



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**NÍVEL: DOUTORADO**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA  
BUCOMAXILOFACIAL**

**HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE  
IMPLANTES DE TITÂNIO - ESTUDO EXPERIMENTAL E REVISÃO DE LITERATURA**

***GROWTH HORMONE ON THE OSSEOINTEGRATION PROCESS OF TITANIUM  
IMPLANTS – AN EXPERIMENTAL STUDY AND REVIEW OF LITERATURE***

**MARCELO EMIR REQUIA ABREU**

**PORTO ALEGRE - RS**

**2011**

**Marcelo Emir Requia Abreu**

**HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE  
IMPLANTES DE TITÂNIO - ESTUDO EXPERIMENTAL E REVISÃO DE LITERATURA**

***GROWTH HORMONE ON THE OSSEOINTEGRATION PROCESS OF TITANIUM  
IMPLANTS – AN EXPERIMENTAL STUDY AND REVIEW OF LITERATURE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito final para obtenção do título de Doutor em Odontologia, na Área de Concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Miranda  
Pagnoncelli

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Hubler

PORTO ALEGRE – RS

2011

## DEDICAÇÃO ESPECIAL

Ao meu pai, **Emyr Farias Abreu**, e à minha mãe, **Josefina Maria Requia Abreu**, por todo o amor, dedicação e suporte ao longo de minha vida. Esse trabalho é dedicado a vocês com muito amor!

## DEDICATÓRIA

À minha **família**, que é a base de tudo. Sem vocês por perto, nada seria possível, amo *todos* vocês!!!

À minha esposa, **Carol**, pela compreensão, estímulo e apoio durante todo esse tempo. Te amo!!!

À minha **nova família**, espero que cada vez mais sejamos uma única família.

Ao **Deus** que tem sempre iluminado a minha vida.

Muito obrigado!

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

Ao Prof. Dr. **Rogério Miranda Pagnoncelli**

Ao Prof. Dr. **Roberto Hubler**

*Pelo exemplo, dedicação à pesquisa e docência, amizade, confiança, oportunidades e estímulo constante, meu muito obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia, Prof. **Marcos Túlio Mazzini Carvalho**, pela busca pelo aperfeiçoamento científico dos alunos da Graduação e Pós-Graduação.

Ao Prof. **José Antônio Poli Figueiredo**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela excelência dos cursos de Pós-Graduação sob sua coordenação.

Aos docentes do Curso de Doutorado, em especial aos professores da área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial **Rogério Miranda Pagnoncelli, Claiton Heitz e Marília Gerhardt de Oliveira** pela dedicação e ensinamentos transmitidos.

Aos colegas do Curso de Doutorado em Odontologia **Renato Valiati, Danilo Ibrahim, Vladimir Dourado Poli e Letícia Kirst Post** pela amizade durante todo esse período intenso e difícil, porém gratificante.

Em especial, ao colega e amigo Dr. **Renato Valiati**, que acreditou em nosso trabalho e viabilizou um local para que fosse realizado o experimento de minha Tese, muito obrigado!

A todo o pessoal do Grupo de Estudos e Propriedades de Superfícies e Interfaces (GEPISI) do Centro de P&D em Física da Faculdade de Física da PUCRS, que sempre me receberam muito bem e por toda ajuda prestada. Em especial, agradeço a **Paula Veleza**, doutoranda de Física, cuja colaboração e parceria foi imprescindível à realização dessa Tese.

Ao centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da UDESC, e em especial ao Professor Doutor, **Aury Nunes Moraes**, por disponibilizar o CAV para a realização de nosso experimento e por sua ajuda e dedicação ímpar à pesquisa. Parabéns, é um exemplo a ser seguido!

Aos Doutores Professores **Claiton Heitz**, **Kléber Ricardo Monteiro Meyer**, **Vinícius Nery Viegas** e **Vladimir Dourado Poli** por suas valiosas colaborações à redação final deste trabalho.

Agradeço aos **amigos** que sempre estiveram por perto, com sua fundamental amizade. Oásis nessa vida corrida e cheia de obstáculos. Em especial gostaria de agradecer ao **Luis André Mendonça Mezzomo**, além da camaradagem, pelo auxílio no experimento da Tese.

*Acredite!*



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	16
<b>2 CAPÍTULOS</b> .....	31
2.1 CAPÍTULO 1: <i>“Recombinant human Growth Hormone (rhGH) in the osseointegration of dental implants - A literature review”</i> .....	32
2.2 CAPÍTULO 2: <i>“Recombinant human Growth Hormone (rhGH) accelerates the osseointegration of titanium implants in rabbit tibia”</i> .....	47
<b>3 DISCUSSÃO GERAL</b> .....	78
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>ANEXOS</b> .....	95
<b>ANEXO 1</b> .....	96
<b>ANEXO 2</b> .....	108
<b>ANEXO 3</b> .....	111
<b>ANEXO 4</b> .....	115



## ***RESUMO***

---

# HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NO PROCESSO DE OSSEOINTEGRAÇÃO DE IMPLANTES DE TITÂNIO - ESTUDO EXPERIMENTAL E REVISÃO DE LITERATURA

## RESUMO

Com o intuito de acelerar e melhorar a qualidade do processo de osseointegração, recentemente tem sido dado ênfase aos fatores de crescimento. Logo, foi objetivo dessa Tese avaliar o emprego do hormônio do crescimento (GH) na osseointegração de implantes de titânio. Esse trabalho é composto de dois artigos, o primeiro artigo é uma revisão de literatura sobre o emprego dos fatores de crescimento, e, em especial o GH, no processo de reparo do tecido ósseo. O segundo artigo é um estudo experimental no qual se avaliou o uso tópico do rhGH no processo de osseointegração de implantes de titânio nanotexturizados inseridos na tíbia de coelhos. Foram utilizados 14 animais divididos aleatoriamente em grupo teste e controle. No grupo teste foi aplicado 1 IU de rhGH no defeito cirúrgico imediatamente antes da colocação de cada implante. No grupo controle não foi aplicado o rhGH. Cada animal recebeu 2 implantes na tíbia esquerda. Os animais foram sacrificados em 14 e 42 dias depois da cirurgia. As regiões periimplantares foram submetidas à microscopia óptica (MO) de transmissão e de reflexão, e os implantes ao ensaio biomecânico de pull out e a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em todas as análises realizadas o grupo teste apresentou desempenho superior ao controle, principalmente aos 14 dias. Na MO aos 14 dias o grupo teste possuía características histológicas da fase proliferativa do reparo com acentuada neoformação óssea e também a formação de uma espécie de calo ósseo sobre a cortical óssea externa, e aos 42 dias o tecido ósseo possuía aspecto lamelar. O grupo controle aos 14 dias possuía ainda características da fase inflamatória e proliferativa com moderada neoformação óssea, e aos 42 dias o tecido ósseo neoformado ainda não possuía características lamelares. No ensaio de pull-out o grupo teste apresentou tensão de  $59,26 \text{ N/cm}^2$  e  $29,69 \text{ N/cm}^2$  aos 14 e 42 dias respectivamente, enquanto o grupo controle apresentou tensão de  $33,88 \text{ N/cm}^2$  e  $25,99 \text{ N/cm}^2$  aos 14 e 42 dias, respectivamente. Os implantes analisados no MEV demonstraram no grupo teste aos 14 dias maior quantidade de tecido ósseo aderido, porém aos 42 dias não se observaram diferenças entre os grupos. Os achados no experimento corroboram com a literatura, em que se observa que o rhGH aumenta a velocidade e quantidade de osso periimplantar neoformado, principalmente em estágios iniciais do reparo ósseo. Com base na revisão de literatura pesquisada e com os resultados do presente experimento, conclui-se que a aplicação tópica de rhGH na região periimplantar acelera o processo de neoformação óssea.

**Palavras Chave (termos *MeSH*):** hormônio do crescimento humano recombinante; implantes dentários; osseointegração; remodelamento ósseo, regeneração óssea.

**Palavras Chave (DeCS):** hormônio do crescimento; implantes; osseointegração; regeneração óssea; remodelação óssea.



***ABSTRACT***

---

## ***GROWTH HORMONE IN THE PROCESS OF OSSEOINTEGRATION OF TITANIUM IMPLANTS – AN EXPERIMENTAL STUDY AND REVIEW OF LITERATURE***

### ***ABSTRACT***

In order to accelerate and improve the quality of the osseointegration process has recently been given emphasis to growth factors. Thus, this thesis was aimed to evaluate the use of growth hormone (GH) on osseointegration of titanium implants. This thesis is composed of two papers, the first chapter is a review of literature on the use of growth factors, and, in particular GH in the process of bone repair. The second chapter is an experimental study to evaluate the topical use of rhGH in the osseointegration of nanotexturized titanium implants inserted in the tibia of rabbits. We used 14 animals randomly divided into rhGH-treated group and control group. In the rhGH-treated group was administered 1 IU of rhGH in surgical defect immediately before the placement of each implant. In the control group was not used rhGH. Each animal received two implants in the left tibia. The animals were sacrificed at 14 and 42 days after surgery. The peri-implant regions were evaluated by transmission and reflection on optical microscopy (OM), to pull out biomechanical testing of implants and scanning electron microscopy (SEM). In all analyzes the rhGH-treated groups showed better performance than the control groups, especially at 14 days. MO at 14 days in the rhGH-treated group have histological characteristics of proliferative repair phase with new bone formation and also marked cortical reaction from the endosteum and periosteum and at 42 days, the bone tissue has a lamellar appearance. The control group at 14 days also has characteristics of the inflammatory and moderate proliferative new bone formation, and with 42 days the new bone does not have lamellar characteristics. In the pull-out testing of the rhGH-treated group showed tension of 59.26N/cm<sup>2</sup> and 29.69 N/cm<sup>2</sup> at 14 and 42 days respectively. The control group showed tension of 33.88 N/cm<sup>2</sup> and 25.99 N/cm<sup>2</sup> respectively. The implants analyzed in the SEM showed in the rhGH-treated group at 14 days greater amount of bone attached, but at 42 days there were no differences between groups. The findings in this experiment corroborate the literature, which observed that rhGH increases the speed and amount of newly peri-implanted bone, especially in the early stages of bone repair. Thus, this thesis concludes that topical application of rhGH in the region peri-implant area induces new bone formation.

**Key Words (MeSH terms):** recombinant human growth hormone; dental implants; osseointegration; bone remodeling; bone regeneration.

**Key Words (DeCS):** growth hormone; implants; osseointegration; bone remodeling; bone regeneration.



## **1. INTRODUÇÃO GERAL**



Nos anos 60 do século XX, a partir dos estudos do pesquisador Branemark, a implantodontia contemporânea teve início, cujo principal alicerce foi a descoberta da propriedade do titânio comercialmente puro (cpTi) ou de ligas de titânio em conduzir o crescimento do tecido ósseo justaposto a ele, sem a interposição de tecido inflamatório crônico ou conjuntivo. Essa característica de interação do titânio com o tecido ósseo foi denominada de osseointegração (BRANEMARK *et al.*, 1977).

O tempo para que ocorra o processo de osseointegração varia de 1 a 6 meses, ou mais, e o sucesso clínico dos implantes é relacionado a um intervalo curto entre a cirurgia e a osseointegração. A velocidade e a qualidade da osseointegração têm sido relatadas às características de superfície dos implantes, como rugosidade, composição e hidrofília, além dos fatores locais e sistêmicos do hospedeiro. Assim, diversos pesquisadores e empresas têm investido em maneiras de dinamizar o processo de osseointegração, desenvolvendo implantes com variadas formas e tratamentos de superfície (BELSER *et al.*, 2004; LE GHÉHENNEC *et al.*, 2007; MORTON *et al.*, 2010).

Há estudos que comparam os implantes lisos aos com superfícies tratadas; e, em sua maioria, apontam para um menor tempo de cicatrização e um índice de sucesso a longo prazo melhor para os implantes com tratamento de superfície (BELSER *et al.*, 2004; LE GHÉHENNEC *et al.*, 2007; MORTON *et al.*, 2010).

Além das pesquisas que trabalham com as características de superfície dos implantes, há estudos que buscam interferir na fisiologia do processo de

reparo ósseo. Tem sido investigado o uso de diferentes proteínas endógenas, chamadas em grupo de Fatores de Crescimento (GFs – Growth Factors), as quais estão envolvidas no estímulo direto ou indireto das células osteogênicas (VARKEY *et al.*, 2004; SIMPSON *et al.*, 2006; TRAN *et al.*, 2009).

A utilização de recursos para acelerar e aumentar o grau de osseointegração estaria particularmente indicado a situações clínicas difíceis, onde o tecido ósseo tenha pouca qualidade e quantidade (LE GHÉHENNEC *et al.*, 2007).

Dentre os GFs, destaca-se o hormônio do crescimento (GH- growth hormone), que é um regulador fundamental do crescimento ósseo pós-natal e do remodelamento ósseo. Na infância e puberdade há um grande aumento na massa óssea via formação óssea endocondral. Observa-se ainda um gradual aumento na massa óssea até ocorrer o pico de massa óssea, em torno dos 20-30 anos de idade. Subsequentemente, a massa óssea vai diminuindo e de maneira acelerada nas mulheres após a menopausa. O remodelamento ósseo é regulado pelo balanço entre a reabsorção e a formação óssea. Nesse processo, o GH tem um papel fundamental. O GH exerce efeito sobre os osteoclastos e mais acentuadamente sobre os osteoblastos, criando a base teórica para o seu possível efeito de anabolismo no esqueleto (ERIKSEN *et al.*, 1996; OHLSSON *et al.*, 1998; VARKEY *et al.*, 2004; GUYTON, HALL, 2006; SIMPSON *et al.*, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008; TRAN *et al.*, 2009).

Nesse contexto, o GH, também chamado de hormônio somatotrópico ou somatotropina, quando aplicado diretamente na loja óssea ou na superfície de

implantes, poderia ter uma ação local parácrina osteoindutora, além de seu efeito endócrino ao ser absorvido pela circulação sistêmica. O GH é sintetizado e armazenado pela adenohipófise pelas células somatotróficas; é secretado no sistema circulatório sob estímulo do hormônio hipotalâmico de liberação de hormônio do crescimento (GHRH – Growth hormone release hormone) e se distribui sistemicamente no organismo. A inibição de sua liberação se dá pelo hormônio de inibição do hormônio do crescimento, também denominado somatostatina. A liberação de hormônios hipotalâmicos ativadores ou inibidores da hipófise se dá de modo pulsátil com a superposição de diversos ciclos, como o circadiano (GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

A produção e secreção do GH ocorre por feedback mediado pelos hormônios hipotalâmicos de estimulação e inibição, por fatores de crescimento, esteróides sexuais e condições nutricionais. Os principais reguladores são os hormônios hipotalâmicos: GHRH e somatostatina (OHLSSON *et al.*, 1998; 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 protéica, a multiplicação celular e diferenciação específica de certos tipos celulares como as células do crescimento ósseo e as células musculares imaturas (ERIKSEN *et al.*, 1996; OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

Seus efeitos dose-dependentes são mediados diretamente nas células via receptores transmembrana JAK2 ou indiretamente via um aumento da

síntese dos Fatores de Crescimento Semelhantes à Insulina 1 e 2 (IGF-I e IGF-2, insulin-like growth factor) produzidos principalmente pelo fígado (ERIKSEN *et al.*, 1996; OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008; MORENO *et al.*, 2009). Entretanto, ainda não está bem esclarecido o papel das IGF's no metabolismo ósseo. O GH 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, sendo esse hormônio também conhecido como o hormônio da velhice (OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

Estruturalmente o GH é um peptídeo hidrossolúvel que contém 191 aminoácidos em cadeia única, com peso molecular de 22.005 Kd e com meia-vida sérica de 20 minutos. É degradado por enzimas do sangue e demais tecidos; é rapidamente excretado pelos rins e fígado, permanecendo no sangue por um curto período de tempo (GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

O GH promove o aumento do catabolismo de ácidos graxos do tecido adiposo e de sua utilização como fonte energética em detrimento da utilização de glicose; assim esse hormônio aumenta a proteína corporal, utiliza as reservas de gordura e conserva carboidratos (GUYTON, HALL, 2006). No tecido ósseo, observa-se que a sua ação promove a deposição aumentada de proteínas pelos condrócitos e osteoblastos, aumento do número de mitoses e a conversão de condrócitos em osteoblastos (OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008; MORENO *et al.*, 2009).

Devido a limitações à obtenção de GH até os anos 80 do século passado, um limitado número de estudos com o hormônio foi realizado até a metade daquela década. Além disso, os estudos eram caracterizados pela não-homogeneidade do tratamento, diferentes fontes de GH e por grupos e número de animais insuficientes. Entretanto, 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) pela bactéria *Escherichia coli*, se tornou realidade. Logo, aumentou sobremaneira a oferta do GH, permitindo um significativo aumento no número e na qualidade das pesquisas o envolvendo (OHLSSON *et al.*, 1998; RASCHKE *et al.*, 2001; VARKEY *et al.*, 2004).

No princípio, o GH era somente utilizado no tratamento de crianças com retardo de crescimento por deficiência em sua secreção adenohipofisária, tendo seu uso aprovado pela U.S Food and Drug Administration (FDA). Atualmente, a FDA também aprovou seu uso para a reposição em adultos com deficiência de GH. A reposição de rhGH em adultos acarreta ganho de massa muscular e óssea, proporcionando melhora na capacidade física e conseqüentemente psíquica desses pacientes. Assim, o rhGH tem sido utilizado no tratamento da osteoporose, na caquexia associada à síndrome da imunodeficiência adquirida e em idosos, cuja secreção do GH é fisiologicamente reduzida (OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

A principal via de administração do rhGH é subcutânea, e a principal desvantagem é sua meia-vida curta e toxicidade renal (GARCÍA *et al.*, 2002).

Entretanto, tem se pesquisado outras vias de administração, como implantes de lâminas biodegradáveis e a aplicação tópica do pó liofilizado de rhGH (STEFANI *et al.*, 2000; GARCÍA *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010).

Apesar do conhecimento do efeito anabólico do GH no tecido ósseo, ainda poucos estudos têm investigado o efeito do rhGH no reparo de fraturas ósseas (NORTHMORE-BALL *et al.*, 1980; WITTBJER *et al.*, 1983; BAK, ANDREASSEN, 1991; DUBREUIL *et al.*, 1996; DARRYL *et al.*, 1998; RASCHKE *et al.*, 2001; BAIL *et al.*, 2002; BAIL *et al.*, 2002; ANDREASSEN, OXLUND, 2003; KOLBECK *et al.*, 2003; BAIL *et al.*, 2003) e no processo de osseointegração de implantes de titânio (LYNCH *et al.*, 1991; BECKER *et al.*, 1992; STEFANI *et al.*, 2000; STENPORT *et al.*, 2001; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; TAKECHI *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010).

Um dos primeiros estudos com rhGH no tratamento de defeitos ósseos foi conduzido em 1983 por Wittbjer *et al.*, o qual fez durante 14 dias a administração sistêmica por bomba de infusão do hormônio em coelhos submetidos a defeitos ósseos e enxertados com osso autógeno desmineralizado. Os animais foram sacrificados com 14 e 28 dias de pós-operatório. Não foi encontrada influência do rhGH na indução do reparo ósseo, provavelmente, conforme os autores, pela relativa falta de células osteogênicas viáveis no defeito ósseo.

Raschke et al., em 2001, avaliaram o efeito do GH homólogo recombinante de origem suína (r-pGH – recombinant porcine growth hormone) no processo de reparo de defeitos ósseos segmentares na tíbia de miniporcos adultos (12-17 meses). No grupo teste, o r-pGH foi infundido diariamente desde a cirurgia até o dia do sacrifício em 42 dias; procedeu-se o mesmo no grupo controle, onde foi infundido cloreto de sódio em detrimento do r-pGH. Os espécimes foram submetidos a tomografias computadorizadas quantitativas (qCT) para mensuração dos conteúdos mineral e da densidade óssea da tíbia. Observou-se um aumento da densidade óssea no grupo teste ( $p < 0.05$ ) e não houve diferença entre os grupos quanto ao conteúdo mineral. Em teste de mecânica óssea, foi observada carga de falha de torção 70% maior e de dureza a torção 83% maior no grupo teste ( $p < 0.05$ ). Para os autores, nesse modelo experimental, o r-pGH estimula o reparo ósseo, resultando em aumento mecânico da força e dureza do calo ósseo.

O mesmo grupo de pesquisas (RASCHKE *et al.*, 2001), em outros estudos (BAIL *et al.*, 2002; BAIL *et al.*, 2002; KOLBECK *et al.*, 2003; BAIL *et al.*, 2003) de reparo ósseo com o uso do r-pGH, demonstraram novamente resultados promissores. Em um trabalho com distração osteogênica, observaram que o r-pGH pode acelerar a regeneração do tecido ósseo neoformado, sem contudo alterar a microestrutura do calo ósseo (BAIL *et al.*, 2002). Em outro estudo, o reparo ósseo de fraturas estabilizadas por miniplacas obteve aumento na força e na dureza do tecido ósseo neoformado com o uso do r-pGH (KOLBECK *et al.*, 2003). Por fim, os autores analisaram o efeito do r-pGH na cicatrização de defeitos endocondrais. Para tal fizeram um

defeito na cartilagem femural de miniporcões. Observaram que o grupo tratado com hormônio teve maior formação de osso, cartilagem, tecido conjuntivo e do preenchimento do defeito em relação aos controles. Concluem que o r-pGH acelera a cicatrização de defeitos osteocondrais pelo estímulo à formação de osso e cartilagem (BAIL *et al.*, 2003).

Em 1991, Lynch *et al.* avaliaram o uso sistêmico de IGF-I associado ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) no processo de osseointegração de implantes de titânio em mandíbulas de cães. Os animais do grupo teste foram infundidos com o IGF-I e o PDGF no momento da cirurgia para a colocação dos implantes e sacrificados com 7 e 21 dias. Observaram em ambos os tempos, um significativo aumento na superfície de contato osso/implante e do preenchimento do espaço periimplantar no grupo teste em relação ao controle.

Observam-se novos estudos envolvendo implantes, GH e IGF-1, a partir de 2000 (STEFANI *et al.*, 2000; STENPORT *et al.*, 2001; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; TAKECHI *et al.*, 2008; MUÑOZ *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010).

Stefani *et al.*, em 2000, conduziram um estudo no qual, como Lynch *et al.*, em 1991, avaliaram o uso de IGF-I recombinante associado ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) na osseointegração de implantes de titânio em cães. A principal diferença entre os dois estudos concerne a forma de aplicação das substâncias, além da espécie animal utilizada. Lynch *et*



*al.*, em 1991 administraram IGF-1 em coelhos por via subcutânea; já Stefani *et al.*, em 2000 fizeram a aplicação tópica local no sítio ósseo de IGF-1 em cães, antes da colocação do implante, usando como veículo um gel de metilcelulose a 4%. Corroborando com Lynch *et al.*, em 1991, observaram um significativo aumento na superfície de contato osso/implante, do preenchimento do espaço periimplantar e maior impregnação de marcador de neoformação óssea no grupo teste em relação ao controle.

Stenport *et al.*, em 2001 avaliaram se a infusão sistêmica contínua de 0.3 IU/kg/dia do rhGH aumentaria a estabilidade inicial de implantes de titânio inseridos na tíbia de coelhos. Analisaram os resultados através do torque de remoção mecânica e a frequência de ressonância (RFA) dos implantes. Também foi observada a densidade mineral do tecido ósseo ao redor dos implantes através de exames radiográficos e histológicos. Os autores observaram diferença na estabilidade dos implantes com a técnica da RFA após 2 e 8 semanas, a favor do grupo teste. Nos demais testes não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos. Foram realizados exames de sangue nos animais, os quais demonstraram anticorpos ao rhGH a partir da quarta semana. Os autores concluem que o rhGH tem um efeito benéfico no período inicial do processo de osseointegração; entretanto, devido a formação dos anticorpos, esse estudo não conseguiu demonstrar se esse efeito permanece em um período mais prolongado.

Tresguerres *et al.*, em 2002, avaliaram se a administração tópica local de 1,2 mg (4 IU) de rhGH, colocado sob sua fração de pó liofilizado, diretamente no defeito cirúrgico criado para a colocação de implantes de titânio

na tíbia de coelhos com osteoporose, poderia induzir alterações quantitativas e qualitativas no tecido ósseo periimplantar. Os animais foram sacrificados com 14 dias de pós-operatório e secções de suas tíbias foram submetidas ao exame histológico para realização de densitometria e histomorfometria. Os autores observaram que houve um aumento da reação transcortical e na mineralização do tecido osteóide no grupo tratado com rhGH.

Esses autores (TRESGUERRES *et al.*, 2002) ainda relatam que a aplicação tópica do rhGH também influencia a formação do tecido ósseo periimplantar em coelhos jovens. Observaram aumento da neoformação de tecido ósseo periimplantar e do contato osso/implante nos grupos tratados com hormônio (TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005).

Moreno *et al.* em 2009 avaliaram o uso local do rhGH em cães. Nesse estudo 4 implantes (2 controles e 2 testes) foram colocados na mandíbula em zonas de pós-extrações dentárias. No grupo teste foi inserido 4IU (1,2 mg) de rhGH em cada osteotomia. Em 2 semanas de pós-operatório observaram que os implantes testes tiveram aumento significativo ( $P < .0001$ ) no perímetro de contato osso-implante (BIC), no perímetro ósseo total ( $P < .001$ ) e na neoformação óssea ( $P < .0001$ ) em relação aos implantes controle.

No mesmo ano, Munoz *et al.* 2009, fizeram a aplicação tópica de rhGH associado à melatonina no defeito ósseo confeccionado para instalação de implantes em cães. Observaram que aos 14 dias de pós-operatório o grupo que recebeu os GFs possuía o contato osso-implante, a neoformação óssea periimplantar e entre as roscas dos implantes, significativamente aumentada

em relação ao grupo controle. Entretanto, aos 35 e 56 dias de pós-operatório essa diferença não foi observada.

Calvo-guirado *et al.*, no ano seguinte, publicaram um estudo semelhante ao de Moreno *et al.*, em 2009, no qual avaliaram a osseointegração dos implantes nos cães com 35 e 56 dias de pós-operatório. Não observaram diferença no BIC, apesar de haver diferença estatística na neoformação óssea e de osso inter-roschas do implante em favor do grupo tratado com rhGH.

Observa-se pela literatura que o reparo do tecido ósseo vem sendo estudado há décadas. De maneira geral, os trabalhos investigam formas de acelerar e melhorar a qualidade do reparo desse tecido (NORTHMORE-BALL *et al.*, 1980; WITTBJER *et al.*, 1983; BAK, ANDREASSEN, 1991; LYNCH *et al.*, 1991; BECKER *et al.*, 1992; DUBREUIL *et al.*, 1996; ERIKSEN *et al.*, 1996; DARRYL *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 2000; RASCHKE *et al.*, 2001; STENPORT *et al.*, 2001; BAIL *et al.*, 2002; BAIL *et al.*, 2002; ANDREASSEN TT, OXLUND H., 2003; BAIL *et al.*, 2003; KOLBECK *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; VARKEY *et al.*, 2004; TRESGUERRES *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2006; LE GHÉHENNEC *et al.*, 2007; TAKECHI *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; TRAN *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010; MORTON *et al.*, 2010).

A implantodontia, que tem como parâmetro de sucesso a osseointegração, tem especial interesse em terapêuticas, técnicas cirúrgicas ou superfícies de implantes que possam dinamizar o reparo ósseo periimplantar

(BRANEMARK *et al.*, 1977; BELSER *et al.*, 2004; LE GHÉHENNEC *et al.*, 2007; MORTON *et al.*, 2010).

Há uma tendência atual na literatura em utilizar fatores de crescimento (GFs) para melhorar o reparo ósseo, tal quais as células progenitoras endoteliais, hormônio do crescimento, hormônio paratireiódico (PTH), melatonina, calcitonina e as proteínas morfogenéticas e osteogênicas (NORTHMORE-BALL *et al.*, 1980; WITTBJER *et al.*, 1983; BAK, ANDREASSEN, 1991; LYNCH *et al.*, 1991; BECKER *et al.*, 1992; ERIKSEN *et al.*, 1996; DUBREUIL *et al.*, 1996; DARRYL *et al.*, 1998; OHLSSON *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 2000; RASCHKE *et al.*, 2001; STENPORT *et al.*, 2001; BAIL *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2002; ANDREASSEN, OXLUND, 2003; BAIL *et al.*, 2003; OLBECK *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2003; VARKEY *et al.*, 2004; TRESGUERRES *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2006; TAKECHI *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010).

Com base na literatura (NORTHMORE-BALL *et al.*, 1980; WITTBJER *et al.*, 1983; BAK, ANDREASSEN, 1991; LYNCH *et al.*, 1991; BECKER *et al.*, 1992; DUBREUIL *et al.*, 1996; ERIKSEN *et al.*, 1996; DARRYL *et al.*, 1998; OHLSSON *et al.*, 1998; STEFANI *et al.*, 2000; RASCHKE *et al.*, 2001; STENPORT *et al.*, 2001; BAIL *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2002; BAIL *et al.*, 2003; ANDREASSEN, OXLUND, 2003; KOLBECK *et al.*, 2003; BAIL *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2003; VARKEY *et al.*, 2004; TRESGUERRES *et al.*, 2005; LAN *et al.*, 2006; SIMPSON *et al.*, 2006; TAKECHI *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-

GUIRADO *et al.*, 2010), que aponta crescente utilização de fatores de crescimento no reparo ósseo, foi objetivo desse trabalho investigar se a aplicação tópica de rhGH em lojas ósseas confeccionadas para instalação de implantes poderia interferir no processo de osseointegração.

Logo, essa Tese é composta de dois artigos: uma revisão de literatura e um trabalho experimental. As pesquisas realizadas no banco de dados da Medline que embasaram o modelo do experimento da Tese foram sintetizadas em forma de um artigo de revisão de literatura. Esse primeiro artigo é intitulado: *“Recombinant human Growth Hormone (rhGH) in the osseointegration of dental implants - A literature review”* e tem como objetivo situar o leitor no tema, e apontar como o rhGH vem sendo utilizado e que resultados essa terapêutica tem alcançado.

Na seqüência da Tese é apresentado um segundo artigo intitulado: *“Recombinant human Growth Hormone (rhGH) accelerates the osseointegration of nanotextured titanium implants in rabbit tibia”* no qual é descrito um estudo do tipo intervencional em coelhos, que avaliou o uso tópico do rhGH em diferentes estágios do período de osseointegração de implantes de titânio nanotexturizados.

Esse experimento foi realizado em parceria com o Laboratório de Materiais e Nanociências – Grupo de Estudos e Propriedades de Superfícies e Interfaces (GEPSI) do Centro de P&D em Física da Faculdade de Física da PUCRS, localizado no TECNOPUC. O GEPSI analisa e confecciona

superfícies de implantes de titânio, além de pesquisar e publicar trabalhos na área de osseointegração.

Também viabilizou essa pesquisa o trabalho conjunto com a Faculdade de Veterinária de Lages, através do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da UDESC, local em que foram realizadas as cirurgias, estada e eutanásia dos animais.

Foi utilizado nesse estudo o hormônio do crescimento humano recombinante (Saizen<sup>®</sup>, Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça), sob forma de pó liofilizado (frasco-ampola), cujo cada frasco-ampola contém 1,33 mg (4 UI) de rhGH e excipientes de manitol 20,0 mg, fosfato dissódico dihidratado 2,0-2,4 mg e fosfato monossódico monohidratado 0,30-0,40 mg, conforme informações presentes na bula do fabricante. O hormônio do crescimento Saizen<sup>®</sup> Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça, é um peptídeo de 191 aminoácidos idêntico ao GH (SOMATROPINA HUMANA RECOMBINANTE 4 UI, 2009).



## **2. CAPÍTULOS**

---



## **2.1 CAPÍTULO 1**

---



**Recombinant human Growth Hormone (rhGH) in the osseointegration of  
dental implants - A literature review**

**Marcelo Emir Requia Abreu\***

**Vinícius Nery Viegas\*\***

**Renato Valiati\*\***

**Roberto Hubler\*\*\*\***

**Rogério Miranda Pagnoncelli\*\***

\*Oral and Maxillofacial Surgeon.

\*\*Oral and Maxillofacial Surgeon. Associated Professor.

\*\*\*Physicist and Mechanical Engineer. Associated Professor.

**Keywords:** growth hormone; implants; osseointegration; bone remodeling; bone regeneration.

Address Correspondence:

To: Rogério Miranda Pagnoncelli

Catholic University of Rio Grande do Sul

School of Dentistry

Surgery Department

6681 Ipiranga Avenue

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone: +55 (51) 33313466

E-mail:marceloemir@uol.com.br

## **Abstract**

The modern age of oral implantology began in the 1960s with Brånemark's discovery of osseointegration—the ability of titanium to guide repair of bone tissues abutting its surface. Ever since, integrated titanium implants have been used as replacements for lost body tissues and as fixed anchorage points for prostheses. The field of dentistry has used osseointegration to replace lost dentition, allowing highly successful oral rehabilitation of edentulous patients. Several surgical techniques, implant shapes, and implant surfaces have been developed in an attempt to shorten the osseointegration period and increase the quality and quantity of bone–implant contact, providing long-term treatment with stability, predictability and ensuring patient comfort due to shorter treatment times. Development of the polymerase chain reaction (PCR) from the 1990s onwards made it possible to synthesize endogenous substances, including recombinant human growth hormone (rhGH). The main function of growth hormone (GH), which is produced throughout life in the anterior pituitary gland, is to regulate protein anabolism and fatty acid breakdown. In bone tissue, it promotes increased protein deposition by chondrocytes and osteoblasts, increased rates of mitosis and conversion of chondrocytes into osteoblasts increasing bone turnover. During the growth period, GH determines the ultimate height of an individual. The objective of this article is to conduct a review of the literature and demonstrate how recombinant human growth hormone (rhGH) can be used in oral implantology to optimize osseointegration of titanium implants.

**Keywords:** Recombinant growth hormone, implants, osseointegration, bone remodeling.

## **Introduction and Review oh the Literature**

The field of contemporary oral implantology was born in the late 1960s out of the studies of Per-Ingvar Brånemark, having as its cornerstone the landmark discovery that commercially pure titanium (cpTi) and titanium alloys can guide the growth of bone tissues juxtaposed onto it, with no intervening chronic inflammatory tissue or connective tissue. This characteristic interaction between titanium and bone tissue was termed osseointegration.<sup>(1)</sup>

The period of the osseointegration process varies, usually ranging from 1 to 6 months or more, and the clinical success of implantation correlates with shorter times between surgery and implant osseointegration.<sup>(2,3)</sup> The speed and quality of osseointegration have been associated with surface characteristics of the implant, such as roughness, chemical composition, and hydrophilicity. Several researchers and companies have therefore been investing in the development of implants with varied shapes and surface treatments in an attempt to speed the osseointegration process.<sup>(3-4)</sup>

In addition to studies on the surface characteristics of implants, research has also sought to interfere with cell differentiation during the bone healing process by inducing local release of endogenous cell signaling mediators or drugs into the extracellular matrix surrounding the implant.<sup>(5-10)</sup> These approaches are particularly indicated in difficult clinical pictures, when bone tissue quality and quantity is unsatisfactory.<sup>(3)</sup>

Growth hormone (GH, somatotropin) could be useful in this context, whether administered into the bone defect or onto the implant surface as a bone growth inducer or given as a systemic agent to boost bone tissue anabolism throughout the body. GH is an essential regulator of postnatal bone growth and agent of bone remodeling, which is regulated by the balance between bone resorption and formation. GH plays a key role in this process, acting on osteoclasts and, most prominently, osteoblasts. An overall anabolic effect on skeletal tissue is therefore theoretically possible.<sup>(8-12)</sup>

GH is synthesized, stored, and secreted by the anterior pituitary upon stimulation by the hypothalamic hormone GHRH (growth hormone-releasing hormone) and has several systemic effects, increasing intracellular metabolism and promoting cell growth and mitosis. These effects are mediated directly by membrane-bound GH receptors or indirectly by increased synthesis of insulin-like growth factor (IGF-I). GH secretion is a lifelong process that occurs mostly at night and decreases markedly after the age of sixty; hence, GH is also known as the aging hormone.<sup>(11-12)</sup>

The main metabolic effects of GH include increasing protein anabolism and lipolysis and decreasing uptake of glucose as a source of energy; it therefore has amino acid-sparing actions. GH acts on bone tissue to promote increased protein deposition by chondrocytes and osteoblasts and increase the rate of mitosis and conversion of chondrocytes into osteoblast<sup>(12)</sup>.

Due to the difficulty in obtaining GH before the 1980s, only a limited numbers of studies were carried out until the mid- 1990s; furthermore, treatment and control groups were rarely homogeneous, GH was obtained from different

sources and sample sizes and subject ages were insufficient. However, in the 1990s, the laboratory synthesis of recombinant human growth hormone (rhGH) by molecular biology techniques became a reality, and research involving GH increased significantly in quantity and quality alike. Early on, rhGH was administered to children with growth impairments due to GH secretion deficiency. The role of GH in adults is now well established; in several countries, adult GH deficiency patients undergo hormone replacement therapy with rhGH. GH replacement therapy in adults produces muscle and bone mass gains, improving the physical capacities and, consequently, the psychological condition of these patients. Recombinant human GH has also been quite widely used for hormone replacement in elderly patients with physiologically reduced GH output, in the treatment of osteoporosis, and in AIDS-related wasting.<sup>(11-14)</sup>

The actions of GH have been the subject of extensive debate seeking to clarify whether the hormone acts directly on tissues or whether its effects are mediated by a liver-derived growth factor. Two theories have been set forth in an attempt to explain the effects of GH: the older “somatomedin theory” and the more recent “dual effector theory”. The somatomedin theory proposes that GH, synthesized in the anterior pituitary, would mostly stimulate production of insulin-like growth factor (IGF-I, formerly known as somatomedin) in the liver and bone. This factor would then reach the systemic circulation and exert various metabolic effects. According to the dual effector theory, GH would induce differentiation of precursor cells into an IGF-I sensitive state. When exposed to IGF-I (released by the liver after GH stimulation), these immature

cells would proliferate and carry out their functions in the body. However, the role of IGF-I in bone metabolism is still controversial.<sup>(11-12)</sup>

The main route of administration of rhGH is by subcutaneous injection, and the main disadvantage is its short half-life and renal toxicity. Other routes have been tried, such as biodegradable laminar implant and lyophilized powder.<sup>(15)</sup>

Despite broad scientific knowledge of the metabolic effects of GH on bone tissue, few animal studies have investigated the effects of rhGH on fracture healing<sup>(6, 13-14, 16-20)</sup> and in the osseointegration of titanium implants.<sup>(2,8-10,21-25)</sup>

One of the first studies of rhGH in the treatment of bone defects was conducted in 1983 by Wittbjer *et al.*,<sup>(16)</sup> who administered a 14-day course of rhGH (produced by the hybrid DNA technique) to rabbits who had been subjected to bone defect creation and demineralized autogenous bone grafts. Animals were euthanized at 14 and 28 days, and no influence of rhGH on bone repair induction was detected. The authors believe this was likely due to a lack of viable osteogenic cells in the bone defect.

In 1991, Lynch *et al.*, assessed the effects of systemic administration of IGF-I and platelet-derived growth factor (PDGF) on the osseointegration of titanium implants to the dog mandible. Animals in the test group received IGF-I/PDGF infusions at the time of surgery and were euthanized after 7 and 21 days. Animals in both test subgroups showed significant increase in implant–bone contact surface and periimplant space fill when compared with those in the control group.

In 2001, Raschke *et al.*, assessed the effect of autologous recombinant porcine growth hormone (r-pGH) in the healing of segmental tibial defects in adult micropigs (aged 12-17 months). The test group comprised 12 animals who received daily r-pGH infusions from the time of surgery to euthanasia on postoperative day 42; the control group (also 12 animals) received similar infusions of saline solution. After euthanasia, all animals underwent quantitative CT scanning (qCT) for measurement of the mineral content and bone density of the tibia. Bone density was increased in the test group ( $p < 0.05$ ), with no between-group differences in mineral content. Bone mechanics testing showed a 70% higher torsional failure load and 83% higher torsional stiffness in the test group ( $p < 0.05$ ). Postoperatively, serum IGF-1 levels increased 382% from baseline in the test group and 69% in the control group ( $p < 0.001$ ). The authors believe that, in this experimental model, r-pGH had a stimulating effect on bone repair, producing increased mechanical strength and greater callus stiffness.

Following the same line of research, Raschke *et al.*<sup>(17)</sup> published further promising results for r-pGH use in bone defect repair.<sup>(13,18)</sup> In a micropig model of distraction osteogenesis, r-pGH was found to accelerate regeneration of new bone tissue without changing callus microstructure<sup>(18)</sup>. In the same model, bone repair of microplate-stabilized fractures was aided by r-pGH use, with increased strength and stiffness of new bone tissue.<sup>(13)</sup>

The local application effects of growth hormone on bone repair were investigated by Andreassen and Oxlund<sup>(19)</sup> in 2003. Rat growth hormone (rGH) was injected daily for 14 days onto the surfaces of intact tibia and healing tibial fractures in rats. Increased external bone was seen at the rGH-injected location

in the intact tibia group, with dose-dependent responses to rGH. In the healing fracture group, ultimate load, ultimate stiffness, external callus dimensions and external callus volume increased with rGH treatment.

Further studies of implant osseointegration, GH and IGF-1 were published from 2000 onwards.<sup>(2,8-10,22-25)</sup> In 2000, Stefani *et al.*<sup>(22)</sup> conducted a trial similar to the landmark 1991 Lynch *et al.* study,<sup>(21)</sup> assessing the use of recombinant IGF-I and platelet-derived growth factor (PDGF) in the osseointegration of titanium implants in dogs. The main difference between the two studies concerned route of administration: Lynch *et al.*<sup>(21)</sup> used subcutaneous infusion, whereas Stefani *et al.*<sup>(22)</sup> used local administration directly into the bone defect prior to implant placement, using 4% methylcellulose gel as a vehicle. Animals were euthanized at 3, 6, and 8 weeks postoperatively. As did Lynch *et al.*,<sup>(21)</sup> Stefani's group found a significant increase in implant–bone contact surface and periimplant space fill and greater impregnation of bone tissue with markers in the test group.

Stenport *et al.*<sup>(23)</sup> assessed whether continuous systemic infusion of rhGH at a dose of 0.3 IU/kg/day would improve the initial stability of titanium implants placed in the rabbit tibia. Removal torque and resonance frequency analysis (RFA) were used as markers of stability. Bone mineral density in the periimplant region was also assessed by radiographic and histological analysis. At 2 and 8 weeks, the authors found a difference in implant stability as measured by RFA in favor of the test group. No significant between-group differences were detected with the other tests. Blood testing showed development of anti-rhGH antibodies from the fourth week onwards. The



authors conclude that rhGH has a beneficial effect on the early stages of the osseointegration process; however, due to antibody formation, the study was unable to demonstrate whether this effect can remain over the long term.

Tresguerres *et al.*<sup>(8)</sup> assessed whether local administration of 1.2 mg (4 IU) rhGH as lyophilized powder directly into the surgical defect for titanium implant placement in the osteoporotic rabbit tibia could produce quantitative and qualitative changes in the periimplant bone tissue. Animals were euthanized 2 weeks postoperatively and tibial sections were examined by microscopic densitometry and morphometry. The authors found increased transcortical reaction and osteoid tissue mineralization in the test group.

Using the same methods, Tresguerres *et al.*<sup>(9-10)</sup> also assessed whether rhGH could influence bone tissue formation around titanium implants placed in the young rabbit tibia. In both studies, the authors found increased formation of new periimplant bone tissue and implant–bone contact in the test group.

In 2009, a group of Spanish researchers published two studies of mandibular implant healing in dogs after local administration of growth factors, one using GH alone<sup>(24)</sup> and the other testing a combination of GH and melatonin.<sup>25</sup> In the first study,<sup>(24)</sup> growth hormone-treated sites showed significant ( $p < 0.0001$ ) increases in the perimeter of bone in direct contact with treated implants, total periimplant area, and new bone formation in comparison with control implants on week 2. In the second study,<sup>(25)</sup> bone implant contact (BIC), periimplant bone area and interthread bone area were significantly higher in the test group than in the control group on week 2. At 5 and 8 weeks, BIC and bone density around implants were similar in both groups. In both studies,

the authors confirm that GH or melatonin plus GH enhance new bone formation around titanium implants in the early stages of healing.

## **Conclusions**

According to the available literature, GH administration appears to increase the quality and speed of bone healing, whether in fractures or around endosseous implants. There is a current trend in oral implantology toward local rather than systemic GH administration; results have thus far been encouraging, with decreased injury and a lower number of visits.

Studies have generally shown a bone formation-inducing effect of GH in the early stages of bone healing, whereas positive results have been more difficult to obtain in the later stages of healing. Two hypotheses may be inferred from these findings: one, that GH may only act in the earliest stages of bone healing; two, that anti-GH antibodies develop over time, as these studies<sup>(16,25)</sup> used hormones that were not analogs of the animals' endogenous GH.

If this therapy is to gain wide-scale use in human patients, further studies are required to ascertain the efficacy and risks of GH treatment as an adjunct for bone repair.

## **References**

1. Branemark PI, Hansson BO, Adell R, *et al.* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconst Surg.* 1977; II (suppl.): 16.

2. Lan J, Wang Z, Wang Y, Wang J, Cheng X. The effect of combination of recombinant human bone morphometric protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin – like growth factor – I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol.* 2006 Mar; 77 (3): 357-63.
3. Le Ghéhenec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface Treatment of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater.* 2007 Jul;23(7):844-54.
4. Belser UC, Schmid B, Higginbottom F, Buser D. Outcome analysis of implant restorations located in the anterior maxilla: a review of the recent literature. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2004; 19 (suppl):30-42.
5. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K *et al.* A comparison of PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol.* 1992; 63 (11): 929-40.
6. Darryl LM, Brent WE, Gregory DB, Hubner K, Archie M, Frances BC *et al.* Radiographic, densitometric, and biomechanical effects of recombinant canine somatotropin in an unstable ostectomy gap model of bone healing in dogs. *Veterinary Surgery.* 1998; 27: 85-93.
7. Takechi M, Tatehara S, Satamura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorfometric study. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19 (8): 2949-52.
8. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L,

- Alobera MA, Tresguerres JA. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Dec;13(6):631-6.
9. Tresguerres IF, Blanco L, Clement C, Tresguerres JA. 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.
  10. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Mar-Apr; 20 (2): 193-202.
  11. Eriksen EF, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Investig.* 1996; 26: 225-34.
  12. Ohlsson C, Bengtsson B, Isaksson OGO, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev.* 1998; (19) 1: 55-79.
  13. Kolbeck S, et al. Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone.* 2003; 33: 628-37.
  14. Raschke M, et al. Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. *Bone.* 2001; 29 (4): 368-73.
  15. García JT, Dorta JM, Munguía O, Llabrés M, Fariña JB. Biodegradable laminar implants for sustained release of recombinant human growth hormone. *Biomaterials.* 2002; 23: 4759-64
  16. Wittbjer J, Rholin M, Thorngren KG. Bone formation in desmeralized bone transplants treated with biosynthetic human growth hormone. *Scand J Plast*

- Reconstr Surg. 1983; 17 (2): 109-17.
17. Raschke MS et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*. 2001; 29 (4): 368-73.
  18. Bail HJ et al. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone*. 2002; 30 (1): 117-24.
  19. Andreassen TT, Oxlund H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int*. 2003 Sep; 73(3): 258-64.
  20. Tran GT, Pagkalos J, Tsiridis E, Narvani AA, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. Growth hormone: does it have a therapeutic role in fracture healing? *Expert Opin Investig Drugs*. 2009 Jul; 18(7):887-911.
  21. Lynch SE et al. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991; Nov; 62 (11): 710-6.
  22. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent*. 2000; 9 (2): 126-31.
  23. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Tornell 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.
  24. Moreno GG, Cutando A, Arana C, Worf CV, Guardia J, Muñoz F, Lopez-

Peña M, Stephenson J. The effects of growth hormone on the initial formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec; 24(6): 1068-73.

25. 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*. 2009 Sep 29. [epub ahead of print].



## **2.2 CAPÍTULO 2**

**Recombinant human Growth Hormone (rhGH) accelerates the  
osseointegration of titanium implants in rabbit tibia**

**Marcelo Emir Requia Abreu\***

**Luis André Mendonça Mezzomo\*\***

**Paula Veleda\*\*\***

**Aury Nunes Moraes \*\*\*\***

**Roberto Hubler\*\*\*\*\***

**Rogério Miranda Pagnoncelli\*\*\*\*\***

\* Oral and Maxillofacial Surgeon.

\*\* PhD in Dental Protheses.

\*\*\* Physicist.

\*\*\*\*PhD in Medicine Veterinary. Associated Professor.

\*\*\*\*\*Physicist and Mechanical Engineer. Associated Professor.

\*\*\*\*\* Oral and Maxillofacial Surgeon. Associated Professor.

**Key words:** growth hormone; implants; osseointegration; bone remodeling;  
bone regeneration.

Address Correspondence:

To: Rogério Miranda Pagnoncelli

Catholic University of Rio Grande do Sul

School of Dentistry

Surgery Department



6681 Ipiranga Avenue

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Telephone: +55 (51) 33313466

E-mail:marceloemir@uol.com.br

### **Abstract**

The purpose of this study was to determine whether recombinant human growth hormone (rhGH) would induce the osseointegration. Fourteen adult male rabbits received two nanotextured titanium implants in the tibia. In the rhGH- treated group a layer of 1 IU of rhGH was applied to each osteotomy. None was applied at the control animals. Animals were sacrificed at 14 and 42 days. In the histological and light microscopic evaluation at 14 days was observed in rhGH- treated group acceleration in bone repair and presence of a lamellar bone in periimplant area. At 42 days theres no difference in the new bone formation between the groups, but the rhGH-treated group had was at an advanced stage of bone remodeling. On SEM analysis at 14 days the rhGH-treated group showed a uniform and abundant bone tissue coating attached to the implants, and at 42 days, there were no differences between groups. The biomechanical testing had stress values: 59.26 N/cm<sup>2</sup> for the rhGH-treated group and 33.88 N/cm<sup>2</sup> for controls at 14 days; and 29.69 N/cm<sup>2</sup> for rhGH-treated animals and 25.99 N/cm<sup>2</sup> for controls at 42 days. These results show that the topically use of rhGH induce new bone formation in the early stages of healing.

## 1. Introduction

Rehabilitation of lost body structures has been successfully achieved with the use of bone-anchored implant-retained prostheses. The clinical success of this therapy has been related to the short period required for implant osseointegration and long-term stability. The speed and quality of osseointegration, however, have been associated with the surface characteristics of implants, host factors, such as quality of bone tissue of the recipient bed, and systemic factors, such as endocrine actions [1,2].

Some studies have sought to interfere in bone physiology through the use of growth factors (GFs), which are endogenous proteins capable of activating receptors on cell surfaces directly involved in the regeneration of bone tissue. GFs include growth hormone (GH), insulin-like growth factor (IGF-1 and -2), fibroblast growth factor (FGF-2), melatonin, parathyroid hormone (PTH), calcitonin, and morphogenetic and osteogenic proteins [3-6]. In oral implantology, GFs seem to be particularly suitable for difficult clinical situations, in which bone tissue is of poor quality and quantity [2].

GH is a water-soluble endogenous protein that acts as a regulator of postnatal bone growth and agent of bone remodeling. This hormone exerts its effects on osteoclasts and, most prominently, on osteoblasts. An overall anabolic effect on skeletal tissue is therefore theoretically possible [3-8].

GH is synthesized by the anterior pituitary and its secretion or inhibition is regulated by a feedback loop mediated by GFs, such as IGF-1, sex steroids and nutritional status. GH is distributed systemically from the anterior pituitary

throughout the body and is known to be degraded in the tissues and peripheral circulation. The hormone is then rapidly excreted by the kidneys and liver, remaining in the blood for a short period of time [7,8].

GH affects the functioning of most body cells, directly increasing intracellular metabolism and thus promoting whole-body growth. GH acts on protein synthesis, cell multiplication, and differentiation of certain specific cell types, such as bone-forming cells and immature muscle cells [7,8]. In bone tissue, GH promotes increased protein deposition by chondrocytes and osteoblasts, increased rate of mitosis and conversion of chondrocytes into osteoblasts [3-5,7,8].

GH effects are mediated directly by membrane-bound GH receptors of most body cells or indirectly by increased IGF-1 synthesis by the liver. The hormone is secreted in pulses, mostly at night. GH secretion is a lifelong process, with peak secretion during puberty and a marked decrease after the age of sixty [7,8].

In this context, GH has been used experimentally to stimulate bone healing, either by topical application in bone defects, aiming to obtain osteoinductive paracrine and/or autocrine effects, or by parenteral administration, aiming at its endocrine actions. However, few studies have investigated the effects of GH on the healing of bone fractures [5,9-13] and on the osseointegration process of titanium implants [14-23].

In 1991, Lynch et al. [14] assessed the effects of endocrine administration of a combination of IGF-1 and platelet-derived growth factor (PDGF) on the osseointegration process of titanium implants in the dog

mandible. The authors observed a significant increase in the implant surface in contact with new bone and peri-implant space filled with new bone in the treatment group compared to controls.

In 2001, Raschke et al. [10] assessed the endocrine effect of daily injections of homologous recombinant porcine growth hormone (r-pGH) in the healing of segmental bone defects in the tibia of adult micropigs. Bone density was increased in the treatment group ( $p < 0.05$ ), with no differences in mineral content between groups. Biomechanical testing showed a 70% higher torsional failure load and 83% higher torsional stiffness in the treatment group ( $p < 0.05$ ). The authors concluded that r-pGH stimulates bone repair, resulting in increased mechanical strength and stiffness of the callus. In other studies, the same authors observed that r-pGH used in distraction osteogenesis accelerates regeneration of new bone tissue without changing callus microstructure [11]. The authors also found that the hormone accelerates osteochondral defect healing by stimulating the formation of bone and chondral tissue [12] and that bone repair of microplate-stabilized fractures was aided by r-pGH use, with increased strength and stiffness of new bone tissue [13].

Stefani et al. [16] evaluated the effects of topical application of a combination of IGF-1 and PDGF on the osseointegration of titanium implants in dogs. The authors found a significant increase in the implant surface in contact with new bone and peri-implant space filled with new bone in the treatment group compared to controls.

In the study by Stenport et al. [17], implants were inserted in the tibia of rabbits, which received daily injections of recombinant human GH (rhGH). After

14 and 56 days of follow-up, resonance frequency analysis was performed and a difference in implant stability was detected in favor of the treatment group. No significant differences were detected with histological and radiographic measurements. Blood testing showed development of anti-rhGH antibodies after 28 days. The authors concluded that rhGH has a role in the early stages of the osseointegration process. However, due to antibody formation, the study failed to demonstrate whether this effect can remain in the long term.

Tresguerres et al. [18] assessed whether local administration of rhGH would induce quantitative and qualitative changes in the peri-implant bone tissue during the surgical placement of implants in the tibia of osteoporotic rabbits. After 14 days, the authors found increased periosteal and transcortical reaction and mineralization of osteoid in the treatment group. The same research group conducted similar studies in adults rabbits [19,20] and observed enhanced growth of the trabeculae from the periosteal tissue and significantly greater bone-to-implant contact in the rhGH-treated group ( $p < 0.05$ ) than in the control group.

Muñoz et al. [21] observed that a single topical application of rhGH and melatonin significantly increased bone-to-implant contact and the peri-implant bone area in dogs at 14 days, but at 35 and 56 days, the results for treatment and control groups showed no significant differences.

Gómez-Moreno et al. [22], in a study in dogs, found that GH-treated sites showed significant ( $p < 0.0001$ ) increases in the perimeter of bone that was in direct contact with implants, total peri-implant area, and new bone formation in comparison to control implants 14 days after treatment. The authors confirmed

that GH enhances new bone formation around titanium implants in the early stages of healing.

Calvo-Guirado et al. [23], using the same methods employed by Muñoz et al. [21], found no statistically significant differences in bone-to-implant contact between rhGH-treated sites and controls at 35 and 56 days after surgery. However, a statistically significant difference in newly formed bone and interthread bone was detected in favor of the rhGH-treated group.

The aim of this study was to evaluate the effects of topical application of rhGH on the osseointegration of nanotextured titanium implants in rabbits at 14 and 42 days following implant placement.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animal model and implantation**

Fourteen 10-week-old adult male New Zealand rabbits were used in this study. Animals were obtained commercially, fed a standard diet and given water *ad libitum*. All interventions were approved by the Animal Care and Use Committee and Research Ethics Committee of Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil (protocol no. 10/00165). The study was conducted under the supervision of the Veterinary Service of University of Santa Catarina State, Brazil (protocol no. 13810).

All animals were weighed before surgery. Mean body weight was 3.281 kg in the rhGH-treated group and 2.735 kg in the control group. Preanesthesia (4 mg/kg acepromazine and 0.2 mg/kg butorphanol, intramuscularly) was

administered before intravenous induction of anesthesia with 50 mg/kg ketamine and 0,5 mg/Kg diazepam. All animals received 20 mg/Kg of amoxicillin and 5 mg/kg of clavulanate as perioperative antibiotic prophylaxis.

After depth of anesthesia was confirmed, the left hind leg was shaved and infiltrated with 2% lidocaine with 1:150,000 epinephrine (DFL<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brazil) in the anterior aspect of the tibia to reduce intraoperative bleeding and prophylactic control of postoperative pain. Surgery was performed under aseptic conditions. A 3-cm skin incision was made over the anterior aspect of the tibia. Successive layers of muscle tissue were split until reaching the periosteum, which was incised and detached to expose bone tissue. Two bone defects (2.2 mm in diameter and 4 mm deep) were created in the tibia, 16 mm apart from each other. Bone defects were surgically created using a drill bit 2 mm in diameter (Colosso<sup>®</sup>, Itu, Brazil) rotated at 637 revolutions per minute (rpm) to break through the cortical bone. The hole was then enlarged to the planned diameter and depth by using a drill bit 2.2 mm in diameter (Straumann<sup>®</sup>, Basel, Switzerland). The region was irrigated with 0.9% saline solution throughout the drilling procedure.

The rabbits were randomly divided into two groups (control and rhGH-treated group) of seven animals each. Prior to implant placement, a layer of 1 IU (0.3 mg) of rhGH as a lyophilized powder (Saizen<sup>®</sup>, Serono Laboratories, Aubonne, Switzerland) was applied to each osteotomy site in the rhGH-treated group. None was applied at the control animals.

Each left tibia received two pure titanium cylindrical implants (2.2 mm in diameter and 6 mm in length) specially designed for this study, without screws

and tapered at the last millimeter of their apical portion. Implant surface had been roughened by means of atmospheric plasma-sprayed titanium porous coatings with particle size of 70-170 mesh; the process for implant surface preparation was previously described by Renz et al. [24]. Implants were inserted 4 mm intraosseously, leaving 2 mm above the bone to facilitate subsequent location and completion of biochemical testing.

After then wound closure by planes was performed using 6-0 mononylon nonabsorbable suture (Ethicon 6.0, Johnson & Johnson Co., USA). All animals were returned to their individual cages for a 7-day period in order to restrict postoperative movement of the implant. During the same period, to prevent infections, antibiotic (amoxicillin and clavulanate) was added to the water supplied to the animals. The animals also received oral ketoprofen (10 mg/kg) in the water for 3 days for postoperative analgesia. Animals were visited twice daily and surgical wounds were inspected daily throughout the study period. The skin sutures were removed at 10 days postoperatively.

## 2.2 Sacrifice and specimen preparation

Eight animals were sacrificed at 14 days (4 animals in control group A and 4 animals in rhGH-treated group B) and the others six animals at 42 days after surgery (3 animals in control group C and 3 animals in rhGH-treated group D) by intravenous administration of sodium thiopental, and circulatory arrest was induced with potassium chloride. Two animals were excluded from the study (one rhGH-treated animal and one control, both assessed at 14 days postoperatively) due to fractures in the implant zone, leaving 6 animals in each



group. Soft tissues were dissected from the tibiae, and the implants were removed together with the surrounding bone and fixed in 10% neutral buffered formalin.

### 2.3 Biomechanical testing and SEM

One implant from each group A, B, C and D was subjected to biomechanical testing (tensile pull-out test). The tibiae were embedded in unsaturated polyester resin (Resapol 10-249<sup>®</sup>, Reichhold Co., USA), keeping the extraosseous portion of the implant exposed. Specimens were then mounted on a material testing machine (EMIC DL-2000<sup>®</sup>, São José dos Pinhais, Brazil). The test consisted of measuring the mechanical strength required for extrusion of implants from the tibia. Measurements were made using a load cell of 500 N and a constant strain rate of 1 mm/min. Tensile load was applied until achieving a complete detachment of the implant from the bone. The stress-strain curve was recorded and the energy values were calculated based on this curve.

After these implants were detached from the tibia by the tensile pull-out test, bone tissue that remained attached the implants was subjected to qualitative analysis using a scanning electron microscope (SEM; Philips XL30 FEG-SEM<sup>®</sup>, Philips, Eindhoven, Netherlands). Implants were linearly arranged along their long axis and randomly placed into slots for image acquisition at a magnification of x50, x100, x200, and x500.

## 2.4 Histological evaluation

Four samples from each group were submitted for histological analysis of peri-implant tissue. Twelve implants were removed by decalcification of the tibia and four by the biomechanical testing carried out previously. The periimplant bones were then dehydrated in a graded series of alcohols, infiltrated and embedded in paraffin wax. Sections were cut parallel to the longitudinal axis of the periimplant site in latero-lateral direction, resulting in four sections per sample. Each section was ground down to an approximate thickness of 10  $\mu\text{m}$  and stained with hematoxylin-eosin (HE). Sections were observed under a light microscope (Olympus BX60<sup>®</sup>, Olympus Co, Japan) at a magnification of x20 to x60. A qualitative histological description of the peri-implant tissue was performed. All analyses were performed by the same investigator, who was blinded as to which group each sample belonged.

## 2.5 Reflection light microscopic evaluation

Two samples from each group (A, B, C and D) were dehydrated in a graded series of alcohols and then infiltrated and embedded in unsaturated polyester resin (Resapol 10-249). Sections were cut across the center of implants parallel to their longitudinal axis in latero-lateral direction. Specimens were then polished with ascending grades of sandpaper 80 to 2000 grit until the surface appeared flat and smooth. This technique of sample preparation for reflected light microscopy was able to preserve the mineral content of tissues and allowed a qualitative analysis of the bone-implant interface. The samples were observed under a light microscope at a magnification of x20 to x60 (Olympus BX60<sup>®</sup>).

### 3 Results

#### 3.1 Clinical data

The two animals excluded from the study after skin incision at the time of killing at 14 days postoperatively, had pus present in the fracture zone. In the rhGH-treated rabbit, a tumor-like fibro-osseous lesion covering both implants was observed, hindering the identification of implants and the origin of fracture. After dissecting the tissue, we could observe that the fracture had occurred at the distal implant, with large displacement of the fractured stumps. The fracture in the control animal was of the same origin, but there was only a slight displacement of the fracture line and little surrounding granulation tissue. All other rabbits appeared healthy throughout the experiment. In both groups, a slight increase in mean body weight was observed: from 3.281 kg preoperatively to 3.433 kg on the day of sacrifice in the rhGH-treated group and from 2.735 kg to 3.056 kg in the control group.

#### 3.2 Macroscopic analysis

Some macroscopic differences were observed between rhGH-treated and control samples obtained from tibiae assessed at 14 days postoperatively. The rhGH-treated specimens assessed 14 days postoperatively showed a type of cortical reaction of irregular appearance and distribution, with new bone growing along the supraosseous portion of implants and also along the lateral surface of the tibia (Figure 1). At 42 days, the callus had a regular appearance and it was difficult to distinguish native bone from new bone.

**Figura 1: Macroscopic view of two tibiae obtained from rabbits sacrificed at 14 days.**

**Figura 1(a): Control group A.**



**Source: research data.**

**Figura 1(b): rhGH-treated group B.**



**Source: research data.**

### 3.3 Biomechanical testing and SEM findings

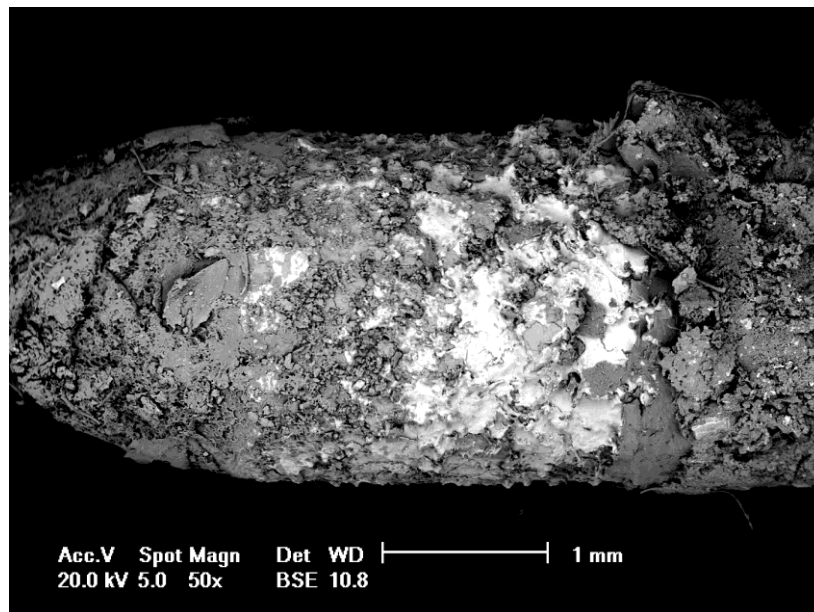
In both observation time points, the rhGH-treated group had stress values higher than the control group, as follows: 59.26 N/cm<sup>2</sup> for the rhGH-treated group and 33.88 N/cm<sup>2</sup> for controls at 14 days; and 29.69 N/cm<sup>2</sup> for

rhGH-treated animals and 25.99 N/cm<sup>2</sup> for controls at 42 days. Both groups showed higher values at 14 days postoperatively.

SEM analysis of the surface of implants revealed that, at 14 days postoperatively, the rhGH-treated group showed a uniform and abundant bone tissue coating attached to the implants, including their apical portion, achieving the intramedullary portion of the tibia (Figure 2). At 42 days, there were no significant differences between groups in relation to bone tissue adhering to the implant surface.

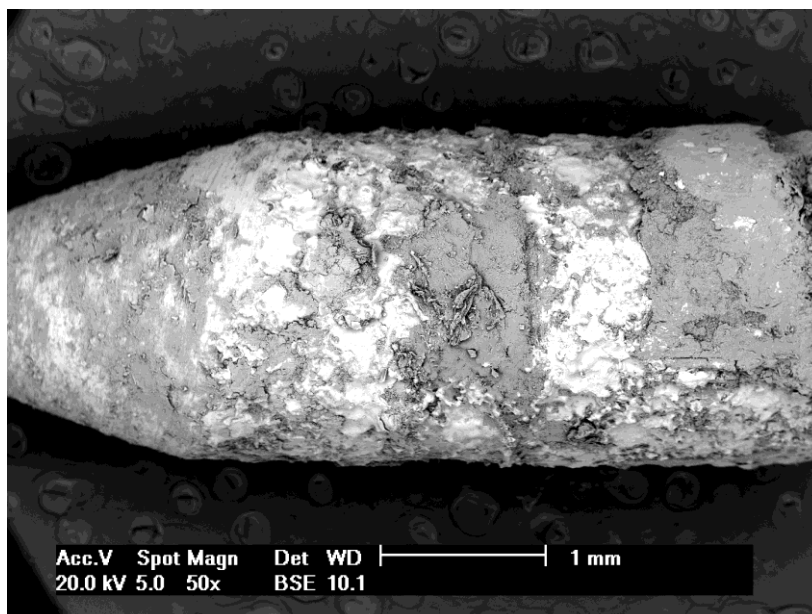
**Figura 2: Scanning electron microscopy at 14 days, the bright area corresponds to metal and the gray area to calcified tissue.**

**Figura 2(a): rhGH-treated group.**



Source: research data.

**Figura 2(b): Control Group.**



Source: research data.

### 3.4 Histological evaluation

Four samples from each group were stained with HE, but one rhGH-treated sample assessed 42 days postoperatively had processing problems and was excluded from the analysis. Qualitative results from histological analysis are described in Table 1.

**Table 1. Results from semi-qualitative histological analysis**

Groups	New bone formation	Neovascularization	Connective tissue
<i>14 postoperative days</i>			
Control group A (samples=4)	4+	9+	1+
rhGH-treated group B (samples=4)	11+	5+	1+
<i>42 postoperative days</i>			
Control group C (samples=4)	5+	5+	0
rhGH-treated group D (samples=3)	5+	3+	0

rhGH = recombinant human growth factor.

Qualitative values are represented by the sum of all values + obtained for each sample. The criteria used to evaluate slides individually were as follows: 0 absent, + mild, ++ moderate, +++ strong.

At 14 days, the rhGH-treated group showed histological features in the peri-implant region characteristic of the proliferative phase of healing, with marked new bone formation and moderate amount of blood capillaries, indicating that bone healing had achieved the remodeling phase. The control group, in turn, showed marked histological features of the proliferative phase, with intense neovascularization in the peri-implant region. At 42 days, both groups were in the process of peri-implant bone remodeling, a phase in which connective tissue is no longer observed. Although the rhGH-treated group had one less sample than the control group, there was little difference in the variables analyzed between groups. However, the rhGH-treated group, at 42 days, was at an advanced stage of bone remodeling. Since peri-implant bone tissue had already been largely remodeled, showing lamellar features, we can infer that there was a significant decrease in new bone formation compared to day 14, whereas neovascularization remained similar. At 42 days the control group showed lower neovascularization than at day 14. However, new bone formation remained similar, indicating that a great amount of tissue was still in the process of bone remodeling.

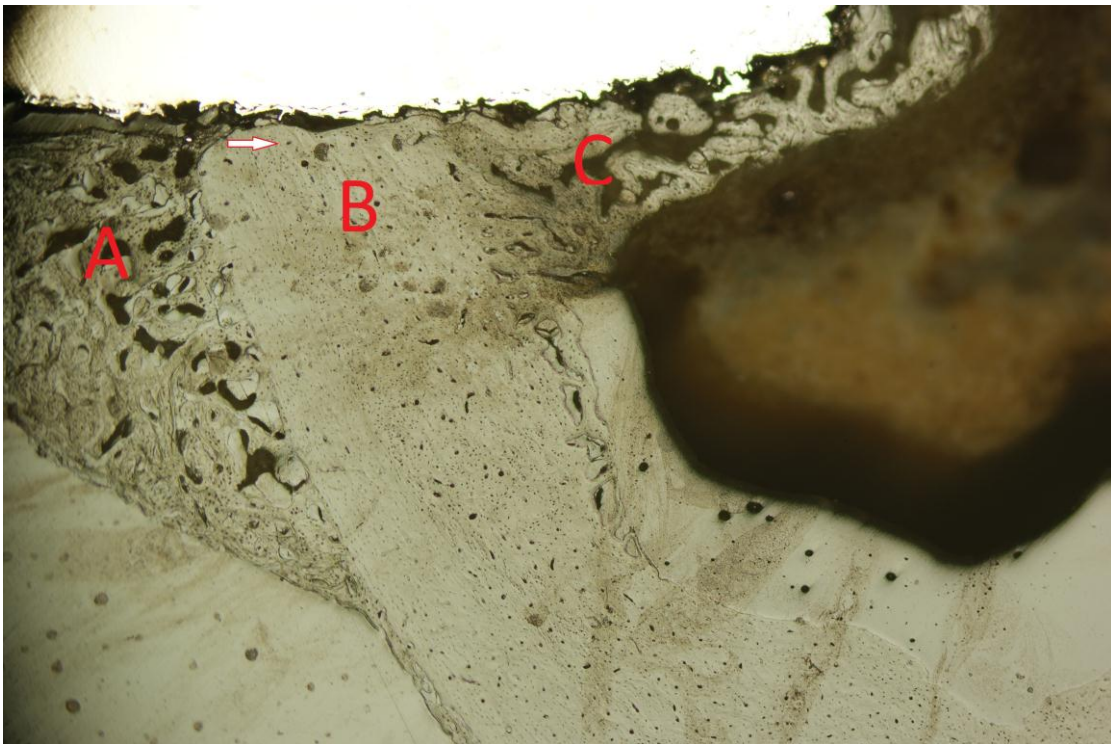
### 3.5 Reflected light microscopy

The analysis of samples embedded in polyester resin confirmed the histological findings. At 14 days, rhGH-treated implants showed newly formed bone with lamellar features in contact with the implant, in addition to significant intramedullary bone growth. Figure 3 shows the significant bone formation in the area above the cortical portion of the implant in the rhGH-treated group at

day 14, demonstrating the cortical reaction microscopically. At 14 days, the control group showed immature newly formed bone in contact with the implant and slight intramedullary bone formation (Figure 4).

**Figure 3: Reflection light microscopy of peri-implant bone area around a rhGH-treated implant at 14 days (original magnification X20).**

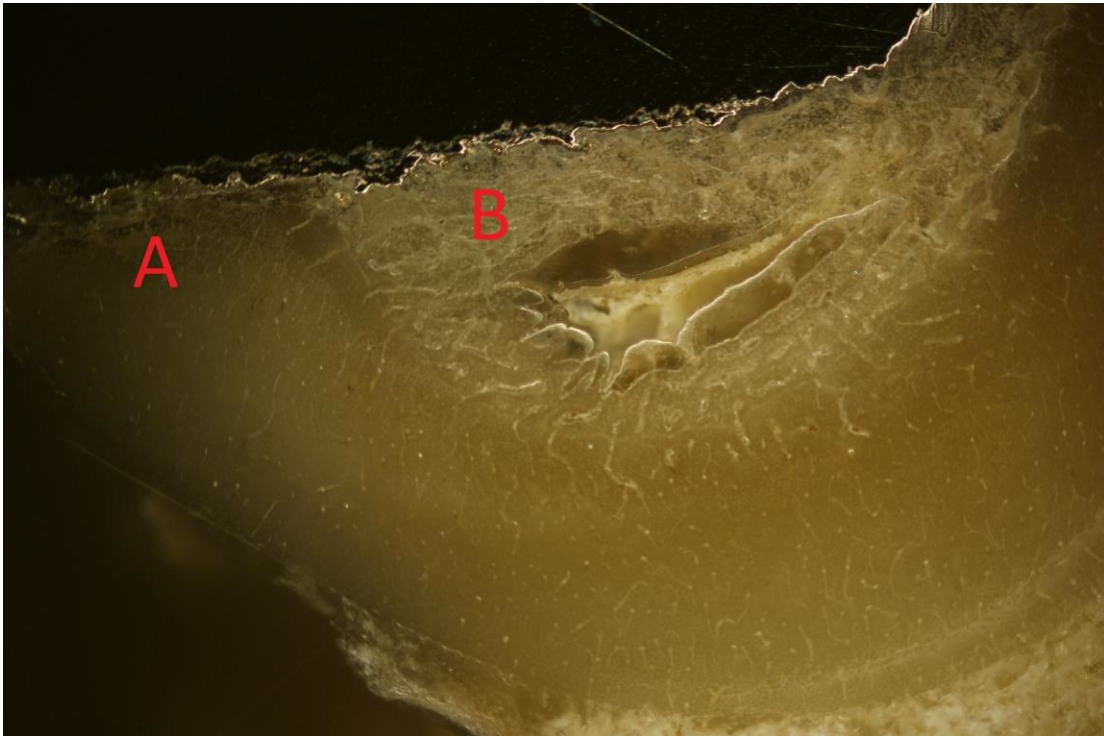
**Figure 3 (a):** Brightfield illumination, where (A) corresponds to cortical reaction, (B) to newly formed lamellar bone, (C) to bone marrow and the arrow indicates Haversian canal.



Source: research data.

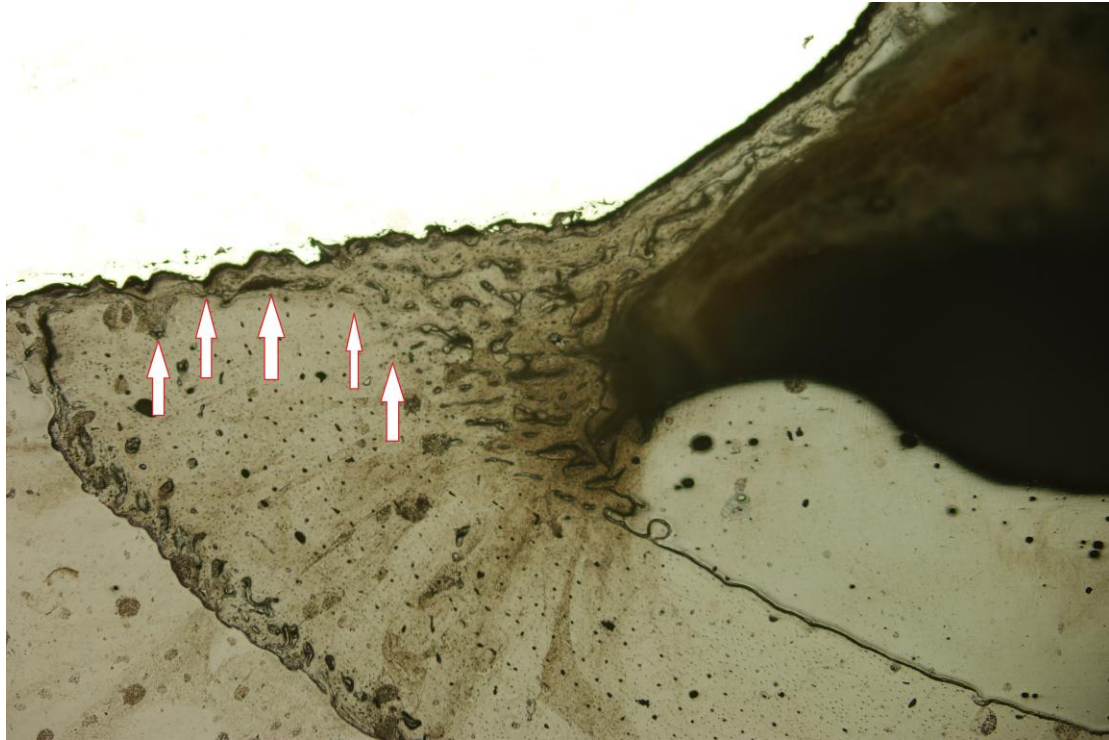


**Figura 3(b): Darkfield illumination, intimate bone-to-implant contact (A) and endosteal bone formation (B).**



Source: research data.

**Figure 4: Peri-implant bone area around a control implant at 14 days. Brightfield illumination, the arrows indicate the boundary between immature newly formed bone in contact with the implant and lamellar bone (original magnification X20).**

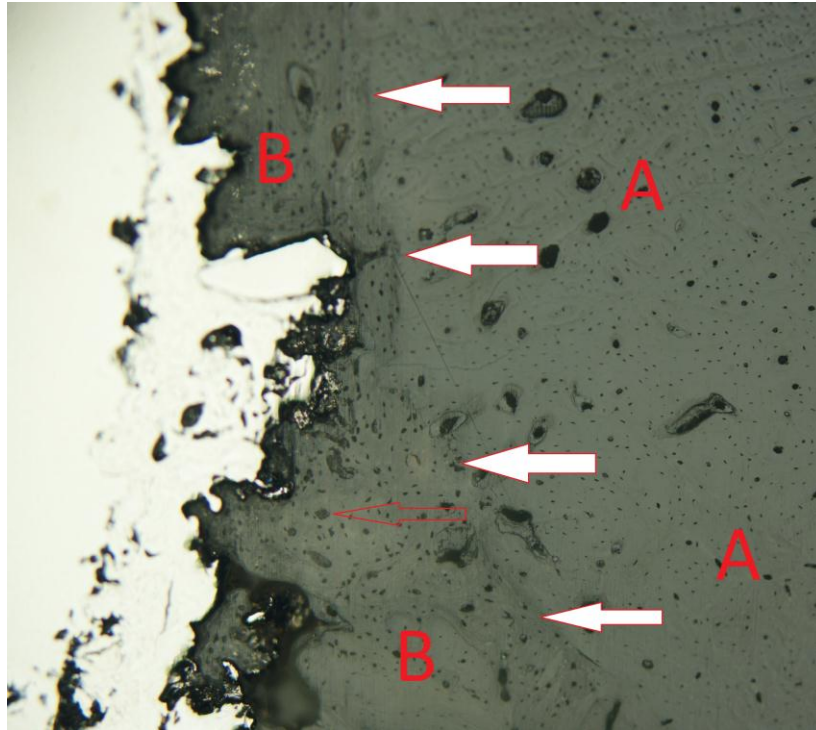


**Source: research data.**

At 42 days, the rhGH-treated group showed peri-implant bone tissue with characteristics of lamellar formation and intense bone-to-implant contact, growing into cavities in the implant surface. In the control group, the peri-implant zone still showed features of immature bone tissue and lower bone-to-implant contact than the rhGH-treated group (Figure 5).

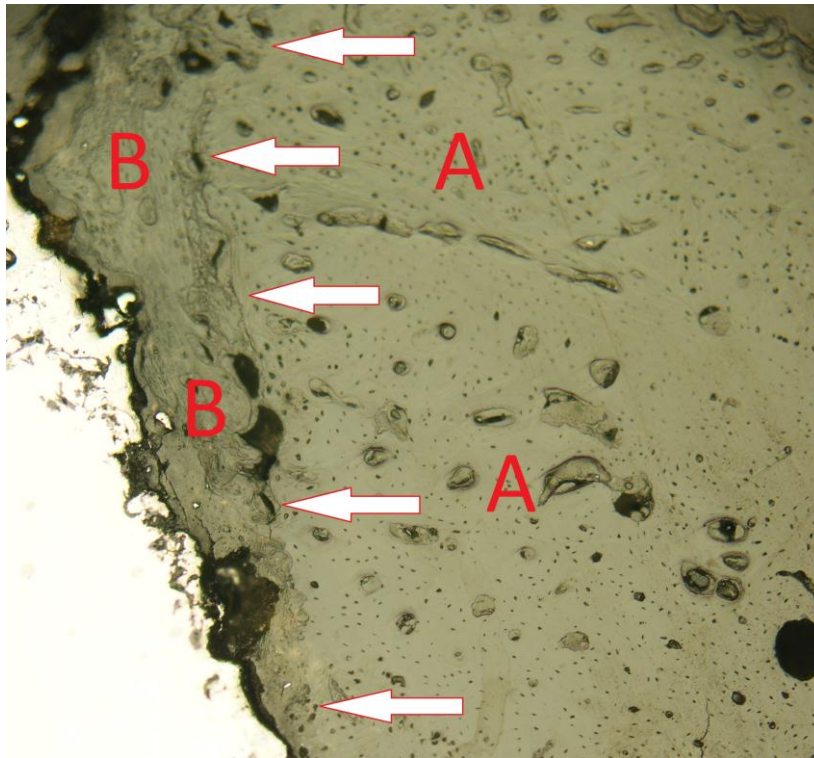
Figure 5: Light microscopy at 42 days (brightfield illumination and X40 magnification). (A) corresponds to original bone, (B) to newly formed bone, filled arrows indicate the boundary between original and newly formed bone, and hollow arrows indicate the Haversian system.

Figure 5(a): rhGH-treated group. Peri-implant area showing newly formed bone with lamellar features.



Source: research data.

**Figure 5(b): Control group. Peri-implant area showing maturing newly formed bone.**



**Source: research data.**

#### **4 Discussion**

In this study, the use of rhGH as an osteoinductive agent was successful. In all analyses performed, the rhGH-treated group had greater results compared to controls, especially at 14 days postoperatively. The ability of rhGH to stimulate bone formation in the early stages of healing has also been reported in the literature [17-22]. However, in later stages of bone healing, in general, no significant differences have been observed in implant osseointegration after a single topical application of rhGH [19,21,23].

Similar behavior was observed in our study. However, at 42 days, the histological analysis and reflected light microscopy of specimens embedded in resin revealed rhGH-treated samples with newly formed bone showing lamellar

features, whereas in controls the peri-implant tissue was still undergoing maturation. These observations coupled with less neovascularization noticed in the rhGH-treated group in both postoperative time points confirm that rhGH accelerates bone healing.

A possible explanation for a more significant effect of rhGH in the early stages of bone healing was suggested by Stenport et al. [17], who demonstrated antibody development after 4 weeks in rabbits treated with rhGH. Bail et al. [12] conducted a study with micropigs receiving a daily injection of homologous r-pGH, which prevented foreign body reaction, and found that stimulation of bone repair not only reached later stages of bone healing, but was also more significant at 42 than at 14 days postoperatively.

However, when a single topical application of rhGH is employed, rhGH effects last only from application to degradation, and the hormone is therefore unable to promote stimulation in the long term. This understanding explains the reason why this and other studies [19,21,23] that have employed a single topical application of rhGH could not observe an osteoinductive effect of rhGH in later stages of bone healing.

The literature reports that osteoinduction by rhGH accelerates bone tissue repair without changing the microstructural characteristics of the tissue [10,11,17]. These findings allow the safe use of rhGH in oral implantology without the risk of generating a little vascularized tissue prone to bone necrosis, a characteristic that has been associated with the use of bisphosphonates [25-27]. Owing to the specimen-embedding technique developed for this study, the preservation of the microstructural characteristics of the peri-implant bone

tissue could be clearly demonstrated. This technique preserved the inorganic matrix of bone and allowed the observation of tissue by the reflection light microscopy.

As observed by Tresguerres et al. [18-20], this study also showed that rhGH promoted increased periosteal and endosteal reactions, with new bone growing along the supraosseous portion of implants and significant new bone formation in the peri-implant intramedullary portion of the tibia. This effect is probably due to the osteoinductive capacity of rhGH, which acts on undifferentiated mesenchymal cells present in the periosteum and endosteum. This experiment documented both macroscopically and microscopically the transcortical reaction as a type of callus composed of immature bone tissue, which is present in the first two postoperative weeks and is later remodeled. Transcortical reaction may be clinically important, increasing initial implant stability and providing a better prognosis, especially in areas of poor bone quality and quantity.

Biomechanical testing revealed higher tensile strength of rhGH-treated implants at 14 days postoperatively. Such result may be due to transcortical and endosteal reactions observed in this group.

Of the two animals that had postoperative tibial fractures, the test animal showed a tumor-like fibro-osseous lesion around the fracture, but the same did not occur in the control animal. One may suggest that this overreaction of tissues surrounding the fractured region is due to rhGH, which acts not only on the bone tissue, but also on the fascia and muscle tissue overlying the tibia.

It remains to be established whether the mechanism of action of GH occurs directly by its local action on the tissue or its effect is mediated by IGF-1. Although the relative roles of GH and IGF-1 are controversial, they have had cooperative actions in several cases [7,8]. It has been recently accepted that GH may be secreted by various types of cells, including osteoblasts, and that this hormone has not only endocrine effects, but also autocrine and paracrine effects [20,23]. The results obtained in the present experiment, by topical application of rhGH, corroborate the potential local action of rhGH.

The endocrine secretion of GH occurs by hypothalamic hormone-mediated feedback loops, requiring prolonged and multifactorial stimulation [7]. However, a single topical application of rhGH into the bone defect prepared to receive the implant can stimulate bone repair, mainly by autocrine and paracrine actions [20-23]. RhGH activates local osteogenic cells, triggering intense and accelerated new bone formation, thus explaining the results observed in the present study.

Early new bone formation defines the quality of osseointegration and prognosis of implant treatment [2,3]. This study clearly demonstrated the ability of rhGH to accelerate new bone formation and maturation. Thus, rhGH is likely to be a useful adjuvant in oral implantology particularly to the treatment of patients with poor bone quantity and postmenopausal women or elderly people with low endogenous GH secretion.

Although GH is a physiological hormone, which has been widely used in therapy for many years, its misuse may cause deleterious effects to the patient, such as metabolic ketosis, hepatic steatosis, increased insulin resistance, and

acromegaly [3,7,8]. Therefore, clinical studies are needed so that the rhGH can be effectively used in oral implantology.

## **5 Conclusions**

In this study, the intraoperative topical use of rhGH induced peri-implant new bone formation without change the bone microstructure. Administration of rhGH accelerated and increased new bone formation in the early stages of bone healing. However, because this study employed a single topical application of rhGH, it remains unclear whether rhGH could maintain its osteoinductive effects or would be ineffective in later stages of bone healing. Studies involving slow and sustained release of rhGH into the bone defect are warranted to clarify this issue.

## **References**

1. Belser UC, Schmid B, Higginbottom F, Buser D. Outcome analysis of implant restorations located in the anterior maxilla: a review of the recent literature. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2004; 19 (suppl):30-42.
2. Le Ghéhenec L, Soueidan A, Layrolle P, Amouriq Y. Surface Treatment of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54.
3. Ohlsson C, Bengtsson B, Isaksson OGO, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocrinol Rev*. 1998; (19) 1: 55-79.



4. Eriksen EF, Kassem M, Langdahl B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Investig.* 1996; 26: 252-34.
5. Simpson AH, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br.* 2006 Jun; 88 (6): 701-5.
6. Takechi M, Tatehara S, Satamura K, Fujisawa K, Nagayama M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorfometric study. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19 (8): 2949-52.
7. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physilogy.* 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2006.
8. Goldman L, Ausiello D. *Cecil Medicine.* 23 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.
9. Darryl LM, Brent WE, Gregory DB, Hubner K, Archie M, Frances BC et al. Radiographic, densitometric, and biomechanical effects of recombinant canine somatotropin in an unstable ostectomy gap model of bone healing in dogs. *Veterinary Surgery.* 1998; 27: 85-93.
10. Raschke M, Kolbeck S, Bail HJ, Schmidmaier G, Flyvbjerg A, Lindner T, Dahne M, Roenne, Haas P. Homologous growth hormone accelerates healing on segmental bone defects. *Bone.* 2001; 29 (4): 368-73.
11. Bail HJ, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A, Raun K, Mosekilde LI, Haas P. Recombinant species-specific growth

hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone*. 2002; 30 (1): 117-24.

12. Bail H, Klein P, Kolbeck S, Krummrey G, Weiler A, Schmidmaier G, Haas NP, Raschke MJ. Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of osteochondral defects – a preliminary study in micropigs. *Bone*. 2003; 32: 457-67.
13. Kolbeck S, Bail H, Schmidmaier G, Alquiza M, Raun K, Kappelgard A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke MJ. Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone*. 2003; 33: 628-37.
14. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox CH, Williams RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991; Nov; 62 (11): 710-6.
15. Becker W, Lynch SE, Lekholm U, Becker BE, Caffesse R, Donath K et al. A comparison of PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol*. 1992; 63 (11): 929-40.
16. Stefani CM, Machado MA, Sallum EA, Sallum AW, Toledo S, Nociti FH Jr. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1 combination and

bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent.* 2000; 9 (2): 126-31.

17. Stenport VF, Olsson B, Morberg P, Tornell 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.
18. Tresguerres IF, Clemente C, Donado M, Gómez-Pellico L, Blanco L, Alobera MA, Tresguerres JA. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Dec;13(6):631-6.
19. Tresguerres IF, Alobera MA, Baca R, Tresguerres JA. Histologic, morphometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Mar-Apr; 20 (2): 193-202.
20. Tresguerres IF, Blanco L, Clement C, Tresguerres JA. 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.
21. 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.* 2009 Sep 29. [epub ahead of print].

22. Moreno GG, Cutando A, Arana C, Worf CV, Guardia J, Munoz F, Peña ML, Stephenson J. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec; 24 (6): 1068-73.
23. 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 - *Clin Oral Impl Res*. Xx, 2010; 000-000. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02007.x
24. Renz RP, Cunha A, Wantowski G; Blando E,Hubler R. Osseointegration evaluation of treated surfaces of titanium implants applying tensile pull out test. *J Dent Clin Research*. 2007; 3:149-57.
25. Atalay B, Yalcin S, Emes Y, Aktas I, Aybar B, Issever H, Mandel NM, Cetin O, Oncu B. Bisphosphonate-related osteonecrosis: laser-assisted surgical treatment or conventional surgery? *Lasers Med Sci*. 2011 Aug 2. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21809068.
26. Urade M, Tanaka N, Furusawa K, Shimada J, Shibata T, Kirita T, Yamamoto T, Ikebe T, Kitagawa Y, Fukuta J. Nationwide Survey for Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Jul 21. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21782307.

27. Brock G, Barker K, Butterworth CJ, Rogers S. Practical considerations for treatment of patients taking bisphosphonate medications: an update. Dent Update. 2011 Jun; 38(5):313 -8.



### ***3. DISCUSSÃO GERAL***

---

A capacidade de cicatrização do tecido ósseo sofre um conhecido decréscimo com a idade. Muitos mecanismos têm sido identificados que podem explicar esse fenômeno, sendo um deles a reduzida secreção endógena de GH. O reparo ósseo é um processo altamente ordenado e complexo, que é regulado por hormônios, fatores de crescimento sistêmicos e locais, em que o hormônio do crescimento tem um papel chave (ERIKSEN *et al.*, 1996; OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

A idéia inicial para o presente experimento veio de uma demanda clínica, em que um curto intervalo entre a cirurgia de instalação do implante e sua adequada osseointegração é motivo de satisfação tanto do clínico quanto do paciente. Implica em menores custos e numa maior predictividade do tratamento. Logo, o GH em função de seu papel fundamental no desenvolvimento e manutenção do tecido ósseo no período pós-natal foi lembrado como um possível fator capaz de dinamizar o processo de osseointegração de implantes de titânio.

Em relação aos outros GFs, o GH apresenta inúmeras vantagens. Destacamos que se trata de um hormônio naturalmente presente no organismo humano, logo, não possui contra-indicações ao seu uso. Há na literatura (OHLSSON *et al.*, 1998; RASCHKE *et al.*, 2001) relatos de seu emprego terapêutico em humanos com distúrbios do crescimento desde o início do século XX. Atualmente, o rhGH é sintetizado em laboratórios, nacionais inclusive, tendo assim o acesso a droga facilitado e os custos muito menores do que os outros GFs.

A utilização de implantes de titânio na reposição dental é frequentemente

utilizada em pacientes idosos, os quais têm fisiologicamente reduzida a secreção endógena do GH. Assim, a administração local do rhGH pode favorecer a osseointegração e ser utilizada nesse grupo de pacientes para aumentar a chances de sucesso da terapêutica reabilitadora dental com implantes.

Tal qual é relatado na literatura, (BAIL *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005)

no presente experimento os animais do grupo teste de 14 dias, tiveram neoformação óssea na tábua externa da tíbia. Em adultos essa reação cortical é vista em tumores produtores de GH ou no uso exagerado de reposição hormonal com o rhGH e caracteriza a acromegalia. Entretanto, o uso tópico e único do rhGH, faz com que essa neoformação óssea na cortical externa ocorra somente no período inicial do reparo ósseo, aumentando a estabilidade inicial dos implantes, o que pode ser um efeito desejável dessa terapêutica.

Desde os anos 50 do século XX, o GH é utilizado como adjuvante no processo de reparo de fraturas ósseas (STENPORT *et al.*, 2001). Na grande maioria dos trabalhos o rhGH é administrado diariamente por via subcutânea, obtendo-se, em geral, resultados satisfatórios na aceleração e qualidade do reparo ósseo.

A partir da síntese laboratorial do rhGH nos anos 90 do último século, tornou-se possível outras formas de administração do fármaco (LAN *et al.*, 2006). O rhGH tem sua porção ativa fracionada em forma de pó, o que possibilita seu emprego tópico, diferentemente dos trabalhos anteriores aos anos 90, nos quais o GH era retirado como solução da adenohipófise de



doadores, e só podia ser utilizado de forma subcutânea – sua administração via oral não é possível por ser um peptídeo grande e não absorvido pelo trato gastro-intestinal. Em nosso experimento, observamos que a aplicação local da fração liofilizada do rhGH é de fácil execução e que o mesmo parece ser sugada para dentro do defeito ósseo.

Em nosso experimento, optamos pela administração tópica e única do rhGH no defeito ósseo cirúrgico previamente a instalação do implante. Essa forma de administração foi observada na literatura (TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010) e escolhida pensando-se em sua futura aplicabilidade clínica, sendo ela prática e confortável. Infiltrações diárias do fármaco podem ser desagradáveis, dispendiosas e desencorajar o paciente a aderir a essa terapêutica. Assim, a aplicação única e local do rhGH no momento da cirurgia nos faz acreditar que irá possibilitar uma aceitação maior por parte dos pacientes.

A aplicação tópica no local da cirurgia também apresenta a vantagem de fazer com que todo o fármaco atinja o tecido periimplantar em alta concentração sérica. Porém, ele é logo absorvido pela circulação sistêmica e rapidamente degradado [7-8], permanecendo por um curto período de tempo na região periimplantar. Logo, justifica-se uma possível causa para o rhGH ter sido bastante efetivo nos estágios iniciais do reparo ósseo periimplantar nesse experimento. Dessa forma, seria importante o desenvolvimento de um veículo ou superfície de implante para aplicação do rhGH, que fizesse sua liberação

lenta no leito cirúrgico, proporcionado assim um efeito mais duradouro da terapêutica.

Definida a via de administração, foi pesquisada a dose a ser utilizada e o modelo animal a ser escolhido. Optou-se pelo uso de coelhos por haver trabalhos na literatura em que o rhGH havia sido utilizado nesse animal (TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010) e também por termos a disponibilidade de realizar o experimento em um biotério que trabalha com essa espécie com frequência. Também se observou na literatura trabalhos com o rhGH em cães, porém a menor disponibilidade e o custo desse animal para pesquisa em nosso meio, fez com que ele ficasse em segunda opção.

Há também trabalhos com miniporcosp e ratos. Nesses experimentos são utilizados hormônios análogos aos endógenos produzidos por esses animais. Se optássemos por esses modelos animais, teríamos a vantagem de não gerar resposta imunológica adaptativa tipo corpo-estranho ao hormônio. Porém, como em nosso trabalho fizemos a aplicação de uma única dose de hormônio no animal, a resposta imunológica adaptativa que possa vir a ter sido formada, não se fez em tempo de interferir e de acelerar a eliminação do rhGH pelas rotas usuais de degradação endógenas. Trabalhar com esses modelos animais iria gerar um maior custo e dificuldade de obtenção do hormônio, sem, contudo, interferir nos resultados finais, logo não teria vantagens sobre o modelo animal que utilizamos em nosso estudo.

A dose empregada no experimento foi de 1UI do pó liofilizado de rhGH em cada loja óssea. E a mesma foi obtida através de testes pilotos, que em

função das dimensões dos alvéolos planejados à esse estudo, se observou não ser possível a introdução das doses de 4UI de rhGH que a literatura relata utilizar (TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005; MORENO *et al.*, 2009; MUÑOZ *et al.*, 2009; CALVO-GUIRADO *et al.*, 2010) dentro das lojas ósseas com a mesma dimensão que utilizamos no presente experimento (2.2 mm de diâmetro e 4mm de profundidade).

Entretanto, mesmo utilizando doses inferiores as dos demais trabalhos, também obtivemos resultados satisfatórios com o uso do rhGH em nosso experimento. Questiona-se nesse momento, se efetivamente é necessário o uso de doses mais elevadas de GH para haver osteoindução no leito cirúrgico periimplantar. Também é possível que as características nanométricas da superfície do implante utilizado em nosso experimento, possam ter retido por mais tempo o rhGH no leito cirúrgico, proporcionando um maior estímulo ao tecido ósseo quando comparado a implantes de superfície não nanométricas utilizados nos demais experimentos.

Na literatura, o período de eutanásia de coelhos submetidos a estudos de osseointegração mediados por GFs varia entre 14 e 56 dias (STENPORT *et al.*, 2001; TRESGUERRES *et al.*, 2002; TRESGUERRES *et al.*, 2003; TRESGUERRES *et al.*, 2005). No presente experimento fizemos o sacrifício dos animais com 14 e 42 dias de pós-operatório. Foi objetivo analisar aos 14 dias a capacidade do rhGH em induzir o reparo ósseo primário, o qual é importante para o sucesso inicial de implantes dentários, e aos 42 dias analisar se esse efeito permanecia em longo prazo.

A escolha por coelhos machos se deveu a dois fatores, o primeiro foi a menor variação hormonal que os machos têm em relação às fêmeas; a segunda razão foi uniformizar o grupo, em que os animais sendo todos do mesmo sexo sofrem a mesma ação hormonal.

As fêmeas, em função do ciclo ovariano, sofrem a variações hormonais importantes ao longo de seu período fértil, envolvendo hormônios sexuais esteróides que interferem no metabolismo ósseo, como os estrógenos (OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008). Essa variação na secreção do estrógeno poderia influenciar o reparo dos implantes entre uma fêmea e outra, dependendo do estágio do ciclo ovariano que o animal estaria durante o experimento, e também através das variações das características do ciclo de cada fêmea. A escolha por coelhos machos minimiza esse tipo de viés.

O GH é secretado em níveis crescentes a partir da infância tendo seu pico de secreção na adolescência, vindo a se estabilizar na idade adulta e voltar a variar na velhice, quando começa a decair gradativamente (OHLSSON *et al.*, 1998; GUYTON, HALL, 2006; GOLDMAN, AUSIELLO, 2008). A escolha por coelhos adultos no experimento teve como objetivo trabalhar com animais cuja secreção do GH estivesse estável.

Apesar dos benefícios apontados pela literatura revisada e comprovados em nosso experimento, o uso descontrolado e excessivo do GH pode proporcionar efeitos colaterais. Ele pode mobilizar uma quantidade pronunciada de gordura dos tecidos, aumentando os ácidos graxos livres no sangue, gerando cetose metabólica aguda e esteatose hepática em longo prazo. O GH também

diminui a utilização de carboidratos pelo organismo, através da redução da captação de glicose pelos tecidos, aumento da produção de glicose pelo fígado e aumento da secreção de insulina. Cada uma dessas ações gera resistência à insulina semelhante ao Diabetes Mellitus tipo II e resulta em um aumento da glicemia corporal e aumento compensatório da secreção de insulina, caracterizando o efeito diabetogênico do excesso de GH [10-11,20].

Outro problema relacionado ao excesso de GH, observado principalmente em tumores secretores de GH, seria a acromegalia em adultos e gigantismo nas crianças antes dessas fecharem suas epífises. As características mais notáveis da acromegalia envolvem a face, as mãos e os pés. Na face geram um aumento de estruturas como o nariz, lábios e a mandíbula, causando prognatismo. As alterações da cavidade bucal incluem má-oclusão, diastemas e macroglossias. O tratamento farmacológico da acromegalia inclui agonistas da dopamina como a cabergolina e mais efetivamente os análogos da somostatina como a octreodina, os quais reduzem os níveis de GH e IGF-1 em quase todos os pacientes (GOLDMAN, AUSIELLO, 2008).

Logo o uso do rhGH deve ser realizada com parcimônia, sempre ponderando os riscos e os benefícios da terapêutica.

Nesse momento, fica clara mais uma vantagem da aplicação tópica do rhGH em relação a via sistêmica. A aplicação subcutânea do fármaco acarreta em sua distribuição em todo o sistema. Já a aplicação tópica do fármaco possibilita uma maior biodisponibilidade do mesmo no local da instação do implante, diminuindo a dose necessária para que se atinja no tecido-alvo a

concentração terapêutica do fármaco.

O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) e material intercelular calcificado, a matriz óssea. A presença de matriz inorgânica torna o tecido ósseo difícil de ser cortado no micrótomo. Por isso, técnicas especiais são utilizadas ao seu estudo (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2008). Em nosso experimento utilizamos duas técnicas para analisar as amostras na microscopia óptica: emblocamento do tecido ósseo liofilizado em resina e a histologia convencional.

A técnica de emblocamento do osso liofilizado em resina e seu desgaste em fatias finas foi especialmente desenvolvida pelo pesquisador Roberto Hubler para esse experimento. Essa técnica permite o minucioso estudo da matriz óssea inorgânica em microscopia óptica, entretanto, não preserva as células. Já a histologia convencional permitiu o estudo das células e da matriz orgânica e baseia-se na descalcificação do tecido ósseo, seguido de sua fixação em parafina e coloração com hematoxilina e eosina. Dessa forma, utilizando técnicas complementares, conseguimos analisar tanto a parte orgânica quanto a inorgânica das amostras desse estudo, obtendo-se uma visão completa do tecido ósseo em estudo.

Passado o período inicial à descoberta da osseointegração, e a comprovação de sua efetividade, a implantodontia hoje é vista como uma realidade incontestável, e adentra esse começo de milênio com uma nova perspectiva, não mais de provar sua viabilidade, e sim de otimizar seus resultados. Nesse contexto, em que diversos materiais e técnicas vêm sendo

testadas, o rhGH pode vir a ser um coadjuvante importante na modulação do processo de osseointegração.



## ***REFERÊNCIAS***

---



## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ANDREASSEN TT, OXLUND H. Local anabolic effects of growth hormone on intact bone healing fractures in rats. *Calcif Tissue Int.* 2003 Sep; 73(3): 258-64.

BAIL H, KLEIN P, KOLBECK S, KRUMMREY G, WEILER A, SCHMIDMAIER G, HAAS NP, RASCHKE MJ. Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of osteochondral defects – a preliminary study in micropigs. *Bone.* 2003; 32: 457-67.

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

BAIL HJ, KOLBECK S, KRUMMREY G, SCHMIDMAIER G, HASS NP, RASCHKE MJ. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembraous fracture healing. *Horm Res.* 2002; 58 Suppl 3: 39-42.

BAK B, ANDREASSEN TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone.* 1991; 12 (3): 151-4.

BECKER W, LYNCH SE, LEKHOLM U, BECKER BE, CAFFESSE R, DONATH K et al. A comparison of PTFE membranes alone or in combination with platelet-derived growth factors and insulin-like factor-I or demineralized freeze-dried bone in promoting bone formation around immediate extraction socket implants. *J Periodontol.* 1992; 63 (11): 929-40.

---

<sup>1</sup> De acordo com a NBR 6023: Referências bibliográficas, de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *MEDLINE*

BELSER UC, SCHMID B, HIGGINBOTTOM F, BUSER D. Outcome analysis of implant restorations located in the anterior maxilla: a review of the recent literature. *Int J Oral Maxillofacial Implants*. 2004; 19 (suppl):30-42.

BRANEMARK PI, HANSSON BO, ADELL R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconst Surg*. 1977; II (suppl.): 16.

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 - *Clin Oral Impl Res*. Xx, 2010; 000-000. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02007.x

DARRYL LM, BRENT WE, GREGORY DB, HUBNER K, ARCHIE M, FRANCES BC et al. Radiographic, densitometric, and biomechanical effects of recombinant canine somatotropin in an unstable osteotomy gap model of bone healing in dogs. *Veterinary Surgery*. 1998; 27: 85-93.

DUBREUIL P, ALBRIBAT T, BROXUP B, BRAZEU P. Long-term growth hormone-releasing factor administration on growth hormone, insulin-like growth factor-I concentrations, and bone healing in the beagle. *Can J Vet Res*. 1996 Jan; 60 (1): 7-13.

ERIKSEN EF, KASSEM M, LANGDAHL B. Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodeling. *Eur J Clin Invest*. 1996; 26: 252-34.

GARCÍA JT, DORTA JM, MUNGUÍA O, LLABRÉS M, FARIÑA JB. Biodegradable laminar implants for sustained release of recombinant human growth hormone. *Biomaterials*. 2002; 23: 4759-64.

GOLDMAN L, AUSIELLO D. Cecil Medicine. 23 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008.

GUYTON AC, HALL JE. Textbook of Medical Physiology. 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2006.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. Histologia Básica. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KOLBECK S, BAIL H, SCHMIDMAIER G, ALQUIZA M, RAUN K, KAPPELGARD A, FLYVBJERG A, HAAS NP, RASCHKE MJ Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone*. 2003; 33: 628-37.

LAN J, WANG Z, WANG Y, WANG J, CHENG X. The effect of combination of recombinant human bone morphometric protein-2 and basic fibroblast growth factor or insulin – like growth factor – I on dental implant osseointegration by confocal laser scanning microscopy. *J Periodontol*. 2006 Mar; 77 (3): 357-63.

LE GHÉHENNEC L, SOUEIDAN A, LAYROLLE P, AMOURIQ Y. Surface treatment of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater*. 2007 Jul;23(7):844-54.

LYNCH SE, BUSER D, HERNANDEZ RA, WEBER HP, STICH H, FOX CH, WILLIAMS RC. Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol*. 1991; Nov; 62 (11): 710-6.

MORENO GG, CUTANDO A, ARANA C, WOLF CV, GUARDIA J, MUNOZ F, PEÑA ML, STEPHENSON J. The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2009 Nov-Dec; 24 (6): 1068-73.

MORTON D, BORNSTEIN MM, WITTNEBEN JG, MARTIN WC, RUSKIN JD, HART CN, BUSER D. Early loading after 21 days of healing of nonsubmerged titanium implants with a chemically modified sandblasted and acid-etched surface: two-year results of a prospective two-center study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2010 Mar; 12(1): 9-17.

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*. 2009 Sep 29. [epub ahead of print].

NORTHMORE-BALL MD, WOOD MR, MEGGITT BF. A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *Bone Joint Surg Am*. 1980; 62 (3): 391-6.

OHLSSON C, BENGTTSSON B, ISAKSSON OGO, ANDREASSEN TT, SLOOTWEG MC. Growth hormone and bone. *Endocrinol Rev*. 1998; (19) 1: 55-79.

RASCHKE MS et al. Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone*. 2001; 29 (4): 368-73.

SIMPSON AH, MILLS L, NOBLE B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing. *J Bone Joint Surg Br*. 2006 Jun; 88 (6): 701-5.

SOMATROPINA HUMANA RECOMBINANTE 4 UI. **Saizen (pó liófilo injetável)**: Merck Serono S.A. Aubonne, Suíça; Dezembro 2009. Bula. N1281212B.

STEFANI CM, MACHADO MA, SALLUM EA, SALLUM AW, TOLEDO S, NOCITI FH JR. Platelet-derived growth factor/insulin-like growth factor-1

combination and bone regeneration around implants placed into extraction sockets: a histometric study in dogs. *Implant Dent.* 2000; 9 (2): 126-31.

STENPORT VF, OLSSON B, MORBERG P, TORNELL 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.

TAKECHI M, TATEHARA S, SATAMURA K, FUJISAWA K, NAGAYAMA M. Effect of FGF-2 and melatonin on implant bone healing: a histomorfometric study. *J Mater Sci: Mater Med.* 2008; 19 (8): 2949-52.

TRAN GT, PAGKALOS J, TSIRIDIS E, NARVANI AA, HELIOTIS M, MANTALARIS A, TSIRIDIS E. Growth hormone: does it have a therapeutic role in fracture healing? *Expert Opin Investig Drugs.* 2009 Jul; 18(7):887-911.

TRESGUERRES IF, ALOBERA MA, BACA R, TRESGUERRES JA. Histologic, morfometric, and densitometric study of peri-implant bone in rabbits with local administration of growth hormone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Mar-Apr; 20 (2): 193-202.

TRESGUERRES IF, BLANCO L, CLEMENT C, TRESGUERRES JA. 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, CLEMENTE C, DONADO M, GÓMEZ-PELLICO L, BLANCO L, ALOBERA MA, TRESGUERRES JA. Local administration of growth hormone enhances periimplant bone reaction in an osteoporotic rabbit model. *Clin Oral Implants Res.* 2002 Dec;13(6):631-6.

VARKEY M, GITTENS SA, ULUDAG H. Growth factor delivery for bone tissue repair: an update. *Expert Opin Drug Deliv.* 2004 Nov; 1(1):19-36.

WITTBJER J, RHOLIN M, THORNGREN KG. Bone formation in desmeralized bone transplants treated with biosynthetic human growth hormone. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1983; 17 (2): 109-17.



## ***ANEXOS***

---



## **ANEXO 1**

---



## **1 Materiais e Métodos**

### **1.1 Modelo Animal, implantes e cirurgias**

Quatorze coelhos machos adultos (10 meses de idade) da linhagem Nova Zelândia, obtidos comercialmente, alimentados com ração standard e água ad libitum, foram usados nesse estudo (Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil). Todas as intervenções foram aprovadas pelo Comitê de Ética e Pesquisas Científicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, com o número de protocolo 10/00165 e conduzido sob a supervisão do Serviço Veterinário da Universidade do Estado de Santa Catarina sob o número de protocolo 13810.

As cirurgias foram realizadas no Estado de Santa Catarina, na cidade de Lages, no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Todos os animais foram pesados antes das cirurgias. A media de peso dos animais tratados com rhGH foi de 3,281 Kg e a do grupo controle foi de 2,735 Kg. No procedimento cirúrgico, inicialmente os animais receberam medicação pré-anestésica com acepromazina na dose de 4 mg/Kg associado com butorfanol 0,2 mg/kg via intramuscular, a indução anestésica e manutenção foi realizada com Cetamina na dose de 50 mg/Kg de peso corporal associado a diazepam por via intravenosa (imagem 1). Profilaxia antibiótica perioperativa, consistindo de 20 mg/Kg de amoxicilina associada a 5 mg/Kg de clavulanato, foi instituída a todos os animais. As anestésias gerais foram realizadas por Veterinários Anestesiologistas da UDESC.

**Figura 1: Anestesia dos animais**



**Fonte: Imagens da pesquisa**

Após constatada anestesia, a pata traseira esquerda foi tricotomizada e infiltrada com anestésico local tipo Lidocaína 2% com 1.150.000 adrenalina (Lidocaína DFL<sup>®</sup>, Rio de Janeiro, Brasil) na região anterior da tíbia, para diminuir o sangramento trans-operatório e controle profilático da dor pós-operatória. A cirurgia foi realizada sob condições assépticas. Uma incisão na pele de 4 cm foi realizada sobre a face anterior da tíbia, o tecido muscular foi divulsionado até atingir o periósteo, que foi incisado e descolado expondo-se o tecido ósseo. Foram feitas na tíbia duas cavidades ósseas de 2.2 mm de diâmetro e 4 mm de profundidade, separadas 16 mm entre elas. As cavidades foram confeccionadas com uma fresa cirúrgica de 2 mm (Colosso<sup>®</sup>, Itu, Brasil)

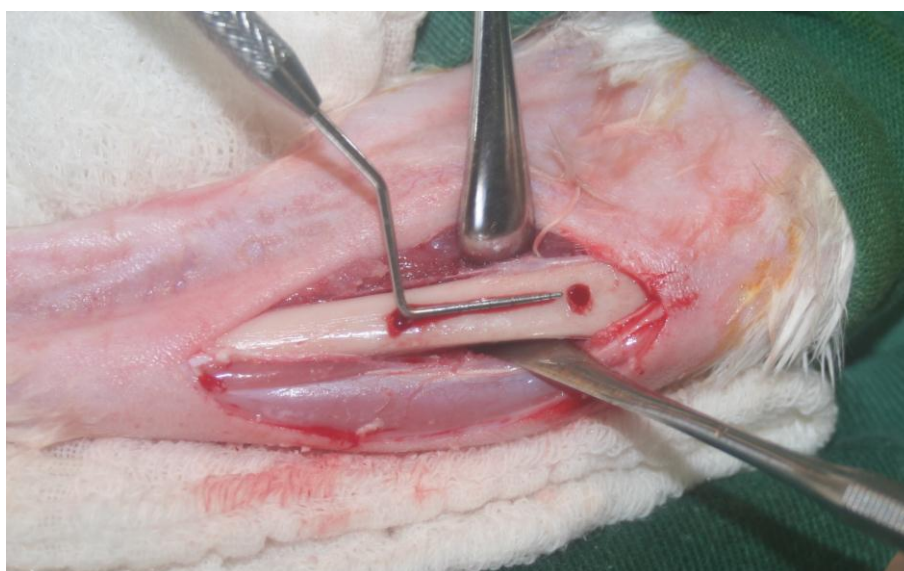
de diâmetro em 637 rotações por minuto, sob irrigação abundante de soro fisiológico 0.9%, até romper a cortical óssea e na sequência a cavidade foi alargada até o diâmetro e profundidade planejados com uma fresa de 2.2mm de diâmetro (Straumann®, Basel, Suíça) (figuras 2 e 3).

**Figura 2: Cirurgia sob cuidados de assepsia.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**

**Figura 3: cavidades cirúrgicas confeccionadas na tíbia dos animais e a mensuração da distância de 16mm entre elas.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**

Cada tíbia esquerda recebeu dois implantes cilíndricos de titânio puro com 2,2 mm e 6 mm de comprimento, sem roscas e com afilamento no último milímetro de sua porção apical; suas superfícies foram nanotexturizadas através da pulverização de partículas de plasma spray atmosférico. Os implantes foram especialmente confeccionados para esse experimento pelo do Grupo de Estudos e Propriedades de Superfícies e Interfaces (GEPSI) do Centro de P&D em Física da Faculdade de Física da PUCRS (figura 4). Após a confecção e tratamento da superfície, os implantes tiveram suas superfícies limpas à vácuo, para então serem embalados individualmente e esterilizados com óxido de etileno.

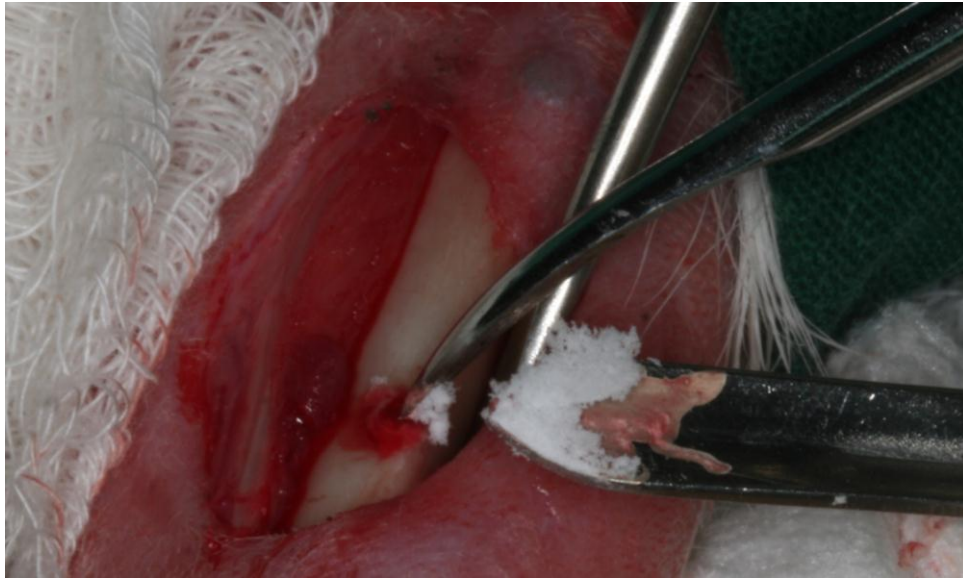
**Figura 4: Implante nanotexturizado utilizado no experimento.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**

Os coelhos foram divididos randomicamente em grupos. No grupo teste antes da colocação do implante, em cada defeito ósseo cirurgicamente criado, foi inserido uma camada de 1 IU (0,3 mg) de rhGH liofilizado (Saizen<sup>®</sup>, Serono Laboratories, Aubonne, Suíça) (figura 5). Nada foi aplicado nos animais do grupo controle.

**Figura 5: Colocação do rhGH na cavidade óssea prévia a instalação do implante.**

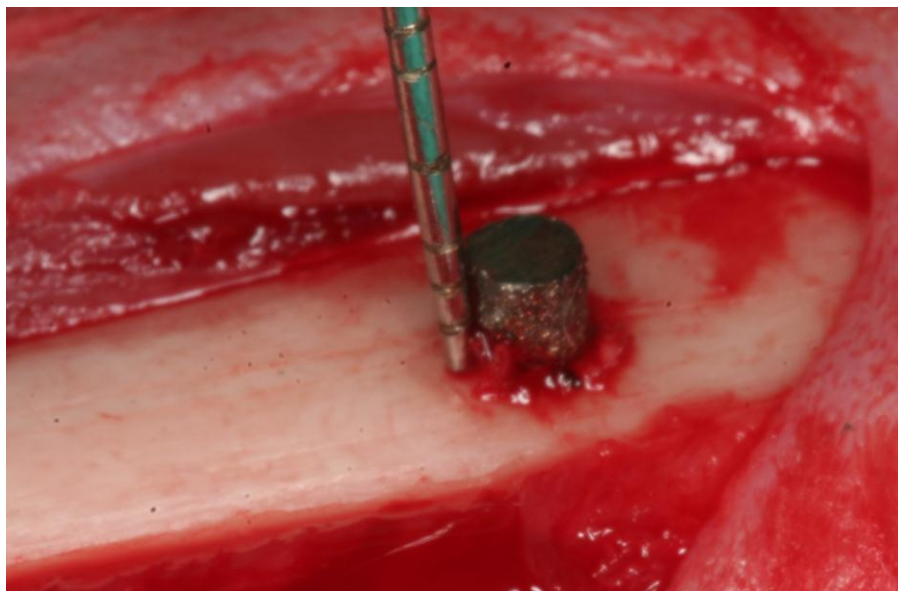


**Fonte: Imagens da pesquisa.**

Após essa etapa, os implantes foram inseridos 4 mm intraósseos, deixando 2 mm supra-ósseos para facilitar sua posterior localização e realização do teste biomecânico e procedeu-se a sutura dos tecidos moles em planos, onde foi utilizada sutura de mononylon não-reabsorvível com fio de 6.0 (Ethicon 6.0 - Johnson & Johnson Co., EUA) (figuras 6 e 7). Após a sutura os animais voltaram às suas gaiolas individuais onde ficaram por um período de 7 dias com objetivo de restringir sua movimentação pós-operatória. Pelo mesmo período, para evitar infecções, foi utilizado antibiótico (amoxicilina 10 mg/Kg e clavulanato 2,5 mg/Kg) na água colocada para os animais beberem. A analgesia pós-operatória também foi realizada por via oral na água dada aos animais por 3 dias (cetoprofeno). Os animais eram visitados duas vezes ao dia, e as feridas operatórias inspecionadas diariamente durante todo o período do estudo. As suturas da pele foram removidas aos 10 dias de pós-operatório.



**Figura 6: Implante colocado na cavidade óssea com 2mm deixado supra-ósseo.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**

**Figura 7: Sutura da pele dos coelhos.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**

## 1.2. Sacrifício e preparo dos espécimes

Oito animais foram sacrificados com 14 dias (4 animais no grupo controle intulado A e 4 animais no grupo tratado com rhGH intitulado B) e outros seis animais aos 42 dias de pós-operatório (3 animais no grupo controle

intitulado C e 3 animais no grupo tratado com rhGH intitulado D) por narcotização através do tiopental sódico intravenoso, e a circulação interrompida com cloreto de potássio. Entretanto, dois animais foram excluídos do estudo aos 14 dias de pós-operatório em função de fraturas nas regiões peri-implantares (um animal do grupo A e outro do grupo B). Logo cada grupo (A, B, C e D) ficou com 3 animais (tabela 1).

**Tabela 1: Divisão dos Grupos**

	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo Teste (rhGH)</b>	<b>n</b>
<b>14 dias</b>	A	B	8
<b>42 dias</b>	C	D	6

Fonte: Dados da pesquisa

A pele e os tecidos moles da perna dos animais foram divulsionados até se atingir a tibia, que foi então dissecada e ressecada; os implantes foram removidos juntos com o tecido ósseo circundante e fixado em uma solução de formol 10% (figura 8).

**Figura 8: Tibia ressecada e dissecada.**



Fonte: Imagens da pesquisa.

### 1.3 Teste Biomecânico e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Um implante de cada grupo (A, B, C e D) foi submetido aos teste biomecânico de Pull-Out, realizado na máquina de testes universal (EMIC DL-2000<sup>®</sup>, São José dos Pinhais, Brasil) do laboratório de Tecnologia dos Materiais Dentários da Faculdade de Odontologia da PUCRS. As tibias foram embebidas em resina de poliéster insaturada (Resapol 10249<sup>®</sup>, Reichhold Co, EUA), mantendo a porção extra-ossea dos implantes expostas. As tibias embocadas na resina foram então montadas na máquina de testes universal. O ensaio consistiu da mensuração da força necessária à extrusão mecânica dos implantes da tíbia. As mensurações foram feitas usando uma célula de força de 500N e uma taxa de deformação constante de 1mm/min. A força foi aplicada até o completo desprendimento do implante da tíbia. Foi registrada a curva tensão-deformação e, a partir dela, foram calculados os valores de energia (figura 9).

**Figura 9: amostra montada na máquina de ensaio para o teste biomecânico de Pull-out.**



Fonte: Imagens da pesquisa.



Os implantes após separados da tíbia pelo Pull Out, foram submetidos à Microscopia Eletrônica de Varredura MEV (Philips XL30 FEG-SEM<sup>®</sup>, Philips, Eindhoven, Holanda) para a análise qualitativa do tecido ósseo que permaneceu aderido a eles. Os implantes foram aleatoriamente posicionados em seu longo eixo em slots, para aquisição das imagens com aumentos de 50, 100, 200 e 500 X.

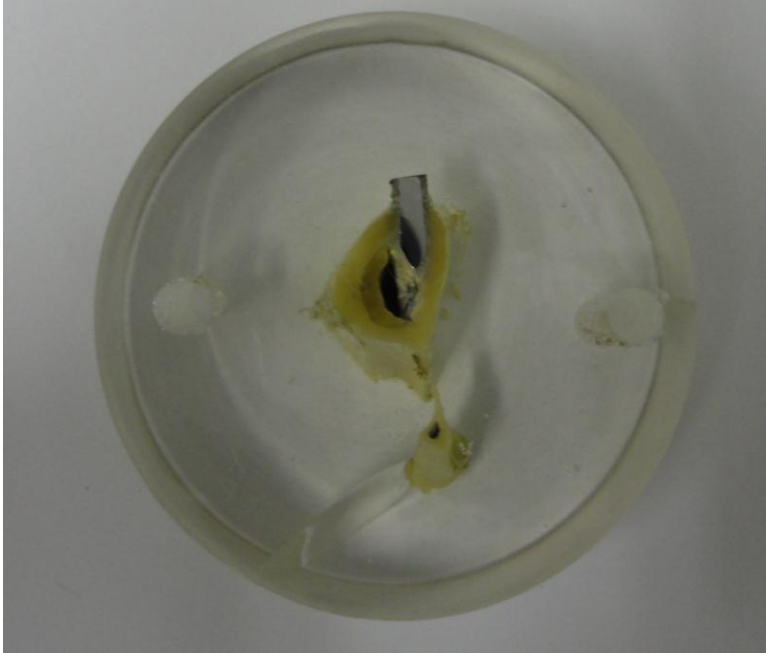
#### 1.4 Avaliação histológica

Quatro implantes de cada grupo foram removidos da tíbia para que se procedesse a análise histológica do tecido periimplantar. Doze implantes foram removidos por descalcificação da tíbia em solução ácida e o quatro através do teste biomecânico de Pull-Out realizado anteriormente. As áreas periimplantares foram então desidratadas em séries crescentes de álcool e após embebidas e infiltradas com parafina. Para a confecção das lâminas de histologia, as amostras foram seccionadas em uma direção látero-lateral, paralela ao longo eixo longitudinal da cavidade óssea remanescente após a remoção dos implantes. Quatro secções foram feitas por cavidade óssea. Cada secção foi reduzida a espessura de aproximadamente 10 µm, e então coradas com hematoxilina e eosina. As secções foram observadas em microscopia óptica de transmissão (Olympus BX60<sup>®</sup>, Olympus Co, Japão) em magnificação de 20 a 60 vezes. Foi realizada a descrição histológica qualitativa do tecido perimplantar. As análises foram todas realizadas pelo mesmo pesquisador, o qual desconhecia a que grupo pertencia cada amostra.

### 1.5 Microscopia óptica de reflexão

Dois implantes de cada grupo (A, B, C e D) tiveram suas regiões peri-implantares desidratadas em séries crescentes de álcool e então embebidas e infiltradas em resina de poliéster insaturada (Resapol 10249<sup>®</sup>, Reichhold Co, EUA). As amostras foram então seccionadas na região do centro dos implantes em seu longo eixo longitudinal em uma direção látero-lateral. Procedeu-se o acabamento da face das amostras seccionadas através do seu polimento em uma politriz horizontal (Struvers<sup>®</sup> modelo DPU-10), com 200 rotações por minuto e irrigação constante com água. Foram utilizadas lixas d'água de granulação crescente, variando entre 80 e 2000 grãos, até que as amostras tivessem sua superfície lisa e polida. Ao final dessa etapa, as amostras ainda foram submetidas a um polimento final com pasta de diamante com tamanho de partícula variando entre 0 a 1/2 micron (Geolit<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Essa técnica de preparo das amostras para microscopia óptica de reflexão a fresco preservou o conteúdo mineral das amostras e permitiu a análise qualitativa da interface do tecido ósseo com os implantes (figura 10). Essas amostras foram então observadas em microscopia óptica de reflexão (Olympus BX60<sup>®</sup>).

**Figura 10: amostra emblocada em resina e preparada para a microscopia óptica de reflexão.**



**Fonte: Imagens da pesquisa.**



## **ANEXO 2**

---



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS

Ofício 164/10 – CEUA

Porto Alegre, 07 de outubro de 2010.

Senhor Pesquisador:

O Comitê de Ética para o Uso de Animais apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEUA 10/00165, intitulado: **“Avaliação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície”**, com as recomendações em anexo.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

  
Profª. Dra. Anamaria Gonçalves Feijó  
Coordenadora do CEUA – PUCRS

Ilmo. Sr.  
Prof. Dr. Rogério Pagnoncelli  
Faculdade de Odontologia  
N/Universidade

PUCRS

**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)



### AVALIAÇÃO DE PROJETOS DE PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO
<b>Avaliação do hormônio do crescimento humano recombinante (rhGH) no processo de osseointegração de implantes de titânio submetidos a diferentes tratamentos de superfície.</b>
<b>Projeto nº 10/00165</b>
<b>Pesquisador:</b> Rogério Pagnoncelli
AVALIAÇÃO GERAL DO PROJETO
<input type="checkbox"/> Aprovado <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado com recomendação <input type="checkbox"/> Pendente <input type="checkbox"/> Não aprovado
Questões levantadas pelo CEUA – PUCRS
Foram acrescentados e esclarecidos os itens (cálculo do tamanho da amostra e eutanásia). O cronograma, bem como o orçamento, foram reelaborados, conforme as sugestões. O CEUA sugere, porém, que nas próximas submissões o pesquisador anexe uma carta com as respostas e modificações realizadas no corpo do texto.



**Campus Central**  
Av. Ipiranga, 6690 – Prédio 60, sala 314  
CEP: 90610-000  
Fone/Fax: (51) 3320-3345  
E-mail: [ceua@pucrs.br](mailto:ceua@pucrs.br)



## ***ANEXO 3***

---

**Os seguintes grupos foram submetidos à análise histológica:**

Grupo A – controle de 14 dias;

Grupo B – tratado com rhGH de 14 dias;

Grupo C – controle de 42 dias;

Grupo D – tratado com rhGH de 42 dias.

**As amostras nos laudos da histologia pertencem aos seguintes grupos:**

3C medial – grupo C

3C distal – grupo C

10 H distal – grupo D

12 H distal – grupo B

12 H medial – grupo B

13 C distal – grupo A

13 C medial – grupo A

10644 – grupo A

10645 – grupo B

10646 – grupo A

10647 – grupo B

10665 – grupo D

10666 – grupo C

10667 – grupo C

10668 – grupo D



## LAUDO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO

Canoas, 07 de março de 2011.

Protocolo n.º: 009/11

Data de Entrada: 15/01/11

Proprietário: Marcelo Abreu

Tíbia Coelho

### 1 HISTÓRICO

Material de pesquisa. Tíbia de Coelho

### 2 RESULTADO

O exame histopatológico das amostras de **osso** revelou o que segue:

Amostra	Neoformação óssea	Neovascularização	Tecido Conjuntivo	Obs:
10644	+	+++	0	
10645	++	++	+	
10646	+	+++	+	
10647	+++	+	0	
10665	+	++	0	
10666	+	++	0	
10667	++	+	0	dobras/artefato
10668	+++	+	0	dobras/artefato

Coloco-me a inteira disposição para quaisquer questionamentos sobre este laudo. Atenciosamente,



### Dra. Rosecler Alves Pereira

Médica Veterinária CRMV-RS 6405  
Mestre em Sanidade Avícola  
Doutora em Medicina Veterinária Preventiva  
Membro do Colégio Brasileiro de Patologia Animal  
Membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária  
Member of American Association of Avian Pathologists – AAAP

## LAUDO DE EXAME HISTOPATOLÓGICO

Canoas, 07 de março de 2011.

Protocolo n.º: 124/11	Data de Entrada: 28/02/11
Proprietário: Marcelo Abreu	Tíbia Coelho

### 1 HISTÓRICO

Material de pesquisa. Tíbia de Coelho

### 2 RESULTADO

O exame histopatológico das amostras de **osso** revelou o que segue:

Amostra	Neoformação óssea	Neovascularização	Tecido Conjuntivo	Obs:
3C MEDIAL	+	+	0	
3C DISTAL	+	+	0	
10 H DISTAL	+	0	0	
12 H DISTAL	+++	+	0	
12 H MEDIAL	+++	+	0	
13 C DISTAL	+	++	0	
13 C MEDIAL	+	+	0	

Coloco-me a inteira disposição para quaisquer questionamentos sobre este laudo. Atenciosamente,



### Dra. Rosecler Alves Pereira

Médica Veterinária CRMV-RS 6405  
Mestre em Sanidade Avícola  
Doutora em Medicina Veterinária Preventiva  
Membro do Colégio Brasileiro de Patologia Animal  
Membro da Associação Brasileira de Patologia Veterinária  
Member of American Association of Avian Pathologists – AAAP



## ***ANEXO 4***

---



USO PEDIÁTRICO ou ADULTO  
Para uso subcutâneo ou intramuscular

**Características Farmacológicas**  
Grupo fármaco-terapêutico: hormônios e análogos do lóbulos pituitário anterior, código ATC: H01A.

O hormônio de crescimento Saizen® (somatropina r-HGH) é um peptídeo de 191 aminoácidos idêntico ao hormônio de crescimento pituitário humano. O hormônio de crescimento é sintetizado em uma linhagem celular murina transformada que foi modificada para a produção de hormônio de crescimento humano.

**Farmacodinâmica**  
O efeito farmacológico mais importante resultante da administração parenteral de somatropina é a estimulação dos níveis de crescimento através do intermédio de somatomedinas ou IGF. Entretanto, a somatropina é ativa tanto na presença do crescimento retardado resultante de uma deficiência de somatomedinas ou de seus receptores, quanto em pacientes de baixa estatura devido a uma deficiência pituitária, cujas epífises já tenham fechado.

A somatropina também tem efeito sobre o metabolismo de proteínas (efeito anabólico), do metabolismo da glicose (alteração da tolerância à glicose) e do metabolismo de lipídios (efeito lipolítico). Adicionalmente, a somatropina modula a atividade do citocromo hepático P450 2A4.

**Eficiência clínica nos casos de deficiência acentuada de hormônio de crescimento iniciada durante a infância**  
Os efeitos da deficiência do hormônio de crescimento em adultos são influenciados por Saizen® como descrito a seguir.  
Em um estudo duplo-cego, controlado por placebo com 115 pacientes, conduzido por um período de 6 meses foram observados os seguintes parâmetros:

No início do tratamento, foi administrada uma injeção subcutânea de 0,05 mg/kg/dia. Após 4 semanas de tratamento, se a tolerabilidade fosse boa, a dose era aumentada para 0,07 mg/kg/dia.

**Avaliação primária: alteração na massa gorda livre (medida pela média do DEXA - absorção por raios-X de dupla energia)** aumento estatisticamente significativo de 2,23 kg, na média. Os homens apresentaram um aumento mais pronunciado que as mulheres.

**Avaliação secundária: alteração na massa gorda total (medida pela média do DEXA)** redução média de 2,3 kg no grupo tratado com r-HGH, comparado a 0,47 kg do grupo tratado com placebo (estatisticamente significativo). **Função cardíaca:** a ecocardiografia bi-dimensional mostra um aumento médio da porcentagem da tração de ejeção de 50,6% no grupo tratado com r-HGH, comparado com 3,0% no grupo tratado com placebo, e diminuição média do volume do ventrículo esquerdo no final da sístole de 4,29 ml no grupo de r-HGH, comparado com 1,14 ml no grupo tratado com placebo. **Quantidade de vida alien:** a melhor estatisticamente significativa (de 11% no grupo tratado com r-HGH) nas áreas das "respostas emocionais" (p = 0,017) o resultado do questionário do perfil de saúde (Health Related Quality of Life) por meio de uma escala socializada e genérica. **Qualidade de vida alien:** os efeitos foram estatisticamente significativos de nível de significância (p = 0,0001) para o teste de Mann-Whitney. **Densidade óssea:** A densidade óssea permaneceu inalterada.

**Eficiência clínica nos casos de deficiência de hormônio de crescimento em crianças nascidas pequenas para idade gestacional (PEG)**  
Em um ensaio clínico randomizado, o tratamento de três anos com uma dose de 0,067 mg/kg/dia de crianças baixas pré-púberes nascidas com PEG resultou em um ganho médio em altura

de +1,85. Os pacientes que não receberam nenhum tratamento adicional mantiveram um ganho em altura de +0,7 na altura final (p < 0,01 em comparação com o período inicial).

Os pacientes que receberam um segundo curso do tratamento após um período variável de observação experimental em um ganho total em altura de +1,35 (p = 0,001 em relação ao período inicial) na altura final, após o tratamento com duração média cumulativa de 6,1 anos. O ganho em altura (+1,35 ± 1,1) final deste grupo foi significativamente (p < 0,05) diferente de tratamento em média.

Um segundo ensaio clínico investigou dois esquemas diferentes de dose ao longo de quatro anos. Um grupo foi tratado com 0,067 mg/kg/dia durante 2 anos e, depois, foi observado sem tratamento durante 2 anos. O segundo grupo recebeu 0,067 mg/kg/dia no primeiro e no terceiro ano e sem tratamento no segundo e no quarto ano. Qualquer um dos esquemas de tratamento resultou em uma dose administrada cumulativa de 0,033 mg/kg/dia ao longo do período de quatro anos do estudo. Os dois grupos apresentaram uma aceleração comparável de crescimento e uma melhoria significativa em altura de +1,85 S (p < 0,0001) e +1,43 S (p < 0,0001), respectivamente, no final do período de quatro anos do estudo. Dados de segurança em longo prazo ainda são limitados.

**Farmacocinética**

Após a administração de uma dose única de r-HGH em voluntários saudáveis, a concentração plasmática máxima (C<sub>max</sub>) alcançada 3 horas após a administração intramuscular, e entre 4 e 6 horas após a administração subcutânea. As áreas sob a curva (AUC) são comparáveis para as 7 rotas de administração. Os valores de C<sub>max</sub> são semelhantes ao do hormônio do crescimento natural de acordo com o publicado na literatura. A farmacocinética de Saizen é linear pelo menos até doses de 8 UI (2,67 mg). Com doses mais altas (60 UI/20 mg), não pode ser descartado certo grau de não-linearidade, embora sem relevância clínica. Após a administração em voluntários saudáveis, o volume de distribuição no estado estacionário é de aproximadamente 7 L. O clearance metabólico total de aproximadamente 15 L/h, ao passo que a depuração renal é desprezível, e o medicamento exibe uma meia-vida de eliminação de 20 a 35 min. Após a administração SC, o IM, de dose única de Saizen®, a meia-vida terminal aparente é bem mais longa, ao redor de 2 a 4 horas. Isso se deve a uma frequência que limita o processo de absorção. As concentrações séricas máximas do hormônio de crescimento (GH) são alcançadas após aproximadamente 4 horas e os níveis séricos de GH voltam para os níveis iniciais dentro de um período de 24 horas, indicando que não ocorre nenhum acúmulo de GH durante as administrações repetidas. A biodisponibilidade absoluta de ambas as vias é de 70-90%. O hormônio de crescimento exógeno segue a mesma rota de metabolização do hormônio de crescimento endógeno; é inativado por proteases e metabolizado no fígado e nos rins, seguindo as rotas de metabolização das proteínas. Ele não é recuperado na urina. **Critérios de grupo espereados de pacientes:** Em pacientes com insuficiência hipofisária ou renal crônica a depuração de somatropina é reduzida.

**Dados de segurança pré-clínica**

Os dados pré-clínicos não revelam nenhum perigo especial para humanos, baseado-se em estudos convencionais de farmacologia, de segurança, de toxicidade com dose repetida e de genotoxicidade.

**Indicações**

- Deficiência de crescimento em crianças provocada por diminuição ou ausência de secreção do hormônio de crescimento endógeno. Esta deficiência é manifestada clinicamente pela redução significativa do crescimento, com retardo na maturação óssea, bem como pelo aumento mínimo, ou nenhum aumento no grau, do nível sanguíneo de hormônio do crescimento durante o teste de estimulação com injeção hipofisotrófica, por exemplo, pela clonidina ou insulina.
- Deficiência de crescimento em meninas com disgenesia gonadal (Síndrome de Turner), confirmada por análise cromossômica.
- Deficiência de crescimento associado à insuficiência renal crônica em crianças em idade pré-púberal.
- Ate o momento não existem dados disponíveis sobre a altura final alcançada na idade adulta de pacientes com Síndrome de Turner ou em crianças com deficiência de crescimento devido a insuficiência renal crônica após o tratamento com somatropina.
- Deficiência de crescimento em crianças nascidas pequenas para idade gestacional.

A deficiência no crescimento em crianças nascida pequena para idade gestacional é definida como:

- peso e/ou altura no nascimento < - 2 S, e crianças que não alcançaram a taxa normal de crescimento até os 4 anos de idade ou logo após, com taxa de crescimento < 0,5 durante o último ano;

Saizen® é indicado em adultos para tratamento de:

- Deficiência acentuada do hormônio do crescimento com início na infância ou na fase adulta;
- A deficiência deve ser confirmada por dois testes séricos, após cirurgia cardíaca aberta, cirurgia abdominal, trauma ocular, múltipla insuficiência respiratória aguda ou condições semelhantes não devem ser tratados com somatropina. (com relação aos pacientes submetidos à terapia com somatropina que ficam clinicamente doentes, vide precauções);
- Retinopatia diabética proliferativa ou pré-proliferativa.

Como a deficiência do hormônio do crescimento pode, raramente, ser um dos primeiros sinais da presença de tumores cerebrais, tumores deste tipo devem ser descartados antes do início do tratamento. Qualquer tumor já existente deve ser inativo e o tratamento deve ser terminado antes do início do tratamento com Saizen®.

**Contra-indicações**

- Saizen® é contra-indicado em pacientes subclínicamente hipotensivos à somatropina e a qualquer exigente da formulação ou do solvente;
- Saizen® não deve ser usado em casos com evidência de qualquer progressão ou recorrência de lesão intracraniana subjacente;
- Pacientes com doença aguda sofrimento de complicações, após cirurgia cardíaca aberta, cirurgia abdominal, trauma ocular, múltipla insuficiência respiratória aguda ou condições semelhantes não devem ser tratados com somatropina. (com relação aos pacientes submetidos à terapia com somatropina que ficam clinicamente doentes, vide precauções);
- Retinopatia diabética proliferativa ou pré-proliferativa.

Como a deficiência do hormônio do crescimento pode, raramente, ser um dos primeiros sinais da presença de tumores cerebrais, tumores deste tipo devem ser descartados antes do início do tratamento. Qualquer tumor já existente deve ser inativo e o tratamento deve ser terminado antes do início do tratamento com Saizen®.

**Modo de usar**

Saizen® 1,33 mg (4 UI) é indicado para dose única e, preferencialmente, por via subcutânea.

Reconstituído: O pó liofilizado deve ser reconstituído com o solvente incluído. A solução reconstituída para injeção deve ser clara e isenta de partículas. Se a solução contiver partículas, ela não deve ser injetada.

Para reconstituir Saizen®, injete o solvente no frasco-ampola de Saizen. 1,33 mg apontando o líquido contra a parede de vidro. O frasco-ampola cuidadosamente dissolvido. Evite agitar rotatórios suaves até que o conteúdo seja completamente dissolvido. Evite agitar vigorosamente porque qualquer solvente que não for utilizado, o local da injeção deve ser variado a fim de evitar lipodistrofia.

**Saizen® 8 mg é indicado para doses múltiplas por via subcutânea.**

O estudo randomizado a solução reconstituída de Saizen® 8 mg click easy é somente para uso com o auto-aplicador DoseClick®. Para administração, siga as instruções contidas no Manual de Instruções contido no embalagem do auto-aplicador DoseClick®.

**Precauções:** O produto deve ser dissolvido com o solvente bacteriostático incluído (metacresol em água para injeção 0,3% (v/v), utilizando o dispositivo para reconstituição click easy®). A solução reconstituída para injeção deve ser clara e sem partículas. Se a solução apresentar partículas, esta não deve ser utilizada. O local da injeção deve ser variado a fim de evitar lipodistrofia.

**Posologia**

A dosagem de Saizen® deve ser individualizada para cada paciente com base na área de superfície corporal (ASC) ou no peso corporal (PC). Recomenda-se a administração de Saizen® na hora de dormir de acordo com a seguinte tabela:

**Deficiência de crescimento decorrente de secreção inadequada de hormônio de crescimento endógeno**  
0,7-10 mg/dia de área de superfície corporal (ASC) por dia ou 0,025-0,035 mg/kg do peso corporal (PC) por dia com administração subcutânea ou intramuscular.

**Deficiência de crescimento em crianças com disgenesia gonadal (Síndrome de Turner)**

0,7-10 mg/dia de área de superfície corporal (ASC) por dia ou 0,025-0,035 mg/kg do peso corporal (PC) por dia com administração subcutânea. Em pacientes com síndrome de Turner, ainda não definido em que lado o tratamento deve iniciar. Ainda não há dados disponíveis que indiquem se o início da terapia deve ser em ambos os lados ou em um lado. O tratamento deve iniciar na infância ou na adolescência. O uso de um dos lados deve ser baseado em testes endocrinológicos em pacientes com Síndrome de Turner, pode aumentar, taxa de crescimento.

**Deficiência de crescimento associada à insuficiência renal crônica**

1,4 mg/m<sup>2</sup> de área corporal ou 0,045 - 0,050 mg/kg de peso corpóreo por dia, administrado por via subcutânea. Em pacientes com insuficiência renal crônica o tratamento deve iniciar assim que possível após o diagnóstico de retardo no crescimento.

**Deficit de crescimento em crianças baixas nascidas pequenas para a idade gestacional (SGA)**

Dose: diária = 0,035 a 0,067 mg/kg de peso corpóreo (ou 1 - 2 mg/m<sup>2</sup> por dia), administrado por via subcutânea.

**Duração do tratamento em crianças**

O tratamento é geralmente contínuo por muitos anos. A duração do tratamento depende do decréscimo da altura do paciente e do objetivo terapêutico a ser atingido. O tratamento deve ser interrompido quando o paciente tiver atingido uma altura adulta satisfatória ou quando as epífises tiverem fechado. Em crianças com insuficiência renal crônica o tratamento deve ser interrompido quando for realizado o transplante renal. No caso do distúrbio de crescimento em crianças baixas nascidas pequenas para idade gestacional, normalmente se suspende o tratamento quando a altura adulta for atingida. O tratamento deve ser interrompido após o período de crescimento ativo da altura final (definido como velocidade de altura < 2 cm/ano) e se for necessária confirmação caso a idade óssea > 14 anos (garotas) ou > 16 anos (garotos), correspondendo ao fechamento das placas de crescimento epifisárias.

**Deficiência do Hormônio de Crescimento em adultos**

No início da terapia com somatropina, são recomendadas doses baixas de 0,15-0,3 mg, ministradas na forma de uma injeção subcutânea diária. A dose deve ser ajustada gradualmente, levando em consideração as reações clínicas, os eventos adversos que aparecerem e a concentração de IGF-1 no sangue. Se necessário, a dose deve ser aumentada uma vez ao mês. A dose final recomendada do hormônio de crescimento raramente ultrapassa 1,0 mg/dia. O tratamento deve ser administrado a menor dose eficaz. Em pacientes mais velhos ou com sobrepeso, podem ser necessárias doses menores.

**Duração do tratamento em adultos**

A duração do tratamento em adultos é normalmente de muitos anos. A duração ótima de tratamento não é definida. É recomendado avaliar, durante a avaliação médica anual, se o tratamento deve ser continuado.

**Precauções e Advertências**

**Contra-indicações relatadas**  
Pacientes com Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, anemia falciforme não devem ser tratados com Saizen®.

**Precauções e advertências**

A idade óssea deve ser periodicamente medida durante o tratamento com Saizen® especialmente em pacientes puberais e/ou em pacientes que recebem terapia de substituição hormonal, porque nestes pacientes a maturação das epífises pode ocorrer rapidamente. Em casos de deficiência de somatropina secundária à terapia antitumoral é recomendado procurar por possíveis sinais de renovação do processo de proliferação, mesmo sabendo que a taxa de reaparecimento do tumor não é aumentada com a terapia com Saizen®. Se houver evidência de renovação do processo de malignidade, o tratamento com Saizen® deve ser suspenso. Pacientes com deficiência de hormônio do crescimento devido a lesão intracraniana deve ser



avaliado periodicamente, a fim de detectar alguma progressão da doença. Durante a terapia de reposição em adultos, é esperado que ocorra retenção de líquidos.

#### Hipertensão

Durante o tratamento com Saizen® o nível tridiano no sangue pode diminuir como o resultado do aumento da di-iodação periférica de T4 para T3. Pode ocorrer o desenvolvimento de hipotensão que, se não tratado, pode diminuir a ação do Saizen®. Devem ser realizados testes regulares de função da tireóide durante o tratamento com Saizen®. Caso ocorra o aparecimento de hipotensão durante o tratamento com hormônio do crescimento, este deve ser substituído pela administração do hormônio triiodado, a fim de se obter um efeito terapêutico adequado.

#### Hipertensão intracranial benigna

No caso de dor de cabeça severa ou recorrente, problemas visuais, náusea e/ou vômito, recomenda-se a realização de fundoscopia para detecção de papiledema. Se for confirmado papiledema, deve ser considerado um diagnóstico de hipertensão intracranial benigna (ou pseudotumor cerebral), devendo ser interrompido o tratamento com Saizen®. No momento, não há evidência suficiente para orientar uma tomada de decisão clínica em pacientes com hipertensão intracranial resolvida. Se for reiniciado o tratamento com hormônio do crescimento, é necessário o monitoramento cuidadoso por sintomas da hipertensão intracranial, devendo ser interrompido o tratamento se houver recorrência da hipertensão intracranial.

#### Resistência à insulina

A administração do hormônio do crescimento é seguida por uma fase transitória de hipoglicemia que geralmente dura 2 horas, seguida-se, após 2-4 horas, em diante, um aumento nos níveis de glicose no sangue apesar das concentrações de insulina. A somatropina pode induzir a um estado de resistência à insulina o que pode resultar em hiperinsulinismo e em alguns pacientes em hiperglicemia. Para detectar resistência à insulina, os pacientes devem ser monitorados quanto à evidência de intolerância à glicose. Fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de diabetes durante o tratamento com somatropina são: obesidade, predisposição familiar, tratamento com esteróides ou existência de intolerância à glicose reduzida. Pacientes com um destes fatores devem ser observados durante o tratamento com Saizen®. Saizen® deve ser utilizado com precaução em pacientes com *diabetes mellitus* ou com história familiar desta doença. Em pacientes diabéticos é necessário fazer o ajuste da terapia antidiabética adequadamente.

#### Deslocamento da epífise femoral

O deslocamento da epífise femoral frequentemente está associado com distúrbios ósseos tais como osteoporose e hiperparatireoidismo, e com surtos de crescimento. Em crianças tratadas com hormônio do crescimento, o deslocamento da epífise femoral pode ser decorrente de distúrbios endócrinos subjacentes ou do aumento da velocidade de crescimento causado pelo tratamento. Surtos de crescimento podem aumentar o risco de problemas relacionados com as articulações, com a articulação do quadril, estando especialmente sob esforço durante o surto pré-pubere de crescimento. Os médicos e os pais devem ficar em alerta para o desenvolvimento do mancar ou para quedas de dor no quadril ou no pélo em crianças tratadas com Saizen®. Pacientes com deficiência de crescimento associado à insuficiência renal crônica deve ser regularmente avaliado para possível progressão da osteodistrofia renal. Em crianças com osteodistrofia renal avançada deve ser observada a ocorrência de deslocamento da epífise femoral ou uma necrose avascular da cabeça do fêmur. A ligação com a terapia com hormônio do crescimento não pode ser comprovada. Uma radiografia dos quadris deve ser realizada antes do início do tratamento.

Em casos de crianças com insuficiência renal crônica, a função renal deve ser reduzida a pelo menos 50% em relação ao normal antes do início do tratamento. A fim de confirmar a deficiência na taxa de crescimento, o crescimento do paciente deve ser monitorado por uma não antes do início do tratamento. O tratamento da insuficiência renal deve continuar normalmente durante a terapia com hormônio do crescimento. O tratamento de ser interrompido na ocasião do transplante renal.

Em crianças baixas nascidas pequenas para a idade gestacional, antes de iniciar o tratamento, devem ser descartados outros motivos ou tratamentos médicos que poderiam explicar o distúrbio do crescimento.

Para pacientes nascidas pequenas para a idade gestacional, recomenda-se medir a insulina em jejum e a glicose no sangue antes de iniciar o tratamento e novamente depois disso. Em pacientes com aumento do risco de diabetes mellitus (por exemplo, história familiar de diabetes,

obesidade, aumento no índice de massa corporal, resistência severa à insulina, acanthosis nigricans) deve ser administrado hormônio do crescimento.

Para as pacientes nascidas pequenas para a idade gestacional, recomenda-se medir o nível de IGF-1 antes de iniciar o tratamento e depositado duas vezes ao ano. Se, depois de quatro a seis meses, os níveis de IGF-1 estiverem <2SD em comparação com as referências quando a idade e o estado de puberdade, a proporcão IGF-1/IGFBP-3 poderia ser levada em conta para considerar o ajuste da dose.

As experiências na iniciação do tratamento em pacientes nascidas pequenas para a idade gestacional próximo ao início da puberdade, há evidência limitada. Portanto, não se recomenda iniciar o tratamento próximo ao início da puberdade. Há evidência limitada com pacientes com IIG portadores da Síndrome de Silver-Russell. Alguns ganho de altura obtido com o tratamento com somatropina de crianças baixas nascidas com IIG pode ser perdido caso o tratamento for parado antes de atingir a altura final.

Pacientes com Síndrome de Turner devem ser examinados regularmente pelo médico para possíveis sinais da doença de Scheuermann, especialmente com o aparecimento de dores ósseas. Na presença de deficiência antepulsátil total ou parcial, é necessário a realização de uma terapia de substituição com hormônios adicionais (ex. glicocorticóides). Nestes casos, a dosagem do tratamento concomitante deve ser cuidadosamente ajustada, a fim de prevenir qualquer efeito de inibição do crescimento.

Em casos isolados, injeções de preparações contendo o conservante metacresol (Saizen® 8 mg) não são associadas com o aparecimento de miostes. Em caso de mialgia ou dor esmagada no local da injeção, deve ser determinado o nível de creatina kinase.

Se o diagnóstico de miostes for confirmado pelo aumento dos valores de creatina kinase e pela biópsia ou se outra forma de sensibilidade do metacresol for observado, Saizen® 8 mg deve ser dissolvido em solvente que não contenha metacresol ou deve ser substituído por uma preparação de somatropina que não contenha conservantes.

A deficiência do hormônio do crescimento no adulto é uma condição que dura a vida toda e que deve ser tratada de acordo, entrando a experiência com pacientes com mais de sessenta anos de idade que passaram por tratamento prolongado é limitada.

#### Uso durante a gravidez e lactação

Gravidez: Para Saizen® não há disponível nenhum dado clínico sobre gravidez exposta. Assim, desconhe-se seu risco para humanos. Embora os estudos com animais não apontem um risco em potencial durante a gravidez, Saizen® deve ser interrompido caso ocorra uma gravidez. Lactação: Não se sabe se hormônios peptídicos e óxigenos são excretados no leite materno, mas é improvável que a proteína intacta seja absorvida no trato gastrointestinal do bebê.

#### Efeitos na habilidade de dirigir ou operar máquinas

Saizen® não interfere na capacidade do paciente de dirigir ou de usar maquinaria.

#### Interações Medicamentosas

A terapia concomitante com corticosteróides pode inibir a resposta de Saizen®. Além disso substâncias como, glicosaminoglicanos, estrogênios, androgênios e agentes anabólicos podem interferir na ação de Saizen®. A administração de Saizen® deve ser interrompida caso haja observação de desconforto. Entretanto, quando a somatropina é administrada em combinação com medicamentos, sabidamente metabolizados por enzimas hepáticas CYP P450 3A4, é aconselhável monitorar a eficácia clínica desses medicamentos.

#### Reações adversas a medicamentos

##### Formações de anticorpos

Em alguns pacientes, podem ser formados anticorpos contra a somatropina; desconhe-se a significância clínica desses anticorpos, embora, até o momento, esses anticorpos tenham sido de baixa capacidade de ligação e não tenham sido associados com atenuação de crescimento, exceto em pacientes com defeitos genéticos. Em exemplos muito raros, em que a baixa estrutura se deve a deleção do complexo de genes do hormônio do crescimento, o tratamento com o hormônio do crescimento pode induzir a atenuação de anticorpos. Qualquer paciente que apresente deficiência de hormônio do crescimento confirmada que não responder ao tratamento com saizen deve ser examinado quanto à presença de anticorpos contra o hormônio do crescimento e o estado da tireóide deve ser determinada. O tratamento com proteínas humanas pode causar reações de hipersensibilidade (ex.: vermelhidão e prurido no local da injeção). A deficiência de volume extracelular é uma característica em pacientes com

deficiência do hormônio do crescimento. Esta deficiência é rapidamente corrigida após o início do tratamento com Somatropina. Crianças com um número pequeno de crianças que apresentam Anosmia podem desenvolver Anosmia durante o tratamento com Somatropina. Crianças com deficiência de crescimento, também as crianças que possuem um número maior de crianças com deficiência de hormônio do crescimento. Não há evidências nenhuma relação causal a terapia com hormônio do crescimento. Espera-se retenção de fluidos durante a terapia de substituição com hormônio do crescimento em adultos. Edema, inchaço das articulações, artralgias, mialgias e parastesias podem ser manifestações clínicas da retenção de fluidos. No entanto, esses sintomas / sinais normalmente são passageiros e dependentes da dose.

As reações adversas relacionadas abaixo são classificadas de acordo com a frequência de ocorrência da seguinte forma:

Muito Comum	≥ 1/10
Comum	> 1/100 - < 1/10
Incomum	> 1/1000 - < 1/100
Rara	> 1/10000 - < 1/1000
Muito rara	≤ 1/10000

#### Reações locais da aplicação

Comum: Reações no local da injeção como dor, parêstesia, vermelhidão ou edema. Lipoatrofia localizada, que pode ser evitada variando o local da injeção.

#### Distúrbios do Sistema Nervoso

Comum em adultos/ Incomum em crianças: parêstesia, hipaestésia (somente em adultos). Incomum: Hipertensão intracranial idiopática benigna.

#### Distúrbios cardíacos

Muito raro: hiperparatireoidismo.

#### Distúrbios musculoesqueléticos

Comum em adultos/ Incomum em crianças: artralgia. Muito raro: deslocamento de epífise femoral capital (epifisiólise femoral capital) ou necrose avascular da cabeça do fêmur.

#### Distúrbios do sistema linfático e sanguíneo

Muito comum em adultos (mais de 15%) Incomum em crianças: edema. Distúrbios do sistema metabólico e nutricional.

Resistência à insulina pode resultar em hiperinsulinismo e, em casos raros, em hiperglicemia espontaneamente ou com a redução do tratamento.

Pacientes adultos com deficiência do hormônio do crescimento diagnosticados durante a infância relatam menos eventos adversos que os pacientes com deficiência do hormônio que foram detectados na fase adulta.

A administração intramuscular irregular de Saizen® está associada com o aparecimento de hiperglicemia.

#### Eventos adversos observados em crianças com a mesma classe terapêutica

Raramente podem ocorrer casos de convulsões, exacerbação de um psoríase existente e Hipercolesterolemia de crianças.

Hoje não há dados de segurança de longo prazo em pacientes com Síndrome de Prader-Willi. Porém, há relatos de tratamento com somatropina. Saizen® não é indicado para o tratamento de pacientes com Síndrome de Prader-Willi.

#### Superdosagem

Não houve relato de nenhum caso de superdosagem aguda. Entretanto, exceto as doses recomendadas pode provocar efeitos colaterais. A superdosagem pode levar a hipoglicemia e, subsequentemente, à hiperglicemia. Além disso, e provavelmente que superdosagem de somatropina provoque manifestações de retenção de fluidos.

#### Armazenagem e prazo de validade

Saizen® 1,33 mg (4U) (U) (U) liofilizado é válido por 24 meses, quando mantido no frasco-ampola liofilizado em temperatura entre 2 °C e 8 °C, não congelar.

Saizen® 8 mg "click easy" (U) liofilizado é válido por 36 meses, quando mantido no frasco-ampola liofilizado em temperatura entre 15 °C e 30 °C, não congelar.

#### Atenção ao armazenamento

Saizen® 1,33 mg (4U) deve ser conservado sob refrigeração, protegido da luz, em temperatura entre 2 °C e 8 °C. Não congelar. "ESTE MEDICAMENTO, DEPOIS DE RECONSTITUÍDO, DEVERÁ SER CONSUMIDO EM ATÉ 24 HORAS".

Saizen® 8 mg "click easy" deve ser conservado sob refrigeração, protegido da luz, em temperatura entre 2 °C e 8 °C. Não congelar. "ESTE MEDICAMENTO, DEPOIS DE RECONSTITUÍDO, DEVERÁ SER CONSUMIDO EM ATÉ 28 DIAS".

#### VENDA SOB PRESCRIÇÃO MÉDICA

#### SÓ PODE SER VENDIDO COM RETENÇÃO DA RECEITA

Nº de lote, data de fabricação e prazo de validade. Vide cartucho

Saizen® 1,33 mg (4U): Reg. M.S. nº 1.00899.0350.001-1

Saizen® 8 mg: Reg. M.S. nº 1.00899.0350.002-8

#### Responsável Técnico:

Geraldo César Monteiro de Castro - CRF-RJ nº 14021

#### Fabricado por:

Saizen® 1,33 mg (4U):  
Merck Serono S.A.  
Zone Industrielle de l'Ourmetz, 1170  
Aubonne - Suíça

#### Saizen® 8 mg "click easy":

Merck Serono S.p.A  
Zone Industriale  
70123 - Bari - Itália

#### Embalado por:

ATUSA - Arns Trading Uruguay S. A.  
Montevideo - Uruguai

#### Importado e distribuído por:

MERCK S.A.  
CNPJ 33.069.212/0001-84  
Estrada dos Bandeirantes, 1099  
Rio de Janeiro - RJ - CEP 22710-571  
Indústria Brasileira

Merck Serono é uma divisão de Merck S.A.

#### Serviço de Atendimento ao Consumidor - SAC Merck Serono

0800-113320

www.papmerckserono.com.br

