

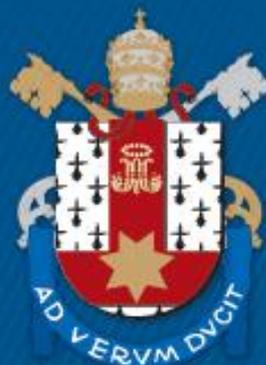
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE

**AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS
PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A TERAPIA
COM LLLT: ESTUDO EM RATOS**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

ALINE ADELAIDE PAZ DA SILVA DUARTE

AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS
PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A
TERAPIA COM LLLT: ESTUDO EM RATOS

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Linha de Pesquisa: Diagnóstico e terapêuticas aplicadas

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Porto Alegre - 2019

Ficha Catalográfica

D812a Duarte, Aline Adelaide Paz da Silva

Avaliação do reparo tecidual em defeitos ósseos críticos preenchidos com biomaterial matriz de PLGA/rhGH e submetidos a terapia com LLLT : Estudo em ratos / Aline Adelaide Paz da Silva Duarte . – 2019.

92.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber.

1. Regeneração óssea. 2. Hormônio do crescimento. 3. Polímeros. 4. Odontologia. I. Weber, João Batista Blessmann. II. Título.

AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS
PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A
TERAPIA COM LLLT: ESTUDO EM RATOS

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber – PUCRS (Orientador)

Prof. Dr. Rogério Miranda Pagnoncelli - PUCRS

Prof. Dr. Vinicius Nery Viegas - PUCRS

Prof. Dr. Alexandre Silveira Gerzson – Ulbra

Prof. Dr. Marcos Antonio Torriani - UFPel (Suplente)

Porto Alegre
2019



DEDICATÓRIA

À minha amada mãe, Ester,
por todo amor, pelo exemplo e
por me ensinar que o conhecimento
é o bem mais valioso que temos.



AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por ter permitido a realização desse sonho.

A minha mãe amada, por todo amor, tempo e cuidado que sempre dedicou a mim, por me incentivar a estudar, pelo exemplo e por estar presente em todos os momentos importantes da minha vida.

Aos meus irmãos amados Shayane, Betinho e Giovani. Obrigada por fazerem parte da minha vida, por me incentivarem e me ajudarem em tudo que podem. Eu amo muito vocês.

Aos meus familiares, Beto, tia Elaine, tia Cristina e primos: obrigada pelo carinho, incentivo e apoio ao longo dessa e de outras jornadas!

Ao Dr João Batista Blessmann Weber, meu orientador, por ter sido tão compreensivo e, até mesmo, paciente comigo. Agradeço pelo apoio e por todos os conhecimentos que me passou, não apenas durante o doutorado, mas desde o início da minha trajetória acadêmica. Minha admiração e respeito!

Ao Dr Rogério Miranda Pagnoncelli, meu orientador no mestrado, obrigada por todo apoio e ensinamentos transmitidos e pelo incentivo a fazer o processo seletivo do doutorado.

Ao colega e amigo Dr. Ricardo Fernandes Garcia por todo companheirismo e amizade desde a época da especialização, na UFPel. Foi muito bom compartilhar contigo toda essa trajetória de especialização, mestrado e doutorado.

A amiga Dra Waneza Dias Borges Hirtz, que apesar da distância geográfica sempre se faz presente através de uma mensagem, um conselho, uma palavra de incentivo. Tenho muita admiração por ti!

A minha amada Susy, mesmo sendo uma “filhinha” canina eu não poderia deixar de agradecer por ser minha companheirinha e estar comigo em todos os momentos. Tua presença alegra os meus dias!

AGRADECIMENTOS

A Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, representada pelo seu Magnífico Reitor, Prof. Dr. Evilázio Teixeira.

A Escola de Ciências da Saúde da PUCRS, representada pelo seu Decano, Luciano Castro e a Coordenação do Curso de Odontologia, Dra. Angélica Maria Genehr Fritscher.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa de sua coordenadora, Profa. Dra. Maria Martha Campos, por oferecer um curso de qualidade aos seus alunos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por viabilizar recursos para a realização deste Curso de Doutorado em Odontologia, na área de concentração em CTBMF.

A Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue, pelo auxílio na confecção das matrizes e por disponibilizar as dependências do Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR).

Aos meus queridos professores de cirurgia, por todos os ensinamentos durante minha formação acadêmica: Dra. Daniela Nascimento Silva, Dra Marília Gehard de Oliveira, Dr. Claiton Heitz, Dr Rogério Belle, Dr. Marcos Torriani, Dr Roberto Silva, Dr Otacílio Chagas Jr, Dr. Rogério Pagnoncelli.

Aos professores de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS, Dra Ana Luísa e Dr Fabio Maito e à Janaína, funcionária do laboratório de Patologia, pelo apoio técnico na parte laboratorial.

A todos os funcionários do LOR e da Faculdade de Química da PUCRS, aos funcionários do CEMBE (Centro de Modelos Biológicos Experimentais da PUCRS), pelo apoio no cuidado com os animais.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS pela eficiência em ajudar a todos os alunos.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação, em especial, Dr Alexandre Gerzon e MSc Fernanda Boing pelos agradáveis momentos compartilhados nesses anos de PUCRS.

À MSc Isadora de Souza Basso, pelo apoio durante a execução da parte experimental e Dra Ana Cláudia Costa Flores, pelo apoio na análise dos resultados dessa pesquisa científica.

Para meus amigos, por entenderem quando precisei estar ausente, em função dos estudos. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão dessa importante etapa.



SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS.....	23
Objetivo Geral.....	23
Objetivos Específicos	23
ARTIGO 1: O USO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA: Uma revisão da literatura.	25
ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A TERAPIA COM LLLT: ESTUDO EM RATOS.....	49
DISCUSSÃO GERAL	77
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO	91
ANEXO B – ATA DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS.....	92



INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido duro (mineralizado ou calcificado) composto por hidroxiapatita, colágeno, glicosaminoglicanos, proteínas, outros componentes orgânicos e água. Apresenta uma estrutura formada por moléculas de tropocolágeno e cristais de apatita (em nível molecular), de trabéculas (em nível ultraestrutural) e de osso não lamelar, osso cortical e osso esponjoso (em nível microestrutural) (Junqueira, 2015).

O tecido ósseo poderia ser definido como um tipo de tecido conjuntivo especializado cuja principal característica é a mineralização. Leeson e Leeson (1980) afirmaram que este tecido é constituído por uma matriz orgânica que representa, aproximadamente, 33% de seu volume total, e por íons e cristais, representando os outros 67% de seu volume.

O osso desempenha diversas funções, sendo as principais a de suporte esquelético, proteção de órgãos vitais (como os contidos nas caixas craniana e torácica e no canal raquidiano), locomoção, reserva de minerais, apoio aos músculos esqueléticos, além de alojar e proteger a medula óssea (Junqueira, 2015).

No início dos anos 90, materiais biomédicos começaram a ser produzidos e comercializados com o intuito de restaurar partes do corpo humano, em especial o tecido ósseo. O uso cada vez mais frequente desses materiais artificiais tem exigido o desenvolvimento de tecnologias diferenciadas para fabricação e caracterização de produtos que atendam as solicitações para uso médico.

De maneira geral, os biomateriais têm contribuído significativamente para o avanço das áreas biomédicas. A partir da colaboração entre engenheiros biomédicos, cientistas de materiais, químicos, físicos, biólogos, médicos e dentistas; a área de biomateriais tem amadurecido, tornando-se uma área de pesquisa multidisciplinar,

que envolve a utilização de conceitos fundamentais no desenvolvimento de materiais para aplicação na prática clínica. Um rápido progresso vem sendo conseguido nessa área, resultando na síntese de novos biomateriais poliméricos e cerâmicos, na aquisição de conhecimentos sobre interações entre biomateriais e tecidos biológicos, desenvolvimento de órgãos artificiais, envolvendo cultivo de células, além do avanço dos sistemas para liberação controlada de drogas, enxertos e dispositivos cardiovasculares, miniaturização de próteses, enxertos ósseos e dispositivos ortopédicos.

BIOMATERIAIS

Os biomateriais são usados em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados no corpo humano. O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982 como:

Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (HELMUS e TWEDEN, 1995)

O critério de seleção de biomateriais é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Os biomateriais devem ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Em aplicações sanguíneas, eles devem também ser não-trombogênicos. As complicações oriundas dos dispositivos implantados irão variar de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, infecções e

biodegradação irão afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como próteses permanentes e válvulas cardíacas.

O termo biocompatibilidade foi redefinido em 1987 por Williams como sendo a habilidade de um material desempenhar com uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica (Williams e Remes, 1992).

MATRIZ DE PLGA COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

O poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), é um copolímero derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) que tem sido empregado na encapsulação de peptídeos e proteínas, pela sua excelente biocompatibilidade celular, biodegradabilidade e aprovação regulamentar (Kramer, 1980).

Sistemas poliméricos apresentam a vantagem de serem controlados eficientemente para entregar drogas a uma área localizada (Williams e Remes, 1992). Além disso, podem ser combinados com matrizes de engenharia tecidual implantável. Por isso, os polímeros derivados dos ácidos láctico e glicólico têm recebido muita atenção nas pesquisas de polímeros biodegradáveis alternativos, sendo que já são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para serem utilizados como sistemas de liberação de drogas, existindo diversos estudos demonstrando sua baixa toxicidade (Bourne, 1972; Gerzon et al, 2017).

O “*scaffold*” (ou matriz) deve ser poroso com uma relação superfície-volume alta, para permitir a fixação das células, bem como a troca de nutrientes durante as culturas “*in vitro*” ou “*in vivo*” (Ducheyne e Kohn, 1992). Além disso, a natureza porosa da matriz permitirá angiogênese sobre a implantação no local do defeito (para tecidos vascularizados). Também, porque a matriz atua como um suporte temporário para as células aderirem e proliferarem a deve imitar a matriz extracelular nativa tanto

arquiteticamente, como funcionalmente (Barbanti, Zavaglia e Duek, 2005). Deve ser biodegradável e não necessitar de um segundo tempo cirúrgico para sua remoção. A taxa de degradação deverá coincidir, ou pelo menos ser controlável para mimetizar a taxa da neoformação do tecido (Santos-Fialho, 2007).

Uma das drogas com potencial para ser usada nesse tipo de veículo é o hormônio do crescimento (GH – *growth hormone*), também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina (Mota, Duek 2006).

O GH é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal, atuando no remodelamento ósseo. Desempenha um papel fundamental, exercendo efeito sobre os osteoclastos e, mais acentuadamente, sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto (Gombotz, Pettit, 1995; Mota, Duek, 2006) .

Devido a limitações para obtenção do GH até os anos 80, um limitado número de estudos foram realizados até a metade daquela década. No entanto, a partir dos anos 90, através de técnicas de biologia molecular, a síntese laboratorial do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH – *recombinant human growth hormone*) tornou-se realidade, e houve um significativo aumento no número e na qualidade das pesquisas envolvendo esse hormônio (Soares et al., 2005).

TERAPIA COM LASER DE BAIXA POTÊNCIA (*Low Level Laser Therapy* - LLLT)

O laser de baixa potência é uma técnica, utilizada há décadas por médicos, dentistas, fisioterapeutas e veterinários. Esta tecnologia oferece vantagens, como a aceleração da cicatrização e analgesia. Sabe-se que a luz laser interage com os tecidos biológicos podendo ser absorvida pelos componentes do tecido, uma

transferência de energia para o tecido o que, modificaria as reações biológicas do mesmo e, conseqüentemente, a regeneração tecidual como um todo. (Sun; Tunér, 2004).

O raio laser, de uma maneira geral, pode ser descrito como uma onda eletromagnética e, como tal, apresenta uma característica importante chamada de comprimento de onda. É o comprimento de onda que define a cor da luz. A unidade utilizada para a medição deste comprimento é uma fração do metro, o nanômetro (nm). Essa característica, juntamente com a freqüência e a amplitude, define a luz dentro do espectro completo de ondas eletromagnéticas.

O laser de diodo que tem como meio ativo o composto de arseto de gálio e alumínio (GaAlAs) apresenta um comprimento de onda variando entre 630 - 690 nm (laser vermelho) e 790 - 830 nm (laser infravermelho), com potências que variam de 20 até 100mW.

Estudos têm demonstrado que o uso tópico rhGH acelera o processo de osteointegração, estimulando a osteogênese e também acelera o processo de remodelação óssea e maturação ao redor de implantes (Muñoz et al., 2009; Calvo-Guirardo et al., 2011; Martin-Monge et al., 2017). Como no estudo de Gomez Moreno et al. (2009), no qual os autores observaram histomorfométricas extremamente significantes entre os implantes tratados com a aplicação tópica do hormônio e o controle.

Para este estudo, foi proposta a avaliação regeneração óssea de defeitos ósseos críticos preenchidos com matriz de PLGA/rhGH e submetido à terapia com laser de baixa intensidade (LLLT).



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa é identificar, através de um estudo in vivo, com modelo animal – ratos da raça Wistar, variações no processo de reparo do tecido ósseo quando um defeito ósseo crítico (defeitos que não se recuperam) é submetido ao preenchimento com matriz de PLGA/rhGH e a aplicação de LLLT.

Objetivos Específicos

- 1) Realizar uma revisão da literatura sobre o uso do hormônio do crescimento na regeneração óssea.
- 2) Avaliar o processo de reparação tecidual dos defeitos ósseos críticos preenchidos com a matriz de PLGA/rhGH, submetidos ou não à terapia com LLLT;
- 3) Quantificar o reparo ósseo em defeitos ósseos críticos preenchidos com este biomaterial, através de histomorfometria.



ARTIGO 1

O USO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA REGENERAÇÃO ÓSSEA. Uma revisão da literatura.

ARTIGO 1: O USO DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA REGENERAÇÃO

ÓSSEA: Uma revisão da literatura.

RESUMO:

O presente estudo teve o objetivo de realizar uma revisão da literatura sobre a utilização do Hormônio do Crescimento na regeneração óssea. Foi realizada uma busca na base de dados PubMed com os seguintes *mesh terms*: “*Growth hormone*”, “*bone regeneration*”, “*Dentistry*”, com o operador booleado “AND”. Também foi consultada a base de dados Cochrane, na qual não foi encontrado nenhum estudo. Foram encontrados 33 artigos e após a leitura dos títulos e resumos e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 11 estudos. Estes artigos foram agrupados nas seguintes categorias: uso do GH na osseointegração e uso do GH no reparo ósseo. Os dados foram tabelados conforme o tipo de amostra, forma de uso do GH e tempo de observação. Analisando os artigos selecionados, observou-se que a forma de utilização do GH, na maioria dos estudos, é tópica e as doses variam de 2UI à 4UI. A maior parte das pesquisas tem avaliado o efeito do GH na cicatrização óssea periimplantar, sendo que apenas 3 destes artigos avaliaram esse efeito em casos de distração osteogênica e apenas um estudo foi realizado em defeitos ósseos críticos administrando o GH de forma sistêmica. Dentro dos limites desta revisão, observou-se que o GH tem se mostrado uma alternativa viável para acelerar a regeneração óssea.

PALAVRAS-CHAVES¹: Hormônio do crescimento, regeneração óssea, Odontologia.

¹ Bireme - Descritores em Ciências da Saúde. Disponível em <http://decs.bvs.br>

THE USE OF GROWTH HORMONE IN BONE REGENERATION. Review of the literature.

ABSTRACT:

The present study had the objective of reviewing the literature on the use of Growth Hormone in bone regeneration. It was done a search in the PubMed database with the following mesh terms: "Growth hormone", "bone regeneration", "Dentistry", with the Boolean operator "AND". We also consulted the Cochrane database, in which no study was found. We found 33 articles and after reading the titles and abstracts and applying the inclusion and exclusion criteria, 11 studies were selected. These articles were grouped in the following categories: use of GH in osseointegration and use of GH in bone repair. Data were tabulated according to the type of sample, usage form of GH and time of observation. Analyzing the selected articles, it has been observed that the mode of GH use in most studies is topical and doses range from 2UI to 4UI. Most studies have evaluated the effect of GH on Peri-implant bone healing, with only 3 of these articles evaluating this effect in cases of osteogenic distraction, and only one study was performed on critical bone defects by administering GH in a systemic way. Within the limits of this review, it has been observed that GH has been shown to be a good alternative to accelerate bone regeneration.

KEY-WORDS²: Growth hormone, bone regeneration, dentistry.

INTRODUÇÃO

O Hormônio do Crescimento (GH – growth hormone), também denominado de hormônio somatotrópico ou somatotropina, é um hormônio polipeptídico, produzido

² MeSH: Medical Subject Headings; disponível em: www.nlm.nih.gov/mesh

pela adenohipófise e secretado no sistema circulatório. (Guyton, Hall, 2006; Goldman, Ausiello, 2008). É secretado principalmente à noite, durante toda a vida, porém seu pico de secreção ocorre durante a puberdade e há um decréscimo acentuado de sua produção a partir da sexta década de vida (Guyton, Hall, 2006; Goldman, Ausiello, 2008).

O GH atua na maioria das células do corpo, aumentando diretamente o metabolismo do meio intracelular e promovendo o crescimento de todo o corpo ao afetar a síntese proteica, a multiplicação celular e diferenciação específica de certos tipos celulares, como as células do crescimento ósseo e as células musculares imaturas (Guyton, Hall, 2006; Goldman, Ausiello, 2008). O GH é considerado um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal e do remodelamento ósseo, pois sua ação no tecido ósseo promove a deposição de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos (Varkey et al., 2004; Guyton, Hall, 2006; Goldman, Ausiello, 2008; Moreno et al., 2009). Este hormônio é considerado um dos principais reguladores sistêmicos do crescimento longitudinal do osso, sendo capaz de estimular o crescimento ósseo através da estimulação direta dos condrócitos e dos osteoblastos tanto *in vivo* como *in vitro* (Yang et al., 2012)

O GH intensifica praticamente todos os aspectos da captação de aminoácidos e da síntese de proteínas pelas células, reduzindo ao mesmo tempo a degradação das proteínas. Esse hormônio também afeta o metabolismo de gorduras e carboidratos exercendo suas funções tanto diretamente sobre os órgãos quanto na estimulação da produção de fatores de crescimento.

No ano de 1975, foi realizado um estudo sobre o efeito da calcitonina e do GH no metabolismo ósseo (Klein, 1975), porém, somente na década de 90, através de

técnicas de biologia molecular, a síntese laboratorial do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) tornou-se realidade. A partir daí houve um aumento significativo no número e na qualidade das pesquisas envolvendo esse hormônio.

Inicialmente, o rhGH foi usado em crianças com retardo de crescimento. Atualmente, a reposição hormonal com GH em adultos já está estabelecida e acarreta no ganho de massa muscular e óssea. O rhGH também tem sido bastante utilizado como reposição hormonal em pacientes idosos, cuja secreção do GH é fisiologicamente reduzida, no tratamento de osteoporose e na caquexia associada à síndrome da imunodeficiência adquirida. 3,18,19

Em Odontologia, tem sido investigado o efeito do GH na cicatrização óssea, principalmente ao redor de implantes. O uso sistêmico do GH tem sido avaliado em experimentos de distração osteogênica (Bail, 2002; Cho, 2003), na osseointegração de implantes (Frank-Stenport, 2001) e em defeitos ósseos críticos (Cacciafesta, 2001). Já a aplicação local do GH, tem sido usada principalmente antes da inserção de implantes dentários.

Com o avanço da implantodontia e as frequentes necessidades de enxerto ósseo, cada vez mais busca-se materiais biocompatíveis que possam estimular o tecido ósseo ou servir de substitutos para o enxerto autógeno. Nesse contexto, o GH parece ser um candidato pois em vários estudos tem demonstrado seus efeitos benéficos na cicatrização óssea. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi realizar uma revisão da literatura sobre o uso do GH no reparo ósseo.

METODOLOGIA

Esse estudo consistiu em uma revisão da literatura sobre a utilização do Hormônio do Crescimento no processo de regeneração óssea. A pesquisa foi

realizada na base de dados eletrônica PubMed, através da consulta pelas seguintes *key-words*: “*bone regeneration*”, “*growth hormone*” e “*dentistry*”, os termos foram pesquisados utilizando-se o operador booleano “AND”, durante o mês de novembro de 2018. Também foi realizada uma busca na base de dados Cochrane, com os mesmos termos, e não foi encontrado nenhum estudo sobre o tema.

A busca realizada na base de dados PubMed apresentou 33 artigos científicos. Foi realizada a leitura dos títulos e aplicados os critérios de inclusão e exclusão, permanecendo 13 artigos. Destes 13, realizou-se a leitura dos resumos, sendo excluídos mais 3 estudos. Dessa forma, restaram 10 artigos que foram incluídos nessa revisão. Além dos 10 artigos da busca sistematizada, ainda foi incluído 01 artigo encontrado através da busca manual.

Apenas os estudos publicados a partir do ano 2000 foram avaliados e incluídos, a fim de obter uma maior delimitação do estudo, com trabalhos publicados mais recentemente.

Os fatores de exclusão foram: artigos de relatos de casos ou de revisão da literatura e artigos anteriores ao ano 2000. Além disso, alguns estudos foram encontrados pela estratégia de busca mesmo sem avaliarem o GH na regeneração óssea, dessa forma, também foram excluídos. Os artigos excluídos estão relacionados no Quadro 3.

Os fatores de inclusão foram: os trabalhos de pesquisa que avaliavam o uso do hormônio do crescimento na regeneração óssea, usado por via sistêmica ou tópica na região do complexo crânio facial.

Restando onze artigos, os dados foram tabelados e classificados nas seguintes categorias: uso do GH na osseointegração (Quadro 1) e uso do GH no reparo ósseo (Quadro 2). As variáveis avaliadas para o estudo foram: tipo de estudo, forma de

utilização do hormônio, número da amostra, tempo decorrido para regeneração óssea, metodologia, análises e resultados.

REVISÃO DA LITERATURA:

Uso do GH na Osseointegração:

Franke-Stenport et al. (2001), avaliaram a cicatrização ao redor de implantes em tibia de coelhos. Foi administrado Hormônio do Crescimento (GH), na dose de 03UI/kg/dia, para o grupo experimental ou cloreto de sódio, para o grupo controle. Foram medidos os níveis séricos do IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina, e realizados 2 testes biomecânicos: Análise de frequência de ressonância (RFA), que investiga a estabilidade ou rigidez da interface implante/osso; e Análise de Torque de Remoção. A análise de raio x de dupla energia foi usada para avaliar a densidade óssea mineral e, também, foi realizada a análise histomorfométrica. Os resultados do RFA demonstraram uma média maior para o grupo tratado com GH comparado com o grupo controle, no início do experimento (2 semanas). Após 4 semanas, o grupo com GH demonstrou uma média inferior ao controle. No teste de torque de remoção não houve diferença estatística entre os grupos. Os autores concluíram que o GH tem efeito benéfico inicial na osseointegração do implante, no entanto, devido a rápida formação de anticorpos, este estudo não demonstrou se esse efeito permanece a longo prazo.

Tresguerres et al. (2002), realizaram um estudo para avaliar as diferenças qualitativas e quantitativas na reação óssea periimplantar. Oito coelhas foram ovariectomizadas e submetidas à dieta pobre em cálcio por 6 semanas, afim de induzir a osteoporose. Foram realizados implantes de titânio e, antes da inserção destes, foi inserido 4UI de GH, na forma de pó liofilizado. Após duas semanas de observação os

animais foram eutanaziados e foram realizadas as seguintes colorações histológicas: Hematoxilina-Eosina, Masson, Picrosirius. Realizaram as análises de morfometria e densitometria para quantificar o reparo ósseo. O uso do GH melhorou a reação periosteal e transcortical e a mineralização osteóide 14 dias após o procedimento, sem aumentar a reabsorção óssea.

Tresguerres et al. (2003), avaliaram as diferenças qualitativas e quantitativas no osso periimplantar recém formado. Oito coelhos receberam implantes na tíbia, em metade deles foi inserido 4UI de GH, na forma de pó liofilizado, antes da inserção dos implantes. O tempo de observação foi de 2 semanas. O grupo com GH apresentou crescimento aumentado de novas trabéculas e o contato osso-implante foi significativamente maior. Concluíram que a administração local do GH pode melhorar o reparo ósseo periimplantar.

Goméz-Moreno et al. (2009), avaliaram o efeito da aplicação tópica do hormônio do crescimento na osseointegração de implantes dentários em cães Beagle. Foram extraídos pré-molares e molares superiores e inferiores de 12 cães e após dois meses esses animais receberam implantes cilíndricos de 3,25 mm de diâmetro e 10 mm de comprimento. O hormônio do crescimento foi aplicado na dose de 4UI, diretamente na região a ser implantada. Após 2 semanas, oito cortes histológicos por implante foram obtidos para análise histomorfométrica. Os sítios tratados com hormônio do crescimento mostraram aumento do perímetro ósseos, da área total periimplante, e da neoformação óssea. Com isso, concluíram que a aplicação tópica do hormônio do crescimento pode agir como um estimulante ósseo na colocação de implantes dentários.

Muñoz et al. (2009), avaliaram o efeito da administração tópica de GH e melatonina na osseointegração. Após a extração dos pré-molares e molares

superiores e inferiores, foram realizados 48 implantes, em 12 cães Beagle adultos. Antes da inserção do implante, foi aplicada uma dose de 4UI de GH e 1,2 mg de melatonina em pó liofilizado. Os resultados foram avaliados em 2, 5 e 8 semanas. A avaliação foi realizada por meio de exame histológico, microanálise por dispersão de raios-X e histomorfometria. Na semana 2, o contato osso/implante (BIC) foi significativamente maior no grupo experimental do que no grupo controle, e também houve aumento significativo da área óssea periimplantar no grupo experimental. Nas semanas 5 e 8, tanto o BIC quanto a densidade óssea periimplantar foram semelhantes nos dois grupos. Como conclusão, os autores observaram que a combinação de GH e melatonina pode aumentar a neoformação óssea ao redor de implantes de titânio, nos estágios iniciais da cicatrização.

Calvo-Guirardo et al. (2011), avaliaram o uso do GH tópico na osseointegração em doze cães Beagle. Foram extraídos os molares e pré-molares superiores e inferiores e aguardaram um período de dois meses de cicatrização para, então, realizarem a instalação de implantes dentários. Antes da inserção dos implantes, as cavidades teste receberam 4UI de GH, na forma de pó liofilizado. Após 5 e 8 semanas a aplicação tópica do GH não apresentou efeito significativo no contato osso-implante (BIC), embora a neoformação óssea e os valores ósseos entre os segmentos do implante tenham aumentado significativamente.

Martin-Monge et al. (2017), avaliaram a cicatrização óssea ao redor de implantes instalados em tíbia de 20 coelhas. Os animais foram divididos em 2 grupos, no primeiro 10 coelhas foram ovariectomizadas e receberam alimentação pobre em Cálcio por 6 semanas, com intuito de estimular a osteoporose, os outros 10 animais permaneceram hígidos. Foi instalado um implante em cada tíbia e, em metade dos animais foi inserido 2UI de Hormônio do Crescimento (GH) antes da instalação do

implante. A eutanásia ocorreu após 2 semanas. Foram realizadas as análises morfológica e densitométrica, onde foi observado a BIC e a densidade mineral óssea (DMO). Os animais que tiveram indução da osteoporose apresentaram menos BIC e DMO, porém a aplicação local do GH aumentou a BIC no grupo ovariectomizado.

Uso do GH no Reparo Ósseo:

Cacciafesta et al. (2001), avaliaram a resistência biomecânica e a formação óssea em defeitos ósseos críticos em calvária de ratos tratados sistemicamente com GH. Foi realizado um defeito ósseo crítico, coberto com membrana de politetrafluoretileno expandido (e-PTFE) em 40 ratos Wistar, que foram divididos aleatoriamente em dois grupos. O grupo experimental recebeu injeções diárias de 2,7 mg/Kg de GH e os ratos do grupo controle receberam cloreto de sódio. Os animais foram sacrificados após 28 dias. Nos testes de carga máxima, rigidez final, e absorção de energia os resultados foram significativamente maiores no grupo tratado com GH ($P < 0,003$). Além disso, a massa de tecido ósseo foi significativamente maior no grupo tratado com GH ($P < 0,001$). A Tomografia Computadorizada (TC), com reconstrução 3D, mostrou quase o dobro do volume ósseo no grupo tratado com GH, em comparação com o grupo controle. O experimento demonstrou que a administração de GH melhora a deposição óssea e a resistência mecânica em defeitos críticos, em calota craniana, revestidos com membranas e- PTFE.

Em 2003, um estudo de Cho et al., verificou o efeito do GH na consolidação óssea inicial, em distração osteogênica. Dezesesseis cães foram submetidos a uma osteotomia vertical no corpo mandibular e a instalação de um dispositivo de distração externo. A distração foi iniciada 5 dias após a cirurgia a uma taxa de 1 mm por dia, e ocorreu por 10 dias. Os cães do grupo experimental receberam uma injeção

subcutânea diária de 100 micro gramas (1 UI) de GH por quilograma de peso corporal, enquanto no grupo controle receberam solução salina. O nível sérico de IGF-I no grupo do hormônio do crescimento foi elevado e atingiu o pico entre o 8º e o 12º dia após a administração sistêmica. A densidade mineral óssea foi maior no grupo do GH e inferior no grupo controle durante todo o período. A força mecânica do osso foi 300 % superior no grupo do GH do que no grupo controle. Os autores concluíram que o hormônio do crescimento pode ser eficaz na consolidação óssea no início da distração osteogênica.

Cho et al. (2004), avaliaram o reparo ósseo após distração osteogênica, em 48 cães. Foi realizada osteotomia vertical em corpo mandibular e instalado um dispositivo externo. A distração mandibular foi iniciada 5 dias após a cirurgia, a uma taxa de 1mm / dia, por 10 dias. Os grupos foram divididos em: grupo controle (I), grupo com ácido hialurônico (II), grupo com microesferas de quitosana (III) e, grupo (IV) com microesferas de quitosana encapsuladas com GH. Cinco cães em cada grupo (um total de 20 cães) foram sacrificados três semanas após o término da distração, o restante (28 cães) foi sacrificado após 6 semanas. Foram analisados os níveis séricos de IGF-I; a densidade mineral óssea, através da análise de Raio X de dupla Energia; a força óssea, através de testes biomecânicos; e a análise histológica. O nível sérico de IGF-I, no grupo IV, aumentou durante todo o período do estudo. A DMO foi maior nos grupos II, III e IV, em comparação ao controle. A área de distração, no grupo IV, apresentou maior radiodensidade em relação aos demais grupos. A liberação do GH, encapsulado em microesferas de quitosana, aumentou abruptamente nos primeiros 5 dias e gradualmente durante 20 dias. A eficiência de carga foi de cerca de 80% em 10 dias, e aumentou até 20 dias. Estes resultados sugerem que liberação controlada de GH continuou após 20 dias, porque um perfil de liberação não mostra um platô até o

20º dia. Os autores concluíram que as microesferas de quitosana com GH encapsulado pode ser muito eficaz no início consolidação óssea, em casos de distração osteogênica.

Bail et al. (2004), analisaram e quantificaram os efeitos do GH na regeneração óssea, em 20 mini porcas da raça Yucatan. A tíbia e a fíbula dos animais foram osteotomizadas e estabilizadas com um fixador externo, a seguir iniciaram a distração osteogênica 2 mm/dia, durante 10 dias após um período de latência de 4 dias. O grupo de estudo (n=10) recebeu uma injeção diária de 100 microgramas por quilo de peso corporal (mcg/Kg) do hormônio do crescimento recombinante de porco (pGH-r). O grupo controle (n=10) recebeu cloreto de sódio como o placebo. A eutanásia ocorreu no 25º dia e foi realizada análise histomorfométrica quantitativa do calo formado e do osso cortical adjacente. Também realizaram uma análise de policromia, na qual cada um dos animais recebeu 15 mg/kg de calceína-verde injetada por via intravenosa e, ao final do período de distração osteogênica, 30 mg/kg de tetraciclina intravenosa, e 90 mg/kg de xilenol-laranja 2 dias antes da eutanásia. Como resultado, os animais tratados com r-pGH apresentaram uma área significativamente maior no calo ósseo, porém sem alteração na sua estrutura. Os calos do grupo de controle exibiram um teor mais elevado de cartilagem em comparação ao grupo tratado com r-pGH. Estes resultados demonstram que o hormônio do crescimento pode acelerar a maturação óssea em casos de distração osteogênica, sem alterar a microestrutura do calo ósseo. Dessa forma, pode ser uma boa alternativa para diminuir o tempo de cicatrização.

QUADRO 1. GH NA OSSEOINTEGRAÇÃO

(Continua)

AUTOR/ ANO	AMOSTRA	FORMA DE USO DO GH	PERÍODO	MÉTODO	ANÁLISES	RESULTADOS
Franke- Stenport et al., 2001	16 coelhos	Sistêmico	8 semanas	Os animais receberam 1 implante em cada tíbia. No grupo experimental foi administrado 0,3 UI/Kg/dia de GH e no grupo controle cloreto de sódio.	Análise dos níveis de IGF-1. Análise da frequência de ressonância (RFA). Análise do Torque de remoção. Análise de Raio X de dupla energia. Análise histomorfométrica.	Os resultados do RFA demonstraram uma média maior para o grupo tratado com GH comparado com o grupo controle, no início do experimento (2 semanas). Após 4 semanas, o grupo com GH demonstrou uma média inferior ao controle. No teste de torque de remoção não houve diferença estatística entre os grupos.
Tresguerres et al., 2002	8 coelhos	Tópico	2 semanas	Foram implantadas placas de titânio em coelhos com osteoporose induzida. O grupo experimental recebeu 4UI de GH antes da inserção do implante.	Análises de morfometria e densitometria.	O GH melhorou o reparo ósseo periosteal e transcortical e a mineralização osteóide, após 14 dias, sem aumentar a reabsorção óssea.
Tresguerres et al., 2003	8 coelhos	Tópico	2 semanas	Foram realizados implantes em tíbia de coelhos, em metade da amostra foi usado 4UI de GH, antes da inserção do implante.	Análise histológica, com coloração em HE, Masson e Picrosirius e morfometria.	O grupo com GH apresentou crescimento aumentado de novas trabéculas e o contato osso/implante foi significativamente maior.
Gomez- Moreno et al., (2009)	12 cães Beagle	Tópico sem veículo	2 semanas	Foram extraídos os dentes posteriores e, após 2 meses, foram instalados implantes. Foi aplicado 4UI de GH, no grupo teste, previamente a instalação dos implantes.	Análise histomorfométrica.	Após 2 semanas, os sítios tratados com GH mostraram aumento significativo no perímetro ósseo, na área total peri-implante e na neoformação óssea.

QUADRO 1. GH NA OSSEOINTEGRAÇÃO

						Conclusão
AUTOR/ ANO	AMOSTRA	FORMA DE USO DO GH	PERÍODO	MÉTODO	ANÁLISES	RESULTADOS
Muñoz et al., (2009)	12 cães Beagle	Tópico	2, 5 e 8 semanas.	Foram extraídos os molares e pré-molares superiores e inferiores. Antes da inserção dos implantes foram aplicadas 4 UI de GH e 1,2 mg de melatonina. O grupo controle não recebeu nenhum tipo de tratamento.	Análise histológica, microanálise por dispersão de raios-X e histomorfometria.	Na 2ª semana o BIC foi significativamente maior no grupo do GH e da melatonina, do que no controle. Foram detectadas diferenças significativas na neoformação óssea maior no grupo de melatonina do que no grupo do GH na 8ª semana.
Calvo-Guirardo et al., (2011)	Cães Beagle	Tópico	5 e 8 semanas	Foi utilizado 4UI de GH antes da inserção de implantes.	Análise histológica e histomorfométrica.	Após 5 e 8 semanas a aplicação tópica do GH não apresentou efeito significativo na BIC, embora a neoformação óssea e os valores ósseos inter-segmento tenham aumentado significativamente.
Martin-Monge et al., (2017)	20 coelhas	Tópico	2 semanas	Metade dos animais tiveram indução da osteoporose. Foi instalado um implante em cada tíbia e, em metade dos animais foi inserido 2UI de GH antes da instalação do implante.	Análise morfométrica e densitométrica.	Os animais que tiveram indução da osteoporose apresentaram menos BIC e DMO, porém a aplicação local do GH aumentou a BIC neste grupo.

QUADRO 2. GH NO REPARO ÓSSEO

AUTOR/ ANO	AMOSTRA	FORMA DE USO DO GH	PERÍODO	MÉTODO	ANÁLISES	RESULTADOS
Cacciafesta et al., (2001)	40 Ratos	Sistêmico	28 dias	Defeitos ósseos críticos em calvária foram preenchidos com e-PTFE. No grupo experimental foi administrado 2,7 mg de GH/kg/dia e no controle, cloreto de sódio.	Testes biomecânicos e TC	O grupo que recebeu GH apresentou melhores resultados em todos os testes biomecânicos e o volume ósseo foi quase o dobro, em comparação ao controle.
Bail et al., (2002)	20 Porcas (micopigs Yucatan)	Sistêmico	25 dias.	A tibia e a fíbula foram estabilizadas com um fixador externo e foi feita distração osteogênica 2 mm / dia, por 10 dias. O grupo do GH, recebeu injeções diárias de 100 mcg/Kg de pGH-r. O grupo controle recebeu cloreto de sódio como o placebo.	Análise histomorfométrica e análise de policromia.	Os animais tratados com r-pGH apresentaram uma área maior de calo ósseo, enquanto o grupo controle exibiu uma área mais elevada de cartilagem comparadas com o grupo r-pGH.
Cho et al., (2003)	16 cães	Sistêmico	2, 4 e 6 semanas.	Distração osteogênica em mandíbula, 1mm/dia, por 10 dias. O grupo experimental recebeu injeção subcutânea diária de 1 UI de GH/Kg.	IGF-I sérico, Raio X de dupla energia, medição de força óssea, histologia.	O IGF-I foi elevado no grupo do GH, com pico entre o 8º e 12 dia. O grupo do GH apresentou maior DMO e 300% mais força mecânica do que o grupo controle.
Cho et al., (2004)	48 cães	Tópico com veículo (quitosana)	3 e 6 semanas.	Distração osteogênica em mandíbula, a taxa de 1mm/dia, por 10 dias. Os grupos foram divididos em: controle (I), ácido hialurônico (II), microesferas de quitosana (III), microesferas de quitosana com GH (IV).	IGF-I sérico, Rx de dupla energia, medição de força óssea, histologia.	A liberação do GH, encapsulado em microesferas de quitosana, aumentou abruptamente nos primeiros 5 dias e gradualmente durante 20 dias. A eficiência de carga foi de cerca de 80% em 10 dias, e aumentou até 20 dias.

QUADRO 3. Artigos Excluídos

	AUTOR/ANO	TÍTULO	Motivo da exclusão
1	Abduljabbar T et al. 2017.	Effect of growth hormone supplementation on osseointegration: a systematic review and meta-analyses.	Artigo de revisão.
2	Tsunori, Katsuyoshi. 2015.	Effects of parathyroid hormone dosage and schedule on bone regeneration.	Avaliou o hormônio Parotídeo.
3	Yun, HMun et al. 2016.	Combined effects of growth hormone and mineral trioxide aggregate on growth, differentiation, and angiogenesis in human dental pulp cells.	Estudo em células pulpareas.
4	Jung, J et al. 2017.	Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study.	Não avaliou o GH.
5	Heo, HA. et al. 2016.	Enhancing effect of intermittent parathyroid hormone administration on bone formation after titanium implant placement in an ovariectomized rat maxilla.	Avaliou o Hormônio Parotídeo.
6	Hata, K. 2016.	Clinical and preclinical application of PTH and BMP to dental treatment.	Não avaliou o GH.
7	Cerci, DX et al. 2015.	Leukocyte-platelet-rich plasma diminishes bone matrix deposition in rat calvaria treated with autograft due to simultaneous increase in immunohistochemical expression of Indian Hedgehog, transforming growth factor- β , and parathyroid-1 receptor.	Não avaliou o GH.
8	Weng, D et al. 2009.	The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs.	Estudo piloto.
9	Prati, AJ. et al. 2013.	Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: a randomized clinical trial.	Não avaliou o GH.
10	Zou, H et al. 2013.	Effect of chronic kidney disease on the healing of titanium implants.	Não avaliou o GH.
11	Tanaka, S.; Hata, K.; Yoneda, T. 2012.	Potential use of parathyroid hormone (PTH) in the treatments for oral diseases.	Avaliou o hormônio Parotídeo.
12	Lee, PH et al. 2018.	Parathyroid hormone gene-activated matrix with DFDBA/collagen composite matrix enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects.	Avaliou o hormônio Parotídeo.
13	Jung, Ronald E.; Thoma, Daniel S.; Hammerle, Christoph Hf. 2008.	Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review.	Artigo de revisão.
14	Takedachi, M.; Murakami, S. 2012.	Present status of periodontal regeneration-FGF-2 and Teriparatide.	Não avaliou o GH.
15	Schneider, A et al. 2003.	Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone.	Não avaliou o GH.
16	Veitenhansl, M. et al. 2004.	40 EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Munich, Germany, 5-9 September 2004. Diabetologia	Resumo de anais de Congresso.
17	Blom, E. J. et al. 2000.	Transforming growth factor- β 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro.	Não avaliou o GH.

QUADRO 3. Artigos Excluídos

(Conclusão)

	AUTOR/ANO	TÍTULO	Motivo da exclusão
18	Kline, LW.; Donald, C Y. 2009.	Effects of Calcitonin, Calcitonin Gene-Related Peptide, Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2, and Parathyroid Hormone-Related Protein on Endodontically Treated Ferret Canines	Não avaliou o GH.
19	Talwar, R et al. 2001.	Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo.	Não avaliou o GH.
20	Davit-béal, T et al. 2014.	Dental complications of rickets in early childhood: case report on 2 young girls.	Relato de caso.
21	Denissen, H et al. 1997.	Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues	Não avaliou o GH.
22	Wang, Z.; HU W. Krebsbach, P. H. 2007.	Gene therapy strategies for craniofacial tissue engineering.	Não avaliou o GH.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os artigos selecionados, observou-se que as pesquisas utilizando o GH na regeneração óssea estão sendo feitas em animais, principalmente em cães (CALVO-GUIRARDO et al, 2011; Muñoz et al, 2009) e coelhos (Martin-Monge et al., 2017; Tresguerres et al., 2003).

A forma de utilização do GH, na maioria dos estudos, é tópica, sem veículo, utilizando apenas o pó liofilizado aplicado diretamente na área a ser tratada. As doses variam de 2UI (Martin-Monge et al., 2017) À 4ui (Gomez-Moreno et al., 2009; Muñoz et al ., 2009; Tresguerres et al ., 2002).

Apenas um estudo utilizou um veículo para administração do GH tópico, no estudo de Cho et al. (2004) o hormônio do crescimento foi encapsulado em microesferas de quitosana e apresentou resultados benéficos para a cicatrização óssea. Os autores observaram que a liberação do GH, por meio das microesferas de quitosana, ocorreu de forma intensa nos primeiros 5 dias e aumentou gradualmente até o 20º dia.

O tempo de observação, na maioria dos trabalhos, iniciou após 02 semanas (Tresguerres et al., 2002; Cho et al., 2003; Martin-Monge et al., 2017), sendo o tempo máximo de observação nos estudos encontrados de 8 semanas (Franke-Stenport et al., 2001; Muñoz et al., 2009; Calvo-Guirardo et al., 2011).

A maior parte das pesquisas tem avaliado o efeito do GH na cicatrização óssea periimplantar (Franke-Stenport et al., 2001; Tresguerres et al., 2002; Martin-Monge et al., 2017), sendo apenas 3 artigos avaliando esse efeito em casos de distração osteogênica (Cho et al., 2003; Cho et al., 2004; Bail et al., 2002) e apenas um estudo foi realizado em defeitos ósseos críticos (Cacciafesta et al., 2001), porém neste o uso do GH foi sistêmico.

Um dos fatores que tem sido analisado na cicatrização óssea periimplantar é o contato entre o osso e o implante (BIC), após 2 semanas de tempo de observação o uso tópico do GH tem demonstrado aumento do BIC (Tresguerres et al., 2003; Martin-Monge et al., 2017). Porém, em períodos de observação maiores, o uso tópico do GH não tem apresentado efeito significativo no BIC (Calvo-Guirardo et al., 2011; Muñoz et al., 2009).

Em 2003, Cho et al. avaliaram a densidade mineral óssea (DMO) em áreas que sofreram distração osteogênica, e o grupo que recebeu GH sistêmico apresentou melhores resultados do que o controle, durante todo o período do experimento. Já em 2004, Cho et al. usaram o GH tópico, em áreas de distração osteogênica, e a DMO apresentou melhores resultados em comparação ao controle. Além disso, neste estudo foi avaliado um veículo para liberação controlada do GH, microesferas de quitosana, e os resultados quanto a DMO foram maiores, em comparação com o uso tópico sem veículo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dentro das limitações desta revisão, o GH tem se mostrado uma boa alternativa para melhorar a regeneração óssea. Porém, os estudos ainda são bastante limitados e não há um consenso sobre um protocolo ou uma dose de utilização do GH. Se faz necessário a realização de mais estudos para determinar um protocolo de tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abduljabbar T et al. Effect of growth hormone supplementation on osseointegration: a systematic review and meta-analyses. *Implant Dent.* 2017 Aug;26(4):613-620. doi: 10.1097/ID.0000000000000616.

Bail HJ. et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone.* 2002 Jan;30(1):117-24.

Blom, EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, LIE. J, Kurashina KI. Transforming growth factor- β 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, v. 50, n. 1, p. 67-74, 2000.

Boing, F. Avaliação da neoformação óssea em defeitos críticos com o uso de substitutos ósseos derivados de fosfato e do PLGA/rhGH: estudo preliminar em coelhos. [dissertation] Porto Alegre: PUCRS; 2014. 53 f.

Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen T. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *The European Journal of Orthodontics*, v. 23, n. 6, p. 733-740, 2001.

Calvo-Guirado JL, Mate-Sanchez J, Delgado-Ruiz R, Ramirez-Fernández MP, Cutando-Soriano A, Peña M. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clinical oral implants research*, v. 22, n. 6, p. 587-593, 2011.

Cerci DX et al. Leukocyte-platelet-rich plasma diminishes bone matrix deposition in rat calvaria treated with autograft due to simultaneous increase in immunohistochemical expression of Indian Hedgehog, transforming growth factor- β , and parathyroid-1 receptor. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 43, n. 8, p. 1470-1477, 2015.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *J Craniofac Surg*. 2004 Mar;15(2):299-311; discussion 312-3.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model. *J Craniofac Surg*. 2003 May;14(3):417-25.

Davit-Béal T et al. Dental complications of rickets in early childhood: case report on 2 young girls. *Pediatrics*. 2014 Apr;133(4):e1077-81. doi: 10.1542/peds.2013-0733. Epub 2014 Mar 10.

Denissen H et al. Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues. *J Periodontal Res*. 1997 Jan;32(1 Pt 1):40-6.

Franke-Stenport V, Olsson B, Morberg P, Törnell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3(3):135-41.

Gerzson AS, et al. Assessment of Adhesion and Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Polymer Matrices with rhGH. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 32, n. 3, 2017.

Gerzson AS, et al. Assessment of the viability of NIH3T3 fibroblast cells cultured in polymer matrices with rhGH. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 906-912, 2018.

Gómez-Moreno G et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec;24(6):1068-73.

Hata K. Clinical and preclinical application of PTH and BMP to dental treatment. *Clin Calcium*. 2016 Mar; 26(3): 466-74. doi: [CliCa16034 66474](https://doi.org/10.1007/s12013-016-0647-4).

Heo HA, Park SH, Jeon YS, Pyo SW. Enhancing effect of intermittent parathyroid hormone administration on bone formation after titanium implant placement in an ovariectomized rat maxilla. *Implant Dent*. 2016 Apr;25(2):227-31. doi: [10.1097/ID.0000000000000352](https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000352).

Jung J, Yoo HY, Kim GT, Lee JW, Lee YA, Kim DY, Kwon YD. Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study. *J Bone Miner Res*. 2017 Dec;32(12):2445-2452. doi: [10.1002/jbmr.3237](https://doi.org/10.1002/jbmr.3237). Epub 2017 Sep 18.

Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):255-81. doi: [10.1111/j.1600-051X.2008.01270.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01270.x).

Kline LW, Yu DC. Effects of Calcitonin, Calcitonin Gene-Related Peptide, Human Recombinant Bone Morphogenetic Protein-2, and Parathyroid Hormone-Related Protein on Endodontically Treated Ferret Canines. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):866-9. doi: [10.1016/j.joen.2009.03.045](https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.045).

Lee PH, Yew TL, Lai YL, Lee SY, Chen HL. Parathyroid hormone gene-activated matrix with DFDBA/collagen composite matrix enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Chin Med Assoc.* 2018 Aug;81(8):699-707. doi: 10.1016/j.jcma.2017.12.004. Epub 2018 Mar 15.

Martin-Monge E, Tresguerres IF, Clemente C, Tresguerres JA. Local Application of Growth Hormone to Enhance Osseointegration in Osteoporotic Bones: A Morphometric and Densitometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017 Jul/Aug; 32(4):751-758. doi: 10.11607/jomi.5320.

Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Apr;14(2):226-35. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00242.x. Epub 2009 Sep 29.

Prati, A. J. et al. Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2013 Dec;92(12 Suppl):161S-7S. doi: 10.1177/0022034513504951. Epub 2013 Oct 24.

Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res.* 2003 Sep;21(5):859-64.

Takedachi M, Murakami, S. Present status of periodontal regeneration-FGF-2 and Teriparatide. *Clinical calcium*, v. 22, n. 1, p. 99-104, 2012.

Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):340-.

Tanaka S, Hata K, Yoneda, T. Potential use of parathyroid hormone (PTH) in the treatments for oral diseases. *Clin Calcium*. 2012 Jan;22(1):75-82. doi: CliCa12017582.

Tresguerres, IF et al Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Nov-Dec;18(6):807-11.

Tsunori K. Effects of parathyroid hormone dosage and schedule on bone regeneration. *J Oral Sci*. 2015 Jun;57(2):131-6. doi: 10.2334/josnusd. 57. 131.

Veitenhansl M et al. 40 EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Munich, Germany, 5-9 September 2004. *Diabetologia*. 2004 Aug;47 Suppl 1:A1-489.

Wang Z, Hu WW, Krebsbach PH. Gene therapy strategies for craniofacial tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007 Oct-Dec;7(4):331.

Weng D, Poehling S, Pippig S, Bell M, Richter EJ, Zuhr O, Hürzeler MB. The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Jan-Feb;24(1):31-7.

Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22(3): 97-101.

Yun HM, Chang SW, Park KR1, Herr L, Kim EC. Combined effects of growth hormone and mineral trioxide aggregate on growth, differentiation, and angiogenesis in human dental pulp cells. *J Endod*. 2016 Feb;42(2):269-75. doi: 10.1016/ j.joen.2015.08.020. Epub 2015 Oct 2.

Zou, Huawei et al. Effect of chronic kidney disease on the healing of titanium implants.
Bone, v. 56, n. 2, p. 410-415, 2013.

**ARTIGO 2**

AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS
PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A
TERAPIA COM LLLT: ESTUDO EM RATOS

ARTIGO 2: AVALIAÇÃO DO REPARO TECIDUAL EM DEFEITOS ÓSSEOS
CRÍTICOS PREENCHIDOS COM BIOMATERIAL MATRIZ DE
PLGA/rhGH E SUBMETIDOS A TERAPIA COM LLLT: ESTUDO EM
RATOS

RESUMO

Neste estudo foi avaliada a regeneração óssea em defeitos ósseos críticos preenchidos com um biomaterial polimérico e submetidos à aplicação de laser de baixa potência (LLLT). O biomaterial foi confeccionado com PLGA, um copolímero derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA), e hormônio de crescimento humano recombinante (rhGH). Foram utilizados 36 ratos Wistar machos divididos em 2 grupos (GI: sem LLLT e GII: com LLLT), cada grupo teve 3 subgrupos (7, 14 e 21 dias, com 6 animais cada). Na calota craniana de cada animal foram confeccionados 2 defeitos ósseos críticos, onde um dos defeitos foi preenchido pelo biomaterial e o outro por coágulo sanguíneo (controle). Ao final do procedimento cirúrgico, o grupo II recebeu a primeira dose de LLLT. A irradiação foi realizada a cada 48 horas, num total de 7 sessões de aplicação, durante o período de 15 dias, totalizando 70 J/cm². Os resultados demonstraram que: as cavidades com biomaterial apresentaram uma área de tecido regenerado maior que as cavidades controle, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa; e o Grupo I, sem laser, apresentou um percentual de regeneração menor em relação ao grupo que recebeu LLLT, exceto aos 14 dias. Sendo assim, é possível considerar a utilização do biomaterial proposto para regeneração de defeitos ósseos críticos, tanto em associação com a laserterapia quanto isoladamente.

Palavras-chave³: Regeneração óssea, Hormônio do crescimento, Polímeros

³ Regeneração óssea, Hormônio do crescimento, Polímeros

ASSESSMENT OF TISSUE REPAIR IN CRITICAL BONE DEFECTS FILLED WITH MATRIX BIOMATERIAL OF PLGA/rhGH AND SUBMITTED TO LLLT THERAPY: STUDY IN RATS

ABSTRACT

This study evaluated bone regeneration in critical bone defects filled with a polymeric biomaterial and submitted to the application of low-power laser (LLLT). The biomaterial was made with PLGA, a copolymer derived from lactic acid (PLA) and glycolic acid (PGA), and recombinant human growth hormone (rhGH). Thirty-six male Wistar rats were divided into two groups (GI: without LLLT and GII: with LLLT), each group had 3 subgroups (7, 14 and 21 days, with 6 animals each). In the cranial bone of each animal, 2 critical bone defects were made, where one of the defects was filled by the biomaterial and the other by a blood clot (control). At the end of the surgical procedure, group II received the first dose of LLLT. Irradiation was performed every 48 hours, in a total of 7 application sessions, during the period of 15 days, totaling 70 J/cm². The results showed that: the cavities with biomaterial presented a greater area of regenerated tissue than the control cavities, but this difference was not statistically significant; and Group I, no laser, showed a lower percentage of regeneration in relation to the group that received LLLT except at 14 days. Thus, it is possible to consider the use of the proposed biomaterial for the regeneration of critical bone defects, both in association with laser therapy and isolated.

Key-Words⁴: Bone regeneration, growth hormone, polymers.

⁴ MeSH: Medical Subject Headings; disponível em: www.nlm.nih.gov/mesh

INTRODUÇÃO

Enxerto ósseos são necessários para reestabelecimento da forma e função de estruturas ósseas perdidas por traumas, procedimentos cirúrgicos ou por processos patológicos. O enxerto ideal, padrão ouro, é o enxerto de osso autógeno, porém devido a difícil aceitação do paciente, a morbidade de uma segunda área cirúrgica para a remoção do enxerto e a disponibilidade óssea limitada, é crescente o interesse por biomateriais substitutos (Wilson et al., 2007).

Um biomaterial que tem recebido destaque nas pesquisas é o PLGA, um copolímero derivado dos ácidos láctico (PLA) e glicólico (PGA) que vem sendo empregado na encapsulação de peptídeos e proteínas, pela sua excelente biocompatibilidade celular, biodegradabilidade e aprovação regulamentar (Guo et al, 2018).

Sistemas poliméricos apresentam a vantagem de serem controlados eficientemente para entregar drogas a uma área localizada e são materiais bastante utilizados para a produção de matrizes, que oferecem elevada área de superfície em relação ao volume produzido, sendo um aspecto favorável à adesão celular, além de também apresentarem elevado número de poros interconectados, proporcionando espaços para entrada de nutrientes e saída de metabólitos, bem como aumento de migração celular (Willians, Remes, 1992).

Cada vez mais estudos estão focando a combinação de matrizes que possuam características osteocondutora com proteínas osteoindutivas. Essas proteínas podem estimular a diferenciação de células mesenquimais e osteoprogenitoras em osteoblastos e assim aumentar a migração de células relacionadas à formação óssea dentro do sítio do defeito (Liu, Ma, 2004; Villanova et al., 2010).

O reparo ósseo tem sido relacionado à vários fatores de crescimento: fatores de crescimento derivados das plaquetas (PDGFs), fatores de crescimento semelhantes a insulina I e II (IGFI e IGFII), proteínas morfogenéticas do osso 1 a 12 (Jung et al., 2017) e o GH. Este último, aumenta a síntese do IGF-I e do IGF-II, que estimula a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (Cho et al., 2003). Conseqüentemente, é capaz de estimular a síntese de proteínas, aumentar a remodelação e mineralização óssea (Cho et al., 2003).

O efeito do GH na cicatrização óssea vem sendo estudando tanto na aplicação local quanto sistêmica (Cho et al., 2003; Gomez-Moreno et al., 2009). Sua aplicação sistêmica tem apresentado bons resultados na densidade mineral óssea e na força mecânica (Cacciafesta et al., 2001; Cho et al., 2003). E a aplicação tópica, mostra um aumento da velocidade do processo de reparo ósseo periimplantar (Tresguerres et al., 2002) e na neoformação óssea, estímulo a síntese de colágeno, osteocalcina e fosfatase alcalina (Muñoz et al, 2009).

Nesse contexto, foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS um biomaterial para estimular a formação óssea, realizando uma regeneração óssea guiada. Para isso, foi utilizado como arcabouço um polímero biodegradável e biocompatível, o PLGA, e foi feita a incorporação do rhGH, que tem o papel de indutor de cicatrização e formação óssea (Garcia et al., 2015).

Outro tratamento que tem sido eficaz no processo de reparo ósseo é a laserterapia de baixa potência (*Low Level Laser Therapy* – LLLT), pois foi comprovado, *in vivo*, que a laserterapia aplicada nas fases iniciais do processo de reparo em defeitos ósseos causa um aumento da deposição óssea e aceleração da regeneração óssea (Garavello-Freitas et al., 2003; Merli et al. 2005).

A luz laser interage com os tecidos biológicos podendo ser absorvida pelos componentes do tecido, ocasionando uma transferência de energia para o tecido o que, modificaria as reações biológicas do mesmo e, por conseguinte, o processo de reparação tecidual como um todo (Baber et al., 2001). Dessa forma, pretende-se avaliar a otimização do processo de reparo ósseo causada pelo *laser*, nos defeitos ósseos preenchidos com o biomaterial proposto nesse estudo.

O presente estudo tem a finalidade de avaliar o efeito na cicatrização óssea de matrizes de PLGA com rhGH, associadas ou não com laserterapia, em defeitos ósseos críticos em calota craniana de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi desenvolvido em 36 ratos Wistar, machos, provenientes do Centro de Modelos Biológicos Experimentais – CeMBE/PUCRS, com 120 dias de vida, pesando entre 250 e 300g. Os animais foram mantidos no Vivário da PUCRS, prédio 14, em estantes ventiladas, equipadas com filtros de entrada e saída de ar (Tecniplast, Itália) e receberam água e ração Nuvilab® (Nuvital Nutrientes S/A) *ad libitum*.

Os animais selecionados foram identificados e distribuídos de forma aleatória em dois grupos distintos constituídos de dezoito ratos cada, sendo então designados como Grupo I e Grupo II. Cada grupo foi dividido em subgrupos, de acordo com o tempo de observação (07, 14 e 21 dias) e cada subgrupo teve 06 espécimes.

A definição do tamanho da amostra (N=6 por grupo, N total=36) deu-se através de dados encontrados na literatura (Göelzer et al., 2012). Assim sendo, optou-se pelo número mínimo que não pudesse comprometer os resultados.

	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
GRUPO 1 sem Laser	n = 6	n = 6	n = 6
GRUPO 2 com Laser	n = 6	n = 6	n = 6

Tabela 1: Organização dos grupos.

Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

Antes do procedimento cirúrgico, os animais foram pesados em balança de precisão e anestesiados com Ketamina 10% (ketamin®) na dose de 90 mg/Kg e Xilazina 2% (calmiun®) na dose de 10mg/Kg. Foi realizada, tricotomia, antissepsia, com clorexidina à 2%, e aposição de campos cirúrgicos estéreis. Para hemostasia, analgesia trans-operatória e controle de dor no pós-operatório imediato foi utilizado infiltração local de Lidocaína à 2% com Epinefrina 1:100.000.

Foi feita uma incisão sagital linear com extensão de 1,5 cm, divulsão dos tecidos e exposição da calota craniana. As duas cavidades, direita e esquerda, foram distribuídas lateralmente à sutura sagital mediana, e foram confeccionadas em baixa rotação, com brocas cilíndricas multilaminadas com diâmetro de 4 mm, correspondente ao tamanho dos defeitos ósseos criados.

As cavidades foram irrigadas abundantemente com solução fisiológica e secadas com gaze estéril, procedendo-se com a inserção da matriz PLGA/rhGH, na respectiva cavidade experimental. As cavidades-controle foram confeccionadas no lado direito da calota, da mesma forma que as experimentais, porém sem a inserção de material, sendo preenchidas por coágulo. O material testado, matrizes de PLGA com RHGH, foi confeccionado no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR), da Faculdade de Química da PUCRS, conforme técnica descrita por Garcia et al. (2015).

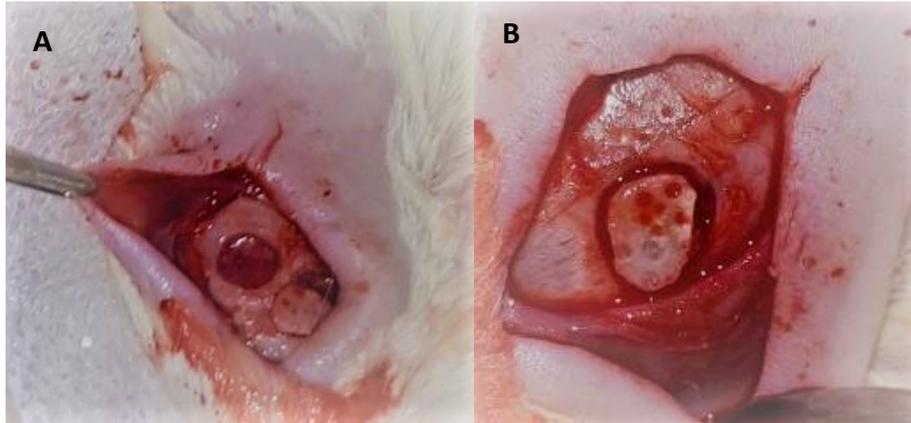


Fig. 3: A) Cavidade controle. B) Cavidade experimental, preenchida com matriz de PLGA/rhGH Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

Após a inserção do material, os tecidos moles foram reposicionados e suturados. O controle da dor pós-operatória foi realizado com Tramadol (15mg/kg) por via intraperitoneal de 8 em 8hs, nas primeiras 72 horas e com Paracetamol (200mg/ml) por via oral (2mg/kg) diluído em água após as 72 horas iniciais. Todos os animais receberam dose única de amoxicilina profilática, via oral, logo após término do procedimento.

Ao final do procedimento cirúrgico, o grupo II recebeu a primeira dose de LLLT. A aplicação foi pontual e foi realizada a cada 48 horas, num total de 7 sessões de aplicação, durante o período de 13 dias, totalizando 70 J/cm². O *laser* utilizado foi o *laser* de diodo infravermelho (GaAlAs)⁵, com comprimento de onda de 830nm. A potência estabelecida foi de 90 mw e a dose de 10 J/cm² por sessão, conforme protocolo da linha de pesquisa laser em Odontologia da PUCRS.

A eutanásia foi realizada por sedação profunda com inalação de isoflurano. E, para obtenção das peças operatórias, realizou-se tricotomia, antissepsia, incisão na região mais posterior dos tecidos moles da cabeça e divulsão dos tecidos,

⁵ Thera Lase® DMC Equipamentos, São Paulo, SP/Brasil.

promovendo uma ampla visualização da calota.

A remoção da calota craniana foi feita por meio de osteotomia, com linhas distantes de 4 a 5 mm da área dos defeitos.

Após exame macroscópico local, as peças foram imediatamente armazenadas em recipientes plásticos identificados, contendo formalina neutra tamponada a 10%.

RESULTADOS

ANÁLISE HISTOLÓGICA

As lâminas foram confeccionadas e coradas com Hematoxilina-Eosina no Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Foi realizada análise descritiva, usando microscopia de luz, baseando-se nos critérios usados por Wagner et al. (2013), onde em cada lâmina analisada foi estabelecido um score, sendo: 0 (cicatrização na margem), 1 menos da metade de área de cicatrização, 2 mais da metade de área de cicatrização, 3 cicatrização irregular, 4 cicatrização completa (Quadro 1).

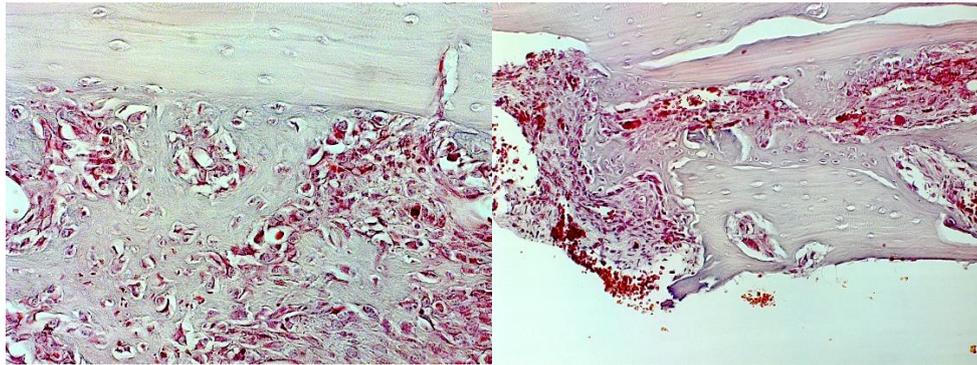
Grupo I, sem laser:

7 dias: as cavidades controle apresentaram maior presença de tecido inflamatório, em relação às cavidades experimentais do mesmo grupo. As cavidades experimentais apresentaram uma quantidade expressivamente maior de fibras colágenas. A cicatrização óssea manteve o score 1 tanto nas cavidades experimentais quanto nos controles.

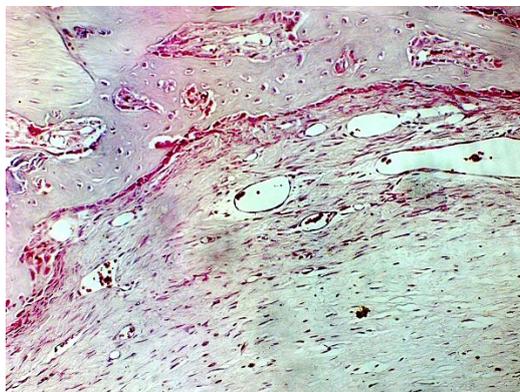
14 dias: As cavidades controle apresentaram maior quantidade de infiltrado inflamatório, quando comparadas às cavidades experimentais do mesmo grupo e,

também ao controle de 7 dias. A cicatrização óssea manteve o score 1, tanto nas cavidades experimentais quanto nos controles.

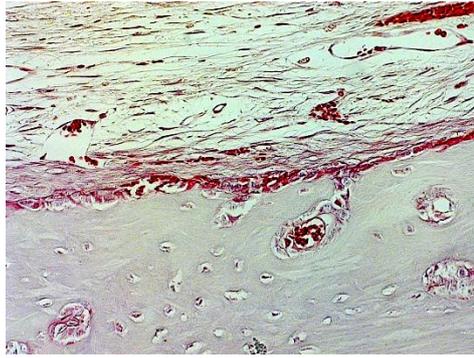
21 dias: A cicatrização óssea apresentou score 2 e pouco processo inflamatório, tanto nas cavidades experimentais quanto no controle.



7 dias Aumento: 40x e 20x
Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)



14 dias controle Aumento 20x
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2018)



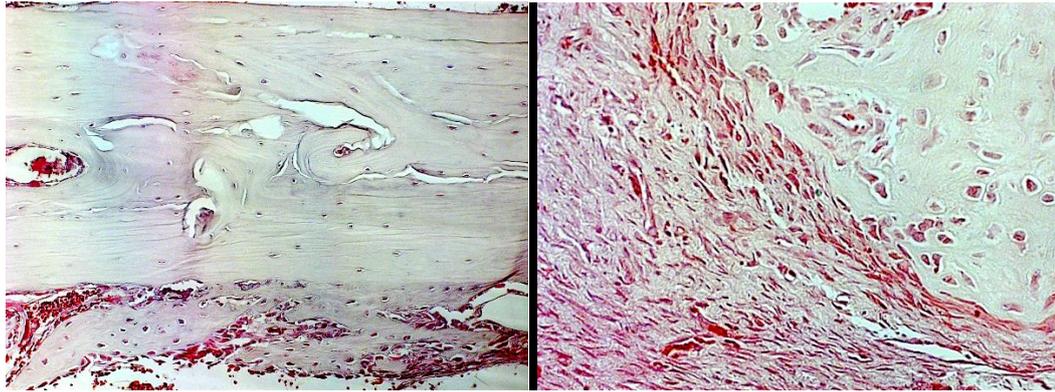
21 dias controle Aumento: 40x
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2018)

Grupo II, com laser:

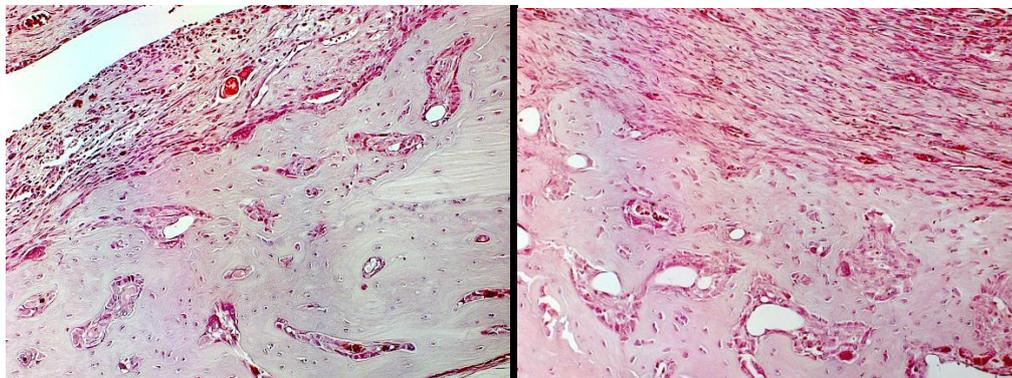
7 dias: as cavidades experimentais tiveram uma boa quantidade de neoformação óssea, fechando mais da metade da área do defeito (score 2), enquanto que as cavidades controle apresentaram cicatrização irregular (score 3). O processo inflamatório foi menor nas cavidades experimentais, quando comparado aos controles.

14 dias: as cavidades experimentais apresentaram menos processo inflamatório, em relação ao controle. Em relação à cicatrização óssea observou-se que nas cavidades experimentais e no controle menos da metade da área cicatrizou (score 1).

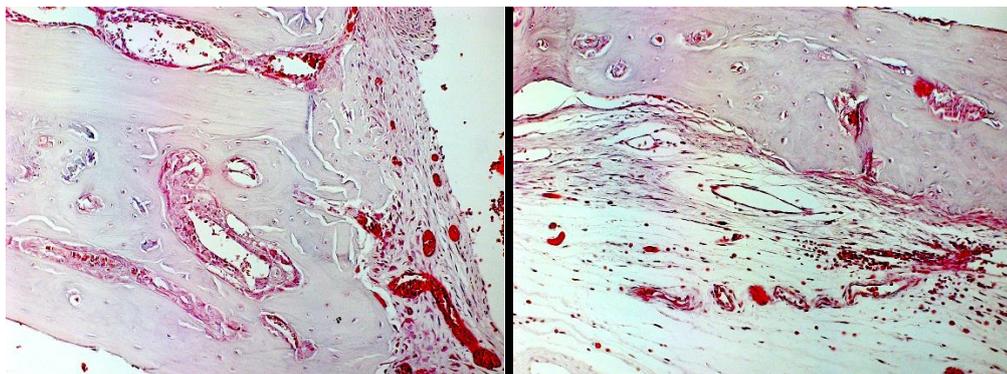
21 dias: nas cavidades experimentais pode-se observar fibras colágenas envolvendo toda circunferência da matriz. Pouco tecido inflamatório tanto no controle quando nas cavidades experimentais. Tecido ósseo em mais da metade da área do defeito (score 2) nas cavidades experimentais e nas controle.



7 dias Aumento: 20x e 40x.
Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)



14 dias Aumento: 20x
Fonte: Dados da pesquisa (PUCRS, 2018)



21 dias Aumento: 20x
Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

Nos dois grupos, o tecido ósseo neoformado exibiu espaços medulares, tecido conjuntivo, fibras colágenas e algumas áreas de inflamação, não houve presença de processo infeccioso e nem áreas de necrose.

QUADRO 1: ANÁLISE HISTOLÓGICA.

	Cavidade experimental			Cavidade controle		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Grupo I – sem laser	Score 1	Score 1	Score 2	Score 1	Score 1	Score 2
Grupo II – com laser	Score 2	Score 1	Score 2	Score 3	Score 1	Score 2

Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Foi utilizado o software Image J[®] (versão 1.52a) para calcular a área de regeneração óssea. As imagens das lâminas e da escala foram capturadas através de uma Lupa Binocular, marca Carl Zeiss[®], modelo Stemi DV4, com aumento de 16x. Através dessas imagens, calculou-se a área total do defeito ósseo e após, a área de tecido regenerado. A seguir os dados foram tabelados no Excel[®] e foi aplicada uma fórmula para cálculo da porcentagem de regeneração óssea.

O Grupo I, sem laser, apresentou um percentual de regeneração menor do que o Grupo II, exceto nos 14 dias, quando observou-se uma regeneração maior na cavidade controle do grupo sem laser.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para fins estatísticos, os dados quantitativos (% de regeneração) foram expressos em média e desvio padrão. A comparação do percentual de regeneração dentro do G1 ou G2 foi realizada pelo teste t de Student para amostras independentes. Já as análises dos dias dentro do G1 ou do G2, bem como as comparações dos dias entre o G1 e G2 foram realizadas através do teste de ANOVA de medidas repetidas (pós-teste de Bonferroni) ou ANOVA de uma via (pós-teste de Bonferroni). Todas as

análises e processamento dos dados foram realizados no programa SPSS 18.0. O nível de significância adotado será de 5% ($p < 0,05$).

TABELA 2: Relação entre Média X Desvio Padrão, no Grupo 1.

G1	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
EXPERIMENTAL	M: 40,90	M:47,38	M: 43,81
	DP:12,87	DP:8,571	DP: 9,306
CONTROLE	M: 29,28	M:47,95	M: 41,25
	DP:6,523	DP:11,87	DP: 10,69

Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

TABELA 3: Relação entre Média X Desvio Padrão, no Grupo 2.

G2	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
EXPERIMENTAL	M: 49,82	M:43,53	M:53,11
	DP:14,40	DP:10,87	DP:10,87
CONTROLE	M:35,03	M:43,48	M:51,04
	DP:21,85	DP:22,77	DP:12,84

Fonte: Dados da Pesquisa (PUCRS, 2018)

Gráfico 3. Comparação entre G1 e G2 no 7º dia.

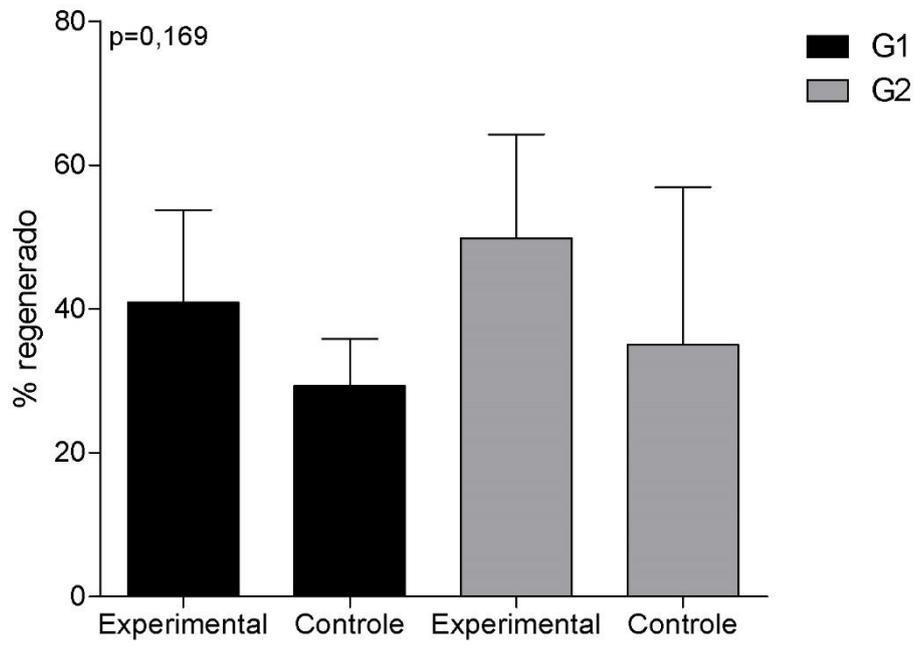


Gráfico 4. Comparação entre G1 e G2 no 14º dia.

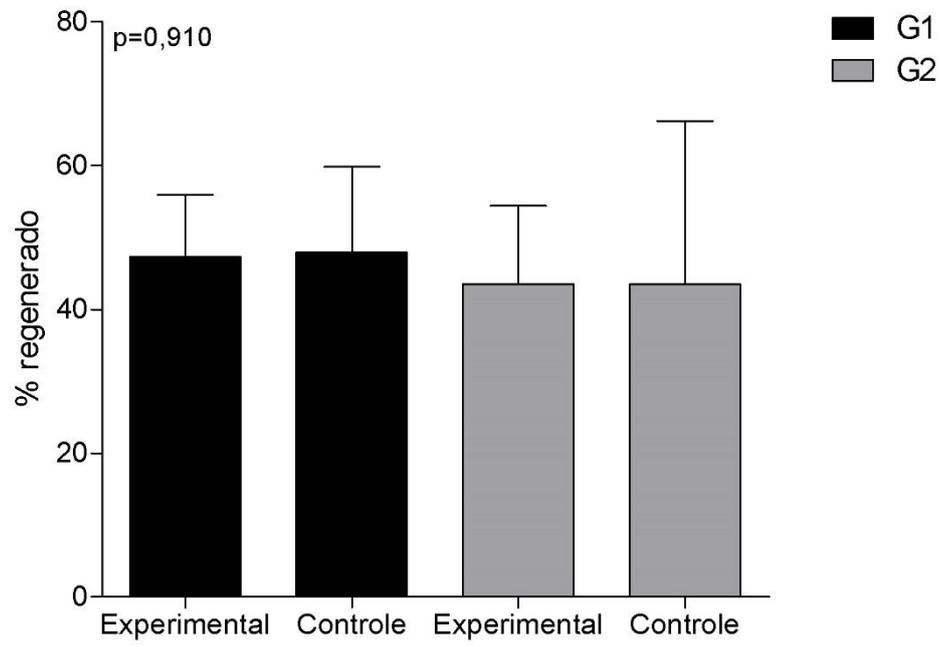
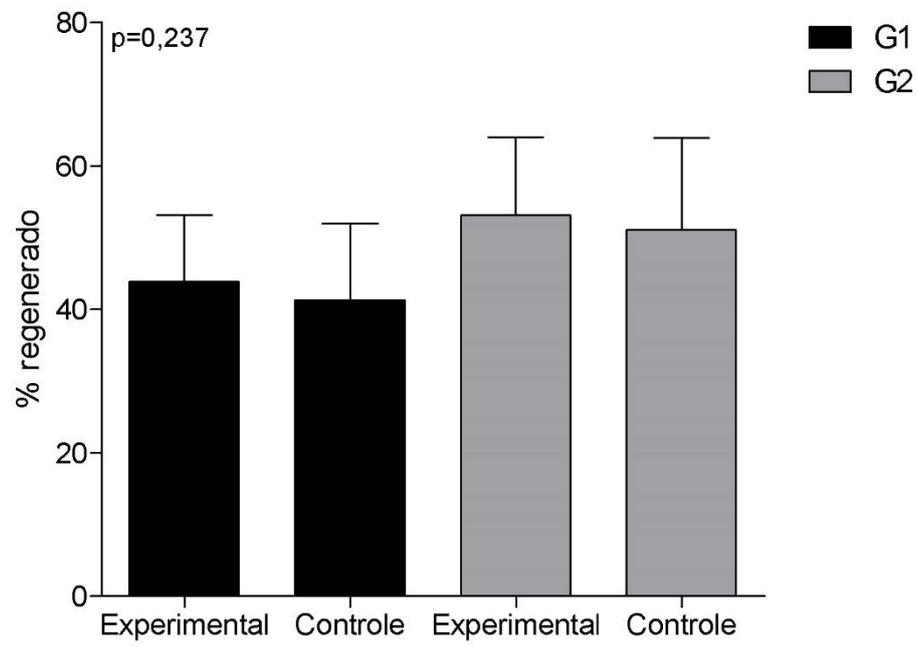


Gráfico 5. Comparação entre G1 e G2 no 21º dia.



DISCUSSÃO

No presente estudo, foi realizada uma análise do percentual de regeneração óssea, ao utilizar um biomaterial (matriz de PLGA e rhGH) e laserterapia. Defeitos ósseos críticos, em calota craniana de ratos, foram preenchidos com o biomaterial e as cavidades controle foram preenchidas somente com coágulo sanguíneo.

As matrizes utilizadas nesse estudo são resultados de pesquisas prévias (Garcia, 2015) e as taxa de perda de massa, a quantidade de hormônio liberada, em um meio que simula o ambiente *in vivo*, e também a estabilização do pH, já foram determinadas no estudo de Duarte (2014).

O PLGA seria uma boa alternativa para aumentar o tempo de ação do GH, pois acredita-se que ele possa fazer uma entrega controlada do hormônio conforme vai degradando a matriz polimérica (Ulery et al., 2011). Ao final desse estudo (21 dias), notou-se que a matriz permanecia visualmente íntegra, já no estudo de Boing (2014) foi observada a degradação total da matriz ao final de 6 semanas. Sabe-se que alguns fatores interferem na degradação do polímero, como a composição do PLGA utilizada e o pH do meio. E isto, conseqüentemente, poderá aumentar ou diminuir a liberação do hormônio ao meio externo.

A composição do PLGA (PLA + PGA) torna possível o controle do tempo de degradação, pois sabe-se que quando maior o percentual de PGA, mais acelerado se torna o processo de absorção pelo organismo. Nesse estudo foi usada a proporção 50:50 (Purasorb® - PDLG 5010).

As pesquisas utilizando o rhGH na regeneração óssea tem sido realizadas principalmente na área de implantodontia, onde, na maioria das vezes, se utiliza o rhGH na forma de pó liofilizado, aplicado diretamente na região que receberá o implante (Tresguerres et al., 2002; Gomez-Moreno et al., 2009).

Não há um protocolo estabelecido para a aplicação local mas tem se observado que o rhGH traz bons resultados nas primeiras semanas de cicatrização óssea, geralmente as doses usadas são 4UI (Tresguerres et al., 2002; Tresguerres et al., 2003; Gomez Moreno et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Calvo-Guirardo et al., 2011). Já no estudo de Martin-Monge (2017) a dose utilizada foi 2 UI de rhGH antes da instalação de implantes, os autores constataram que a aplicação do rhGH aumentou a BIC, mesmo em coelhas que tiveram indução de osteoporose.

Um estudo que avaliou a influência do uso sistêmico do rhGH no reparo ósseo periimplantar foi o de Franke-Stenport et al. (2001), os autores realizaram uma análise de frequência de ressonância (RFA) e observaram que o rhGH apresentou uma média maior nas duas semanas iniciais, porém essa média foi inferior ao controle após 4 semanas de estudo. O que nos remete a importância de um biomaterial que possa manter o rhGH disponível durante todo o período cicatricial.

Diversos estudos têm avaliado os efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização óssea (Bublitz et al., 2014; Tim et al., 2013; Tim et al., 2015), esses efeitos tem sido comparados com biomateriais, como o Biosilicato (Pinto et al., 2013), com o uso de células troco mesenquimais (Fekrazad et al., 2015) e com outros equipamentos, como o ultra-som pulsado de baixa intensidade (Acar et al., 2015).

Nesse estudo a laserterapia de baixa potência apresentou melhores resultados na cicatrização óssea aos 7 e 21 dias, quando comparadas ao grupo sem laser. A associação do biomaterial, proposto nesse estudo, com a LLLT não apresentou diferenças estatisticamente significativas, apesar da área cicatrizada ser maior nas cavidades que continham o biomaterial em comparação às cavidades controle. Já na análise qualitativa observou-se uma cicatrização mais uniforme no grupo com laser,

aos 21 dias, tanto nas cavidades preenchidas com material quanto nas cavidades preenchidas por coágulo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com a metodologia empregada e com os resultados descritivos qualitativos e histomorfométricos obtidos nesta pesquisa, pode-se concluir que:

- a) o biomaterial pode ser utilizado como coadjuvante no processo de regeneração de defeitos ósseos críticos;

- b) o uso desse biomaterial em defeitos ósseos, pode produzir maior área de regeneração, em comparação às cavidades preenchidas por coágulo sanguíneo, mas sem associação estatística significativa.

- c) a associação do LLLT melhorou a cicatrização óssea, tanto isoladamente quanto em conjunto com o biomaterial, apresentando percentual de regeneração maior aos 07 e 21 dias de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abduljabbar T et al. Effect of Growth Hormone Supplementation on Osseointegration: A Systematic Review and Meta-analyses. *Implant Dent.* 2017 Aug;26(4):613-620. doi: 10.1097/ID.0000000000000616.

Baber A, Luger JE, Karpf A. Advances in Laser Therapy for Bone Repair. *Laser Ther.* 2001;13: 81-5, 2001.

Bail HJ. et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone*. 2002 Jan;30(1):117-24.

Blom, EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, LIE. J, Kurashina KI. Transforming growth factor- β 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000 Apr;50(1):67-74.

Boing F. Avaliação da neoformação óssea em defeitos críticos com o uso de substitutos ósseos derivados de fosfato e do PLGA/rhGH: estudo preliminar em coelhos. [dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2014. 53 f.

Cacciafesta V1, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen TT. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *Eur J Orthod*. 2001 Dec;23(6):733-40.

Calvo-Guirado JL et al. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clin Oral Implants Res*. 2011 Jun;22(6):587-93. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02007.x. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21121954.

Cerci DX et al. Leukocyte-platelet-rich plasma diminishes bone matrix deposition in rat calvaria treated with autograft due to simultaneous increase in immunohistochemical expression of Indian Hedgehog, transforming growth factor- β , and parathyroid-1 receptor. *J Craniomaxillofac Surg*. 2015 Oct;43(8):1470-7. doi: 10.1016/j.jcms.2015.06.040. Epub 2015 Jul 8.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *J Craniofac Surg*. 2004 Mar;15(2):299-311; discussion 312-3.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model. *J Craniofac Surg.* 2003 May;14(3):417-25.

Davit-Béal T et al. Dental complications of rickets in early childhood: case report on 2 young girls. *Pediatrics.* 2014 Apr;133(4):e1077-81. doi: 10.1542/peds.2013-0733. Epub 2014 Mar 10.

Denissen H et al. Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues. *J Periodontal Res.* 1997 Jan;32(1 Pt 1):40-6.

Fekrazad, R. et al. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Oct;151:180-5. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.002. Epub 2015 Aug 11.

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980 Mar;38(3):176-80.

Franke-Stenport V, Olsson B, Morberg P, Törnell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2001;3(3):135-41.

Garcia RF, Duarte AAPD, Boing F, Ligabue RA, Pagnoncelli RM. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) em matriz de polímero biodegradável. *Rev Odonto UNESP.* 2015;44: 218-25.

Gavarello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-Power Laser Irradiation Improves Histomorphometrical

Parameters and Bone Matrix Organization During Tíbia Wound in Rats. *J Photochem Photobiol B*. 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Gerzson AS, et al. Assessment of Adhesion and Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Polymer Matrices with rhGH. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 32, n. 3, 2017.

Gerzson AS, et al. Assessment of the viability of NIH3T3 fibroblast cells cultured in polymer matrices with rhGH. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 906-912, 2018.

Göelzer JG, Avelar RL, Dolzan AN, Becker OE, Haas OL Jr, de Oliveira LY, de Oliveira RB. Evaluation of tissue response and genotoxicity of poly (L/D-lactic acid) disks implanted in rat calvarium. *Histol Histopathol*. 2012 Dec;27(12):1551-7. doi: 10.14670/HH-27.1551.

Gómez-Moreno G et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec;24(6):1068-73.

Gondim ALMF. Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos. 2007. [dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2007. 117 f.

Guo Z, Wu S, Li H, Li Q, Wu G, Zhou C. In vitro evaluation of electrospun PLGA/PLLA/PDLLA blend fibers loaded with naringin for guided bone regeneration. *Dent Mater J*. 2018 Mar 30;37(2):317-324. doi: 10.4012/dmj.2016-220. Epub 2017 Dec

Hata K. Clinical and preclinical application of PTH and BMP to dental treatment. *Clin Calcium*. 2016 Mar; 26(3): 466-74. doi: [CliCa16034 66474](https://doi.org/10.1111/CLIC.12034).

Heo HA, Park SH, Jeon YS, Pyo SW. Enhancing effect of intermittent parathyroid hormone administration on bone formation after titanium implant placement in an ovariectomized rat maxilla. *Implant Dent*. 2016 Apr;25(2):227-31. doi: [10.1097/ID.0000000000000352](https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000352).

Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):255-81. doi: [10.1111/j.1600-051X.2008.01270.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01270.x).

Jung J, Yoo HY, Kim GT, Lee JW, Lee YA, Kim DY, Kwon YD. Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study. *J Bone Miner Res*. 2017 Dec;32(12):2445-2452. doi: [10.1002/jbmr.3237](https://doi.org/10.1002/jbmr.3237). Epub 2017 Sep 18.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.

Kline LW, Donald CY. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):866-9. doi: [10.1016/j.joen.2009.03.045](https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.045).

Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;30(5):365-9.

Lee PH, Yew TL, Lai YL, Lee SY, Chen HL. Parathyroid hormone gene-activated matrix with DFDBA/collagen composite matrix enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects. *J Chin Med Assoc.* 2018 Aug;81(8):699-707. doi: 10.1016/j.jcma.2017.12.004. Epub 2018 Mar 15.

Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2004 Mar;32(3):477-86.

Martin-Monge E, Tresguerres IF, Clemente C, Tresguerres JA. Local Application of Growth Hormone to Enhance Osseointegration in Osteoporotic Bones: A Morphometric and Densitometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017 Jul/Aug; 32(4):751-758. doi: 10.11607/jomi.5320.

Merli LA. et al. Effect of low- intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):212-5.

Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Apr;14(2):226-35. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00242.x. Epub 2009 Sep 29.

Prati AJ et al. Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2013 Dec;92(12 Suppl):161S-7S. doi: 10.1177/0022034513504951. Epub 2013 Oct 24.

Prockt AP, Takahashi A, Pagnoncelli, RM. Uso de terapia com laser de baixa intensidade na cirurgia bucomaxilofacial. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac.* 2008;49(4):247-55.

Schneider A1, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res.* 2003 Sep;21(5):859-64.

Silva Júnior AN. Avaliação do efeito do laser diodo (GaAlAs) infravermelho de 830nm na biomodulação da cicatrização óssea. [Dissertação]. Porto Alegre: yIMPUCRS; 2000. 116 f.

Silva Júnior NA, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. *J Clin Laser Med Surg.* 2002 Apr;20(2):83-

Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol.* 2001 Apr;28(4):340-7.

Tanaka S, Hata K, Yoneda T. Potential use of parathyroid hormone (PTH) in the treatments for oral diseases. *Clin Calcium.* 2012 Jan;22(1):75-82. doi: CliCa12017582.

Tee BC et al. Reconstructing jaw defects with MSCs and PLGA-encapsulated growth factors. *Am J Transl Res.* 2016 Jun 15;8(6):2693-704. eCollection 2016.

Tresguerres IF et al. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2003 Nov-Dec;18(6):807-11.

Tresguerres, IF et al. Effects of Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model: an histologic, histomorphometric and densitometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(6):631-36.

Tsunori K. Effects of parathyroid hormone dosage and schedule on bone regeneration. *J Oral Sci.* 2015 Jun;57(2):131-6. doi: 10.2334/josnusd. 57. 131.

Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci B Polym Phys.* 2011 Jun 15;49(12):832-864.

Veitenhansl M et al. 40 EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Munich, Germany, 5-9 September 2004. *Diabetologia.* 2004 Aug;47 Suppl 1:A1-489.

Villanova JCO, Oréface RL, Cunha, AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros.* 2010;20(1):51-64.

Wagner VP, Meurer L, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013 Dec;18(12):128002. doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128002.

Wang Z, Hu WW, Krebsbach PH. Gene therapy strategies for craniofacial tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007 Oct-Dec;7(4):331.

Weng D, Poehling S, Pippig S, Bell M, Richter EJ, Zuhr O, Hürzeler MB. The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jan-Feb;24(1):31-7.

Williams DF, Remes A. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials.* 1992;13(11):731-43.

Yang S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res.* 2012 Jun-Aug;22(3-4):97-101. doi: 10.1016/j.ghir.2012.03.002. Epub 2012 Apr 1.

Yun HM, Chang SW, Park KR1, Herr L, Kim EC. Combined effects of growth hormone and mineral trioxide aggregate on growth, differentiation, and angiogenesis in human dental pulp cells. *J Endod.* 2016 Feb;42(2):269-75. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.020. Epub 2015 Oct 2.

Zou H et al. Effect of chronic kidney disease on the healing of titanium implants. *Bone.* 2013 Oct;56(2):410-5. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.014. Epub 2013 Jul 19.



DISCUSSÃO GERAL

Os efeitos do rhGH na regeneração óssea têm sido avaliados em animais, principalmente em cães (Calvo-Guirardo et al, 2011; Muñoz et al, 2009) e coelhos (Martin-Monge et al., 2017; Tresguerres et al., 2003). Na maioria dos estudos, o uso é tópico, sem veículo, utilizando apenas o pó liofilizado aplicado diretamente na área a ser tratada. As doses variam de 2UI (Martin-Monge et al., 2017) à 4UI (Gomez-Moreno et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Tresguerres et al., 2002).

A maior parte das pesquisas têm avaliado o efeito do rhGH na regeneração óssea periimplantar (Franke-Stenport et al., 2001; Tresguerres et al., 2002; Martin-Monge et al., 2017) e um dos principais fatores que tem sido analisado é o contato entre o osso e o implante (BIC). Alguns estudos tem demonstrado aumento do BIC, com o uso tópico do GH, após 2 semanas de tempo de observação (Tresguerres et al., 2003; Martin-Monge et al., 2017). Porém, em períodos de observação maiores, o uso tópico do rhGH não tem apresentado efeito significativo no BIC (Calvo-Guirardo et al., 2011; Muñoz et al., 2009). O que exprime a necessidade de desenvolver um biomaterial que possa prolongar o efeito do rhGH.

No estudo de Cho et al. (2004) o hormônio do crescimento foi encapsulado em microesferas de quitosana e apresentou resultados benéficos para a cicatrização óssea. Os autores observaram que a liberação do rhGH, por meio das microesferas de quitosana, ocorreu de forma intensa nos primeiros 5 dias e aumentou gradualmente até o 20º dia. Notou-se que a liberação do rhGH não apresentou um platô, sugerindo que essa liberação continuaria após o 20º dia.

O PLGA seria uma boa alternativa para aumentar o tempo de ação do rhGH, pois acredita-se que ele possa fazer uma entrega controlada do hormônio conforme

vai degradando a matriz polimérica (Ulery et al., 2011). A composição do PLGA (PLA + PGA) torna possível o controle do tempo de degradação, pois sabe-se que quando maior o percentual de PGA, mais acelerado se torna o processo de absorção pelo organismo. Nesse estudo foi usada a proporção 50:50 (Purasorb® - PDLG 5010).

As matrizes utilizadas nesse estudo são resultados de pesquisas prévias (Garcia, 2015) e as taxa de perda de massa, a quantidade de hormônio liberada, em um meio que simula o ambiente in vivo, e também a estabilização do pH, já foram determinadas no estudo de Duarte (2014).

Ao final desse estudo (21 dias), notou-se que a matriz permanecia visualmente íntegra, já no estudo de Boing (2014) foi observada a degradação total da matriz ao final de 6 semanas. Sabe-se que alguns fatores interferem na degradação do polímero, como a composição do PLGA utilizada e o pH do meio. E isto, conseqüentemente, poderá aumentar ou diminuir a liberação do hormônio ao meio externo.

Um estudo que avaliou a influência do uso sistêmico do rhGH no reparo ósseo periimplantar foi o de Franke-Stenport et al. (2001), os autores realizaram uma análise de frequência de ressonância (RFA) e observaram que o rhGH apresentou uma média maior nas duas semanas iniciais, porém essa média foi inferior ao controle após 4 semanas de estudo. O que nos remete a importância de um biomaterial que possa manter o rhGH disponível durante todo o período cicatricial.

Em 2003, Cho et al. realizaram um estudo no qual o rhGH foi encapsulado em microesferas de quitosana, para liberação controlada do hormônio. Os autores observaram que a Densidade Mineral Óssea foi maior do que ao usar o rhGH tópico, sem veículo.

No presente estudo, foi realizada uma análise do percentual de regeneração óssea, ao utilizar um biomaterial (matriz de PLGA e rhGH) e laserterapia. Diversos estudos têm avaliado os efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização óssea (bublitz et al., 2014; Tim et al., 2013; Tim et al., 2015), esses efeitos tem sido comparados com biomateriais, como o Biosilicato (Pinto et al., 2013), com o uso de células troco mesenquimais (Fekrazad et al., 2015) e com outros equipamentos, como o ultra-som pulsado de baixa intensidade (Acar et al., 2015).

Nesse estudo a laserterapia de baixa potência apresentou melhores resultados na cicatrização óssea aos 7 e 21 dias, quando comparadas ao grupo sem laser. A associação do biomaterial, proposto nesse estudo, com a LLLT não apresentou diferenças estatisticamente significativas, apesar da área cicatrizada ser maior nas cavidades que continham o biomaterial em comparação às cavidades controle. Já na análise qualitativa observou-se uma cicatrização mais uniforme no grupo com laser, aos 21 dias, tanto nas cavidades preenchidas com material quanto nas cavidades preenchidas por coágulo.

Diante do exposto e de acordo com a metodologia empregada, pode-se considerar que o biomaterial proposto é uma boa alternativa para ser utilizado como coadjuvante no processo de regeneração de defeitos ósseos críticos e que a associação com o LLLT pode melhorar a cicatrização óssea, porém as diferenças não foram estatisticamente significantes, o que estimula a realização de novos estudos para elucidar as questões que ainda não foram avaliadas.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS⁵

Abduljabbar T et al. Effect of growth hormone supplementation on osseointegration: a systematic review and meta-analyses. *Implant Dent.* 2017 Aug;26(4):613-620. doi: 10.1097/ID.0000000000000616.

Acar AH, Yolcu Ü, Altındış S, Gül M, Alan H, Malkoç S.. Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol.* 2016 Jan;61:60-5. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.011. Epub 2015 Oct 23.

Baber A, Luger JE, Karpf A. Advances in Laser Therapy for Bone Repair. *Laser Ther.* 2001;13: 81-5, 2001.

Bail HJ. et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone.* 2002 Jan;30(1):117-24.

Barbanti S, Zavaglia C, Duek E. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de tecidos. *Polímero.* 2005 jan;15(1):13-21.

Blom, EJ, Klein-Nulend J, Klein CP, LIE. J, Kurashina KI. Transforming growth factor- β 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res.* 2000 Apr;50(1):67-74.

⁵ A lista contém todas referências apresentadas no trabalho, da introdução, dos dos artigos 1 e 2 e discussão geral. Nas citações no Texto, com de três ou mais autores foi colocada a expressão latina et al. Nas referências, mais de seis autores, também. O formato da referência está conforme Vancouver. A lista da referência está em ordem alfabética.

Boing F. Avaliação da neoformação óssea em defeitos críticos com o uso de substitutos ósseos derivados de fosfato e do PLGA/rhGH: estudo preliminar em coelhos. [dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2014. 53 f.

Bourne, GH editor et al. The Biochemistry and Physiology of Bone. New York: Academic Press; 1972. v. 1.

Bublitz C et al. Low-level laser therapy prevents degenerative morphological changes in an experimental model of anterior cruciate ligament transection in rats. *Lasers Med Sci.* 2014 Sep;29(5):1669-78. doi: 10.1007/s10103-014-1546-z. Epub 2014 Apr 11.

Cacciafesta V, Dalstra M, Bosch C, Melsen B, Andreassen T. Growth hormone treatment promotes guided bone regeneration in rat calvarial defects. *The European Journal of Orthodontics*, v. 23, n. 6, p. 733-740, 2001..

Calvo-Guirado JL et al. Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clin Oral Implants Res.* 2011 Jun;22(6):587-93. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02007.x. Epub 2010 Dec 2. PMID: 21121954.

Cerci DX et al. Leukocyte-platelet-rich plasma diminishes bone matrix deposition in rat calvaria treated with autograft due to simultaneous increase in immunohistochemical expression of Indian Hedgehog, transforming growth factor- β , and parathyroid-1 receptor. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, v. 43, n. 8, p. 1470-1477, 2015.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of chitosan microsphere-encapsulated growth hormone on bony consolidation in mandibular distraction osteogenesis in a dog model. *J Craniofac Surg.* 2004 Mar;15(2):299-311; discussion 312-3.

Cho BC et al. The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model. *J Craniofac Surg.* 2003 May;14(3):417-25.

Davit-Béal T et al. Dental complications of rickets in early childhood: case report on 2 young girls. *Pediatrics.* 2014 Apr;133(4):e1077-81. doi: 10.1542/peds.2013-0733. Epub 2014 Mar 10.

Davit-Béal T et al. Dental complications of rickets in early childhood: case report on 2 young girls. *Pediatrics.* 2014 Apr;133(4):e1077-81. doi: 10.1542/peds.2013-0733. Epub 2014 Mar 10.

Ducheyne P, Kohn DH. Materials for bone and joint replacement. *Materials Science and Technology.* 1992;14(29).

Denissen H et al. Net-shaped hydroxyapatite implants for release of agents modulating periodontal-like tissues. *J Periodontal Res.* 1997 Jan;32(1 Pt 1):40-6.

Duarte, A. Avaliação da degradação de matrizes poliméricas biodegradáveis (PLGA) associadas com hormônio do crescimento Humano recombinante (rhGH): estudo in vitro. [dissertation]. Porto Alegre; PUCRS; 2014. 2014 45f

Fekrazad, R. et al. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B.* 2015 Oct;151:180-5. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.002. Epub 2015 Aug 11.

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 1980 Mar;38(3):176-80.

Franke-Stenport V, Olsson B, Morberg P, Törnell J, Johansson CB. Systemically administered human growth hormone improves initial implant stability: an experimental study in the rabbit. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2001;3(3):135-41.

Garcia RF, Duarte AAPD, Boing F, Ligabue RA, Pagnoncelli RM. Incorporação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) em matriz de polímero biodegradável. *Rev Odonto UNESP*. 2015;44: 218-25.

Gavarello-Freitas I, Baranauskas V, Joazeiro PP, Padovani CR, Dal Pai-Silva M, da Cruz-Höfling MA. Low-Power Laser Irradiation Improves Histomorphometrical Parameters and Bone Matrix Organization During Tibia Wound in Rats. *J Photochem Photobiol B*. 2003 May-Jun;70(2):81-9.

Gerzson AS, et al. Assessment of Adhesion and Proliferation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Polymer Matrices with rhGH. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, v. 32, n. 3, 2017.

Gerzson AS, et al. Assessment of the viability of NIH3T3 fibroblast cells cultured in polymer matrices with rhGH. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 26, n. 3, p. 906-912, 2018.

Göelzer JG, Avelar RL, Dolzan AN, Becker OE, Haas OL Jr, de Oliveira LY, de Oliveira RB. Evaluation of tissue response and genotoxicity of poly (L/D-lactic acid) disks implanted in rat calvarium. *Histol Histopathol*. 2012 Dec;27(12):1551-7. doi: 10.14670/HH-27.1551.

Gombotz WR, Pettit DK. Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery. *Bioconjug Chem*. 1995 Jul-Aug;6(4):332-51

Gómez-Moreno G et al. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec;24(6):1068-73.

Gondim ALMF. Efeito da laserterapia na biomodulação da osteogênese em defeitos críticos confeccionados em calota craniana de ratos. 2007. [dissertação]. Porto Alegre (RS): PUCRS; 2007. 117 f.

Guo Z, Wu S, Li H, Li Q, Wu G, Zhou C. In vitro evaluation of electrospun PLGA/PLLA/PDLLA blend fibers loaded with naringin for guided bone regeneration. *Dent Mater J*. 2018 Mar 30;37(2):317-324. doi: 10.4012/dmj.2016-220. Epub 2017 Dec 2.

Hata K. Clinical and preclinical application of PTH and BMP to dental treatment. *Clin Calcium*. 2016 Mar; 26(3): 466-74. doi: CliCa16034 66474.

Helmus MN, Tweden K. Encyclopedic handbook of biomaterials and bioengineering: Materials selection. ed Wise Donald (Marcel Dekker, Inc, New York) 1995; 2:27-59.

Heo HA, Park SH, Jeon YS, Pyo SW. Enhancing effect of intermittent parathyroid hormone administration on bone formation after titanium implant placement in an ovariectomized rat maxilla. *Implant Dent*. 2016 Apr;25(2):227-31. doi: 10.1097/ID.0000000000000352.

Jung J, Yoo HY, Kim GT, Lee JW, Lee YA, Kim DY, Kwon YD. Short-Term Teriparatide and Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Regenerative Approach to Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw: A Preliminary Study. *J Bone Miner Res*. 2017 Dec;32(12):2445-2452. doi: 10.1002/jbmr.3237. Epub 2017 Sep 18.

Jung RE, Thoma DS, Hammerle CH. Assessment of the potential of growth factors for localized alveolar ridge augmentation: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2008 Sep;35(8 Suppl):255-81. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01270.x. **ARTIGO 1-2.**

Junqueira, LCU et al. *Histologia basica: texto y atlas*. Editorial Médica Panamericana; 2015.

Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys*. 1989 May;56(5):691-704.

Kline LW, Donald CY. Effects of calcitonin, calcitonin gene-related peptide, human recombinant bone morphogenetic protein-2, and parathyroid hormone-related protein on endodontically treated ferret canines. *J Endod*. 2009 Jun;35(6):866-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.045.

Kramer IRH, Kelly HC, Wright HC. A histological and radiological comparison of the healing of defects of the rabbit calvarium with and without implanted heterogenousanorganic bone. *Arch. Oral Biol*. 1968;13:1095.

Kreisler M, Christoffers AB, Al-Haj H, Willershausen B, d'Hoedt B. Low level 809nm diode laser induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002;30(5):365-9.

Lee PH, Yew TL, Lai YL, Lee SY, Chen HL. Parathyroid hormone gene-activated matrix with DFDBA/collagen composite matrix enhances bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Chin Med Assoc*. 2018 Aug;81(8):699-707. doi: 10.1016/j.jcma.2017.12.004. Epub 2018 Mar 15.

Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng.* 2004 Mar;32(3):477-86.

Martin-Monge E, Tresguerres IF, Clemente C, Tresguerres JA. Local Application of Growth Hormone to Enhance Osseointegration in Osteoporotic Bones: A Morphometric and Densitometric Study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2017 Jul/Aug; 32(4):751-758. doi: 10.11607/jomi.5320.

MERLI LA. et al. Effect of low- intensity laser irradiation on the process of bone repair. *Photomed Laser Surg.* 2005 Apr;23(2):212-5.

Motta AC, Duek EAR. Síntese aracterização e egradação “in vitro” do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico). *Matéria (Rio J.)*. 2006;11(3):340-350.

Muñoz F, López-Peña M, Miño N, Gómez-Moreno G, Guardia J, Cutando A. Topical application of melatonin and growth hormone accelerates bone healing around dental implants in dogs. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012 Apr;14(2):226-35. doi: 10.1111/j.1708-8208.2009.00242.x. Epub 2009 Sep 29.

Pinto KN, Tim CR, Crovace MC, Matsumoto MA, Parizotto NA, Zanotto ED, Peitl O, Rennó AC. Effects of biosilicate(®) scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. *Photomed Laser Surg.* 2013 Jun;31(6):252-60. doi: 10.1089/pho.2012.3435

Prati AJ et al. Release of bone markers in immediately loaded and nonloaded dental implants: a randomized clinical trial. *J Dent Res.* 2013 Dec;92(12 Suppl):161S-7S. doi: 10.1177/0022034513504951. Epub 2013 Oct 24.

Prockt AP, Takahashi A, Pagnoncelli, RM. Uso de terapia com laser de baixa intensidade na cirurgia bucomaxilofacial. Rev Port Estomatol Cir Maxilofac. 2008;49(4):247-55.

Santos RMM, Fialho SL. Nanopartículas. Biotecnol. Ciênc. Desenvolv.. 2007 jan/fev; 37(10):52-59.

Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. J Orthop Res. 2003 Sep;21(5):859-64.

Silva Júnior AN. Avaliação do efeito do laser diodo (GaAlAs) infravermelho de 830nm na biomodulação da cicatrização óssea. [Dissertação]. Porto Alegre: FO-PUCRS; 2000. 116 f.

Silva Júnior NA, Pinheiro AL, Oliveira MG, Weismann R, Ramalho LM, Nicolau RA. Computerized morphometric assessment of the effect of low-level laser therapy on bone repair: an experimental animal study. J Clin Laser Med Surg. 2002 Apr;20(2):83-7.

Soares AQ, Oliveira LF, Rabelo D, Souza AR, Polímeros Biodegradáveis: Novas perspectivas para as ciências farmacêuticas. Rev. Eletronica Farm. 2005;2(2):202-205.

Sun G, Tunér Low-level laser therapy in dentistry. J. Dent Clin North Am. 2004 Oct;48(4):1061-76, viii

Takedachi M, Murakami, S. Present status of periodontal regeneration-FGF-2 and Teriparatide. Clinical calcium, v. 22, n. 1, p. 99-104, 2012.

Talwar R, Di Silvio L, Hughes FJ, King GN. Effects of carrier release kinetics on bone morphogenetic protein-2-induced periodontal regeneration in vivo. *J Clin Periodontol*. 2001 Apr;28(4):340-.

Tanaka S, Hata K, Yoneda T. Potential use of parathyroid hormone (PTH) in the treatments for oral diseases. *Clin Calcium*. 2012 Jan;22(1):75-82. doi: CliCa12017582.

Tee BC et al. Reconstructing jaw defects with MSCs and PLGA-encapsulated growth factors. *Am J Transl Res*. 2016 Jun 15;8(6):2693-704. eCollection 2016.

Tim CR, Bossini OS et al. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes during the initial stages of bone healing in rats: a microarray analysis. *Lasers Med Sci*. 2015 Dec;30(9):2325-33. doi: 10.1007/s10103-015-1807-5. Epub 2015 Sep 28.

Tim CR, Pinto KN et al. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. *Lasers Med Sci*. 2014 Jan;29(1):147-56. doi: 10.1007/s10103-013-1302-9. Epub 2013 Mar 21.

Tresguerres IF et al. Effects of local administration of growth hormone in peri-implant bone: an experimental study with implants in rabbit tibiae. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003 Nov-Dec;18(6):807-11.

Tresguerres, IF et al. Effects of Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model: an histologic, histomorphometric and densitometric study. *Clin Oral Implants Res*. 2002;13(6):631-36.

Tsunori K. Effects of parathyroid hormone dosage and schedule on bone regeneration. *J Oral Sci.* 2015 Jun;57(2):131-6. doi: 10.2334/josnusd. 57. 131.

Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J Polym Sci B Polym Phys.* 2011 Jun 15;49(12):832-864.

Veitenhansl M et al. 40 EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes: Munich, Germany, 5-9 September 2004. *Diabetologia.* 2004 Aug;47 Suppl 1:A1-489.

Villanova JCO, Oréface RL, Cunha, AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros.* 2010;20(1):51-64.

Wagner VP, Meurer L, Martins MD. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013 Dec;18(12):128002. doi: 10.1117/1.JBO.18.12.128002.

Wang Z, Hu WW, Krebsbach PH. Gene therapy strategies for craniofacial tissue engineering. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2007 Oct-Dec;7(4):331.

Weng D, Poehling S, Pippig S, Bell M, Richter EJ, Zuhr O, Hürzeler MB. The effects of recombinant human growth/differentiation factor-5 (rhGDF-5) on bone regeneration around titanium dental implants in barrier membrane-protected defects: a pilot study in the mandible of beagle dogs. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009 Jan-Feb;24(1):31-7.

Williams DF, Remes A. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials.* 1992;13(11):731-43.

YANG S, Cao L, Cai S, Yuan J, Wang J. A systematic review of growth hormone for hip fractures. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22(3): 97-101.

Yun HM, Chang SW, Park KR1, Herr L, Kim EC. Combined effects of growth hormone and mineral trioxide aggregate on growth, differentiation, and angiogenesis in human dental pulp cells. *J Endod*. 2016 Feb;42(2):269-75. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.020. Epub 2015 Oct 2.

Zou H et al. Effect of chronic kidney disease on the healing of titanium implants. *Bone*. 2013 Oct;56(2):410-5. doi: 10.1016/j.bone.2013.07.014. Epub 2013 Jul 19.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO



SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7330

Porto Alegre, 18 de agosto de 2016.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação do reparo tecidual em defeitos ósseos críticos preenchidos com biomaterial matriz de PLGA/rhGH e submetidos a terapia com LLLT: estudo em ratos". Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ANEXO B – ATA DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS



SIPESQ Sistema de Pesquisas da PUCRS

Código SIPESQ: 7330

Porto Alegre, 8 de junho de 2017

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação do reparo tecidual em defeitos ósseos críticos preenchidos com biomaterial matriz de PLGA/rhGH e submetidos a terapia com LLLT: estudo em ratos" coordenado por JOAO BATISTA BLESSMANN WEBER.

Sua investigação, respeitando com detalhe as descrições contidas no projeto e formulários avaliados pela CEUA, está autorizada a partir da presente data.

Informamos que é necessário o encaminhamento de relatório final quando finalizar esta investigação. Adicionalmente, ressaltamos que conforme previsto na Lei no. 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que regulamenta os procedimentos para o uso científico de animais, é função da CEUA zelar pelo cumprimento dos procedimentos informados, realizando inspeções periódicas nos locais de pesquisa.

Duração do Projeto: 08/06/2017 - 08/12/2017

Nº de Animais	Espécie
43	Rato Wistar
Total de Animais: 43	

Atenciosamente,

Comissão de Ética no Uso de Animais(CEUA)



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br