média na região do defeito (BOUXSEIN et al., 2010; STAUBER; MULLER, 2008). Assim, optou-se pela utilização do ionômero de vidro, o qual manteve a possibilidade de identificação do defeito original nos cortes histológicos além da análise tomográfica proposta, sem contar que esta modificação permitiu a realização das análises tomográfica e histomorfométrica utilizando os mesmos animais. Vale a pena ressaltar que a não interferência deste material utilizado foi comprovado pelo *check-up* do fundo da imagem durante a análise tomográfica, uma vez que apresentou valores médios de densidade idênticos ao vazio (aproximadamente -1000HU).

Quanto aos períodos experimentais aplicados no estudo em questão, muitos autores têm comprovado que um período de regeneração 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 oito 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).

Considerando essa busca constante por biomateriais que possibilitam reconstruções ósseas na área odontológica principalmente no campo da cirurgia bucomaxilofacial, implantodontia e periodontia, ainda hoje as pesquisas realizadas com o objetivo de analisarem a regeneração óssea associada com a utilização de substitutos ósseos são frequentes e plenamente justificáveis, principalmente porque dentre os materiais disponíveis nenhum apresenta as características de um material ideal. E isso também explica os estudos já desenvolvidos que avaliam a associação de diferentes substitutos ósseos (JENSEN et al., 2013; KUHL; GOTZ; HANSEN, 2010).

Dentro deste contexto, a doxiciclina tem sido frequentemente pesquisada desde a sua descoberta. Sua aplicabilidade é ampla dentro e fora da Odontologia, se estendendo desde marcadores de formação óssea no campo da imagiologia por fluorescência até o tratamento de periodontites e peri-implantites. E isso se deve, sobretudo, às suas propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, anti-colagenases, imunossupressora e anti-osteoclastogênese, além da maior estabilidade química comparada às outras tetraciclinas e às concentrações bactericidas alcançadas no fluido gengival com a sua aplicação local. E muitos estudos já foram realizados com o intuito de verificar a ação das tetraciclinas associadas ou não aos enxertos ósseos de diferentes origens. Todavia, em todos eles, esta análise se dava pela imersão do enxerto na solução destes antimicrobianos ou com dispositivos de liberação lenta e direcionados ao tratamento de periodontites ou peri-implantites (BASSETTI et al., 2013; CATON; RYAN; 2011; DASHTI et al., 2010; KINUGAWA et al., 2012; MUTHUKURU; SUN, 2013; PARK, 2010; SCHAR et al., 2012; SUNDARARAJ et al., 2013; UDAGAWA et al., 2013; YAGAN; KESIM; LIMAN, 2013). Porém, diferentemente das demais, esta pesquisa propôs verificar, em defeitos ósseos, a ação da doxiciclina, na forma de gel e sua associação com enxerto, sem a presença das enfermidades citadas.

Quanto à densidade tomográfica, Grimard et al. (2013) avaliaram em seu estudo as medidas de imagens radiográficas digitais intraorais e imagens tomográficas (TCCB) para direcionar as medidas cirúrgicas avaliando resultados de tratamento ósseo regenerativo. Concluíram que as medidas obtidas na TCCB em comparação com as medições cirúrgicas diretas foram significativamente mais precisas do que as radiografias intraorais. Isto porque a imagem tridimensional pode fornecer orientação adequada dos três pontos de vista (coronal, sagital e axial) e

medir as mudanças que ocorrem após procedimentos de enxerto ósseo. Outros estudos corroboram esses achados. Misch, Yi, Sarment (2006), por exemplo, avaliaram as alterações em defeitos ósseos criados em mandíbulas de crânios secos e concluíram que a capacidade tridimensional da TCCB tem uma vantagem significativa em relação aos métodos convencionais porque todo o defeito é detectado e quantificado. Além disso, Kehl, Swierkot, Mengel (2011) avaliaram o nível de osso marginal ao redor dos implantes dentários com a TCCB que permitiu uma análise quantitativa mais precisa da perda óssea quando também comparada com a radiografia convencional (duas dimensões). E neste trabalho, a utilização da análise tomográfica permitiu complementar as análises histológica e histométrica, uma vez que se pode quantificar, em densidades diferentes, os vários tecidos e materiais presentes no defeito ósseo (osso neoformado, tecido conjuntivo, partículas de Bio-Oss). Os resultados mostraram que no período de avaliação de 4 semanas, o grupo BO apresentou os maiores valores numéricos de densidade, isso porque nos demais, as partículas de Bi-Oss, que apresentam alta densidade, não foram utilizadas (grupos DOX, NAT e CS) ou porque parte delas já havia se reabsorvido e novo osso estava em processo de formação (grupo BODOX). Enquanto que, no período de 8 semanas, o grupo BODOX apresentou os maiores valores numéricos e densidade, provavelmente porque as partículas de Bio-Oss foram reabsorvidas e substituídas por osso neoformado.

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 arcaçouço 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 (CARVALHO, et al., 2010; GUIANNOUDES; DINOPOULOS; TSIRIDIS, 2005; LOURENÇO, 2002; OGUN SALU, 2011; SARTORI et al., 2003;). Assim, os resultados obtidos com o presente trabalho se justificam, uma vez que a maior neoformação óssea observada nos grupos DOX e BODOX de 8 semanas devem-se também à base do gel, ou seja, ao natrosol, e às partículas de Bio-Oss. E estas implicações são confirmadas pela avaliação histológica da utilização do veículo do gel (um material a base de celulose, inerte, solúvel em água) e das partículas do Bio-Oss de forma isoladas (grupos NAT

e BO respectivamente), onde foi possível observar que ambas foram capazes de manter a espessura original da calvária, resultando numa neoformação óssea maior que o grupo CS, em que a espessura dos tecidos conjuntivo e ósseo foram drasticamente menores que a da calvária original; e menor que os grupos DOX e BODOX, os quais possuíam além do arcabouço, a ação da doxiciclina.

Ressalta-se ainda que cada biomaterial apresenta maior ou menor capacidade de oferecer um *scaffold* adequado dependendo da sua aplicação. No caso da doxiciclina na forma de gel a 10%, a sua utilização isolada, em defeitos críticos na calvária de ratos, foi suficiente para suportar o retalho mucoperiosteal, tanto é que os melhores resultados numericamente obtidos estiveram associados com o grupo DOX no período de 8 semanas conforme comprovado no presente estudo. Em contrapartida, em defeitos com menor número de paredes ou que estejam associados com a necessidade de ganho em altura ou espessura significativas, outros biomateriais devem ser indicados ou associados já que somente o gel, nesses casos, não é suficiente como arcabouço. Para isso, torna-se essencial uma matriz resistente que mantenha o espaço abaixo do retalho.

Desta forma, a utilização de substitutos ósseos capazes de oferecerem um adequado arcabouço, destacando-se aqui os enxertos bovinos, em especial as partículas de Bio-Oss, tem sido uma boa opção. Mas a osteocondução destes materiais quando agregadas com outros mecanismos de ação, tal como a osteoindução e osteogênese, parecem ter resultados ainda melhores. Portanto, uma favorável alternativa seria a associação deste material de preenchimento, essencialmente osteocondutor, com a doxiciclina que possui além das características já mencionadas a capacidade de inibir a osteoclastogênese, que de forma indireta lhe confere propriedades osteoindutivas. Soma-se a isto, o fato de que a utilização deste medicamento na forma de gel poderia funcionar como uma conexão biológica entre as partículas do enxerto, favorecendo ainda mais a regeneração tecidual (BANSAL; BHARTI, 2013; JENSEN et al., 2012; JENSEN et al., 2013).

Porém uma das principais desvantagens do Bio-Oss é a reabsorção muito lenta e incompleta de suas partículas, que resulta em um volume considerável do enxerto que não pode ser substituído pelo novo osso, processo denominado por alguns autores de osteobstrução (KOLERMAN et al., 2012; LEE, CHEN, DARBY, 2012; MORDENFELD et al. 2010; OGUNSALU, 2011; VALENTINI et al., 2000).

Mordenfeld et al. (2010), por exemplo, avaliaram espécimes obtidos de enxertos ósseos realizados para elevar seios maxilares com o Bio-Oss após 11 anos e constataram que a porcentagem média de partículas residuais foi de 17,3%. Esses dados podem explicar os resultados histomorfométricos obtidos nesta pesquisa, já que no período de 4 semanas o grupo BODOX apresentou os maiores valores de neoformação óssea apesar de ser estatisticamente maior apenas que os grupos CS e NAT . Mas, no período de 8 semanas, os grupos DOX e BODOX também não apresentaram diferenças estatísticas; todavia, numericamente, os maiores valores foram identificados no grupo DOX. Os autores associaram este fato à dispensável reabsorção e posterior substituição das partículas de Bio-Oss que no grupo BODOX é essencial. Consequentemente de acordo com o tipo de defeito ósseo, a necessidade de um arcabouço poderá conduzir a escolha da associação, ou não, das partículas do enxerto ósseo bovino particulado ao gel de doxiciclina.

Sem dúvidas, novas pesquisas devem ser realizadas para confirmar as reais propriedades do gel de doxiciclina a 10% no processo de regeneração óssea, tanto na sua forma isolada como em associação com outros substitutos ósseos; além de estudos com períodos de observações mais longos investigando a total substituição dos biomateriais por osso neoformado. Quanto ao gel, estudos futuros também poderão comprovar seu mecanismo de ação, estabilidade química, tempo de ação, vantagens, desvantagens, reações adversas, indicações e contraindicações.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro dos limites deste estudo, observa-se que a doxiciclina a 10% na forma de gel teve um bom efeito quando utilizada no preenchimento de defeitos críticos em calvária de ratos. Sua associação com partículas de osso bovino (Bio-Oss) mostrou melhor comportamento como arcabouço, permitindo adequada formação de tecido ósseo nos defeitos dos animais.

REFERÊNCIAS

- 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 Periodontology**, v. 60, n. 10, p. 582-590, 1989.
- BANG, S. M. et al. Osteoblastic and osteoclastic differentiation on SLA and hydrophilic modified SLA titanium surfaces. **Clinical Oral Implants Research**, p. 1-7, 2013.
- BANSAL, C.; BHARTI, V. Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with desmineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 3, p. 361-366, 2013.
- BASSETTI, M. et al. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implant Research**, p. 1-9, 2013.
- BIELBY, R.; JONES, E.; MCGONABLE, D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. **Injury**, v. 38, p. 26-32, 2007.
- BODDE, E. W. et al. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 85, p. 206-217, 2008.
- BOER, H. H. D. The History of Bone Grafts. **Clinical Orthopaedics & Related Research: section III: basic science and pathology**, v. 226, 1988.
- BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regeneration materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1988.
- BOUXSEIN, M. L. et al. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **J Bone Miner Res.**, v. 25, p. 1468–86, 2010.
- BUCHTER, A. et al. Sustained release of doxycycline for the treatment of peri-implantitis: randomised controlled trial. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 42, p. 439–444, 2004.

CARVALHO, P. S. P. et al. Biomateriais aplicados a implantodontia. **Revista Implantnews**, São Paulo, n. 7, p. 56-65, 2010.

CATON, J.; RYAN, M. E. Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline. **Pharmacological Research**, v. 63, n. 2, p. 114–120, 2011.

CHAMBERS, T. J. The birth of the osteoclast. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 1192, p. 19-26, 2010.

CHIAPASCO, M.; ROMEO, E. **Reabilitação Oral com Prótese Implantossuportada para Casos Complexos**. São Paulo: Editora Santos, 2007.

CONZ, M. B. et al. Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia. **Revista Implantnews**, v.7, n.4, p. 541-6, 2010.

DAHLIN, C; SIMION, M.; HATANO, N. Longterm follow up on soft and hard tissue levels following guided bone regeneration treatment in combination with a xenogeneic filling material: a 5 years prospective clinical study. **Clinical Implant Dentistry**, v. 12, p. 263-270, 2009.

DASHTI, A. et al. In Vitro antibacterial efficacy of tetracycline hydrochloride adsorbed onto Bio-Oss bone graft. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93B, n. 2, p. 394-400, 2010.

FARDIN, A. C. et al. Bone graft in dentistry: review of literatura. **Innov Implant J, Biomater Esthet.**, v. 5, n. 3, p. 48-52, set./dez, 2010.

FINKEMEIER, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. **J. Bone J. T. Surg. Am.**, v. 84, p. 54-64. 2002.

FISCHER, J. et al. Future of local bone regeneration e Protein versus gene therapy. **Journal Craniomaxillofacial Surgery**, v. 39, p. 54 – 64, 2011.

FRALEIGH, C. M . An Evaluation of Topical Terramycin in Postgingivectomy Pack. **Journal of Periodontology**, v. 27, n. 201, 1956.

FRANKLIN, T. J.; SNOW, G. A. Biochemistry of antimicrobial action. **Chapman and Hall Ltd.**, p 224, 1975.

GALINDO-MORENO, P. et al. Histomorphometric comparison of maxillary pristine bone and composite bone graft biopsies obtained after sinus augmentation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 122-128, 2010.

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.

GARDEL, L. S. et al. Use of Perfusion Bioreactors and Large Animal Models for Long Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part B**, v. 20, n. 2, p. 127-145, 2014.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, v. 327, p. 656–661, 2010.

GRIMARD B. et al. Comparison of clinical, periapical radiograph, and cone-beam volume tomography measurement techniques for assessing bone level changes following regenerative periodontal therapy. **Journal Periodontology**, v. 80, p. 48-55, 2009.

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

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

HOBIOYD, S. V. Antibiotics in the practice of periodontics. *J. Periodont.*, v. 42, n. 9, p. 584-589, 1971.

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

JENSEN, T. et al. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 635–644, 2013.

JENSEN, T. et al. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 41, p. 114-120, 2012.

JOHANSSON, B. et al. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. **DentoMaxilloFacial Radiology**, v. 30, p. 157–161, 2001.

KEHL, M.; SWIERKOT, K.; MENGEL, R. Three-Dimensional Measurement of Bone Loss at Implants in Patients With Periodontal Disease. **J Periodontol.**, v. 82, p. 689-99, 2011.

KIM, D. M. et al. The clinical and histologic outcome of dental implant in large ridge defect regenerated with alloplast: a randomized controlled preclinical trial. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 2, p. 148-153, 2013.

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.

KOLERMAN, R. et al. Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 32, p. e21-e28, 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.

KUHL S.; GOTZ H.; HANSEN T. et al. Three-dimensional analysis of bone formation after maxillary sinus augmentation by means of microcomputed tomography: a pilot study. **International Journal Oral Maxillofacial Implants**, v. 25, p. 930-938, 2010.

LANGE, G. L. et al. A histomorphometric and microcomputed tomography study of bone regeneration in the maxillary sinus comparing biphasic calcium phosphate and deproteinized cancellous bovine bone in a human split-mouth model. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 117, n. 1, p. 8-22, 2014.

LE GUEHENNEC, L. et al. Small-animal models for testing macroporous ceramic bone substitutes. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 72B, p. 69–78, 2005.

LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 918–924, 2012.

LERNER, U. H. Bone remodeling in Post-menopausal Osteoporosis. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 584-595, 2005.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LONG, T. et al. The effect of mesenchymal stem cell sheets on structural allograft healing of critical sized femoral defects in mice. **Biomaterials**. p. 1-8, 2014.

LOPES, J. C; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Osteoimmunology – The hidden immune regulation of bone. **Revista Autoimmun**, Lisboa, v. 8, n. 3, p. 250-255, 2008.

LOURENÇO, E. J. V. **Avaliação da osteogênese com Proteínas Ósseas Morfogênicas (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 Baurú, Universidade Federal de São Paulo, Bauru, 2002.

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. 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, 2008.

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

MISCH, K.; YI, E.; SARMENT, D. Accuracy of Cone Beam Computed Tomography for Periodontal Defect Measurements. **Journal Periodontology**, v. 77, p.1261-6, 2006.

MLADENOVIC, Z. et al. In vitro study of the biological interface of Bio-Oss: implications of the experimental setup. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 329-335, 2013.

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.

MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 961–970, 2010.

MUTHUKURU, M.; SUN, J. Doxycycline Counteracts Bone Morphogenic Protein 2–Induced Osteogenic Mediators. **Journal Periodontology**, v. 85, n. 4, p. 657 – 665, 2013.

NARAIN, R. U.; GARG, S.; NARAIN, P. A prospective study of the quality of removable prostheses and patients' satisfaction in post-prosthetic phase. **The Internet Journal of Dental Science**, v. 9, n. 1, 2010.

NAUJOKS, C. et al. Biocompatibility of osteogenic predifferentiated human cord blood stem cells with biomaterials and the influence of the biomaterial on the process of differentiation. **J. Biomater. Appl.**, v. 25, p. 497 – 512, 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.

OGUNSLU, C. Bone Substitutes and Validation. **Implant Dentistry - The Most Promising Discipline of Dentistry**, book edited by Ilser Turkyilmaz, ISBN 978-953-307-481-8, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/implant-dentistry-the-most-promising-discipline-of-dentistry/bone-substitutes-and-validation>> Acesso em: 15 May 2014.

ORSINI, G. et al. Maxillary sinus augmentation with Bio-Oss particles: light, scanning and transmission electron microscopy study in man. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part B, v. 74B, p. 448-457, 2005.

PALUCKA, K.; UENO, H.; BANCHEREAU, J. Recent developments in cancer vaccines. **J. Immunol.**, v. 186, p. 1325–1331, 2011.

PARIROKH, M. et al. Comparative study of subcutaneous tissue responses to a novel root-end filling material and white and grey mineral trioxide aggregate. **International Endodontic Journal**, v. 44, p. 283–289. 2011.

PARK, J. B. Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone onto Bio-OssVR bone graft. **Journal Of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 93B, may, 2010.

PAUTKE, C. et al. Tetracycline bone fluorescence: a valuable marker for osteonecrosis characterization and therapy. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 68, p.125-129, 2010.

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

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

SANTIS, E. et al. Healing outcomes at implants installed in sites augmented with particulate autologous bone and xenografts. An experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 77–86, 2013.

SANTIS, E. et al. Healing outcomes at implants installed in grafted sites: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p.340–350, 2012.

SARTORI, S. et al. Case Report: Ten-years follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 14, n. 3, p. 369-372, 2003.

SBORDONE, C. et al. Volume changes of autogenous bone after sinus lifting and grafting procedures: a 6-year computerized tomographic follow-up. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 41, p. 235–241, 2013.

SBORDONE, C. et al. Volume changes of iliac crest autogenous bone grafts after vertical and horizontal alveolar ridge augmentation of atrophic maxillas and mandibles: a 6-year computerized tomographic follow-up. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, p. 2559-2565, 2012.

SBORDONE, L. et al. Implant survival in maxillary and mandibular osseous onlay grafts and native bone: a 3-year clinical and computerized tomographic follow-up. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, p. 695–703, 2009.

SCHAR, D. et al. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: six-month outcomes of a prospective randomized clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 1, p. 104-110, 2012.

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.

SCHMITT, C. M. et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, p. 576–585, 2013.

SILVA, M. O. et al. Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions. A tomography and histomorphometric study in rabbit calvaria. **International Journal of Biomaterials**, v. 12, p. 1-7, 2012.

SMOLKA, W. et al. Changes in the volume and density of calvarial split bone grafts after alveolar ridge augmentation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, p. 149–155, 2006.

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.

SONVER, M. et al. Validation of annual skeletal marks in green sea turtles *Chelonia mydas* using tetracycline labeling. **Aquatic Biology**, v. 12, p. 197-204, 2011.

STAUBER, M.; MULLER, R. Micro-computed tomography: a method for the non-destructive evaluation of the three-dimensional structure of biological specimens. **Methods Mol Biol.**, v. 455, p. 273-292, 2008.

STOLLER, N. H. et al. The pharmacokinetic profile of a biodegradable controlled – release delivery system containing doxycycline in gingival crevicular fluid, saliva and serum. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 10, p. 1085-1091, 1998.

SUNDARARAJ, S. C. et al. Design of a multiple drug delivery system directed at periodontitis. **Biomaterials**, v. 34, p. 8835-8842, 2013.

TETÈ, S. et al. Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 10, p. 60 – 65, 2013.

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

VALENTINI, P. et al. Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, p. 245-253, 2000.

VENTURA, M. et al. Preclinical Imaging in Bone Tissue Engineering. **Tissue Engineering: Part B.**, 2014. DOI: 10.1089/ten.teb.2013.0635. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2013.0635>.> Acesso em: 10 Set. de 2014.

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 Online**. p. 1-18, 2013. Disponível em: <<http://www.joponline.org/doi/abs/10.1902/jop.2013.130138>.> Acesso em: 16 Set. 2013.

YALTIRIK, M. et al. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. **Journal of Endodontics**, v. 30, p. 95–9, 2004.

YIP, I. et al. Healing of calvaria defect with various bone substitutes . **Clin. Oral Impl. Res. Online**, p. 1- 9, 2014. Disponível em: <<http://www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/clr.12395/full>.> Acesso em: 19 Out. 2014.

ANEXO**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA)**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 26 de fevereiro de 2014.

Prof. Ronaldo Célio Mariano

Prezado Professor;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 555/2014, intitulado “Avaliação do gel de doxiciclina a 10% como inibidor da osteoclastogênese na regeneração óssea, associado ou não ao Bio-Oss e sua biocompatibilidade – estudo histomorfométrico e tomográfico em ratos” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente da CEUA – Unifal-MG

APÊNDICE

APÊNDICE A – Distribuição das porcentagens de densidade tomográfica segundo os grupos e períodos experimentais e cortes tomográficos.

	CS			NAT			DOX			BO			BO+DOX			
	4 semanas	8 semanas		4 semanas	8 semanas		4 semanas	8 semanas		4 semanas	8 semanas		4 semanas	8 semanas		
CA	1ªmed.	42,8985%	45,7889%	45,7442%	49,8720%	53,2567%	53,3831%	67,0987%	50,3964%	63,1967%	63,8476%	63,8476%	50,3964%	63,1967%	63,8476%	63,8476%
	2ªmed.	43,7250%	46,3668%	49,8948%	47,9028%	55,0223%	57,0278%	53,1964%	64,9146%	44,0470%	64,2690%	64,2690%	44,0470%	64,2690%	64,2690%	64,2690%
	3ªmed.	43,6417%	46,1228%	53,7296%	47,9989%	55,7296%	57,8548%	52,8293%	66,1233%	45,1449%	50,7208%	50,7208%	45,1449%	50,7208%	50,7208%	50,7208%
R1	1ªmed.	28,9198%	31,3545%	21,8547%	26,8173%	29,7456%	32,7300%	39,4235%	40,2828%	22,3144%	20,4785%	20,4785%	22,3144%	20,4785%	20,4785%	20,4785%
	2ªmed.	33,5653%	32,4590%	25,6734%	28,9933%	29,9130%	32,7300%	39,4235%	40,2828%	22,3144%	20,4785%	20,4785%	22,3144%	20,4785%	20,4785%	20,4785%
	3ªmed.	25,5399%	29,9712%	26,2212%	28,0147%	32,9845%	34,0211%	45,1537%	42,6052%	31,5436%	31,5436%	31,5436%	31,5436%	31,5436%	31,5436%	31,5436%
CC	1ªmed.	26,1256%	28,9765%	16,6181%	19,3045%	26,8274%	35,5952%	27,8210%	39,9067%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%
	2ªmed.	26,1126%	29,0134%	23,4429%	22,9875%	26,8841%	33,9222%	36,9797%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%	44,6093%
	3ªmed.	23,4203%	28,7673%	21,6710%	23,8763%	29,2446%	32,7424%	36,1349%	41,4182%	23,1589%	23,1589%	23,1589%	23,1589%	23,1589%	23,1589%	23,1589%
CA	1ªmed.	42,5590%	46,8323%	51,4255%	48,9348%	54,9803%	60,3667%	53,4344%	66,3423%	60,2242%	60,2242%	60,2242%	60,2242%	60,2242%	60,2242%	60,2242%
	2ªmed.	43,3696%	47,8610%	45,9885%	50,7714%	56,2773%	60,2251%	53,4617%	64,7688%	57,8491%	57,8491%	57,8491%	57,8491%	57,8491%	57,8491%	57,8491%
	3ªmed.	43,6674%	46,9992%	46,9659%	50,0048%	55,9801%	60,3764%	52,1679%	67,6000%	58,8727%	58,8727%	58,8727%	58,8727%	58,8727%	58,8727%	58,8727%
R2	1ªmed.	17,6714%	25,5643%	24,1228%	24,8725%	25,7649%	40,4214%	39,5747%	48,7779%	31,1813%	31,1813%	31,1813%	31,1813%	31,1813%	31,1813%	31,1813%
	2ªmed.	20,5710%	24,8729%	20,3007%	27,9403%	27,9937%	34,9739%	45,2035%	46,5312%	33,0598%	33,0598%	33,0598%	33,0598%	33,0598%	33,0598%	33,0598%
	3ªmed.	19,5121%	24,7881%	20,5578%	26,9650%	28,9438%	39,1242%	45,8824%	45,4412%	33,5766%	33,5766%	33,5766%	33,5766%	33,5766%	33,5766%	33,5766%
CC	1ªmed.	20,7764%	18,9872%	9,9391%	21,8324%	26,7837%	39,5088%	36,8927%	42,2473%	32,8091%	32,8091%	32,8091%	32,8091%	32,8091%	32,8091%	32,8091%
	2ªmed.	16,5035%	17,8239%	16,1290%	20,8567%	25,9917%	42,2822%	35,8111%	39,5778%	33,8360%	33,8360%	33,8360%	33,8360%	33,8360%	33,8360%	33,8360%
	3ªmed.	16,4556%	19,2401%	16,0460%	20,4329%	26,8837%	38,3732%	37,7275%	40,5771%	34,6044%	34,6044%	34,6044%	34,6044%	34,6044%	34,6044%	34,6044%
CA	1ªmed.	40,9189%	44,5672%	46,5432%	50,8237%	53,9115%	57,4765%	52,3373%	66,3568%	52,6183%	52,6183%	52,6183%	52,6183%	52,6183%	52,6183%	52,6183%
	2ªmed.	42,4598%	41,7610%	49,1212%	50,5601%	55,8726%	55,9835%	54,4998%	66,9765%	68,1201%	68,1201%	68,1201%	68,1201%	68,1201%	68,1201%	68,1201%
	3ªmed.	43,4343%	44,9819%	48,6781%	49,9105%	55,8821%	53,7752%	53,4883%	66,5563%	66,5716%	66,5716%	66,5716%	66,5716%	66,5716%	66,5716%	66,5716%
R3	1ªmed.	27,8087%	30,9835%	24,6562%	26,8903%	29,4726%	33,7561%	42,9363%	46,1064%	25,5707%	25,5707%	25,5707%	25,5707%	25,5707%	25,5707%	25,5707%
	2ªmed.	30,6764%	29,9634%	23,6754%	27,9833%	30,7174%	33,8965%	43,9773%	44,4234%	27,1962%	27,1962%	27,1962%	27,1962%	27,1962%	27,1962%	27,1962%
	3ªmed.	28,4288%	30,0228%	26,2234%	27,5277%	30,0037%	31,9721%	42,5774%	49,2731%	28,0204%	28,0204%	28,0204%	28,0204%	28,0204%	28,0204%	28,0204%
CC	1ªmed.	25,1111%	26,7699%	17,8976%	23,2349%	28,8648%	36,7800%	37,2979%	44,3686%	25,8084%	25,8084%	25,8084%	25,8084%	25,8084%	25,8084%	25,8084%
	2ªmed.	23,5656%	25,9826%	22,3798%	24,8759%	26,8226%	40,8127%	36,7799%	41,6315%	26,1410%	26,1410%	26,1410%	26,1410%	26,1410%	26,1410%	26,1410%
	3ªmed.	22,4347%	27,6781%	20,5487%	24,2746%	27,7841%	31,8786%	38,7766%	41,7097%	26,1231%	26,1231%	26,1231%	26,1231%	26,1231%	26,1231%	26,1231%
CA	1ªmed.	43,5259%	45,7112%	49,9734%	54,8267%	56,7125%	62,7896%	54,5710%	64,7210%	58,8621%	58,8621%	58,8621%	58,8621%	58,8621%	58,8621%	58,8621%
	2ªmed.	42,3696%	44,8791%	48,7674%	55,7104%	55,9104%	60,9983%	53,6699%	64,8858%	59,7506%	59,7506%	59,7506%	59,7506%	59,7506%	59,7506%	59,7506%
	3ªmed.	41,9234%	46,0567%	47,6513%	54,9026%	55,1120%	61,8179%	53,5026%	71,3470%	65,3171%	65,3171%	65,3171%	65,3171%	65,3171%	65,3171%	65,3171%
R4	1ªmed.	20,1221%	22,9811%	19,6658%	22,7815%	32,8557%	41,8925%	43,6523%	43,0518%	32,3573%	32,3573%	32,3573%	32,3573%	32,3573%	32,3573%	32,3573%
	2ªmed.	19,2341%	24,0137%	19,7601%	24,9226%	34,8133%	37,8545%	43,0633%	42,1665%	31,3630%	31,3630%	31,3630%	31,3630%	31,3630%	31,3630%	31,3630%
	3ªmed.	19,8797%	24,6592%	20,9834%	23,7691%	35,0057%	36,4777%	45,0242%	44,0982%	26,7320%	26,7320%	26,7320%	26,7320%	26,7320%	26,7320%	26,7320%
CC	1ªmed.	20,4587%	21,7890%	11,7603%	20,2045%	34,7592%	38,8888%	35,2801%	40,2633%	33,8001%	33,8001%	33,8001%	33,8001%	33,8001%	33,8001%	33,8001%
	2ªmed.	18,5045%	19,9928%	18,2434%	19,9237%	34,0223%	44,7762%	36,7509%	39,0136%	33,7582%	33,7582%	33,7582%	33,7582%	33,7582%	33,7582%	33,7582%
	3ªmed.	18,8769%	22,9807%	13,4567%	19,9991%	32,8930%	33,9435%	36,7984%	39,9549%	36,7076%	36,7076%	36,7076%	36,7076%	36,7076%	36,7076%	36,7076%

Fonte: Do autor.

Notas: *CA: corte axial; CS: corte sagital; CC: corte coronal; R1: rato 1; R2: rato 2; R3: rato 3; R4: rato 4.

APÊNDICE B – Distribuição da área total e de neoformação óssea e suas respectivas porcentagens segundo os grupos e períodos experimentais.

	CS		NAT		DOX		BO		BO+DOX		
	4 semanas	8 semanas	4 semanas	8 semanas							
AT	2807841,01	2478282,68	2460893,32	1694370,93	2895981,78	4054220,66	268342,96	3262489,23	3352751,71	3870813,78	
R1	AON	102293,39	386210,82	116473,12	418307,91	362076,99	3485896,81	377456,99	939382,97	1081650,85	1681484,62
	%	3,6431	15,5839	4,7329	24,6880	12,5027	85,9819	14,0640	30,3260	32,2616	43,4400
AT	2836278,70	2683202,90	3622641,37	2475413,64	2960777,69	2390961,57	2309332,54	2531731,88	2661019,77	3846039,79	
R2	AON	175150,82	458516,15	795722,29	929118,94	5240780,17	1349645,52	337002,40	1138363,44	549141,48	1296770,60
	%	6,1758	17,0883	21,9652	37,5339	17,7006	56,4478	14,5930	44,9638	20,6365	33,7170
AT	1933489,96	2574590,07	1895114,67	2194557,23	2895982,63	3800383,82	3345510,10	2540191,80	2584246,33	3419338,70	
R3	AON	107642,66	943067,47	87183,69	913733,46	5780813,64	1550748,59	525373,79	711942,17	855010,79	1171352,99
	%	5,5673	36,6298	4,6004	41,6363	19,9614	40,8050	15,7038	28,0271	33,0855	34,2567
AT	2134997,90	2466981,01	2356698,98	1997646,77	2777599,02	3522167,34	2235876,21	2889433,11	3077598,32	3762181,25	
R4	AON	110042,06	571293,59	247455,75	691189,77	436077,49	2155619,24	375334,30	770548,24	818973,53	1567396,19
	%	5,1542	23,1576	10,5001	34,6002	15,6998	61,2015	16,7869	26,6678	26,6108	41,6619

Fonte: Do autor.

Notas: *AT: Área total; AON: Área de osso neoformado; R1: rato 1; R2: rato 2; R3: rato 3; R4: rato 4.