



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**Pós-graduação em Processos Interativos  
dos Órgãos e Sistemas**

**Lilian Souza Campos**

**Regeneração de defeito ósseo crítico com novos  
arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases  
amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com  
zinco**

Salvador  
2015

**Lilian Souza Campos**

**Regeneração de defeito ósseo crítico com novos  
arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases  
amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com  
zinco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa**

**Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Maurício C. Mendes  
Prof. Dr. Raúl García Carrodegua**

Salvador  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Departamento de Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde  
Sistema de Bibliotecas da UFBA

---

C198 Campos, Lilian Souza.

Regeneração de defeito ósseo crítico com novos arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com zinco / Lilian Souza Campos. - Salvador, 2015.

126 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

Coorientadores: Prof. Dr. Carlos Maurício Cardeal Mendes, Prof. Dr. Raúl García Carrodegas.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 2015.

1. Materiais biocompatíveis. 2. Regeneração óssea. 3. Osteogênese. 4. Zinco. 5. Hidroxiapatita. I. Rosa, Fabiana Paim. II. Mendes, Carlos Maurício C. III Carrodéguas, Raúl Garcia. IV. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. V. Título.

CDU: 616.314

---

LILIAN SOUZA CAMPOS

**Regeneração de defeito ósseo crítico com novos arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com zinco**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Aprovada em, \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Fabiana Paim Rosa, Orientadora** \_\_\_\_\_  
Doutora em Odontologia

**Carlos Mauricio Cardeal Mendes, Coorientador** \_\_\_\_\_  
Doutor em Saúde Coletiva

**Raúl García Carrodeguas, Coorientador** \_\_\_\_\_  
Doutor em Ciências Químicas

**Roberto Paulo Correia de Araújo** \_\_\_\_\_  
Livre Docente em Odontologia

**Eliana Cristina da Silva Rigo** \_\_\_\_\_  
Doutora em Ciência e Engenharia dos Materiais

*À minha família, que me apoia, ensina e conforta, sempre.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela maravilhosa dádiva que é a vida e pela oportunidade de sempre poder recomeçar;

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa pela compreensão, paciência e apoio;

Ao meu coorientador Prof. Dr. Carlos Maurício Cardeal Mendes pelo valioso auxílio, atenção e ensinamentos;

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Raúl García Carrodegua, pela disponibilidade e incentivo;

Ao Prof. Dr. Roberto Paulo Correia de Araújo, coordenador do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa;

Ao Dr. Aryon de Almeida Barbosa Júnior, pela gentileza na análise histológica das lâminas;

À Sussette e ao Arcádio pelo preparo e caracterização dos biomateriais;

Aos meus colegas do grupo LBTB pela convivência e ajuda;

Ao Júnior, funcionário do Biotério da UEFS, pelo trabalho e cuidado com os animais;

Às técnicas de laboratório, Cristina e Elisângela pelo processamento das amostras;

Aos secretários do Programa de Pós-graduação, Marcelo, Célia e Oelma, pela atenção, carinho e eficiência.

Aos professores que participaram desta jornada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho;

Aos animais que, com suas vidas, tornaram possível a realização deste e de tantos outros trabalhos científicos.

*“O homem é do tamanho de seu sonho”.*

*Fernando Pessoa*

CAMPOS, Lilian Souza. **Regeneração de defeito ósseo crítico com novos arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com zinco.** Salvador, 2015. 126 f., il. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia.

## RESUMO

**Introdução:** A regeneração de grandes defeitos ósseos continua a ser um desafio clínico para a medicina regenerativa e impulsiona as pesquisas para o desenvolvimento de biomateriais mais osteogênicos. Com este intuito, novos biomateriais sintéticos foram projetados como arcabouços para regeneração óssea.

**Objetivo:** Avaliar quatro diferentes formulações de biomateriais sintéticos experimentais compostos por monetita, hidroxiapatita, fosfato de cálcio amorfo e gel de sílica, dopadas ou não com zinco, na regeneração de defeito ósseo crítico.

**Materiais e métodos:** Para este estudo, foram utilizados 105 ratos distribuídos aleatoriamente para a composição de sete grupos denominados GLL, GPP, GAA, GOO, GHB, GCS e GCI. Nos seis primeiros grupos foi realizado um defeito de 8,5 mm de diâmetro na calvária. Nos quatro primeiros grupos foram implantados os biomateriais sintéticos experimentais LL, PP, AA (Sil-Oss<sup>®</sup>) e OO. No quinto grupo (GHB) foi implantada uma hidroxiapatita bovina comercial (Bio-Oss<sup>®</sup>). No sexto grupo (GCS) o defeito foi mantido apenas com o coágulo sanguíneo. No sétimo grupo (GCI) a calvária foi mantida íntegra. Os animais foram mortos após os pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias pós-operatórios e as calvárias recolhidas. As amostras foram processadas e avaliadas através de análises histomorfológica e morfométrica por microscopia de luz comum e análise estatística, através de ANOVA-*one way*, com teste de Dunnett, Tukey, e medidas de tamanho de efeito  $\eta^2$  e  $d$  de Cohen. **Resultados:** Como principais resultados, observou-se, no ponto biológico de 15 dias, discreto edema e infiltrado inflamatório crônico nos seis primeiros grupos. Em todos os pontos biológicos ocorreu uma discreta reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho, com células gigantes próximas às partículas dos biomateriais. Aos 120 dias pós-operatório, todos os grupos mostraram maior porcentagem de matriz osteoide em comparação ao GCS: GLL ( $d = 3,5$ ;  $p < 0,001$ ); GPP ( $d = 4,0$ ;  $p < 0,001$ ), GAA ( $d = 7,6$ ;  $p < 0,001$ ), GOO ( $d = 8,0$ ;  $p < 0,001$ ), GHB ( $d = 3,7$ ;  $p < 0,001$ ). Na análise das variâncias da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 120 dias nos grupos implantados com as diferentes formulações dos biomateriais sintéticos experimentais, foram encontradas diferenças significativas entre: GAA e GLL ( $d = 4,6$ ;  $p < 0,001$ ), GAA e GPP ( $d = 2,9$ ;  $p < 0,001$ ), GOO e GLL ( $d = 5,0$ ;  $p < 0,001$ ) e GOO e GPP ( $d = 3,06$ ;  $p < 0,001$ ). **Conclusão:** Concluiu-se que, todos os biomateriais foram biocompatíveis e osteocondutores; o zinco otimizou a regeneração óssea de defeito crítico sem diferenças estatisticamente significantes entre GAA e GOO ( $d = 0,06$ ;  $p = 0,999$ ), com melhor equalização entre a biodegradabilidade e manutenção do arcabouço para o biomaterial sintético experimental na formulação OO.

**Palavras-chave:** Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Osteogênese. Zinco. Hidroxiapatita.



CAMPOS, Lilian Souza. **Critical bone defect regeneration with novel scaffolds based on monetite, hidroxyapatite and amorphous fases of calcium phosphate and silica, doped or not with zinc.** Salvador, 2015. 126 f., II. Thesis (Doctorate in Interactive Processes of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia.

## ABSTRACT

**Introduction:** Bone regeneration remains a challenge to regenerative medicine and drives the researches for the development of more osteogenic biomaterials. For this purpose, new synthetic biomaterials were designed as scaffolds for bone regeneration. **Objective:** The aim of this study was to evaluate four different formulations of new biomaterials consisting of monetite, hydroxyapatite and amorphous fase of calcium phosphate and silica, doped or not with zinc, in the critical bone defect regeneration. **Materials and methods:** For this study, it was used 105 rats randomly assigned to the composition of seven groups called , GLL, GPP, GAA, GOO, GHB, GCS and GCI. In the first six groups was carried out a defect of 8.5 mm in diameter in the skull. In the first four groups experimental synthetic biomaterials, LL, PP, AA (Sil-Oss<sup>®</sup>) and OO, were implanted. In the fifth group (GHB) was deployed a commercial bovine hydroxyapatite (Bio-Oss<sup>®</sup>). In the sixth group (GCS) the defect was maintained only with blood clot. In the seventh group (GCI) the calvaria was kept integrous. The animals were killed after biological points of 15, 45 and 120 days postoperatively and the calvaria were collected. The samples were processed and evaluated by histomorphological and morphometric analysis by ordinary light microscopy and statistical analysis using ANOVA-one way with Dunnett's test, Tukey's test and effect size measures  $\eta^2$  and d Cohen. **Results:** As major results, it was observed, at biological point of 15 days, moderate cronic inflammatory reaction and edema in the first six groups; in all biological point there was a mild chronic inflammatory reaction, with giant cells nearby to biomaterials particles; at 120 days, all groups showed higher percentage of osteoid matrix compared to the GCS: GLL (d = 3.5; p <0.001; GPP (d = 4.0; p <0.001), GAA (d = 7.6, p <0.001), GOO (d = 8.0; p <0.001) GHB (d = 3.7; p <0.001), and CGI (p = 11.2; p <0.001). In the analysis of variances of the groups implanted with synthetic experimental biomaterials, significant differences were found between: GAA and GLL (d = 4.6; p <0.001), GAA and GPP (d = 2.9; p <0.001), GOO and GLL (d = 5.0; p <0.001), GOO and GPP (d = 3.1; p <0.001). **Conclusion:** In conclusion, all biomaterials were biocompatible and osteoconductive; zinc optimized critical bone defect regeneration with no statistically significant differences between GAA and GOO (d = 0.06; p = 0.999); with better biodegradation and maintenance of the scaffold for the experimental synthetic biomaterial in OO formulation.

**Keywords:** Biocompatible materials, Bone regeneration, Osteogenesis, Zinc, Hydroxyapatite.

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

<b>Figura 1</b>	Formação e maturação do osteócito	<b>23</b>
<b>Figura 2</b>	Esquema do processo de preparação dos biomateriais experimentais sintéticos	<b>39</b>
<b>Figura 3</b>	Gráficos de DRX dos biomateriais	<b>42</b>
<b>Figura 4</b>	Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial AA, Sil-Oss <sup>®</sup>	<b>44</b>
<b>Figura 5</b>	Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial controle, Bio-Oss <sup>®</sup>	<b>45</b>
<b>Figura 6</b>	Gráfico com a solubilidade dos biomateriais experimentais (LL, AA, PP, OO) e do controle (BioOss <sup>®</sup> )	<b>47</b>
<b>Figura 7</b>	Ensaio de citotoxicidade dos biomateriais experimentais e do biomaterial controle (BioOss <sup>®</sup> )	<b>49</b>
<b>Figura 8</b>	Sequência cirúrgica	<b>54</b>
<b>Figura 9</b>	Divisão da calvária implantada	<b>55</b>
<b>Figura 10</b>	Vista frontal de corte histológico da calvária na região do defeito	<b>56</b>
<b>Figura 11</b>	Exemplo da avaliação morfométrica de espessura da calvária íntegra em uma fotomicrografia	<b>59</b>
<b>Figura 12</b>	Exemplos das avaliações morfométricas da área de uma partícula de biomaterial	<b>60</b>
<b>Figura 13</b>	Partículas de biomateriais sintéticos experimentais no defeito	<b>65</b>
<b>Figura 14</b>	Partículas de hidroxiapatita bovina no defeito	<b>66</b>
<b>Figura 15</b>	Aspectos inflamatórios nos grupos implantados	<b>67</b>
<b>Figura 16</b>	Vasos sanguíneos na calvária íntegra	<b>68</b>
<b>Figura 17</b>	Vasos sanguíneos nos grupos implantados	<b>69</b>

<b>Figura 18</b>	Proteínas colagênicas nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais	<b>71</b>
<b>Figura 19</b>	Tecido conjuntivo fibroso no grupo GHB	<b>72</b>
<b>Figura 20</b>	Tecido conjuntivo fibroso no GCS	<b>73</b>
<b>Figura 21</b>	Conformação lamelar do tecido ósseo no GCI	<b>74</b>
<b>Figura 22</b>	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 15 dias	<b>76</b>
<b>Figura 23</b>	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 45 dias	<b>77</b>
<b>Figura 24</b>	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 120 dias	<b>78</b>
<b>Figura 25</b>	Osteogênese GHB	<b>79</b>
<b>Figura 26</b>	Osteogênese GCS	<b>80</b>
<b>Figura 27</b>	Calvária íntegra GCI	<b>80</b>
<b>Figura 28</b>	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 15 dias	<b>82</b>
<b>Figura 29</b>	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 45 dias	<b>85</b>
<b>Figura 30</b>	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 120 dias	<b>88</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição química e de fases dos biomateriais experimentais	<b>43</b>
<b>Tabela 2</b>	Superfície específica, densidade aparente e porosidade dos biomateriais experimentais e do controle	<b>46</b>
<b>Tabela 3</b>	Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico	<b>51</b>
<b>Tabela 4</b>	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 15 dias de acordo com os grupos	<b>83</b>
<b>Tabela 5</b>	Comparação múltipla 2 a 2 entre grupos e GCS aos 15 dias	<b>83</b>
<b>Tabela 6</b>	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 15 dias	<b>83</b>
<b>Tabela 7</b>	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 45 dias de acordo com os grupos	<b>86</b>
<b>Tabela 8</b>	Comparações múltiplas 2 a 2 entre grupos e GCS aos 45 dias	<b>86</b>
<b>Tabela 9</b>	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 45 dias	<b>86</b>
<b>Tabela 10</b>	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 120 dias de acordo com os grupos	<b>89</b>
<b>Tabela 11</b>	Comparações múltiplas 2 a 2 entre grupos e GCS aos 120 dias	<b>89</b>
<b>Tabela 12</b>	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 120 dias	<b>89</b>
<b>Tabela 13</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 15 dias	<b>91</b>
<b>Tabela 14</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 45 dias	<b>91</b>
<b>Tabela 15</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 120 dias	<b>91</b>
<b>Tabela 16</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 15 dias	<b>93</b>

<b>Tabela 17</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 45 dias	<b>93</b>
<b>Tabela 18</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 120 dias	<b>93</b>
<b>Tabela 19</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 15 dias	<b>95</b>
<b>Tabela 20</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 45 dias	<b>95</b>
<b>Tabela 21</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 120 dias	<b>95</b>
<b>Tabela 22</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 15 dias	<b>97</b>
<b>Tabela 23</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 45 dias	<b>97</b>
<b>Tabela 24</b>	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 120 dias	<b>97</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

<b>AA</b>	SilOss <sup>®</sup> na formulação AA
<b>Bm</b>	Biomaterial
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>CG</b>	Célula gigante
<b>CI</b>	Células inflamatórias
<b>d</b>	Desvios
<b>DC</b>	Defeito crítico
<b>DRX</b>	Difração de Raios X
<b>E</b>	Espessura
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetracético
<b>Fb</b>	Fibroblasto
<b>GCV</b>	Grupo Calvária Vazia
<b>GHB</b>	Grupo com implantação de BioOss <sup>®</sup>
<b>GLL</b>	Grupo com implantação de SilOss <sup>®</sup> na formulação LL
<b>GPP</b>	Grupo com implantação de SilOss <sup>®</sup> na formulação PP
<b>GAA</b>	Grupo com implantação de SilOss <sup>®</sup> na formulação AA
<b>GOO</b>	Grupo com implantação de SilOss <sup>®</sup> na formulação OO
<b>GCI</b>	Grupo Calvária Íntegra
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>HAB</b>	Hidroxiapatita bovina
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>ICS</b>	Instituto de Ciências da Saúde
<b>LBTB</b>	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
<b>LL</b>	Biomaterial experimental sintético na formulação LL
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>M</b>	Monetita
<b>Mo</b>	Medula óssea
<b>MO</b>	Matriz osteoide
<b>Ob</b>	Osteoblasto
<b>Oc</b>	Osteócito
<b>OO</b>	Biomaterial experimental sintético na formulação OO

<b>PIFG</b>	Picrosírius <i>red fast green</i>
<b>PP</b>	Biomaterial experimental sintético na formulação PP
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SF</b>	Septos fibrosos
<b>TCF</b>	Tecido conjuntivo fibroso
<b>TDE</b>	Tamanho do efeito
<b>TMG</b>	Tricrômico de Masson Goldner
<b>UEFS</b>	Universidade Estadual de Feira de Santana
<b>UFBA</b>	Universidade Federal da Bahia
<b>VS</b>	Vaso sanguíneo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
4.1. BIOMATERIAIS	38
4.1.1. Difração de raios X	41
4.1.2. Análise química	43
4.1.3. Microestrutura	43
4.1.4. Área superficial, densidade e porosidade	45
4.1.5. Solubilidade <i>in vitro</i>	46
4.1.6. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	47
4.2. AMOSTRA	50
4.3. ETAPA CIRÚRGICA	52
4.4. ETAPA LABORATORIAL	55
4.5. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	57
4.6. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	58
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>63</b>



5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	64
5.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS COM ANÁLISE ESTATÍSTICA	81
5.2.1. Porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por nova matriz osteoide	81
5.2.2. Porcentagem da distância linear do defeito ósseo crítico ocupada por matriz osteoide	90
5.2.3. Porcentagem da área do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso	92
5.2.4. Porcentagem da área do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomateriais	94
5.2.5. Espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico	96
6. DISCUSSÃO	98
7. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	111
ANEXOS	122

## *INTRODUÇÃO*

## 1. INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos críticos constituem desafios clínico para a medicina regenerativa. Dentre as técnicas utilizadas para solucionar tais situações, o uso de biomateriais como substitutos ósseos tem sido das mais preconizadas devido, principalmente, à redução da morbidade associada à remoção de enxertos autógenos, porém ainda não são totalmente eficazes.

Desta forma, o desenvolvimento e aprimoramento de biomateriais substitutos ósseos mais osteogênicos são de relevante importância para a melhoria da qualidade de vida da população.

A depender da sua formulação, características físico-químicas e da forma de obtenção, é possível o aprimoramento de suas capacidades de osteointegração, osteocondutividade, osteoindutividade, bioatividade e biodegradabilidade, importantes na regeneração do tecido ósseo.

Dentre os vários biomateriais com esta finalidade, os compostos à base de fosfato de cálcio têm se destacado devido à sua alta biocompatibilidade, ausência de toxicidade local e sistêmica, além de sua similaridade com os componentes inorgânicos do tecido ósseo, porém, possuem como desvantagem uma baixa resistência mecânica, o que limita sua utilização.

Apesar disto, são considerados bons arcabouços para o reparo ósseo e permitem associações a outros biomateriais e substituições iônicas em sua formulação capazes de melhorar as suas capacidades regenerativas.

A hidroxiapatita é um importante representante desta classe de biomateriais e o principal componente mineral do tecido ósseo. Pode ser obtida de fonte natural ou sintética, é biocompatível e osteocondutora, porém possui baixa solubilidade em fluidos orgânicos e, conseqüentemente, reduzida taxa de biometabolização. Esta característica pode ser considerada uma vantagem por conferir ao arcabouço uma alta estabilidade porém, pode retardar a sua completa substituição por *de novo* osso, o que configura-se em uma desvantagem na regeneração tecidual.

Outro fosfato de cálcio que tem merecido destaque é a monetita que, ao contrario da hidroxiapatita, possui alta solubilidade em fluídos orgânicos e, deste modo, disponibiliza mais facilmente íons de alta bioatividade em um microambiente em regeneração óssea. Entretanto, a alta taxa de biodegradação associada à esta solubilidade pode, a depender das características do defeito, comprometer a estabilidade do arcabouço prematuramente à completa neoformação e mineralização da matriz osteoide nele recém depositada.

Neste estudo, avaliamos quatro biomateriais experimentais, sintetizados em baixas temperaturas, que variaram entre si nas quantidades de monetita, de hidroxiapatita e de uma fase amorfa formada por fosfato de cálcio e gel de sílica, com ou sem conteúdo de zinco, implantados em um defeito crítico à regeneração óssea espontânea.

A estratégia de utilização de dois tipos de fosfato de cálcio em conjunto com o gel de sílica em proporções adequadas objetivou na obtenção de arcabouços que fossem biodegradáveis, capazes de susterm-se pelo tempo necessário à completa regeneração do defeito ósseo e que promovessem uma osteoindutividade, além da já esperada osteocondutividade e integração ao tecido ósseo.

Em duas destas formulações, o zinco foi adicionado e substituiu parte do cálcio da monetita, o que aumentou a bioatividade e a biometabolização destes compostos.

Os resultados preliminares obtidos mostraram um elevado potencial osteogênico nestes novos biomateriais, e contribuíram, juntamente com outros estudos, para que uma destas formulações fosse recentemente aprovada na Comunidade Européia como um biomaterial para a regeneração de defeitos ósseos, com especial utilização na clínica odontológica e na cirurgia maxilo-facial, sob o nome comercial Sil-Oss®.

Ao final deste estudo, foi nos possível vislumbrar que nos encontrávamos diante de uma nova geração de substitutos ósseos, promissores, capazes de contribuir com a regeneração de defeitos ósseos críticos e com a melhoria da qualidade de vida da população.

***REVISÃO DE LITERATURA***

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os defeitos críticos são caracterizados pela incapacidade de regeneração espontânea dos tecidos por eles envolvidos, com conseqüente reparo pela formação total ou parcial de uma fibrose que, na maioria das situações, ocasiona alterações funcionais e estéticas, com prejuízos à saúde e à inserção social dos indivíduos por eles acometidos (LIM; LEE; YEO, 2000; BOROJEVIC, 2008).

Persistem como um desafio clínico para a medicina regenerativa e podem estar associados às dimensões das lesões, à perda do arcabouço, ao metabolismo dos tecidos afetados, à insuficiência de vascularização local e aos distúrbios sistêmicos existentes (CARANO; FILVAROFF, 2003; KIM et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; BARRETO 2011; CAMPOS, 2012; ROLIM; 2013).

No tecido ósseo estão, ainda, correlacionados à instabilidade de fragmentos e, geralmente, são ocasionados por infecções, traumas e ressecções cirúrgicas de grandes cistos e tumores (BOROJEVIC, 2008; CAMPOS, 2012).

Para melhor compreensão desta problemática e desenvolvimento de estratégias para sua resolução é fundamental a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de formação, neoformação e manutenção óssea (ANDRADE et al., 2007).

O osso é um tipo de tecido conjuntivo especializado mineralizado, dinâmico, formado por uma parte orgânica e outra parte mineral, que lhe conferem características importantes para cumprir com suas funções de proteção, locomoção e de armazenamento de íons importantes para a homeostase (KIM et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

A fase mineral, formada especialmente por hidroxiapatita, contribui para o aumento de sua resistência mecânica, enquanto a fase orgânica, formada sobretudo por células e colágeno tipo I, é responsável pela manutenção de sua vitalidade e por sua plasticidade (KIM et al., 2006; ANDRADE et al., 2007; BELLIDO, 2014).

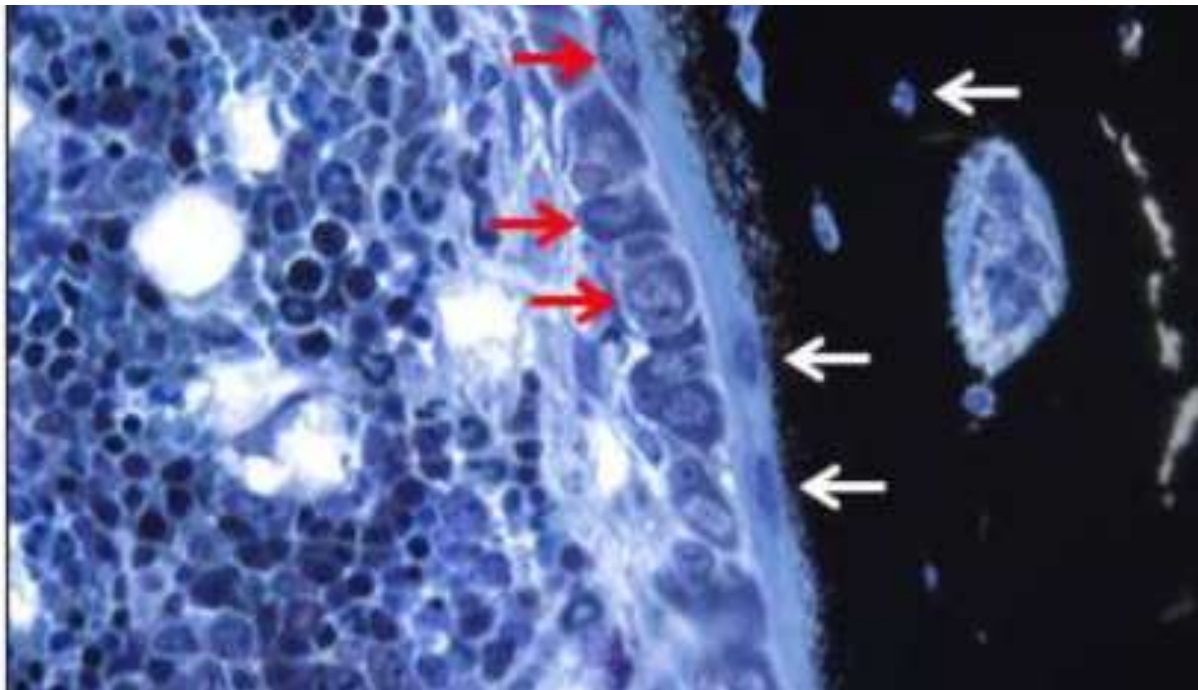
A remodelação e a regeneração óssea ocorrem de forma ativa durante toda a vida do indivíduo e são dependentes da diferenciação de células mesenquimais para a formação dos osteoblastos, encarregados de sintetizar e secretar a matriz osteoide (Figura 1). A regulação destes processos é mediada por uma sequência de

sinais moleculares geneticamente controlados, porém influenciados pelo meio (TURHANI et al., 2007; BELLIDO, 2014).

Quando os osteoblastos ficam aprisionados no interior desta matriz, passam a ser denominados de osteócitos (Figura 1). Estas células ocupam as lacunas do tecido ósseo e, por intermédio de prolongamentos citoplasmáticos nos canalículos ósseos, são capazes de responder à transmissão de estímulos internos e externos, e desencadear uma cascata de sinalização que irá resultar em reabsorção ou neoformação óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; BELLIDO, 2014).

A reabsorção óssea deve-se principalmente à presença dos osteoclastos, células derivadas da linhagem monocítico fagocitária, que se fundem em células gigantes multinucleadas, e são capazes de degradar e absorver a matriz óssea (GARRIGUES et al, 2005; ANDRADE et al., 2007; BELLIDO, 2014).

**Figura 1. Formação e maturação do osteócito.** Fileira de osteoblastos (setas vermelhas de fundo); osteócito recentemente incorporado (topo seta vermelha); dois osteócitos inteiramente embebidos na matriz osteoide (setas brancas inferiores); osteócito incorporado na matriz óssea mineralizada (seta branca superior).



Fonte: BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. *Calcif Tissue Int.*, New York, v. 94, n. 1, p. 25–34. 2014.

Após estes eventos, em situações de normalidade, células osteoprogenitoras são recrutadas e diferenciam-se em osteoblastos, que são estimulados a sintetizarem nova matriz osteoide e iniciar a regeneração óssea (KIM et al., 2006; BELLIDO, 2014).

Esta nova matriz é composta basicamente por fibras colágenas, ainda desorganizadas, e com reduzida deposição mineral. Com a evolução deste processo ocorre uma organização destas fibras em uma estrutura lamelar, com maior deposição mineral (GARRIGUES et al., 2005; LEONG, 2007, BELLIDO, 2014).

Este mecanismo dinâmico e contínuo permite a regeneração de lesões de dimensões pequenas, com a devolução da forma e da função tecidual e estrutural, entretanto, em grandes defeitos ósseos, esta capacidade regenerativa é insuficiente e, portanto, são necessárias terapias regenerativas auxiliares (HING, 2004; KIM et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL, 2008; BARRETO 2011; CAMPOS, 2012; ROLIM, 2013).

Dentre as opções de intervenções regenerativas, o enxerto autógeno persiste como o padrão ouro, pois fornece como substrato o próprio tecido ósseo do indivíduo, com um suprimento vascular e celular para a região enxertada, sem despertar resposta antigênica ou reação de corpo estranho. Entretanto, a morbidade associada ao procedimento cirúrgico de coleta, a quantidade restrita de tecido ósseo na região doadora, o potencial risco de infecção e a alta taxa de reabsorção do enxerto são desvantagens que desestimulam a sua utilização (BOROJEVIC, 2008; MOKBEL et al., 2008; DAHLIN; JOHANSSON, 2011).

Com o intuito de encontrar soluções, as pesquisas no sentido do desenvolvimento e do aprimoramento de novos biomateriais, mais osteogênicos, capazes de guiar e favorecer os processos regenerativos do tecido ósseo tem sido impulsionadas (MOKBEL et al., 2008; PADILLA et al., 2015).

Biomateriais são substâncias ou compostos de origem natural ou sintética, biocompatíveis, com exceção dos fármacos e quimioterápicos, que possam substituir de forma permanente ou transitória os tecidos perdidos, e estimular reações químicas e biológicas que melhorem suas funções (BORETOS; EDEN, 1984; FLECKENSTEIN et al., 2006).



Quando implantado em tecido ósseo, um biomaterial deve funcionar como um arcabouço que possibilite a migração, a adesão e a proliferação de células da linhagem osteogênica e preferencialmente de forma a ser totalmente substituído pela nova matriz osteoide sintetizada pelos osteoblastos e favorecer a mineralização deste novo tecido em neoformação (ANSELME, 2000; HING, 2004; DIETMAR; GARCIA, 2005; MASTROGIACOMO et al., 2005).

Este desempenho está condicionado à sua formulação, características físico-químicas, topografia, rugosidade, forma, taxa de bioabsorção e manutenção do arcabouço adequado à neoformação óssea, bem como à presença de espaços que possibilitem a proliferação vascular e garantam a nutrição e trocas metabólicas deste tecido em neoformação (ANSELME, 2000; PADILLA et al., 2015).

Os biomateriais substitutos ósseos podem ser apresentados em diferentes formas como pastas, pós, particulados ou em blocos, densos ou porosos, de tamanho e porosidade diferentes, isolados, compostos ou na forma de compósitos, com vantagens e desvantagens quando comparados ao enxerto ósseo autógeno (LIM, 2000; LIND, 2000; TORRES et al., 2015).

Previamente à utilização clínica de novos biomateriais, estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para a avaliação das suas interações com as células, os tecidos e os órgãos, de forma local e sistêmica (GOTHARD et al., 2014).

Os estudos de implantação em animais permitem uma compreensão global da sua performance em um sistema complexo, complementa os resultados obtidos *in vitro* e são de extrema importância na avaliação de sua eficácia (GOTHARD et al., 2014).

Os estudos *in vitro* de biomateriais substitutos ósseos são capazes de avaliar a viabilidade celular, a citocompatibilidade, a adesão e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas e da linhagem osteogênica quando em contato com a superfície dos biomateriais. Os experimentos *in vivo* têm como objetivo analisar a biocompatibilidade do biomaterial, por meio da avaliação da intensidade da resposta inflamatória, da qualidade celular, da angiogênese, bem como do seu potencial osteogênico (ANSELME, 2000; BOROJEVIC, 2008).

Para uma adequada avaliação, a escolha do modelo animal e as características morfológicas do defeito ósseo são de grande importância e devem reproduzir as situações críticas ao reparo espontâneo. Dentre os modelos animais, o

*Rattus norvegicus* é o mais utilizado em experimentos *in vivo* para testar o potencial osteogênico de novos biomateriais e oferece várias vantagens com relação aos demais animais como, por exemplo, o porte reduzido, ciclos vitais curtos, prole numerosa, disponibilidade, facilidade de manutenção e manejo, além da possibilidade de padronização genética, entre outras (MIGUEL et al., 2006; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011).

Dos vários locais de implantação, a calvária do rato adulto oferece facilidade de acesso com reduzido risco de complicações pós-cirúrgicas, além de uma morfologia óssea díplex, com reduzida quantidade de medula óssea entre duas placas de osso cortical e baixo suprimento sanguíneo, o que limita o aporte de moléculas sinalizadoras, nutrientes e fatores de crescimento e reduz as possibilidades de regeneração óssea espontânea (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998).

Muitos estudos têm demonstrado que defeitos ósseos com mais de 8 mm de diâmetro efetuados na calvária de rato, associados à completa remoção do perióstio e da porção externa da dura-máter nesta região, apresentam uma neoformação óssea linear restrita às bordas ósseas, com um preenchimento da área remanescente da lesão por tecido conjuntivo fibroso de forma cicatricial. Portanto, estes defeitos são considerados críticos à regeneração óssea espontânea e capazes de cumprir com os requisitos para a avaliação de biomateriais substitutos ósseos (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL, 2008; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; CAMPOS; ROSA, 2012; ROLIM, 2013).

Desta forma, biomateriais que auxiliem a regeneração destes defeitos, oferecem grandes possibilidades de produzir bons resultados quando implantados em tecido ósseo humano (KLENKE et al., 2008; CAMPOS, 2012).

A biocompatibilidade de um biomaterial é um dos principais parâmetros a ser considerado nas avaliações pré-clínicas. Após ser atestada em estudos *in vitro*, a biocompatibilidade deve também ser avaliada *in vivo* e é definida como uma mínima resposta inflamatória ou imunitária após a sua interação com os fluidos tissulares presentes no microambiente do leito receptor (BOROJEVIC, 2008; CATAURO et al., 2013).

A confecção de defeito ósseo desencadeia uma resposta inflamatória causada pelo próprio ato cirúrgico, com rompimento vascular e extravasamento sanguíneo. Quando se associa a implantação de biomateriais à este procedimento, ocorre uma interação sangue-superfície do biomaterial com formação de coágulo sanguíneo, inflamação aguda, inflamação crônica do tipo corpo estranho com degradação do biomaterial, ou reação granulomatosa com possibilidade de encapsulamento fibroso (ANDERSON; RODRIGUES; CHANG, 2008).

O formato do biomaterial também deve ser adequado ao defeito estudado. Os biomateriais particulados oferecem uma relativa facilidade de inserção no leito receptor dos defeitos ósseos, com formação de poros intergranulares, importantes para a neoformação óssea e vascular na região a ser regenerada (KLENKE et al 2008; DEGIDI et al, 2006).

A forma e o tamanho da partícula têm relação direta com a área de superfície disponível para reagir com células e com fluidos biológicos (OONISH et al., 1999; CARVALHO, 2006).

Na superfície do biomaterial ocorrem os primeiros contatos com o microambiente e onde são adsorvidas proteínas, biomoléculas e água, importantes no direcionamento da resposta biológica à implantação (KURELLA; DAHOTRE, 2005; DOROZHKIN et al., 2010).

A rugosidade da superfície e a porosidade das partículas são também fatores importantes para que, ao ser implantado, o biomaterial seja capaz de mimetizar a estrutura óssea e permitir tanto a adesão de osteoblastos como a revascularização local, responsável pela nutrição do tecido em neoformação (OONISH et al., 1999, KLENKE et al. 2008; DOROZHKIN et al., 2010).

A morfologia e o tamanho de cada poro, com dimensões mínimas para favorecer a angiogênese, além de sua interconectividade, influenciam positivamente as respostas tissulares desencadeadas e conseqüentemente o reparo obtido (CORDARO et al., 2008; PORTER; RUCKH; POPAT, 2009; VOLKOV et al., 2010; CHACARTI et al., 2011).

De acordo com sua fonte de obtenção, um biomaterial pode ser classificado em duas grandes categorias: os naturais e os sintéticos (CANCEDDA; GIANONNI; MASTROGIACOMO, 2007).

Quanto à resposta biológica à presença do biomaterial, pode-se classificá-lo em bioinerte, biotolerado, bioativo e bioabsorvível (LIND et al., 2000; TORRONI, 2009).

Os bioinertes não provocam reação de corpo estranho no organismo e estão em contato direto com o tecido receptor, enquanto os biotolerados são aceitos pelo tecido receptor, porém envolvidos por tecido fibroso (BEST et al., 2008).

Os bioativos entram em contato direto com os tecidos vivos devido aos íons presentes em sua formulação e estimulam a neoformação óssea (DALAPICULA et al., 2006; LONG et al., 2008).

Os bioabsorvíveis são degradados, principalmente devido à sua solubilidade e pela ação biológica de células gigantes, características a uma reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho. Posteriormente, os compostos resultantes destes eventos são metabolizados e o arcabouço é gradualmente substituído pelo tecido ósseo em neoformação (GARRIGHES et al., 2005; DALAPICULA et al., 2006; DOROZHKIN, 2010).

Esta propriedade é desejável na regeneração óssea, desde que seja mantida a estabilidade dimensional do arcabouço pelo tempo necessário à completa regeneração tecidual (DALAPICULA et al., 2006; DOROZHKIN, 2010).

A osseointegração é também um requisito importante em um biomaterial de substituição óssea e relaciona-se com a capacidade do biomaterial em formar uma forte ligação com o tecido ósseo, com consequente aumento da atividade celular e de sua neoformação (JENSEN et al., 2012; MOTAMEDIAN et al., 2015).

Quando aplicados *in vivo*, os biomateriais podem promover osteogênese por meio de três mecanismos: osteocondução, osteopromoção e osteoindução (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Na osteocondução o biomaterial serve como arcabouço e propicia a migração, a adesão, a inserção e a proliferação celular. Na osteopromoção há estimulação das células osteogênicas do leito receptor ou do próprio enxerto ósseo

no sentido de promoverem a síntese de matriz osteoide, com consequente mineralização (DALAPICULA et al., 2006; BHATT; ROZENTAL, 2012; JENSEN et al., 2012; MOTAMEDIAN et al., 2015).

Na osteoindução, o biomaterial estimula células mesenquimais indiferenciadas a diferenciarem-se em células osteoprogenitoras e formar osso, inclusive em sítios ectópicos (SUH et al., 2001; ALBREKTSSON, JOHANSSON, 2001; DALAPICULA et al., 2006; BHATT; ROZENTAL, 2012; GONZÁLEZ-VASQUES; PLANELL; ENGEL, 2014).

Os biomateriais para enxerto ósseo devem servir tanto como arcabouço para a adesão de células osteoprogenitoras como fonte de cálcio e fósforo para a mineralização da nova matriz óssea (ANSELME, 2000; LEGEROS, 2002; ANDRADE et al., 2007; BEST et al., 2008).

Dentre os substitutos ósseos de origem natural, inúmeros trabalhos têm demonstrado que a matriz mineral do osso bovino é formada basicamente por hidroxiapatita similar a do tecido ósseo humano, com estrutura porosa, capaz de cumprir papel osteogênico, com a vantagem de uma grande disponibilidade (DEGIDI et al., 2006; SCARANO et al., 2006; TRAINI et al., 2007; SHIMITT et al., 2012).

Os substitutos ósseos de origem bovina existentes no mercado encontram-se o osso desmineralizado, o osso mineralizado, o osso composto e a proteína óssea morfogenética, cada um com uma indicação específica, a serem utilizados puros ou combinados com outros biomateriais ou mesmo com o osso autógeno, a ter-se em consideração o respeito aos limites biológicos e mecânicos que o material apresenta (WALLACE, et al., 2005; GALINDO-MORENO et al., 2007; TRAINI, et al., 2007; KRUSE et al., 2011).

O Bio-Oss<sup>®</sup> é uma estrutura mineral óssea bovina, obtida por meio de processo termoquímico, com remoção completa de proteínas, restos celulares e lipídios, com eliminação de risco imunológico e de contaminação bacteriológica e, comparativamente a outras hidroxiapatitas bovinas, considerada de melhor comportamento biológico quando implantada *in vivo* (CHACKARTCHI et al, 2011; LI et al., 2014; LUTZ et al., 2015).

Produzido por *Geistlich Biomaterials*, é distribuído na forma de blocos ou como grânulos de 0,25 a 1 mm e de 1 a 2 mm de diâmetro e possui estrutura química e física comparável à matriz mineral do osso humano, com arquitetura constituída por poros de tamanho variável, que favorecem a migração celular e vascular até o centro do enxerto (DEGIDI et al., 2006; SCARANO et al., 2006; TRAINI et al., 2007).

A alta segurança deste biomaterial, segundo o fabricante, baseia-se em medidas de controle que vão ao encontro acordo às diretivas europeias e americanas, as quais preconizam cuidados com a origem do rebanho, a qualidade dos matadouros, testes de saúde pré e pós-morte de cada animal, a seleção dos ossos, exclusivos das extremidades, e com métodos apropriados de inativação protéica e de esterilização.

Estudos de comportamento biológico de arcabouços bovinos sugerem que as diferentes características da superfície do Bio-Oss<sup>®</sup> desempenham um papel crítico na diferenciação celular óssea (BARONE et al, 2013; MASTRANGELO et al., 2013; PAKNEJAD et al., 2014) e sua inserção conduz à formação de um osso estável ao longo do tempo (PIATTELLI et al., 1999; LI et al., 2014).

Muitos estudos relatam que o Bio-Oss<sup>®</sup> é um substituto ósseo aceitável, pode ser usado como um material único para elevação do seio maxilar e é um método previsível para aumento dimensional da região posterior da maxila (SCARANO et al., 2006; LEE; CHEN; DARBY, 2012; LINDHE et al., 2013; LI et al, 2014; LUTZ et al., 2015; MOON et al., 2015), com melhor performance em relação aos biomateriais aloplásticos (MAH et al., 2004; CORDARO et al., 2008; KRUSE et al, 2011).

Estudos prospectivos de implantação de hidroxiapatita bovina relatam a presença de altas porcentagens de partículas incorporadas ao tecido ósseo neoformado, após longos períodos de realização do procedimento cirúrgico (ARTZI et al, 2003; CORDARO, et al. 2008; MORDENFELD et al., 2010).

Os biomateriais de origem sintética possuem vantagens e desvantagens frente aos de origem natural, a depender de sua formulação e síntese (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; MOTAMEDIAN et al., 2015; PADILLA et al., 2015).

Dentre os vários biomateriais substitutos ósseos, os compostos à base de cálcio e fosfato, têm se destacado devido à sua alta biocompatibilidade, ausência de toxicidade e similaridade com os componentes inorgânicos do osso (KLAMMERT et al., 2009; TAMIMI et al., 2009; TORRES et al., 2011; TORRES et al., 2015).

A osteogênese observada frente à implantação de compostos de cálcio e fosfato ocorre, em geral, através do mecanismo de osteocondução, além de serem capazes de adsorver proteínas, fatores de crescimento e auxiliar na diferenciação de células da linhagem osteogênica. Entretanto, em geral, possuem como desvantagem uma baixa resistência mecânica, que limita seu uso e estimula o desenvolvimento de novas associações à outros biomateriais que melhorem este comportamento (RIMINUCCI; BIANCO, 2003; JENSEN et al., 2012; MOTAMEDIAN et al., 2015).

Os biomateriais à base de fosfato de cálcio possuem diferentes graus de solubilidade, a depender de sua síntese e composição, a qual será influenciada pelo pH do local de implantação, por exemplo, a liberação de mediadores químicos por células inflamatórias causam uma redução do pH local e conferem um aumento da taxa de biodegradabilidade do implante (THORWARTH et al., 2005).

A formulação de um biomaterial e suas características físico-químicas são determinantes críticas do sucesso do implante em defeitos ósseos críticos. Vários estudos relatam que os íons inorgânicos simples, como o cálcio (Ca) (MAENO et al., 2005; VALERIO et al., 2009; LU; MARIE, 2010; YANG et al., 2010), o fósforo (P) (JULIEN et al., 2009), o silício (Si) (REFFITT et al., 2003) e o zinco (Zn) (HALL; DIMAI; FALEY, 1986; RAMASWAMY, et al., 2008; YANG et al., 2010; SHEN et al., 2014), e as suas associações (RAMASWAMY et al., 2008; MURPHY et al., 2009; HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; PADILLA et al., 2015) estão relacionados com o metabolismo ósseo, com a angiogênese e com a mineralização da matriz óssea.

Compostos sintéticos que liberem tais íons para o microambiente biológico podem ser construídos e capazes de atuar tanto no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas como em sua diferenciação e maturação no sentido de promoverem a osteogênese (DE AZA; DE AZA; DE ASA, 2005; JONES et al., 2012; PADILLA et al., 2015).

Com esta intenção, biomateriais sintéticos experimentais, compostos por

monetita, hidroxiapatita, fosfato de cálcio amorfo e gel de sílica com e sem conteúdos de zinco, foram projetados como arcabouços para a regeneração óssea (GARCÍA DE CASTRO et al, 2010; PADILLA, et al., 2015).

A monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ) é um fosfato de cálcio anidro e o principal componente dos biomateriais sintéticos experimentais ora avaliados. Apresenta uma composição química semelhante ao tecido ósseo e possui grande disponibilidade e alta solubilidade em fluídos fisiológicos. Quando observada *in vivo* é osteocondutora e absorvível (GBURECK et al., 2007; HABIBOVIC, et al., 2008, TAMIMI et al, 2008; TAMIMI et al, 2009; TAMIMI et al, 2010; TORRES et al., 2011; TAMIMI et al, 2012; MONTAZEROLGHAEM et al., 2015), além de não apresentar antigenicidade e riscos de transmissão de doenças (KLAMMERT et al, 2009).

A monetita permite a formação de um arcabouço estável no local de aplicação, de alta biocompatibilidade. Quando implantada, favorece a migração e a adesão de osteoblastos, com resultados similares ao enxerto de osso autógeno (KLAMMERT et al., 2009; TAMIMI et al., 2009; TORRES et al., 2011; TORRES et al, 2015).

A possibilidade de introdução de uma alta porosidade durante o processamento dos implantes à base de monetita é outra vantagem dos biomateriais substitutos ósseos nela baseados (STULAJTEROVA et al., 2015). Além disso, alguns autores ainda atribuem-lhe um potencial osteoindutivo (IDOWU et al., 2014).

Outro importante componente das formulações destes biomateriais sintéticos experimentais é a hidroxiapatita deficiente em cálcio.

Dentre os fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita deficiente em cálcio é a que mais se assemelha à estrutura mineral do osso humano e, apesar de sua alta estabilidade, possui uma relação não estequiométrica entre os elementos cálcio e fósforo (Ca/P), o que a torna mais solúvel em comparação à hidroxiapatita estequiométrica sintética e às hidroxiapatitas de origem natural (SUCHANEK; YOSHIMURA, 2010).

As suas principais vantagens são a sua biocompatibilidade, osteocondutividade, lenta biodegradabilidade, origem sintética (baixo risco de transmissão de doenças), baixa imunogenicidade. Quando implantada, apresenta



uma forte afinidade com o tecido ósseo o que a torna substituta do osso humano (POINERN et al., 2009).

Além da monetita e da hidroxiapatita, os biomateriais sintéticos experimentais ainda possuem uma fase amorfa composta por fosfato de cálcio e gel de sílica (PADILLA et al., 2015).

Os compostos bifásicos são biologicamente mais ativos que a hidroxiapatita pura, de elevada cristalinidade, e podem facilitar a neoformação óssea. Este fenômeno pode estar relacionado à uma dissolução mais rápida da fase amorfa (RIBEIRO, 2003).

Estudos *in vitro* indicam que os produtos de dissolução de compostos com conteúdo de sílica são capazes de estimular células osteoprogenitoras no sentido de diferenciarem-se em osteoblastos, com possíveis efeitos osteoindutores (ARCOS; VALLET-REG, 2006; IAFISCO et al., 2009; JONES, 2013).

O gel de sílica na composição do biomaterial ainda pode favorecer a formação de uma camada de apatita, rica em cálcio e fósforo, em sua superfície, quando este entra em contato com os fluídos intersticiais do leito receptor. Esta habilidade varia em função da composição do biomaterial e tem demonstrado favorecer a osteogênese comparativamente à hidroxiapatita isolada (ARCOS; VALLET-REGI, 2006; GUTIERRES et al., 2006).

A adição de sílica à hidroxiapatita também demonstrou *in vivo* ser eficaz no aumento de sua degradação e no aumento da resistência da união osso-implante, quando comparada à hidroxiapatita pura. Portanto, a sílica adicionada a um implante contribui com o aumento da osteointegração do biomaterial e posteriormente auxilia a reparação do tecido lesado (KOKUBO; KAWASHITA, 2003; REFFITT et al., 2003; DE AZA; DE AZA; DE AZA, 2005; ARCOS; VALLET-REGI, 2006; IAFISCO et al., 2009; BOSSHARDT et al., 2014).

Em algumas formulações dos biomateriais experimentais sintéticos propostos, parte do cálcio da monetita foi substituído por zinco (Zn), um elemento essencial para o metabolismo ósseo que tem efeitos estimulantes sobre a formação óssea *in vitro* e *in vivo* (YAMAGUCHI, 1998; PADILLA et al., 2015).

A deficiência de zinco provoca redução da massa óssea, retarda o crescimento e o desenvolvimento do esqueleto, além de dificultar a manutenção da estrutura óssea ao longo da vida do indivíduo (HALL; DIMAI; FARLEY, 1999; SEO et al., 2010).

O mecanismo celular de ação do zinco em células osteoblásticas ainda não foi totalmente esclarecido, porém, estudos mostram que ele exerce uma influência positiva direta em diversas enzimas envolvidas na primeira etapa da biossíntese das proteínas, inclusive da osteocalcina, nas células osteoblásticas (SEO et al., 2010).

O zinco, ao ser incluído em compósitos cerâmicos não sinterizados, aumentou a atividade da enzima fosfatase alcalina (YAMAGUCHI; OISHI; SUKETA, 1987; LI; LIU; JIA, 2015), estimulou a proliferação e diferenciação celular, bem como a síntese proteica por osteoblastos (SEO et al., 2010; CHOU, 2015). Alguns autores ainda atribuem-lhe a capacidade de promover um aumento da mineralização óssea (YAMAGUSHI; OISHI; SUKETA, 1987, YAMAGUSHI, 1998).

Estes aspectos não foram observados em um composto cerâmico sinterizado de hidroxiapatita e tricálcio fosfato dopado com zinco, apesar de notada uma incorporação deste elemento ao tecido ósseo neoformado (CALASANS-MAIA et al., 2014).

Portanto, a mobilização do zinco, bem como de outros íons bioativos contidos em um biomaterial, constituem importantes alvos de estudo que possibilitarão a obtenção de substitutos ósseos bioativos, biodegradáveis e mais osteogênicos, capazes de reestabelecerem defeitos ósseos críticos à regeneração espontânea, e possam contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população por eles acometida.

***OBJETIVO***

### **3. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar quatro diferentes formulações de arcabouços experimentais sintéticos à base de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopadas ou não com zinco, na regeneração de defeito ósseo crítico.

## *MATERIAIS E MÉTODOS*

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. BIOMATERIAIS

Os biomateriais experimentais e a hidroxiapatita bovina comercial (Bio-Oss<sup>®</sup>) foram fornecidos pela Azurebio SL, Madrid, Espanha, através do convênio firmado entre o *Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC, Instituto de Cerámica y Vidrio*, Madri, Espanha e a Universidade Federal da Bahia, UFBA.

Todos os biomateriais experimentais, nomeados pelo fornecedor em LL, PP, AA e OO (Tabela 1), foram projetados como substitutos ósseos sintéticos biodegradáveis e estão constituídos por monetita, hidroxiapatita deficiente em cálcio e uma fase amorfa composta por fosfato de cálcio e gel de sílica (Tabela 1).

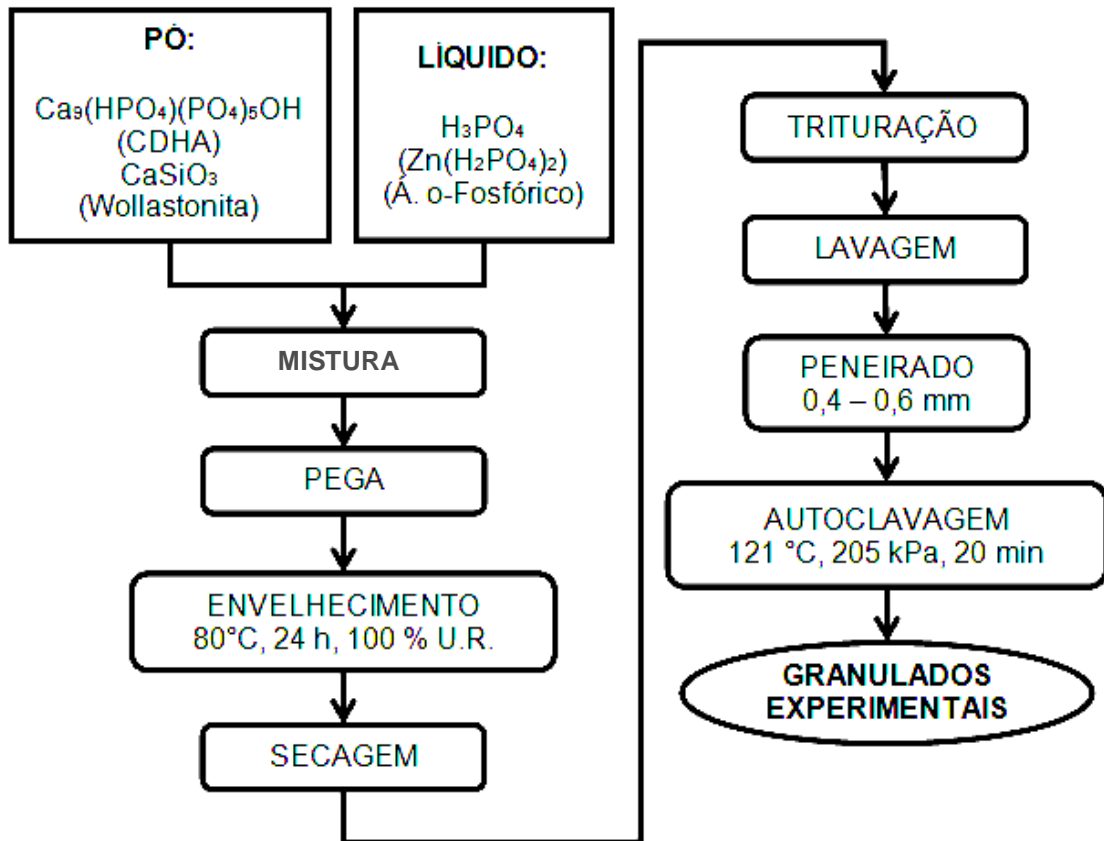
Nos biomateriais AA e OO, o zinco foi introduzido de forma a substituir parcialmente o cálcio na fase da monetita. O biomaterial experimental AA, sob o nome comercial Sil-Oss<sup>®</sup>, foi recentemente aprovado na Europa para uso clínico em odontologia e cirurgia maxilo-facial para regeneração de defeitos ósseos (PADILLA et al., 2015).

Bio-Oss<sup>®</sup> (Geistlich Pharma AG, Alemanha) é um granulado de hidroxiapatita produzido a partir de osso bovino mediante processos nos quais fora removida toda a matéria orgânica e mantida a estrutura porosa e trabecular do osso bovino. Este biomaterial foi usado como controle.

Todos os biomateriais foram recebidos sob a forma de grânulos com tamanho de partículas entre 0,4 e 0,6 mm. Foi escolhida esta faixa granulométrica com base em resultados de estudos prévios, os quais demonstraram ser este o tamanho mais adequado para o modelo experimental escolhido (CAMPOS, 2012; CAMPOS, ROSA, 2012).

O processo de fabricação dos biomateriais experimentais está representado na Figura 2.

Figura 2: Esquema do processo de preparação dos biomateriais sintéticos experimentais.



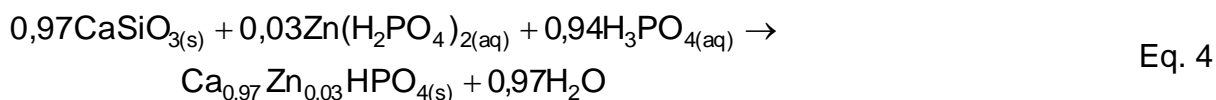
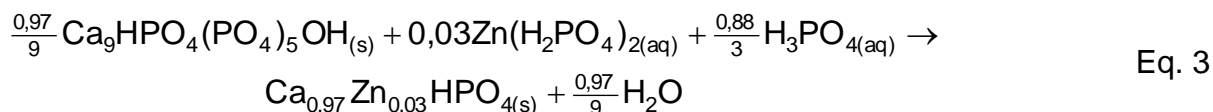
Fonte: Azubebio SL, Madrid, 2015.

As reações químicas globais que ocorreram durante a fabricação dos biomateriais LL, PP, AA e OO são representadas pelas Equações 1 até 4.

A fabricação dos biomateriais sem conteúdo de zinco, LL e PP, pode ser representada pelas equações 1 e 2.



Para a síntese dos biomateriais que contém zinco, AA e OO, usou-se como líquido uma dissolução de ácido orto-fosfórico com a quantidade requerida de zinco, tendo lugar as reações 2 e 3.



A wollastonita é mais reativa que a hidroxiapatita frente ao ácido ortofosfórico logo, depois da mistura do pó com o líquido, ocorrem preferentemente as reações 2 ou 4, e só quando esta estiver quase totalmente consumida começam a acontecer as reações 1 ou 3. Deste modo na composição de todos os materiais, além dos produtos das correspondentes equações, existe hidroxiapatita.

Previamente às implantações no defeito ósseo crítico, as amostras de todos os biomateriais foram alicotadas em frascos com 0,25mg cada e novamente esterilizadas em autoclave a 121°C, com 1 atmosfera de pressão, durante 30 minutos.

Após a esterilização dos biomateriais, procedeu-se a determinação de sua composição, porosidade, área superficial específica, microestrutura, solubilidade e citotoxicidade.

Aos biomateriais experimentais estéreis foram efetuadas as seguintes caracterizações:

- Análise química quantitativa (fluorescência de raios-X);
- Análise qualitativa e quantitativa de fases (difração de raios-X, método Rietveld e adição de padrão interno);
- Microestrutura superficial dos grânulos (microscopia eletrônica de varredura);
- Área superficial específica (método da isoterma BET com nitrogênio);
- Porosidade (porosimetria de intrusão de mercúrio);
- Solubilidade *in vitro* (tampão de Tris-HCl 0,1M, pH 7,40, 37,0 ± 1,5°C);
- Citotoxicidade *in vitro* frente a osteoblastos humanos.



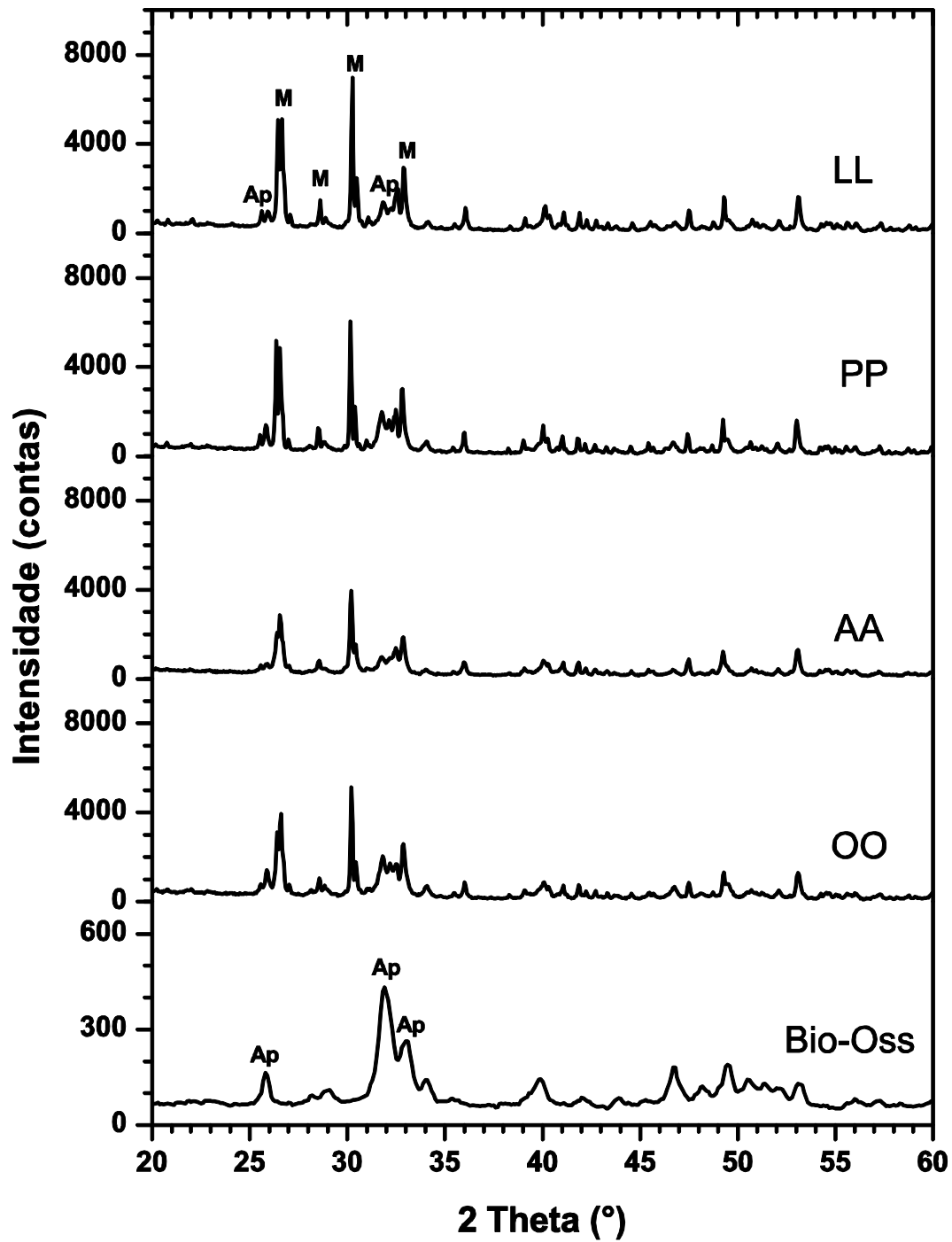
#### 4.1.1. Difração de raios X

Os padrões de difração de raios X dos biomateriais experimentais e do controle aparecem na figura 3. Nela são assinalados os componentes correspondentes aos picos mais intensos. Em todos os materiais experimentais foram identificados somente picos de difração correspondentes às fases cristalinas da monetita (arquivo PDF 9-0080), e da hidroxiapatita (arquivo PDF 9-0432). Não foi identificada nenhuma outra fase cristalina.

No entanto, a análise quantitativa de fases realizada mediante o método de adição de padrão interno (10,0% m/m; coríndon > 99,995 %) revelou a presença de uma fase amorfa, além das fases cristalinas antes mencionadas e de acordo com o apresentado na Tabela 1. Esta fase amorfa carece de ordenamento estrutural periódico e, portanto, não é capaz de produzir picos de raios X, somente contribui para a radiação de fundo dos difratogramas.

O difratograma do biomaterial controle, Bio-Oss<sup>®</sup>, só apresentou picos de difração de hidroxiapatita (Figura 3, arquivo PDF 9-0432), de baixa intensidade e bem mais largos que os observados nos biomateriais experimentais. Essas características correspondem às de um biomaterial com pequeno tamanho de cristalito, e coincide com reportes prévios (MENDONÇA, 2005; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008).

Figura 3: Padrões de difração de raios X dos biomateriais experimentais (LL, PP, AA e OO) e do controle (Bio-Oss®).



Fonte: Azurebio, SL, Madrid, 2015.

#### 4.1.2. Análise química

Os resultados das análises de composição química para os biomateriais experimentais estão resumidas na Tabela 1.

Ao compararmos os resultados das análises quantitativas, química e de fases, foi possível determinar que a fase amorfa presente nos biomateriais experimentais é constituída por sílica hidratada e por fosfatos de cálcio.

**Tabela 1: Composição química e de fases dos biomateriais experimentais**

Nome	Composição elementar (% dos óxidos)					Composição de fases (%)		
	CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	SiO <sub>2</sub>	ZnO	PPC <sup>a</sup>	Monetita <sup>b</sup>	CDHA <sup>c</sup>	Amorfo <sup>d</sup>
LL	42,5	45,1	5,34	0	7,03	60 ± 3 <sup>e</sup>	18 ± 1	22 ± 1
PP	43,5	44,5	5,34	0	6,73	43 ± 2 <sup>e</sup>	30 ± 2	27 ± 1
AA	41,3	44,7	5,45	1,32	7,19	64 ± 3 <sup>f</sup>	20 ± 1	16 ± 1
OO	42,5	44,1	5,64	1,00	6,75	45 ± 2 <sup>f</sup>	34 ± 2	21 ± 1

<sup>a</sup> Perda por calcinação; <sup>b</sup> Ca<sub>1-x</sub>Zn<sub>x</sub>HPO<sub>4</sub>; <sup>c</sup> Hidroxiapatita deficiente em cálcio, Ca<sub>9</sub>HPO<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>OH; <sup>d</sup> fosfato de cálcio amorfo e gel de sílica; <sup>e</sup> x=0; <sup>f</sup> x≈3. Fonte: Azurebio, SL, Madrid, 2015.

#### 4.1.3. Microestrutura

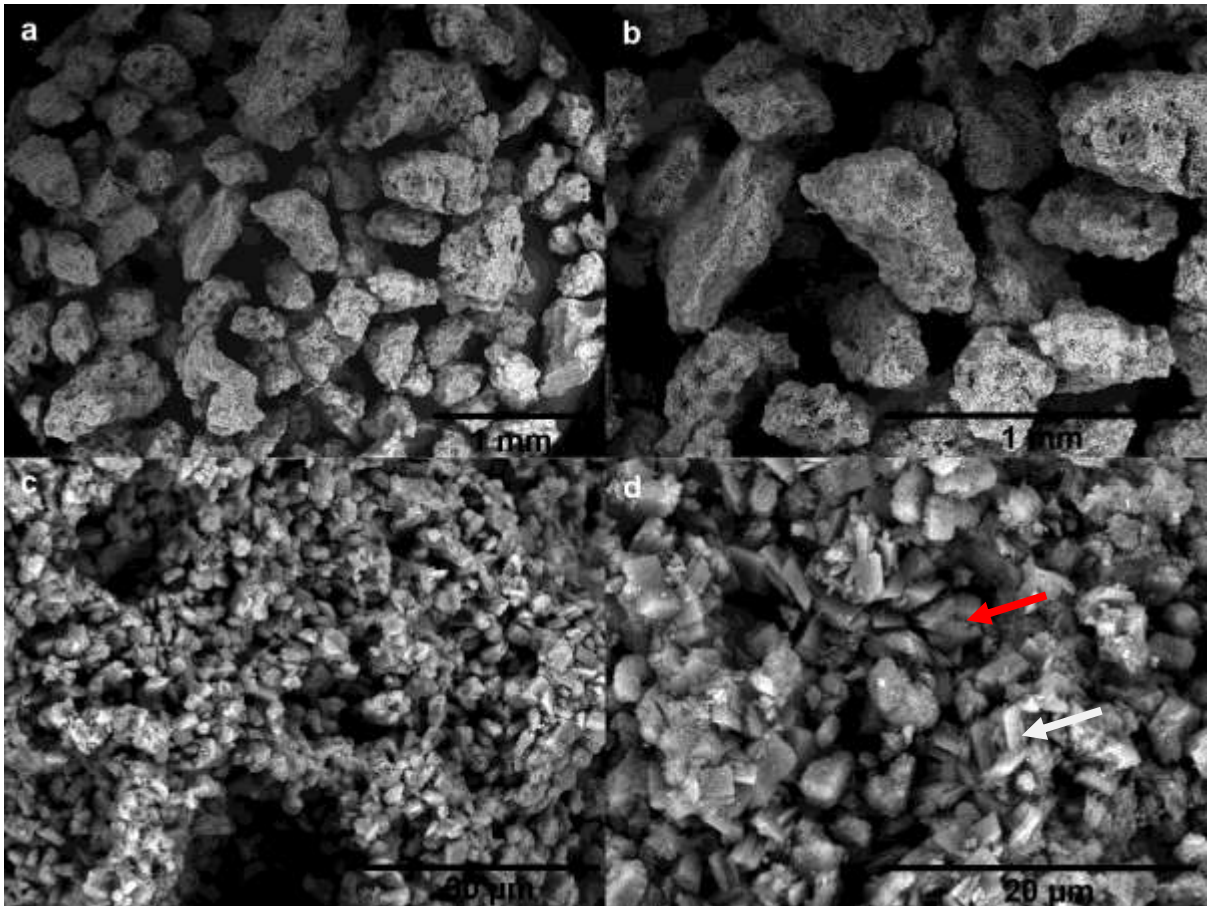
A microestrutura superficial dos biomateriais experimentais e do controle foi estudada mediante microscopia eletrônica de varredura. Os resultados do estudo são apresentados nas Figuras 4 e 5.

Os biomateriais experimentais apresentaram características morfológicas similares entre si. Todos estão constituídos por grânulos de forma irregular com bordas arredondadas e microporosidade expressiva, segundo exemplificado nas Figuras 4a e 4b para o biomaterial AA.

Quando examinados com maior magnificação, percebeu-se que todos os biomateriais experimentais estão constituídos por dois tipos de cristais cimentados por uma matriz amorfa. Os cristais maiores com forma tabular (Figuras 4c e 4d)

correspondem à monetita enquanto os menores, com forma de agulha e que se confundem com a matriz amorfa (Figura 4d), são típicos da hidroxiapatita.

**Figura 4: Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial AA, Sil-Oss®.** Agregados de nanocristais de hidroxiapatita e matriz amorfa (seta vermelha) e de monetita (seta branca).

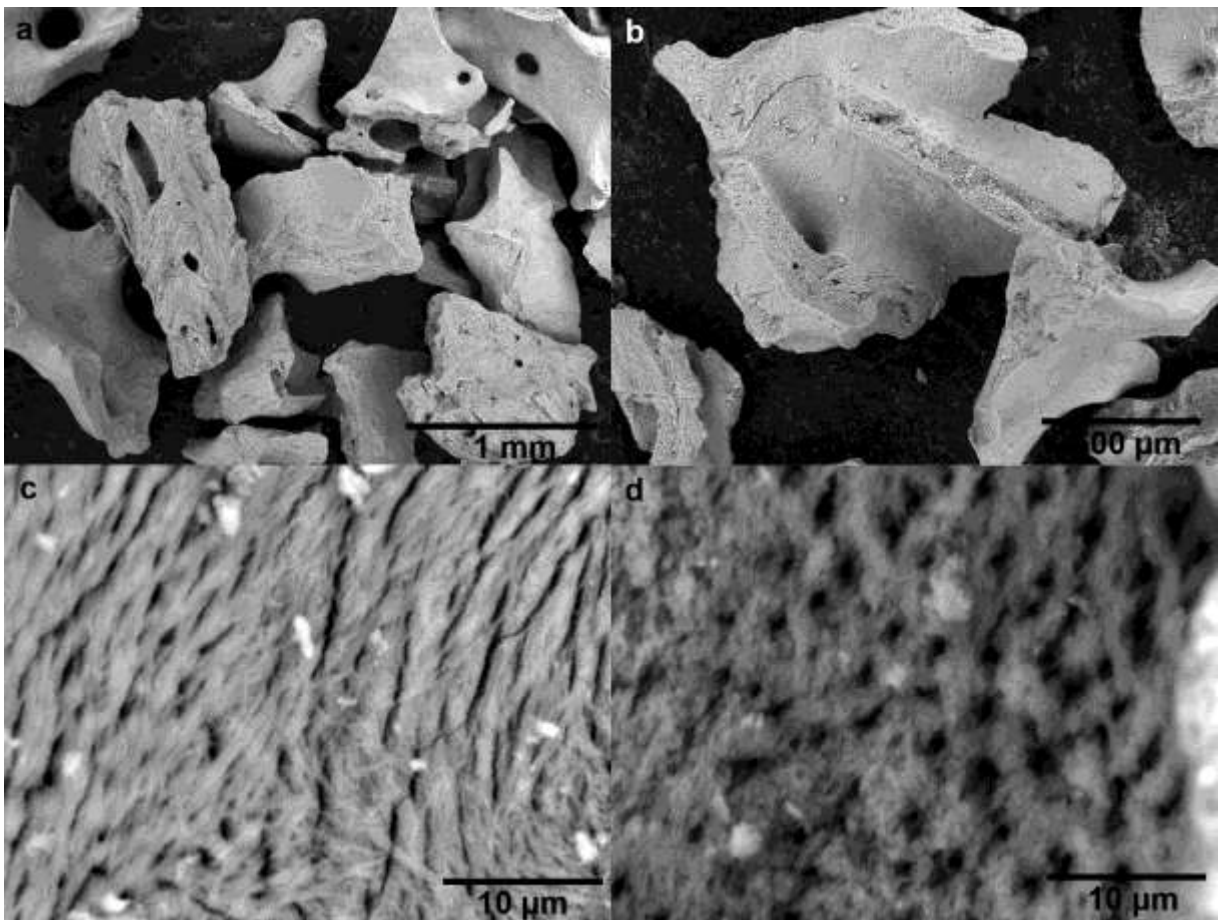


Fonte: Azurebio, SL, Madrid, 2015.

Por outro lado, a Figura 5 mostra as micrografias de MEV do biomaterial controle, Bio-Oss®.

Os grânulos de hidroxiapatita bovina do Bio-Oss® apresentaram forma irregular com bordas pontiagudas e espículas evidentes (Figura 5a e 5b). Quando observados a maiores aumentos (Figuras 5c e 5d) foi possível identificar abundante microporosidade.

**Figura 5: Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial controle, Bio-Oss®.**



Fonte: Azurebio, SL, Madrid, 2015.

#### **4.1.4. Área superficial, densidade e porosidade**

Os resultados das medições de áreas superficial específica, densidade aparente e porosidade para os biomateriais experimentais são resumidos na Tabela 2, juntamente com os correspondentes ao biomaterial controle, Bio-Oss®.

**Tabela 2: Superfície específica, densidade aparente e porosidade dos biomateriais experimentais e do controle**

Amostra	Á. S. E. (m <sup>2</sup> /g)	D <sub>ap</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	P <sub>Intra</sub>			P <sub>inter</sub>		
			D <sub>médio</sub> (μm)	Intervalo (μm)	Volume (%)	D <sub>médio</sub> (μm)	Intervalo (μm)	Volume (%)
LL	50	2,77	0,02	0,1-0,01	56	250	50-300	37
PP	53	2,80	0,03	0,1-0,01	62	120	40-300	34
AA	40	2,83	0,03	0,1-0,01	58	180	50-300	36
OO	66	2,77	0,02	0,1-0,01	56	140	30-300	23
BioOss <sup>®</sup>	60	3,21	0,03	0,1-0,01	51	100	10-400	13

Á.S.E.: Área superficial específica; D<sub>ap</sub>: Densidade aparente; P<sub>intra</sub>: Porosidade intragranular; P<sub>inter</sub>: Porosidade intergranular; D<sub>médio</sub>: Diâmetro médio de poros; Fonte: Azurebio, SL, Madrid, 2015

#### 4.1.5. Solubilidade *in vitro*

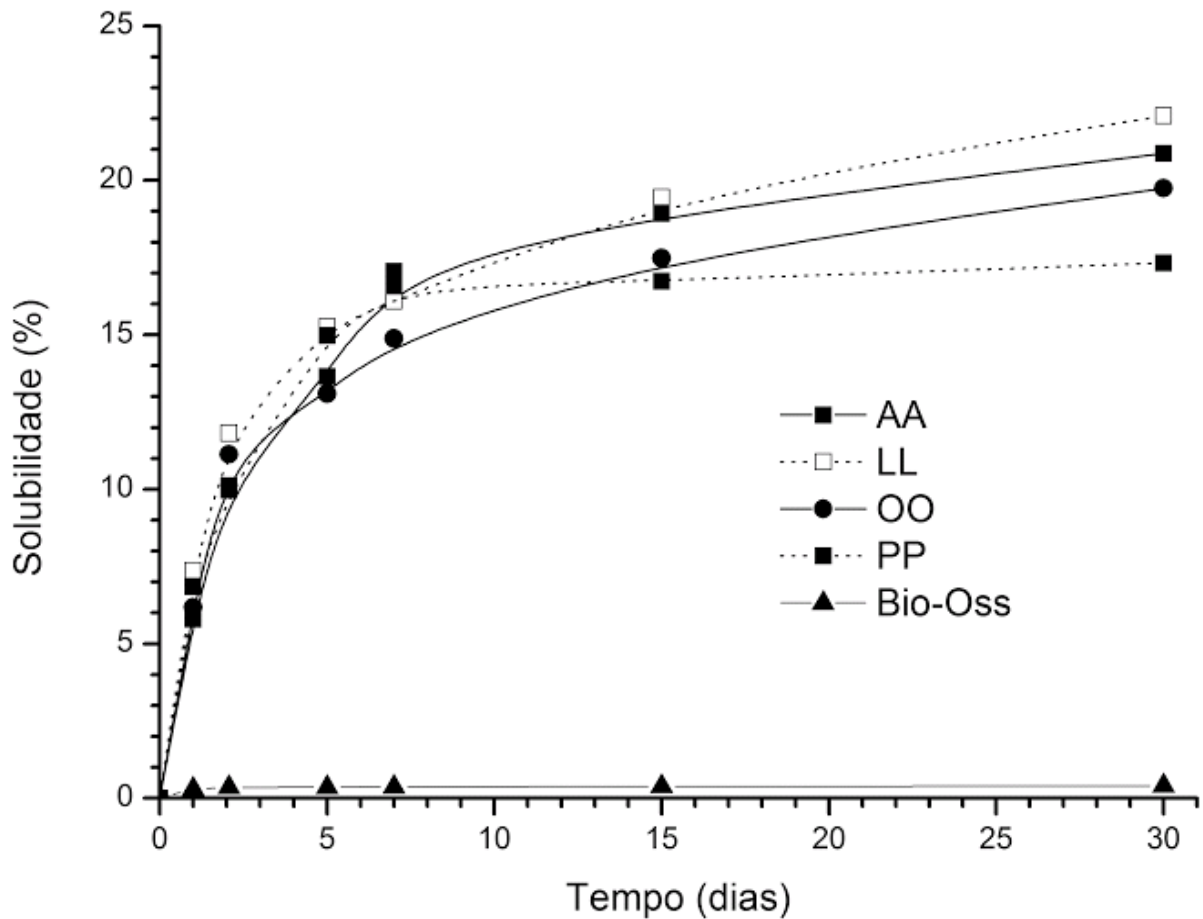
Os testes de solubilidade foram efetuados em tampão de 0,1M de Tris-HCl de pH 7,40 a 37,0 ± 1,5°C. Ao final de cada período de incubação, a suspensão resultante foi filtrada a vácuo e os resíduos sólidos quantitativamente recolhidos, secos a 80°C e ponderados para determinação da sua solubilidade através da perda de massa.

As quantidades dissolvidas dos biomateriais experimentais aumentaram gradualmente durante o tempo de ensaio chegando a alcançar aproximadamente 20% da massa inicial depois de 30 dias (Figura 6).

Dentre os biomateriais experimentais, aqueles com maior conteúdo de monetita e menor quantidade de hidroxiapatita (AA e LL, veja-se Tabela 1) foram os mais solúveis. No entanto, quando comparadas as solubilidades daqueles biomateriais com similares teores de monetita e de hidroxiapatita, um contendo zinco e o outro não (AA com LL, e OO com PP) não foi possível estabelecer nenhuma dependência da solubilidade com o teor de zinco.

Finalmente a solubilidade do Bio-Oss<sup>®</sup> foi bem menor (< 1 %) que as dos biomateriais experimentais (Figura 6).

Figura 6: Gráfico com a solubilidade dos biomateriais experimentais (LL, AA, PP, OO) e do controle (BioOss®).



Fonte: Azurebio SL, Madrid, 2015.

#### 4.1.6. Citotoxicidade *in vitro*

Para avaliar os possíveis efeitos dos biomateriais experimentais e do controle de hidroxiapatita bovina sobre culturas de osteoblastos humanos, foram preparados extratos aquosos por incubação dos granulados (0,1 g/mL) em meio de cultura DMEM-F12 (DMEM-F12, Sigma D8437) suplementado com 1% de uma

solução de 10 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma, P0781) em meio completo, durante 24 horas a 37 °C em um agitador orbital a 100 rpm.

A suspensão resultante foi centrifugada a 1500 rpm e filtrada através de um filtro de 0,22 µm. Os filtrados foram diluídos com soro fetal bovino (FBS, Sigma, F7524) a uma concentração final de extrato de 80% em 10% de FBS em meio DMEM-F12 completo.

Para o ensaio de citotoxicidade, osteoblastos humanos (HOb 406-05f, Cell Applications, Inc) foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de 50000 células/poço em 100 µl/poço de meio DMEM completo, suplementado com F12-FBS a 10% (DMEM-F12 completo/10% FBS) e incubado a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 24 h, o meio foi substituído pelos extratos e incubou-se durante mais 24 horas, após o que o meio foi substituído com 10% de Alamar Blue em DMEM-F12 completo/10% de FBS sem vermelho de fenol e incubou-se durante mais 2 horas a 37 °C.

O sobrenadante foi retirado e traspassado a uma nova placa de 96 poços e seguidamente a absorbância foi medida a 570 nm utilizando-se como referência a absorbância a 620 nm. DMEM-F12 completo/10% de FBS foi usado como controle negativo. Como controle positivo de citotoxicidade foi utilizado uma dissolução 0,5 % vol de Triton X-100 em DMEM-F12 completo/10% de FBS.

Foram adicionados 100 µl de DMEM-F12 completo/10% de FBS nos poços com células da primeira placa e incubado nas mesmas condições por outras 48 h após as quais foi repetida a adição do reagente e a leitura como antes descrito.

Finalmente foram adicionados 100 µl de DMEM-F12 completo/10% de FBS nos poços com células e incubado nas mesmas condições por outras 96 h após o qual foi repetida a adição do reagente e a leitura.

Seis réplicas de cada condição e tempo foram analisadas. Diferenças significativas entre os grupos foram estabelecidas por meio do teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

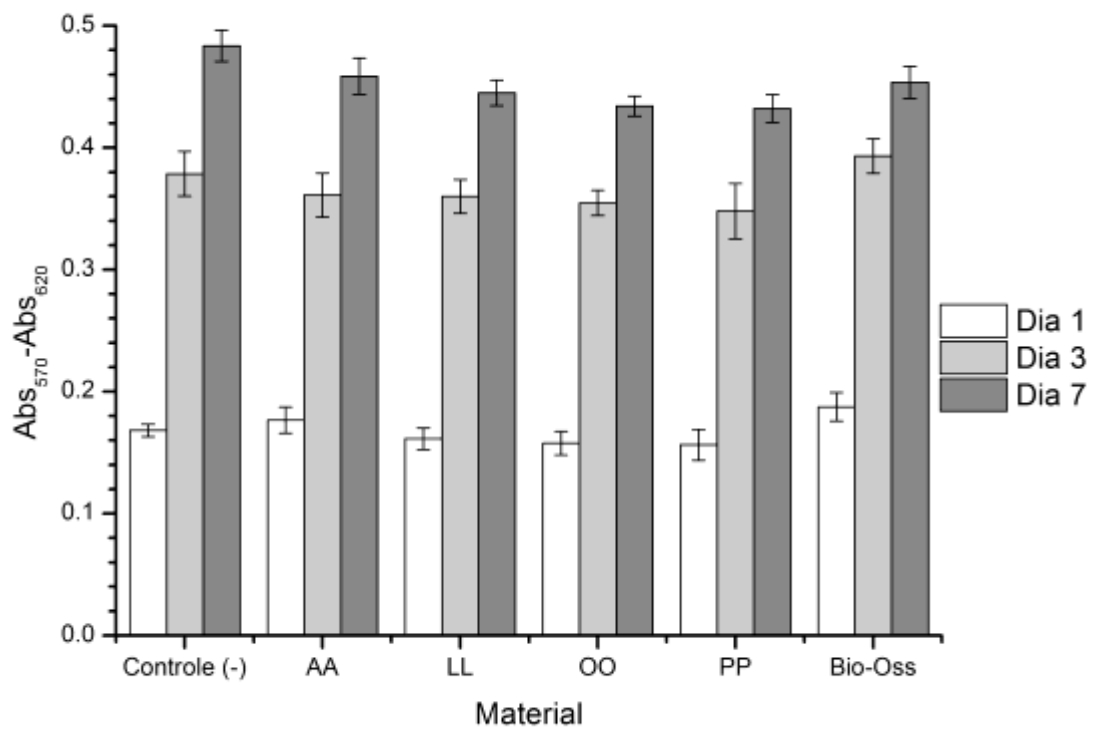
Os resultados do teste são resumidos na Figura 7.

Nenhum dos extratos dos biomateriais experimentais nem do controle foi citotóxico nas condições estudadas. Não houve diferenças significativas entre a



viabilidade celular de culturas de osteoblastos humanos expostos aos extratos dos diferentes biomateriais e o controle (Figura 7).

**Figura 7: Ensaio de citotoxicidade dos biomateriais experimentais e do biomaterial controle (BioOss®).**



Fonte: Azurebio, SL, 2015

## 4.2.AMOSTRA

O modelo animal escolhido para este trabalho foi o *Rattus Norvegicus* da linhagem *Wistar albinus* e a região escolhida para a realização do defeito ósseo de 8,5 mm foi a calvária.

Este defeito é considerado crítico ao reparo espontâneo, com vários estudos que o corroboram como um modelo de excelência para a avaliação do potencial osteogênico de novos biomateriais (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; MIGUEL, 2008; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; ROLIM, 2013).

A amostra foi selecionada de forma aleatória de acordo com o quadro 1, composta por 105 ratos, jovens adultos, machos, de 3 a 4 meses de idade, com massa corpórea entre 350 e 400 gr, distribuídos em sete grupos, avaliados em três pontos biológicos, 15, 45 e 120 dias pós-operatório (Tabela 3):

- Grupos GLL, GPP, GAA e GOO: defeito preenchido respectivamente com grânulos de biomateriais sintéticos experimentais nas formulações LL, PP, AA e OO (Tabela 1);

- Grupo GHB: defeito preenchido com grânulos de hidroxiapatita bovina, Bio-Oss®;

- Grupo GCS: defeito preenchido apenas por coágulo sanguíneo;

- Grupo GCI: calvária íntegra.

**Tabela 3: Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico**

<b>Grupo</b>  <b>Ponto biológico</b>	<b>GLL</b>	<b>GPP</b>	<b>GAA</b>	<b>GOO</b>	<b>GHB</b>	<b>GCS</b>	<b>GCI</b>	<b>Total</b>
	<b>15 dias</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>45 dias</b>	5	5	5	5	5	5	5	35
<b>120 dias</b>	5	5	5	5	5	5	5	35
<b>Total</b>	15	15	15	15	15	15	15	105

Fonte: Elaborada pela autora

## ETAPA CIRÚRGICA

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana, com a aprovação do respectivo comitê de ética, Protocolo 12/2011, em anexo, e de acordo a determinação do protocolo de técnica cirúrgica descrita por diversos autores (ROLIM, 2010; BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012) e ilustrados na figura 8.

Durante todo o tempo do estudo, os animais foram mantidos em caixas plásticas autoclavadas, identificadas com o grupo e o ponto biológico, forradas com maravalha de *Pinus* autoclavada, trocada diariamente. Na ficha de identificação dos animais ainda constou a data da cirurgia, o peso do animal, a data do sacrifício e o nome do investigador responsável. Os animais foram alimentados com ração sólida e água à vontade, mantidos em regime de luminosidade de claro e escuro de 12 horas com temperatura adequada.

Anteriormente aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados e sedados por injeção intramuscular de cloridrato de cetamina na proporção de 0,08mL por 100mg de peso e cloridrato de xilazina na proporção de 0,04mL por 100mg de peso. Na sequência, os animais foram tricotomizados na região da calvária e efetuada assepsia do campo operatório com solução de iodo.

Os animais foram posicionados em decúbito ventral e o acesso à calvária efetuado por meio de uma incisão cutânea bicoronal, semilunar, com extensão aproximada de 3 cm, com lâmina de bisturi nº 15. Os tecidos foram divulsionados com tesoura curva de ponta romba e procedeu-se a elevação do retalho com pinças mosquito. O perióstio foi incisado com lâmina de bisturi nº 15 e removido na sua totalidade na região da execução do defeito com o auxílio de curetas Molt.

O defeito ósseo crítico na porção mediana da calvária foi efetuado entre os vértices da sutura anterior e posterior, com a utilização de uma fresa tipo trefina com 8,0 mm de diâmetro interno em contra ângulo cirúrgico com redução de 16:1 acoplado em motor elétrico com rotação de 1.500 rpm, com torque de 55N/cm<sup>2</sup>, sob constante irrigação com solução fisiológica estéril.

Após a transfixação da calvária, o fragmento foi removido juntamente com a dura-máter com o auxílio de cureta multi e pinça mosquito, sob abundante irrigação, com o cuidado de promover a remoção de espículas ósseas.

Nos defeitos foram implantados os biomateriais de acordo com os grupos definidos.

O retalho foi reposicionado e a incisão suturada com pontos simples, com fio de seda montado em agulha 4.0 de seção triangular.

Após os pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias pós-operatório, os animais foram mortos com dose letal de anestésico e toda a porção superior da calvária foi removida em bloco para processamento histológico.

**Figura 8: Sequência cirúrgica.** A) Espécime posicionado em decúbito ventral; B) Divulsão dos tecidos e incisão do periósteo; C) Descolamento e remoção do periósteo; D) Exposição da calvária; E) Instrumentação cirúrgica; F) Deslocamento do fragmento ósseo; G) Remoção do fragmento; H) Defeito ósseo crítico de 8,5mm de diâmetro; I) Hidratação e manipulação do biomaterial; J) Inserção do biomaterial; L) Espécime suturado; M) Identificação e acomodação das caixas onde foram mantidos os animais deste estudo.



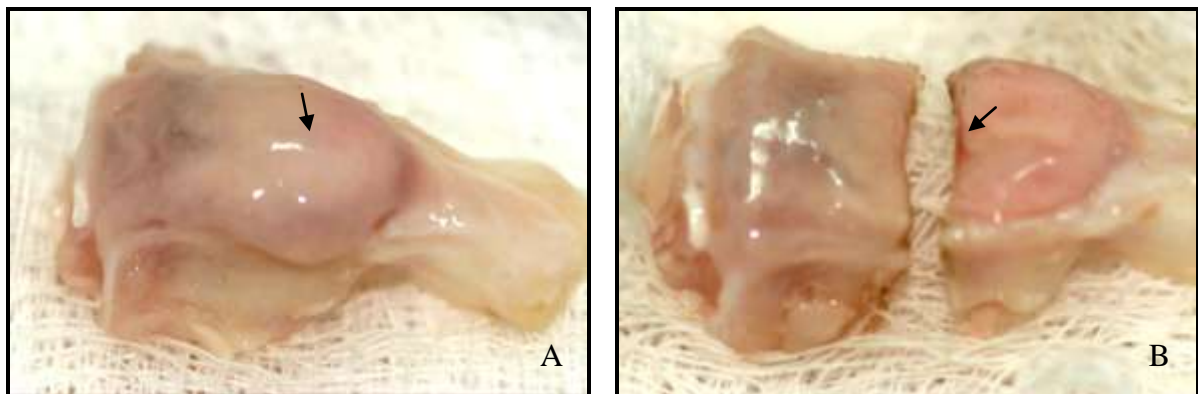
Fonte: Fotos da autora.

### 4.3. ETAPA LABORATORIAL

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Os procedimentos para processamento histológico do tecido ósseo foram realizados através da utilização de protocolos já estabelecidos em experimentos prévios e obedeceram a normatização nacional sobre o uso ético de animais de experimentação.

Após a remoção de tecidos moles, 105 calvárias foram fixadas em formol tamponado a 4%, durante 3 dias e divididas transversalmente ao seu longo eixo em duas metades com disco diamantado de granulação fina em motor elétrico, de modo que foram obtidas amostras com a região do defeito no seu maior diâmetro, aproximadamente com 8,5 mm de extensão linear (Figura 9).

**Figura 9: Divisão da calvária implantada.** Calvária após fixação em formol tamponado a 4%. A) Vista dorsal do espécime com biomaterial na região da implantação (seta); B) Divisão da calvária para descalcificação e inclusão da parte anterior em parafina (seta).



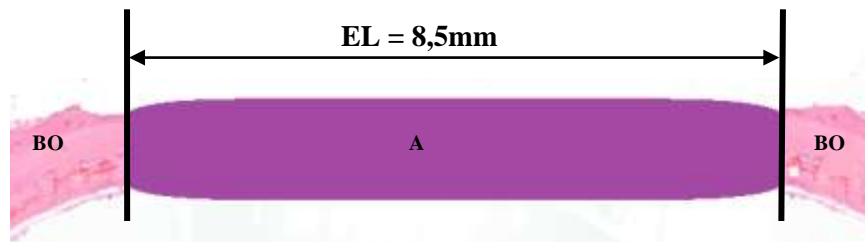
Fonte: Fotos da autora.

A porção anterior da calvária foi descalcificada em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5% e incluída em parafina. A porção posterior foi incluída em resina e reservada a estudos futuros. Os blocos de parafina foram planificados e cortes seriados foram realizados em micrótomo com quatro micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina

eosina (HE) e tricrômico Masson Goldner (TMG) para evidenciar células ósseas, células inflamatórias, fibras colágenas e deposição de matriz osteoide; e picrossírius *fast green* (PIFG) para evidenciar proteínas colagênicas.

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz comum (Figura 10).

**Figura 10: Vista frontal de corte histológico da calvária na região do defeito.** Bordas ósseas remanescentes (BO). Extensão linear (EL) e área seccional (A) do defeito.



Fonte: Elaborada pela autora.



#### 4.4. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

Foi realizada análise histológica no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia – LBTB/ICS/UFBA com o microscópio Leica® DM 1000 e câmera fotográfica Leica® DFC 310 FX.

Como parâmetros histológicos foram observados na região do reparo do defeito ósseo crítico (DC):

- biomaterial (Bm);
- infiltrado inflamatório;
- vascularização;
- tecido conjuntivo fibroso (TCF);
- atividade osteoblástica;
- neoformação óssea;
- aspecto histológico da calvária íntegra (CI).

#### 4.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Utilizou-se o programa Leica QWin<sup>®</sup> (Figuras 11 e 12) para a avaliação morfológica. Foram mensuradas:

- a área total do reparo do DC;
- a área total de nova matriz osteóide (MO) no DC;
- a área ocupada por TCF na região do DC;
- a área ocupada pelas partículas de Bm no DC;
- a extensão linear total do reparo do DC;
- a extensão linear da neoformação óssea no DC;
- a espessura (E) do reparo na região correspondente ao DC.

As mesmas mensurações foram realizadas nos grupos GCS e GCI, com exceção da área ocupada pelas partículas de biomateriais no DC.

Para a determinação da distância linear e da área do DC no GCI foram considerados os seguintes limites:

- aproximadamente nove milímetros de extensão linear, com centro na sutura sagital;
- toda a espessura do tecido ósseo desta região.

Para a análise estatística foram consideradas:

- a porcentagem do reparo total do DC ocupada por MO;
- a porcentagem do reparo do DC ocupada por TCF;
- a porcentagem da área do reparo do DC ocupada por partículas de Bm;
- a porcentagem da extensão linear do DC ocupada por MO;
- a espessura do reparo e da calvária íntegra na região correspondente ao DC em milímetros.

Estes parâmetros foram eleitos devido ao seu caráter associativo, à melhor avaliação do ganho clínico real após a implantação dos biomateriais e à facilidade de comparação dos resultados com outros estudos.

As porcentagens, para cada grupo, foram obtidas da seguinte forma:

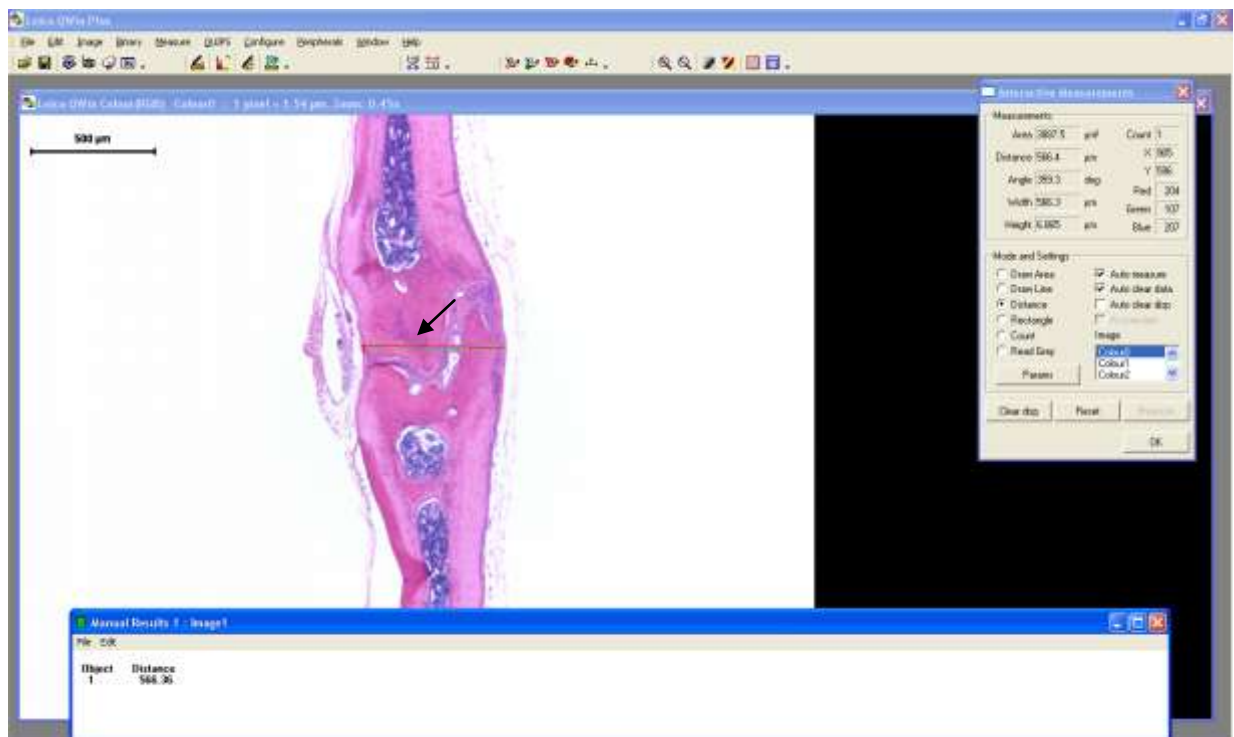
- dividindo-se a soma das áreas de MO pela área total do reparo do DC e multiplicando-se por 100.

- dividindo-se a soma das áreas de TCF pela área total do reparo do DC e multiplicando-se por 100.

- dividindo-se a soma das áreas das partículas de biomaterial pela área total do reparo do DC e multiplicando-se por 100.

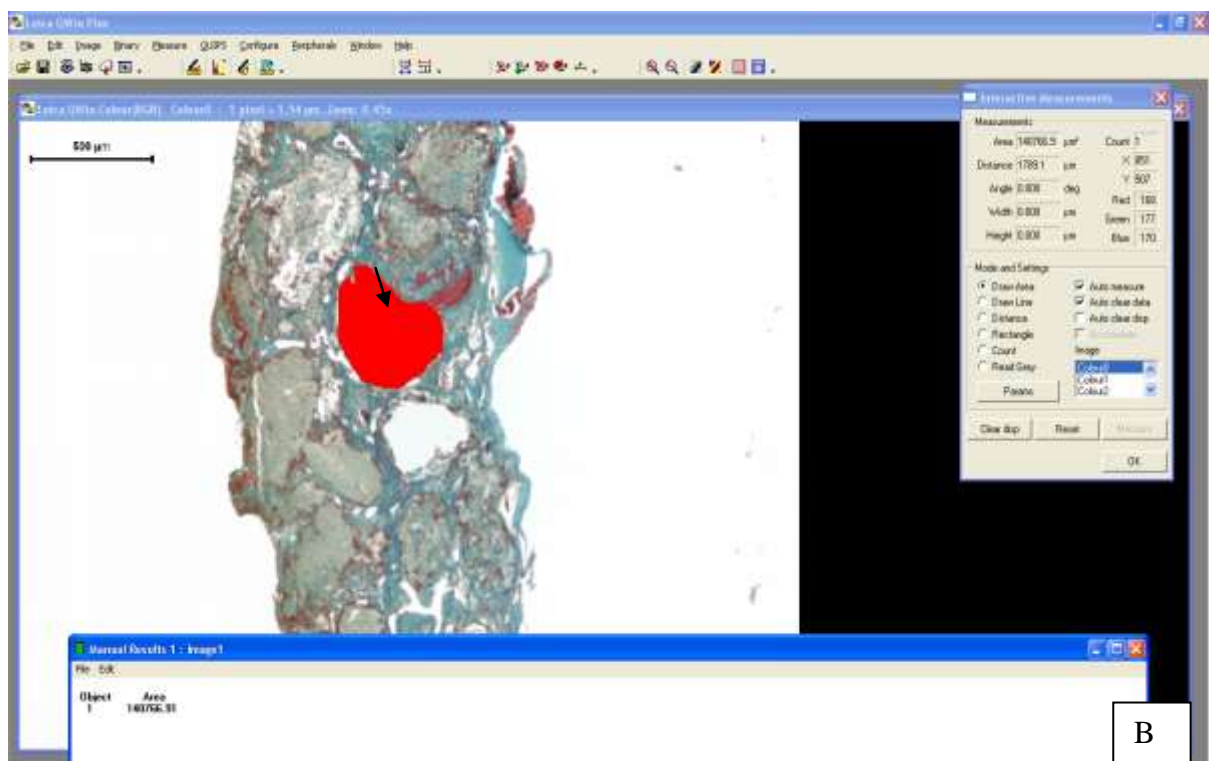
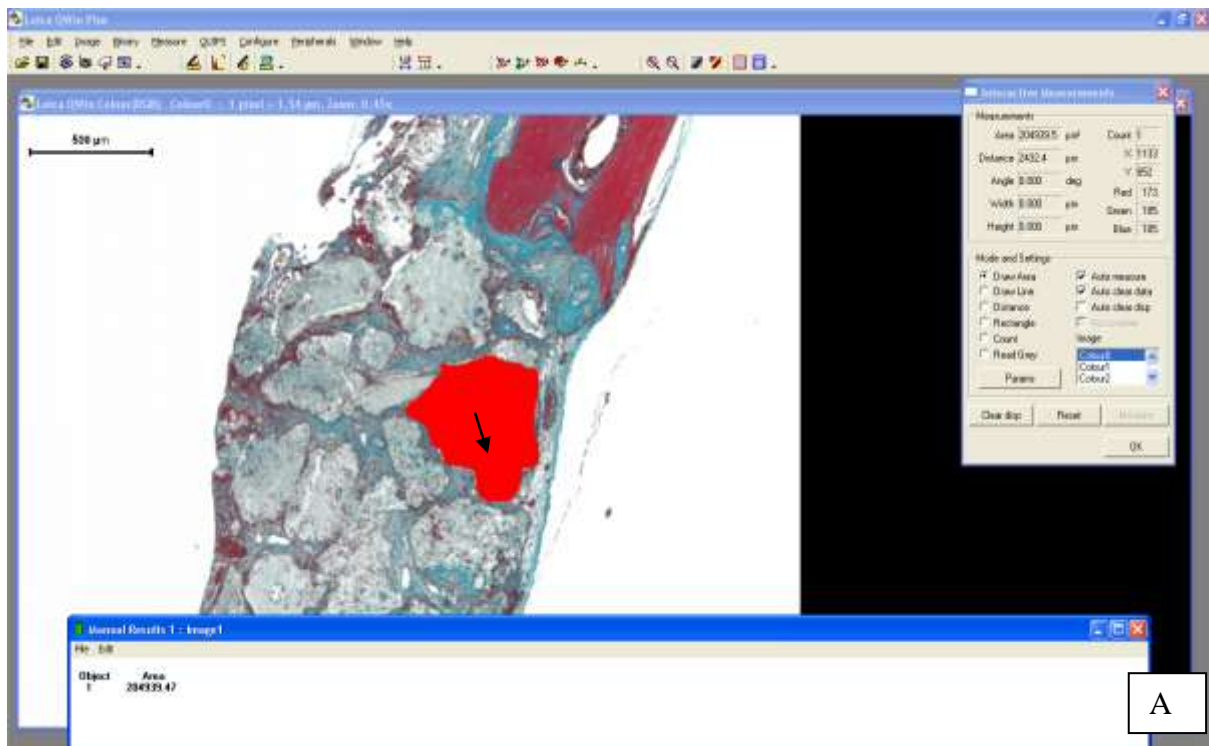
- dividindo-se a soma das distâncias lineares da matriz osteoide neoformada pela distância linear total do reparo do defeito ósseo crítico e multiplicando-se por 100.

**Figura 11: Exemplo de avaliação morfométrica de espessura da calvária íntegra em uma fotomicrografia.** Mensurações efetuadas com o auxílio do Programa Leica QWin®: espessura da calvária na região da sutura sagital (seta).



Fonte: Elaborada pela autora.

**Figura 12: Exemplos das avaliações morfométricas da área de uma partícula de biomaterial.** Mensurações efetuadas com auxílio do Programa Leica QWin®. (setas nas partículas mensuradas): A) GAA 15dias. B) GOO 15 dias.



Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A composição dos grupos e o número amostral foram determinados de acordo com estudos correlatos na literatura científica (MIGUEL et al, 2006; ROLIM 2010; BARRETO, 2011; CAMPOS; ROSA 2012; CAMPOS, 2012).

Para a comparação da porcentagem de área do DC ocupada por matriz osteoide entre os grupos, inicialmente foi efetuada análise de variância (ANOVA) de uma via, uma vez que foram atendidos os seus pressupostos, avaliados a partir do teste de homocedasticidade de Bartlett.

Nesse íterim foi calculado o tamanho do efeito global a partir da análise da variância:

$$\eta^2 = \frac{SS_{grupo}}{SS_{total}}$$

*eta-squared* -

O teste de Dunnett foi empregado na comparação de cada grupo com o GCS, após a ANOVA, obtendo-se os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Para a comparação dos grupos GLL, GPP, GAA e GOO entre si, optou-se pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, após uma nova ANOVA, para um  $\alpha$  global de 5%.

Foram calculadas ainda as medidas de tamanho de efeito dois a dois entre todos os grupos a partir da estatística padronizada *d de Cohen*, com variâncias conjuntas:

$$d = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}}}$$

Foram calculados as medianas e respectivos intervalos interquartílicos para a porcentagem do reparo do defeito crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso; a porcentagem da área do reparo do defeito crítico ocupada por partículas de biomaterial; a porcentagem da extensão linear do defeito crítico ocupada por matriz osteoide; e a espessura do reparo e da calvária íntegra na região correspondente ao defeito crítico em milímetros, uma vez que todas essas variáveis apresentaram elevado coeficiente de variação e assimetria de moderada a forte.

As análises foram efetuadas no pacote estatístico R, versão 3.3.2 (2015).

***RESULTADOS***

## 5. RESULTADOS

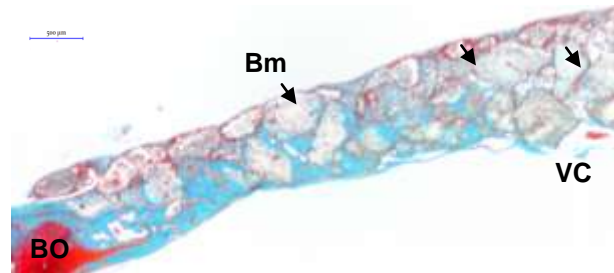
### 5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Em GLL, GPP, GAA e GOO, no ponto biológico de 15 dias, os biomateriais (Bm), preencheram toda a extensão do defeito crítico, entre as bordas ósseas (BO) com centro na região da veia central (VC), com espessura de aproximadamente 3 a 4 camadas de partículas de tamanho e formato irregulares, com bordos arredondados (Figura 13A), de variabilidade regular entre os grupos, e apresentavam-se parcialmente degradadas, com grande porosidade (Figura 13B). Aos 45 e aos 120 dias as partículas encontravam-se presentes por todo o defeito, porém em menor quantidade (Figura 13C) com maiores sinais de degradação e fragmentação, em especial no GLL e no GAA (Figura 13D).

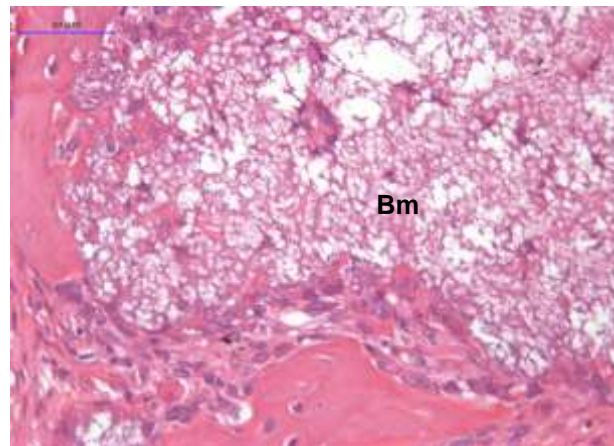
No GHB, no ponto biológico de 15 dias, observou-se o preenchimento completo do defeito pelo biomaterial (Bm), desde as bordas ósseas (BO), com centro na região da veia central (VC) em espessura de 3 a 5 camadas de partículas de tamanho diversificado, com formato irregular, arestas evidentes e espículas pontiagudas (Figura 14A). Em maior aumento pode-se verificar a presença de poros diminutos e fissuras longitudinais na partícula (Figura 14B). Nos demais pontos biológicos, o biomaterial permaneceu sem sinais de maior fragmentação. Aos 45 e 120 dias apresentava partículas com uma superfície mais arredondada, sem espículas evidentes (Figura 14C).



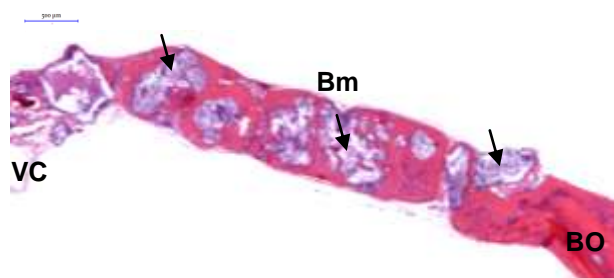
**Figura 13: Partículas dos biomateriais sintéticos experimentais no defeito.** Observamos em: A) distribuição uniforme das partículas do biomaterial (Bm) no defeito no ponto biológico de 15 dias (GAA, TMG, 15dias, 2,5x); B) com alta porosidade da partícula (GAA, HE, 15 dias, 20x); C) Aos 120 dias observamos uma reduzida quantidade e tamanho das partículas (GOO, HE, 120dias, 2,5x) com manutenção do arcabouço desde a borda óssea (BO) até a região central do defeito, nas proximidades da veia central (Vc); D) com alta porosidade e degradação das partículas de biomaterial (Bm) (GOO, HE, 120dias, 10x).



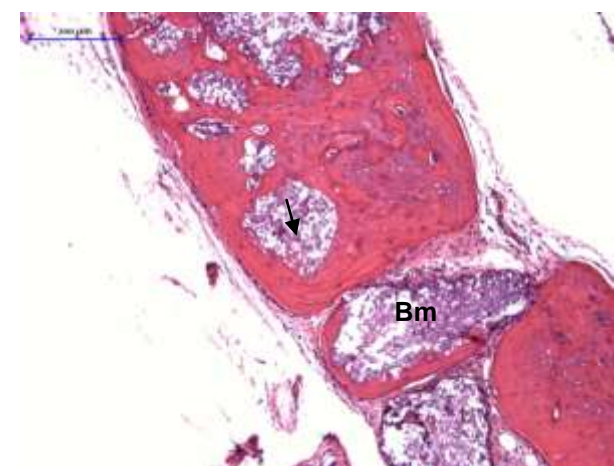
A



B



C

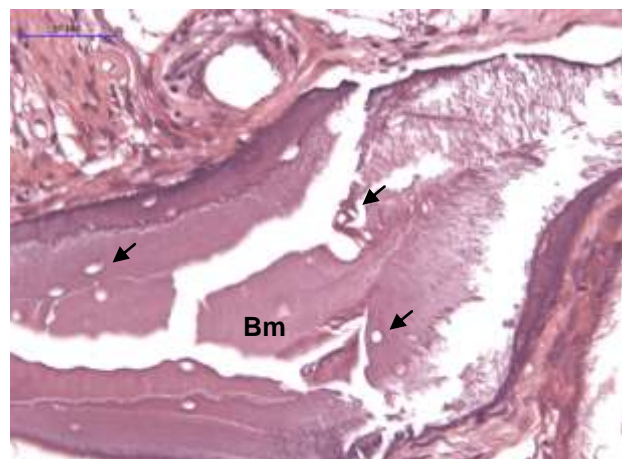


D

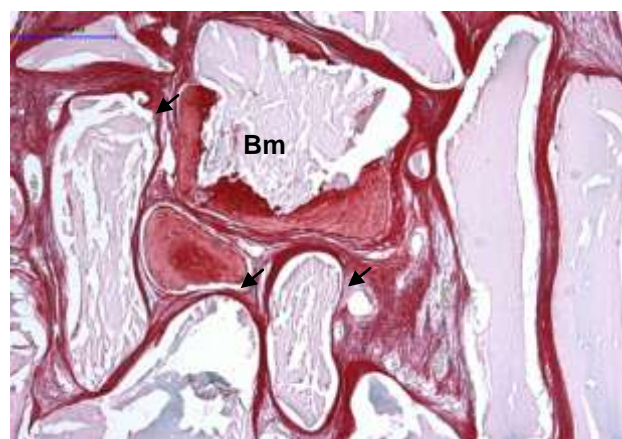
**Figura 14: Partículas de hidroxiapatita bovina no defeito.** Observamos no GHB: A) distribuição uniforme das partículas de biomaterial (Bm) aos 15 dias, HE, 2,5x; B) poros e fissuras no interior da partícula de hidroxiapatita bovina (setas) característicos do tecido ósseo, 15 dias, HE, 20x; C) reduzida metabolização das partículas, evidenciada pelo arredondamento dos seus bordos (setas), 45 dias, PIFG, 10x.



A



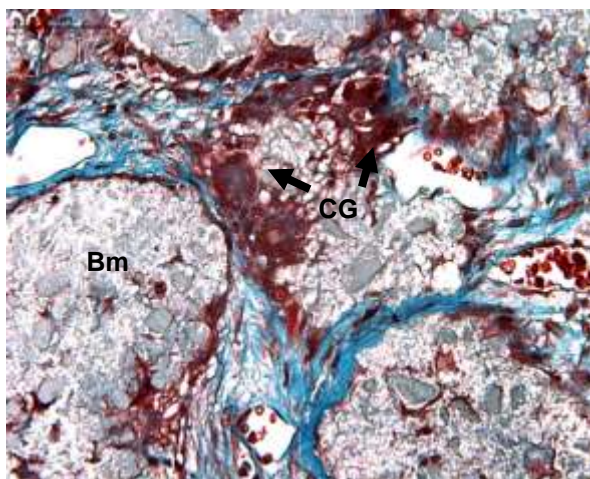
B



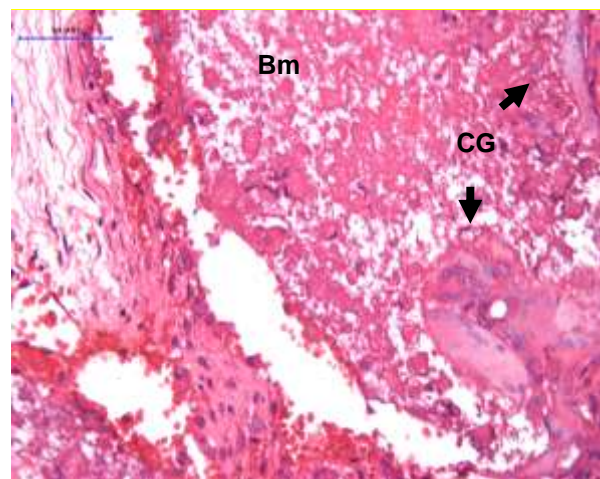
C

Em todos os grupos avaliados houve, no ponto biológico de 15 dias, uma reação inflamatória crônica do tipo linfocitária (seta), com discreto edema. Esta inflamação regrediu nos demais pontos biológicos. Nos grupos implantados, observou-se, aos 15 dias (Figura 15A, 15B e 15C), uma reação inflamatória crônica granulomatosa moderada, do tipo corpo estranho, com presença de células gigantes (CG), especialmente na interface com as partículas dos biomateriais (Bm), que persiste nos pontos biológicos mais tardios, com maior evidência nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais (Figura 15D).

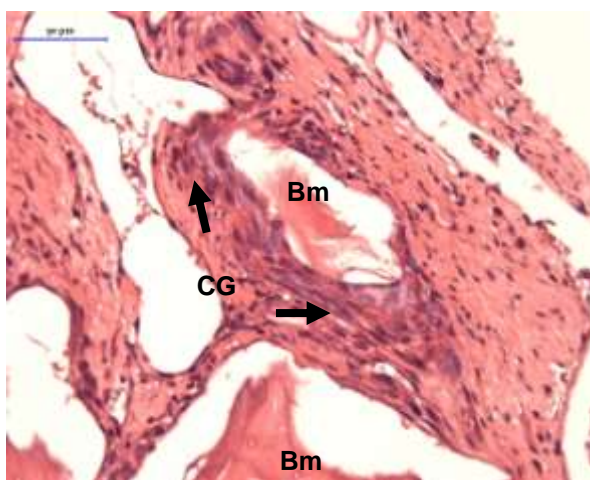
**Figura 15: Aspectos inflamatórios.** Observamos células gigantes (CG) (setas) ao redor das partículas dos biomateriais (Bm): A) GOO, 15 dias, TMG, 40x, B) GAA, 15 dias, HE, 40x; C) GHB, 15 dias, HE, 40x; D) GPP, 120 dias, TMG, 40x.



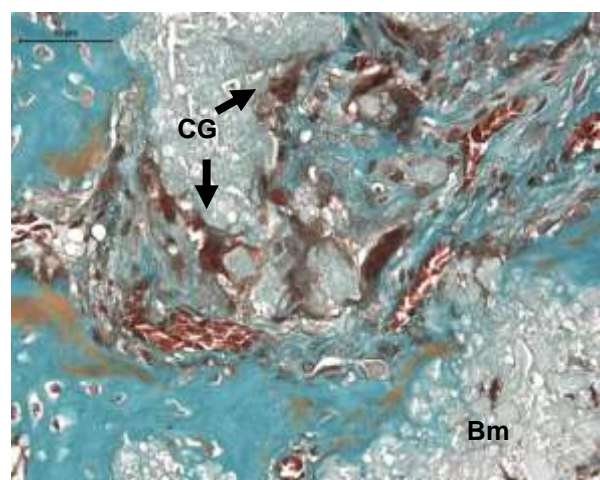
A



B



C



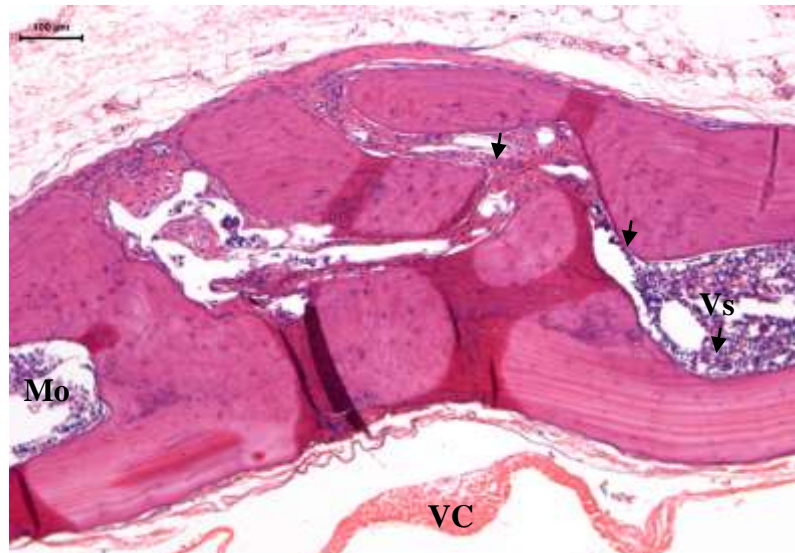
D

Os grupos GLL, GPP, GAA, GOO e GHB exibiram intensa angiogênese aos 15 dias, com expressiva neoformação vascular, evidenciada pela presença de células endoteliais com núcleos globosos projetados para a luz vascular, em especial entre as partículas dos biomateriais, por toda a área de implantação (Figura 17A e 17B). Nos pontos biológicos de 45 e 120 dias, a vascularização manteve-se presente, porém, as células endoteliais já encontravam-se com aspecto nuclear fusiforme.

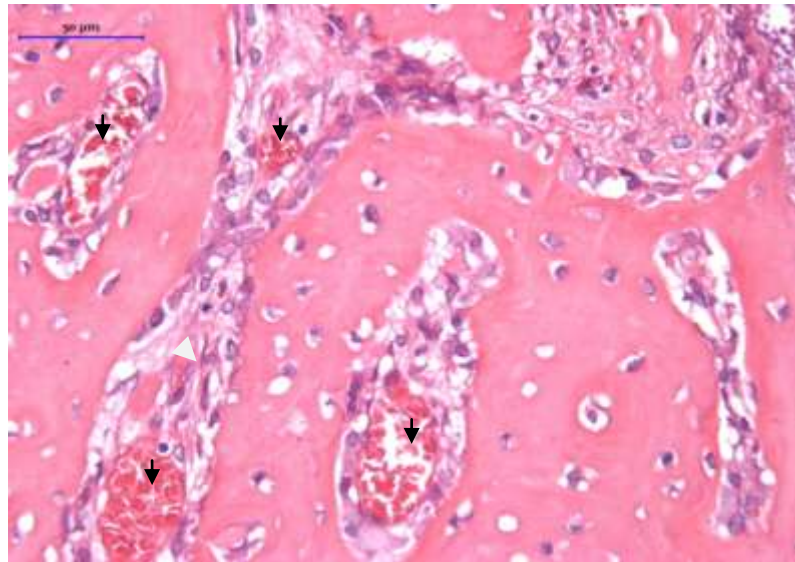
No grupo GCS aos 15 dias, houve a formação de capilares sanguíneos especialmente na região próxima à dura-máter. Nos demais pontos biológicos, a região compreendida pelo defeito apresentava menor formação vascular.

No GCI observamos escassa vascularização, mais evidente na região da medula óssea e na sutura sagital (Figura 16).

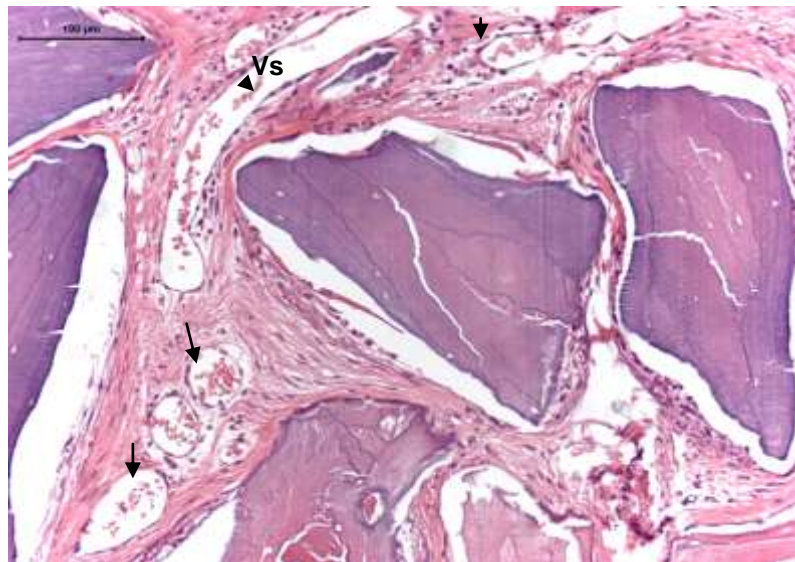
**Figura 16: Vasos sanguíneos na CI.** Região da sutura sagital GCI HE 4x; Vasos sanguíneos com seta (Vs) preferencialmente presentes na medula óssea (Mo).



**Figura 17: Vasos sanguíneos nos grupos implantados.** Observamos, no primeiro ponto biológico, uma intensa angiogênese em todos os grupos implantados. Setas nos vasos sanguíneos (Vs) A) GAA HE 15 dias 40x; B) GHB HE 15dias 20x.



A



B

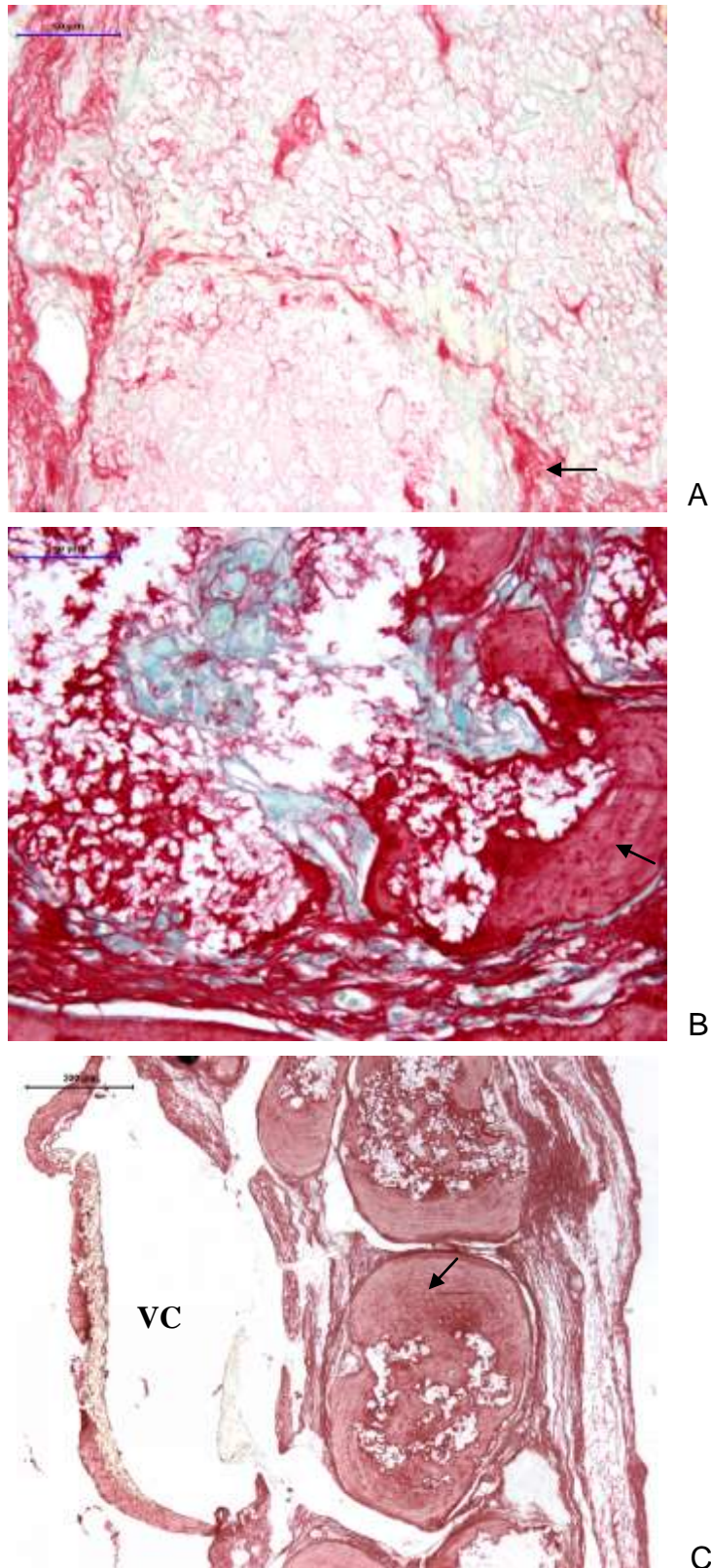
Nos quatro grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais, aos 15 dias, observamos grande produção de fibras colágenas de permeio às partículas dos biomateriais, além de uma conformação de septos fibrosos entre estas, com uma tendência centrípeta de formação (Figura 18A). Este aspecto permaneceu evidente aos 45 dias, mas já com uma tendência de organização em lamelas (Figura 18B). Aos 120 dias as fibras encontravam-se organizadas em lamelas em praticamente todo o defeito ao redor das partículas dos biomateriais (Figura 18C).

No GHB, aos 15 dias, houve grande produção de fibras colágenas entre as partículas porém, sem sinais de permeação (Figura 19A). Aos 45 dias estas fibras já apresentavam-se mais adensadas ao redor das partículas (Figura 19B). Aos 120 dias, as partículas do biomaterial apresentavam-se parcialmente circundadas por tecido conjuntivo fibroso denso e por fibras colágenas organizadas em lamelas próximas à região da dura-máter (DM).

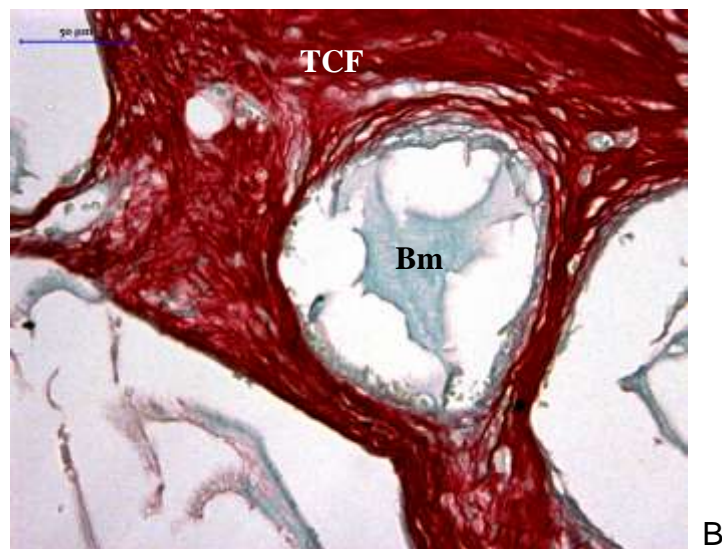
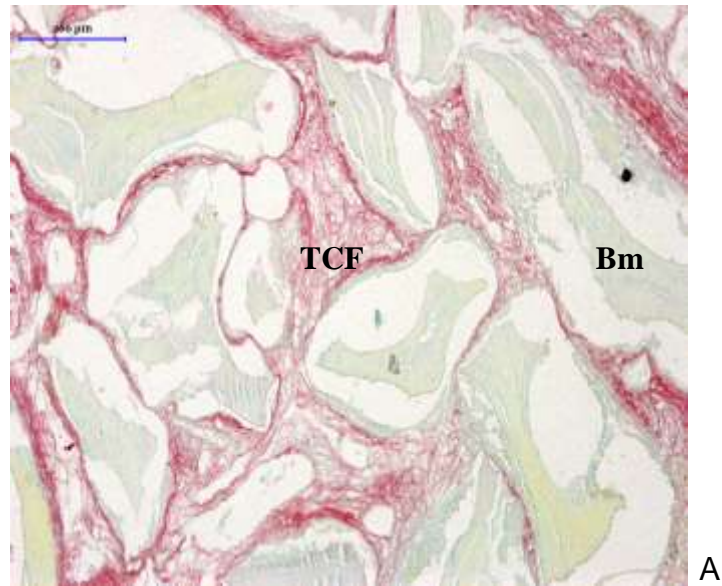
No GCS, aos 15 dias, houve a formação de tecido conjuntivo fibroso frouxo por toda a extensão do defeito (Figura 20A). Aos 45 dias, essa região apresentava-se preenchida por tecido conjuntivo fibroso denso, de espessura menor que a espessura das margens ósseas (Figura 20B).e permaneceu desta forma aos 120 dias, com espessura delgada.

No GCI, nos três pontos biológicos, observou-se fibras colágenas organizadas em lamelas (Figura 21 A e 21B).

**Figura 18: Proteínas colagênicas nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais** Observamos a conformação do tecido conjuntivo fibroso a permear as partículas do biomaterial no GPP, 15 dias, PIFG, 20x; B) Organização das fibras colágenas ao redor das partículas no GAA, 45 dias, PIFG, 20x; C) Fibras colágenas organizadas em lamelas no GOO, 120 dias, PIFG, 10x.

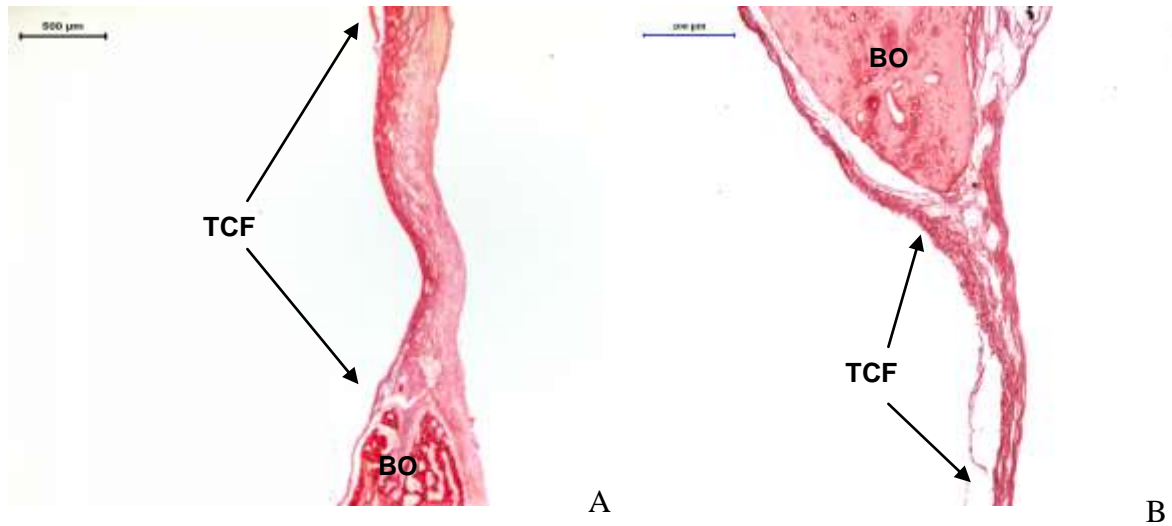


**Figura 19: Tecido conjuntivo fibroso no GHB.** Observamos o tecido conjuntivo fibroso (TCF) com uma tendência ao encapsulamento das partículas de hidroxiapatita bovina (Bm), sem permeação A) 15 dias PIFG 10x; B) 45 dias PIFG 40x.

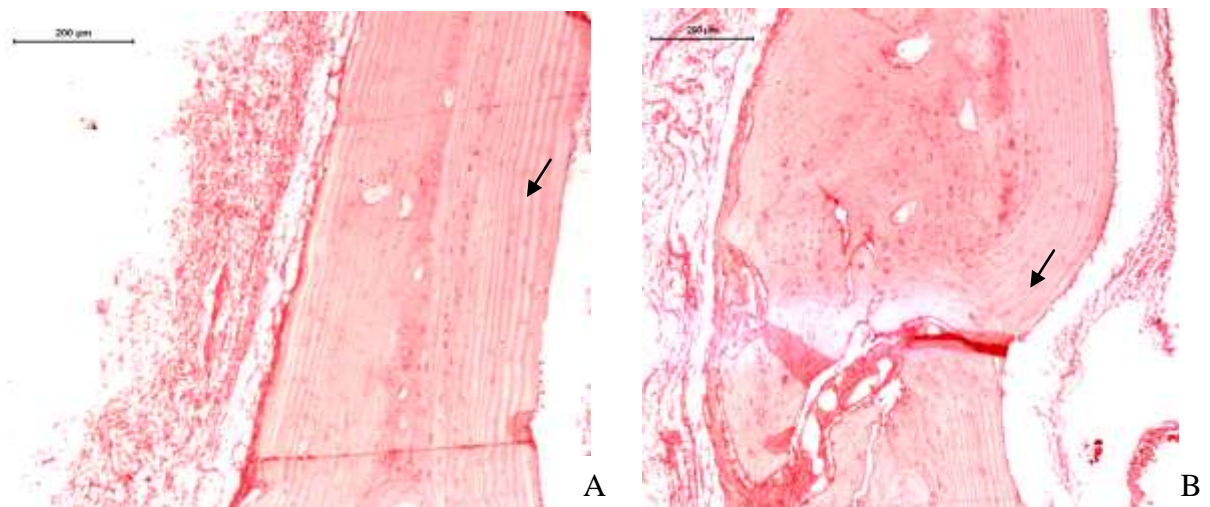




**Figura 20: Tecido conjuntivo fibroso no GCS.** Observamos uma conformação do tecido conjuntivo fibroso entre as bordas do defeito ósseo crítico. A) PIFG 15 dias 4x; B) PIFG 45 dias 10x.



**Figura 21: Conformação do tecido ósseo na calvária íntegra.** Lamelas assinaladas (setas), GCI, PIFG, 120 dias, 10x: A) lateralmente à sutura sagital; B) na região da sutura sagital.



Em GLL, GPP, GAA e GOO, aos 15 dias, ocorreu neoformação óssea reacional nas bordas, que propagou-se pelo defeito crítico, preferencialmente nas porções mais internas, próxima à dura-mater (DM) (Figura 22A, 22B, 22C e 22D), com presença de matriz osteoide (MO) no interior das partículas e ao seu redor (Figura 22E), com numerosos osteoblastos (Ob) nas áreas periféricas ao biomaterial (Bm) e osteócitos aprisionados na matriz osteoide (Mo) (Figura 22E e 22F).

Aos 45 dias a neoformação óssea nestes grupos já se comunicava por todo o defeito com abundante matriz osteoide e formação de lamelas por quase toda a espessura do reparo (Figuras 23A e 23B), com osteoblastos (Ob) próximos às partículas fragmentadas do biomaterial (Bm) e osteócitos (Oc) na matriz osteoide (Figuras 23C e 23D). Neste ponto biológico observa-se mineralização da matriz osteoide evidenciada em vermelho na colorações com TMG (Figura 23E) com presença de osteoblastos, osteócitos e grande metabolização das partículas de biomateriais (Bm) (Figura 23F).

Aos 120 dias, a neoformação óssea progrediu e o defeito encontrava-se preenchido em extensão e espessura por matriz osteoide a circundar as partículas fragmentadas de forma integrada ao biomaterial, com maior evidência nos grupos GAA e GOO (Figuras 24A, 24B, 24C e 24D). Observou-se uma organização lamelar do tecido ósseo em formação, com osteócitos já aprisionados na matriz osteoide (MO) em processo de maturação e mineralização, por todo o defeito ósseo crítico (Figuras 24E, 24F; 24G; 24H).

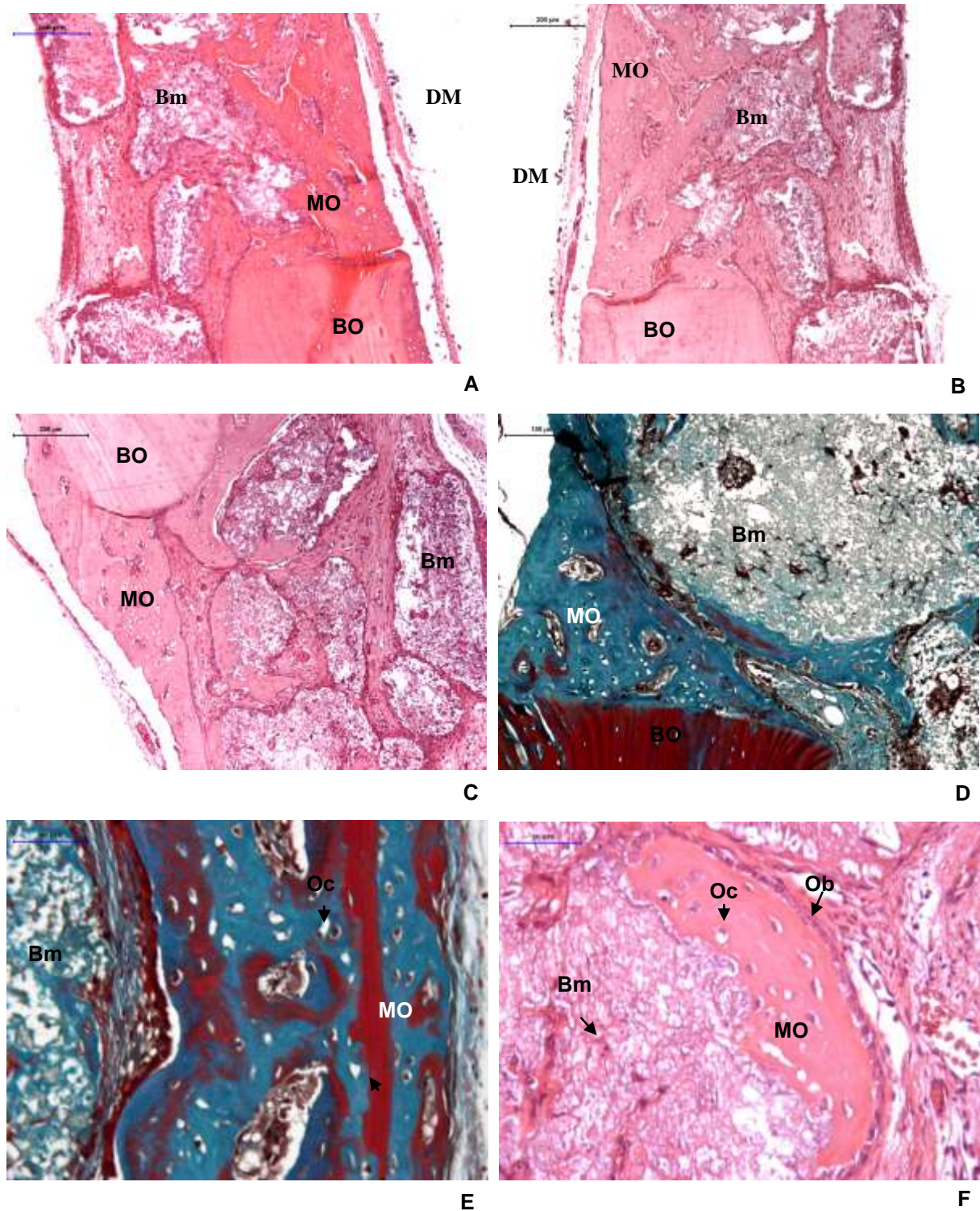
No GHB, a neoformação óssea foi reacional nas bordas do defeito aos 15 dias (Figura 25A). Aos 45 dias, a nova matriz osteoide formada nas bordas encontrava parcialmente propagada por sobre a dura-máter (DM), de forma centrípeta, com matriz osteoide entre as partículas (Figura 25B). Aos 120 dias, a matriz osteoide ocupou praticamente todo o defeito em extensão linear (Figura 25C), com as partículas do biomaterial parcialmente osseointegradas, em especial nas proximidades da dura-máter (Figura 25D).

No grupo GCS, aos 15 dias observou-se neoformação óssea reparativa restrita às bordas do defeito, com a presença de osteoblastos ativos. Aos 45, esta neoformação permaneceu restrita às bordas, porém em maior extensão, com presença de osteoblastos e osteócitos. Nas demais regiões não foram observados

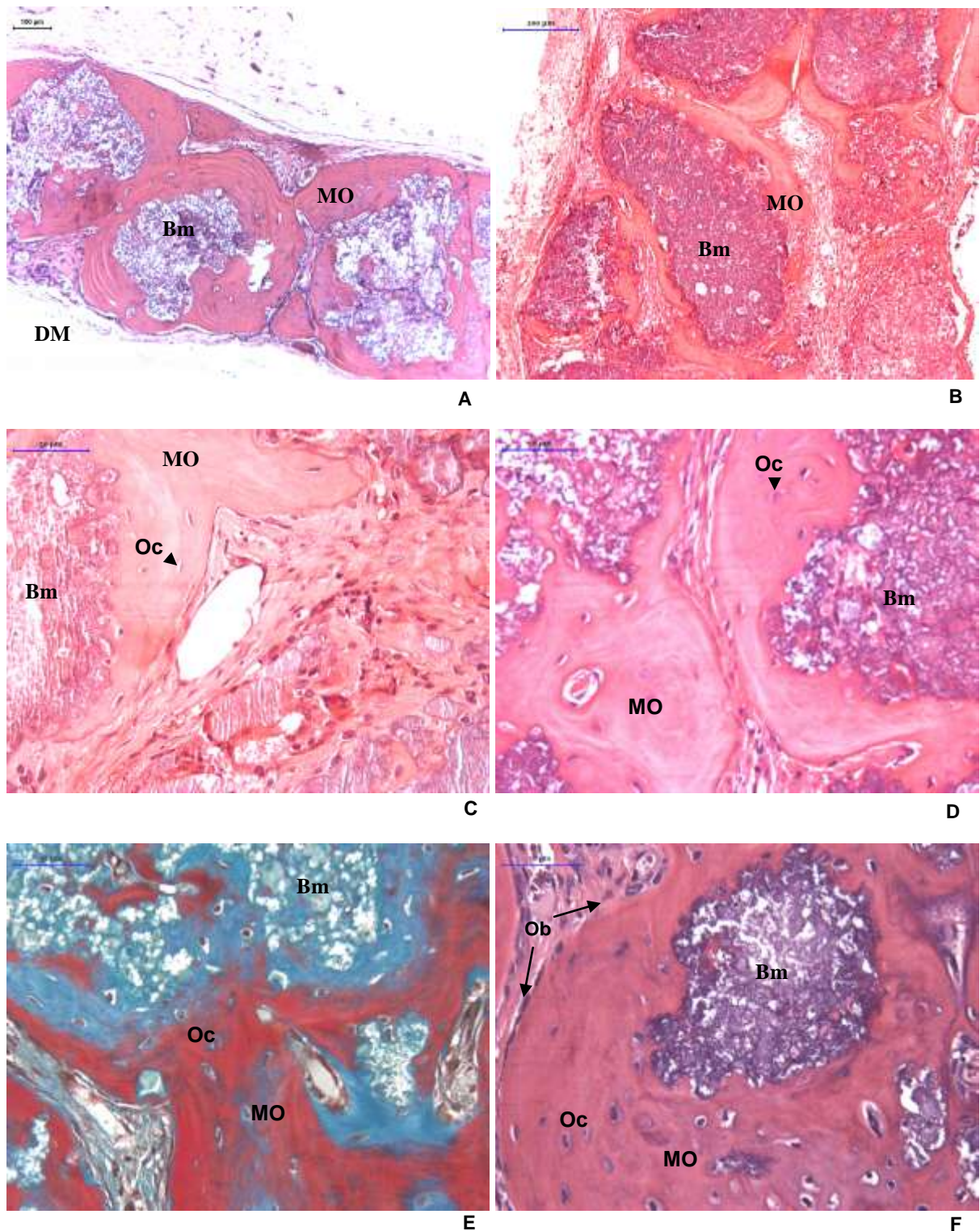
núcleos de formação de matriz osteoide (Figura 26A). Aos 120 dias (Figura 26B) aspectos de osso neoformado foram observados nas bordas ósseas, porém com estrutura pouco notável, caracterizada pela presença de osteócitos, mas sem características de proliferação e atividade osteoblástica.

As calvárias íntegras, GCI, foram observadas nos três pontos biológicos e retiradas de regiões idênticas, sem variação histológica significativa. Observou-se um aspecto de tecido ósseo com lamelas, de espessura variável ao longo da área representada e maior dimensão próximo às suturas. Lacunas com osteócitos foram observadas algumas vezes entre as lamelas ósseas com abundância de matriz osteoide mineralizada e escassa medula óssea (Figura 27A, 27B e 27C).

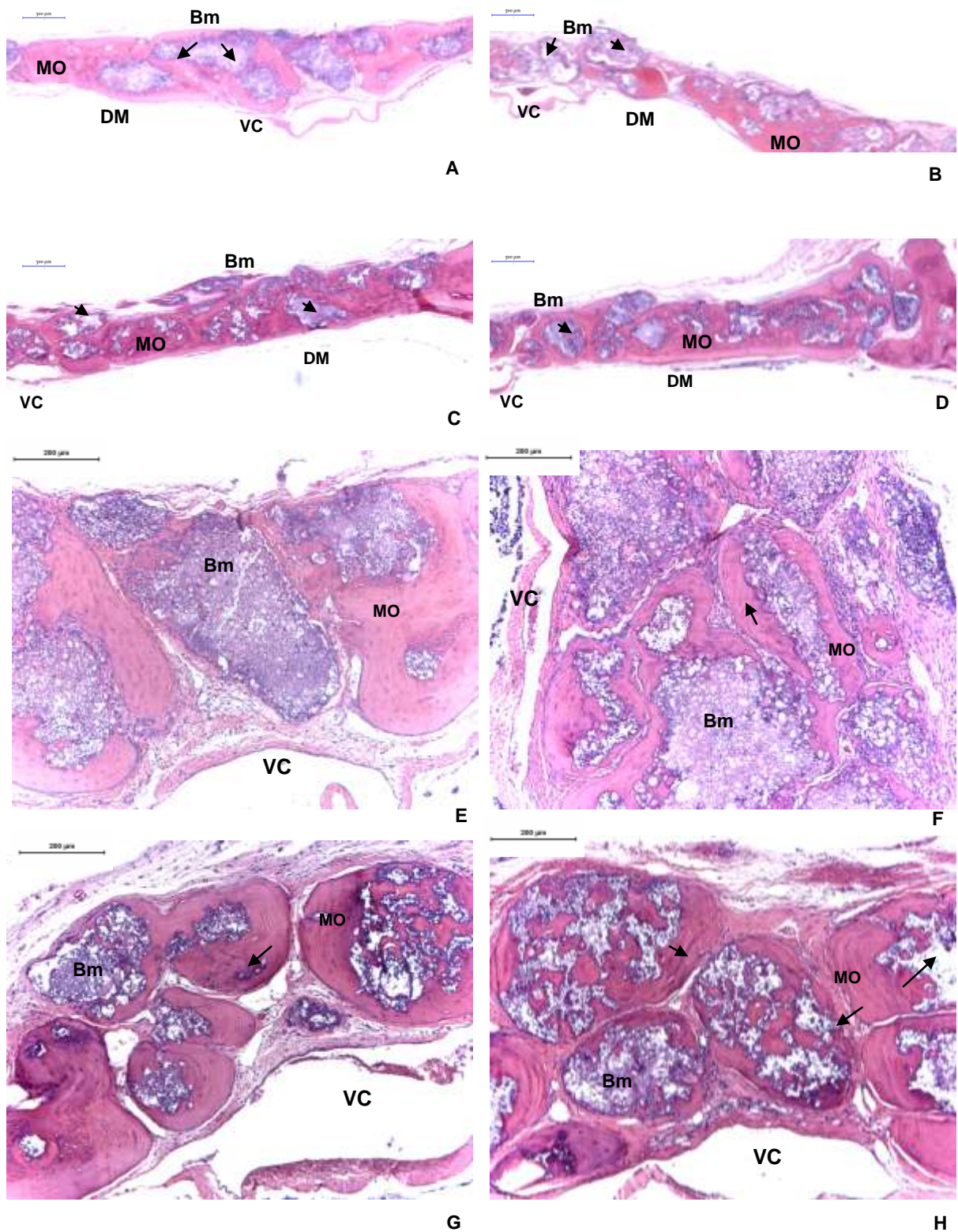
**Figura 22: Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 15 dias..** Observamos neoformação óssea reacional que se propaga pelo defeito preferencialmente próximo à dura-mater e ao redor das partículas dos biomateriais em A) GOO HE10x; B) GAA HE 10x; C) GLL HE 10x; D) GPP HE 20x. Em maior aumento observa-se mineralização da matriz osteoide E) GOO TMG 40x; F) Presença de inúmeros osteoblastos enfileirados no limite da matriz osteoide depositada junto à partícula do biomaterial (Bm), GAA, HE, 40x.



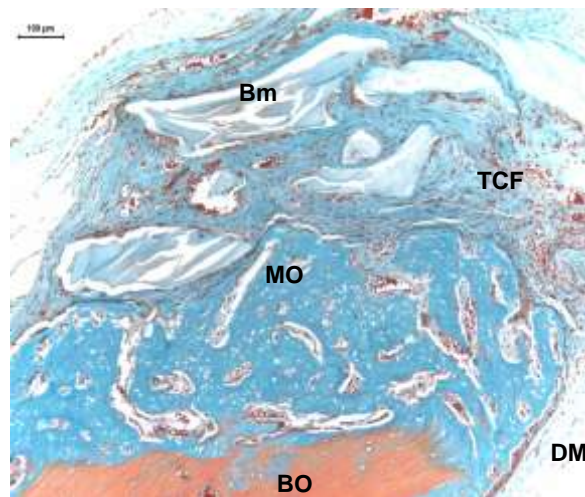
**Figura 23: Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 45 dias.** Neoformação óssea com matriz osteoide (MO) ao redor das partículas dos biomateriais (Bm): A) GOO, HE, 4x; B) GPP, HE, 10x; C) GLL, HE, 40x; D) GPP, HE, 40x. Neste ponto biológico observa-se mineralização da matriz osteoide evidenciada em vermelho na colorações com TMG: E) GAA, TMG, 40x; com presença de osteoblastos, osteócitos e grande metabolização das partículas de biomateriais (Bm) F) GOO, HE, 40x.



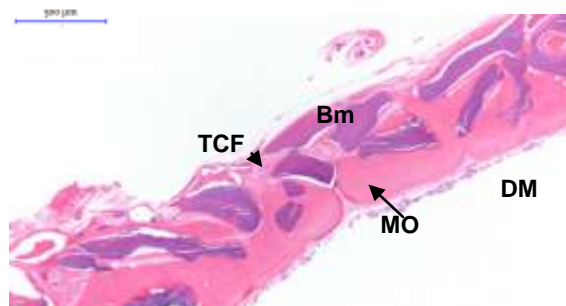
**Figura 24: Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 120 dias.** Observamos a regeneração do defeito ósseo crítico com deposição de matriz osteoide (MO) e metabolização dos biomateriais (Bm) (setas), HE, 2,5x: A) GLL; B) GPP; C) GAA; D) GOO. Matriz osteoide integrada aos biomateriais por toda a espessura do reparo. Nestes cortes podemos observar a região da veia central, mais crítica ao reparo com a presença de partículas em diferentes estágios de degradação, além de inúmeros osteócitos (Oc) aprisionados na matriz osteoide (MO) (setas), HE, 10x: E) GLL; F) GPP; G) GAA; H) GOO. Nota-se uma maior bioatividade nos grupos GAA e GOO.



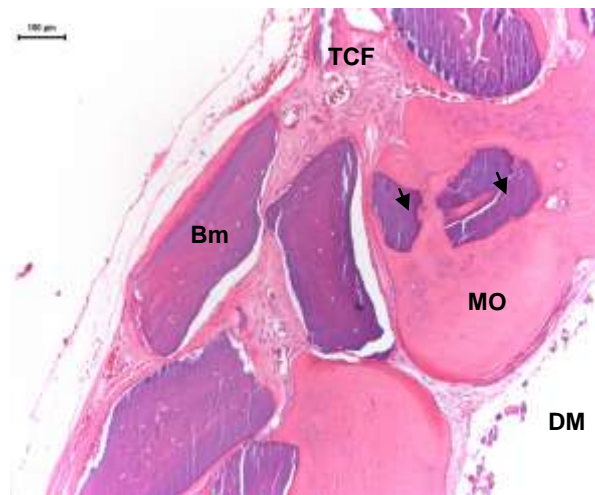
**Figura 25: Osteogênese GHB** A) Neoformação óssea reacional com deposição de matriz osteoide (MO) contígua à borda óssea (BO), 15 dias, TMG, 10x; B) Aos 120 dias observamos neoformação óssea próxima à dura-máter (DM), com presença de grande quantidade de partículas de biomaterial (Bm), circundadas parcialmente por matriz osteoide (MO) e por tecido conjuntivo fibroso (TCF); C) Observamos os mesmos aspectos descritos anteriormente em maior aumento (HE, 10x) com setas em partículas incorporadas à nova matriz osteoide.



A

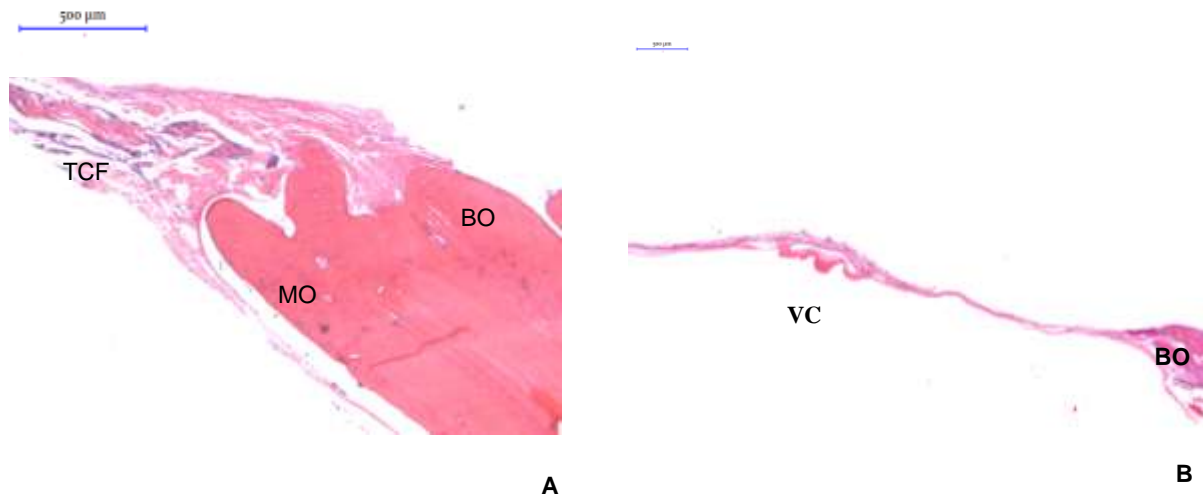


B

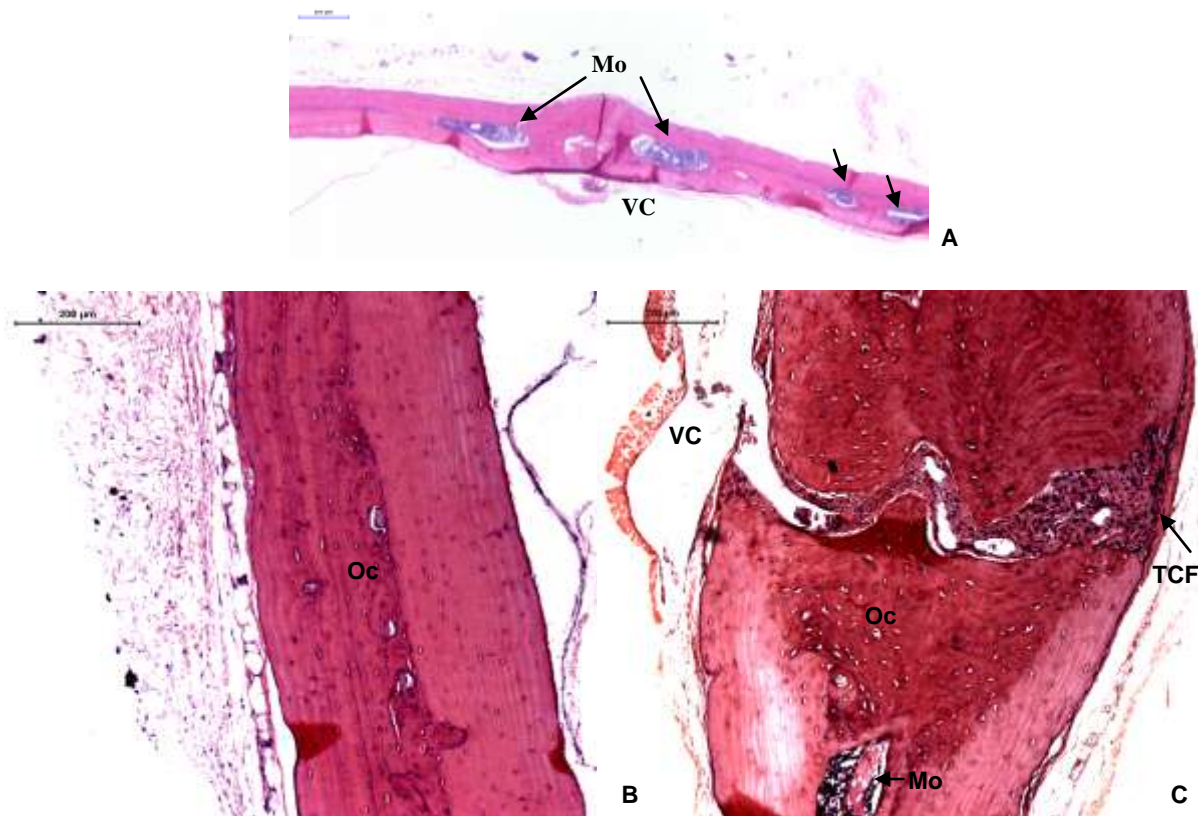


C

**Figura 26: Osteogênese GCS.** Observamos uma osteogênese reacional restrita às bordas ósseas. A) 45 dias HE 4x B) 120 dias HE 2,5x.



**Figura 27: Calvária íntegra.** Observamos a calvária íntegra no GCI aos 120 dias, com reduzida quantidade de medula óssea (Mo) (setas) e tecido conjuntivo fibroso (TCF), e numerosos osteócitos (Oc): A) HE, 2,5x; B) HE, 10x; C) região da sutura sagital, HE, 10x.





## 5.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS COM ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.2.1. Porcentagem de nova matriz osteoide no reparo do defeito ósseo crítico

Foram calculadas as médias e os desvios-padrão da porcentagem de matriz osteoide na região do reparo do defeito ósseo crítico, dos grupos do ponto biológico de 15 dias, de acordo com os grupos (Tabela 8), representados graficamente na figura 28.

De acordo com a tabela 4, existem diferenças entre as médias de porcentagem de matriz osteoide: GLL (38,00%; SD 8,31%), GPP (29,52%; SD 5,38%); GAA (46,07%; SD 6,66%), GOO (52,91%; SD 7,39%), GHB (5,70; SD 1,38%), GCS (4,31%; SD 0,75%) e GCI (96,64%, SD 0,98%).

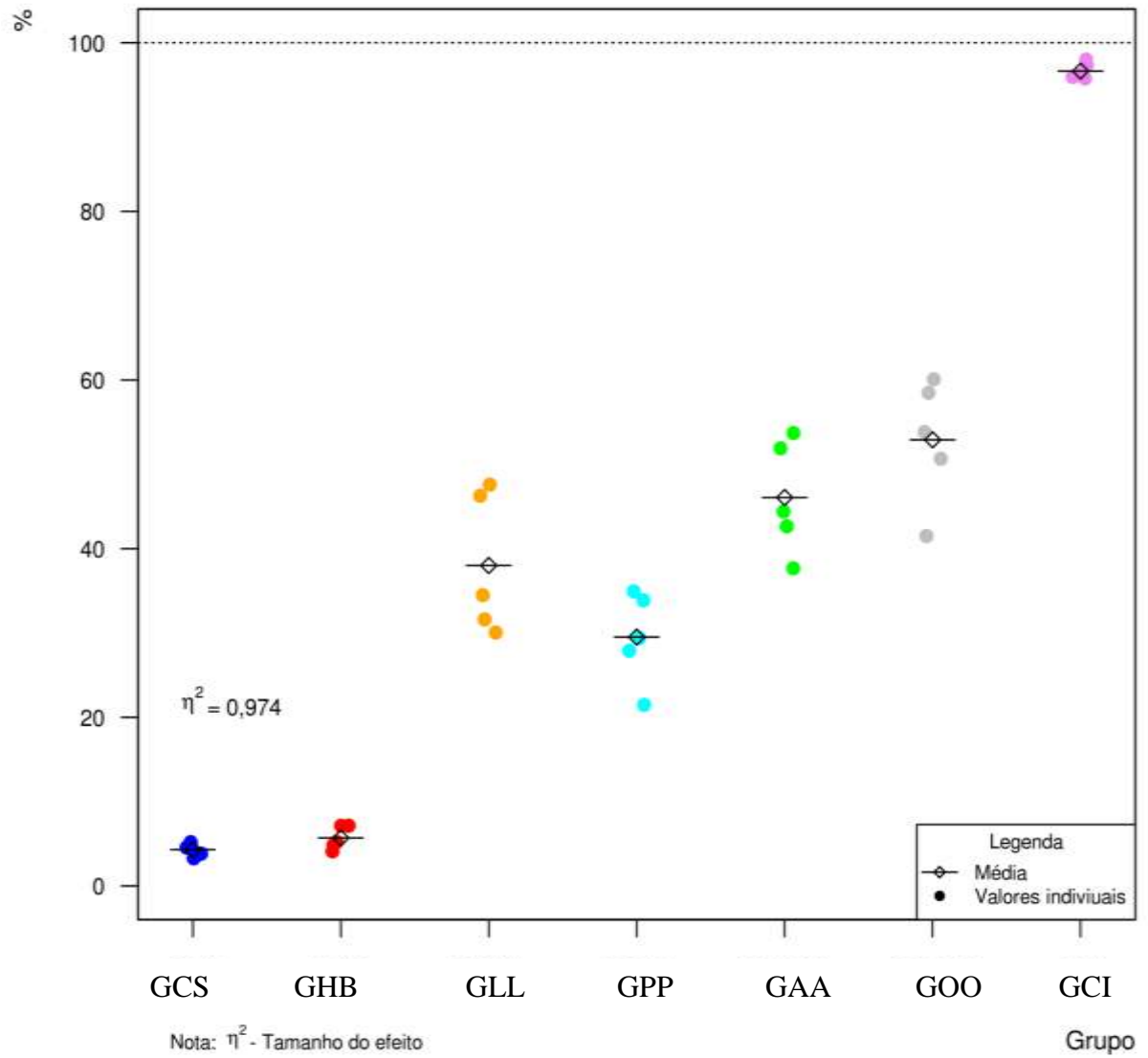
Foi encontrado um tamanho de efeito global estimado  $\eta^2$  de 97,4% ( $p < 0,001$ ).

As diferenças das médias comparativamente ao GCS, pelo teste de Dunnett, com intervalo de confiança de 95% e tamanho do efeito ajustado para cada teste ( $d$ ), revelaram que apenas o GHB ( $d = 1,25$ ;  $p = 0,997$ ) não mostrou uma diferença estatisticamente significativa, com tamanho de efeito de 1,25. Os demais grupos mostraram diferenças significantes e tamanhos de efeitos superiores: GLL ( $d = 5,7$ ;  $p < 0,001$ ), GPP ( $d = 6,6$ ;  $p < 0,001$ ), GAA ( $d = 106,06$ ;  $p < 0,001$ ), GHB ( $d = 1,2$ ;  $p = 0,01$ ), GCI ( $d = 106,06$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabela 5).

A seguir, com a redução dos grupos para GLL, GPP, GAA e GOO, uma nova análise de variância foi efetuada, na qual foi encontrado um tamanho de efeito  $\eta^2$  de 66,1% ( $p < 0,001$ ).

A análise de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, após 15 dias, revelou serem significantes somente as diferenças entre os grupos GAA e GPP ( $d = 2,7$ ;  $p < 0,001$ ), GOO e GPP ( $d = 3,6$ ;  $p < 0,001$ ) e GOO e GLL ( $d = 1,9$ ;  $p = 0,019$ ), embora neste último o tamanho do efeito tenha sido menor (Tabela 6).

Figura 28: Gráfico da porcentagem de matriz óssea nos diferentes grupos, no ponto biológico de 15 dias.



**Tabela 4: Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada de acordo com os grupos aos 15 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Desvio padrão (%)</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
GLL	38,00	8,31	30,06	47,59
GPP	29,52	5,38	21,47	34,94
GAA	46,07	6,66	37,67	53,71
GOO	52,91	7,39	41,50	60,08
GHB	5,70	1,38	4,11	7,15
GCS	4,31	0,75	3,29	5,19
GCI	96,64	0,98	95,76	98,00

**Tabela 5: Comparação múltipla 2 a 2 entre grupos e GCS aos 15 dias**

	<b>Diferença entre as médias (%)</b>	<b>Intervalo de confiança 95% (%)</b>	<b>P</b>	<b>TDE (d de Cohen)</b>
GHB-GCS	1,4	[-7,9 — 10,7]	0,997	1,3
GLL-GCS	33,7	[24,4 — 42,9]	< 0,001	5,7
GPP-GCS	25,2	[15,6 — 34,5]	< 0,001	6,6
GAA-GCS	41,8	[32,5 — 51,0]	< 0,001	8,8
GOO-GCS	48,6	[39,4 — 57,8]	< 0,001	9,3
GCI-GCS	92,3	[83,1 — 101,6]	< 0,001	106,1

**Tabela 6: Comparação múltipla dos grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 15 dias**

	<b>Diferença entre as médias (%)</b>	<b>Intervalo de confiança 95% (%)</b>	<b>p</b>	<b>TDE (d de Cohen)</b>
GLL-GPP	8,5	[-4,2 — 21,2]	0,262	1,2
GAA-GPP	16,6	[3,8 — 29,3]	0,009	2,7
GOO-GPP	23,4	[10,7 — 36,1]	< 0,001	3,6
GAA-GLL	8,1	[-4,6 — 20,8]	0,302	1,1
GOO-GLL	14,9	[2,2 — 27,6]	0,019	1,9
GOO-GAA	6,8	[-5,9 — 19,5]	0,437	1,0

Aos 45 dias, as médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide nos grupos, foram: GLL 50,32% (SD 9,26%), GPP 50,22% (SD 4,88%), GAA 65,43% (SD 5,44%), GOO 68,51% (SD 2,27%), GHB 11,17% (SD 2,07%), GCS 9,61% (SD 1,54%), GCI 96,19% (SD 0,79%), os quais constam na tabela 7.

De acordo com o observado na tabela 15, ocorreu uma variação entre as médias, com maior porcentagem de matriz osteoide formada nos grupos implantados com o biomaterial sintético experimental. O grupo GHB (11,17; SD 9,23%) mostrou uma quantidade de matriz osteoide muito próxima a GCS (9,61%; SD 1,54%). Todos os grupos apresentaram uma grande diferença de porcentagem de matriz osteoide com relação ao GCI (96,19%; SD 0,79%).

O efeito global  $\eta^2$  foi de 98% ( $p < 0,001$ ).

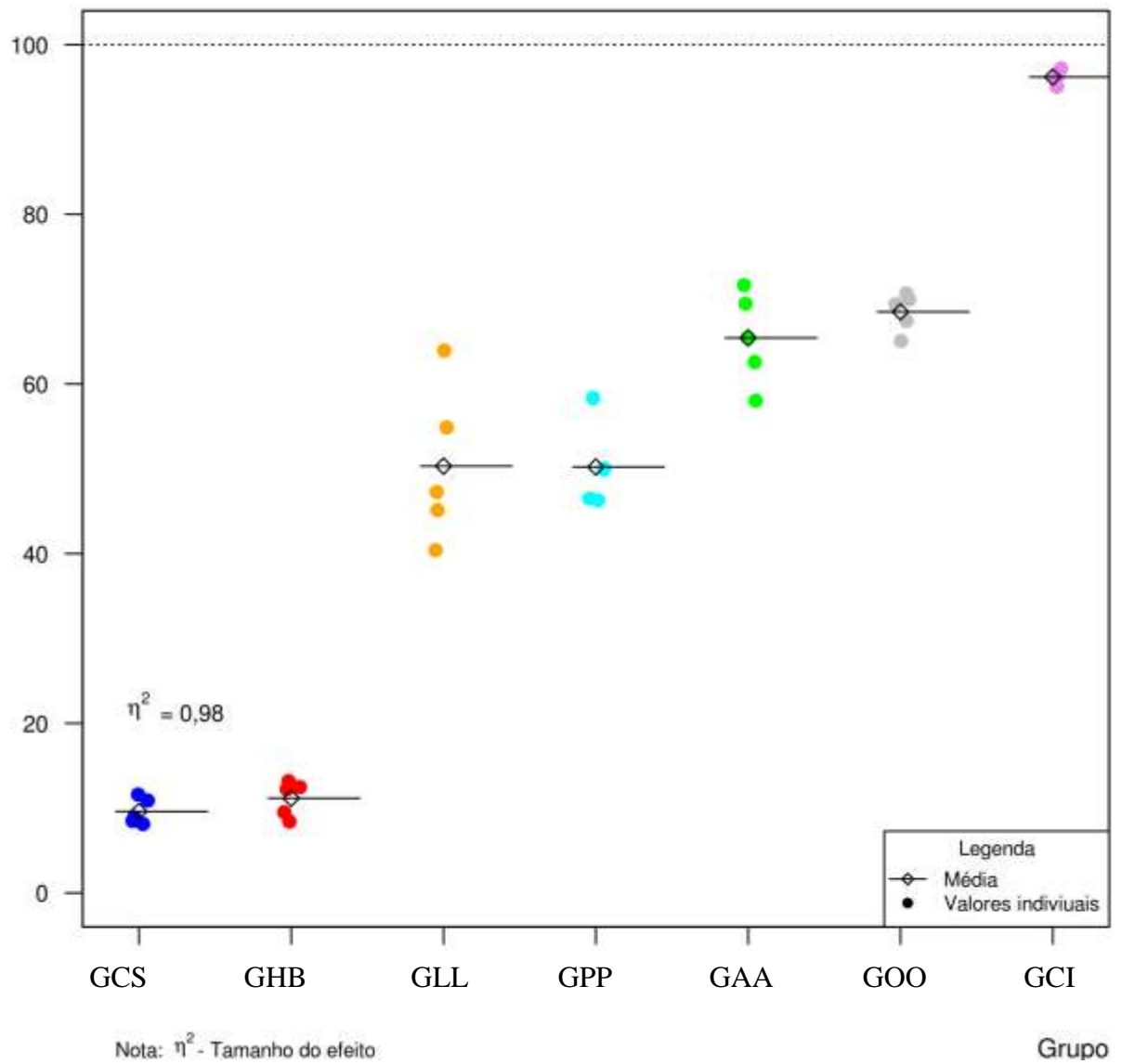
A figura 29 representa os resultados graficamente.

Pelo teste de Dunnett, ao compararmos as diferenças das médias de porcentagem de matriz osteoide de todos os grupos com o GCS, com intervalo de confiança de 95%, todos mostraram diferenças estatisticamente significantes, com grande tamanho de efeito, com exceção do grupo GHB ( $d = 0,9$ ;  $p = 0,997$ ) (Tabela 8).

Uma anova análise de variância foi efetuada para os GLL, GPP, GAA e GOO devido à redução dos grupos, que encontrou um tamanho de efeito  $\eta^2$  de 71,2% ( $p < 0,001$ ).

Pela análise de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, após 45 dias de implantação dos biomateriais somente as diferenças entre os grupos GAA e GPP ( $d = 2,9$ ;  $p = 0,005$ ), GAA e GLL ( $d = 2,0$ ;  $p = 0,005$ ), GOO e GLL ( $d = 2$ ;  $p = 0,001$ ) e GOO e GPP ( $d = 4,8$ ;  $p < 0,001$ ) foram estatisticamente significantes (Tabela 9).

Figura 29: Gráfico da porcentagem de matriz óssea nos diferentes grupos, no ponto biológico de 45 dias.



**Tabela 7: Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 45 dias de acordo com os grupos**

Grupo	Média (%)	Desvio padrão (%)	Mínimo (%)	Máximo (%)
GLL	50,32	9,23	40,4	63,9
GPP	50,22	4,88	46,3	58,3
GAA	65,43	5,44	58,0	71,7
GOO	68,51	2,27	65,1	70,7
GHB	11,17	2,07	8,4	13,2
GCS	9,61	1,54	8,1	11,6
GCI	96,19	0,79	95,3	97,2

**Tabela 8: Comparações múltiplas 2 a 2 entre grupos e GCS aos 45 dias**

	Diferença entre as médias (%)	Intervalo de confiança 95% (%)	p	TDE (d de Cohen)
GHB-GCS	1,6	[-6,5 — 9,6]	0,9968	0,8
GLL-GCS	40,7	[32,7 — 48,7]	< 0,001	6,2
GPP-GCS	40,6	[32,6 — 48,6]	< 0,001	11,2
GAA-GCS	55,8	[47,8 — 63,8]	< 0,001	14,0
GOO-GCS	58,9	[50,9 — 66,9]	< 0,001	30,4
GCI-GCS	86,6	[78,6 — 94,6]	< 0,001	70,7

**Tabela 9: Comparação múltipla dos grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 45 dias**

	Diferença entre as médias (%)	Intervalo de confiança 95% (%)	p	TDE (d de Cohen)
GLL-GPP	0,1	[10,7 — 10,9]	0,999	0
GAA-GPP	15,2	[4,4 — 26,1]	0,005	2,9
GOO-GPP	18,3	[7,4 — 29,1]	< 0,001	4,8
GAA-GLL	15,1	[4,3 — 26,0]	0,005	2,0
GOO-GLL	18,2	[7,3 — 29,0]	0,001	2
GOO-GAA	3,1	[-7,8 — 13,9]	0,848	0,7

As médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide nos grupos aos 120 dias foram: GLL 52,37% (SD 6,86%), GPP 59,46% (SD 6,86%), GAA 78,91% (SD 5,11%), GOO 79,63% (SD3,77%), GHB 51,91% (SD 5,43%), GCS 24,54% (SD 9,03), GCI 96,28% (SD 0,92%), os quais constam na tabela 10.

Foi encontrado um tamanho de efeito estimado  $\eta^2$  0,94 ( $p < 0,001$ ).

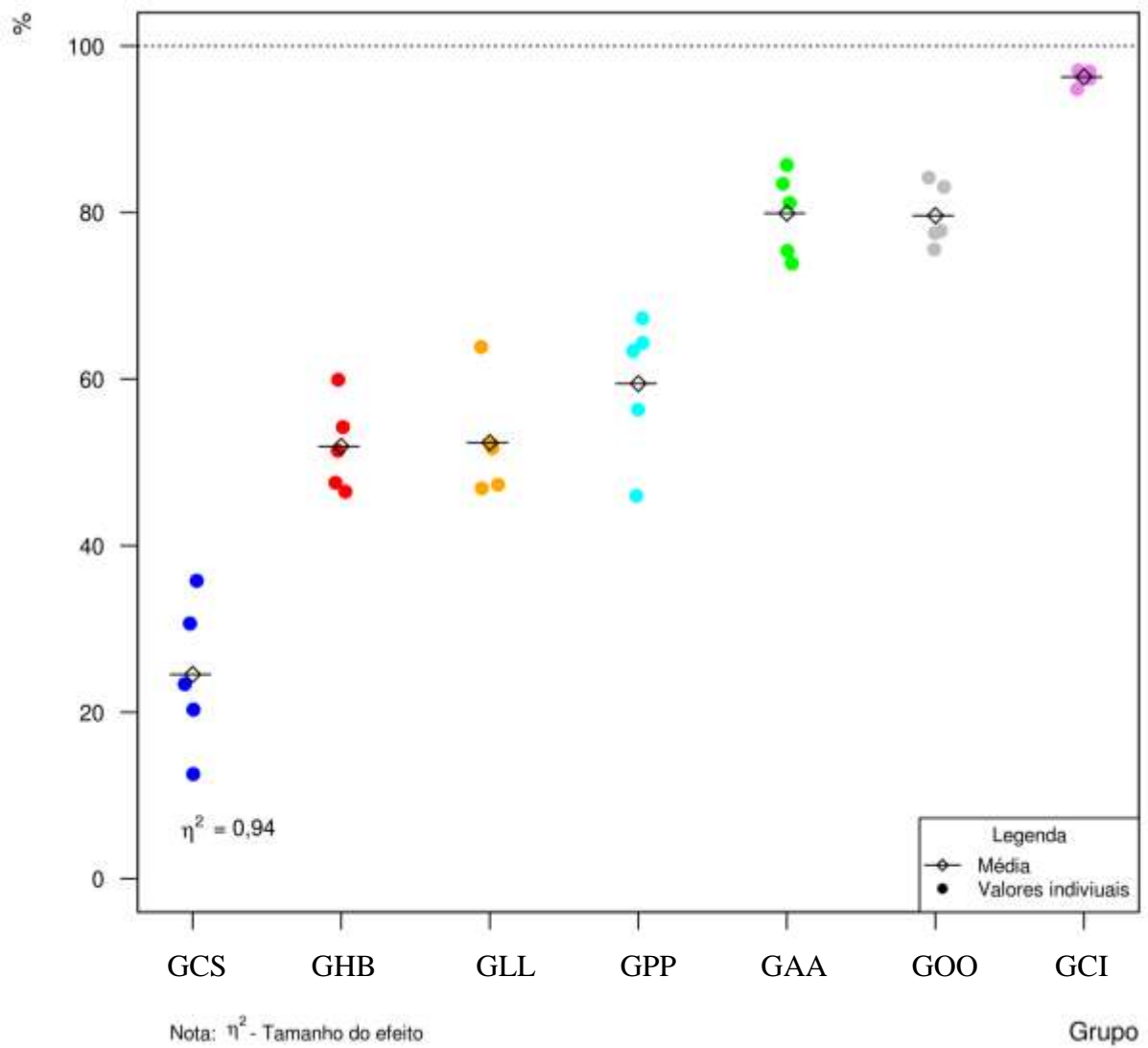
Estes resultados encontram-se representados na figura 30.

Pelo teste de Dunnett, ao compararmos todos os grupos contra o GCS, com intervalo de confiança de 95%, todos os tratamentos revelaram diferenças estatisticamente significantes com grande tamanho de efeito (Tabela 11).

A nova análise de variância entre os grupos GLL, GPP, GAA e GOO foi efetuada devido à redução dos grupos e foi encontrado um tamanho de efeito estimado  $\eta^2$  0,82 ( $p < 0,001$ ).

No teste de comparações múltiplas de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, após 120 dias de implantação dos biomateriais experimentais, somente as diferenças entre os grupos GAA e GLL ( $d = 4,6$ ;  $p < 0,001$ ), GAA e GPP ( $d = 2,9$ ;  $p < 0,001$ ), GOO e GLL ( $d = 4,93$ ;  $p < 0,001$ ) e GOO e GPP ( $d = 3,1$ ;  $p < 0,001$ ) foram estatisticamente significantes (Tabela 12).

Figura 30: Gráfico da porcentagem de matriz óssea nos diferentes grupos, no ponto biológico de 120 dias.





**Tabela 10: Médias (desvios padrão) da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 120 dias**

Grupo	Média (%)	Desvio padrão (%)	Minimo	Máximo
GLL	52,37	6,9	46,9	63,9
GPP	59,46	8,5	45,9	67,3
GAA	78,91	5,1	73,9	85,7
GOO	79,63	3,8	75,6	84,2
GHB	51,91	5,4	46,5	59,9
GCS	24,54	9,0	12,6	35,8
GCI	96,38	0,9	94,8	97,1

**Tabela 11: Comparação múltipla 2 a 2 com o GCS através do teste de Dunnett - 120 dias**

	Diferença entre as médias	Intervalo de confiança 95%	p	TDE( d de Cohen)
GHB-GCS	27,4	[16,6 — 38,2]	< 0,001	3,7
GLL-GCS	27,8	[17,0 — 38,6]	< 0,001	3,5
GPP-GCS	34,9	[24,1— 45,7]	< 0,001	4,0
GAA-GCS	55,4	[44,6 — 66,2]	< 0,001	7,6
GOO-GCS	55,1	[44,3 — 65,9]	< 0,001	8,0
GCI-GCS	71,7	[61,0 — 82,5]	< 0,001	11,2

**Tabela 12: Comparação múltipla dos grupos GLL, GPP, GAA e GOO através do teste de Tukey – 120 dias**

	Diferença entre as médias(%)	Intervalo de confiança 95% (%)	p	TDE (d de Cohen)
GLL-GPP	7,1	[-4,4 — 18,6]	0,322	0,9
GAA-GPP	20,5	[9,0 — 32,0]	< 0,001	2,9
GOO-GPP	20,2	[8,7— 31,6]	< 0,001	3,1
GAA-GLL	27,5	[16,1 — 39,0]	< 0,001	4,55
GOO-GLL	27,3	[15,8 — 38,7]	< 0,001	4,93
GOO-GAA	0,3	[-11,2 — 11,7]	0,99987	0,06

### **5.2.2. Porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide**

No ponto biológico de 15 dias, nos grupos com conteúdo de zinco, este parâmetro foi superior a 50%, GOO (61,25%) e GAA (52,11%), e de aproximadamente 40% nos grupos GLL e GSOPP, sem conteúdo de zinco. As menores porcentagens deste parâmetro ocorreram nos grupos GHB (19,22%) e GCS (14,5%) (Tabela 13).

Aos 45 dias, novamente observou-se uma maior porcentagem nos grupos implantados com conteúdos de zinco, GAA (79,9%) e GOO (69,96%), seguidos dos grupos GLL (60,74%) e GPP (54,93%). Os grupos GHB (40%) e GCS (19%) mostraram as menores porcentagens de neoformação óssea linear no defeito (Tabela 14).

Aos 120 dias, todos os grupos implantados mostraram resultados superiores a 75% da distância linear do defeito ocupada por matriz osteoide, com valores crescentes nos grupos GHB (76,12%), GPP (76,22%), GLL (83,74%), GAA (90,45) e GOO (95,24%) (Tabela 15).

O GCI mostrou os maiores valores (> 99%), em todos os pontos biológicos.

**Tabela 13: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 15 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	40	4,13	[35,73 – 45,72]
GPP	40	10,73	[30,34 – 45,52]
GAA	52	4,42	[50,39 – 61,25]
GOO	61	3,52	[55,08 – 63,98]
GHB	19	0,44	[18,50 – 19,61]
GCV	14	1,31	[12,83 – 16,27]
GCI	> 99,9	-	-

**Tabela 14: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 45 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	61	7,71	[50,62 – 66,11]
GPP	55	8,05	[49,67 – 64,04]
GAA	80	10,54	[74,26 – 88,13]
GOO	70	2,15	[66,38 – 79,23]
GHB	40	10,61	[35,44 – 57,76]
GCS	19	1,23	[18,27 - 19,69]
GCI	> 99,9	-	-

**Tabela 15: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 120 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	84	9,19	[72,14 – 87,79]
GPP	76	5,19	[76,01 – 89,65]
GAA	90	1,50	[88,09 – 95,41]
GOO	95	1,56	[88,81 – 96,57]
GHB	76	8,01	[65,78 – 78,71]
GCS	20	1,49	[19,29 – 20,98]
GCI	> 99,9	-	-

### **5.2.3. Porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico preenchido por tecido conjuntivo fibroso**

No ponto biológico de 15 dias, este parâmetro foi superior em GCS (95,30%), seguido do GHB (41,56%). Entre os grupos implantados com os biomateriais experimentais sem conteúdo de zinco apresentaram porcentagem de tecido conjuntivo fibroso inferior a 30%, GLL 22,38% e GPP 28,98%, e com conteúdo de zinco inferior a 20%, GAA 18,11% e GOO 15,87%, de acordo com a tabela 16.

Aos 45 dias, persistem os resultados de maior porcentagem de tecido conjuntivo fibroso nos grupos GCS (41,79%) e GHB (41,94%). Entre os demais grupos implantados, mantém-se as maiores porcentagem para os grupos sem conteúdos de zinco, GLL (19,73%) e GPP (10,88%), seguidos dos grupos com conteúdo de zinco, GAA (10,64%) e GOO (8,01%) (Tabela 17).

Aos 120 dias, novamente os resultados de maior porcentagem de tecido conjuntivo fibroso ocorreram no grupo no grupo GCS (20,43%). Entre os demais grupos implantados, mantém-se a maior porcentagem para o grupo GHB (14,29%), Entre os grupos implantados com os biomateriais experimentais, as maiores porcentagens deste parâmetro ocorreram nos grupos sem conteúdos de zinco, GLL (12,38%) e GPP (10,42%), seguidos dos grupos com conteúdo de zinco, GAA (5,31%) e GOO (5,56%) (Tabela 18).

O GCI apresentou valores inferiores a 0,01% de tecido conjuntivo fibroso na área correspondente ao defeito crítico em todos os pontos biológicos.

**Tabela 16: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por tecido conjuntivo fibroso aos 15 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	22	5,5	[20,1 – 27,5]
GPP	29	5,9	[24,8 – 34,7]
GAA	18	2,4	[12,6 – 20,5]
GOO	16	3,0	[13,7–19,6]
GHB	47	3,2	[35,5 – 45,4]
GCS	95	0,3	[94,8 – 96,5]
GCI	< 0,1%	–	–

**Tabela 17: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por tecido conjuntivo fibroso aos 45 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	20	7,0	[11,8 – 28,3]
GPP	11	2,0	[10,5 – 15,1]
GAA	11	2,4	[6,5 – 13,4]
GOO	8	3,9	[5,2 – 11,4]
GHB	42	1,0	[40,9 – 47,5]
GCS	42	7,3	[41,1 – 58,4]
GCI	< 0,1	–	–

**Tabela 18: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por tecido conjuntivo fibroso aos 120 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	12	2,6	[10,31 – 14,97]
GPP	10	3,9	[5,08 – 12,65]
GAA	5	2,7	[3,76 – 7,74]
GOO	6	2,4	[5,11 – 9,11]
GHB	14	5,0	[10,37 – 18,74]
GCS	20	3,0	[15,90 – 24,80]
GCI	< 0,1	–	–

#### **5.2.4. Porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico preenchido por partículas de biomateriais**

A porcentagem de biomaterial presente na região do defeito, aos 15 dias pós-operatório, foi superior no GHB (51%), seguido dos grupos GLL (40%), GPP (40%), GAA (33%) e GOO (31%) (Tabela 19).

No ponto biológico de 45 dias, novamente o GHB (47%) foi o grupo que exibiu maior porcentagem de área preenchida por partículas de biomaterial, seguido dos grupos GPP (37%), GLL (31%), GOO (21%) e GAA (19%) (Tabela 20).

No ponto biológico de 120 dias, ainda são notadas a presença de partículas de biomaterial a ocuparem a região do defeito ósseo, em quantidade decrescente nos grupos GHB (30%), GPP (26%), GLL (25%), GOO (14%) e GAA (11%) (Tabela 21).

Os grupos GCS e GCI não constam das tabelas por não possuírem biomateriais implantados.

**Tabela 19: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por partículas de biomaterial no ponto biológico de 15 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	40	9	[29,3 – 48,8]
GPP	30	1	[38,6 – 43,8]
GAA	33	6	[30,7– 40,3]
GOO	31	7	[23,8 – 38,7]
GHB	51	3	[47,9 – 51,9]

**Tabela 20: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por partículas de biomaterial no ponto biológico de 45 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	31	2,67	[26,7 – 34,6]
GPP	37	4,66	[30,6 – 38,5]
GAA	19	11,06	[8,5 – 31,4]
GOO	21	0,33	[17,6 – 22,3]
GHB	47	6,66	[44,9 – 52,7]

**Tabela 21: Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por partículas de biomaterial no ponto biológico de 120 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (%)</b>	<b>Intervalo interquartílico (%)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (%)</b>
GLL	25	3,16	[10,5 – 27,7]
GPP	26	9,33	[20,9 – 32,8]
GAA	11	4,99	[10,5 – 15,7]
GOO	14	2,06	[9,2 – 15,3]
GHB	30	4,91	[30,3 – 35,9]

#### 4.1.1. Espessura do reparo e da calvária íntegra

Em todos os grupos implantados, aos 15 dias, observou-se uma similaridade de espessura do reparo do defeito ósseo crítico, GHB (0,9mm), GLL (0,9mm), GPP (0,9 mm), GAA (1,0 mm), GOO (0,9 mm), com dimensões superiores aos grupos GCS (0,6 mm) e GCI (0,5 mm) (Tabela 22).

Aos 45 dias, a espessura dos reparos dos defeitos críticos nas calvárias implantadas apresenta valores superiores a 0,6mm, GHB (0,8 mm), GLL (0,9 mm), GPP (1,0 mm), GAA (0,6 mm), GOO (0,8 mm), enquanto no GCS (0,4 mm) e no GCI (0,5 mm) mostrou-se com dimensões inferiores a 0,5 mm (tabela 23).

No ponto biológico de 120 dias, a espessura do reparo das calvárias implantadas GHB (0,8 mm), GLL (0,9 mm), GPP (0,9 mm), GOO (0,8 mm), persistem superiores a 0,8 mm, com exceção do GAA que mostrou valores aproximados à 0,5 mm. O GCS apresentou espessura de 0,3 mm e o GCI espessura de 0,6 mm (tabela 24).



**Tabela 22: Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na reação do defeito ósseo crítico aos 15 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (mm)</b>	<b>Intervalo interquartílico (mm)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (mm)</b>
GLL	0,9	0,02	[0,8-0,9]
GPP	0,9	0,02	[0,9–1,0]
GAA	1.0	0,05	[0,9-1,0]
GOO	0,9	0,10	[0,8-0,9]
GHB	0,9	0,11	[0,8-0,9]
GCS	0,6	0,02	[0,4-0,8]
GCI	0,6	0,07	[0,5-0,7]

**Tabela 23: Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na reação do defeito ósseo crítico aos 45 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (mm)</b>	<b>Intervalo interquartílico (mm)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (mm)</b>
GLL	0,9	0,06	[0,9 – 1,0]
GPP	1,0	0,04	[0,9 – 1,0]
GAA	0,6	0,05	[0,4 – 0,7]
GOO	0,8	0,19	[0,7 – 0,9]
GHB	0,8	0,11	[0,7 – 0,9]
GCS	0,4	0,02	[0,4 – 0,5]
GCI	0,5	0,08	[0,5 – 0,7]

**Tabela 24: Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na reação do defeito ósseo crítico aos 120 dias**

<b>Grupo</b>	<b>Mediana (mm)</b>	<b>Intervalo interquartílico (mm)</b>	<b>[Mínimo- Máximo] (mm)</b>
GLL	0,9	0,03	[0,9 – 1,0]
GPP	0,9	0,05	[0,9 – 1,0]
GAA	0,5	0,08	[0,4 – 0,5]
GOO	0,8	0,01	[0,6 – 0,8]
GHB	0,8	0,09	[0,7 – 0,9]
GCS	0,3	0,05	[0,2 – 0,3]
GCI	0,6	0,06	[0,6 – 0,7]

*DISCUSSÃO*

## 5. DISCUSSÃO

Novos biomateriais substitutos ósseos biodegradáveis, projetados de forma a serem capazes de cumprir com os requisitos necessários para auxiliar a regeneração de defeitos ósseos críticos, têm sido desenvolvidos e mostrado bons resultados comparativamente aos existentes no mercado.

Os biomateriais sintéticos experimentais ora avaliados foram desenvolvidos como arcabouços auxiliares à regeneração óssea, facilmente degradados em contato com fluidos fisiológicos e capazes de liberar íons bioativos e osseointutores quando implantados *in vivo*. Recentemente uma destas formulações, AA, foi aprovada pela comunidade europeia, para uso clínico nas áreas de odontologia e de cirurgia maxilo-facial, com o nome comercial de Sil-Oss<sup>®</sup> (GARCÍA DE CASTRO, et al., 2010; PADILLA et al., 2015).

O presente estudo possibilitou uma avaliação do comportamento osteogênico do SilOss<sup>®</sup> e de três outras formulações dos biomateriais sintéticos, com ou sem conteúdo de zinco, implantados em defeito ósseo crítico à regeneração espontânea.

As semelhanças nas formas e nos tamanhos das partículas, e as diferenças químicas qualitativas e quantitativas nortearam os eventos biológicos subsequentes às implantações.

Devido ao fato de serem granulados, todos os biomateriais preencheram satisfatoriamente o defeito, tanto nos grupos implantados com os biomateriais experimentais como no grupo implantado com uma hidroxiapatita bovina comercial (GHB), de origem animal, o qual foi considerado como um dos controles neste estudo. Em todos os grupos, as partículas mantiveram-se próximas e agregadas pelo coágulo sanguíneo originado em decorrência do ato cirúrgico, o que possibilitou tanto a formação dos arcabouços de uma forma estável como uma interação de células, matriz extracelular e biomaterial, premissas para a regeneração óssea (CORDARO et al., 2008; PORTER; RUCKH; POPAT, 2009; VOLKOV et al., 2010; CHACARTI et al., 2011).

A faixa granulométrica utilizada neste estudo foi a mesma para todos os biomateriais, o que facilitou a comparação do arranjo formado por estas partículas nos arcabouços. A visualização de partículas com semelhantes formas e de bordos regulares em GLL, GPP, GAA e GOO deveu-se tanto à similaridade química qualitativa das formulações, quanto aos métodos de síntese e processamento utilizados.

Este aspecto mostrou-se diferente no grupo implantado com a hidroxiapatita bovina (GHB), em especial no ponto biológico de 15 dias, onde foram visualizadas partículas com bordos irregulares e espículas evidentes, certamente em consequência da origem natural do biomaterial, as quais, mesmo após o seu processamento, permaneceram com as características morfológicas de osso bovino triturado (KRUSE et al., 2011; SHIMITT et al., 2012).

A alta solubilidade dos biomateriais sintéticos experimentais traduziu-se, de modo geral, por uma similaridade morfológica das partículas dos biomateriais experimentais implantados nos três pontos biológicos, de forma a reduzirem suas quantidades em função de maiores períodos de tempo transcorridos desde o momento da sua implantação, um resultado esperado para biomateriais biodegradáveis (TAMIMI et al., 2010; PADILLA et al., 2015).

Este aspecto mostrou-se diferente no GHB, o qual apresentou visualmente maior integridade das suas partículas, manutenção morfométrica nos dois primeiros pontos biológicos, de 15 e 45 dias, e somente decréscimo da porcentagem do reparo do defeito ósseo ocupado por partículas de biomaterial aos 120 dias, certamente devido à alta estabilidade e consequente baixa solubilidade verificada previamente *in vitro*.

Esta diferença de comportamento entre os biomateriais de origem sintética e natural ocorreu provavelmente devido às suas composições e características. Enquanto o biomaterial de origem natural é composto na sua totalidade por hidroxiapatita bovina, de difícil metabolização, todos os biomateriais sintéticos experimentais possuem elevadas concentrações monetita e de fase amorfa de fosfato de cálcio e sílica, que somadas são, em todas as formulações, superiores a 60% das respectivas composições, compostos estes de alta solubilidade em fluidos fisiológicos (HABIBOVIC et al., 2008; PADILLA et al., 2015).

De maneira geral, este fato pontuou positivamente os biomateriais sintéticos, que permitiram variações em sua formulação e síntese, o que foi vedado ao biomaterial de substituição óssea exclusivamente oriundo de fonte animal.

A maior degradabilidade dos biomateriais experimentais refletiu-se em outra importante característica, a porosidade intragranular. Embora, previamente à implantação, esta porosidade fosse similar entre os biomateriais de origem sintética e natural (entre 50% e 60%), verificada quando das caracterizações físico-químicas, após a implantação, visualmente, foi mais evidente nos biomateriais de origem sintética, supostamente devido à solubilização gradual da monetita e da fase amorfa de fosfato de cálcio e sílica, presentes na superfície das partículas destes biomateriais (TAMIMI, et al., 2008; TAMIMI et al., 2009; TORRES et al., 2015).

Esta porosidade intragranular possivelmente interferiu de forma positiva no aumento da área superficial das partículas dos diferentes biomateriais sintéticos experimentais (PADILLA et al., 2015) que previamente à implantação eram similares às da hidroxiapatita bovina, na faixa de 40 a 60m<sup>2</sup>/g. Apesar de estes parâmetros não terem sido mensurados, é de se esperar que tenham influenciado nas reações tissulares desencadeadas pelo contato biomaterial-célula-matriz extra celular e, conseqüentemente contribuído para um aumento da bioatividade destes novos compostos.

Todos estes aspectos nortearam a resposta inflamatória desencadeada após as implantações. Todos os biomateriais foram biocompatíveis, desencadearam discreto edema intersticial e infiltrado inflamatório crônico, reações estas também deflagradas pela liberação de mediadores inflamatórios decorrentes do procedimento cirúrgico por si e presentes no grupo GCS.

Esta biocompatibilidade já era esperada tendo em vista a similaridade da composição dos biomateriais tanto de origem sintética como de origem bovina, com os elementos comuns à fração mineral do tecido ósseo. A ausência de elementos imunogênicos ou citotóxicos e a correta esterilização dos mesmos também influenciaram de modo positivo para a biocompatibilidade observada (KLAMMERT et al., 2009).

A presença dos biomateriais no leito ósseo desencadeou uma reação inflamatória crônica, do tipo granulomatosa, com a presença de células gigantes

visualizadas especialmente próximas às partículas, que contribuiu de forma positiva para a metabolização dos biomateriais, e possibilitou a reabsorção dos mesmos (GARRIGUES et al., 2005; TRAINI, et al., 2007; ROLIM 2010; BARRETO, 2011, ROLIM, 2013).

Embora em todos os grupos a respectiva quantidade de biomaterial inserido no defeito tenha sido similar, o primeiro ponto biológico avaliado foi aos 15 dias pós operatórios e, dentro deste período, a solubilização e metabolização dos biomateriais iniciadas logo após as implantações traduziram-se por diferentes percentuais de partículas presentes na região do defeito para todos os grupos na avaliação do primeiro ponto biológico.

Estas reações continuaram no decorrer do tempo que, embora não tenha sido considerado uma variável neste estudo, ao compararmos a porcentagem de partículas presentes na área do reparo entre os diferentes pontos biológicos dos grupos implantados com os mesmos biomateriais, podemos inferir que a metabolização resultante da solubilização, da degradação e da ação de células gigantes, ocorreu de forma expressiva em todos os grupos e de forma contínua pelos pontos biológicos avaliados, em especial nos grupos com conteúdo de zinco GAA e GOO, seguramente, devido à elevada bioatividade deste elemento, biodisponibilizado de forma lenta e contínua logo após sua implantação.

Entre estes, o GAA ainda apresentou as maiores taxas de degradação, resultado de uma maior razão entre as somas das quantidades de monetita e das fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica em relação à hidroxiapatita, componente de modulação da solubilidade dos biomateriais. Esta maior biodegradabilidade da formulação AA levou a uma diminuição da espessura do reparo, que não foi observado nos estudos de Padilla et al. (2015), provavelmente devido às diferenças morfológicas dos defeitos e metabólicas dos diferentes locais de implantação entre os modelos escolhidos. Esta perda do arcabouço não foi observada nos GOO, provavelmente por esta formulação OO oferecer ao leito receptor da calvária um maior equilíbrio entre os componentes de diferentes solubilidades.

A escolha da faixa granulométrica também colaborou para a modulação da reação inflamatória. Partículas muito diminutas, capazes de exacerbar a reação

inflamatória, foram removidas ao selecionarmos, previamente à implantação, uma faixa de tamanho de partículas de 0,4 a 0,6mm (CAMPOS; ROSA, 2012).

A seleção das partículas neste intervalo de tamanho, tornou ainda possível uma padronização das amostras, a elevação da área de superfície específica e, conseqüentemente, uma maior reatividade dos biomateriais e de seus arredores (CAMPOS, 2012).

Além da presença de poros intragranulares característicos dos biomateriais, a proximidade entre as partículas formou poros intergranulares bastante irregulares em consequência das diferentes formas das partículas e de seu arranjo tridimensional. Esta conformação foi de extrema importância para a formação de poros interconectados, que permitiram a angiogênese responsável pela nutrição e pelas trocas metabólicas dos enxertos (KLENKE et al., 2008), além do entrelaçamento de fibras colágenas, visualizado em todos os grupos implantados, que manteve-se presente em todos os pontos biológicos avaliados.

Apesar de, morfometricamente terem sido encontradas diferenças na porcentagem de área de reparo ocupada por estas fibras aos 15 dias, morfologicamente, elas se distribuíram de forma a permearem as partículas dos biomateriais sintéticos experimentais, de maneira uniforme nestes grupos, certamente em virtude da semelhante porosidade e comportamento físico-químico das suas diferentes formulações.

Esta permeabilidade das fibras colágenas não foi observada no GHB, as quais apresentaram-se com uma tendência à encapsularem as partículas, possivelmente devido à alta estabilidade da hidroxiapatita bovina, resultado já encontrado e descrito em trabalhos anteriores (CAMPOS; ROSA, 2012).

A conformação das fibras colágenas também influenciou na caracterização do defeito. Dentro deste parâmetro, foi possível confirmar a realização do defeito crítico quando no GCS houve a formação de tecido conjuntivo fibroso por praticamente todo o reparo e em todos os pontos biológicos avaliados, além de termos observado uma grande redução da sua espessura nos três pontos biológicos (15 dias com 0,50mm; 45 dias com 0,40mm; 120 dias com 0,20mm) em relação às bordas ósseas, com outros estudos que corroboram estes resultados (MIGUEL, 2008; BARRETO, 2012; CAMPOS; ROSA 2012; CAMPOS, 2012; ROLIM, 2013).

Além das dimensões do defeito e ausência de um arcabouço, a dificuldade de regeneração óssea observada no GCS ocorreu em consequência das particularidades anatômicas e fisiológicas da calvária, tais como o limitado suprimento sanguíneo e a escassez de medula óssea local, características observadas no grupo GCI, que resultou em insuficiência de fatores de crescimento necessários ao reparo desejado (SCHMITZ; HOLLINGER, 1986; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CARDOSO et al., 2006; MIGUEL et al., 2006; CARVALHO, 2010; ROLIM, 2010; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2011; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; BARRETO, 2011; CAMPOS; ROSA, 2012; CAMPOS, 2012).

Ainda que estes fatores tenham limitado o reparo, ocorreu no GCS uma pequena formação de matriz osteoide desencadeada, provavelmente, pela reação inflamatória deflagrada pelo trauma cirúrgico, que conferiu um aumento da vascularização na região das bordas ósseas, com liberação de citocinas e fatores de crescimento neste microambiente (CARANO; FILVAROFF, 2003). Esta neoformação óssea, todavia, ocorreu de modo insuficiente para a completa regeneração do defeito crítico (MIGUEL, 2008; BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; ROLIM, 2013).

Estes eventos ocorreram também nos grupos implantados, contudo, por agora haver um arcabouço formado pelos biomateriais, a adesão de osteoblastos e subsequente aposição de matriz osteoide foi por ele possibilitada. Esta nova matriz se propagou a partir das bordas do defeito em direção ao centro de forma crescente nos pontos biológicos avaliados e caracterizou uma osteogênese por osteocondução em todos os grupos, compatível com muitos estudos que mostraram esta capacidade tanto dos compostos à base de fosfatos de cálcio de origem sintética ou natural na regeneração de defeitos ósseos críticos (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Todos biomateriais deste estudo detinham características em sua composição que viabilizaram este desempenho, e conferiram um efeito global elevado, porém, observamos logo no primeiro e no segundo pontos biológicos avaliados, um maior potencial osteogênico dos biomateriais sintéticos experimentais comparativamente ao GCS, com diferenças quantitativas significantes,  $p < 0,001$  e tamanhos de efeito superiores a 5,7 em todos os grupos.



Entre o GCS e o GHB não houve diferença quantitativa significativa de porcentagem de matriz osteoide presente no defeito nos dois primeiros pontos biológicos ( $p > 0,99$ ) e, comparativamente aos tamanhos de efeito obtidos com as implantações dos biomateriais sintético experimentais, mostrou-se reduzido,  $d = 1,2$  aos 15 dias e de  $d = 0,9$  aos 45 dias. Estes resultados se traduzem em uma superioridade dos compostos experimentais comparativamente à hidroxiapatita bovina em pelo menos 4 desvios.

Esta evidência corrobora a importância da disponibilização contínua de íons bioativos como o cálcio, o fósforo, o silício e o zinco, desde o primeiro momento após a implantação, propiciada por biomateriais de alta solubilidade como a monetita, o fosfato de cálcio amorfo e o gel de sílica (MURPHY et al, 2009; ROETMAN et al, 2010; IDOWU et al., 2014; PADILLA et al., 2015; TORRES et al., 2015). A hidroxiapatita bovina, por sua vez, apenas possibilitou a formação de um arcabouço estável ao reparo ósseo, sem uma maior bioatividade inicial (VOLKOV et al., 2010; CHACARTI et al., 2011; CAMPOS; ROSA, 2012).

No entanto, no ponto biológico mais tardio, a presença do zinco como auxiliar na osteogênese, marcou importante diferença entre os grupos. Aos 120 dias após as implantações, os grupos GLL, GPP e GHB apresentaram, comparativamente ao GCS diferenças estatisticamente significantes na quantidade de nova matriz osteoide presente no reparo, com  $p < 0,001$  e  $d > 3$ , porém similares entre si e muito inferiores aos resultados obtidos com os biomateriais com conteúdo de zinco GAA ( $d = 7,6$ ;  $p < 0,001$ ) e GOO ( $d = 8,0$ ;  $p < 0,001$ ). Nestes a porcentagem de nova matriz osteoide em relação ao reparo, foi superior a 80%, sem diferenças estatísticas significantes entre si ( $d = 0,06$ ;  $p = 0,999$ ), resultado este similar ao encontrado por Padilla et al. (2015).

Embora o mecanismo molecular que regula a osteogênese ainda não tenha sido totalmente elucidado, este resultado reforça a hipótese da participação do zinco na sinalização da osteogênese, no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas, na sua diferenciação em osteoblastos e na estimulação da secreção de colágeno tipo I por estas células (ITO et al., 2002; SEO et al., 2010; SHEN et al., 2014; CHOU et al., 2015; LI et al., 2015).

Esta nova matriz, novamente em consequência de um ambiente favorável, com altas concentrações de íons cálcio e fósforo, apresentava sinais de mineralização evidenciada através das colorações de TMG, em todos os grupos aos 120 dias após as implantações, ocasionalmente aos 45 dias nos grupos GLL e GPP, e de forma esporádica, já aos 15 dias, nos grupos dopados com zinco, GAA e GOO.

Apesar de, no ponto biológico de 120 dias, não terem sido encontradas diferenças na porcentagem de matriz osteóide no reparo entre os grupos dopados com zinco ( $d = 0,06$ ;  $p = 0,999$ ), a espessura das calvarias no GOO manteve-se mais estável entre os três pontos biológicos comparativamente ao GAA. Este resultado provavelmente adveio da maior quantidade de hidroxiapatita na formulação OO e vai ao encontro de muitos autores que relatam a importância da presença da hidroxiapatita na modulação da reabsorção do arcabouço (POINERN et al., 2009; PADILLA et al., 2015).

A influência da hidroxiapatita no tecido em regeneração foi também importante na manutenção da osseointegração observada ao redor das partículas de todos os biomateriais (THORWARTH et al., 2005; SUCHANEK, YOSHIMURA, 2010) e ainda otimizada pela presença de silício proveniente do gel de sílica, liberado quando de sua dissolução, em todas as formulações LL, PP, AA e OO (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; JONES, 2013).

Apesar de muitos estudos indicarem um potencial osteoindutivo de compostos a base de monetita, de silício e de zinco, (GONZÁLEZ-VASQUES; PLANELL; ENGEL, 2013; HABIBOVIC et al., 2008; IDOWU et al., 2014), não nos foi possível concluir esta afirmação.

Para isso, o local de implantação deveria ser outro, que não oferecesse um ambiente osteogênico, mas, podemos inferir que, todos os biomateriais, apesar de serem totalmente inorgânicos, possuem facilidade de adsorção de proteínas específicas que permitiram o crescimento e o contato com a nova matriz osteóide de forma contínua nos pontos biológicos avaliados (SUH et al., 2001; ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001).

Assim, com a metodologia empregada neste trabalho, foi possível constatar que todas as formulações experimentais ora avaliadas formaram arcabouços porosos, biocompatíveis, biodegradáveis, com estabilidade suficiente para que

ocorresse a osteocondução observada, favoreceram a formação de tecido ósseo de forma integrada às suas partículas e com a proliferação de novos vasos, com resultados osteogênicos superiores nos grupos com conteúdo de zinco, em especial no grupo GOO.

Neste estudo, o tempo não foi considerado uma variável, em virtude de os animais terem sido mortos ao final dos pontos biológicos avaliados, entretanto, devido ao grande controle nos animais, podemos inferir que estes resultados refletiram uma continuidade do processo de reparo do tecido ósseo com o uso de biomateriais, observada com a evolução da regeneração óssea do primeiro até o último ponto biológico.

Sob esta ótica, todos os biomateriais sintéticos experimentais tiveram uma taxa de reabsorção variável, de acordo com a sua formulação, e adequada à neoformação óssea, e a melhor relação entre a reabsorção do biomaterial e neoformação óssea foi encontrada no GOO. Este resultado provavelmente ocorreu devido a uma melhor equalização das quantidades de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, além do zinco, que influenciou de forma marcante a estimulação da osteogênese neste modelo de defeito ósseo crítico.

Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível observarmos que as características individuais dos componentes das diferentes formulações, quando unidas na síntese de biomateriais, em quantidades e condições ideais, resultaram em uma nova geração de biomateriais sintéticos que certamente contribuirão para a regeneração de defeitos ósseos, mesmo em condições críticas.

O crescimento ósseo nos implantes foi dependente, além da biocompatibilidade e bioatividade dos compostos, de sua porosidade, das dimensões e interconexões de sua estrutura granular, além do fornecimento de células osteoprogenitoras e dos fatores de crescimento advindos da vascularização e da dura-máter.

Todavia, quando comparados ao GCI, nenhum dos substitutos ósseos avaliados foi capaz de proporcionar uma regeneração que devolvesse as condições do tecido íntegro. Portanto, consideramos precoce esta avaliação, tendo em vista a presença de biomateriais, em diferentes quantidades, no ponto biológico de 120 dias, provavelmente ainda com alguma bioatividade.

Estudos em pontos biológicos mais tardios, que permita a avaliação do mesmo animal em vários momentos pós implantação, com técnicas que possibilitem uma melhor compreensão da mobilização dos componentes das diferentes formulações e de sua influência nas reações tissulares envolvidas no processo regenerativo do tecido ósseo são de relevante importância e ficam como sugestões para trabalhos futuros.

*CONCLUSÕES*

## 6. CONCLUSÕES

- Todas as formulações dos biomateriais sintéticos experimentais formaram bons arcabouços, biocompatíveis e osteocondutores.
- Os resultados osteogênicos obtidos com as implantações dos biomateriais sintéticos experimentais nas formulações sem conteúdo de zinco, LL e PP, foram superiores aos obtidos com a implantação da hidroxiapatita bovina (Bio-Oss<sup>®</sup>) nos pontos biológicos de 15 e 45 dias e similares no ponto biológico de 120 dias, devido à disponibilização dos íons bioativos cálcio, fósforo e silício, promovida pela alta solubilização inicial da monetita e das fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica.
- A associação do zinco à monetita configurou uma maior biodisponibilidade deste íon, e potencializou a osteogênese nos arcabouços formados pelos biomateriais nas formulações AA (Sil-Oss<sup>®</sup>) e OO, com resultados superiores às formulações LL e PP, e à hidroxiapatita bovina (Bio-Oss<sup>®</sup>), em todos os pontos biológicos avaliados.
- As formulações AA (SilOss<sup>®</sup>) e OO produziram resultados similares na porcentagem de área do defeito preenchido por nova matriz osteóide, sem diferenças estatísticas significantes, nos três pontos biológicos avaliados.
- A formulação OO foi capaz de manter um arcabouço tridimensional mais estável devido à maior quantidade de hidroxiapatita em sua composição, que modulou a biodegradabilidade associada à monetita e às fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, e melhor associou osteogenicidade, biodegradabilidade e manutenção do arcabouço na regeneração de defeito ósseo crítico em calvária de rato, nos três pontos biológicos avaliados.



## REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 5–10, 2008.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **The Journal of Materials Science**, London, v. 22, n. 4, p. 997-1004, 2011.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J**, Heidelberg, v. 10, p. 96–101, 2001.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
- ANDIA D. C., CERRI P. S, SPOLIDORIO L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 35, n.2, p. 191-98, 2006.
- ANDRADE, A. D. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **Revista Implant News**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 121, n .7, p. 667-668, 2000.
- ARCOS, D.; VALLET-REGI, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 6, p. 2874-2888, 2006.
- ARTZI Z, et al. Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 2: Morphometric analysis. **J Periodontol**. Indianapolis, v. 74, n. 8, p.1153-60, 2003
- BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. **Hand Clin**, Philadelphia, v. 28, p. 457-468, 2012.
- BARONE, A. et al. A prospective, randomized, controlled, multicenter evaluation of extraction socket preservation comparing two bovine xenografts: clinical and histologic outcomes. **Int J Periodontics Restorative Dent.**, Chicago, v. 33, n. 6, p. 795-802, 2013.
- BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea**. 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.



BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcif Tissue Int.**, New York, v. 94, n. 1, p. 25–34, 2014.

BEST, S. M. et al. Bioceramics: Past, present and for the future. **J Eur Ceramic Society**, Barking, v.28, p.1319–1327, 2008.

BORETOS, J. W.; EDEN, M., Ed(s) Contemporary biomaterials: material and host response, clinical application. **New Technology and legal aspects**. Park Ridge, NJ: Noyes Med. Publ. 1984.

BOROJEVIC, R. Terapias Celulares e Bioengenharia. **Gazeta Médica da Bahia**. Salvador, v. 78, supl. 1, p. 42-46, 2008.

BOSCH, C.; MELSEN, B.; VARGERVIK, K. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. **Journal of Craniofacial Surgery**, Boston, v. 9, n. 4, p. 310-316, 1998.

BOSSHARDT, D. D. et al. Maxillary sinus grafting with a synthetic, nanocrystalline hydroxyapatite-silica gel in humans: histologic and histomorphometric results. **Int J Periodontics Restorative Dent**, Chicago, v. 34, n. 2, p. 259-67. 2014.

CALASANS-MAIA, M. et al., Short-term in vivo evaluation of zinc-containing calcium phosphate using a normalized procedure. **Materials Science and Engineering**, Amsterdam, v. 41, p. 309–319, 2014.

CAMPOS, L. S.; ROSA, F. P. Avaliação de hidroxiapatita bovina no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de rato. **R. Ci. med. biol.**, Salvador, v. 11, n. 2, p. 177-183, 2012.

CAMPOS, L. S. **Estudo do comportamento biológico de biomaterial xenogênico em defeito ósseo crítico**. Faro, 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina da Universidade do Algarve, Faro, Portugal, 2012.

CANCEDDA, R., GIANONNI, P., MASTROGIACOMO, M. Biomaterials: Review Tissue Engineering Approach to Bone Repair in Large Animal Models and in Clinical Practice. **Biomaterials**. Amsterdam, n. 28, p. 4240–4250, 2007.

CARANO, A. D.; FILVAROFF, E. H. Angiogenesis and bone repair. **Drug discovery today**, Oxford, v. 8, n. 21, p. 980-984, 2003.

CARVALHO, A. L. **Efeitos do tamanho dos grânulos na osteocondutividade de hidroxiapatitas bovina e sintética: estudo histológico e histomorfométrico em cães**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CATAURO, M.; PAPALE, F.; ROVIELLO, G.; FERONE, C.; BOLLINO, F.; TRIFUOGGI, M.; AURILIO, C. Synthesis of SiO<sub>2</sub> and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests. **J Biomed Mater Res Part A**, Hoboken, v. 101, p. 1-6, 2013.

CHACKARTCHI, T. et al. Sinus floor augmentation using large (1–2mm) or small (0.25–1mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 473-480, 2011.

CHOU J. et al. Effect of biomimetic zinc-containing tricalcium phosphate (Zn-TCP) on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J Tissue Eng RegenMed**, Chichester, v. 9, n. 7, p. 852-8. 2015.

CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **J. Appl. Oral Sci**, Bauru, v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.

CORDARO, L. et al. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicentre clinical trial. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 796-803, 2008.

DALAPÍCULA, S. S. et al., Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **Implantnews**, São Paulo, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.

DAHLIN, C; JOHANSSON A. Iliac crest autogenous bone graft versus alloplastic graft and guided bone regeneration in the reconstruction of atrophic maxillae: A 5-year retrospective study on cost-effectiveness and clinical outcome. **Clin ImplantDent Relat Res**, Malden, v. 13; n. 4, p. 305-310. 2011.

DE AZA, P. N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. Bioactive glasses and glass-ceramics. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.**, Madrid, v. 44, n. 3, p. 135-45, 2005.

DEGIDI, M. et al. Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss. **Oral dis.**, Houndmills, v. 12, n. 5, p. 469-475, 2006.

DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, Amsterdam, v. 347, n. 1, p. 1-10, 2005.

DOROZHUKIN S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Guildford, vol. 31, p. 1465-85, 2010.

FLECKENSTEIN, K. B. et al. Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **Journal of Periodontology**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.

GALINDO-MORENO, P. et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 376-382, jun. 2007.

GARCÍA DE CASTRO, A. et al. Osseous regeneration material from combinations of monetite with other bioactive calcium compounds, **WO2010/092001 A1** (Patent) Madrid, 2010.

GARRIGUES G.E. et al. Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 16, p. 2933-45, 2005.

GBURECK, U. et al. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. **Biomaterials**, Amsterdam, n. 25, p. 2187–2195, 2004.

GONZÁLEZ-VASQUES, A.; PLANELL, A.; ENGEL, E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. **Acta Biomater**, Kidlington, v. 10, n. 6, p. 2824-33, 2014.

GOTHARD, D. et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. **European Cells and Materials**, Davos, v. 282014, p. 166-208, 2014.

GUTIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, Porto, v. 19, n. 4, p. 153-162, 2006.

HABIBOVIC, P. et al. Osteoconduction and osteoinduction of low-temperature 3D printed bioceramic implants. **Biomaterials**, Guildford, v. 29, n. 7, p. 944–953, 2008.

HALL, S. L.; DIMAI, H. P.; FARLEY, J. R. Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity in vitro. **Calcif Tissue Int**; New York, v. 64, p.163-72, 1999.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philosophical Transactions of The Royal Society of London Series A**, London, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.

HOPPE, A.; GÜLDAL, N. S.; BOCCACCINI, A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, Guilford, v. 32, p. 2757-2774, 2011.

IAFISCO, M. et al. Silica Gel Template for Calcium Phosphates Crystallization. **Cryst Growth Des**, Washington, v. 9, p. 4912-4921, 2009.

IDOWU B. et al. In vitro osteoinductive potential of porous monetite for bone tissue engineering. **J Tissue Eng**, London, v. 5, p. 1-14, 2014.

JENSEN T. et al. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 24, n. 6, p.635-44, 2013.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids **Acta Biomater**, Oxford, v. 9, n.1, p. 4457-86, 2013.

JULIEN, M. et al. Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. **J Bone Miner Res**, New York, v. 24, n.11, p. 1856-1868, 2009.

KLAMMERT, U. et al. Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. **Acta Biomater**, Oxford, v. 5, p. 727–734, 2009.

KIM, S. S. et al. Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.

KLENKE, F. M. et al. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v. 85, n.3, p. 777-86, 2008.

KOKUBO, T., KIM, H., KAWASHITA, M., Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, n. 13, p. 2161-2175, 2003.

KRUSE, A. et al. Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide -based and a xenogeneic hydroxyapatite-based bone substitute material. **Clinical Oral Implants Research**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 506-11, 2011.

KURELLA, A.; DAHOTRE, N.B. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. **J Biomater Appl**, Lancaster, v. 20, p. 5-50, 2005.

LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 23, n. 8, p. 918-24, 2012.

LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin Orthop Related Res**, Philadelphia, v. 395, p. 81-98, 2002.

LI B., LIU H., JIA S. Zinc enhances bone metabolism in ovariectomized rats and exerts anabolic osteoblastic/adipocytic marrow effects ex vivo. **Biol Trace Elem Res Biol**, London, v. 163, n.1-2, p. 202-7. 2015.

- LI, H. Y. et al. Bio-Oss® for delayed osseointegration of implants in dogs: a histological study. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, v. 52, n. 8, p. 729-34, 2014.
- LIM S. C. C.; LEE M. J.; YEO H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol Inter**, Oxford, v. 50, n. 8, p. 594-602, 2000.
- LIND, M. et al. Stimulating Bone Healing. Critical Reviews, **TM. Phys Rehabil Med**, Chicago, v.12, p. 313-343, 2000.
- LINDHE J. et al. Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 786-90, 2014.
- LU, X.; LENG, Y. Theoretical analyses of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, p. 1097-108, 2005.
- LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 36, n.1, p. 85-91, 2008.
- LUTZ, R. et al. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study, **Clin Oral Implants Res**. Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 644-8, 2015.
- MAENO, S. et al. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, n. 23, p. 4847-455, 2005.
- MAH, J. et al. The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. **European journal of orthodontics**, London, v. 26, n. 5, p. 475-482, 2004.
- MARIE, P, J. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. **Bone**, New York, v. 46, n. 3, p. 571-576, 2010.
- MASTRANGELO, F. et al. A comparison of bovine bone and hydroxyapatite scaffolds during initial bone regeneration: an in vitro evaluation. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 613-22. 2013.
- MENDONÇA, T. A. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (Rattus norvegicus)**. [S.l.] s.n, 2005.
- MIGUEL, F. B. et al. Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 78, n. 2, p.334-339, 2006.

MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato.** 158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MOKBEL, N. et al. Healing patterns of critical size bony defects in rat following bone graft. **Oral Maxillofac Surg**, Amsterdam, v. 12, p. 73-78, 2008.

MOON J. W. et al. Comparison of two kinds of bovine bone in maxillary sinus augmentation: a histomorphometric study. **Implant Dent.**, Baltimore, v. 24, n. 1, p. 19-24, 2015.

MONTAZEROLGHAEM, M. et al. Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**, Amsterdam, v. 52, p. 212-218, 2015.

MORDENFELD, A. et al. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clin. Oral Impl Res**, Copenhagen, v. 9, p. 961-970, 2010.

MOTAMEDIAN, S. R. et al. Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature, **World J Stem Cells**, Pleasanton, v. 7, n. 3, p.657-68, 2015.

MURPHY S. et al. The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts. **Mater Sci Mater Med**, London, v. 20, n. 11, p. 2207-14, 2009.

OONISHI, H.; HENCH, L. L.; WILSON, J.; SUGIHARA, F.; KUSHITANI, S.; IWAKI, H. Comparative bone ingrowth behavior in granules of bioceramic material of various sizes. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v. 44, p. 31-43, 1999.

PADILLA, S. et al. Novel Nanostructured Zn-substituted Monetite Based Biomaterial for Bone Regeneration. **J Nanomed Nanotechnol**, Los Angeles, v. 6, n. 5, p. 1000325/1-100325/11, 2015.

PAKNEJAD, M. et al. Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: a histological and histomorphometric study of rabbit calvaria. **J Dent**, Tehran, v. 11, n. 6, p. 687-95. 2014.

PIATTELLI, M. et al. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic longterm report of 20 cases in humans. **Inter j oral maxillofac implants**, Lombard, v. 14, n. 6, p. 835-840, 1999.

POINERN, G. E. et al. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. **Ultrasonics Sonochem**, Amsterdam, vol. 16, p. 469-74, 2009.

PORTER, J.R., RUCKH, T.T., POPAT, K.C. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. **Biotechnol Progress**, New York, v. 25, n. 6, p.1539-1560, 2009.

RAMASWAMY, Y et al, Biological response of human bone cells to zinc-modified Ca–Si-based ceramics. **Acta Biomaterialia**, Oxford, n. 4, p. 1487-1497, 2008.

REFFIT, D. M. et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. **Bone**, New York, v. 32, n. 2, p. 127-35, 2003.

RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico**. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Materiais) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Nucleares, São Paulo, 2003.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8,p. 1027-1036, 2003.

ROLIM, A. E. H. **Avaliação de microesferas de hidroxiapatita, dopadas ou não com estrôncio, no reparo de defeito ósseo crítico, em calvária de rato**. 91f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

ROLIM, A. E. H. **Estudo in vivo de materiais biomiméticos, associados ou não à administração enteral de estrôncio, para o reparo de defeito ósseo**. 215 f. Tese (Doutorado em Processos interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

SEO, H. J. et al. Zinc may increase bone formation through stimulating cell proliferation, alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells; **Nutrition Research and Practice (Nutr Res Pract)**, Seoul, v. 4, n. 5, p. 356-361, 2010.

SCARANO, A. et al. Maxillary sinus augmentation with diferente biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man. **Implant Dentistry**, Baltimore, v. 15, n. 2, p. 197-207, 2006.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, New York, n. 205, p. 299-308, 1986.

SCHMITT, C. M. et al. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res**, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 576-85, 2012.

SHEN X., et al. Regulation of the biological functions of osteoblasts and bone formation by Zn-incorporated coating on microrough titanium. **ACS Appl Mater Interfaces**, Washington, v. 6, n. 18, p.16426-40, 2014.

SUCHANEK, W.; YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **J. Mater. Res**, New York, v. 13, p. 94-117, 1998.

STULAJTEROVA, R., Structural and phase characterization of bioceramics prepared from tetracalcium phosphate-monetite cement and in vitro osteoblast response. **J Mater Sci Mater Med**, London, v. 26, n. 5, p. 5511, 2015.

SUH, H. et al. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 25, n. 5, p. 459-466, 2001.

TAMIMI, F. et al. Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. **J Biomed Mater Res A**, Hoboken, v. 87, n. 4, p. 980-5, 2008.

TAMIMI, F. et al. Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. **Biomaterials**, Amsterdam, n. 30, p. 208-16, 2009.

TAMIMI, F. et al. Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. **Biomaterials**. Amsterdam, v. 31, n. 10, p. 2762-9, 2010.

TAMIMI, F. et al. The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: brushite vs. monetite. **Acta Biomater**, Oxford, v. 8, n. 8, p.3161-9, 2012.

TORRES, J. et al. Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria. **J Clin Periodontol**, Malden, v. 38, n.12, p. 1147-53, 2011.

TORRES, J. et al. Monetite granules versus particulate autologous bone in bone regeneration. **Ann Anat.**, Jena, v.200, p 126-133, 2015.

THORWARTH, M. et al. Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 63, p.1626-1633, 2005.

TORRONI, A. Engineered Bone Grafts and Bone Flaps for Maxillofacial Defects: State of the Art. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 67, p. 1121-7, 2009.

TRAINI, T. et al. A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. **J Periodontol**, Chicago, v. 78, n. 5, p. 955-61, 2007.



TURHANI, D. et al. Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 65, p. 485-93, 2007.

VALERIO, P. et al. Effects of extracellular calcium concentration on the glutamate release by bioactive glass (BG60S) preincubated osteoblasts. **Biomed Mater**, Hoboken, v. 4, n.4, p. 045011, 2009.

VOLKOV, V. et al. Regeneration of Skull Bones in Adult Rabbits after Implantation of Commercial Osteoinductive Materials and Transplantation of a Tissue-Engineering Construct. **Bull Exp Biol Med.**, New York, v. 149, n. 2, p. 505-10, 2010.

WALLACE, S. S.; FROUM, S. J. Effect of maxillary sinus augmentation on the survival of endosseous dental implants. A systematic review. **Ann Periodontol**, Chicago, v. 8, n. 1, p. 328-343, 2003.

YAMAGUSHI, M.; OISHI, H.; SUKETA, Y. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture, **Biochem Pharmacol**, Oxford, v. 36, p. 4007– 4012, 1987.

YAMAGUSHI, M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. **Journal of Trace Elements in Experimental Medicine**, New York, v. 11, p.119-35, 1998.

YANG, L. et al. The effects of inorganic additives to calcium phosphate on in vitro behavior of osteoblasts and osteoclasts. **Biomaterials**, Amsterdam, n. 31, p. 2931 – 2989, 2010.



**ANEXO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício: 07/2012

Feira de Santana, 21 de março de 2012

DE: Eraldo Medeiro Costa Neto  
Coordenador da CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa

Prezada Senhora,

Estamos encaminhando a V.Sa. o parecer final do projeto de pesquisa intitulado "**Estudo do comportamento biológico de novos biomateriais como arcabouços para a regeneração de defeitos ósseos críticos**", de sua autoria, que foi submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEFS), encaminhado a um parecerista e, por fim, aprovado em reunião. Diante do exposto, o parecer foi FAVORÁVEL para ser executado conforme metodologia proposta ao desenvolvimento da pesquisa.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading "Eraldo Medeiros Costa Neto". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal dashed line.

Prof. Eraldo Medeiros Costa Neto  
Coordenador em exercício da CEUA-UEFS

## PARECER

**Título:** “Estudo do comportamento biológico de novos biomateriais como arcabouços para a regeneração de defeitos ósseos críticos”

**Autores:** Coordenadora responsável Professora Dr<sup>a</sup> Fabiana Paim Rosa e colaboradores Dr. Aryon de Almeida Barbosa Junior, Dr. Raúl García Carrrodegua, doutorandas: Ana Emilia Holanda Rolim e Eliana dos Santos Câmara Pereira e Lilian Souza Campos.//

### 1- DO PROJETO

O projeto de pesquisa de autoria da professora Dr<sup>a</sup>. Fabiana Paim Rosa e colaboradores têm por objetivos: analisar o comportamento biológico de biomateriais substitutos ósseos, como arcabouços para a regeneração óssea em defeitos críticos e analisar histologicamente, o efeito químico e mineralógico de arcabouços experimentais SilOss no reparo ósseo.//

Os procedimentos serão realizados na sala de experimentação do biotério da UEFS, em ambiente com temperatura de 20 a 22<sup>o</sup> graus centígrados e luminosidade controlada, com ciclos de 12 h claro e 12 h escuro. O modelo biológico escolhido foi ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem *Wistar albinus*, sendo em numero de 225 animais machos, adultos, entre 3 a 4 meses de idade, com peso corpóreo variando entre: 350 a 400g. O experimento esta previsto que os animais serão analisados com 15, 45 e 120 dias, sendo divididos em 3 lotes, cada lote será composto por 75 animais, subdivididos em 15 grupos com 5 animais por grupo. Cada caixa acomodará 05 animais, com livre acesso a alimentação e água. As caixas em polipropileno auto-clavável, nas dimensões de (300x193x126 mm), com grade zincada com separador em aço inox (300x109mm), contendo: cama forrada com maravilha de *pinus* auto-clavada e trocada diariamente, cocho para ração sólida Labina e garrafa com bico de inox para o fornecimento de água filtrada.//

O projeto possui suporte financeiro subsidiado pela própria instituição no valor de R\$ 40.000,00 (quarenta mil reais) conforme consta na planilha de orçamento.//

## 2- DA FOLHA ROSTO

Todos os itens que constam na folha rosto se encontram preenchidos adequadamente, bem como as assinaturas dos termos de compromisso e declarações dos responsáveis pelo experimento.//

## 3- DO PROTOCOLO

Os procedimentos experimentais estão bem detalhados no protocolo. A autora apresenta uma literatura consistente, quanto aos procedimentos para obtenção dos resultados, o que justifica o número elevado de animais.//

No item 11.2 (G e J) relacionado com o analgésico e anestésico, fica claro que os animais serão submetidos às drogas anestésicas e analgésicas por via intramuscular. Sendo as drogas: anestésica Dopalen (princípio ativo Cloridrato de quetamina) e analgésico pós-cirúrgico Anasedan (princípio ativo cloridrato de xilazina).//

O item 15 referente à eutanásia, o método por aprofundamento da anestesia me parece o menos traumático para os animais em virtude de que o procedimento além de rápido, causa perda total de sensação dolorosa e morte imediata.//

## PARECER FINAL

Ao analisar o projeto verifiquei que a pesquisa esta em consonância com a norma ética no uso de animais na experimentação. O objetivo proposto pela autora busca responder cientificamente, se as substâncias citadas têm potencial para serem utilizados como **regenerador de defeitos ósseos**. O projeto também vai gerar conhecimento, formando jovens pesquisadores na graduação, mestrado e doutorado, além de ser relevante e exeqüível. Pelo exposto, salvo melhor juízo sou **FAVORÁVEL** à execução do projeto.//

Feira de Santana, 26 de dezembro de 2011

IRACI GOMES BONFIM



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Ofício: 03/2013

Feira de Santana, 30 de janeiro 2013.

DE: Iraci Gomes Bonfim  
CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa

Prezada Senhora,

Vimos através deste, informar que o projeto de pesquisa intitulado **“Estudo do Comportamento Biológico de Novos Biomateriais como Arcabouços para Regeneração de Defeitos Ósseos Críticos”**, de autoria da doutoranda Lilian Souza Campos, sob a sua orientação, foi aprovado nesta instituição em 26 de dezembro de 2011, sob nº de Protocolo 012/2011.

Atenciosamente,

A handwritten signature in black ink, reading "Iraci Gomes Bonfim", is written over a horizontal line.

Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora em exercício na CEUA-UEFS