



B0122599

U617.69 B735a 2007 ex.1

INSTITUTO DE CIÊNCIAS MARIAS
S. CARLOS

MAESTRADO EM IMPLANTODONTIA

VALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO DO
MENTO HUMANO RECOMBINANTE A ENXERTOS OSSEOS
APLICADOS EM COELHOS

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Crematky
Pós-graduando: Odair Borghi

UNISA - Universidade Santo Amaro
Biblioteca Campus I

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
UNISA

MESTRADO EM IMPLANTODONTIA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE A ENXERTOS ÓSSEOS
APLICADOS EM COELHOS**

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Gromatzky

Pós-graduando: Odair Borghi

São Paulo, SP
2007

ODAIR BORGHI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE A ENXERTOS ÓSSEOS
APLICADOS EM COELHOS**

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. Alfredo Gromatzky.

B..... B012.2.599
Class..... U617.69
Cutter..... B735w
Patri nº..... 3857
Tipo entrada..... DORADO
Nota Fiscal.....
Data rec..... 23.1.10.08
Preço.....
Origem..... MILITÁRIA
Implantodontia

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

B735a Borghi, Odair
Avaliação do efeito da associação do hormônio do crescimento humano recombinante a enxertos ósseos aplicados em coelhos / Odair Borghi. Orientação do Prof. Dr. Alfredo Gromatzky. – São Paulo : 2007.
85p.

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

1. Enxerto ósseo 2. Hormônio do crescimento 3. Reparação óssea I. Título II. Orientador

Autorizo a impressão parcial ou total do meu trabalho acadêmico para fins de divulgação científica.

São Paulo, 26 de novembro de 2007.


Odair Borghi

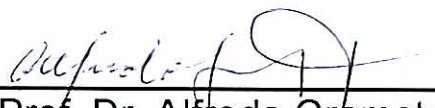
ODAIR BORGHI

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO HUMANO RECOMBINANTE A ENXERTOS ÓSSEOS
APLICADOS EM COELHOS**

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. Alfredo Gromatzky

APROVADA EM 26/11/2007

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Alfredo Gromatzky

Doutor em Periodontia pela Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Giorgio De Micheli

Prof. Livre Docente da disciplina de Periodontia do departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Laurindo Borelli Neto

Doutor em Ciências área de concentração Anatomia Humana pela Universidade de São Paulo

*A minha esposa Edna e aos meus filhos André,
Pedro e Mateus pela colaboração e incentivo para que eu pudesse
realizar este sonho.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alfredo Gromatzky, pela sua dedicação e orientação para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao professor Dr. Wilson Sendyk, por ter proporcionado a oportunidade para que eu pudesse fazer o curso.

Aos professores do curso pela dedicação e paciência.

Aos meus amigos de turma pela convivência e troca de informações, que muito contribuíram para o aprendizado.

Aos amigos Wander Kobayashi e Karla Furtado pela colaboração e apoio em meu trabalho.

Ao Prof. Márcio Antônio de Faria pela colaboração na histologia.

À Professora de Medicina Veterinária, Dra. Andréa Barbosa, pelo auxílio na sedação dos animais.

Aos alunos de Medicina Veterinária e funcionários pelos cuidados com os animais.

Aos funcionários da UNISA pela ajuda e colaboração durante todo o curso.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alfredo Gromatzky, pela sua dedicação e orientação para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao professor Dr. Wilson Sendyk, por ter proporcionado a oportunidade para que eu pudesse fazer o curso.

Aos professores do curso pela dedicação e paciência.

Aos meus amigos de turma pela convivência e troca de informações, que muito contribuíram para o aprendizado.

Aos amigos Wander Kobayashi e Karla Furtado pela colaboração e apoio em meu trabalho.

Ao Prof. Márcio Antônio de Faria pela colaboração na histologia.

À Professora de Medicina Veterinária, Dra. Andréa Barbosa, pelo auxílio na sedação dos animais.

Aos alunos de Medicina Veterinária e funcionários pelos cuidados com os animais.

Aos funcionários da UNISA pela ajuda e colaboração durante todo o curso.

RESUMO

Este trabalho avalia o efeito da associação de enxertos ósseos particulados ao hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) na reparação óssea utilizando como modelo a calvária de coelhos. Vários trabalhos confirmam o sucesso destes materiais de enxerto quando utilizados sozinhos ou associados, nas técnicas de regeneração óssea guiada (ROG) e na cirurgia para levantamento do seio maxilar. O objetivo deste estudo foi verificar o comportamento dos enxertos ósseos: autógeno, homogêneo fresco congelado, xenógeno seco desmineralizado congelado (DFDBA) e xenógeno bovino inorgânico, quando associados ao rhGH. Esses materiais foram utilizados em cilindros de titânio instalados na calota craniana de 10 coelhos New Zealand. Os cilindros foram preenchidos com cada um dos enxertos associados ao rhGH, e após 8 e 12 semanas os coelhos foram sacrificados e os espécimes foram analisados através da macroscopia e histologia. Todos os tipos de enxerto apresentaram capacidade de formação óssea e os melhores resultados volumétricos foram conseguidos com a associação do rhGH com o osso homogêneo fresco congelado, e histológicos com o osso autógeno associado ao rhGH.

PALAVRAS-CHAVE: Enxerto ósseo, hormônio de crescimento, reparação óssea.

ABSTRACT

This research evaluates the effect of associating particulate bone grafts with recombinant human growth hormone (rhGH) in bone mending, using rabbits' skull caps as model. Several studies confirm the success of these graft materials when used alone or in association in techniques of guided tissue regeneration (GTR) and in maxillary sinus lifting surgery. This study aimed at assessing the behavior of the following types of bone grafts: autogenous grafts, fresh frozen homogenous grafts, demineralized freeze-dried bone allografts (DFDBA), and inorganic bovine xenografts (Bone Fill), when associated with rhGH. These materials were used in titanium cylinders placed in the skull cap of 10 New Zealand rabbits. The titanium cylinders were filled with each of the grafts associated with rhGH, and after 8 and 12 weeks the rabbits were sacrificed and the specimens were analyzed through macroscopy and histology. All the types of graft showed bone formation capacity, the best volumetric results were achieved by associating rhGH with the fresh frozen homogenous bone, and the best histological results were obtained by associating autogenous grafts with rhGH.

KEY WORDS: Bone graft, Growth hormone, Bone reparation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Histofisiologia do tecido ósseo	17
2.2 Remodelação óssea.....	19
2.3 Enxertos ósseos.....	21
2.3.1 Regeneração óssea guiada (ROG).....	24
2.4 Hormônio do crescimento humano (hGH).....	27
2.4.1 Fisiologia do hormônio do crescimento humano (hGH).....	29
2.4.2 Efeitos no tecido ósseo.....	32
2.4.3 Estudos pré-clínicos.....	34
3 PROPOSIÇÃO.....	39
4 MATERIAL E MÉTODO	40
4.1 Material.....	40
4.1.1 Material permanente.....	40
4.1.2 Material de consumo.....	41
4.1.4 Material biológico.....	43
4.2 Método	43
4.2.1 Procedimentos cirúrgicos.....	44
4.2.2 Análise histológica	47
4.2.3 Análise estatística.....	48
5 RESULTADOS	58
5.1 Macroscópicos	58
5.2 Estatísticos.....	60
5.2.1 Da análise macroscópica.....	60
5.3 Histológicos.....	63
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tricotomia e antissepsia.....	49
Figura 2	Incisão e descolamento do retalho.....	49
Figura 3	Cilindros de titânio.....	50
Figura 4	Fixação dos cilindros.....	50
Figura 5	Cilindros instalados.....	51
Figura 6	Decorticalização.....	51
Figura 7	Osso autógeno.....	52
Figura 8	Osso homogêneo congelado.....	52
Figura 9	Osso bovino inorgânico.....	53
Figura 10	DFDBA.....	53
Figura 11	Caneta para aplicação do rhGH.....	54
Figura 12	Enxertos em posição com rhGH.....	54
Figura 13	Cilindros fechados.....	55
Figura 14	Sutura.....	55
Figura 15	Aspecto após remoção dos cilindros.....	56
Figura 16	Espécimes removidos por trefina.....	56
Figura 17	Material para histológico.....	57
Figura 18	Material no frasco para exame histológico.....	57
Figura 19	Grupo AH mais rhGH 8 semanas 100X.....	65
Figura 20	Grupo AH mais rhGH 8 semanas 400X.....	65
Figura 21	Grupo HH mais rhGH 8 semanas 100X.....	66
Figura 22	Grupo HH mais rhGH 8 semanas 400X.....	66
Figura 23	Grupo XH mais rhGH 8 semanas 100X.....	67
Figura 24	Grupo XH mais rhGH 8 semanas 400X.....	67

Figura 25	Grupo PH mais rhGH 12 semanas 100X.....	68
Figura 26	Grupo PH mais rhGH 12 semanas 400X.....	68
Figura 27	Grupo AH mais rhGH 12 semanas 100X.....	69
Figura 28	Grupo AH mais rhGH 12 semanas 400X.....	69
Figura 29	Grupo HH mais rhGH 12 semanas 100X.....	70
Figura 30	Grupo HH mais rhGH 12 semanas 400X.....	70
Figura 31	Grupo XH mais rhGH 12 semanas 100X.....	71
Figura 32	Grupo XH mais rhGH 12 semanas 400X.....	71
Figura 33	Grupo PH mais rhGH 12 semanas 100X.....	72
Figura 34	Grupo PH mais rhGH 12 semanas 400X.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ciclo de remodelação óssea cortical.....	21
Tabela 2. Curso de tempo desenvolvido da interface de um implante endósseo no osso cortical.....	21
Tabela 3. Volume ósseo em mm ³ obtido pela aferição macroscópica, comparação entre os grupos para cada uma das semanas.....	60
Tabela 4. Volume ósseo em mm ³ obtido pela aferição macroscópica, comparação entre as semanas para cada um dos grupos.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Compara ganhos e perdas de volume ósseo aferidos macroscopicamente (mm ³).....	62
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A:** Ativação
- AATB:** American Association of Tissue Bank
- AH:** Grupo experimental osso autógeno mais rhGH
- bGH:** Hormônio do crescimento bovino
- BMPs:** Bone morphogenetic proteins
- COBEA:** Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- DFDBA:** Demineralized Freeze Dried Bone Allograft
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- e-PTFE:** expanded Politetrafluoretilene
- F:** Formação
- g:** Grama
- GH:** Hormônio do crescimento
- HCL:** Hidroclorada
- HE:** Hematoxilina e eosina
- HH:** Grupo experimental osso homogêneo mais rhGH
- HIV:** Human immunodeficiency virus
- ICLAS:** International Council of Laboratory Animal Science
- IGF:** Fator de crescimento semelhante à insulina
- IGF-I:** Fator de crescimento semelhante à insulina I
- IM:** Intramuscular
- Kg:** Quilograma
- mg/kg/dia:** Miligrama por quilograma por dia
- mg/kg:** Miligrama por quilograma
- mg:** Miligrama
- ml:** Mililitro
- mm:** Milímetro
- MPA:** Medicação pré-anestésica
- Ng/ml:** Nanograma por mililitro
- PH:** Grupo experimental osso seco desmineralizado mais rhGH
- PRP:** Plasma rico em plaquetas
- Q:** Quietude

R: Reabsorção

rhGH: Hormônio do crescimento humano recombinante

ROG: Regeneração óssea guiada

U/l: Unidade por litro

UI/ml: Unidade Internacional por mililitro

UNISA: Universidade de Santo Amaro

UNITOX: Laboratório Universitário de Análises Toxicológicas

XH: Grupo experimental osso xenógeno mais rhGH

µg/dia Micrograma por dia

µm: Micrometros

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a necessidade de restabelecer a estética e função através da Implantodontia nos indivíduos que perderam um ou mais elementos dentários, tem sido uma das maneiras de tratamento mais viáveis, sendo que o sucesso desta técnica reabilitadora está ligado à quantidade e qualidade óssea da área a ser reabilitada, e a perda dos elementos dentários faz com que o osso alveolar sofra um processo de reabsorção irreversível.

Uma vez que a eficiência dos enxertos ósseos para a posterior instalação de implantes orais é de conhecimento geral (GARG, 2004; PETRUNGARO; AMAR, 2005) 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 com implantes osseointegrados.

Na procura de acelerar esse processo de incorporação e reparação óssea nos enxertos, muitos pesquisadores, (ANDREASSEN et al., 1995; CACCIAFESTA et al., 2001; LO et al., 1995) têm procurado estudar os fatores de crescimento, tais como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), o plasma rico em plaquetas (PRP) e o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), tem sido considerado uma importante forma de atingir esse objetivo, por ser uma das mais importantes substâncias reguladoras do crescimento e da remodelação óssea.

O hormônio do crescimento, como diz o próprio nome é responsável pelo crescimento da criança e o metabolismo dos adultos. Vários autores como Goodman (1974), Macey (1974), e Guyton e Hall (2002), descrevem o rhGH como um

hormônio hipofisário que influencia decisivamente o crescimento de estruturas celulares, e age exercendo efeitos metabólicos específicos e atuando efetivamente no crescimento ósseo. Também favorece a formação das proteínas, sendo essencial para o crescimento. Alguns autores relatam que a administração sistêmica influencia no aumento da massa óssea e estimula o crescimento ósseo longitudinal (ASPENBERG et al., 1994) e que o tratamento com hormônio mostra que a administração local do GH pode estimular a largura da cartilagem epifiseal e crescimento longitudinal do osso, mostrando que a administração exógena de GH teve a capacidade de estimular localmente o crescimento ósseo (ISAKSSON et al., 1982) e a reparação de fraturas ósseas, (NIELSEN et al., 1991; ANDREASSEN et al., 1995).

Em 1995, Pirinen acrescentou dados sobre o hGH observando ser um hormônio peptídeo secretado pelas células somatotrópicas do lobo anterior da glândula pituitária, e que sua secreção ocorre nas primeiras horas do sono e continua durante toda a noite. O rhGH biossintético contém como substância a somatropina, idêntica à produzida pelo organismo com as mesmas funções. Desde 1985 o hGH tem sido biossintetizado (rhGH) e tornou-se acessível para vários tratamentos relacionados com o crescimento.

O rhGH age diretamente na proliferação de osteoblastos, e síntese de colágeno tipo I, seguidos da estimulação da formação óssea (CHIHARA; SUGIMOTO, 1997).

Autores como Hedner; Linde e Nilsson (1996); Tresguerres et al. (2002); Tresguerres et al. (2003); Tresguerres et al. (2005) têm estudado a ação local do rhGH e concluem que este estimulou significativamente a formação óssea local em mandíbulas de ratos, favoreceu o aumento ósseo periimplantar em coelhos

osteoporóticos e não-osteoporóticos, e acelerou o processo de reparação óssea em coelhos.

Segundo Tresguerres et al. (2005) a administração local do rhGH pode estimular as primeiras fases do processo de remodelação óssea, onde a resposta cortical e o contato osso-implante parece ser significativamente maior no grupo rhGH.

Este estudo foi realizado com a finalidade de testar a eficiência do rhGH quando associado aos enxertos ósseos, mediante análises macroscópicas e histológicas, na busca de um enxerto que tivesse qualidade e quantidade para reconstrução óssea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histofisiologia do tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado mineralizado, em constante processo de reabsorção e neoformação, 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, de acordo com Garg (2004).

Ao redor de cada osso compacto, existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico (células formadoras de osso), denominada perióstio, 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 é recoberta por uma camada única de células ósseas, o endóstio, que fisicamente separa a superfície óssea da medula óssea contida no seu interior.

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).

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.

São responsáveis pela formação, reabsorção e manutenção da osteoarquitetura três tipos de células ósseas, 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.

Junqueira e Carneiro (2004) observaram que histologicamente há duas variedades de tecido ósseo: o imaturo, ou osso primário, e o maduro, ou lamelar. Ambos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz extracelular. No tecido ósseo primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida, em menor conteúdo mineral. Enquanto no tecido ósseo secundário, as fibras colágenas organizam-se em lamelas, formando o sistema de Havers. 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.

Os osteoblastos são células uninucleadas que sintetizam tanto colágeno quanto as proteínas não colagenosas da matriz óssea (a 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).

2.2 Remodelação óssea

O osso é remodelado em um fenômeno cíclico que consiste na reabsorção osteoclástica seguida pela formação osteoblástica. Embora evidências recentes sugiram que o hormônio do crescimento (GH) participa na remodelação óssea, o mecanismo exato continua incerto. A série atual de estudos *in vitro* apontou esclarecer que o GH afeta a formação e a reabsorção (CHIHARA e SUGIMOTO, 1997).

A remodelação ocorre quando há o equilíbrio entre o processo de formação óssea e o processo de reabsorção óssea, em que o osso é gradualmente substituído e declararam que 0,7% do esqueleto humano é reabsorvido diariamente e repostado por osso saudável e que a remodelação de todo o esqueleto demora 142 dias. A célula diretamente envolvida nesse processo é o osteoclasto. É uma célula altamente móvel e pode migrar ao longo das superfícies ósseas, e se localizar em várias áreas a serem reabsorvidas. Passam a secretar enzimas hidrolíticas que dissolvem o tecido ósseo formando lacunas de reabsorção (MARX e GARG, 1998).

Um modelo de animal conveniente para teste de materiais substitutos de osso, proposto por Frame (1980), cita que a utilização de animais de grande porte,

além de necessitarem de espaço adequado, são caros para adquirir e manter. Para superar essas dificuldades, outros pesquisadores têm usado animais pequenos como ratos e coelhos. Os defeitos preparados nesses animais são pequenos e, esses animais, mostram uma boa reparação óssea.

Remodelação óssea é definida por Robert et al. (1987) como *turnover* ou reestruturação interna da estrutura óssea pré-existente. É um fenômeno em nível tecidual em que ocorre a ativação (A) de células precursoras ósseas, resultando em uma seqüência de atividades (1) de reabsorção (R): (2) quietude (Q): e (3) formação (F). A duração do ciclo de remodelação A-R(Q)-F, referida por Frost (apud ROBERTS, 1987) é de cerca de 6 semanas para coelhos, 12 semanas para cachorros e 17 semanas para homens. Fase de quietude (Q) é um período de reversão onde osteoclastos são substituídos por osteoblastos. O resultado da fase de formação (F) é o que tem maior variação entre as espécies. A cavidade é preenchida em 4, 5, 10 ou 13 semanas para coelhos, cachorros e para homem, respectivamente. A média de duração do ciclo de remodelação A-R(Q)-F é diretamente proporcional ao tamanho do animal. Usando coelho X como base, os fatores para eventos fisiológicos similares em cachorros e humanos é 2 X e 3 X, respectivamente (Tabela 1). A remodelação da interface osso implante, em osso cortical de um coelho entre 6 e 18 meses de idade, assumindo a proporção do tempo de remodelação (fator de 3 X), o equivalente em humano é de 17 semanas (Tabela 2).

Tabela 1. Ciclo de remodelação óssea cortical

	Coelho	Cachorro	Homem
Ativação (A)	0.5 semanas	0.5 semanas	1.0 semanas
Reabsorção (R)	1.0	1,5	2,0
Quietude (Q)	0,5	1,0	1,5
Formação (F)	4,5	10,0	13,0
A-R-(Q)-F	6,0	12,0	17,0
Fator	X	2X	3X

Tabela 2. Curso de tempo do desenvolvimento da interface de um implante endósseo no osso cortical.

	Coelho	Homem (3X)
Modelação da Superfície		
Estágio 1: Formação do Calo	2 semanas	6 semanas
Estágio 2: Compactação lamelar	6 semanas	18 semanas
Remodelação, Maturação		
Estágio 3: Remodelação da interface	6 semanas	18 semanas
Estágio 4: Maturação Compacta	18 semanas	54 semanas

2.3 Enxertos ósseos

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 (LOZANO; CESTERO; SALYER, 1976; ALBREKTSSON, 1980; HARDESTY; MARSH, 1990; PINHOLT et al., 1994; GARG, 2004).

Segundo Burchardt e Enneking (1978), quando comparados o osso homogêneo e autógeno em sítios enxertados, a osteogênese inicia-se mais tardiamente no homogêneo, enquanto na primeira semana já existem indícios de formação óssea periférica com osso autógeno, no osso homogêneo pode iniciar somente após quatro semanas. Isso se deve à deficiência vascular inicial, embora ela possa ser alcançada em até 8 meses.

Perrot Smith e Kabam (1992) citaram que a maior vantagem do osso fresco congelado sobre o osso liofilizado é que as proteínas osseointodutoras não são destruídas durante o processamento, o que pode resultar em uma melhor formação óssea e na diminuição da reabsorção em longo prazo. Os autores avaliaram os resultados do uso de osso fresco congelado, utilizado isoladamente ou em combinação com o osso autógeno para a reconstrução óssea com finalidade de instalação de implantes. Eles relataram que o sucesso dos implantes foi semelhante as regiões enxertadas com osso autógeno.

Gazdag et al. (1995) classificaram os enxertos ósseos de acordo com sua composição tecidual; suas características anatômicas; seu local de origem cortical ou esponjosa; 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 ou homogêneo, 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.

De acordo com Tomford e Mankin (1999), para obtenção do enxerto ósseo homogêneo a fonte mais comum é doador cadavérico. Os autores descrevem que a preocupação com doenças transmissíveis (HIV, hepatites B e C) pela utilização de enxertos homogêneos está diminuindo, resultado de testes cada vez mais sensíveis. Outro método considerado imprescindível para prevenção da transmissão de doenças é a triagem do doador com base no histórico médico, o que elimina cerca de 90% dos doadores não habilitados. A AATB desenvolveu um modelo padronizado de histórico médico, utilizado em todos os bancos que seguem suas diretrizes.

Shand et al. (2002) desenvolveram um estudo em defeitos efetuados na calvária de coelhos onde foram aplicados enxertos autógenos e enxertos homogêneos frescos congelados. Foram utilizados 15 coelhos, doze deles receberam osso homogêneo congelado e três osso autógeno. Após um período de nove e doze meses, os coelhos foram sacrificados e os espécimes examinados radiograficamente, histologicamente e com microscopia de fluorescência. Em ambos os grupos, o exame radiográfico mostrou união óssea. A análise histológica revelou que tanto o grupo autógeno como o grupo homogêneo fresco congelado demonstraram reposição com osso vital, e também neovascularização. Segundo os autores a incorporação do osso congelado é mais lenta, apesar de contar com mecanismos osteocondutores e osteoindutores. Isso poderia ser o resultado de um potencial mais baixo para osteoindução desse material, quando comparado ao enxerto autógeno.

Garg (2004) relatou que o material de enxerto ideal deve transferir células ósseas com potencialidade de trabalho, 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.

Petrungaro e Amar (2005) publicaram o relato de três casos clínicos nos quais foram utilizados enxertos em bloco de osso homogêneo para reconstrução óssea em regiões com defeito, com a finalidade de uma futura reabilitação com implantes. Em todos os casos, realizou-se análise histológica do osso e foi observada uma nova formação óssea agregada ao osso original. Em um dos casos, foram feitas próteses unitárias sobre implantes na região enxertada e, após um período de um ano e meio em função, a crista óssea reconstruída foi mantida ao longo do tempo.

2.3.1 Regeneração óssea guiada (ROG)

Kahnberg (1979) relatou estudo realizado em 18 coelhos adultos para o processo de reparação em defeitos criados na base da mandíbula, utilizando uma lâmina de Teflon interposta entre o tecido ósseo e o periósteo adjacente. Essa técnica preveniu o desenvolvimento e a invasão de tecido de cicatrização fibroso, contribuindo para que ocorresse a regeneração óssea.

Brugnami et al. (1999), ao avaliarem através de procedimentos de regeneração óssea guiada em alvéolos e defeitos de rebordo, com a utilização de

Demineralized Freezed Dried Bone Allograft (DFDBA) associado a uma membrana de e-PTFE, concluíram que o DFDBA possui propriedades osseocondutivas que colaboram para o crescimento ósseo tanto em alvéolos intactos como em defeitos de rebordo. Observaram remanescentes do biomaterial, com lacunas preenchidas com células ósseas incorporadas a um novo osso.

De acordo com Slotte; Lündgren e Burgos (2003) utilizaram um modelo de regeneração óssea guiada na calvária de coelhos, para avaliar se o uso de enxertos ósseos autógenos ou de osso bovino mineral (Bio-Oss) combinados com uma barreira mantenedora de espaço, aumenta o ganho ósseo, comparados à barreira sozinha. Os autores utilizaram 16 coelhos, em cujas calvárias foram fixados dois cilindros de titânio com tampas rosqueáveis.

Aplicou-se em um dos cilindros enxerto autógeno ou osso bovino mineral; e no outro somente coágulo sangüíneo. Após 12 semanas, os coelhos foram sacrificados para realização de análise histológica e histomorfométrica. Ocorreu maior formação óssea nos dois grupos com enxerto quando comparado ao grupo com coágulo. Segundo os autores, quantidades semelhantes de tecido ósseo mineralizado foram encontrados nos dois grupos teste, e então concluíram que a utilização de enxerto bovino mineral e de enxerto ósseo gerou mais tecido do que o cilindro somente com coágulo, e que os enxertos resultaram em quantidades semelhantes de osso mineralizado.

Busenlechner et al. (2005) realizaram um estudo em seis macacos adultos, com o objetivo de avaliar a neoformação óssea em espessura com a utilização de membranas de colágeno associadas aos enxertos autógenos em bloco, e a blocos de osso bovino desproteinado. Os procedimentos foram comparados aos enxertos autógenos em bloco apenas, sem a utilização de barreira. Após nove meses, os

animais foram sacrificados e as amostras dos blocos submetidos à análises histológicas e histomorfométricas. Verificou-se então que não houve diferença de novo osso encontrado entre os grupos teste com membrana. Entretanto, ocorreu uma menor formação óssea com o grupo de enxerto autógeno em bloco sem a utilização da membrana.

Manfro (2005) realizou estudo com cilindros de titânio fixados em calvária de coelhos para avaliação dos substitutos ósseos xenógenos inorgânicos bovinos Bio-Oss[®], Bone-Fill[®] e Genox[®], demonstrando ser um modelo experimental que simula técnica de regeneração óssea guiada com utilização de membranas impermeáveis. O autor constatou que, tanto macroscopicamente quanto microscopicamente, o Bio-Oss e o Bone-Fill obtiveram resultados semelhantes: aspecto mineralizado com boa incorporação de suas partículas, enquanto o Genox obteve resultados inferiores, com pouca mineralização e pouca incorporação de suas partículas.

Pelegrine (2006) realizou um estudo clínico e histomorfométrico, comparando a utilização de osso autógeno e osso homogêneo fresco congelado associados ou não a medula óssea autóloga com cilindros de titânio em calvária de coelhos, no período de 2 e 3 meses. O autor concluiu que não existe diferença significativa nos grupos de sua pesquisa em relação à quantidade de osso neoformado, tanto clinicamente quanto histomorfometricamente. Entretanto, histologicamente, verificou uma quantidade maior de partículas ósseas residuais no grupo com osso homogêneo fresco congelado.

Fonseca (2006) realizou um trabalho para avaliar potencial de formação óssea com cilindros de titânio em calvária de coelhos, utilizando materiais xenógenos inorgânicos nacionais (Gen-ox-inorg e Bone-Fill) com Bio-Oss em proporção de mistura de 1/1 de cada biomaterial com osso autógeno. O autor

concluiu que o Bone-Fill e o Bio-Oss apresentaram resultados muito semelhantes, próximos aos obtidos pelo osso autógeno puro, enquanto o Gen-ox-inorg apresentou resultados inferiores aos demais.

Furtado (2007) realizou um estudo para avaliar a ROG com cilindros de titânio em calvária de coelhos, utilizou osso desmineralizado seco congelado (DFDBA), Bio-oss, associados ao osso autógeno e DFDBA sem associação. Verificou macroscopicamente maior volume com o DFDBA sem associação, e o melhor resultado histológico foi obtido com a associação do osso autógeno com o DFDBA.

2.4 Hormônio do crescimento humano (hGH)

O hormônio do crescimento humano (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. Promove o aumento do 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, assim realmente, o hGH acentua a proteína corporal e utiliza as reservas de gordura e conserva carboidratos (GUYTON; HALL, 2002).

Aspenberg et al. (1994) estudaram incorporação de enxerto ósseo alógeno durante tratamento com rhGH em ratos fêmeas. Foram removidos blocos de 10 ratos fêmeas, passaram por processo de congelamento e foram enxertados em compartimentos implantados na tíbia de 20 ratos fêmeas divididos em dois grupos.

Um grupo recebeu injeções intraperitoneal de 1.5 UI de rhGH duas vezes ao dia e o outro grupo recebeu soro fisiológico. Amostras de sangue foram colhidas com 3 e 6 semanas para análise, após 6 semanas os ratos foram sacrificados e as amostras colhidas 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 tíbia do lado não operado ficou mais longa no grupo tratado com rhGH, porém a tíbia 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.

Lo et al. (1995) avaliaram através de um estudo 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, sendo 16 em cada grupo. Um grupo foi aplicado injeções subcutâneas de rhGH (Norditropin) na dose de 0,3 UI/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 a melhora da osteogênese.

O hGH é secretado mais intensamente nas primeiras 2 horas de sono profundo. Sendo que a concentração normal de hGH no plasma do adulto está entre 1,6 e 3 ng/ml e na criança ou adolescente é cerca de 6 ng/ml. Com frequência, esses valores podem ser aumentados até 50 ng/ml após depleção das reservas

corporais de proteínas ou carboidratos durante a ausência prolongada de alimentos (PIRINEN, 1995).

2.4.1 Fisiologia do hormônio do crescimento humano (hGH)

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. Os efeitos do hGH no crescimento ósseo são nítidos, principalmente no que se refere à condrogênese e à calcificação (GOODMAN, 1974).

Indivíduos que não têm 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 hormônio de crescimento humano (hGH). Muitos testes de terapia com rhGH em indivíduos idosos demonstram importantes efeitos que sugerem ações antienvelhecimento como o aumento da deposição de proteínas no corpo, particularmente nos músculos, diminuição dos depósitos de gordura e a sensação de aumento de energia (RUDMAN et al., 1990).

Nos dias atuais o hormônio de rhGH é obtido da bactéria *Escherichia coli*, em decorrência da aplicação bem sucedida da tecnologia do DNA recombinante, tornando-se disponível em quantidades suficientes para fins terapêuticos. Os indivíduos que apresentam deficiência 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 várias funções metabólicas no organismo (PIRINEN, 1995).

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; MACEY, 1974; GUYTON; HALL, 2002).

Guyton e Hall (2002) constataram 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. O hormônio hGH é secretado pela hipófise anterior 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.

Sabe-se ainda, por dados provenientes de Guyton e Hall (2002) 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 possam 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 hGH.

A alta quantidade 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 (RUDMAN et al., 1990; GUYTON; HALL, 2002).

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

2.4.2 Efeitos no tecido ósseo

Os efeitos do hormônio de crescimento humano (hGH) no crescimento ósseo são nítidos, principalmente no que se refere à condrogênese e à calcificação. Após a hipofisectomia cessa a formação de cartilagem e as placas epifisiárias dos ossos longos se atrofiam. A administração de GH restabelece a formação de cartilagem e ocasiona o alargamento das placas epifisiárias (GOODMAN, 1974).

Isaksson; Jansson e Gause (1982) realizaram um experimento com uso local de hormônio do crescimento humano biossintetizado (rhGH) em tíbias de ratos

hipofisectomizados e obtiveram resultados com efeitos estimulatórios muito significantes no crescimento ósseo acumulado longitudinal. Também relatam que a produção de somatomedinas é consequência da ação do hormônio de crescimento 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).

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 a proliferação de osteoblastos, atividade alcalina fosfatase e 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 para verificar e coletar dados recentes que indiquem a importância do rhGH na regulação da remodelagem óssea. O autor relatou que o rhGH é o hormônio mais importante no crescimento ósseo longitudinal, estimula o crescimento de cartilagem e outros tecidos pelo aumento tanto do número quanto do tamanho das células e 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.

2.4.3 Estudos pré-clínicos

Back; Jorgensen e Andreassen (1990) fizeram um estudo em ratos com fêmeas, com 3 meses de idade, foram realizadas injeções subcutâneas na parte posterior do pescoço, iniciadas uma semana antes da fratura do osso da tíbia. Os autores concluíram que o hormônio de crescimento humano recombinante (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 a influência da administração do rhGH em 65 ratos fêmeas nas 3 primeiras semanas de reparação de fraturas na tíbia. Foram administradas doses de hormônio do crescimento humano numa concentração de 2.7 mg/kg divididas em duas aplicações diárias por períodos de 1, 2 e 3 semanas

após as fraturas. O estudo mostrou que existem 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; Jorgensen e Andreassen (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.

Andreassen et al. (1995) investigaram a influência de hormônio rhGH administrado por 80 dias na formação óssea, força mecânica e a composição do osso cortical em ratos com 2 anos de idade. Fizeram um estudo com 51 ratos machos que foram 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 do crescimento do rato e tiroxina. Foi concluído então que existe a possibilidade de 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. A microscopia de luz polarizada mostrou que esse novo osso depositado é

organizado da mesma forma que as lamelas concêntricas do osso remanescente e com a mesma força mecânica.

Hedner; Linde e Nilsson (1996) realizaram um estudo em 93 ratos machos, a administração local e sistêmica, dentre outras substâncias, do rhGH; Genotropin, Lot 66138 A5; 2.0 UI/mg) combinado com membranas e-PTFE (GORE-TEX), produziram defeitos transósseos de 5 mm na região do ângulo da mandíbula. Instalaram membranas tanto por vestibular quanto por 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 de 2 e 20 µg/dia. Esse estudo enfatizou que o rhGH exerce efeito específico e direto no tecido ósseo.

Cacciafesta et al. (2001) efetuaram uma pesquisa, com o objetivo de avaliar a força biomecânica e a formação óssea em defeitos na calvária de ratos utilizando membranas de politetrafluoroetileno (e-PTFE) e tratados sistematicamente com o rhGH. Quarenta ratos fêmeas foram divididas em dois grupos aleatoriamente de 20 animais cada um. Os defeitos do osso foram cobertos com uma membrana de e-PTFE extra e endocranialmente. No dia da operação, o grupo rhGH recebeu 2.7 mg rhGH/Kg/dia e o grupo placebo recebeu solução de cloreto de sódio. Os animais foram sacrificados 28 dias após a operação. A carga final, a rigidez final, e a

absorção de energia na carga final foram significativamente aumentados no grupo rhGH ($P > 0.003$). Também, o tecido seco e os pesos da cinza foram aumentados significativamente no grupo rhGH ($P < 0.001$). A reconstrução 3D do osso mostrou que havia quase duas vezes mais volume do osso atual nos defeitos do grupo rhGH comparados com o grupo do placebo. 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) estudaram o efeito de uma dose única de 4 UI 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 do experimento.

Tresguerres et al. (2003) avaliaram o efeito do 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 UI 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 animais foram

sacrificados e foram realizadas as análises microscópicas e histomorfométricas. Os resultados mostraram que o grupo que recebeu rhGH apresentou crescimento ósseo aumentado de osso 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 observado.

Tresguerres et al. (2005) estudaram 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 com 1, 2, 3 e 6 semanas após as cirurgias. Os resultados sugeriram que a administração local do rhGH pode estimular a fase inicial do processo de remodelação no grupo teste.

Mibsan (2006) avaliou 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, comparando dois grupos um com rhGH e outro sem hormônio de crescimento, e concluiu que o enxerto ósseo tratado com hormônio de crescimento humano biossintetizado (rhGH), incorporou mais rápido no leito receptor do que o enxerto do grupo controle.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, mediante análise macroscópica e histológica os efeitos do uso local do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) na incorporação dos enxertos ósseos autógeno, homogêneo fresco congelado, xenógeno seco desmineralizado congelado (DFDBA), xenógeno inorgânico bovino particulados em calota craniana de coelhos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Material permanente

- a) 01 motor elétrico¹
- b) 01 peça reta cirúrgica 1:1²
- c) Instrumental cirúrgico:
 - Afastador Minnessota³
 - Seringa Carpule³
 - Cubas metálicas para soro³
 - Cabo de bisturi número 3³
 - Pinça dente de rato³
 - Pinça hemostática tipo mosquito³
 - Descolador de Molt 2/4³
 - Porta agulha³
 - Tesoura Goldman-Fox³
 - Sonda Peridontal³
 - Broca trefina com 6mm de diâmetro⁴
- d) 1 Kit cirúrgico para instalação de parafusos de fixação⁴

¹ Driller, São Paulo, Brasil.

² Kavo, Joinville, Brasil

³ Duflex, São Paulo, Brasil.

⁴ Conexão–Sistema de Implantes, São Paulo, Brasil.

4.1.2 Material de consumo

- a) 80 parafusos de 1,5mm de diâmetro por 4mm de comprimento⁵
- b) 10 raspadores ósseos descartáveis⁶
- c) 40 cilindros de titânio⁷
- d) 20 fios de sutura mononylon 3-0 com agulha de 1,7 cm⁸
- e) 10 frascos de soro fisiológico de 250 ml⁹
- f) 10 jogos de campo estéril descartáveis¹⁰
- g) 10 lâminas de bisturi número 15¹¹
- h) 10 sugadores cirúrgicos estéreis descartáveis¹²
- i) 01 frasco de solução de iodo-povidine 1%¹³
- j) 20 pares de luvas cirúrgicas estéreis¹⁴

⁵ Conexão–Sistema de Implantes, São Paulo, Brasil.

⁶ SIN-Sistema de Implantes Nacionais, São Paulo, Brasil.

⁷ Mastertech, Barueri, SP, Brasil.

⁸ Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil.

⁹ Áster, São Paulo, Brasil.

¹⁰ Alva Doctor, São Paulo, Brasil.

¹¹ Feather, São Paulo, Brasil Indusbello, Paraná, Brasil.

¹² Indusbello, Paraná, Brasil.

¹³ DGL, São Paulo, Brasil.

¹⁴ Madeitex, São Paulo, Brasil.

4.1.3 Drogas utilizadas

- a) Acepran 1% (10mg/ml)¹⁵
- b) Cloridrato de Ketamina (Vetanorcol[®] – 50mg/ml)¹⁶
- c) Cloridrato de Xilazina (Calmiun[®] – 20mg/ml)¹⁷
- d) Cloridrato de Peptidina (Dornot[®] – 50mg/ml)¹⁷
- e) Enrofloxacino (Flotril[®] 2,5% – 25mg/ml)¹⁸
- f) Flunixinina Meglumina (Banamine[®] – 50mg/ml)¹⁸
- g) Lidocaína HCl 2% com epinefrina 1:100.000 (1,8ml)¹⁹
- h) Midazolan²⁰
- i) Cloreto de potássio 19,1%²¹
- j) Tiopental sódico (Thiopentax[®])²²

¹⁵ Univet, São Paulo, Brasil.

¹⁶ König, Avellaneda, Argentina.

¹⁷ União Química Farmacêutica, Embu-Guaçu, SP, Brasil.

¹⁸ Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil.

¹⁹ DFL, Rio de Janeiro, Brasil

²⁰ Fenelon, São Paulo, Brasil.

²¹ Aster, São Paulo, Brasil.

²² Cristália, São Paulo, Brasil.

4.1.4 Material biológico

- (a) Osso autógeno removido com raspadores²³
- (b) 2,0 mg de osso homogêneo triturado fresco e congelado²⁴
- (c) 03 frascos de 0,5 cc cada de enxerto ósseo xenógeno seco desmineralizado congelado (DFDBA)²⁵
- (d) 03 frascos de 0,5 cc cada de osso xenógeno inorgânico bovino (Bone-Fill).²⁶

4.2 Método

A pesquisa foi registrada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNISA de acordo com o parecer número 026/2007 em 21 de março de 2007 (em anexo). Este trabalho foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal elaborado pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal), entidade filiada ao *International Council of Laboratory Animal Science* (ICLAS), com base em normas internacionais em pesquisa que apresentam-se com base na tríade: "Sensibilidade, bom senso e boa ciência".

Para os procedimentos cirúrgicos experimentais foram selecionados 11 coelhos da raça New Zealand, fêmeas, com idade entre 6 a 8 meses e peso variando entre 3,2 a 3,6kg, sendo separados aleatoriamente em dois grupos, de 5 coelhos cada, Grupo 1 e 2, a serem estudados após 8 e 12 semanas respectivamente. Cerca de 15 dias antes do procedimento cirúrgico o coelho

²³ SIN – Sistema de Implantes Nacionais, São Paulo, Brasil.

²⁴ Uni Oss, Marília, Brasil.

²⁵ Dembone, Pacific Coast, Califórnia, USA.

²⁶ Bone-Fill Bionnovations São Paulo, Brasil

restante foi sacrificado e suas tíbias foram removidas, para processar o osso homogêneo fresco congelado no banco de tecidos músculo-esquelético do Hospital da Universidade de Marília. Todos os coelhos utilizados nessa pesquisa foram provenientes do laboratório de pesquisa do biotério da Universidade de Santo Amaro – UNISA, sendo assistidos e medicados pela equipe da Medicina Veterinária do biotério. Os animais foram acondicionados em gaiolas com ventilação e temperaturas controladas ($22 \pm 2^{\circ} \text{C}$) e foram alimentados com ração Nutríara 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.

4.2.1 Procedimentos cirúrgicos

As cirurgias foram realizadas no Laboratório de Técnicas Cirúrgicas da Universidade de Santo Amaro em local e condições apropriadas, visando à manutenção da cadeia asséptica.

Após a pesagem do animal procedeu-se a medicação pré-anestésica com 0,2 ml de acepran a 1% por via intramuscular. Após 10 minutos foi feita a indução anestésica utilizando-se: 1,8 ml do cloridrato de ketamina associado a 0,9 ml do cloridrato de xilazina e a 0,4 ml do cloridrato de peptidina por via intramuscular. As freqüências cardíaca e respiratória e os reflexos palpebrais foram monitorados, durante todo o procedimento, por um médico veterinário responsável.

Inicialmente foi feita a tricotomia e a antissepsia do campo cirúrgico com iodopovidine a 1%.

Após a infiltração local de lidocaína a 2% com epinefrina 1:100.000, foi feita uma incisão retilínea, frontonasal sagital, na calvária do coelho. Na seqüência, foi feito um retalho de espessura total para exposição do tecido ósseo da calota craniana do animal, com o auxílio de descoladores de periósteo. Posteriormente, um raspador ósseo foi utilizado para a obtenção do osso autógeno, o que contribuiu para o aplainamento da calota craniana, que normalmente apresenta uma característica levemente convexa.

Cada animal recebeu quatro cilindros ocos de titânio de 5 mm de altura por 6 mm de diâmetro, contendo uma aleta lateral de 2 mm com duas aberturas para inserção dos parafusos de estabilização. Esses cilindros apresentam uma tampa cilíndrica rosqueável e foram adaptados à calota craniana dos coelhos e estabilizados com dois parafusos de 1,5 mm de diâmetro por 4 mm de comprimento, inseridos nos orifícios das aletas laterais. Com uma fresa de 1,1 mm, foram realizadas cinco perfurações no osso em área delimitada pelo interior do cilindro, para expor o osso esponjoso e viabilizar a vascularização do material de enxertia. Esse modelo experimental foi originalmente preconizado por Slotte, Lündgren e Burgos (2003).

Foram constituídos quatro grupos de enxerto, e cada cilindro foi preenchido com um dos seguintes grupos:

AH: Osso autógeno associado com rhGH

HH: Osso homogêneo fresco congelado associado com rhGH

XH: Osso xenógeno bovino inorgânico (Bone-Fill) associado com rhGH

PH: Osso xenógeno seco desmineralizado congelado (DFDBA) associado com rhGH

Portanto, os coelhos foram divididos em grupo 1 e grupo 2, e foram sacrificados com 8 e 12 semanas respectivamente. Os cilindros foram preenchidos de forma ordenada, adotando um sistema de rodízio (horário) para que cada grupo experimental não ficasse localizado sempre na mesma posição. Após embeber os enxertos com rhGH (Norditropin SimpleXx 5mg/1,5ml) com 8 gotas, que é equivalente a 0,4 mg ou 1,2 U/I, proporcionando assim o preenchimento total de cada cilindro, uma tampa oclusiva foi rosqueada em posição para que não existisse a possibilidade de contato do enxerto com o tecido mole sobreposto. Essa tampa promoveu um rosqueamento de 1 mm internamente ao cilindro. A sutura foi realizada utilizando-se fio de mononylon 4.0.

Posteriormente, foi confeccionado um curativo composto de gaze estéril embebida em iodo-povidine e recoberta com atadura de crepe para proteção da área operada, e tanto a sutura como a atadura foram removidas depois de sete dias.

Os coelhos receberam como medicação pós-operatória, 1ml de enrofloxacino; aplicada uma vez ao dia por via intramuscular durante 7 dias e 0,3 ml de flunixinina meglumina aplicada uma vez ao dia durante 3 dias por via intramuscular.

Decorridas 8 e 12 semanas, todos os coelhos de cada grupo foram sacrificados em cada um dos períodos, utilizando-se a técnica preconizada pelo COBEA, por meio de superdose de anestésico geral (Thiopentax[®]). Os tempos de avaliação do presente estudo animal foram padronizados em 8 e 12 semanas devido ao fato desses períodos corresponderem, em humanos a períodos de seis e nove meses,

respectivamente. Esses períodos representam o intervalo de tempo indicado para instalação de implantes em humanos, após reconstrução óssea, já que permitem o estabelecimento de neoformação óssea e maturação do osso na área enxertada. Esses intervalos de tempo de avaliação são justificados pelo conhecimento prévio de que o metabolismo ósseo dos coelhos é cerca de três vezes mais rápido que o de seres humanos (ROBERTS et al., 1987).

Nos dois tempos de avaliação os cilindros foram reabertos e, com o auxílio de uma sonda periodontal calibrada, foram tomadas medidas da quantidade de ganho em altura. As medidas foram realizadas em cinco pontos, e a média desses pontos foi considerada o nível de ganho em altura. Para esse cálculo, foi levada em consideração a característica da tampa rosqueável que, conforme já citado, penetrou 1 mm no cilindro de 5 mm. Portanto, a altura máxima de ganho seria de 4 mm. Mediante a determinação da altura óssea conquistada, foi obtido o volume de ganho ósseo, com a aplicação da fórmula para cálculo do volume de cilindros, em que o volume é igual a π vezes o raio ao quadrado, vezes a altura ($V = \pi r^2 \cdot h$).

4.2.2 Análise histológica

Após a remoção dos cilindros de titânio, a amostra e o osso da calota craniana foram coletados juntos, com o auxílio de uma fresa trefina de 6 mm de diâmetro. Esses fragmentos ósseos foram colocados em frascos contendo formol a 10%, para manutenção da viabilidade histológica por 72 horas. Em seguida, as amostras foram descalcificadas com ácido fólico a 5% por 21 dias, processadas e incluídas em parafina. Imediatamente após, foram realizados cortes com 5 μ m de

espessura utilizando micrótomo. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Mallory e os cortes histológicos foram analisados por meio de microscopia de luz por técnicos em Histologia da UNISA. Os seguintes fatores foram considerados:

- a) Neoformação óssea
- b) Presença de partículas do material do tecido enxertado
- c) Presença de tecido não-mineralizado
- d) Altura do tecido ósseo neoformado medida a partir da superfície externa da cortical da calvária do coelho.

4.2.3 Análise estatística

Para este trabalho foi avaliado o volume macroscópico e utilizados os testes não-paramétricos de Friedman e Mann-Whitney. Na complementação da análise descritiva, foi usada a técnica de Intervalo de Confiança para média.

Antes de iniciar com os resultados, atribui-se para este trabalho um nível de significância de 0,05 (5%). Lembra-se também que todos os intervalos de confiança construídos ao longo do trabalho, foram construídos com 95% de confiança estatística.

Ressalta-se que foram utilizados testes e técnicas estatísticas não paramétricas, porque as condições (suposições) para a utilização de técnicas e testes paramétricos, como a normalidade e homogeneidade das variâncias, não foram encontradas (principalmente a normalidade) neste conjunto de dados.

Seqüência do procedimento



Figura 1. Tricotomia e antissepsia



Figura 2. Incisão e descolamento do retalho

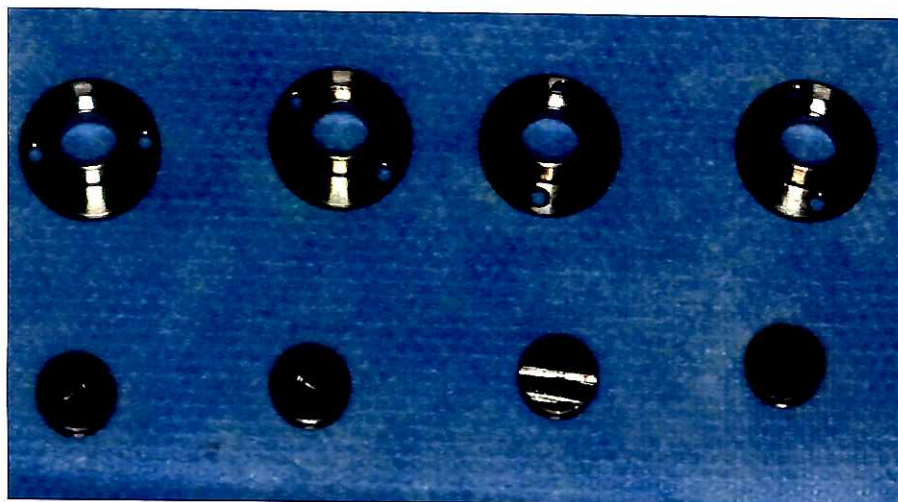


Figura 3. Cilindros de titânio

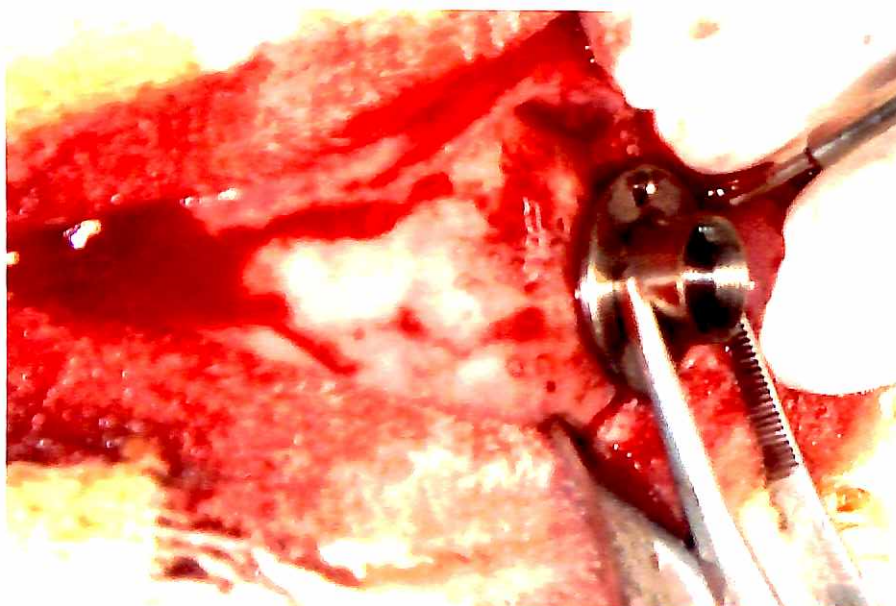


Figura 4. Fixação dos cilindros

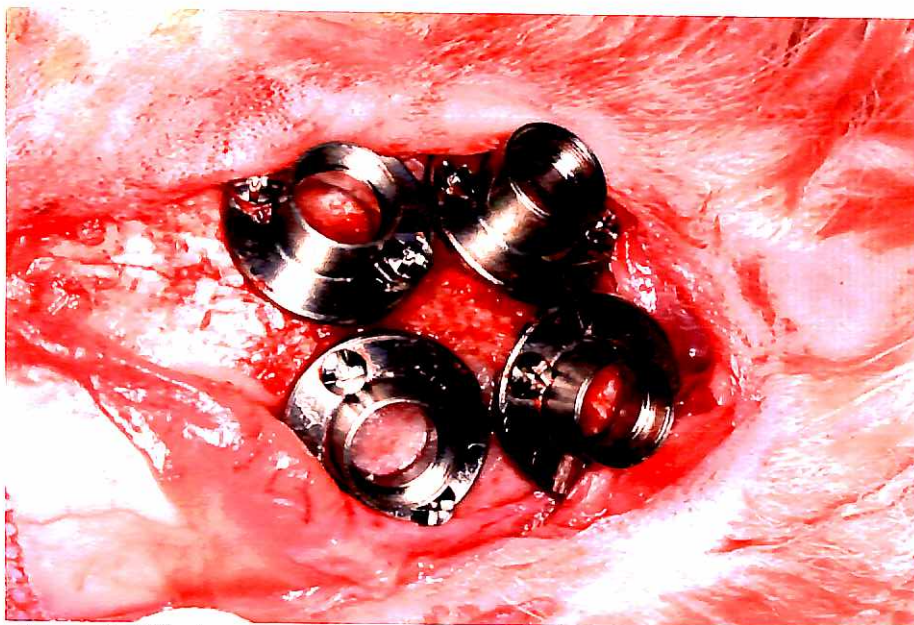


Figura 5. Cilindros instalados

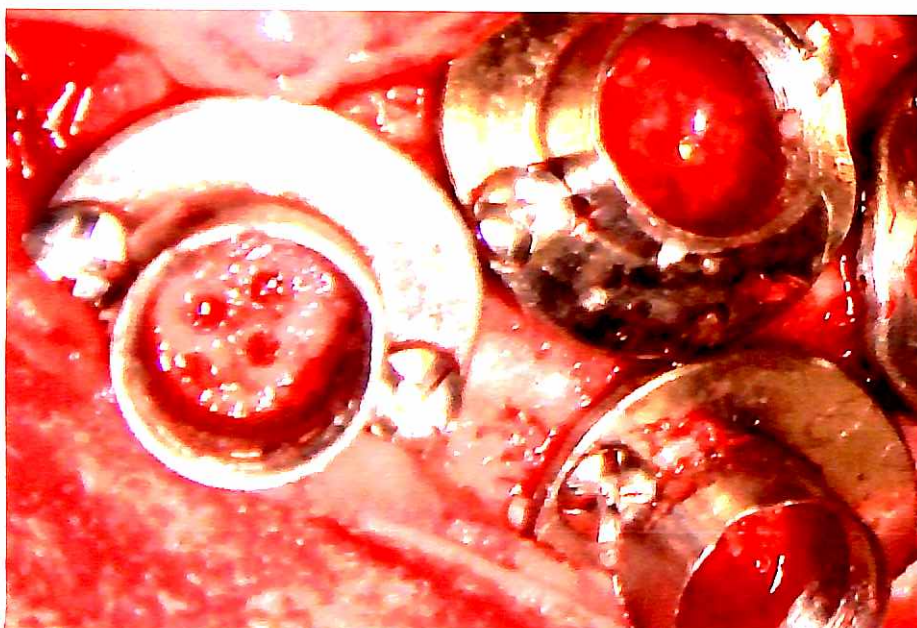


Figura 6. Decorticalização



Figura 7. Osso autógeno

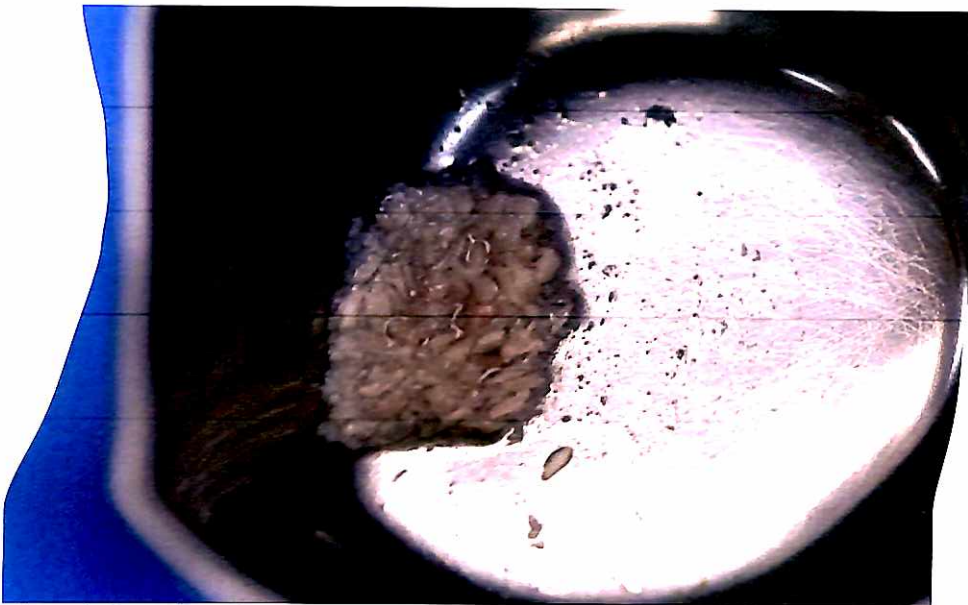


Figura 8. Osso homogéneo congelado

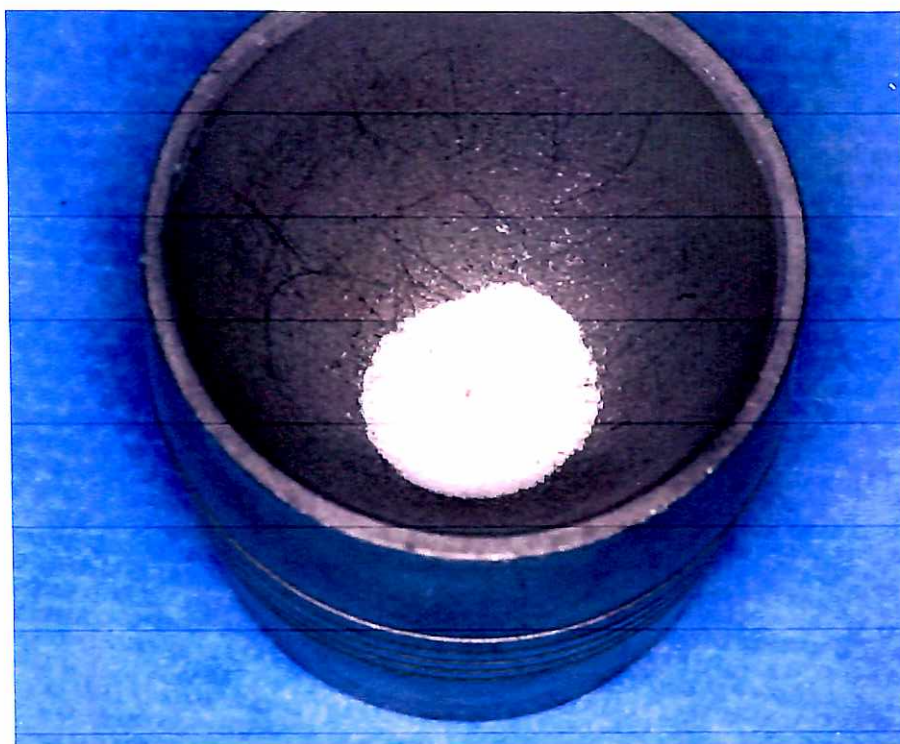


Figura 9. Osso bovino inorgânico

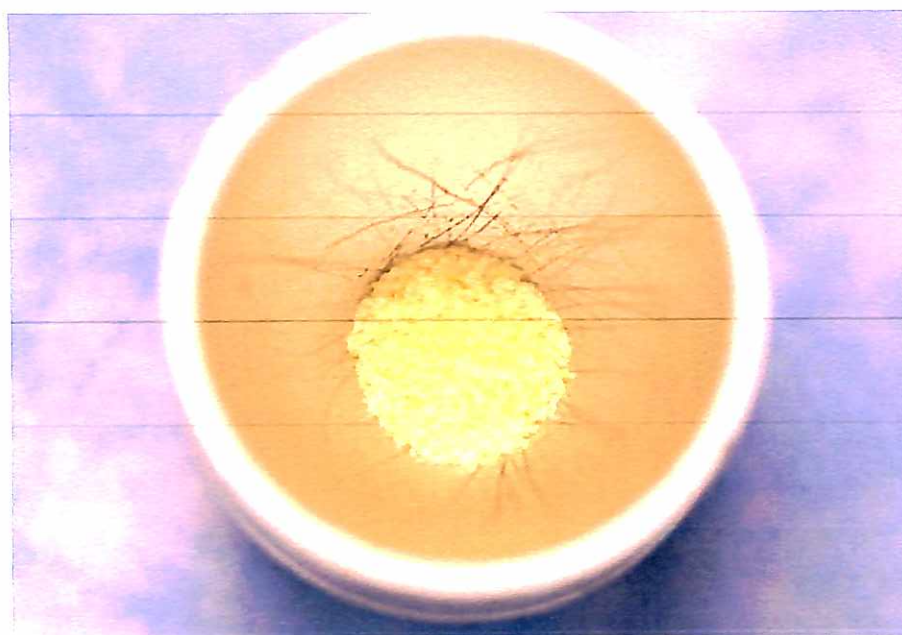


Figura 10. DFDBA



Figura 11. Caneta para aplicação do rhGH

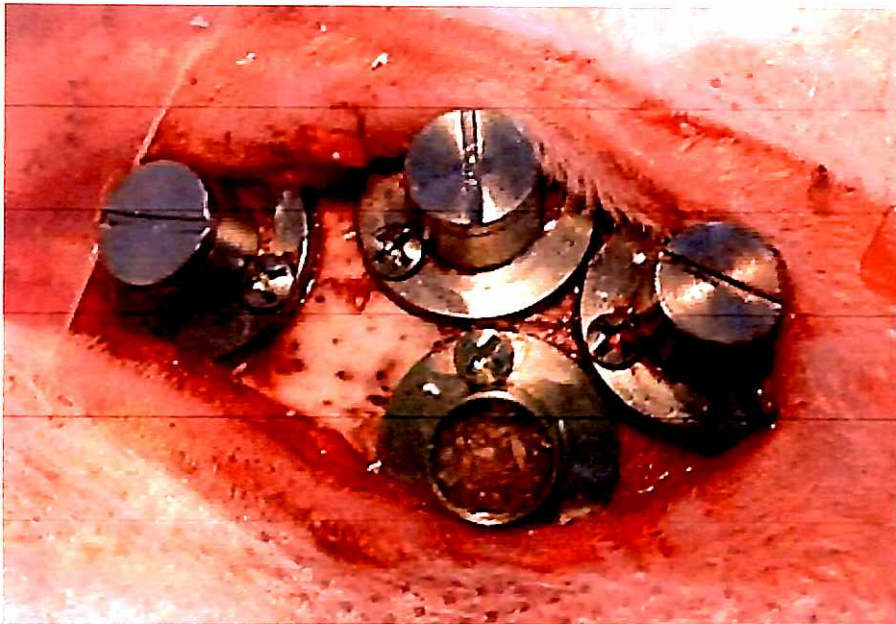


Figura 12. Enxertos em posição com rhGH

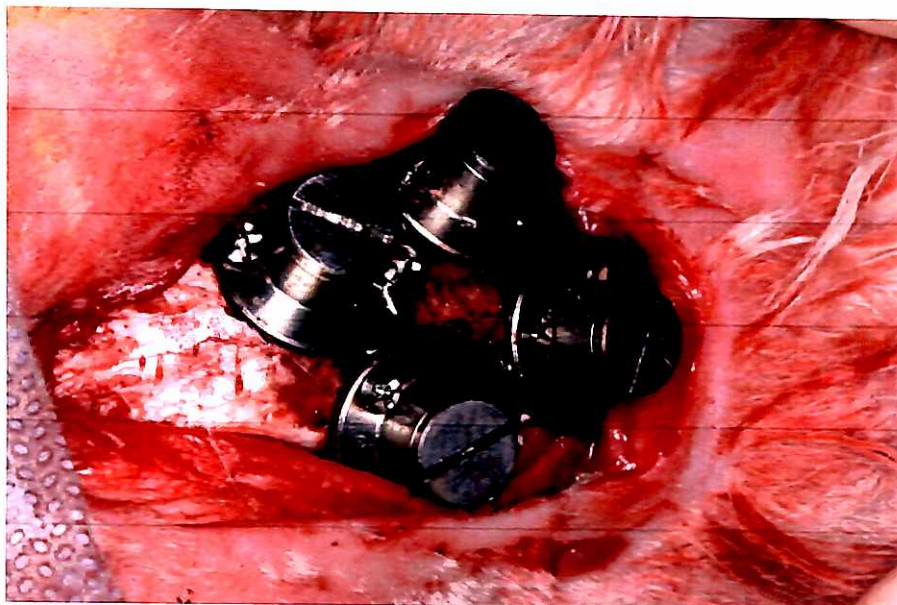


Figura 13. Cilindros fechados



Figura 14. Sutura

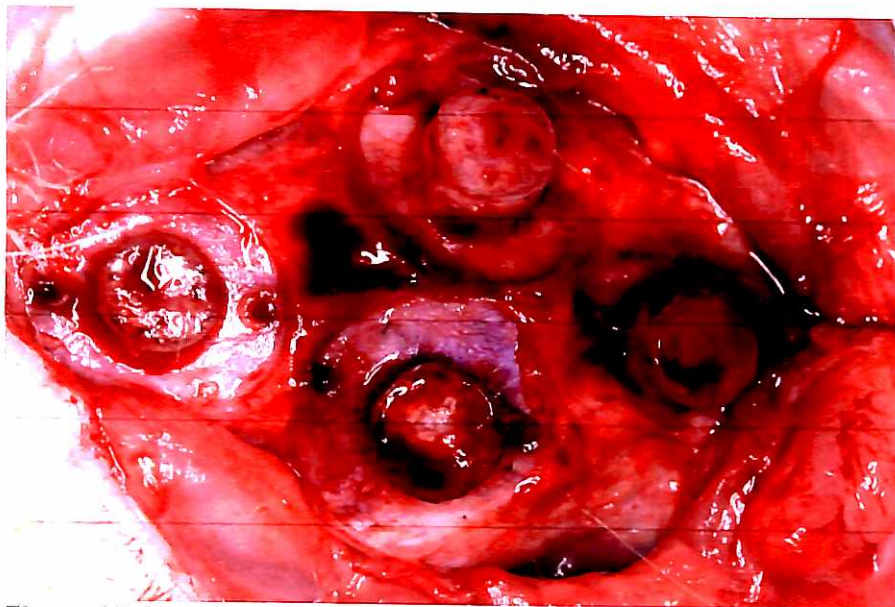


Figura 15. Aspecto após remoção dos cilindros



Figura 16. Espécimes removidas por trefina



Figura 17. Material trefinado para histológico



Figura 18. Material no frasco para exame histológico

5 RESULTADOS

Todos os animais se apresentaram com boa recuperação e com boa reparação da pele. Na intervenção cirúrgica de reabertura e biópsia dos espécimes, todos os cilindros se encontravam estáveis. Após a abertura dos cilindros foram encontradas quantidades variáveis de tecido, que foram inspecionados, em um primeiro momento, visualmente e por sondagem para determinação macroscópica do volume do tecido aumentado. Posteriormente, com o auxílio de uma trefina de 6 mm de diâmetro, foram removidos fragmentos ósseos da área enxertada conjuntamente com a cortical óssea da calota craniana. Esses fragmentos foram processados para análise histológica.

5.1 Macroscópicos

Foram encontrados os seguintes resultados, após a análise macroscópica:

Após 8 semanas:

- 1) **Grupo AH – Autógeno associado ao rhGH:** foram detectadas quantidades pequenas de tecido mineralizado, localizado principalmente no terço inferior do cilindro de titânio mais próximo ao osso da calota craniana, sobre o qual se encontrava um tecido não-mineralizado.

- 2) **Grupo HH – Homógeno fresco congelado associado ao rhGH:** foi encontrado tecido mineralizado nos dois terços inferiores do cilindro, e no terço superior tecido não-mineralizado, existindo uma maior quantidade de tecido mineralizado que nos demais tipos de enxerto.
- 3) **Grupo XH – Xenógeno bovino associado ao rhGH:** foi encontrado tecido mineralizado até a metade do cilindro, e tecido não-mineralizado na outra porção com partículas remanescentes do enxerto na parte superior.
- 4) **Grupo PH – Xenógeno desmineralizado seco associado ao rhGH:** foi detectado tecido mineralizado nos dois terços inferiores do cilindro e no restante superior foi encontrado tecido não-mineralizado, com resultados semelhantes ao enxerto homogêneo congelado.

Após 12 semanas:

- 1) **Grupo AH – Autógeno associado ao rhGH:** foi detectado tecido mineralizado até dois terços do cilindro de titânio, encontrando no restante superior tecido não-mineralizado.
- 2) **Grupo HH – Homógeno fresco congelado associado ao rhGH:** foi encontrado tecido mineralizado em quase todo cilindro de titânio, ficando apenas uma fina camada superior de tecido não-mineralizado, resultando assim uma maior quantidade de tecido mineralizado que nos demais tipos de enxerto.

- 3) **Grupo XH – Xenógeno bovino associado ao rhGH:** foi detectado tecido mineralizado nos dois terços inferiores do cilindro, ficando o restante superior com tecido não-mineralizado e com partículas remanescentes do enxerto.
- 4) **Grupo PH – Xenógeno desmineralizado seco associado ao rhGH:** foi detectada formação de tecido mineralizado em todo o cilindro de titânio, ficando apenas uma fina camada superior com tecido não-mineralizado, fornecendo resultados semelhantes ao enxerto homogêneo congelado.

5.2 Estatísticos

5.2.1 Da análise macroscópica

Tabela 3. Volume ósseo em mm³ obtido pela aferição macroscópica, comparação entre os grupos para cada uma das semanas.

Volume	8 Semanas				12 Semanas			
	AH	HH	PH	XH	AH	HH	PH	XH
Média	48,60	54,26	53,13	52,25	64,43	76,86	67,69	59,91
Mediana	50,86	56,52	56,52	50,86	62,17	79,12	67,82	56,52
Desvio Padrão	8,57	3,10	5,06	5,06	8,57	11,72	12,00	7,58
CV	17,6%	5,7%	9,5%	9,7%	13,3%	15,2%	17,7%	12,7%
Q1	39,56	50,86	50,86	50,86	62,17	79,12	67,17	56,52
Q3	56,52	56,52	56,52	56,52	62,17	84,78	67,82	67,82
N	5	5	5	5	5	5	5	5
IC	7,51	2,72	4,43	4,44	7,51	10,27	10,51	6,65
p-valor	0,615				0,184			

Legenda válida para todas as tabelas e gráficos:

- $p < 0,05$
- AH – Autógeno + rhGH
- HH – Homógeno + rhGH
- XH – Xenógeno bovino + rhGH
- PH – Xenógeno (DFDBA) + rhGH

Capacidade máxima do cilindro: 113,1mm

Tabela 4. Volume ósseo em mm^3 obtido pela aferição macroscópica, comparação entre as semanas para cada um dos grupos

Volume	AH		HH		PH		XH	
	8 Sem.	12 Sem.	8 Sem.	12 Sem.	8 Sem.	12 Sem.	8 Sem.	12 Sem.
Média	48,60	64,43	54,26	76,86	53,13	67,69	52,25	59,91
Mediana	50,86	62,17	56,52	79,12	56,52	67,82	50,86	56,52
Desvio Padrão	8,57	8,57	3,10	11,72	5,06	12,00	5,06	7,58
CV	17,6%	13,3%	5,7%	15,2%	9,5%	17,7%	9,7%	12,7%
Q1	39,56	62,17	50,86	79,12	50,86	67,17	50,86	56,52
Q3	56,52	62,17	56,52	84,78	56,52	67,82	56,52	67,82
N	5	5	5	5	5	5	5	5
IC	7,51	7,51	2,72	10,27	4,43	10,51	4,44	6,65
p-valor	0,013*		0,017*		0,055#		0,163	

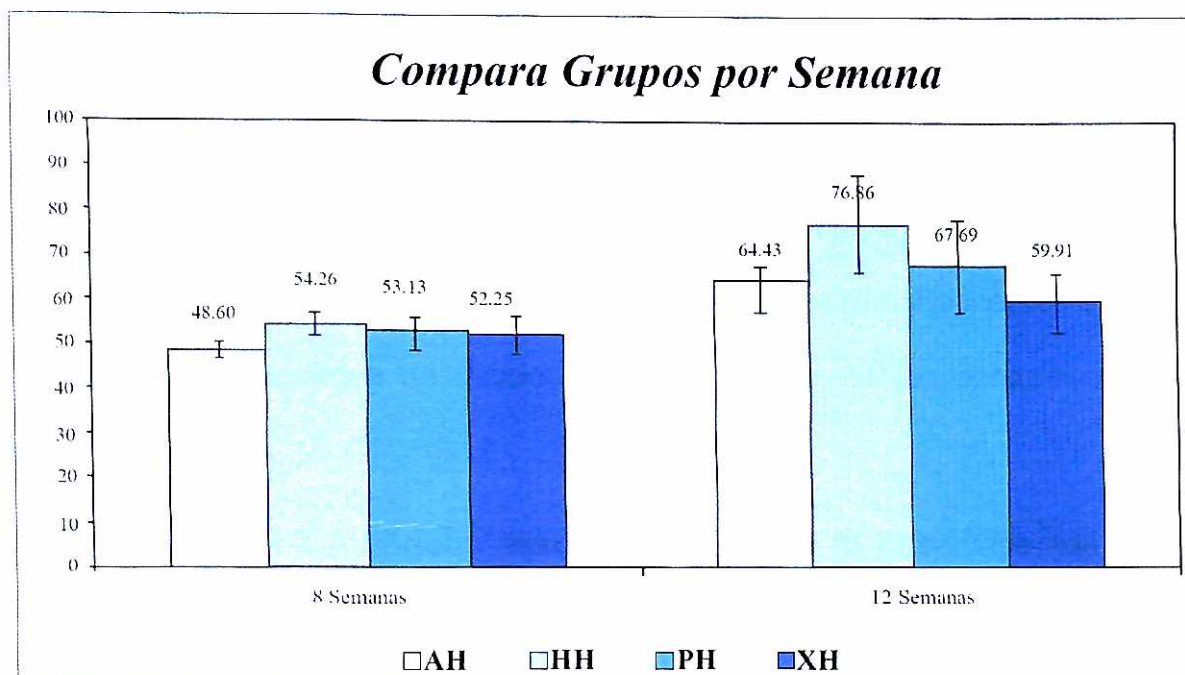


Gráfico 1. Compara ganhos e perdas de volume ósseo aferidos macroscopicamente (mm³).

Os resultados estatísticos do volume formado nas combinações dos grupos de enxerto ósseo autógeno (AH), homogêneo fresco congelado (HH), xenógeno inorgânico bovino (XH) e xenógeno desmineralizado seco congelado (DFDBA) (PH) com hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH), mostram que nos grupos AH e HH é que encontramos diferença estatisticamente significativa entre as semanas. Já no grupo PH, embora a conclusão seja de que não existe diferença, podemos dizer (se necessário) que existe uma tendência à diferença, pois o p-valor está próximo do limite de aceitação.

Em todos os resultados nós podemos notar que existe um aumento entre as semanas, mas somente nos grupos AH e HH o aumento é estatisticamente significativo, enquanto o maior ganho de volume foi no grupo (HH) do enxerto ósseo homogêneo fresco congelado.

5.3 Resultados histológicos

Foram avaliadas em todos os espécimes, histologicamente, a presença e a qualidade do osso neoformado, a presença de partículas remanescentes do material de enxertia e a presença de tecido não-mineralizado (tecido conjuntivo e vasos sanguíneos).

1) Grupo AH – Autógeno associado ao rhGH: foi observado nas amostras uma grande quantidade de osso neoformado com a presença de osso vital, cercado de osteoblastos típicos e presença de osteócitos em lacunas amplas, medula óssea típica presente com vasos sanguíneos e tecido conjuntivo com poucas partículas remanescentes do enxerto.

2) Grupo HH – Homógeno fresco congelado associado ao rhGH: observou-se fragmentos do enxerto envoltos por tecido ósseo neoformado, apresentando também osteoblastos e osteócitos, padrão de formação óssea um pouco mais lenta que o enxerto autógeno mas presente em grande quantidade, presença de vasos sanguíneos e tecido conjuntivo disperso.

3) Grupo XH – Xenógeno bovino associado ao rhGH: foi observada discreta atividade celular com poucos osteoblastos, partículas do enxerto ósseo envolvidas por tecido conjuntivo organizado. Sugerindo um encapsulamento fibroso sem centros de ossificação (formação óssea menor que todos os grupos analisados).

4) Grupo PH – Xenógeno desmineralizado seco associado ao rhGH: observou-se na superfície dos fragmentos atividade celular discreta, maior número de osteoblastos que o osso bovino inorgânico, porém menor que o autógeno e

homógeno. Partículas do enxerto com conjuntivo ao redor, presença de células ósseas porém sem evidências de síntese de matriz ainda neste tempo.

Todas as características microscópicas foram equivalentes entre as amostras de 8 e 12 semanas, e em todos os grupos analisados, os espécimes de 12 semanas apresentavam um nível maior de osso neoformado e de osso maduro. Com relação à quantidade de partículas remanescentes do material enxertado, foi verificado que os grupos de 12 semanas apresentavam um nível reduzido de partículas em comparação aos grupos de 8 semanas. Os resultados indicam que o enxerto ósseo autógeno apresentou os melhores resultados, seguido do grupo HH (homógeno fresco congelado), e que o grupo XH (xenógeno bovino) apresentou os piores resultados.

Figuras histológicas dos grupos de 8 semanas

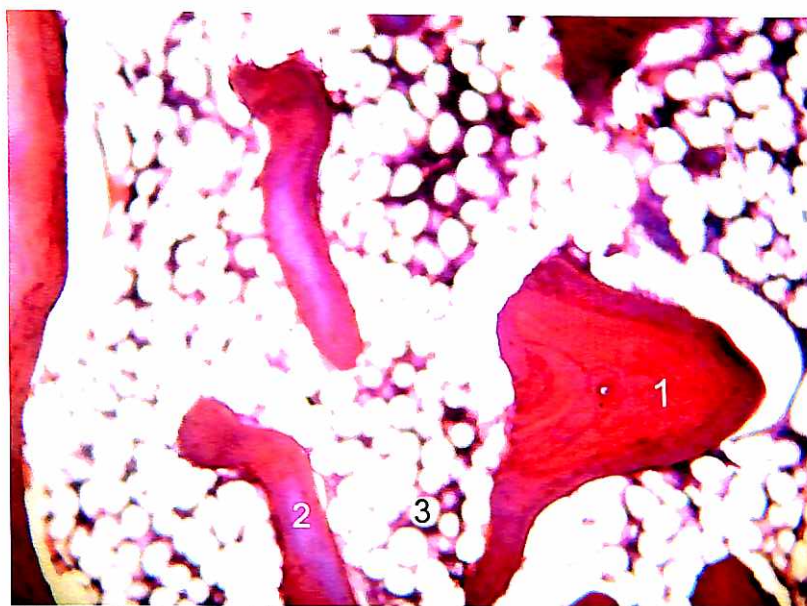


Figura 19. Grupo AH osso autógeno mais rhGH (H.E. 100x). Partícula de enxerto ósseo (1) neoformação óssea (2) espaços medulares neoformados(3).

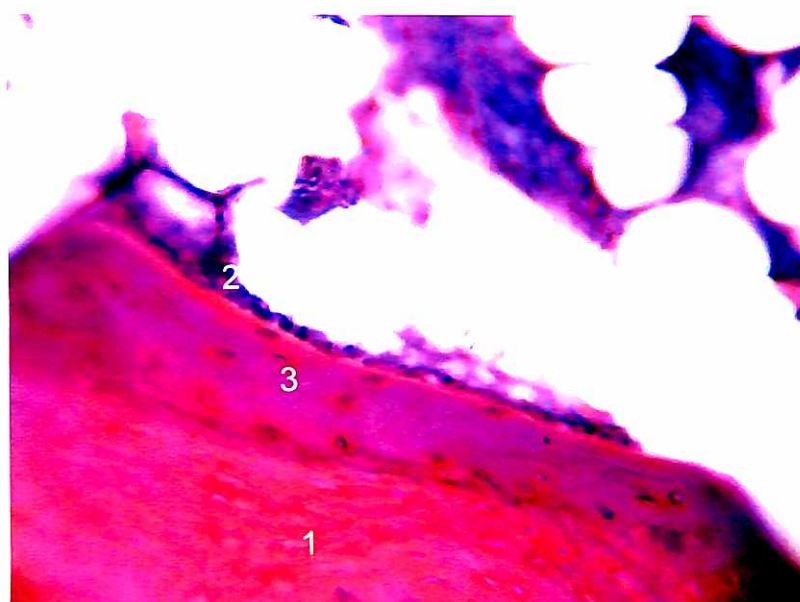


Figura 20. Grupo AH osso autógeno mais rhGH (HE 400X). Partícula de enxerto ósseo (1) osteoblastos colonizando (2) neoformação óssea (3).



Figura 21. Grupo HH osso homogêneo fresco mais rhGH (H.E. 100X). Partícula óssea (1), neoformação óssea (2).

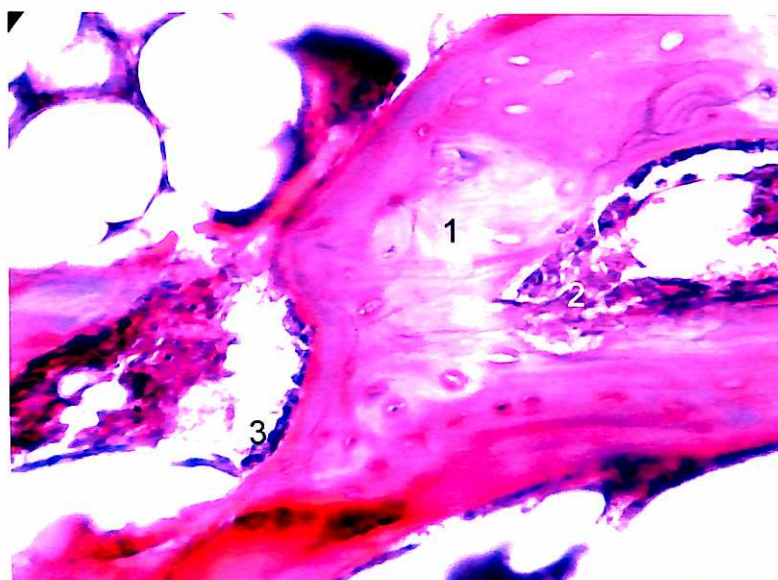


Figura 22. Grupo HH osso homogêneo fresco mais rhGH (H.E. 400X). Partícula óssea (1), colonização de osteoblastos(2), osteoblastos (3).

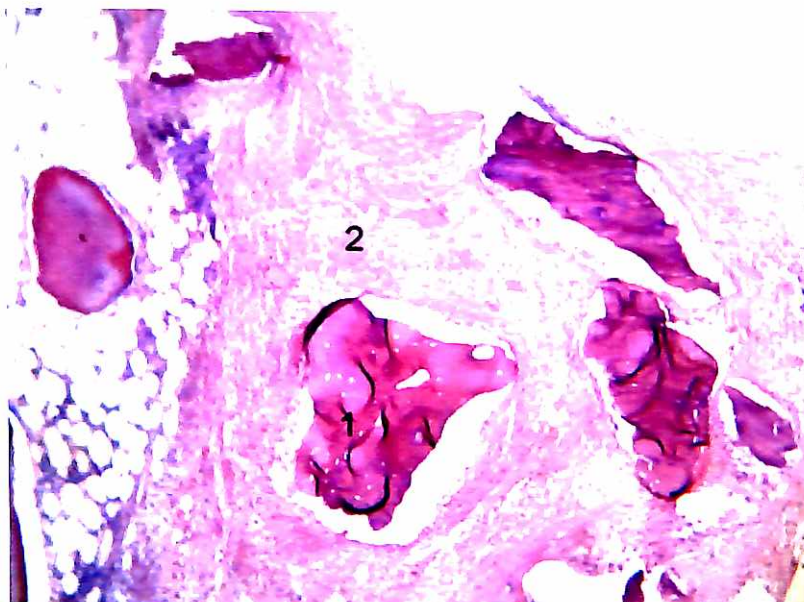


Figura 23. Grupo XH osso bovino inorgânico mais rhGH (H.E.100X). Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo (2).

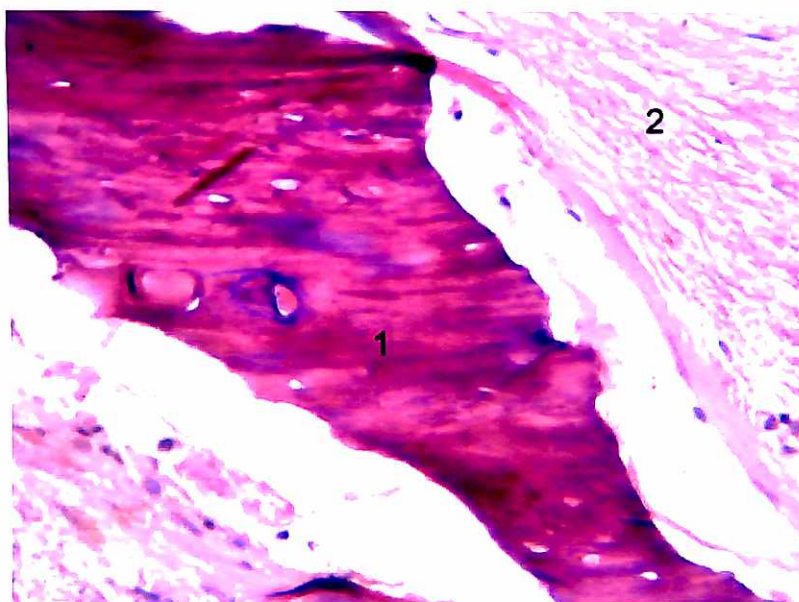


Figura 24. Grupo XH osso bovino inorgânico mais rhGH (H.E.400X). Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo organizado (2).

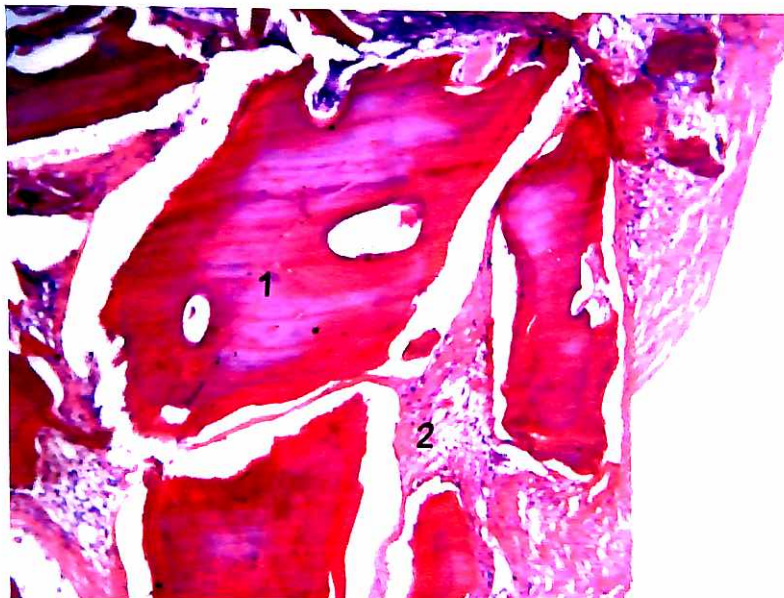


Figura 25. Grupo PH osso xenógeno DFDBA mais rhGH (100X).
Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo (2).

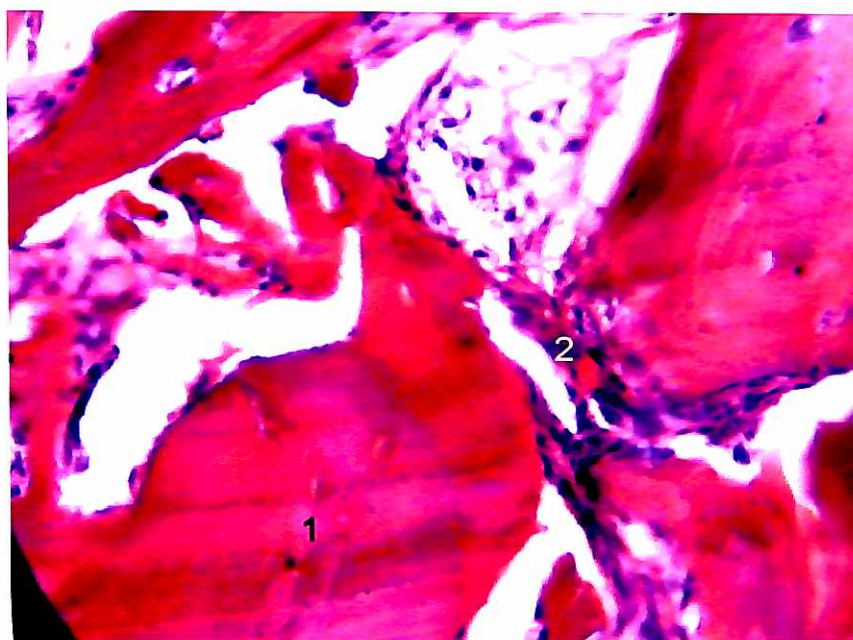


Figura 26. Grupo PH osso xenógeno DFDBA mais rhGH (H.E. 400X).
Partícula óssea do enxerto (1), osteoblastos (2).

Figuras histológicas dos grupos de 12 semanas



Figura 27. Grupo AH osso autógeno mais rhGH (H.E. 100X). Neoformação óssea (1) espaços medulares neoformados(2).

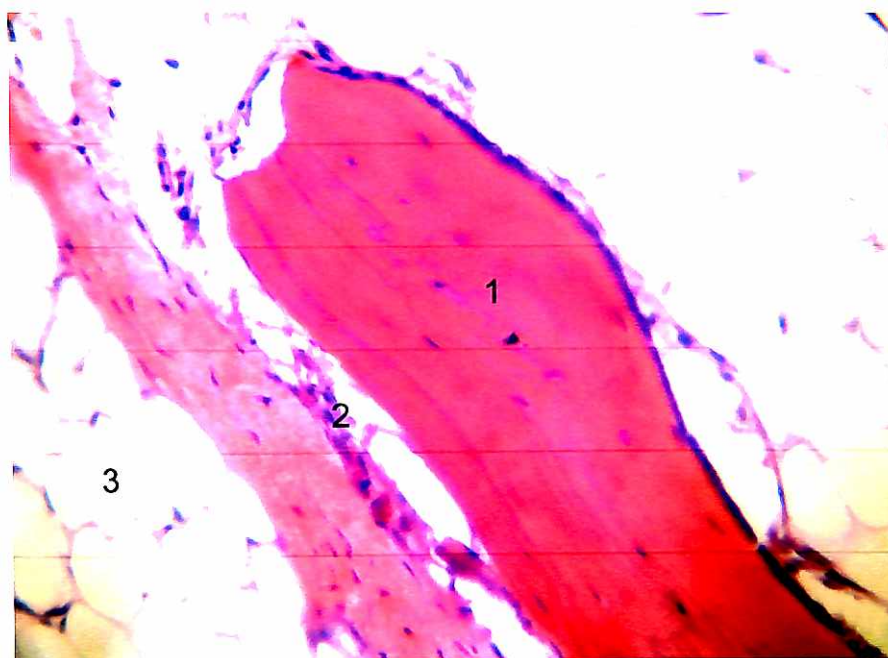


Figura 28. Grupo AH osso autógeno mais rhGH (HE 400X). Osso neoformado com osteócitos (1) osteoblastos colonizando (2) medula óssea (3).

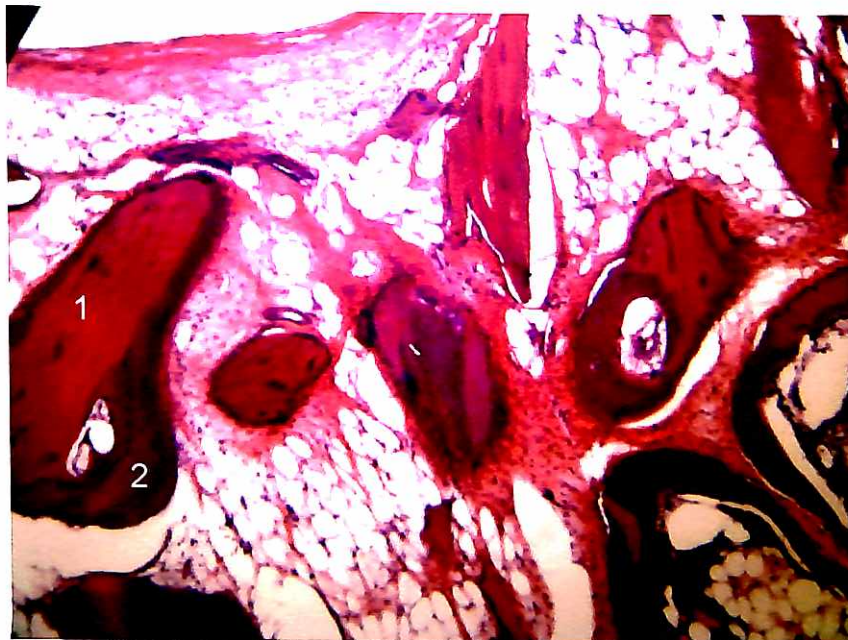


Figura 29. Grupo HH osso homogêneo fresco mais rhGH (H.E. 100X).
Partícula óssea (1), neoformação óssea (2).

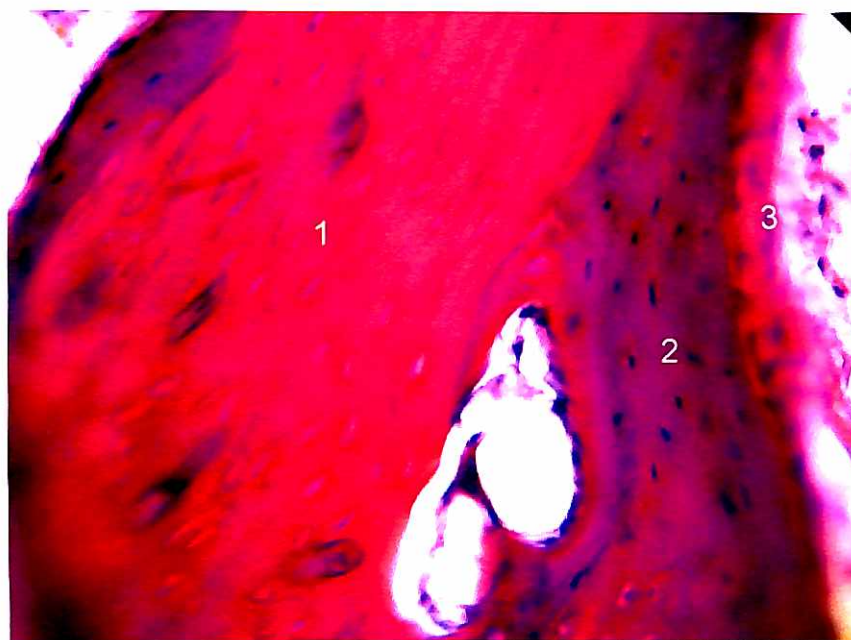


Figura 30. Grupo HH osso homogêneo fresco mais rhGH (H.E. 400X).
Partícula óssea do enxerto (1), osso neoformado (2), osteoblastos (3).

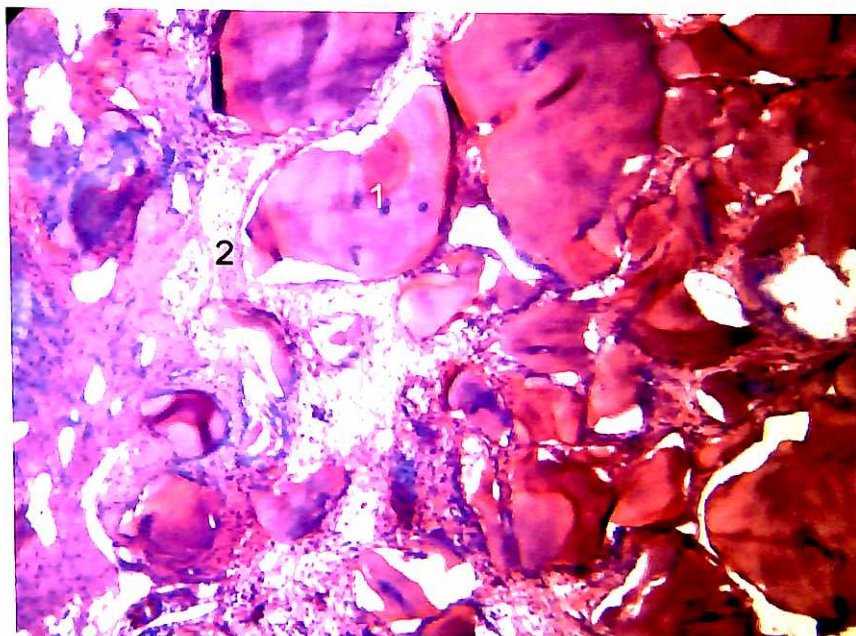


Figura 31. Grupo XH osso bovino inorgânico mais rhGH (Mallory 100X).
Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo (2).

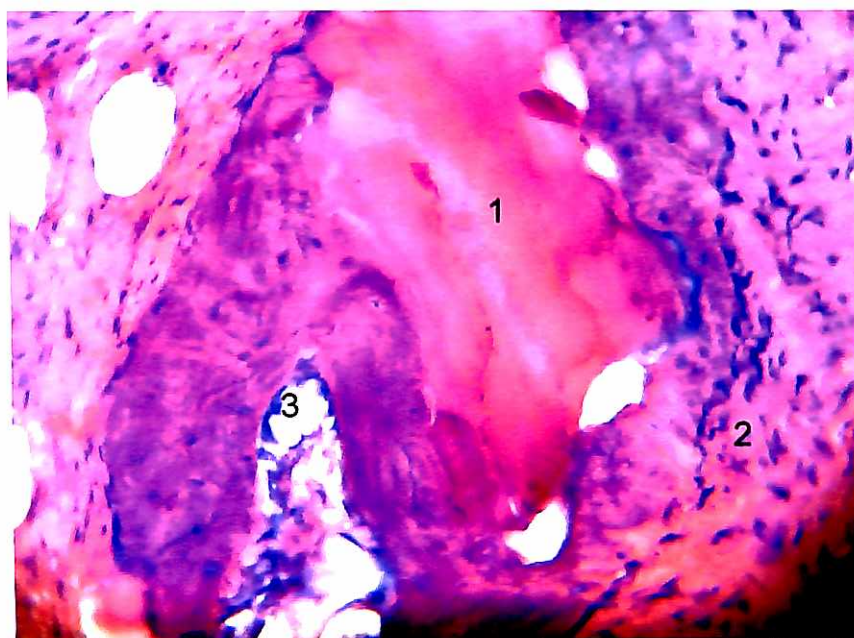


Figura 32. Grupo XH osso bovino inorgânico mais rhGH (Mallory 400X).
Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo (2) osteoblastos (3).

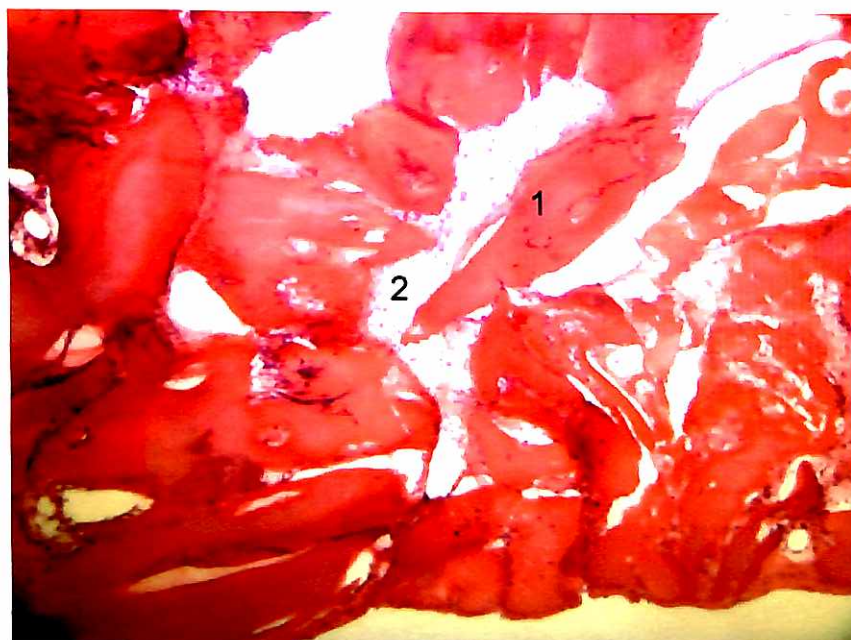


Figura 33. Grupo PH osso xenógeno DFDBA mais rhGH (100X).
Partícula óssea do enxerto (1), tecido conjuntivo (2).

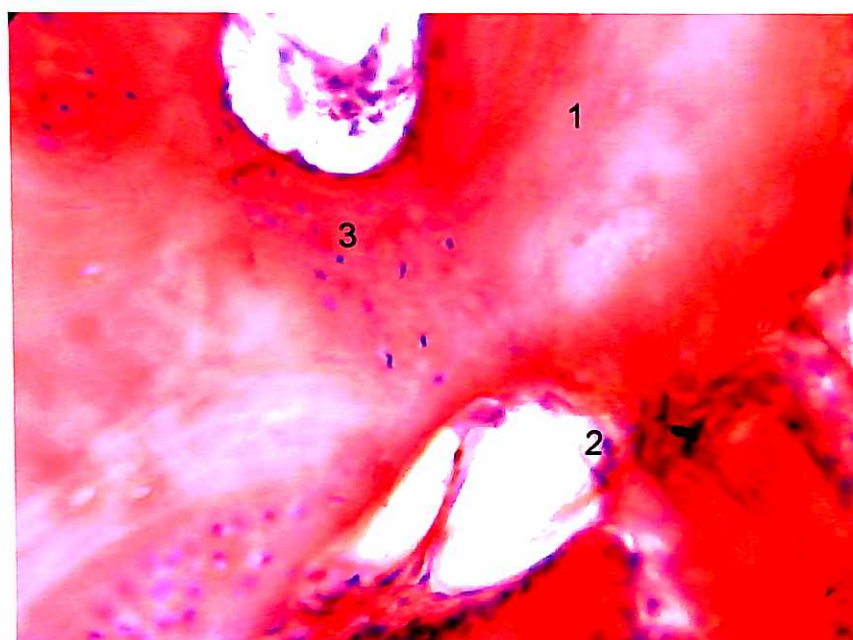


Figura 34. Grupo PH osso xenógeno DFDBA mais rhGH (H.E. 400X).
Partícula óssea do enxerto (1), osteoblastos (2), osteócitos (3).

6 DISCUSSÃO

Diversos tipos de enxertos ósseos e materiais que possam ser associados a eles têm sido desenvolvidos, na busca constante de se encontrar uma associação que possa trazer benefícios tanto para os pacientes quanto para os profissionais. Esta busca se tornou mais intensa com a evolução dos implantes osseointegrados e a necessidade de se instalar implantes que possam estar bem posicionados tanto funcionalmente quanto esteticamente e para que isso ocorra há necessidade de tecidos de suporte suficientes.

De acordo com a literatura consultada, vários materiais pesquisados têm sido utilizados com sucesso como incremento da reparação, entre eles o hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) associado a enxertos ósseos (ISAKSSON et al., 1982; HEDNER et al., 1996; TRESGUERRES et al., 2003; TRESGUERRES et al., 2005).

Este estudo tende a ampliar e colaborar com esta linha de pesquisa utilizando uso local do rhGH, visando melhor aceitação clínica por parte dos pacientes e menor risco de efeitos colaterais, uma vez que estes estão relacionados à quantidade excessiva e ao uso prolongado (GOODMAN, 1974; MACEY, 1974; GUYTON; HALL, 2002).

Neste estudo foi utilizado um modelo efetivo de regeneração óssea guiada pela utilização de cilindros de titânio, onde os tecidos moles não interferiram no processo de reparação óssea. Está bem estabelecido o conceito de que o uso de substitutos ósseos, associados à técnica de RGO fornece um maior ganho ósseo, fato descrito no trabalho de Busenlecher et al. (2005).

A metodologia usada neste estudo foi baseada no trabalho de Slotte, Lündgren e Burgos (2003) observando-se o comportamento dos enxertos na reparação de defeitos ósseos. Com os cilindros de titânio conseguimos a estabilização e adaptação suficientes para impedir a migração de tecido conjuntivo, como sucede na técnica de barreiras não absorvíveis (ROG).

Os enxertos ósseos autógenos, homogêneos e xenógenos estudados e testados com sucesso em defeitos ósseos tanto em humanos quanto em animais e analisados macroscopicamente e microscopicamente, (SHANDI et al., 2007), não inferiram o crédito na melhora da qualidade e na incorporação quando associados ao rhGH, como foi verificado neste trabalho.

De fato, outros autores encontraram melhores resultados nos estudos do efeito do rhGH com utilização local (ISACKSON et al., 1982; MIBSAN, 2006; TRESGUERRES et al., 2002; TRESGUERRES et al., 2003, TRESGUERRES et al., 2005).

Os resultados obtidos por Tresguerres et al. (2003) estão de acordo com os de Hedner et al. (1996), comparando o efeito local e sistêmico do rhGH quando foi administrado localmente, demonstrou uma clara atividade estimulatória de regeneração óssea, com resultados estatisticamente significantes. Esse estudo enfatizou que o rhGH exerce efeito específico e direto no tecido ósseo, fato este que também influenciou na sua escolha para este trabalho.

O incremento nos resultados pela associação do rhGH aos enxertos ósseos particulados utilizados neste trabalho, não está de acordo com os trabalhos de (ISACKSON et al., 1982; HEDNER et al., 1996; MIBSAN, 2006; TRESGUERRES et al., 2002; TRESGUERRES et al., 2003, TRESGUERRES et al., 2005), que avaliaram neoformação óssea em enxertos ósseos autógenos, e em superfície de implantes.

Apesar de o grupo em que o enxerto homogêneo fresco congelado associado ao rhGH ter resultado em maior volume ósseo do que o grupo do enxerto autógeno associado ao rhGH, verificou-se nesse último uma quantidade maior de neoformação óssea. Estando assim de acordo com Guyton e Hall (2002) onde constataram que o rhGH age diretamente nas células ósseas aumentando seu volume e o número de mitoses.

Neste trabalho o osso fresco congelado associado ao rhGH, apresentou melhor reparação óssea que os enxertos ósseos desmineralizado seco e congelado (DFDBA) e que o osso bovino inorgânico. Como os materiais de enxerto liofilizados e esterilizados perdem grande parte do potencial osteoindutor pela destruição das proteínas ósseas morfogenéticas (PERROTT; SMITH; KABAN, 1992), o uso dos enxertos homogêneos frescos congelados, por não serem liofilizados e nem esterilizados, podem representar um biomaterial com bom potencial osteoindutor, o que foi evidenciado por Shand et al. (2002).

No trabalho de Mibsan (2006) em coelhos, onde se utilizou hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), com melhores resultados com a aplicação tópica em dose única em enxertos autógenos em blocos. A dose utilizada foi de 0,85mg para embeber totalmente o enxerto, enquanto no nosso trabalho a quantidade suficiente para embeber o enxerto foi de 0,4mg.

Os resultados deste trabalho mediante análises macroscópicas e histológicas, demonstram que houve uma aplicabilidade clínica e viabilizou a avaliação dos efeitos do uso local do rhGH, associado aos enxertos ósseos autógeno, homogêneo, e xenógeno em calota craniana de coelhos, pois em todos os enxertos houve reparação óssea.

Foi realizada uma técnica cirúrgica que se mostrou eficiente para a finalidade a qual o estudo se propôs, pois os enxertos realizados se integraram ao leito receptor. Os resultados laboratoriais obtidos demonstraram que as cirurgias não interferiram na rotina dos coelhos, que apresentaram ausência de deiscências de sutura, hemorragias tardias e infecções. Nenhum dos coelhos operados morreu em decorrência das cirurgias. Os resultados obtidos demonstram que o coelho pode ser considerado modelo biológico viável para o estudo dos enxertos ósseos.

Neste trabalho foi utilizado a mesma metodologia de Manfro (2005) na qual se constatou que o osso bovino inorgânico apresenta boa densidade e quantidade de osso neoformado, com resultados semelhantes aos verificados nesta pesquisa através da avaliação macroscópica com a associação do rhGH. Quando comparamos histologicamente o rhGH não demonstrou ser efetivo fornecendo assim resultados inferiores ao do trabalho acima.

Quando comparamos esta pesquisa com a de Pelegrine (2006), que utilizou a mesma metodologia, o autor encontrou resultados semelhantes entre o enxerto autógeno e o homogêneo fresco congelado sem associação, enquanto neste estudo em uma avaliação macroscópica os melhores resultados foram obtidos com o enxerto homogêneo fresco congelado, quanto a densidade e volume ósseo, obtendo assim resultado superior ao do enxerto autógeno. Entretanto quando comparado histologicamente os resultados foram semelhantes.

Em um estudo realizado por Furtado (2007), utilizando a mesma metodologia com enxerto xenógeno seco desmineralizado e congelado (DFDBA) sem associação, os resultados não demonstraram diferença quanto à avaliação macroscópica e histológica do enxerto associado ao hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH) deste trabalho.

Tendo em vista a pequena quantidade de trabalhos existentes na literatura, o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) associado aos enxertos ósseos, demonstrou que pode ser utilizado mediante os resultados obtidos neste trabalho.

7 CONCLUSÃO

O modelo proposto neste trabalho, pela análise macroscópica e estatística dos enxertos ósseos associados com hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), apresenta melhores resultados na combinação do osso homogêneo fresco congelado mais rhGH, seguido da associação do osso heterógeno desmineralizado seco congelado (DFDBA) mais rhGH.

Na avaliação histológica os melhores resultados foram observados na combinação do osso autógeno com o hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH), seguido da associação entre o osso homogêneo fresco congelado mais rhGH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBREKTSSON, T. In vivo studies of bone grafts. The possibility of vascular anastomoses in healing bone. **Acta Orthop. Scand.**, Hampshire, v.51, n.1, pp.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, pp.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, pp.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, pp.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, pp.295-301, Mar. 1991.

BRUGNAMI, F. et al. GRB in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclast activities I DFDBA. **Int. J. P.R. Dent.**, v.19, n.3, pp.259-267, 1999.

BURCHARDT, H. ENNEKING, W.F. Transplantation of bone. **Surg. Clin. North Am.** Philadelphia, v.58, n.2, pp.403-27, Apr. 1978.

BUSENLECHNER, D. et al. Alveolar ridge augmentation with a prototype trilayer membrane and various bone grafts: a histomorphometric study in baboons. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.16, n.2, pp.220-7, Apr. 2005.

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

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

FONSECA, F.S. **Análise comparativa entre materiais xenógenos bovinos inorgânicos gen-ox-inorg, bone-fill e bio-oss associados ao osso autógeno na reparação de defeitos ósseos: estudo *in vivo* em coelhos.** 2005. 92f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2005.

FRAME, J. W. A convenient animal model for testing bone substitute materials. **J Oral Surg**, v.38: pp.176-187, 1980.

FURTADO, K.L. **Análise comparativa de quatro combinações de enxertos utilizados para reconstruções ósseas em implantodontia.** Estudo histológico e volumétrico em coelhos. 2007. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2007.

GARANT, P.R. Bone. In: _____. **Oral Cells and Tissues.** Canada: Quintessence, 2003. cap. 8, pp.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, pp.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, pp.1-8, Jan. 1995.
- GOODMAN, H.M. Introdução à endocrinologia. In: MOUNTCASTLE, V.B. **Fisiologia Médica**. 13.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1974. cap. 67, pp.1609-41.
- 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, pp.791-801.
- 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.85, n.1, pp.5-14, Jan. 1990.
- HEDNER, E.; LINDE, A.; NILSSON, A. Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes: an test study in rats. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v.11, n.12, pp.1952-60, Dec. 1996.
- ISAKSSON, O.G.; JANSSON, J.O; GAUSE, I.A. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. **Science**, Washington, v.216, n.4551, pp.1237-9, June 1982.
- ISAKSSON, O.G. et al. Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth. **Endocr. Rev.**, Baltimore, v.8, n.4, pp.426-38, Nov. 1987.

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

KAHNBERG, K.E. Restoration of mandibular jaw defects in the rabbit by subperiosteally implanted Teflon mantle leaf. **Int. J. Oral Surg.** Copenhagen, v.8, n.6, pp.449-56, Dec. 1979.

KASSEM, M. et al. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells In Vitro. **Calcif. Tissue Int.**, New York, v.52, pp.222-6, Sept. 1993.

LO, N.N. et al. Effect of growth hormone on bone marrow grafts in fracture healing – an test study in rabbits. **Ann. Acad. Med. Singapore**, Singapore, v.24, n.3, pp.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, pp.302-5, Sept. 1976.

MACEY, R.I. Metabolismo e Hormônios. In: _____. **Fisiologia Humana**. São Paulo: Edgard Blücher, cap.10, pp.2-117, 1974.

MANFRO, R. **Avaliação dos substitutos ósseos xenógenos inorgânicos bovinos Bio-Oss, Bone-Fill e Genox: análise histológica em coelhos**. 2005. 82f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2005.

MARX, R. E.; GARG, A. K. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 7, n. 4, pp.267-76, 1998.

MIBSAN, O. **Uso local do hormônio do crescimento humano**: avaliação histológica de enxertos ósseos autógenos em coelhos adultos. 2006. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2006.

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

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

PELEGRINE, A.A. **Análise comparativa entre enxerto ósseo autógeno fresco e homogêneo fresco congelado, associados ou não à medula óssea autóloga**: estudo clínico e histomorfométrico em coelhos. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Implantodontia) – Universidade de Santo Amaro, São Paulo, 2006.

PERROTT, D.H.; SMITH, R.A.; KABAN, L.B. The use of fresh frozen allogenic bone for maxillary and mandibular reconstruction. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 21, n. 5, pp.260-5, Oct. 1992.

PETRUNGARO, P.S.; AMAR, S. Localized ridge augmentation with allogenic block grafts prior to implant placement: case reports and histologic evaluations. **Implant Dent.**, Baltimore, v.14, n.2, pp.139-48, June 2005.

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

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

ROBERT, E. et al. Implants: bone physiologia and metabolism. **CDA**, Sacramento, v. 15, n. 10, pp.54-61, 1987.

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

SHAND, J.M. et al. Allogenic bone grafting of calvarial defects: an experimental study in the rabbit. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg, Copenhagen**, v.31, n.5, pp.525-31, Oct. 2002.

SLOTTE, C.; LÜNDGREN, D.; BURGOS, P.M. Placement of autogenic bone chips or bovine mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, Lombard, v.18, n.6, pp.795-806, Nov.- Dec. 2003.

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

TOMFORD,W.W; MANKIN, H.J. Bone banking: Update on methods and materials.**Orthop. Clin. North Am.** Philadelphia, v.30, n.4, pp.565-70, Oct. 1999.

TRESGUERRES, I.F. et al. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. **Clin. Oral Implants Res.**, Copenhagen, v.13, n.6, pp.631-6, Dec. 2002.

_____. 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, pp.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, pp.193-202, Mar.-Apr. 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 026/2007

REGISTRO CEP UNISA N.º 041/07

Projeto de Pesquisa: “Avaliação do efeito da associação do hormônio do crescimento humano recombinante a enxertos ósseos aplicados em coelhos”.

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Dr. Alfredo Gromatzky
Pós- Graduando: Odair Borghi

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 Didáticas – Científica da Vivissecção 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 : "Avaliação histológica utilizando enxertos ósseos particulados associados ao hormônio de crescimento humano em coelhos ".

São Paulo, 31 de outubro de 2007

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