

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM IMPLANTODONTIA

HOTHIR MIBSAN RODRIGUES CORRÊA

EFEITOS DO USO LOCAL DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO
ASSOCIADO A ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM COELHOS: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA

São Paulo

2006

HOTHIR MIBSAN RODRIGUES CORRÊA

**EFEITOS DO USO LOCAL DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO
ASSOCIADO A ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM COELHOS: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre, pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Implantodontia, sob orientação do Prof. Dr. Sérgio Luís de Miranda.

São Paulo

2006

B. 13012.2730
Class. U617.69
Cutter C842e
Patri nº 3867
Tipo entrada DOAÇÃO
Nota Fiscal
Data rec. 23.1.10.08
Preço
Origem MIBSAN RODRIGUES CORRÊA
Implantodontia

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I

Corrêa, Hothir M.R.

C843 Efeitos do uso local do hormônio do crescimento humano associado a enxerto ósseo autógeno em coelhos: análise histomorfométrica/ Hothir Mibsan Rodrigues Corrêa.

Orientação do Prof. Dr. Sérgio Luís de Miranda

-- São Paulo: 2006.

87 p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro.

1. Enxerto ósseo 2. Hormônio do crescimento humano 3. Análise estatística

I. Título

II. Orientador

HOTHIR MIBSAN RODRIGUES CORRÊA

**EFEITOS DO USO LOCAL DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO HUMANO
ASSOCIADO A ENXERTO ÓSSEO AUTÓGENO EM COELHOS: ANÁLISE
HISTOMORFOMÉTRICA**

Dissertação apresentada à Universidade de Santo Amaro, para obtenção do título de mestre,
pelo programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração em Implantodontia.

Aprovada em: _____ / _____ / _____

BANCA EXAMINADORA:



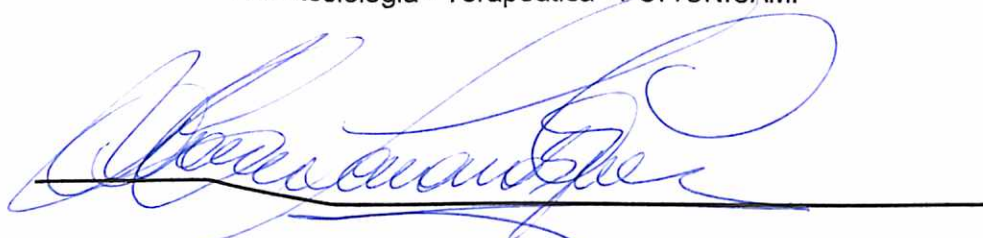
Dr. Sérgio Luis de Miranda

Doutor em Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia pela
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP



Dra. Maria das Graças Vilela Goulart

Doutora em Odontologia com área de concentração em Farmacologia -
Anestesiologia - Terapêutica - FOP/UNICAMP



Dra. Mônica Fernandes Gomes

Doutora em Patologia Bucal - USP/Bauru

CONCEITO FINAL: _____

DEDICATÓRIA

Primeiramente a DEUS,

Por estar sempre presente em minha vida;

Pelo seu infinito amor de Pai;

Pela sua Grandiosidade;

*Venho neste momento, agradecê-lo pela oportunidade recebida e oferecer
esta conquista concedida;*

Muito obrigada Pai!

Ao meu esposo João Marcus B. C. Simões, pelo amor, companheirismo, amizade e apoio incondicional aos meus estudos;

Aos meus pais, Osvaldo Vieira Corrêa e Hothir Bitia Rodrigues Corrêa, em especial, pela educação que me foi dada com muita dedicação, pelos momentos especiais compartilhados com alegria, pelo incentivo a todos os meus feitos, por terem me ensinado o caminho certo a trilhar, pelos exemplos de atitudes repletas de amor, responsabilidade, companheirismo, determinação e força de vontade;

Às minhas irmãs, Kátia Maressa Rodrigues Corrêa e Marúcia Rodrigues Corrêa, pelo apoio fundamental, companheirismo e amizade;

À minha filha Daniela, que tem sido minha maior companheira nessa etapa e mesmo antes de nascer já é extremamente importante em minha vida;

A todas as pessoas que amo e fazem parte da minha vida e entendem a minha ausência em todos esses anos de estudo e dedicação a Odontologia;

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk pela oportunidade de realizar este curso, pelo brilhantismo e dedicação à pesquisa;

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Luís de Miranda pelo exemplo de profissionalismo, dedicação aos estudos e direcionamento deste trabalho;

Ao amigo Prof. Ricardo Jahn, meu exemplo de Mestre, pelo apoio ao curso, incentivo à pesquisa e por se fazer presente em todos os momentos para a realização deste trabalho;

Ao Centro de Biociências Aplicado a Pacientes com necessidades Especiais – CEBAPE/UNESP da faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pelo apoio com equipamentos, microscópio, computadores que viabilizaram a realização da histomorfometria e fotos das lâminas, imprescindíveis para a interpretação dos resultados desta pesquisa.

À professora Dra. Mônica Fernandes Gomes, pelo apoio incondicional na etapa final deste trabalho. Seu amor pela pesquisa é contagiante e seus feitos são louváveis.

À professora Dra. Maria das Graças Vilela Goulart, pela colaboração como co-orientadora desta tese, de maneira muito prestativa e atenciosa; também agradeço a ajuda com a estatística e os gráficos. Sua dedicação à pesquisa é digna de nota e o amor pelo que faz é notório.

À Francine Giovanelli, cuja dedicação, profissionalismo e determinação contribuíram em muito para a realização da histomorfometria desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Nelson Villa pela ajuda com os resultados microscópicos deste trabalho e pelo amor contagiante para com a Histologia;

Ao Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões pela excelente colaboração com as análises microscópicas e fotos para a realização deste trabalho;

Ao amigo Prof. Márcio Faria pela ajuda com a parte experimental e análises microscópicas essenciais para a realização deste trabalho e por todos os momentos, trabalhos em grupo, almoços compartilhados nesses dois anos;

A todos os professores deste curso ao longo desses dois anos que colaboraram, acrescentaram, ensinaram e se esforçaram para nos fazerem mestres;

Ao amigo Renato Limberte pela ajuda com a parte experimental deste trabalho e por todos os momentos, trabalhos, aulas, almoços e caronas compartilhadas nesses dois anos;

A todos os amigos do Mestrado pelos bons momentos que vivenciamos durante o curso e pelas amizades que conquistamos ou aprimoramos neste tempo;

À amiga Karla Furtado pela amizade, importante ajuda em tudo o que precisei e auxílio com a parte experimental.

À secretária Juliana, sempre muito prestativa, dedicada e disposta a nos atender no que precisamos;

À Luciana e à Renata que ajudaram com as Referências e estiveram sempre dispostas a nos atender no que precisamos;

À professora Andréa Barbosa responsável pelo Biotério da Universidade Santo Amaro e o pessoal técnico e auxiliar que não mediram esforços nos cuidados com os animais ao longo da fase experimental;

Ao Carlos, do laboratório de patologia, pela excelente ajuda com as lâminas, tão importantes para avaliarmos os resultados desta pesquisa;

À empresa Neodent pelo excelente atendimento prestado, incentivo a pesquisa e por ter cedido o Kit cirúrgico de enxerto com os parafusos, imprescindíveis para a realização desta pesquisa;

RESUMO

Com o objetivo de avaliar por meio de análises microscópica e estatística da histomorfometria o efeito do uso local em dose única (0,85 mg) do hormônio do crescimento humano biossintetizado (rhGH) na incorporação óssea do enxerto autógeno, realizou-se um trabalho com 24 coelhos fêmeas separados em grupo teste (T2, T6 e T8) e controle (C2, C6 e C8). Foram realizadas cirurgias para remoção de um bloco ósseo da face lateral do íliaco e fixá-lo com parafuso de titânio na face lateral da mandíbula, medialmente ao forame mental. No grupo teste, o enxerto ósseo assim como a área receptora foram embebidos com 0,85 mg de rhGH e no grupo controle foi usado solução salina estéril. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados após 2, 6 e 8 semanas das cirurgias, e as lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscópio de luz. Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método estereológico. Os resultados histológicos para todos os tempos de avaliação do grupo teste mostraram que o rhGH exerceu função importante na incorporação do enxerto, favorecendo a neoformação trabecular e medular. Analisando os dados da histomorfometria observamos que os coelhos do grupo **T2** apresentaram valores de densidade óssea estatisticamente mais elevados que os do grupo **C2**, ($p < 0,001$). Os resultados foram respectivamente: $(0,0700 \pm 0,0081)$ e $(0,0350 \pm 0,0057)$. Para os grupos **T6** ($p < 0,05$) a densidade óssea foi também significativamente mais elevada quando comparada ao seu respectivo controle (**C6**). Os resultados foram respectivamente: $(0,0925 \pm 0,0050)$ e $(0,0775 \pm 0,0050)$. Concluimos que o uso local de rhGH em dose única de 0,85 mg em mandíbulas de coelhos acelerou o processo de incorporação de enxerto ósseo autógeno.

Palavras chave: Enxerto ósseo; Hormônio do crescimento humano; Análise estatística.

ABSTRACT

Seeking histological and histomorphometric analysis evaluation on the effect of local use of a single dose of human growth hormone (rhGH) in the bone incorporation of the autogenous graft, we have worked with 24 adult rabbits, separated in test group (T2, T6 e T8) and control (C2, C6 e C8). Surgeries have been performed in the autogenous bone graft which was removed from the iliac side face and set with a titanium screw in the side face of the mandibles, in the medial of the mental foramen. In the test group, the bone graft as well as the receptive area were soaked in 0,85 mg of rhGH and a sterile saline solution was used in the control group. Four animals were sacrificed in each group at 2, 6 and 8 weeks after surgery, and histologic sections were stained with hematoxylin-eosin and observed under light microscope. The histological results for all the evaluation periods of the test group show that rhGH had an important function in the integration of the graft, favoring a trabecular and medullar neoformation. Analyzing the histomorphometric data we observed that rabbits of group **T2** present bone density values statistically higher than the ones in group **C2**, ($p < 0,001$). The results were respectively: $(0,0700 \pm 0,0081)$ and $(0,0350 \pm 0,0057)$. For the groups **T6** ($p < 0,05$) the bone density was also significantly higher when compared to its respectively control (**C6**). The results were respectively: $(0,0925 \pm 0,0050)$ e $(0,0775 \pm 0,0050)$. We conclude that the local use of a single dose 0,85 mg rhGH in the mandibles of rabbits accelerated the process of integration of the autogenous graft bone.

Key Words: Bone graft; Human growth hormone; Statistical analysis;

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Incisão na pele da área doadora.	47
Figura 02: Incisão no tecido subcutâneo e muscular e descolamento dos tecidos realizados até a exposição da superfície óssea da área doadora.	48
Figura 03: Bloco ósseo osteotomizado no leito doador. Observa-se a perfuração no centro para a fixação do parafuso.	48
Figura 04: Bloco ósseo osteotomizado após remoção do leito doador.	49
Figura 05: Caneta injetora de rhGH usada no grupo teste.	49
Figura 06: Sutura do plano muscular da área doadora.	50
Figura 07: Sutura da pele da área doadora.	50
Figura 08: Incisão na pele da área receptora	51
Figura 09: Incisão no tecido subcutâneo e muscular e descolamento dos tecidos até a exposição da superfície óssea da área receptora.	51
Figura 10: Bloco osteotomizado parafusado no leito receptor.	52
Figura 11: Sutura do plano muscular da área receptora.	52
Figura 12: Sutura da pele da área receptora.	53
Figura 13 - Representação esquemática da análise histomorfométrica da região central da interface (I), região entre a superfície do tecido ósseo da mandíbula (TOM) e tecido ósseo enxertado (TOE). (H.E.; aumento original: 50x).	56
Figura 14 – 2 semanas. Fotomicrografia mostrando região de interface (I), área entre o enxerto ósseo (EO) e o tecido ósseo receptor (TOR), dos grupos controle (A) e teste (B) , exibindo tecido conjuntivo osteogênico (asterisco), trabéculas ósseas neoformadas (setas) e medula óssea (H.E.; aumento original: 50x).	59
Figura 15 – Grupo teste. 2 semanas. (A) Formação de trabéculas ósseas imaturas (setas), bem celularizadas associada ao tecido conjuntivo osteogênico (asterisco); (B) tecido conjuntivo osteogênico rico em células osteopromotoras (osteoblastos e células osteoprogenitoras) (setas). (H.E., aumento original: 200x).	60

Figura 16 – 6 semanas. **(A)** A região de interface (I) do grupo controle ainda era evidenciada, o enxerto ósseo autógeno (EO) estava sendo substituído por tecido ósseo neoformado (TON) e circundado por perióstio (setas); Incorporação e remodelação do enxerto ósseo autógeno ao leito receptor e **(B)** o grupo teste mostrava tecido ósseo enxertado, exibindo áreas imaturas e maduras, (TOE) e presença de medula óssea (MO). (H.E.; aumento original: 50x). 61

Figura 17 – Grupo controle. 6 semanas. Substituição do enxerto ósseo autógeno (EO) por tecido ósseo neoformado (TON) ricamente celularizado e revestido por perióstio exibindo numerosas células osteogênicas (setas) (H.E., aumento original: 200x) 62

Figura 18 - 8 semanas. Os grupos controle **(A)** e **(B)** teste exibiam cortical óssea espessa composta por tecido ósseo enxertado (TOE) e tecido ósseo receptor (TOR). (H.E.; aumento original: 50x). 63

Figura 19 - 8 semanas. **(A)** No grupo controle, notava-se que a cortical externa (CE) ou tecido ósseo enxertado, apresentava-se tanto imatura (TOI) quanto madura (TOM) e, no grupo teste **(B)**, a cortical externa apresentava-se apenas madura. (H.E.; aumento original: 200x). 64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C2)** e **Teste (T2)** no período de 2 semanas. 66
- Gráfico 2** – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C6)** e **Teste (T6)** no período de 6 semanas. 67
- Gráfico 3** – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C8)** e **Teste (T8)** no período de 8 semanas. 68
- Gráfico 4** – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C2 – C6 – C8)** e **Teste (T2 – T6 – T8)** nos diferentes períodos. 69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre tecido ósseo enxertado e tecido ósseo da mandíbula em coelhos. Valores expressos por Média \pm SD (n=4). 65
- Tabela 2** – Resultados da análise de variância (ANOVA) e Teste de Tuckey dos dados histomorfométricos dos grupos Controle (C2 – C6 – C8) e Teste (T2 – T6 – T8) nos diferentes períodos. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BMPs – proteínas ósseas morfogenéticas

°C – graus centígrados

DNA – ácido desoxirribonucléico

e-PTFE – politetrafluoretileno expandido

µg – micrograma

ng – nanograma

hGH – hormônio do crescimento humano

IGFBP-5 – fator de crescimento insulínico transformador de proteína

IGF- I – fator de crescimento insulínico

IU – unidade internacional

Kg – quilograma

µm – micrômetro

mg – miligrama

ml – mililitro

mm - milímetro

pH – potencial hidrogeniônico

PRP – plasma rico em plaquetas

rhGH – hormônio do crescimento humano biossintetizado

% – porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 Histologia do tecido ósseo	21
2.2 Biologia dos enxertos ósseos autógenos	24
2.3 Hormônio do crescimento humano (hGH)	27
2.3.1 Fisiologia do hGH	27
2.3.2 Efeitos no tecido ósseo	32
2.3.3 Estudos pré-clínicos	34
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODO	41
4.1 Material	41
4.1.1 Material permanente	41
4.1.2 Material de consumo	42
4.1.3 Drogas utilizadas	43
4.2 Método	44
4.2.1 Animais	44

4.2.2	Anestesia e preparo dos animais	45
4.2.3	Procedimento cirúrgico	46
4.2.4	Controle pós-operatório	53
4.2.5	Análise Histológica	54
4.2.5.1	Períodos de observação e preparação dos espécimes para a microscopia de luz	54
4.2.5.2	Análise histomorfométrica	55
4.2.6	Análise da estatística	56
5	RESULTADOS	57
5.1	Análise Histológica	57
5.2	Análise Estatística da Histomorfometria	66
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	76
	ANEXO 1: REGISTRO CEP UNISA nº 108/2005	80
	ANEXO 2: TABELAS DAS MEDIDAS DAS ÁREAS PARA ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS	84

1 INTRODUÇÃO

Diante da necessidade de restabelecer a função e a estética do aparelho estomatognático nos indivíduos que perderam um ou mais elementos dentários, a implantodontia tem sido um tratamento que visa proporcionar conforto, estética, fonética, bem estar pessoal e eficácia mastigatória.

Sabe-se que quando ocorre a perda dos elementos dentários, o osso alveolar edêntulo geralmente é afetado por um processo de reabsorção irreversível.

Dessa forma, as necessidades e inquietudes que buscam melhorar as condições anatômicas e a morfologia óssea têm gerado o desenvolvimento de vários procedimentos cirúrgicos para obtenção de aumento de volume ósseo, incluindo o emprego de enxertos ósseos, sendo primeiro o osso autógeno, intra ou extra-bucal, o material de eleição.

Uma vez que a eficiência dos enxertos ósseos autógenos para a posterior instalação de implantes orais é de conhecimento geral, busca-se a agilidade desse tratamento, ou seja, a diminuição do tempo de incorporação óssea com a finalidade de reabilitar os indivíduos no menor tempo possível a fim de que usufruam dos benefícios da reabilitação do sistema estomatognático com implantes osseointegrados.

Em busca de acelerar esse processo de incorporação óssea nos enxertos autógenos, muitos autores têm estudado alguns fatores de crescimento, tais como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o plasma rico em plaquetas (PRP) e o hormônio do crescimento humano (hGH), considerado, por ser uma das mais

importantes substâncias reguladoras do crescimento e da remodelação óssea (CHIHARA; SUGIMOTO, 1997; OHLSSON et al., 1998).

O hGH é um hormônio hipofisário que influencia decisivamente o crescimento de estruturas celulares, exercendo efeitos metabólicos específicos e atuando efetivamente no crescimento ósseo. Também favorece a formação das proteínas, sendo essencial para o crescimento linear (GOODMAN, 1974; GUYTON; HALL 2002; MACEY, 1974).

O hGH é um hormônio peptídeo secretado pelas células somatotrópicas no lobo anterior da glândula pituitária. Sua secreção é pulsátil e ocorre especialmente nas primeiras horas do sono e continua durante toda a noite. Este hormônio anabólico exerce funções em vários órgãos. Muitos dos efeitos no osso e no crescimento linear são mediados por fatores de IGF-I (fatores de crescimento insulínicos). Desde 1985 o hGH tem sido biossintetizado (rhGH) e se tornou acessível, mesmo tendo um elevado preço, para vários tratamentos de desordens de crescimento (PIRINEN, 1995).

No processo de remodelação óssea, a fase de reabsorção é seguida pelo período de formação óssea. É plausível postular que o rhGH ativa esse processo através da estimulação tanto da formação óssea osteoblástica quanto da reabsorção óssea osteoclástica. A ação do IGF-I é envolvida na estimulação da remodelação óssea pelo rhGH (CHIHARA; SUGIMOTO, 1997).

Estudos demonstraram que o rhGH tem ação sobre a formação óssea, tanto com administração sistêmica quanto local. Foi relatado que a administração sistêmica aumenta a massa óssea (ANDREASSEN et al., 1995), estimula o crescimento ósseo longitudinal (ISAKSSON et al., 1982) e a reparação de fraturas ósseas (NIELSEN et al., 1991). Outros autores têm estudado a ação local do rhGH e

concluem que este estimula significativamente a formação óssea local em mandíbulas de ratos (HEDNER et al., 1996), aumenta a neoformação óssea em coelhos (GUICHEUX et al., 1998), favorece aumento ósseo periimplantar em coelhos osteoporóticos (TRESGUERRES et al., 2002) e não osteoporóticos (TRESGUERRES et al., 2003) e acelera o processo de reparação óssea em coelhos (TRESGUERRES et al., 2005).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do uso local de dose única (0,85 mg) de rhGH na incorporação do enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos, mediante análises microscópica e estatística da histomorfometria.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histologia do tecido ósseo

De acordo com Garg (2004), o osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, cujo peso consiste em 35% de matriz orgânica e 65% de cristais de hidroxiapatita. O osso constitui um reservatório importante de minerais, sendo sistemicamente controlado por fatores hormonais e localmente controlado por forças mecânicas, fatores de crescimento e citocinas.

Ao redor de cada osso compacto, existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico (células formadoras de osso), denominada periósteo, que consiste em duas camadas. A camada interna, próxima à superfície óssea, é mais rica em células principalmente precursoras de células ósseas, e um rico suprimento vascular, enquanto a camada externa é mais fibrosa. A superfície interna do osso compacto, assim como a do osso esponjoso são recobertas por uma camada única de células ósseas, o endósteo, que fisicamente separa a superfície óssea da medula óssea contida no seu interior (TEN CATE, 2001).

Segundo Garant (2003) as propriedades do osso são notáveis devido ao dinamismo do tecido em submeter-se a constante renovação em respostas a influências mecânicas, nutricionais e hormonais.

Junqueira e Carneiro (2004) apresentaram que histologicamente há duas variedades de tecido ósseo: o imaturo, ou osso primário, e o maduro, ou lamelar.

Durante o processo de formação do tecido ósseo, bem como no processo de reparo após fratura, traumatismo, ou cirurgia para implantes, o primeiro tipo de osso a surgir é o primário. Ele caracteriza-se como temporário e é substituído pelo osso lamelar. A regeneração óssea envolve os processos de osteogênese e de reabsorção, onde a reabsorção tem relação com a remoção do osso necrótico ou lesado, e com a remodelação do osso neoformado, especialmente na sua conversão de osso trabecular imaturo em osso lamelar. O osso trabecular imaturo possui fibrilas colágenas de diâmetros e orientações diversas, fato observado nas fases iniciais da osteogênese, tanto no embrião, como após a reparação de uma ferida no organismo pós-fetal.

Três tipos distintos de células ósseas são responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura, cada qual com sua função específica. Os osteoblastos são derivados das células osteoprogenitoras e responsáveis pela formação dos constituintes orgânicos da matriz óssea, os osteócitos, juntamente com os osteoblastos inativos, mantêm a matriz óssea e os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção da matriz óssea. O osteoclasto é auxiliado no processo de reabsorção, por macrófagos livres e citocinas emitidas por osteoclastos vizinhos (GARANT, 2003).

Os osteoblastos são células uninucleadas que sintetizam tanto colágeno quanto as proteínas não colagenosas da matriz óssea (matriz orgânica, osteóide). São responsáveis pela mineralização da matriz óssea neoformada e derivam de células mesenquimais multipotentes, geralmente considerados como se diferenciando de uma célula precursora, o pré-osteoblasto. Os osteoblastos formam uma camada celular sobre a superfície óssea em formação e acredita-se que constituem um osso membranoso que controla o fluxo de entrada e saída de íons no

osso. Quando o osso não se encontra mais em formação, os osteoblastos revestem a superfície óssea, tornam-se inativos e são denominados células de revestimento (GARG, 2004).

Buch et al. (1986) referiram que o ponto para identificação dos osteoblastos é a sua localização na proximidade da superfície do osso.

Os osteoblastos secretam a matriz óssea e alguns ficam aprisionados em lacunas, os osteócitos. O número de osteoblastos que se tornam osteócitos varia de acordo com a velocidade da formação do osso: quanto mais rápida a formação, mais osteócitos estão presentes por unidade de volume, sendo assim, o osso embrionário e osso de reparação possuem mais osteócitos que o lamelar (TEN CATE, 2001).

Bhaskar (1978) avaliou que os osteoclastos são células gigantes multinucleadas que freqüentemente estão instalados em lacuna de reabsorção da superfície óssea. O binômio neoformação óssea/reabsorção é controlado pela relação osteoblasto/osteoclasto. O componente mineral dos tecidos duros consiste de depósitos de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita de cálcio e trifosfato de cálcio amorfo.

2.2 Biologia dos enxertos ósseos autógenos

A reconstrução óssea utilizando enxertos ósseos autógenos desencadeia uma série de eventos que resultam na sua integração com o leito receptor e remodelação. Sendo assim, Burchardt (1987) relatou que o termo usado para descrever a reparação do transplante ósseo, de acordo com sua área de origem, é chamado de incorporação. O processo de incorporação é uma função do leito receptor e depende de um íntimo contato com o tecido doado, da seqüência de tempo e de um equilíbrio de processos independentes. As variáveis da incorporação são: proliferação de células osteoprogenitoras (células mesenquimais), diferenciação dessas células em osteoblastos, osteoindução, osteocondução e propriedades biomecânicas do enxerto. A incorporação também é dependente do metabolismo fisiológico do esqueleto e da idade do indivíduo.

Gazdag et al. (1995) classificaram os enxertos ósseos de acordo com: sua composição tecidual: (cortical ou esponjosa); suas características anatômicas; seu local de origem; tamanho e forma; a natureza de seu suprimento sangüíneo: (se vascularizado ou não); seu método de preservação: (fresco, congelado, congelado-seco); necessidade de manipulações químicas ou exposições: (desmineralizado, irradiado); e a disparidade genética entre doador e receptor: (autógeno, alógeno, xenógeno e isoenxerto). O enxerto autógeno é aquele que é transplantado de alguma parte de um indivíduo para outra parte no mesmo indivíduo. O enxerto alógeno é transplantado de um indivíduo a outro de mesma espécie, porém geneticamente diferentes. O enxerto xenógeno é transplantado de uma espécie para

outra espécie que são diferentes entre si. O isoenxerto é aquele que é transplantado entre indivíduos diferentes, de mesma espécie e geneticamente idênticos.

Garg (2004) relatou que o material de enxerto ideal deve transferir células ósseas com potencialidade funcional, incluindo osteoblastos e células da medula do osso trabecular em quantidade suficiente para a área receptora, que por sua vez, deve ter vascularização suficiente para nutrição, favorecendo a revascularização do enxerto. O enxerto também consiste em ilhas de mineralização de osso esponjoso, fibrina de coágulo sangüíneo com plaquetas sangüíneas em seu interior. O autor relaciona em ordem decrescente de disponibilidade de células ósseas dos sítios doadores autógenos: o íliaco posterior e anterior, a tíbia, a cabeça do fêmur, a sínfise mandibular, a calvária, a costela e a fíbula.

Hardesty et al. (1990) relatou que os aspectos que interferem no processo de reparação de um enxerto ósseo autógeno são inúmeros, desde a forma macroscópica, a revascularização, a origem embriológica, as diferenças arquiteturais bem como o preparo do leito receptor e a fixação rígida do enxerto.

Gazdag et al. (1995) avaliaram as atividades biológicas distintas do enxerto autógeno esponjoso, cortical não vascularizado, ou cortical vascularizado. O enxerto autógeno de osso trabecular ou esponjoso é o mais completo em suas propriedades em relação ao enxerto cortical, exceto no que diz respeito à resistência. O osso cortical apresenta resistência inicial superior ao esponjoso, porém a longo prazo, essa resistência se equipara. O osso esponjoso apresenta maior atividade osteocondutora, e é onde se encontra o maior número de células osteoprogenitoras. Osso cortical apesar da grande resistência inicial, tem baixa atividade osteocondutora e osteoindutora. O enxerto autógeno esponjoso é considerado "*Gold Standard*" (enxerto de ouro), material padrão, por possuir as cinco características

básicas de um enxerto ideal: células osteogênicas, é osteoindutivo, osteocondutivo, não imunogênico e não patogênico.

A incorporação do enxerto envolve diferentes fases, desde a inflamatória inicial até a completa remodelação. Um dos primeiros eventos é a angiogênese que acontece em resposta a fatores que promovem a proliferação e crescimento de capilares sanguíneos (PHILLIPS et al., 1992).

A revascularização é considerada um fator muito importante para o processo de incorporação do enxerto ósseo. A invasão vascular apresenta velocidade variável de acordo com a forma e a densidade do enxerto. Muitos autores relatam que a revascularização e conseqüentemente a reparação do osso esponjoso difere essencialmente daquela do osso cortical (ALBREKTSSON, 1980; GARG, 2004; HARDESTY, 1990; LOZANO et al., 1976; PINHOLT, 1994).

SALAGARAY & LOZADA (1993) descreveram a osteoindução como um fenômeno que envolve formação de tecido ósseo a partir de células mesenquimais não diferenciadas que produzem matriz, sob a influência de agentes indutores, normalmente emanados da matriz óssea já presente. É o processo de diferenciação das células mesenquimais tipo fibroblásticas em contato com a matriz óssea. Esse processo é hipoteticamente regulado por agentes químicos: polipeptídeos morfogênicos insolúveis (BMP), algumas enzimas específicas, alguns inibidores de enzimas, fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento dos derivados de plaquetas, fator de crescimento do tipo insulina e imunoglobulinas.

BURCHARDT (1987) descreveu a osteocondução como um processo de invasão de capilares e células osteoprogenitoras do leito receptor no material transplantado. Os transplantes podem ser não biológicos, com é o caso dos vidros, plásticos, cerâmicas, materiais biológicos não viáveis como osso seco congelado,

osso congelado e osso desproteínizado, ou ainda podem ser enxertos frescos vascularizados ou não. Na essência, a osteocondução depende da invasão passiva de osso novo como extensão do leito receptor.

2.3 Hormônio do crescimento humano (hGH)

2.3.1 Fisiologia do hormônio do crescimento humano

O hGH, também denominado hormônio somatotrópico, ou somatotropina, é uma molécula pequena de proteína que contém 191 aminoácidos em cadeia única, com peso molecular 22.005. Induz o crescimento de quase todos os tecidos do corpo que têm a capacidade de crescer. Age promovendo o aumento de tamanho das células e do número de mitoses, com o desenvolvimento de número aumentado de células e diferenciação específica de certos tipos celulares, como as células do crescimento ósseo e as células musculares imaturas (GUYTON; HALL, 2002).

Após o tratamento prolongado com hGH, ocorre uma modificação na composição do corpo, onde as proporções de proteínas e água são altas, enquanto a de gordura é baixa, portanto o hGH aumenta a composição protéica corporal, utiliza as reservas de gordura e conserva os carboidratos. O efeito do hGH ao promover a utilização da gordura, juntamente com seu efeito anabólico sobre as proteínas, produz aumento da massa corporal magra. O hGH potencializa quase todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas pelas

células, reduzindo, ao mesmo tempo, a degradação das proteínas. Há uma inter-relação entre a ação do hGH e a presença de carboidratos na dieta, assim como a presença de insulina. Tanto os carboidratos quanto a insulina são importantes por fornecer a energia necessária para o desenvolvimento músculo-esquelético (GOODMAN, 1974; GUYTON; HALL, 2002; MACEY, 1974).

O hGH também promove o aumento simétrico de partes moles acompanhando o crescimento do esqueleto. Os rins parecem sensíveis, embora não se sabe ao certo o mecanismo de ação do hGH sobre os rins. Com o tratamento prolongado existe um espessamento e excesso de crescimento da pele e ainda aumento de formação de colágeno. As vísceras em geral parecem aumentar de tamanho (esplancnomegalia). O timo e o tecido linfóide também podem se hipertrofiar (GOODMAN, 1974).

Foi constatado que o hGH induz o fígado e outros tecidos em grau bem menor a sintetizar várias proteínas pequenas, denominadas somatomedinas, que, por sua vez, têm o efeito potente de acentuar todos os aspectos do crescimento ósseo. Muitos dos efeitos das somatomedinas sobre o crescimento assemelham-se aos efeitos da insulina sobre o crescimento. Sendo assim, as somatomedinas IGF foram denominadas fatores de crescimento semelhantes à insulina (GUYTON; HALL, 2002).

Acredita-se que a maioria dos efeitos do hGH sobre o crescimento resulta da somatomedina C e de outras somatomedinas, e não dos efeitos diretos do hormônio sobre os ossos e outros tecidos periféricos. Uma possibilidade é de que o hGH também possa induzir a formação de somatomedina C no tecido local em quantidade suficiente para produzir o crescimento localizado. É também possível que o próprio hGH seja diretamente responsável pelo aumento do crescimento em

alguns tecidos e que o mecanismo da somatomedina constitua meio alternativo de aumentar o crescimento, embora nem sempre seja necessário (GUYTON; HALL, 2002).

De acordo com Guyton e Hall (2002) o hGH é secretado de modo pulsátil com aumento e diminuição da sua secreção. Vários fatores relacionados com o estado de nutrição do indivíduo, ou ao estresse, estimulam sua secreção:

1. Inanição, particularmente com grave deficiência de proteínas;
2. Hipoglicemia, ou baixa concentração de ácidos graxos no sangue;
3. Exercício;
4. Excitação;
5. Traumatismo;

A secreção do hGH aumenta nas primeiras 2 horas de sono profundo. A concentração normal de hGH no plasma do adulto situa-se entre 1,6 e 3 ng/ml e na criança ou adolescente é cerca de 6 ng/ml. Com freqüência, esses valores aumentam até 50 ng/ml após depleção das reservas corporais de proteínas ou carboidratos durante a privação prolongada de alimentos (PIRINEN, 1995).

Sabe-se que a secreção do hGH é controlada por dois fatores secretados pelo hipotálamo e transportados até a hipófise anterior, através dos vasos porta hipotalâmico-hipofisários. Esses dois fatores são: o hormônio de liberação do hormônio de crescimento e o hormônio de inibição do hormônio de crescimento (somatostatina). O núcleo hipotalâmico, que induz a secreção do hormônio de liberação do hGH, é o núcleo ventromedial, ou seja, a mesma área do hipotálamo que se mostra sensível ao nível de glicemia para produzir saciedade nos estados hiperglicêmicos e a fome nos estados hipoglicêmicos. A secreção da somatostatina é controlada por outras áreas próximas do hipotálamo. Ou seja, é possível que

alguns dos mesmos sinais que modificam os instintos comportamentais de alimentação do indivíduo também podem alterar a secreção do hGH, assim como os sinais hipotalâmicos relacionados às emoções, ao estresse e ao traumatismo podem afetar o controle hipotalâmico da secreção do rhGH (GUYTON; HALL, 2002).

Atualmente o hGH pode ser biossintetizado (rhGH) pela bactéria *Escherichia coli*, em decorrência da aplicação bem sucedida da tecnologia do DNA recombinante. Por conseguinte, esse hormônio está começando a se tornar disponível em quantidades suficientes para fins terapêuticos. Os indivíduos que apresentam deficiência pura do hormônio do crescimento podem ser completamente curados se forem tratados no início da vida. Além disso, o hormônio do crescimento humano pode ser benéfico em outros distúrbios metabólicos, em virtude de suas amplas funções metabólicas (PIRINEN, 1995).

Nos indivíduos que perderam a capacidade de secretar hormônio de crescimento, o processo de envelhecimento fica acelerado. O envelhecimento parece resultar principalmente na deposição diminuída de proteínas na maioria dos tecidos do corpo com aumento da deposição de gordura em seu lugar. Os efeitos físicos e fisiológicos consistem em um maior enrugamento da pele, intensidade diminuída do funcionamento de alguns órgãos e redução da massa e da força muscular. À medida que ocorre o envelhecimento ocorre também uma diminuição fisiológica da concentração plasmática do hGH. Muitos testes de terapêutica com rhGH em indivíduos idosos demonstram 3 importantes efeitos que sugerem ações antienvelhecimento: 1 – aumento da deposição de proteínas no corpo, particularmente nos músculos; 2 – diminuição dos depósitos de gordura; 3 – sensação de aumento de energia (RUDMAN et al., 1990).

A quantidade excessiva do hGH influencia na mobilização de gordura do tecido adiposo, resultando em formação de uma grande quantidade de ácido acetoacético pelo fígado, que é liberada nos líquidos corporais, com o conseqüente desenvolvimento de cetose. Essa mobilização excessiva da gordura do tecido adiposo também provoca, freqüentemente, esteatose hepática. Os efeitos do hGH são denominados diabetogênicos, e a secreção excessiva do hGH pode provocar distúrbios metabólicos muito semelhantes aos observados em pacientes com diabetes tipo II, que também são muito resistentes aos efeitos metabólicos da insulina. O aumento induzido pelo hormônio do crescimento da concentração sangüínea de ácidos graxos pode comprometer as ações da insulina sobre a utilização da glicose nos tecidos (GUYTON; HALL, 2002; RUDMAN et al., 1990).

Os efeitos colaterais devido ao uso de rhGH estão diretamente relacionados à quantidade excessiva e ao uso prolongado (GOODMAN, 1974; GUYTON; HALL, 2002; MACEY, 1974).

2.3.2 Efeitos no tecido ósseo

Isaksson et al. (1982) fizeram um experimento com uso local de hormônio de crescimento humano biossintetizado (rhGH) em tíbias de ratos hipofisectomizados e obtiveram resultados com efeitos estimulatórios significantes no crescimento ósseo acumulado longitudinal. Também mencionaram que a produção de somatomedinas é conseqüência da ação do rhGH em vários tecidos.

Isaksson et al. (1987) fizeram uma revisão da literatura a fim de discutir os mecanismos celulares através do qual o rhGH estimula o crescimento ósseo. Os autores sugeriram que rhGH estimula diretamente a diferenciação celular de precondrócitos ou células diferenciadas jovens. Durante o processo de diferenciação celular, as células estimuladas pelo rhGH se tornam responsáveis pelo fator de crescimento insulínico (IGF-I).

Concomitantemente, a codificação do gene para IGF-I é expressa através de resultados do aumento da síntese de IGF-I na diferenciação celular. O IGF-I produzido localmente é exteriorizado e subsequentemente interage com receptores na proliferação de condrócitos por mecanismo autócrino ou parácrino. Os autores enfatizaram que o rhGH estimula o crescimento ósseo longitudinal diretamente através da diferenciação de células precursoras da placa de crescimento da epífese e indiretamente por aumentar a receptividade do IGF-I e aumentar a produção local de IGF-I que estimula a expansão clonal da diferenciação de condrócitos.

Kassen et al. (1993) enfatizou que o rhGH exerce um papel muito importante no crescimento ósseo longitudinal pós-natal.

Pirinen (1995) relatou que o rhGH é um hormônio anabólico que exerce funções em vários órgãos, principalmente no crescimento de cartilagem. O autor acredita que muitos dos efeitos no osso e no crescimento linear são mediados pelo IGF-I.

O rhGH age diretamente nos osteoblastos, estimulando sua proliferação, a atividade alcalina fosfatase e a síntese de colágeno tipo I, seguidos da estimulação da formação óssea. Sendo que esses efeitos estimulatórios são pelo menos em parte, via de aumento da produção de IGF-I e IGFBP-5 (fator de crescimento insulínico transformador de proteínas). O rhGH estimula a reabsorção óssea osteoclástica através da ação direta e indireta na diferenciação dos osteoclastos e por meio da ativação indireta de osteoclastos maduros, possivelmente via estroma celular, incluindo osteoblastos, IGF-I e/ou IGFBP-5 que estão envolvidos na estimulação do rhGH na reabsorção óssea (CHIHARA; SUGIMOTO, 1997).

Ohlsson (1998) fez uma revisão da literatura com a proposta de coletar dados recentes que indiquem a importância do rhGH na regulação da remodelagem óssea. Nesse artigo o autor relatou que o rhGH é o hormônio mais importante no crescimento ósseo longitudinal, pois, estimula o crescimento de cartilagem e outros tecidos pelo aumento tanto do número quanto do tamanho das células. Exerce ação direta nos osteoblastos e osteoclastos sendo capaz de estimular a formação óssea devido à interação direta com o tecido ósseo. O autor concluiu que o tratamento com rhGH aumenta a massa óssea em adultos com deficiência desse hormônio e que estudos clínicos futuros deverão determinar como alguns pacientes com massa óssea diminuída por outros motivos poderão ser beneficiados através do tratamento unicamente com rhGH ou combinado com outros tratamentos.

2.3.3 Estudos pré-clínicos

Back et al. (1990) fizeram um estudo com 90 ratos fêmeas, com 3 meses de idade, separados em 6 grupos, que receberam doses diárias divididas em duas aplicações de rhGH de 0,08 mg/kg, 0,4 mg/kg, 2 mg/kg e 10 mg/kg. Foram realizadas injeções subcutâneas na parte posterior do pescoço, iniciadas uma semana antes da fratura do osso da tibia. Os autores concluíram que rhGH exerceu função importante na reparação das fraturas em doses elevadas e que a administração em duas aplicações diárias é importante para o aumento percentual da reparação das fraturas assim como pelo aumento da massa corpórea.

Nielsen et al. (1991) avaliaram em 65 ratos fêmeas a influência da administração de rhGH nas 3 primeiras semanas de reparação de fraturas na tibia. Foram administradas doses de 2,7 mg/kg divididas em duas aplicações diárias por períodos de 1, 2 e 3 semanas após as fraturas. O presente estudo mostrou que houve diferenças significativas na resistência das fraturas no período de administração de rhGH por 2 ou 3 semanas e que a administração de rhGH não pode ser menor que esse período com a dose e a frequência administradas neste estudo.

Back et al. (1991) estudaram em ratos fêmeas a influência do rhGH administrados durante todo o período da reparação das fraturas em tíbias, durante os primeiros 20 dias e durante os últimos 20 dias. Foram administradas doses de 2,7 mg/kg em duas aplicações diárias. Os resultados mostraram que rhGH estimula

reparação de fraturas quando administrados na primeira parte do período de reparação ou durante todo o período.

Aspenberg et al. (1994) avaliaram a incorporação de enxerto ósseo alógeno durante tratamento com rhGH em ratos fêmeas. Os blocos foram removidos de 10 ratos fêmeas, passaram por processo de congelamento a 70°C e foram enxertados em compartimentos implantados na tibia de 20 ratos fêmeas divididos em dois grupos. Um grupo recebeu injeções intraperitoneal de 1.5 IU de rhGH duas vezes ao dia e o outro grupo recebeu soro fisiológico. As injeções foram iniciadas no dia da cirurgia. Amostras de sangue foram coletadas com 3 e 6 semanas para analisar IGF-I por radioimunescência usando anticorpos policlonais. Após 6 semanas os ratos foram sacrificados e as amostras coletadas para análise. O grupo que recebeu injeções de rhGH teve a concentração de IGF-I maior e ganhou peso em 39% em relação a 8% do grupo controle. A tibia do lado não operado ficou mais longa no grupo tratado com rhGH, porém a tibia que recebeu o enxerto não teve diferença significativa em relação ao grupo controle. Os resultados mostraram pequeno efeito do rhGH sistêmico na incorporação de enxerto ósseo alógeno.

Andreassen et al. (1995) investigaram como a administração de rhGH por 80 dias influencia a formação, força mecânica e a composição do osso cortical em ratos com 2 anos de idade. Fizeram um estudo com 51 ratos machos divididos em 4 grupos, sendo que 3 grupos receberam 2.7 mg/kg em duas injeções diárias por 20, 40 e 80 dias e o quarto grupo foi o controle que recebeu soro fisiológico. Os animais foram sacrificados 80 dias após o início da administração de rhGH. Foram feitos testes mecânicos, avaliaram a aparência histológica da formação óssea, a densidade e concentração da diáfese femoral óssea, peso dos músculos, IGF-I, hormônio de crescimento do rato e tiroxina. Os autores concluíram que é possível

induzir formação de novo osso subperiosteal em ratos de idade avançada através da administração de rhGH, onde normalmente ocorreria uma pequena formação óssea. O endóstio e as trabéculas do osso cortical não foram afetados pelo rhGH. Os níveis de Tiroxina e IGF-I encontrados foram correspondentes aos normalmente encontrados em ratos adultos jovens. O novo osso depositado é organizado da mesma forma que as lamelas concêntricas do osso remanescente e com a mesma força mecânica.

Lo et al. (1995) avaliaram o efeito do rhGH, em reparação de fraturas desfavoráveis em coelhos, com enxerto percutâneo de células ósseas medulares autógenas. Fizeram a pesquisa com 32 coelhos adultos New Zealand, separados em dois grupos de 16. Um grupo recebeu injeções subcutâneas de rhGH (Norditropin, Nordisk Gentofle A/S, Copenhagen, Denmark) na dose de 0,3 IU/kg/dia em duas aplicações diárias, enquanto o outro grupo recebeu 2 injeções diárias de soro fisiológico. O tempo total das injeções de ambos os grupos foi de 2 semanas após o enxerto de medula. Num período de 4 semanas foi feito o sacrifício de 7 animais de cada grupo e o restante após 7 semanas. Os autores concluíram que o efeito estimulatório dos fatores das células da medula juntamente com o rhGH, faz da técnica de enxerto de medula percutâneo, o método de escolha para promover osteogênese.

Hedner et al. (1996) estudaram em 93 ratos machos, a administração local e sistêmica, dentre outras substâncias, do hormônio do crescimento humano (rhGH; Genotropin, Lot 66138 A5; 2.0 IU/mg) combinado com membranas e-PTFE (GORE-TEX) na estimulação da reparação óssea. Fizeram incisão extra-oral submandibular e produziram defeitos transósseos de 5 mm na região do ângulo da mandíbula. Colocaram membranas tanto na vestibular quanto na lingual. Nos experimentos com

administração local, cada grupo continha 6 ratos e os defeitos foram feitos em ambos os lados, direito e esquerdo. A administração local do rhGH foi feita por catéteres através de um dispositivo, que força para dentro os fluidos numa direção única, colocado na região do defeito ósseo, somente pelo lado vestibular. No defeito do lado direito da mandíbula foi injetado o rhGH (0.2, 2 ou 20 µg/dia), e no defeito do lado esquerdo da mandíbula foi injetado apenas solução salina. Os resultados foram avaliados após 4 semanas de cicatrização. Quando o rhGH foi administrado localmente, observaram uma clara atividade estimulatória de regeneração óssea, com resultados estatisticamente significantes para as doses de 2 e 20 µg/dia. Os autores concluíram que essa técnica é viável para promover cicatrização óssea e que a estimulação do rhGH não é limitada apenas a ossos de origem endocondral. Esse estudo enfatizou que o rhGH exerce efeito específico e direto no tecido ósseo.

Harvey e Hull (1997) relataram que o rhGH é considerado um fator de crescimento local por não ter somente efeito endócrino, mas também parácrino e autócrino.

Cacciafesta et al. (2001) com o objetivo de avaliar a regeneração óssea guiada e a força mecânica em defeitos de calvária, em ratos, cobertos com membrana e-PTFE simultaneamente com administração sistêmica de rhGH, fizeram um estudo com 40 ratos fêmeas com 12 meses de idade. Os ratos foram divididos em dois grupos de 20. Um grupo foi tratado sistemicamente com injeção de rhGH subcutaneamente, com a dose de 1,35 mg/kg em duas aplicações diárias por 28 dias. O outro grupo foi tratado com placebo. Os resultados mostraram que a carga máxima foi aumentada em 151% no grupo tratado com rhGH e a rigidez máxima em 97% quando comparadas com o grupo de ratos que foi injetado placebo. O peso do tecido congelado foi maior em 186% no grupo tratado com rhGH e o peso das cinzas

em 250%. Os resultados radiográficos revelaram que o grupo tratado com rhGH mostrou um número significativamente maior de animais com um ou ambos os defeitos fechados do que o grupo tratado com placebo e a análise da tomografia computadorizada revelou que o volume de osso neoformado é duas vezes maior no grupo tratado com rhGH. O estudo concluiu que a administração sistêmica de rhGH é capaz de aumentar a regeneração óssea e a força mecânica na cicatrização de defeitos críticos, em calvária de ratos, cobertos com membranas e-PTFE.

Tresguerres et al. (2002) com a finalidade de avaliar o efeito de uma dose única de 4 IU de rhGH (Saizen® Serono, Madrid, Spain) no osso periimplantar colocada durante o procedimento cirúrgico para instalação de um implante, fizeram uma pesquisa com 8 coelhos osteoporóticos. Os coelhos foram submetidos à cirurgia para instalação de 1 implante em cada tíbia. Foram separados em grupo teste, que receberam tratamento com rhGH em pó liofilizado no local da inserção do implante e grupo controle, onde nenhum tratamento foi feito. Os animais foram sacrificados após 14 dias. Os autores concluíram que a administração local única de rhGH pode aumentar a síntese osteóide e a mineralização ao redor da camada de titânio em animal osteoporótico.

Tresguerres et al. (2003) avaliaram o efeito do uso local de rhGH no osso periimplantar formado ao redor de implantes colocados em tíbia de coelhos. Os autores fizeram um estudo com 8 coelhos divididos em dois grupos, sendo que no grupo teste (04 coelhos), após a osteotomia do osso da tíbia para receber o implante, foi colocado 4 IU de rhGH em pó liofilizado (Saizen, Serono Laboratories, Madrid, Spain) antes da instalação do implante e no outro grupo (controle), os implantes foram instalados sem a presença de qualquer substância. Após 2 meses, os implantes foram instalados sem a presença de qualquer substância. Após 2 meses, os animais foram sacrificados e foram realizadas as análises microscópicas e

histomorfométricas. Os resultados mostraram que o grupo que recebeu rhGH apresentou crescimento ósseo aumentado no tecido periosteal e maior contato entre osso e implante do que no grupo controle. Os autores concluíram que a administração local de uma dose única de rhGH estimulou maior efeito do que os relatos na literatura com uso de administração sistêmica e o crescimento ósseo foi observado tanto por parte do perióstio quanto do endóstio.

Tresguerres et al. (2005) avaliaram a influência da administração local do rhGH na formação óssea periimplantar ao redor de implantes de titânio colocados na tíbia de coelhos jovens. Para esse estudo, foram usados 32 coelhos, separados em grupo teste e controle. Foi colocado 1 implante no lado medial de cada tíbia dos coelhos, sendo que no grupo teste os locais osteotomizados para receberem os implantes, foram tratados com 1.2 mg de rhGH em forma de pó liofilizado (Saizen, Serono Laboratories, Madrid, Spain) e no grupo controle, nada foi aplicado. Foram sacrificados 4 animais de cada grupo, para avaliação após 1, 2, 3 e 6 semanas das cirurgias. Os resultados sugeriram que a administração local do rhGH pode estimular a fase inicial do processo de remodelação no grupo teste.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar os efeitos do uso local do hormônio do crescimento humano biossintetizado (rhGH), associado ao enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos, mediante análises microscópica e estatística da histomorfometria.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Material permanente

- a. 01 motor elétrico Nobel Biocare®¹
- b. 01 peça reta cirúrgica Kavo®²
- c. 01 broca tronco cônica nº 701 Komet®³
- d. 01 broca esférica Komet®³
- e. Instrumental cirúrgico
- f. 01 Kit cirúrgico para instalação de parafusos de fixação Neodent®⁴

¹ São Paulo, Brasil

² Joinville, Brasil

³ Lesell Coml. Imp. Exp. e Repres. Ltda., Santo André, Brasil

⁴ Curitiba, Brasil

4.1.2 Material de consumo

- a. 24 parafusos para fixação dos enxertos Neodent®¹
- b. 24 embalagens de soro fisiológico de 250 ml estéril Áster®²
- c. 24 kits cirúrgicos estéreis Alva Doctor's®³
- d. 72 pares de luvas estéreis para cirurgião e auxiliar
- e. 96 fios de sutura 5.0 mononylon com agulha de 1,7 cm Johnson & Johnson®⁴
- f. 48 lâminas de bisturi número 15 C
- g. 24 sugadores cirúrgicos estéreis descartáveis INDUSBELLO®⁵
- h. 60 pacotes com compressas de gaze estéreis

¹ Curitiba, Brasil

² Prod. Méd. LTDA, Sorocaba, Brasil

³ São Paulo, Brasil

⁴ Prod. Prof. LTDA São José dos Campos, Brasil

⁵ Ind. Inst. Odont. LTDA, Londrina, Brasil

4.1.3 Drogas utilizadas

- a. Cloridrato de Quetamina (10mg/kg – Francotar®¹)
- b. Antibiótico - Penicilina Benzatina (40000 UI a cada 48 horas por 07 dias)²
- c. 48 tubetes de anestésico local Lidocaína HCl 2% com epinefrina 1:100.000 (1,8ml)³
- d. Dipirona Sódica (0,25mg/kg)⁴
- e. Água para injeção – WPI⁵
- f. 1 caneta injetora com 3 cartuchos de 16 UI= 5,3mg de hormônio de crescimento humano (Norditropin®)⁶
- g. Solução de iodo Povidine 1%⁷
- h. Midazolan⁸

¹ Virbac do Brasil Ind. E Com., Roseira – Brasil

² Prodotti, Campinas – Brasil

³ DFL Ind. Com. Ltda, Rio de Janeiro – Brasil

⁴ Fort Dodge, Campinas – Brasil

⁵ Lab. Sanobiol Ltda, Pouso Alegre – Brasil

⁶ Norditropin, Nordisk Gentofle A/S, Copenhagen, Denmark

⁷ DGL, São Paulo, Brasil

⁸ Fenelon, São Paulo - Brasil

4.2 Método

4.2.1 Animais

Foram selecionados 24 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça New Zealand, fêmeas, com idade entre 4 e 6 meses, pesando aproximadamente 3 kg, sendo separados aleatoriamente em dois grupos: Teste (T2, T6 e T8) e Controle (C2, C6 e C8). Os coelhos foram fornecidos e mantidos pelo biotério da Universidade de Santo Amaro (UNISA), onde foram acondicionados em gaiolas com ventilação e temperaturas controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Os animais passaram por um período de climatização e foram alimentados com ração Nutriara e água administrada *ad libitum*. A higienização das gaiolas foi realizada de acordo com as normas do biotério do Unitox sendo realizada a troca da maravalha estéril diariamente.

A pesquisa foi registrada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA de acordo com o parecer número 108/2005 em 31 de agosto de 2005 (em anexo). Este trabalho foi realizado de acordo com os “Princípios Éticos de Experimentação Animal”, elaborada pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao Internacional Council of Laboratory Animal Science (ICLAS), com base em “Normas Internacionais para Utilização de Animais em Pesquisa” que se apresentam com base na tríade: “Sensibilidade, Bom Senso e Boa Ciência”.

4.2.2 Anestesia e preparo dos animais

Os animais foram pesados para que fosse realizado o cálculo das doses (mg/kg) utilizadas para cada animal.

A indução da anestesia geral foi realizada, por via intramuscular na parte posterior da coxa, com Quetamina 10 mg/kg, Midazolam 0,5 mg/kg. A manutenção da anestesia foi realizada através da Quetamina.

Para monitorar o tempo da anestesia foram avaliados os seguintes parâmetros: a) Relaxamento muscular: visto pelo relaxamento mandibular; b) diminuição da frequência cardíaca e respiratória; c) Reflexos: Podal – ausência de reflexo de retirada ao estímulo doloroso realizado pelo pinçamento da membrana interdigital; Auricular – ausência de resposta motora ao pinçamento da base da orelha.

Após a anestesia, os coelhos foram submetidos à tricotomia da região da crista ilíaca do lado direito e da face lateral da mandíbula. Foi realizada uma antissepsia com escovas estéreis embebidas em solução degermante de iodopovidona nas duas regiões tricotomizadas. Para a assepsia durante a cirurgia, foram colocados campos estéreis sobre o coelho, expondo apenas as áreas cirúrgicas. A oxigenação dos coelhos durante todo o procedimento foi realizada através de uma máscara inalatória.

4.2.3 Procedimento Cirúrgico

As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Técnicas Cirúrgicas da Universidade de Santo Amaro em local com condições apropriadas, visando manutenção da cadeia asséptica. Realizou-se a infiltração local do anestésico à base de Cloridrato de Lidocaína a 2% com Epinefrina no volume de 1,8 ml/região na área doadora (crista ilíaca) e na área receptora (face lateral da mandíbula), para efeito de redução de sangramento, menor indução anestésica e maior conforto para os animais.

Houve um cuidado para se padronizar o local da incisão, na porção mais superior da crista ilíaca a fim de não ter a interferência da musculatura da região tanto na incisão quanto no descolamento e facilitar o afastamento para a realização da osteotomia. Sendo assim, foi feita a localização digital da crista ilíaca e uma incisão de aproximadamente 3 cm com uma lâmina de bisturi nº 15 na pele, tecido subcutâneo e muscular e o descolamento dos tecidos realizados até a exposição da superfície óssea.

Uma vez exposto o osso, dois afastadores foram usados para manter os tecidos afastados durante a osteotomia com fresa e refrigeração com solução salina estéril. Após a osteotomia de um bloco de 5 a 7 mm de comprimento e 5 mm de largura, foi realizada uma perfuração no centro do bloco com fresa de 1.6 mm de diâmetro. O bloco foi removido do leito doador com um descolador cirúrgico e colocado num recipiente estéril com tampa e um pouco de solução salina estéril nos grupos controle (C2, C6 e C8) e 0,85 mg de hormônio de crescimento humano biossintetizado (rhGH) nos grupos teste (T2, T6 e T8). Posteriormente a uma incisão

extra-oral na região do bordo da mandíbula e descolamento de um retalho de espessura total, esse bloco foi parafusado sobre a face lateral da mandíbula, medialmente ao forame mentual com parafuso de titânio de 1.6 mm de diâmetro e 4 mm de comprimento.

As suturas do plano muscular e da pele foram realizadas com fio mononylon 5.0.

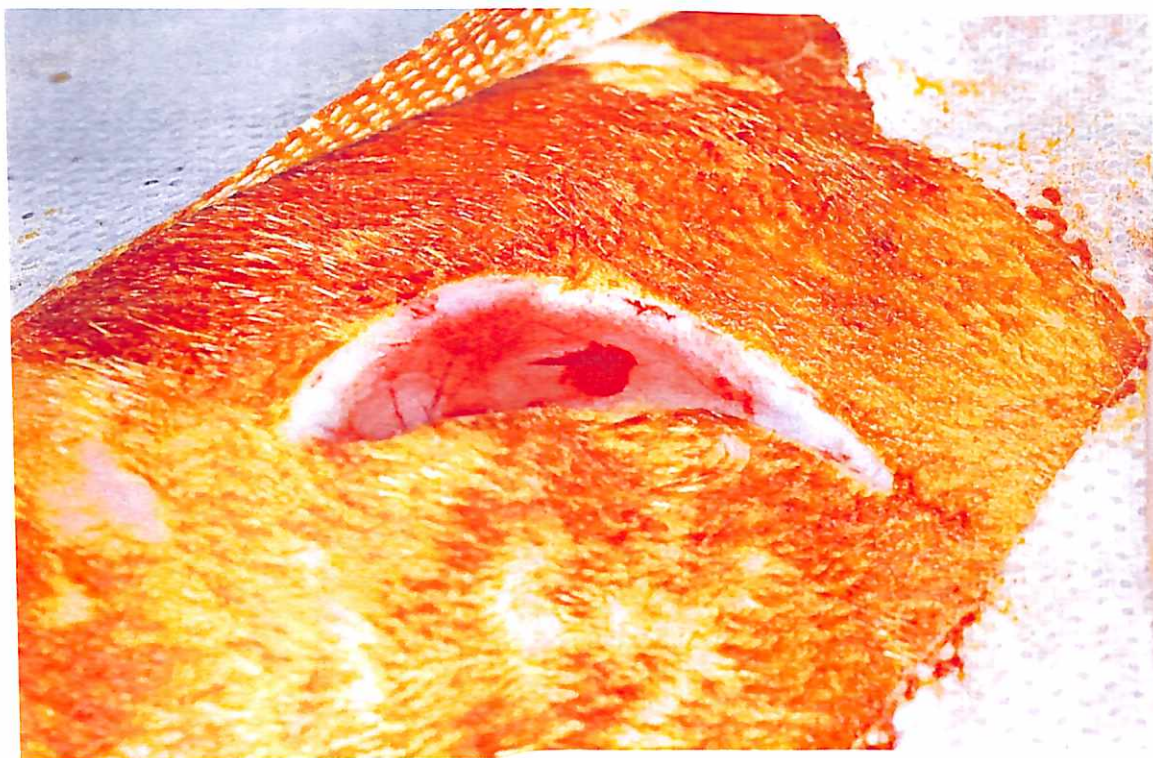


Figura 01: Incisão na pele da área doadora.

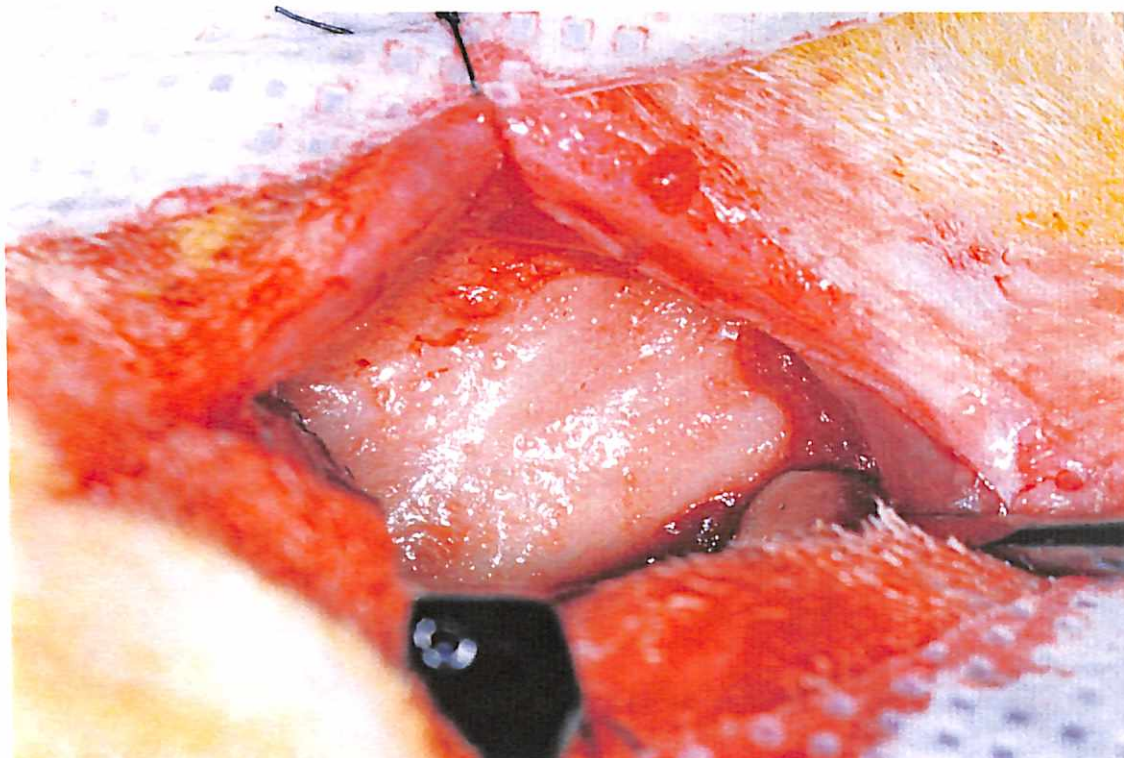


Figura 02: Incisão no tecido subcutâneo e muscular e descolamento dos tecidos realizados até a exposição da superfície óssea na área doadora.

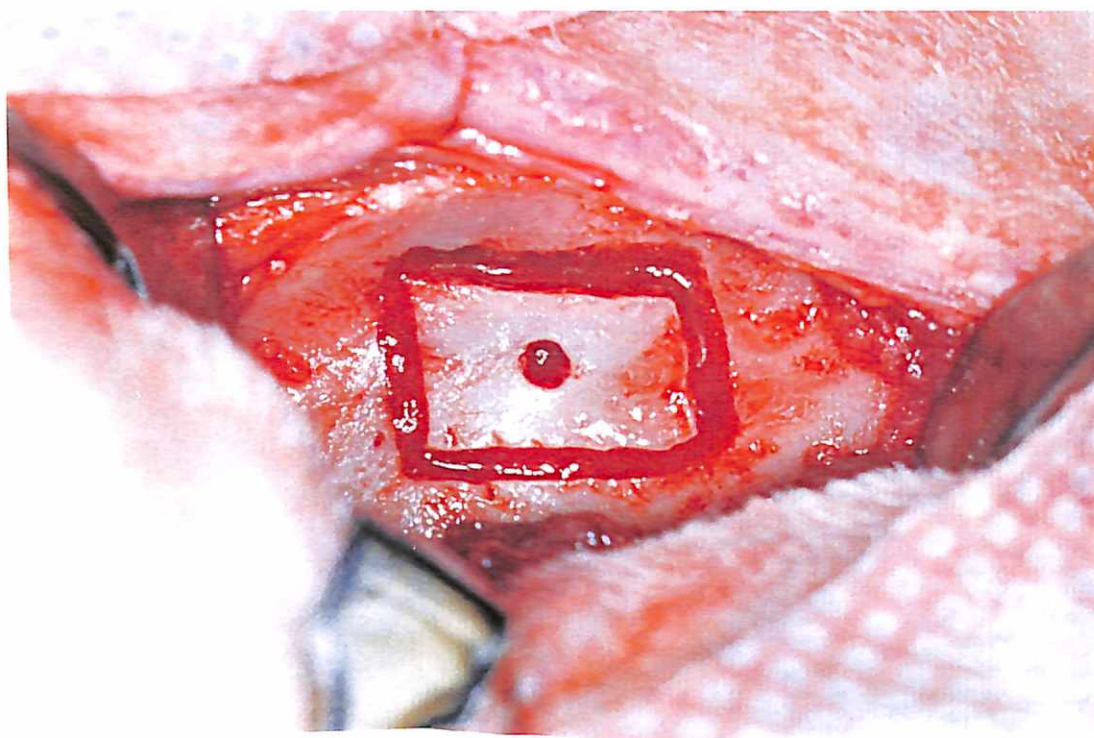


Figura 03: Bloco ósseo osteotomizado no leito doador. Observa-se a perfuração no centro para a fixação do parafuso.

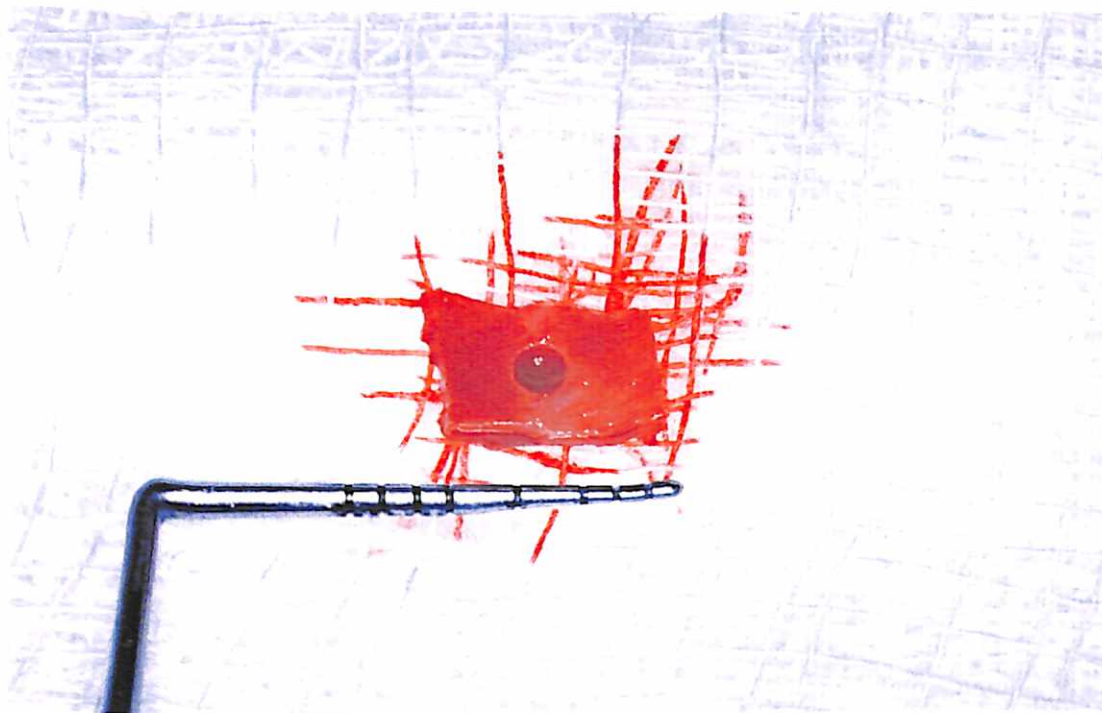


Figura 04: Bloco ósseo osteotomizado após remoção do leito doador.



Figura 05: Caneta injetora de rhGH usada no grupo teste.

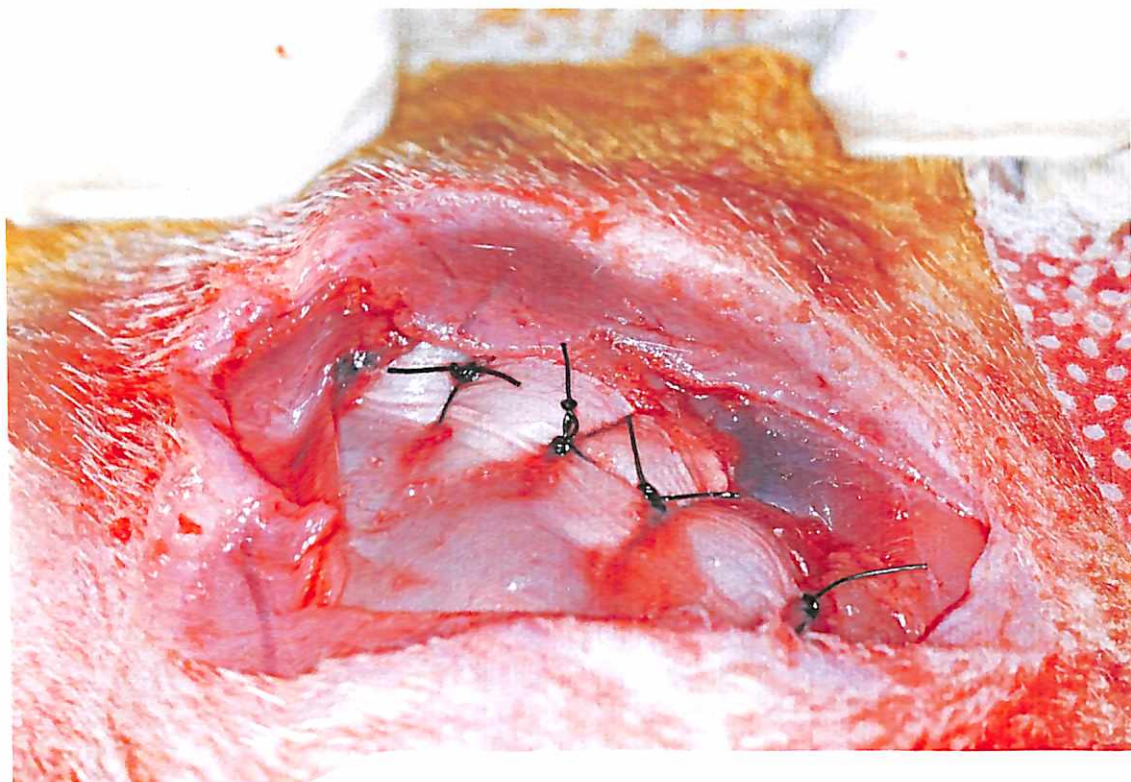


Figura 06: Sutura do plano muscular da área doadora.



Figura 07: Sutura da pele da área doadora.



Figura 08: Incisão da pele na área receptora.

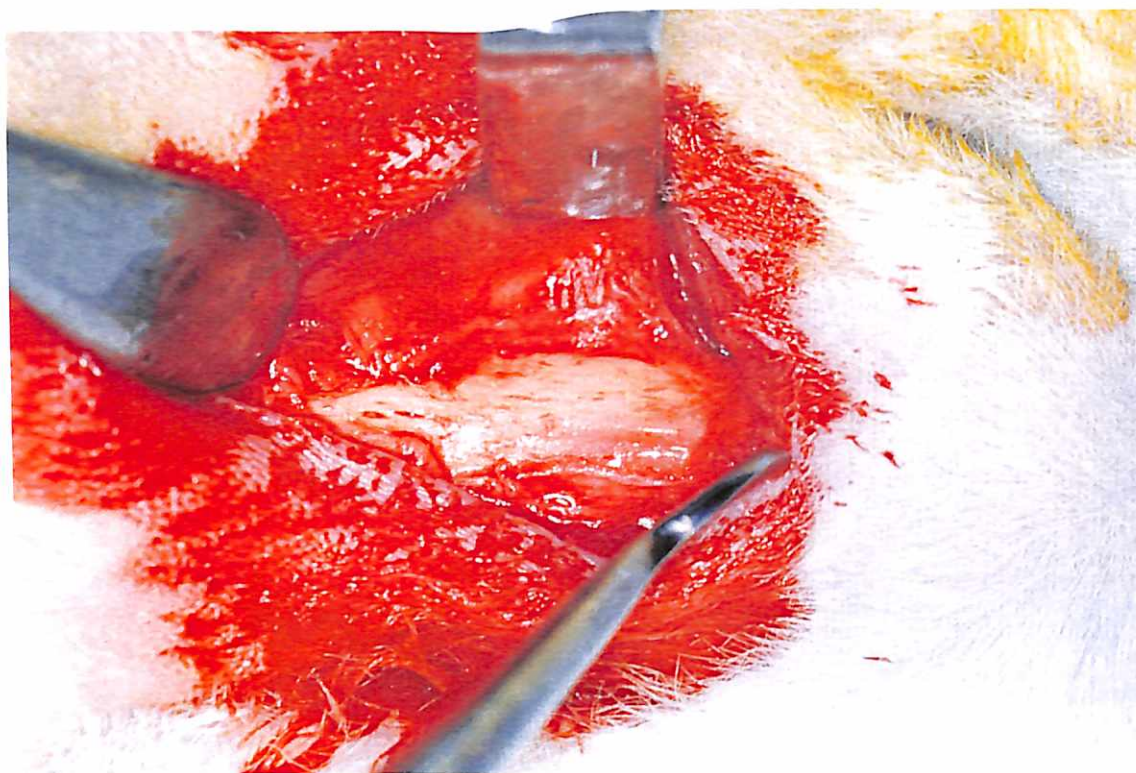


Figura 09: Incisão no tecido subcutâneo e muscular e descolamento dos tecidos até a exposição da superfície óssea na área receptora.

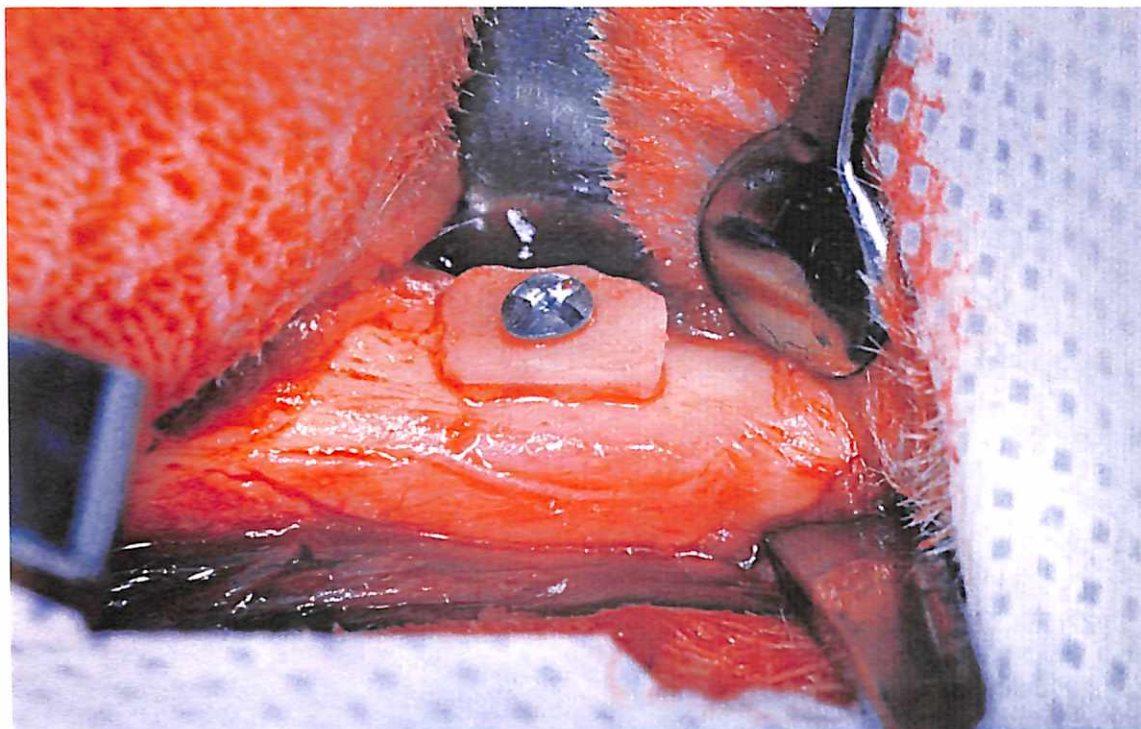


Figura 10: Bloco osteotomizado parafusado no leito receptor.

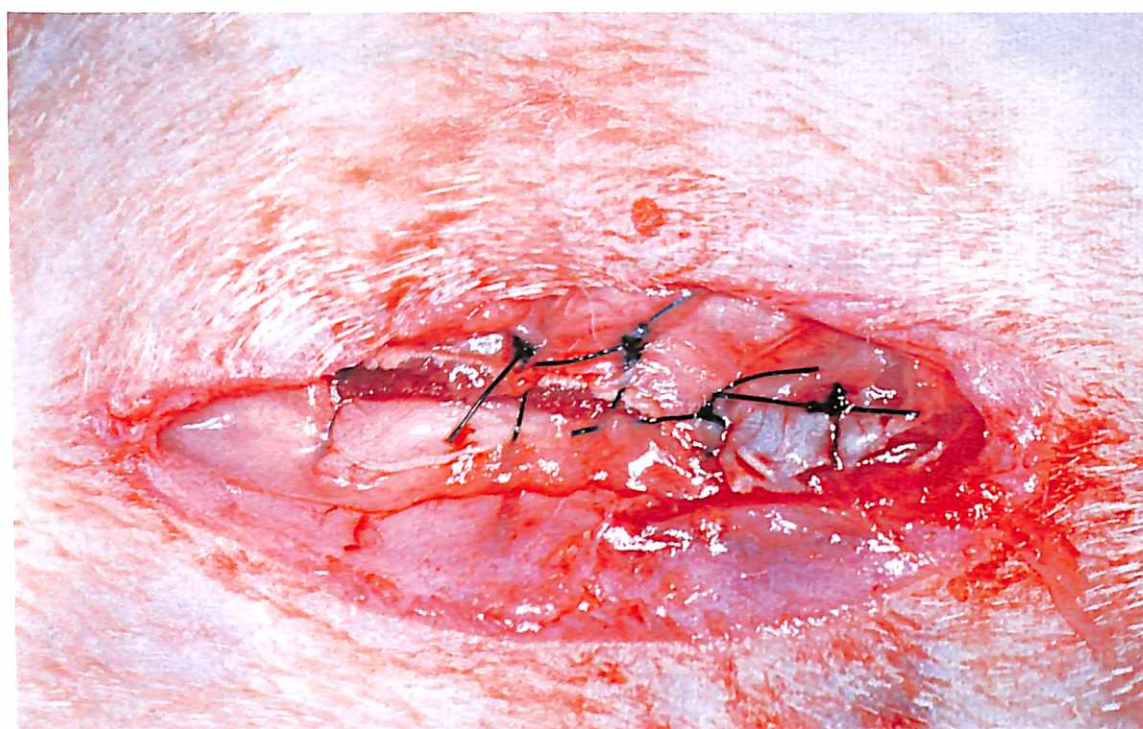


Figura 11: Sutura do plano muscular da área receptora.



Figura 12: Sutura da pele da área receptora.

4.2.4 Controle pós-operatório

A terapêutica medicamentosa utilizada foi a seguinte:

- Antibiótico: Penicilina Benzatina 40.000 UI a cada 48 horas por 07 dias;
- Analgésico: Dipirona Sódica 0,25 mg/Kg;

4.2.5 Análise Histológica

4.2.5.1 Períodos de observação e preparação dos espécimes para a microscopia de luz

Decorridos 02, 06 e 08 semanas, 04 coelhos dos grupos controle (C2, C6 e C8) e teste (T2, T6 e T8) foram sacrificados, utilizando-se a técnica preconizada pelo COBEA, por meio de superdose de anestésico geral. As peças, contendo o bloco ósseo enxertado, foram removidas e fixadas em formol a 10% por 72 horas. Em seguida, as amostras foram descalcificadas com solução de ácido nítrico a 20% por um período médio de 2 semanas, processadas e incluídas em parafina. Imediatamente após, foram realizados cortes microscópicos com 5 μ m de espessura. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e os cortes histológicos foram analisados por meio de microscopia de luz.

4.2.5.2 Análise histomorfométrica

Para a realização da análise histomorfométrica, foi utilizado o método estereológico, que consiste em determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de cortes histológicos através da geometria e estatística. Os métodos estereológicos se baseiam em princípio geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade de as imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidirem com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal nesses métodos está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem. Esse fato foi realizado por meio da aplicação de procedimentos de escolha aleatória em todos os estágios do experimento, tais como: seleção dos animais, dos blocos histológicos, das lâminas histológicas, dos cortes e campos microscópicos (GOMES *et al.*, 2002; CARVALHO *et al.*, 2004).

Os fragmentos do bloco ósseo enxertado foram submetidos a cortes histológicos semi-seriados, sendo obtido 6 lâminas histológicas/animal. Dentre essas lâminas, três foram separadas aleatoriamente, sendo cinco campos histológicos, obtidos longitudinalmente na região central da interface (Figura 13), avaliados pelo programa Axiovision 4.4 (Carl Zeiss Vision Imaging Systems, Carl Zeiss, Alemanha). Para o procedimento de mensuração, foram utilizadas a objetiva 20x/0,25 (ACHROPLAN, Carl Zeiss) e ocular 10x (W-PI, Carl Zeiss) de um microscópio de luz (Axioskop 40, Carl Zeiss, Alemanha). As imagens foram captadas por uma câmera digital (AxioCam MRc5, Carl Zeiss, Alemanha), correspondendo uma área de 0,14 mm², onde se analisou a densidade óssea de trabéculas ósseas neoformadas presentes na região entre o bloco ósseo enxertado e o leito receptor, denominada região de interface, nos grupos controle e teste em todos os períodos de observação.

Essa metodologia foi realizada no Centro de Biociências CEBAPE / UNESP.

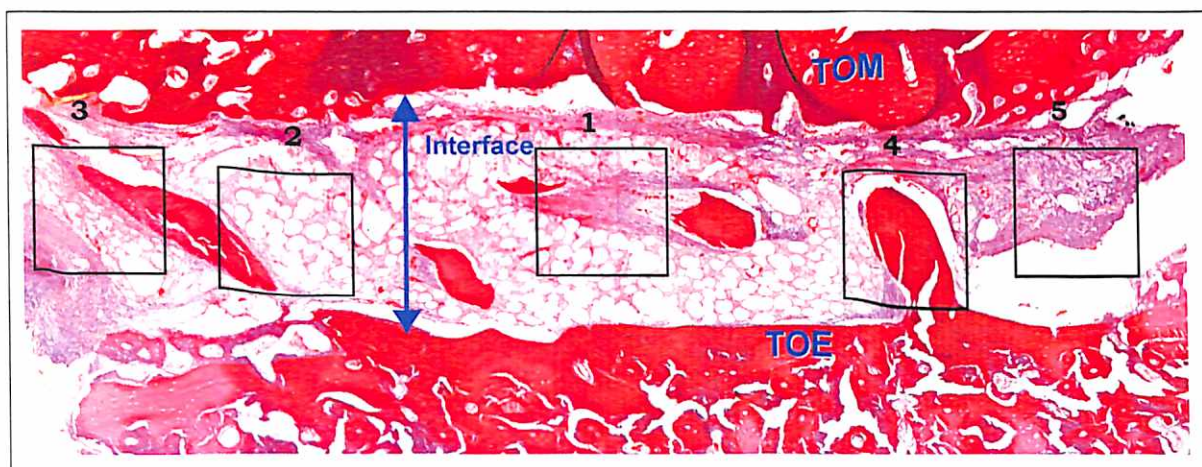


Figura 13 - Representação esquemática da análise histomorfométrica da região central da interface (I), região entre a superfície do tecido ósseo da mandíbula (TOM) e tecido ósseo enxertado (TOE). (H.E.; aumento original 50x).

4.2.6 Análise da estatística

Os resultados da histomorfometria da densidade óssea foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey (GraphPad Prism version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). O nível de significância adotada será de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Histológica

Grupo Controle

Em 2 semanas, observava-se que havia presença de tecido conjuntivo osteogênico, trabéculas ósseas imaturas e medula óssea. A matriz óssea neoformada estendia-se das paredes ósseas do enxerto e leito para a região central da interface. Observávamos que havia maior quantidade de tecido conjuntivo osteogênico do que trabéculas ósseas neoformadas (Figura 14A).

Em 6 semanas, a região de interface estava presente, exibindo ainda tecido conjuntivo osteogênico. Além disso, observávamos a substituição dessa região por trabéculas ósseas neoformadas e medula óssea. O enxerto ósseo encontrava-se circundado por periósteo, em algumas regiões, notávamos sua substituição por tecido ósseo neoformado (Figura 16A).

Em 8 semanas, notávamos a formação de nova cortical óssea na mandíbula. O espessamento desta cortical era maior quando comparada com a cortical óssea adjacente ao leito receptor. Além disso, notávamos que a cortical externa (tecido ósseo enxertado) apresentava-se com aspecto tanto imatura quanto madura.

Grupo Teste

Em 2 semanas, notava-se que o enxerto ósseo não mostrava alteração em sua arquitetura óssea. O tecido conjuntivo osteogênico mostrava-se bem celularizado, rico em células osteogênicas e osteoblastos. As trabéculas ósseas neoformadas estavam bem distribuídas por toda a região, bem como encontravam-se isoladas e integradas com as trabéculas ósseas maduras presentes no enxerto ósseo tratado com o hormônio de crescimento humano biossintetizado (rhGH). Verificávamos ainda que a quantidade de trabéculas ósseas era maior quando comparado com o grupo controle. Essas trabéculas mostravam-se delicadas e bem celularizadas, bem como exibiam arranjo irregular (Figuras 14B e 15).

Em 6 semanas, a região da interface foi substituída por trabéculas ósseas maduras e imaturas, bem como por medula óssea. Verificávamos que o fragmento de enxerto ósseo havia incorporado como o tecido ósseo do leito receptor, sendo denominado tecido ósseo enxertado. Portanto, o processo de remodelação óssea tornou-se concomitante tanto no tecido ósseo receptor quanto no tecido ósseo enxertado. Notávamos ainda que o tecido ósseo enxertado exibia função de cortical óssea e o seu tamanho era menor quando comparado com o período anterior, bem como havia grande quantidade de medula óssea (Figura 16B).

Em 8 semanas, notávamos a formação de nova cortical óssea na mandíbula. O espessamento desta cortical era maior quando comparada com a cortical óssea adjacente ao leito receptor. Além disso, verificou-se que a cortical óssea neoformada, composta por cortical externa (tecido ósseo enxertado) e cortical interna (tecido ósseo receptor), apresentava-se totalmente madura.

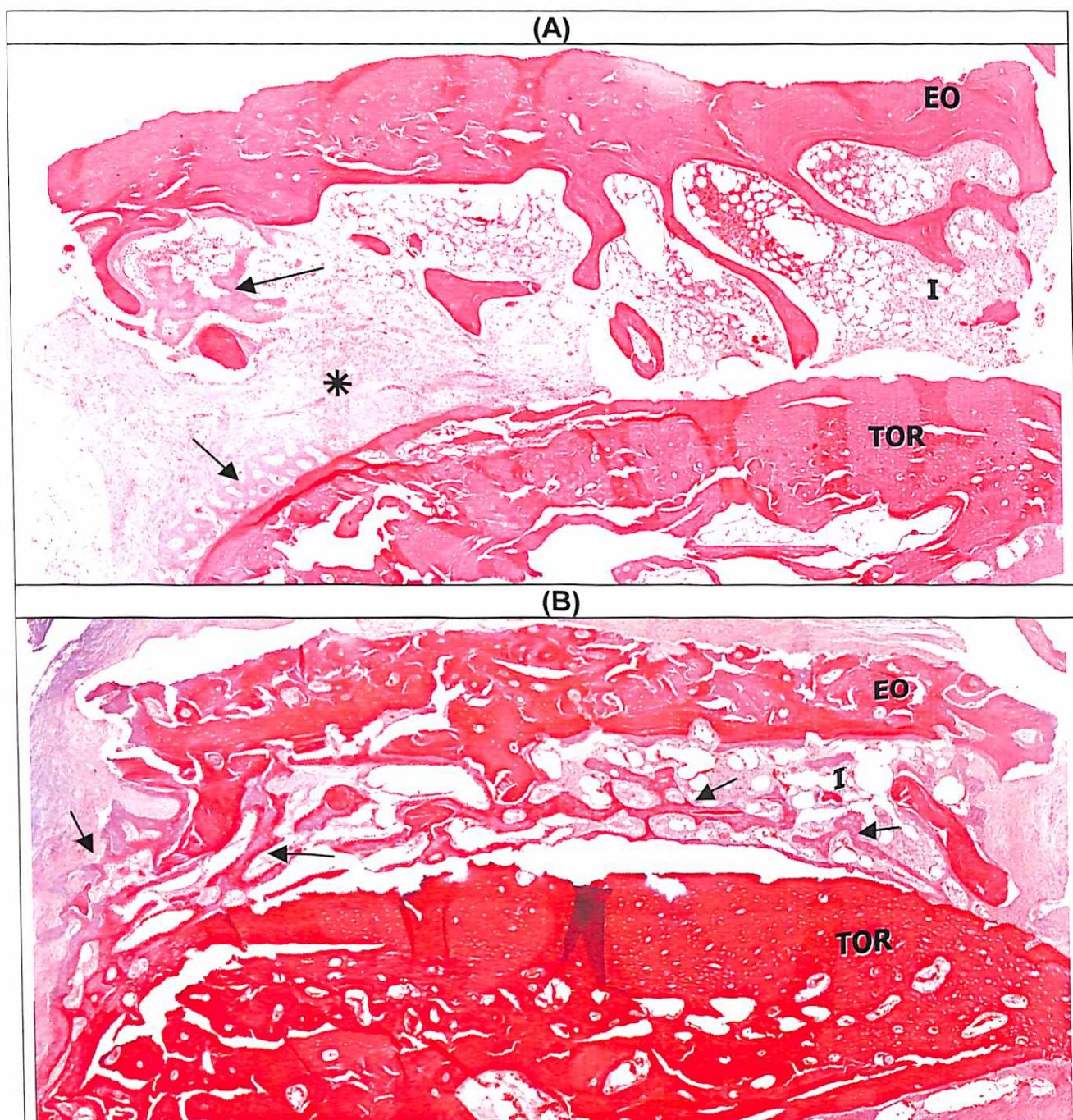


Figura 14 – 2 semanas. Fotomicrografia mostrando região de interface (I), área entre o enxerto ósseo (EO) e o tecido ósseo receptor (TOR), dos grupos controle (A) e teste (B), exibindo tecido conjuntivo osteogênico (asterisco), trabéculas ósseas neoformadas (setas) e medula óssea (H.E.; aumento original: 50x).

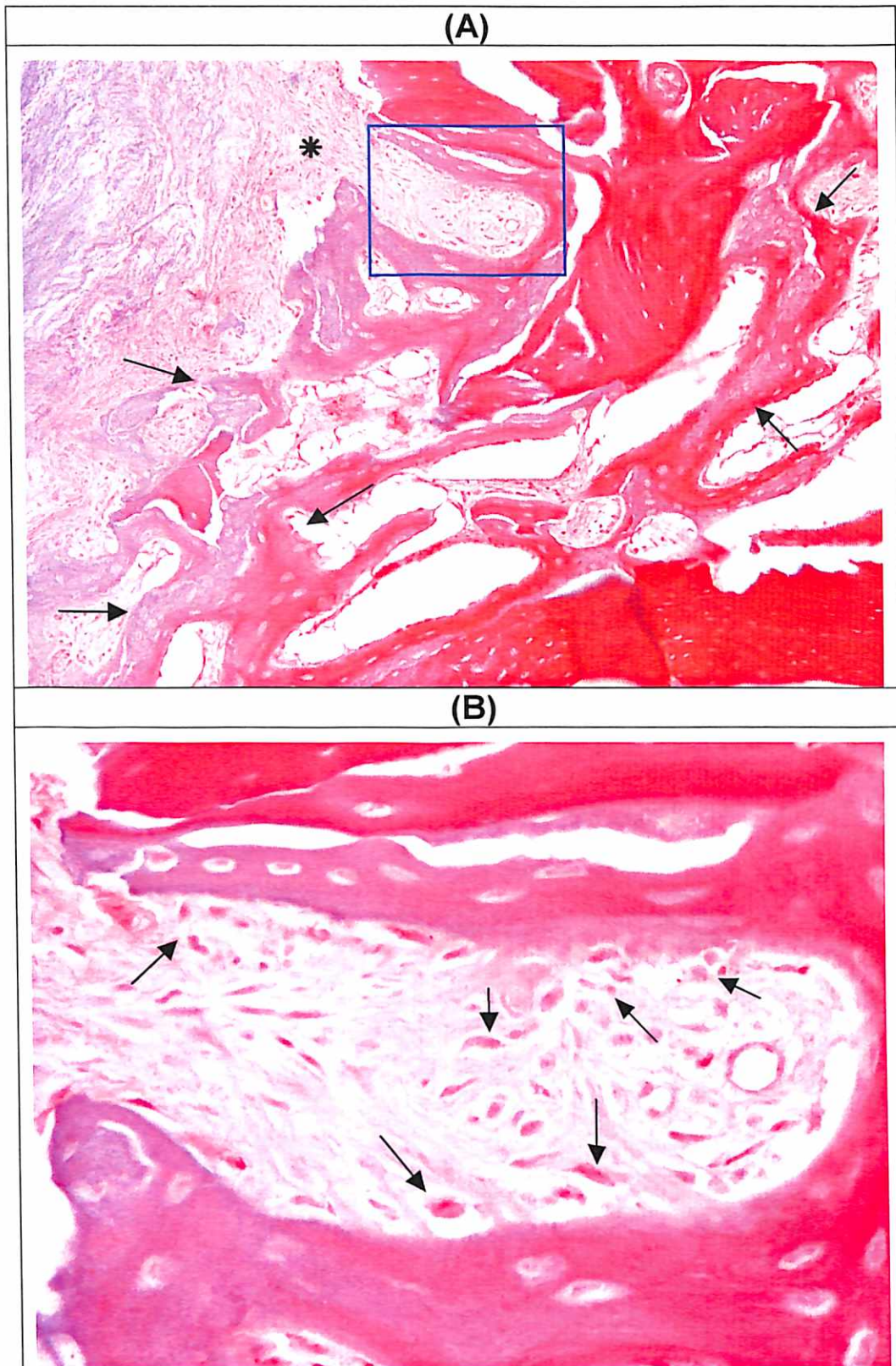


Figura 15 – Grupo teste. 2 semanas. **(A)** Formação de trabéculas ósseas imaturas (setas), bem celularizadas associada ao tecido conjuntivo osteogênico (asterisco); **(B)** tecido conjuntivo osteogênico rico em células osteopromotoras (osteoblastos e células osteoprogenitoras) (setas). (H.E., aumento original: 200x).

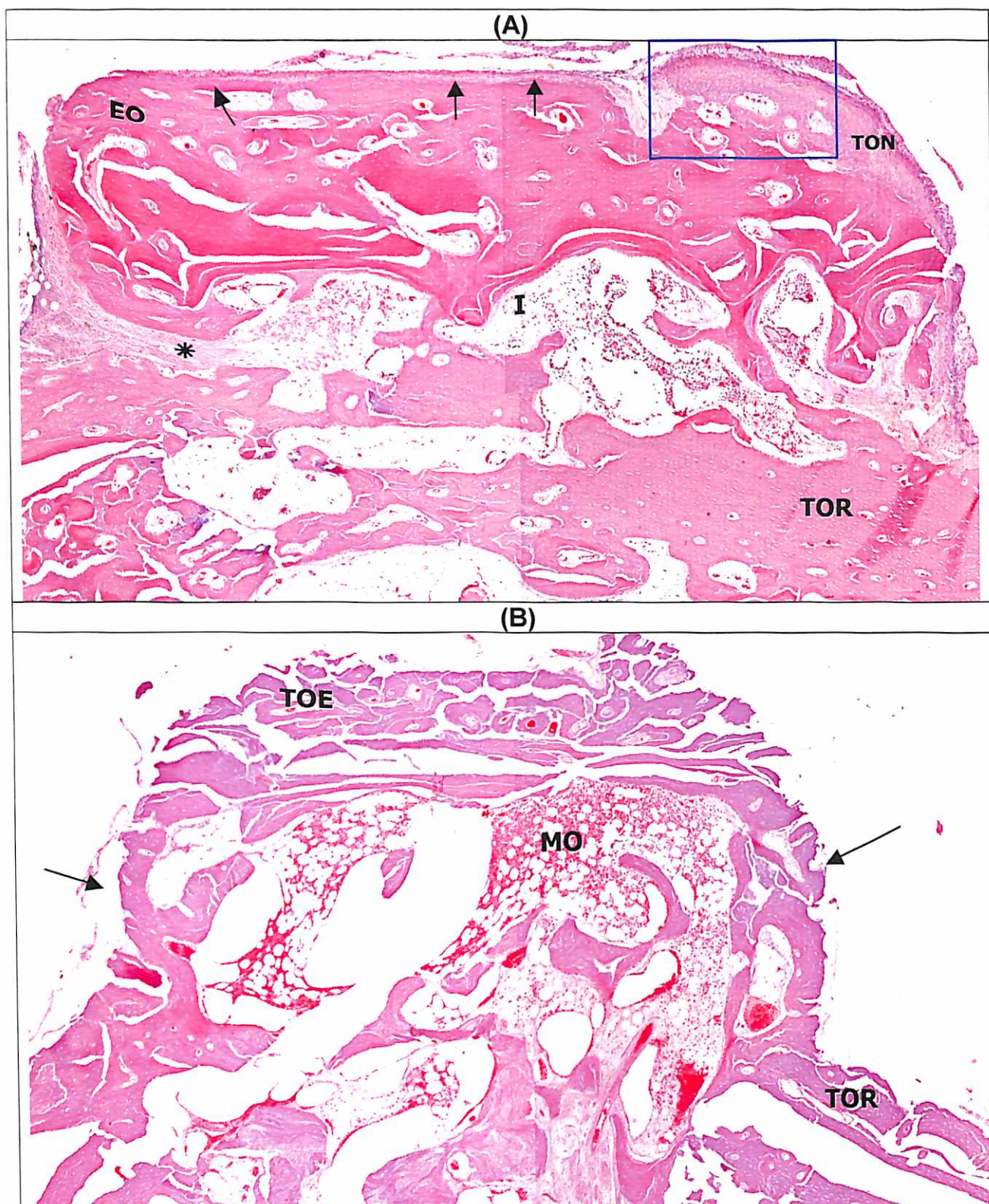


Figura 16 – 6 semanas. (A) A região de interface (I) do grupo controle ainda era evidenciada, o enxerto ósseo autólogo (EO) estava sendo substituído por tecido ósseo neoformado (TON) e circundado por perióstio (setas); Incorporação e remodelação do enxerto ósseo autólogo ao leito receptor e (B) o grupo teste mostrava tecido ósseo enxertado, exibindo áreas imaturas e maduras, (TOE) e presença de medula óssea (MO). (H.E.; aumento original: 50x).

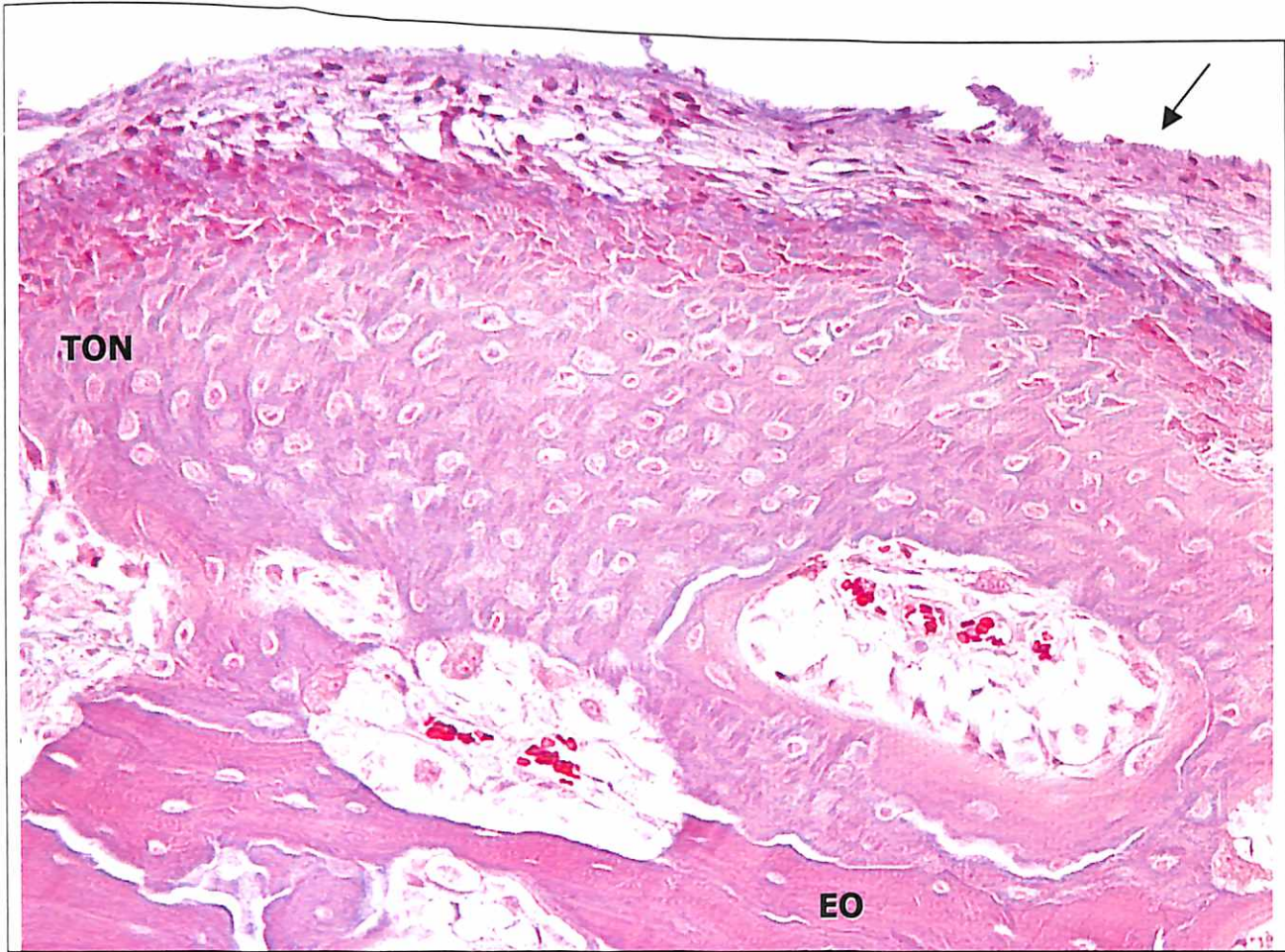


Figura 17 – Grupo controle. 6 semanas. Substituição do enxerto ósseo autógeno (EO) por tecido ósseo neoformado (TON) ricamente celularizado e revestido por perióstio exibindo numerosas células osteogênicas (seta) (H.E., aumento original: 200x)

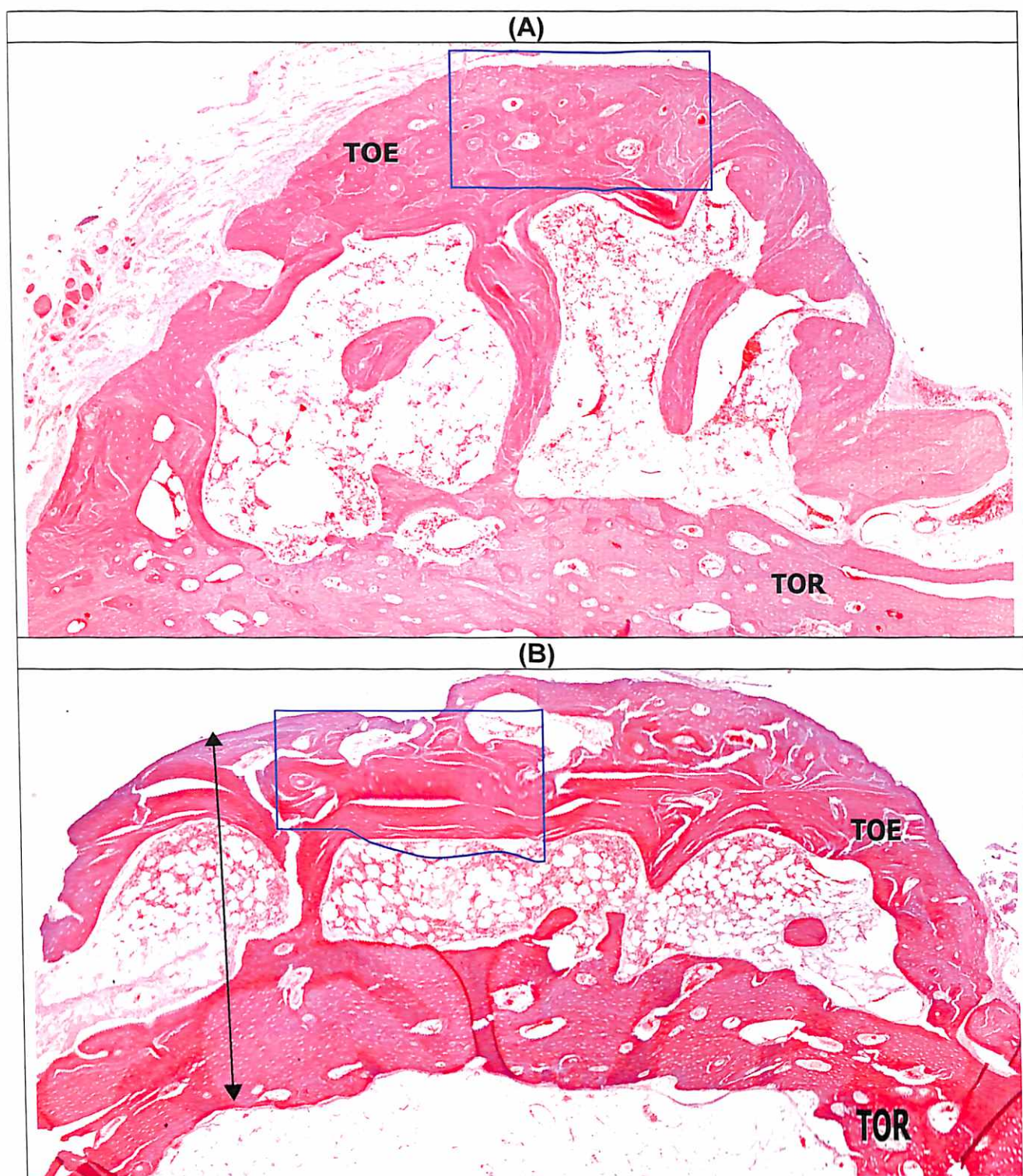


Figura 18 - 8 semanas. Os grupos controle (A) e (B) teste exibem cortical óssea espessa composta por tecido ósseo enxertado (TOE) e tecido ósseo receptor (TOR). (H.E.; aumento original: 50x).

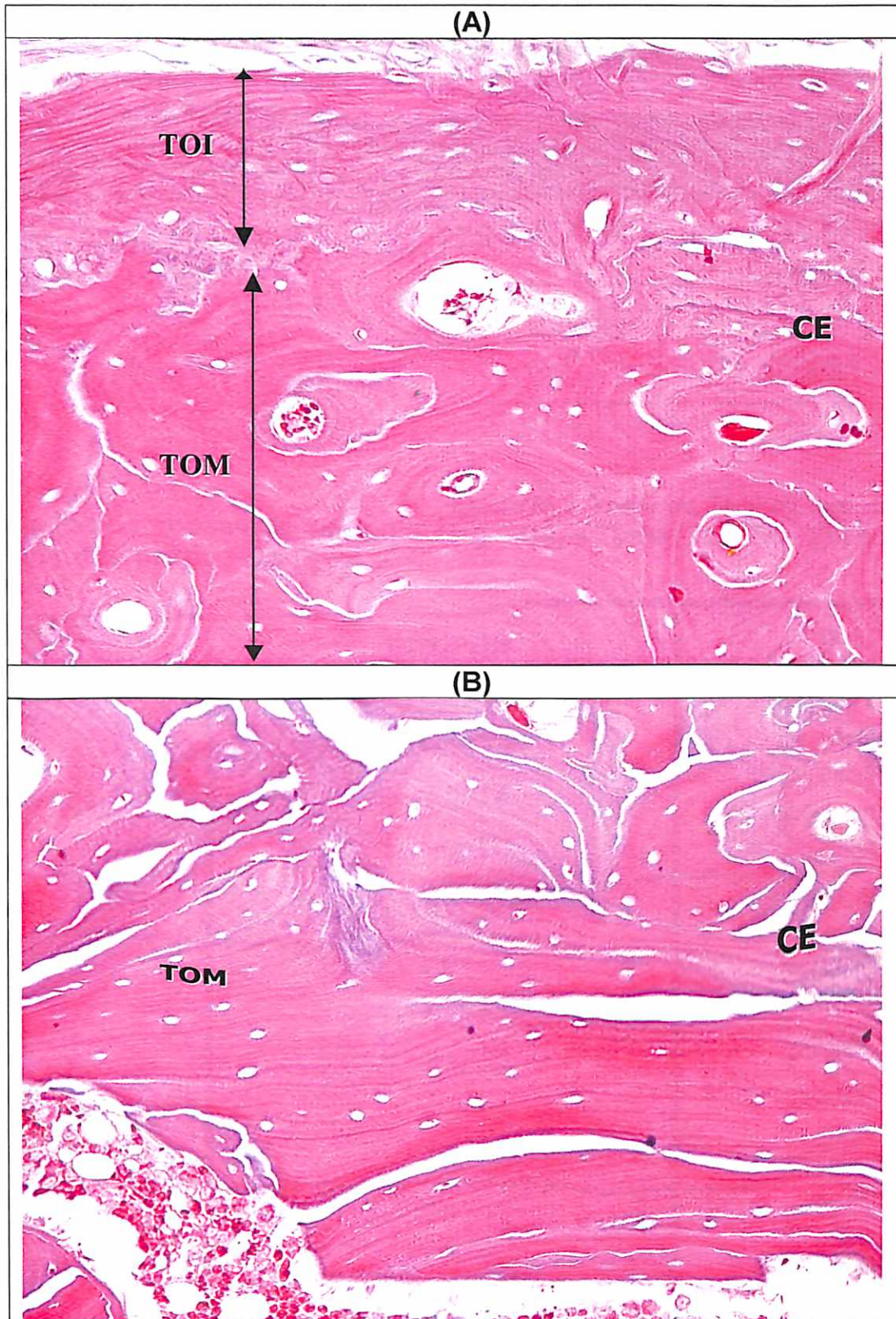


Figura 19 - 8 semanas. (A) No grupo controle, notava-se que a cortical externa (CE) ou tecido ósseo enxertado, apresentava-se tanto imatura (TOI) quanto madura (TOM) e, no grupo teste (B), a cortical externa apresentava-se apenas madura. (H.E.; aumento original: 200x).

Tabela 1 – Análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre tecido ósseo enxertado e tecido ósseo da mandíbula em coelhos. Valores expressos por Média \pm SD (n=4)

GRUPOS	TEMPOS		
	2 semanas	6 semanas	8 semanas
Controle	0,0350 \pm 0,0057	0,0775 \pm 0,0050	0,1075 \pm 0,0050
Teste	0,0700 \pm 0,0081	0,0925 \pm 0,0050	0,1100 \pm 0,0081

Tabela 2 – Resultados da análise de variância (ANOVA) e Teste de Tuckey dos dados histomorfométricos dos grupos Controle (C2 – C6 – C8) e Teste (T2 – T6 – T8) nos diferentes períodos.

TEMPOS	GRUPOS	P
2 semanas	C2 / T2	p<0,001^{***}
	C2 / T6	p<0,001 ^{***}
	C2/ T8	p<0,001 ^{***}
	T2/ T6	p<0,01 ^{**}
	T2/ T8	p<0,001 ^{***}
6 semanas	C6 / T2	p>0,05
	C6/ T6	p<0,05*
	C6/ T8	p<0,001 ^{***}
	T6/ T2	p<0,01 ^{**}
	T6/ T8	p<0,05*
8 semanas	C8 / T2	p<0,001 ^{***}
	C8/ T6	p<0,05*
	C8/ T8	p>0,05 (n.s)
	T8/ T2	p<0,001 ^{***}
	T8/ T6	p<0,05*

p < 0,05

5.2 Análise Estatística da Histomorfometria

Os resultados estatísticos da análise histomorfométrica da densidade óssea realizada na região de interface entre tecido ósseo enxertado com rhGH e tecido ósseo da mandíbula do grupo controle e teste estão computados nas TABELAS 1 e 2 e representados nos GRÁFICOS 1, 2, 3 e 4. Todos os valores estão expressos por Média e desvio padrão da média (SD) e o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

Analisando os dados da TABELA 1, TABELA 2 e GRÁFICO 1 podemos observar que os coelhos do grupo T2 apresentaram valores de densidade óssea estatisticamente mais elevados que os do grupo C2, no intervalo de avaliação de 2 semanas ($p < 0,001$). Os resultados foram respectivamente: $(0,0700 \pm 0,0081)$ e $(0,0350 \pm 0,0057)$.

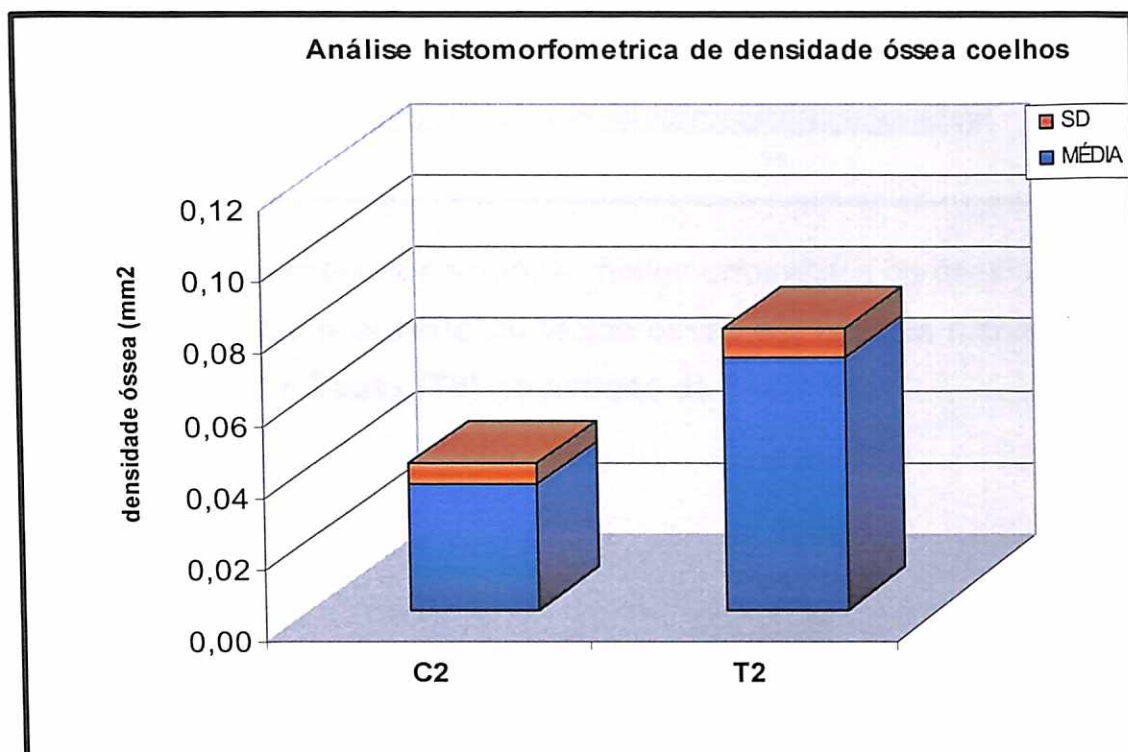


Gráfico 1 – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos Controle (C2) e Teste (T2) no período de 2 semanas.

Analisando os dados da **TABELA 1**, **TABELA 2** e **GRÁFICO 2** podemos observar que após 6 semanas do enxerto ósseo com rhGH a região da interface dos coelhos do grupo **T6** ($p < 0,05$) apresentou densidade óssea significativamente mais elevada quando comparada ao seu respectivo controle (**C6**). Os resultados foram respectivamente: $(0,0925 \pm 0,0050)$ e $(0,0775 \pm 0,0050)$.

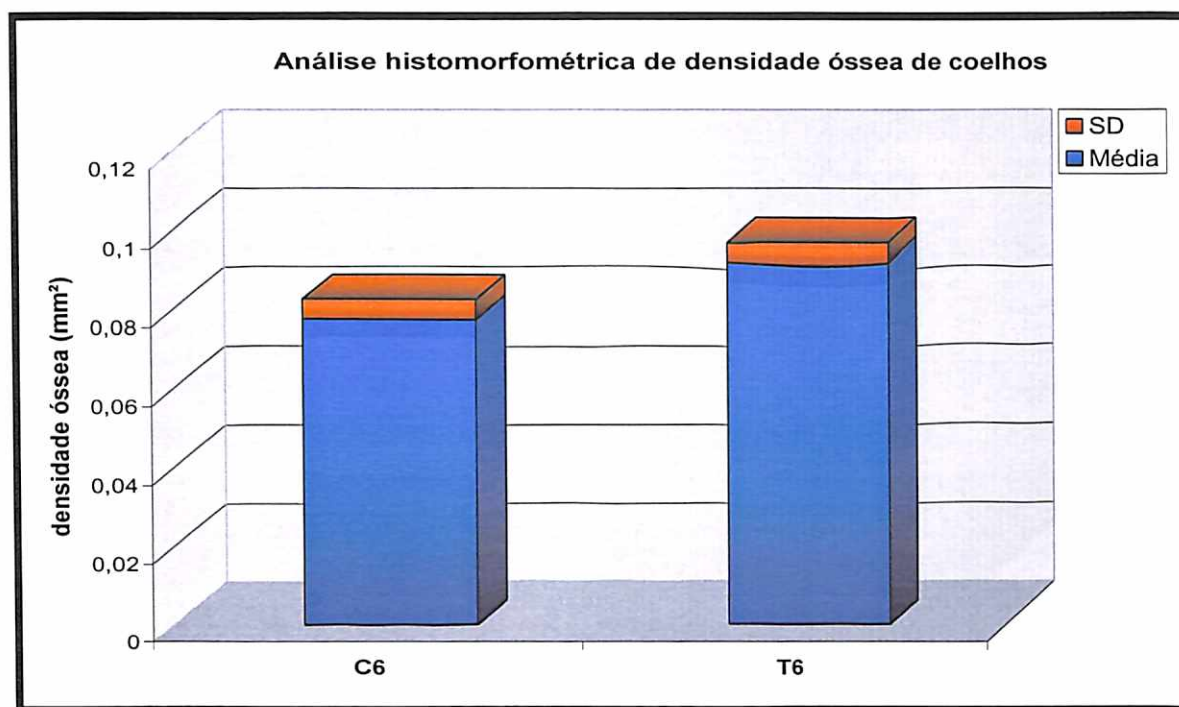


Gráfico 2 – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm²)

na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C6)** e **Teste (T6)** no período de 6 semanas.

Quando analisamos os resultados histomorfométricos dos grupos teste (**T8**) e controle (**C8**) no intervalo de avaliação de 8 semanas, constatamos que não houve diferença estatística entre os grupos, quando comparados entre si ($p > 0,05$). Os resultados foram respectivamente: $(0,1100 \pm 0,0081)$ e $(0,1075 \pm 0,0050)$.

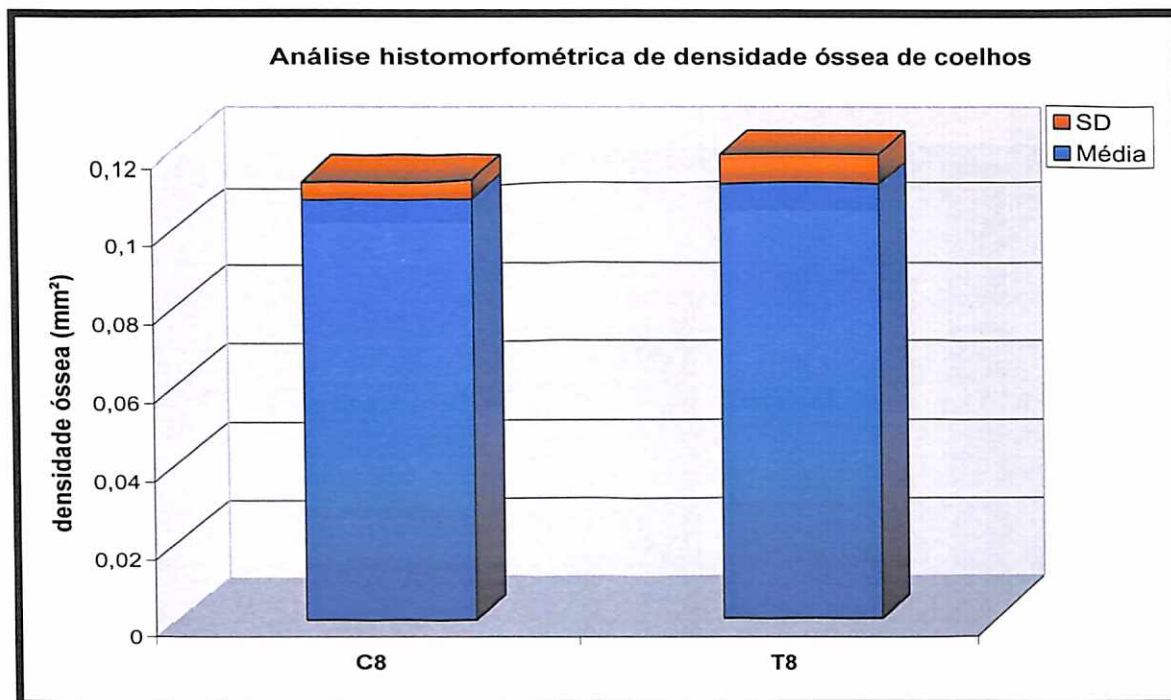


Gráfico 3 – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C8)** e **Teste (T8)** no período de 8 semanas.

Analisando os dados do **GRAFICO 4**, podemos observar ainda que tanto os coelhos dos grupos **Controles (C2 – C6 – C8)** quanto aqueles dos grupos **Testes (T2 – T6- T8)** apresentaram, uma crescente e constante evolução da densidade óssea (mm^2) em relação direta aos tempos estudados, apresentando assim valores mais elevados após 8 semanas de estudo.

Análise histomorfométrica de densidade óssea de coelhos

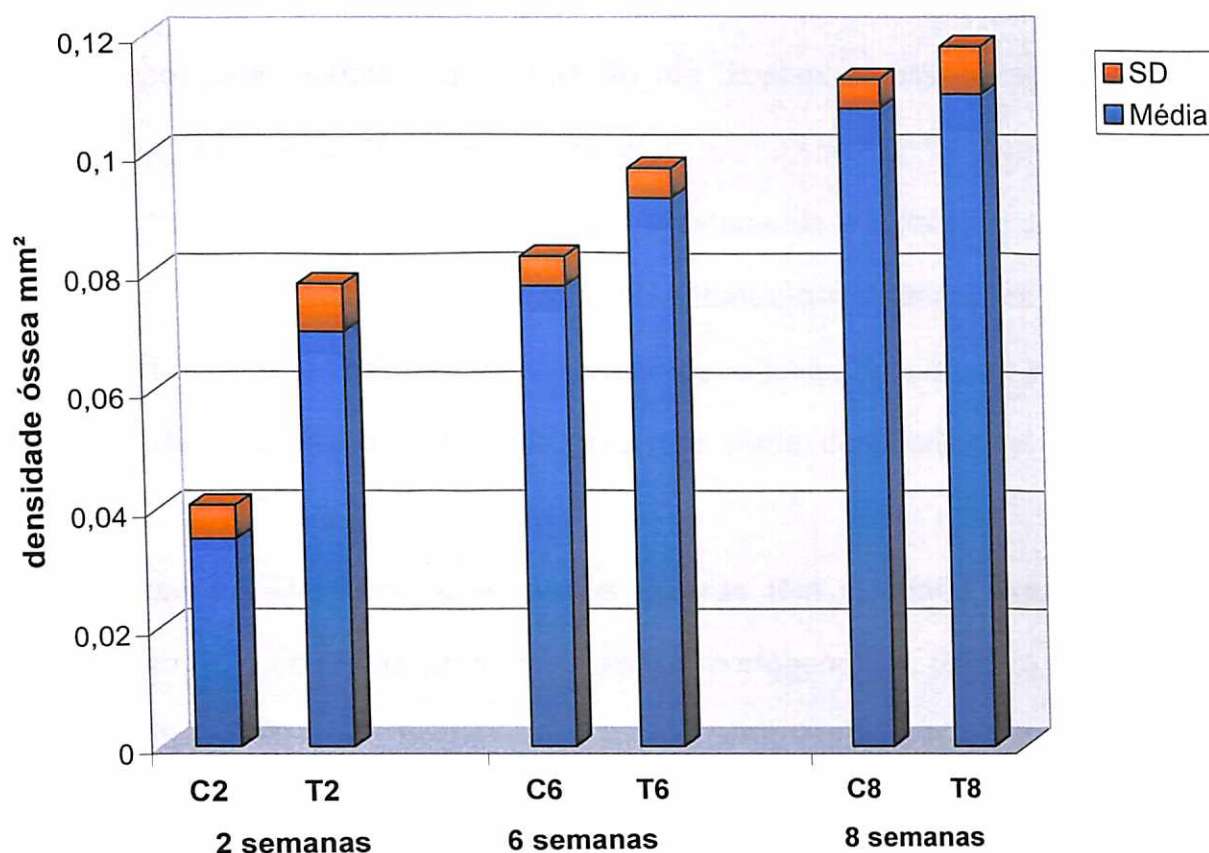


Gráfico 4 – Valores médios da análise histomorfométrica da densidade óssea (mm^2) na região da interface entre o enxerto de tecido ósseo e o osso da mandíbula em coelhos dos grupos **Controle (C2 – C6 – C8)** e **Teste (T2 – T6 – T8)** nos diferentes períodos.

6 DISCUSSÃO

O uso de implantes osseointegrados tem sido tratamento de escolha em diversas situações em decorrência dos benefícios que proporcionam aos indivíduos que perderam um ou mais elementos dentários. Porém com a perda dos elementos dentários inicia-se um processo de reabsorção alveolar (ULM et al., 1995) que muitas vezes impossibilita a instalação de implantes osseointegrados, sendo necessária a realização de enxertos ósseos.

O tratamento com enxertos ósseos previamente a instalação dos implantes é uma técnica previsível e muito utilizada, no entanto, certas limitações são discutidas na literatura, como: a reabsorção dos enxertos, o longo tempo para incorporação, a aceitação de um enxerto não autógeno por parte dos pacientes, dentre outras limitações.

Vimos na literatura, que muitos autores têm estudado alguns fatores de crescimento, tais como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o plasma rico em plaquetas (PRP) e o hormônio do crescimento humano biossintetizado (rhGH), em busca de acelerar esse processo de incorporação nos enxertos ósseos autógenos. Também pudemos observar que a maioria das pesquisas, tanto em coelhos quanto em ratos, com uso sistêmico ou local de rhGH, teve resultados muito satisfatórios em relação ao estímulo do crescimento ósseo longitudinal, a neoformação óssea, o aumento ósseo periimplantar e ao processo de reparação óssea.

Esses resultados nos motivaram a fazer um estudo que tivesse uma aplicabilidade clínica e viabilizasse avaliar os efeitos do uso local do rhGH,

associado ao enxerto ósseo autógeno em mandíbula de coelhos, mediante análises microscópica e estatística da histomorfometria.

A técnica cirúrgica proposta se mostrou eficiente para a finalidade a qual o estudo se propôs, pois todos os enxertos realizados integraram ao leito receptor. Os resultados clínicos demonstraram que as cirurgias não interferiram na locomoção e alimentação dos coelhos, que apresentaram ausência de deiscências de sutura, de hematomas, de hemorragias tardias e mínimo edema. Nenhum dos coelhos operados morreu em decorrência das cirurgias. Nossos resultados nos permitem concluir que o coelho pode ser considerado modelo biológico viável para o estudo dos enxertos ósseos autógenos e suas possíveis variáveis.

Entendemos ser importante fazer um estudo com uso local do rhGH, visando maior aceitação clínica por parte dos pacientes e menor risco de efeitos colaterais, uma vez que estes estão diretamente relacionados à dose excessiva e ao uso prolongado (GOODMAN, 1974; GUYTON; HALL, 2002; MACEY, 1974).

Os achados na literatura em relação aos efeitos do uso local no tecido ósseo são satisfatórios. Isaksson et al. (1982) concluiu que o uso local do rhGH estimula significativamente o crescimento ósseo longitudinal em tíbias de ratos. Chihara; Sugimoto (1997) relataram que o rhGH age diretamente nos osteoblastos e osteoclastos. Esses achados estão de acordo com Ohlsson (1998), que relatou que o estímulo do crescimento dos tecidos por parte do rhGH se dá pelo aumento tanto do número quanto do tamanho das células e também enfatizaram que o rhGH exerce ação direta nos osteoblastos e osteoclastos, sendo capaz de estimular a formação óssea devido à interação direta com o tecido ósseo.

Outros estudos começaram a avaliar a administração local do rhGH, como o de Hedner et al. (1996) que enfatiza que o rhGH exerce efeito específico e direto no

tecido ósseo, porém esses autores avaliaram a administração local de aplicações diárias por um período de 2, 3 e 4 semanas por meio de catéteres. Em relação a essa metodologia, achamos que não tem aplicabilidade clínica e que o tempo prolongado do uso do rhGH pode gerar efeitos colaterais.

Posteriormente, Tresguerres et al. (2002) estudaram a administração local em dose única de rhGH em coelhos osteoporóticos e concluíram que pode aumentar a síntese osteóide e a mineralização ao redor da camada de titânio no osso periimplantar. Esses autores fizeram outro estudo em 2003 em coelhos não osteoporóticos e concluíram que a administração local de uma dose única de rhGH estimulou maior efeito do que os relatos na literatura com uso de administração sistêmica e o crescimento ósseo foi observado tanto por parte do periosteio quanto do endosteio. Esses achados estão de acordo com os resultados obtidos em nossa pesquisa, onde também pudemos observar que os efeitos da administração local de uma dose única de rhGH resultaram em maior quantidade de trabéculas ósseas neoformadas comparado com o grupo controle, a incorporação do fragmento de enxerto ósseo com o tecido ósseo do leito receptor ocorreu num tempo menor que no grupo controle e a cortical óssea neoformada apresentava-se com aspecto totalmente madura, enquanto que no grupo controle, o aspecto era tanto madura quanto imatura.

Em se tratando do uso do rhGH em enxertos ósseos, os achados de Aspenberg (1994) não estão de acordo com os nossos resultados, pois esses autores não observaram resultados significantes na incorporação do enxerto ao avaliarem a administração sistêmica com enxertos homogêneos em ratos. Esses resultados talvez sejam justificados pelo fato do autor ter usado a administração sistêmica e o enxerto ser homogêneo, ao passo que nós avaliamos a administração

local em enxertos autógenos e obtivemos resultados estatisticamente significantes na proposta de acelerar o processo de incorporação óssea.

Quanto à dose utilizada em nossa pesquisa para o grupo teste, achamos que 0,85 mg de rhGH foi suficiente para embeber o enxerto ósseo, uma vez que essa era a proposta da nossa metodologia. No intuito de avaliar uma situação clínica viável fizemos o estudo com uso local em dose única de rhGH com o objetivo de acelerar o processo de incorporação dos enxertos ósseos autógenos, diminuindo o tempo de tratamento para os indivíduos que necessitam dessa etapa cirúrgica previamente a outros tratamentos.

Nossos resultados histomorfométricos foram coerentes com os de Gomes et al. (2002), que também utilizaram o método estereológico, que se baseia em princípios geométrico-estatísticos, derivados da probabilidade de as imagens dos perfis da estrutura na secção histológica coincidirem com um sistema-teste apropriado. Deste modo, a característica principal nesses métodos está na casualização das amostras, eliminando a ocorrência de vício na amostragem. Esse fato foi realizado por meio da aplicação de procedimentos de escolha aleatória em todos os estágios do experimento, tais como: seleção dos animais, das lâminas histológicas, dos cortes e campos microscópicos. Sendo assim, os resultados são fidedignos, precisos e também relatam números absolutos.

Embora sejam poucos os trabalhos realizados com uso local e dose única de rhGH, os resultados das análises microscópica e estatística da histomorfometria obtidos neste estudo nos permitem concluir que a administração local de rhGH em dose única pode atuar efetivamente no processo de incorporação do enxerto ósseo autógeno em mandíbulas de coelhos e que a metodologia proposta possui aplicabilidade clínica, por se tratar apenas de uma dose necessária para embeber o

enxerto, a quantidade não é excessiva, o custo não será um problema e o indivíduo não estará sujeito aos efeitos colaterais do uso do rhGH, que geralmente estão relacionados a administração sistêmica onde é necessário maior dose e tratamento prolongado.

Acreditamos que o estudo do rhGH é mais um fator em desenvolvimento na implantodontia por potencializar o processo de incorporação dos enxertos ósseos autógenos.

7 CONCLUSÃO

O número de trabéculas ósseas neoformadas foi maior no grupo teste do que no controle.

O enxerto ósseo, tratado com hormônio de crescimento humano biossintetizado (rhGH), incorporou mais rápido no leito receptor do que o enxerto do grupo controle.

Na análise histológica subjetiva, evidenciou-se maior número de células osteoprogenitoras no grupo teste do que no grupo controle, no período de 02 semanas.

REFERÊNCIAS¹

ALBREKTSSON, T. In vivo studies of bone grafts. The possibility of vascular anastomoses in healing bone. **Acta Orthop. Scand.**, Hampshire, v. 51, n. 1, p. 9-17, Feb. 1980.

ANDREASSEN, T. T. et al. Growth hormone stimulates bone formation and strength of cortical bone in aged rats. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 10, n. 7, p. 1057-67, July 1995.

ASPENBERG, P. et al. No effect of growth hormone on bone graft incorporation. Titanium chamber study in the normal rat. **Acta Orthop. Scand.**, Hampshire, v. 65, n. 4, p. 456-61, Aug. 1994.

BAK, B.; JORGENSEN, P. H.; ANDREASSEN, T. T. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. **Acta Orthop. Scand.**, Hampshire, v. 1, n. 1, p. 54-7, Feb. 1990.

_____. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, Philadelphia, n. 264, p. 295-301, Mar. 1991.

BHASKAR S. N. Maxila e Mandíbula (Processo alveolar). In: _____. **Histologia e Embriologia Oral de Orban**. 8. ed. São Paulo: Artes Médicas, 1978. cap. 8, p. 238-258.

BUCH, F.; ALBREKTSSON, T.; HERBST, E. The bone growth chamber for quantification of electrically induced osteogenesis. **J. Orthop. Res.**, Hoboken, v. 4, n. 2, p. 194-203, 1986.

BURCHARDT, H. Biology of bone transplantation. **Orthop. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 187-96, Apr. 1987.

CACCIAFESTA, V. et al. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. **Eur. J. Orthod.**, London, v. 23, n. 6, p. 733-40, Dec. 2001.

¹ De acordo com a NBR 14724 e NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), 2002. Abreviaturas dos Periódicos segundo "Index to Dental Literature" e Seriadados em Ciências da Saúde (SECS).

CARVALHO, V.A.P.; TOSELLO, D.O.; SALGADO, M.A.C.; GOMES, M.F. Histomorphometric analysis of homogenous demineralized dentin matrix as osteopromotive material in mandibular of rabbits. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v. 19, n. 5, p. 679-686, 2004.

CHIHARA, K.; SUGIMOTO, T. The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. **Horm. Res.**, Basel, v. 48, n. 5, p. 45-9, 1997. Suplemento.

GARANT, P. R. Bone. In: _____. **Oral Cells and Tissues**. Canada: Quintessence, 2003. cap. 8, p. 195-238.

GARG, A. K. Bone Physiology for Dental Implantology. In: _____. **Bone biology, harvesting, and grafting for dental implants: rationale and clinical applications**. China: Quintessence, 2004. cap. 1, p. 3-20.

GAZDAG, A. R. et al. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. **J. Am. Acad. Orthop. Surg.**, Rosemont, v. 3, n. 1, p. 1-8, Jan. 1995.

GOMES, M.F.; ANJOS, M.J.S.; NOGUEIRA, T.O.; GUIMARÃES, S.A.C. Autogenous Demineralized Dentin Matrix for Tissue Engineering Applications: Radiographic and Histomorphometric Studies. **Int J Oral Maxillofac Implants**, Lombard, v.17, n. 4, p. 488-497, 2002.

GOODMAN, H. M. Introdução à endocrinologia. In: MOUNTCASTLE, V. B. **Fisiologia Médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974. cap. 67, p.1609-1641.

GUICHEUX, J. et al. Human growth hormone locally released in bone sites by calcium-phosphate biomaterial stimulates ceramic bone substitution without systemic effects: a rabbit study. **J. Bone Miner Res.**, New York, v. 3, n. 4, p. 739-48, Apr. 1998.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Os hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo. In: _____. **Tratado de Fisiologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 75, p. 791-801.

HAASE, H. R. et al. Growth hormone regulates osteogenic marker mRNA expression in human periodontal fibroblasts and alveolar bone-derived cells. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v. 38, n. 4, p. 366-74, Aug. 2003.

HARDESTY, R. A.; MARSH, J. L. Craniofacial onlay bone grafting: a prospective evaluation of graft morphology, orientation, and embryonic origin. **Plast. Reconstr. Surg.**, Baltimore, v. 5, n. 1, p. 5-14, Jan. 1990.

HARVEY, S.; HULL, K. L. Growth hormone. A paracrine growth factor? **Endocrine**, Totowa, v. 7, n. 3, p. 267-79, Dec. 1997.

HEDNER, E.; LINDE, A.; NILSSON, A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes: an Teste study in rats. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 11, n. 12, p. 1952-60, Dec. 1996.

ISAKSSON, O. G. et al. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 8, n. 4, p. 426-38, Nov. 1987.

ISAKSSON, O. G.; JANSSON, J. O.; GAUSE, I. A. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. **Science**, Washington, v. 216, n. 4551, p. 1237-9, June 1982.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. **Histologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap. 8, p. 136-153.

KASSEM, M.; BLUM W.; RISTELLI J.; MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E. F. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells In Vitro. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v. 52, p. 222-226, Sept. 1993.

LO, N. N. et al. Effect of growth hormone on bone marrow grafts in fracture healing—an Teste study in rabbits. **Ann. Acad. Med. Singapore**, Singapore, v. 24, n. 3, p. 343-6, May 1995.

LOZANO, A. J.; CESTERO Jr, H. J.; SALYER, K. E. The early vascularization of onlay bone grafts. **Plast. Reconstr. Surg.**, Hagerstown, v. 58, n. 3, p. 302-5, Sept. 1976.

MACEY, R. I. Metabolismo e Hormônios. In: _____. **Fisiologia Humana**. São Paulo: Edgard Blücher, 1974. cap. 10, p. 102-117.

NIELSEN, H. M. et al. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. **Acta Orthop. Scand.**, Hampshire, v. 62, n. 3, p. 244-7, June 1991.

OHLSSON, C. et al. Growth hormone and bone. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v. 19, n. 1, p. 55-79, Feb. 1998.

PHILLIPS, J. H.; FORREST, C. R.; GRUSS, J. S. Current concepts in the use of bone grafts in facial fractures. Basic science considerations. **Clin. Plast. Surg.**, Philadelphia, v. 19, n. 1, p. 41-58, Jan. 1992.

PINHOLT, E. M. et al. Revascularization of calvarial, mandibular, tibial, and iliac bone grafts in rats. **Ann. Plast. Surg.**, Boston, v. 33, n. 2, p. 193-7, Aug. 1994.

PIRINEN, S. Endocrine regulation of craniofacial growth. **Acta Odontol. Scand.**, Stokholms, v. 53, n. 3, p. 179-85, June 1995.

RUDMAN, D. et al. Effects of human growth hormone in men over 60 years old. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 323, n. 1, p. 1-6, July 1990.

SALAGARAY, V. L., LOZADA, T. **Tecnica de Elevacion Sinusal - Injerto Subantral de Induccion Osea**. Unidad de Implantologia Oral y Protesis Biointegrada, Madrid, 1993.

TEN CATE, A. R. Osso. In: _____. **Histologia Bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 7, p.101-122.

TRESGUERRES, I. F. et al. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an Teste study with implants in rabbit tibiae. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 18, n. 6, p. 807-11, Nov.-Dec. 2003.

_____. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 20, n. 2, p. 193-202, Mar.-Apr. 2005.

_____. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v. 13, n. 6, p. 631-6, Dec. 2002.

ULM, C. W. et al. Incidence and suggested surgical management of septa in sinus-lift procedures. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v. 10, n. 4, p. 462-5, July-Aug. 1995.

ANEXO 1: REGISTRO CEP UNISA n° 108/2005



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 108/2005

REGISTRO CEP UNISA N.º 231/05

Projeto de Pesquisa: “Uso local do hormônio do crescimento humano: avaliação histológica de enxertos ósseos autógenos em coelhos adulto”.

Responsáveis: Pós-Graduanda: Hothir Mibsan Rodrigues Corrêa

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis de Miranda

Área Temática Especial: Implantodontia

Prezado Pesquisador:

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais da Lei 6.638, de 8 de maio de 1979, que estabelece as Normas para Prática Didática – Científica da Vivisseção de Animais e os Princípios Internacionais para a pesquisa Biomédica envolvendo Animais.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa, visando avaliar, em fêmur de coelhos, o efeito do uso local do Hormônio do Crescimento no processo de incorporação do enxerto ósseo homogêneo.

São Paulo, 26 de outubro de 2005

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Parecer Consubstanciado de Projeto

Título do Projeto: : Uso local do hormônio do crescimento humano: avaliação histológica de enxertos ósseos autógenos em coelhos adulto

Pesquisador Responsável : Pós-Graduanda: Hothir Mibsan Rodriguês Corrêa
Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luis de Miranda

Data da Versão

Cadastro 231

Data do Parecer 26/10/2005

Grupo e Área Temática I.5 Novos procedimentos

Objetivos do Projeto

Avaliar, em fêmur de coelhos, o efeito do uso local do Hormônio do Crescimento no processo de incorporação do enxerto ósseo homogêneo.

Sumário do Projeto

Serão realizadas cirurgias de enxertos ósseos homólogos em bloco em coelhos adultos. Os animais serão divididos em dois grupos: teste e controle. No grupo teste, os blocos assim como a área receptora serão embebidos com hormônio do crescimento humano. No grupo controle, o bloco será fixado sem código de qualquer substância. Os animais serão sacrificados, em grupos de seis, no período de 01, 02, 03 e 06 semanas após as cirurgias, para as análises histológicas.

<i>Aspectos relevantes para avaliação</i>	<i>Situação</i>
Título	Adequado
Relação dos Pesquisadores	Adequada
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas
Introdução	Adequada
Objetivos	Adequados
Método	
Tipo de projeto	Pesquisa em Animais
Delineamento	Adequado
Tamanho de amostra	Total Na Instituição sim
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Adequada
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Adequada
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Armazenamento de material biológico	Adequado
Instrumentos de coleta de dados	Adequados
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Adequado
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim
Cronograma	Adequado
Data de início prevista	01/10/2005
Data de término prevista	31/12/2006
Orçamento	Adequado
Solicita recursos à instituição	Não
Fonte de financiamento externa	Não
Referências Bibliográficas	Adequadas

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

O trabalho tem méritos por estudar técnicas para enxertos ósseos

São Paulo, 26 de outubro de 2005.

PROF. DR. CARLOS DE SOUSA LUCCI
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
UNISA - Universidade de Santo Amaro

**TABELAS DAS MEDIDAS DAS ÁREAS PARA
ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICAS**

Grupo Controle – 2 semanas

Campos	Coelho 1			Coelho 2			Coelho 3			Coelho 4		
	1	0,06	0,05	0,06	0,02	0,02	0,04	0,05	0,07	0,05	0,04	0,05
2	0,03	0,03	0,04	0,05	0,04	0,03	0	0,02	0	0,04	0,04	0,03
3	0,05	0,05	0,04	0,03	0	0,01	0	0	0	0,03	0,02	0,02
4	0,04	0,05	0,02	0,04	0,04	0,04	0,02	0,04	0,05	0,02	0,04	0,04
5	0,04	0,04	0,02	0,04	0,04	0,05	0,02	0,04	0,04	0,01	0,05	0,06
Média	0,04	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,02	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04
Média/coelho	0,04			0,03			0,03			0,04		

Grupo Teste – 2 semanas

Campos	Coelho 1			Coelho 2			Coelho 3			Coelho 4		
	1	0,07	0,08	0,05	0,05	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04	0,08	0,09
2	0,04	0,04	0,05	0,09	0,03	0,08	0,07	0,06	0,06	0,03	0,06	0,04
3	0,08	0,08	0,08	0,07	0,03	0,08	0,09	0,09	0,10	0,06	0,07	0,10
4	0,07	0,05	0,07	0,07	0,03	0,05	0,06	0,06	0,04	0,07	0,07	0,07
5	0,06	0,05	0,06	0,13	0,05	0,12	0,07	0,05	0,09	0,12	0,12	0,08
Média	0,06	0,06	0,06	0,08	0,04	0,08	0,07	0,06	0,07	0,07	0,08	0,08
Média/coelho	0,06			0,07			0,07			0,08		

Grupo Controle – 6 semanas

Campos	Coelho 1		Coelho 2		Coelho 3		Coelho 4				
1	0,10	0,09	0,08	0,04	0,05	0,08	0,08	0,07	0,05	0,06	0,11
2	0,06	0,08	0,08	0,11	0,08	0,03	0,04	0,11	0,05	0,04	0,11
3	0,07	0,07	0,08	0,09	0,04	0,09	0,09	0,09	0,07	0,07	0,09
4	0,03	0,05	0,09	0,08	0,11	0,08	0,04	0,06	0,13	0,12	0,08
5	0,06	0,07	0,08	0,10	0,12	0,11	0,12	0,10	0,09	0,06	0,06
Média	0,06	0,07	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,09	0,08	0,07	0,09
Média/coelho	0,07		0,08		0,08		0,08		0,08		

Grupo Teste – 6 semanas

Campos	Coelho 1		Coelho 2		Coelho 3		Coelho 4					
1	0,12	0,11	0,08	0,11	0,07	0,08	0,10	0,08	0,07	0,09	0,09	0,10
2	0,09	0,10	0,08	0,10	0,08	0,09	0,08	0,08	0,09	0,10	0,10	0,10
3	0,11	0,10	0,10	0,11	0,07	0,07	0,09	0,08	0,09	0,09	0,06	0,07
4	0,12	0,10	0,07	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,06	0,10	0,10	0,11
5	0,11	0,12	0,12	0,07	0,10	0,09	0,08	0,10	0,11	0,06	0,12	0,13
Média	0,11	0,11	0,09	0,10	0,08	0,09	0,09	0,09	0,08	0,09	0,09	0,10
Média/coelho	0,10		0,09		0,09		0,09		0,09		0,09	

Grupo Controle – 8 semanas

Campos	Coelho 1			Coelho 2			Coelho 3			Coelho 4		
1	0,12	0,11	0,10	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,08	0,11	0,12	0,07
2	0,11	0,12	0,10	0,12	0,11	0,12	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,09
3	0,09	0,09	0,10	0,08	0,08	0,10	0,11	0,12	0,08	0,13	0,12	0,10
4	0,11	0,09	0,12	0,12	0,12	0,12	0,09	0,07	0,09	0,14	0,11	0,09
5	0,12	0,12	0,11	0,11	0,12	0,10	0,11	0,12	0,12	0,10	0,14	0,09
Média	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	0,11	0,09	0,12	0,12	0,09
Média/coelho	0,11			0,11			0,10			0,11		

Grupo Teste – 8 semanas

Campos	Coelho 1			Coelho 2			Coelho 3			Coelho 4		
1	0,13	0,12	0,12	0,08	0,12	0,10	0,12	0,14	0,13	0,08	0,10	0,09
2	0,13	0,09	0,11	0,10	0,10	0,11	0,12	0,11	0,13	0,09	0,10	0,09
3	0,13	0,12	0,10	0,09	0,12	0,09	0,14	0,12	0,12	0,10	0,09	0,10
4	0,12	0,10	0,12	0,11	0,10	0,12	0,12	0,14	0,11	0,11	0,08	0,08
5	0,12	0,08	0,12	0,12	0,09	0,12	0,10	0,14	0,12	0,12	0,12	0,12
Média	0,13	0,10	0,11	0,10	0,11	0,11	0,12	0,13	0,12	0,10	0,10	0,10
Média/coelho	0,11			0,11			0,12			0,10		