

CRISTIANA CORRÊA KUCI

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA COMPARATIVA DE BIOMATERIAIS
MICRONANOESTRUTURADOS APLICADOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA
GUIADO EM CALVÁRIA DE COELHOS *Oryctolagus cuniculus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes

**LAGES, SC
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Kuci, Cristiana Corrêa
Neoformação óssea comparativa de biomateriais
micronanoestruturados aplicados através de um
sistema guiado em calvária de coelhos *Oryctolagus*
cuniculus / Cristiana Corrêa Kuci. - Lages , 2017.
82 p.

Orientador: Aury Nunes de Moraes
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Lages, 2017.

1. Crescimento ósseo guiado. 2. Fosfato
tricálcico-beta. 3. Hidroxiapatita. 4. Biomaterial.
I. Moraes, Aury Nunes de. II. Universidade do
Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação.
III. Título.

CRISTIANA CORRÊA KUCI

**NEOFORMAÇÃO ÓSSEA COMPARATIVA DE BIOMATERIAIS
MICRONANOESTRUTURADOS APLICADOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA
GUIADO EM CALVÁRIA DE COELHOS *Oryctolagus cuniculus***

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em ciência animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes
Departamento de Medicina Veterinária - CAV/ UDESC

Membro:

Prof. Dr. Ney Luis Pippi
Departamento de Medicina Veterinária – UFSM

Membro:

Prof. Dr. Ademar Luiz Dallabrida
Departamento de Medicina Veterinária - CAV/ UDESC

“À minha mãe, incentivadora dos meus estudos e da realização desse sonho!”

AGRADECIMENTOS

À Deus, por guiar meus passos e me dar força para ir em busca dos meus objetivos.

À minha mãe, Edi, por ser meu porto seguro, acreditar em mim e não medir esforços para me proporcionar o melhor.

À toda minha família, por serem meu alicerce, motivação, entenderem minha ausência em diversos momentos e estarem sempre ao meu lado, especialmente às minhas irmãs Ana Cristina Kuci e Patrícia Fernandes por dividirmos o mesmo lar, os mesmos anseios e por cuidarem da nossa mãe enquanto estive longe.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Aury Nunes de Moraes que oportunizou a realização do mestrado e pela dedicação ao experimento. Também por ser um exemplo de profissional, de ética, de ser humano, por ter um coração imenso e nos acolher tão bem, como filhos. Muito obrigada, o senhor sabe o quanto é especial para mim!

Aos meus amigos de Lages, Cristiane Vargas, Murilo Moretti, Patrícia Tres e Luara da Rosa, por serem minha família de coração, pelas risadas e pelos maravilhosos momentos de distração juntos.

À todos os professores e amigos da Pós-graduação, por toda ajuda e aprendizado que me proporcionaram nesse período, especialmente àqueles que me auxiliaram no projeto do mestrado, Laís Villa Demétrio, Altamir Corso, Bruna Colombo, Bruna Regalin e Carla Cancelier e também às bolsistas de iniciação Nicole Nigro, Dayani Fonseca e Daniela Cáceres, sem vocês nada disso seria possível. Além disso, é muito mais divertido fazer pesquisa ao lado de vocês!

Ao Prof. Dr. Fabiano Salbego, por todo auxílio no projeto e fora dele, durante este período.

À Ronise Tocheto, por ter me acolhido na disciplina de Patologia Clínica Cirúrgica para realização da docência e, ainda, por dividir seu conhecimento e me motivar a ir além.

Ao Prof. Dr. Nilson Oleskovicz, que permitiu a utilização do ambiente de pesquisa e equipamentos necessários ao projeto.

Ao Prof. Dr. Ademar Luiz Dallabrida, por todo auxílio e conhecimentos compartilhados durante o mestrado.

À equipe do HCV pela oportunidade de realização do projeto e pelo auxílio em outras atividades da rotina. Em especial à Marizete que se dispôs a me ajudar com o material de esterilização mesmo no período de férias e à dona Adriane, por ser sempre tão gentil e preocupada conosco.

Ao Prof. Dr. Nelson Camargo, que pacientemente me acolheu nesta jornada, sendo uma área totalmente nova para mim. Obrigada pelo tempo e conhecimento dedicados e por demonstrar tanto amor pelo que faz.

Ao Prof. Dr. Celso Pilati, por dispensar tanto tempo à mim junto às análises histológicas dos materiais, sempre com muito alto astral e bom humor.

Aos animais do meu experimento, todo meu respeito e gratidão, de coração.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UDESC, pela oportunidade da realização do mestrado nesta instituição da qual me orgulho muito por ter feito parte desde a graduação e à CAPES pelo auxílio financeiro nestes dois anos.

Muito Obrigada!!

“Seu tempo é limitado, então não o perca vivendo a vida de um outro alguém. Não fique aprisionado pelo dogma, que é viver com os resultados do pensamento de outras pessoas. Não deixe que o barulho da opinião dos outros cale sua voz interior. E o mais importante, tenha a coragem de seguir seu próprio coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar...”

Steve Jobs

RESUMO

KUCI, Cristiana Corrêa. **Neoformação óssea comparativa de biomateriais micronanoestruturados aplicados através de um sistema guiado em calvária de coelhos *Oryctolagus cuniculus*.** 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

Diversas pesquisas relacionadas a substitutos ósseos têm sido realizadas na busca de um material ideal, que tenha qualidades próximas ao osso autógeno quanto à sua aplicação para reparação de um defeito ósseo, seja ele decorrente de fratura, degeneração ou neoplasias. Com esta finalidade, foram realizados experimentos cirúrgicos guiados em calvárias de coelhos onde se teve por objetivo analisar e comparar diferentes biomateriais micronanoestruturados em relação à sua capacidade de osteoindução e osteocondução. Foram utilizados 14 coelhos da raça Nova Zelândia, machos, com oito meses de idade e com peso médio de $3,43 \pm 0,53\text{kg}$. Os animais foram comprovadamente hígidos através de exame clínico e análise hematológica. Os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano para realização do procedimento cirúrgico. A partir da exposição óssea da região da calvária, foram fixadas quatro guias cilíndricas de poliamida com parafuso de aço inoxidável. Cada guia foi preenchida por biomaterial pré-determinado, compostos por: Hidroxiapatita com Sílica a 5% (HA/SiO₂ 5%), Hidroxiapatita com Fosfato tricálcico- β (HA/TCP- β : 73,53/26,27%), Fosfato tricálcico (TCP- β) e Bio-ss® (controle). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: G60 (n=7) e G90 (n=7), que foram submetidos à eutanásia com 60 e 90 dias de pós-operatório, respectivamente, sendo cada calvária removida e acondicionada em formaldeído tamponado por 15 dias. Após, as calvárias foram seccionadas em quatro quadrantes, cada qual contendo o biomaterial, sendo mantidos em formaldeído tamponado 10% por mais 15 dias e então encaminhados para análises histológica e de microscopia eletrônica por varredura (MEV). A partir dos resultados obtidos pela metodologia deste estudo, pode ser concluído que todos os biomateriais aplicados, apresentam capacidade de osteoindução e osteocondução, mesmo que em graus variados. Observou-se que o Bio-Oss® apresentou menor neoformação de tecido ósseo. A composição bifásica HA/SiO₂ 5% não apresentou incorporação na interface entre o leito receptor e o enxerto ósseo na maior parte dos animais, induzindo à formação de tecido fibroso em sua maior parte. O TCP- β e o bifásico HA/TCP- β 73,53/26,27%, foram os biomateriais mais promissores deste estudo, induzindo a uma maior neoformação óssea. O TCP- β demonstrou ser o biomaterial com velocidade mais rápida de formação e maturação do tecido ósseo. O bifásico HA/TCP- β apresentou resultados bem próximos ao TCP- β isolado. No entanto, apresentou maior quantidade de células fagocitárias, o que num período maior de avaliação, poderia apresentar maior velocidade de absorção do biomaterial.

Palavras-chave: Crescimento ósseo guiado. Fosfato tricálcico- β . Hidroxiapatita. Biomaterial.

ABSTRACT

KUCI, Cristiana Corrêa. **Comparative bone formation of micronanostructured biomaterials applied through a calvary-guided system of rabbits *Oryctolagus cuniculus*.** 2017. 73f. Dissertation (Masters in Animal Science) - Santa Catarina State University. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2017.

Several research studies related to bone substitutes have been conducted in order to find the ideal material for this purpose, with similar qualities to the autogenous bone regarding its application of repairing bone defects, whether it results from fracture, degeneration or neoplasias. Accordingly, surgical experiments were carried out in rabbit calvaries, aiming to analyse and compare different micro-nanostructured biomaterials in relation to their capacity of osteoinduction and osteoconduction. Fourteen male New Zealand rabbits, eight months old and with a mean weight of $3.43 \pm 0.53\text{kg}$, were used. The animals were proven to be healthy through clinical examination and haematological analysis. The animals were submitted to inhalation anesthesia with isoflurane for the surgical procedure. From the bone exposure of the calvary region, four cylindrical polyamide guides were fixed with stainless steel screw. Each guide was filled with a pre-determined biomaterial composed of: hydroxyapatite with 5% silica (HA/SiO₂ 5%), hydroxyapatite with β -tricalcium phosphate (β -TCP/HA - 26.27%/73.53%), β -tricalcium phosphate (β -TCP) and Bio-Oss® (control). The animals were randomly assigned into two groups: G60 (n=7) and G90 (n=7), which were submitted to euthanasia at 60 and 90 days postoperatively, respectively, each calvary being removed and conditioned in buffered formaldehyde for 15 days. Afterwards, the calvaries were sectioned in four quadrants, each containing the biomaterial, being kept in buffered formaldehyde for another 15 days and then sent to histological analysis and scanning electron microscopy (SEM). From the results obtained by the methodology of this study, it can be concluded that all applied biomaterials show osteoinduction and osteoconduction capacity, despite different degrees. Through the analysis performed, it was observed that the Bio-Oss® presented smaller neoformation of bone tissue. The biphasic HA/SiO₂ 5% composition did not show incorporation on the interface between the recipient bed and the bone graft in most animals, inducing the formation of fibrous tissue for the most part. The β -TCP and the biphasic β -TCP/HA 73,53/26,27%, were the most promising biomaterials of this study, inducing a greater bone neoformation. β -TCP has been shown to be the biomaterial with the fastest rate of formation and maturation of bone tissue. The biphasic β -TCP/HA presented results very close to the β -TCP alone. However, it presented a greater amount of phagocytic cells, which in a longer period of evaluation could present a higher rate of absorption of the biomaterial.

Keywords: Guided bone growth. β -Tricalcium phosphate. Hydroxyapatite. Biomaterial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(A) Desenho representativo do dispositivo de poliamida que foi elaborado com as dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, formando um volume interior de sua cúpula de aproximadamente $0,314 \text{ cm}^3$. (B) Guia de crescimento de poliamida. Notar o orifício na região central (seta preta) para colocação do parafuso que fixa a guia à calvária.....	40
Figura 2 -	(A) Calha metálica desenvolvida por Dallabrida (2016). (B) Animal posicionado em decúbito esternal com a cabeça sobre a calha metálica, após paramentação anestésica.....	42
Figura 3 -	Fotografia demonstrando a distribuição pré-determinada para implante de cada guia contendo seu biomaterial específico para todos os animais.....	43
Figura 4 -	(A) Incisão de pele e periósteo sobre a crista sagital e afastamento dele com auxílio de elevador periosteal, (B) realização de um orifício com furadeira e broca de calibre 1,5 mm, (C) hidratação do biomaterial em uma cuba estéril, a partir da mistura com sangue arterial do próprio animal, (D) posicionamento das guias preenchidas com biomaterial e fixação das mesmas à calvária através de parafuso de aço inoxidável de 2mm de diâmetro e 8mm de comprimento.....	44
Figura 5 -	(A) Aspecto da calvária coletada. (B) Calvária após a remoção das guias de poliamida, com o tecido ósseo neoformado.....	46
Figura 6 -	(A) Observa-se o disco diamantado acoplado a um motor de alta rotação, utilizado para criar um ponto de fragilidade nas amostras. (B) Fixação da peça a ser analisada em um porta-amostra (seta preta). (C) Equipamento de metalização da amostra por pulverização catódica. (D) Microscópio eletrônico de varredura utilizado para análise das amostras.....	48
Figura 7 -	Imagem histológica do tratamento controle Bio-Oss®, indicando presença de pequena quantidade de neoformação óssea (seta preta), grande quantidade de tecido fibroso (TF) e de biomaterial remanescente (BR) aos 60 dias após a implantação (H&E, Obj. 10 X).....	50
Figura 8 -	Micrografia demonstrando grande parte da cúpula preenchida pelo biomaterial Bio-Oss®, após 60 dias de implantação. (A) Observa-se na região de interface entre o osso da calvária e o biomaterial, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (seta vermelha). Porém em outras porções da cúpula, há grande quantidade de tecido fibroso (seta verde) (Aumento 20x). (B) Observa-se em um maior aumento, o grânulo do biomaterial com prolongamentos de tecido fibroso para o seu interior (seta verde) (Aumento 50x).....	51
Figura 9 -	Imagem de microscopia óptica para o biomaterial Bio-Oss® após 90 dias de implantação. Ainda há pequena quantidade de neoformação de tecido ósseo (seta preta) e menor atividade de células de limpeza (CL), em comparação aos 60 dias. Observam-se os grânulos de biomaterial remanescente (BR) (H&E, Obj. 10X).....	52

- Figura 10 - (A) Imagem obtida através de MEV evidenciando a formação de tecido fibroso (TF) entre os grânulos do biomaterial Bio-Oss® (seta preta) e se prolongando para o interior dos mesmos (seta verde), aos 90 dias de pós-operatório (Aumento de 50X). (B) Grânulos de biomaterial remanescente (seta preta), envolvidos por grande quantidade de tecido fibroso (Aumento de 50X).....52
- Figura 11 - Imagem histológica demonstrando moderada neoformação de tecido ósseo tanto do tipo primário (OP), quanto secundário (OS) para o biomaterial TCP- β aos 60 dias após a implantação. Pode-se observar ainda grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) e formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 10X).....54
- Figura 12 - Imagem obtida através de MEV para o biomaterial TCP- β aos 60 dias de pós operatório. (A) Demonstra a presença de moderada neoformação óssea (seta vermelha) e grande quantidade de biomaterial remanescente (seta amarela) (Aumento de 50X). (B) Demonstra a atividade dos osteoblastos pela emissão de vários prolongamentos (seta azul) para posterior formação óssea (Aumento de 5000X).....54
- Figura 13 - Imagem obtida através de microscopia óptica, onde se evidencia a presença de osso primário (OP) e osso secundário maduro em maior quantidade (OS), na amostra de TCP- β aos 90 dias após implantação na calvária de coelhos. Grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (H&E. Obj 10X).....55
- Figura 14 - Micrografia obtida através de MEV para o biomaterial TCP- β aos 90 dias após implantação. (A) Acentuada presença de neoformação óssea (seta vermelha) (Aumento de 200X). (B) Presença de formação óssea intragrangular (Aumento 5000X).....56
- Figura 15 - Imagem obtida através de microscopia óptica para a amostra de HA/TCP- β aos 60 dias de evolução. Observa-se neoformação de tecido ósseo moderada (setas pretas), sendo essa formação próxima à calvária, demonstrando boa integração ao leito receptor. Ainda há grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (H&E, Obj. 10X).....57
- Figura 16 - (A) Imagem obtida através de MEV, demonstrando a formação de tecido ósseo sobre o grânulo do biomaterial HA/TCP- β (seta vermelha) aos 60 dias de pós-operatório (Aumento de 200X). (B) Prolongamento fibroso (seta verde) e osteoblasto (seta amarela) sobre o grânulo do biomaterial (Aumento de 500X).....58
- Figura 17 - Imagem histológica obtida para a amostra de HA/TCP- β com 90 dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea moderada (setas pretas), formação de tecido fibroso (TF), grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) e menor quantidade de células de limpeza (CL) (H&E, Obj. 10X).....59
- Figura 18 - (A) Imagem obtida através de MEV, demonstrando a presença de tecido fibroso intergranular (seta verde) e a formação de tecido ósseo sobre o grânulo do biomaterial HA/TCP- β (seta vermelha) com 90 dias pós-implantação em

um aumento de 200X. (B) Neoformação de tecido ósseo intragranular (seta vermelha) (Aumento de 2000X).....	59	
Figura 19 -	(A) Imagem histológica do tratamento com HA/SiO ₂ 5% após 60 dias de implantação, indicando a intensa formação de tecido fibroso (TF) e atividade osteoclástica presente (OC). Observa-se o osso da calvária distante da celularidade (setas pretas) não havendo integração ao leito receptor (H&E, Obj. 10X).....	61
Figura 20 -	A micrografia do compósito HA/SiO ₂ 5% obtida através de MEV, demonstra grande quantidade de material fibroso recobrindo toda sua superfície. Não é possível observar crescimento ósseo (Aumento 200X).....	61
Figura 21 -	Imagen histológica de amostra do grupo HA/SiO ₂ 5% com 90 dias de pós-operatório demonstrando um incremento de neoformação de tecido ósseo (seta preta) em comparação à análise aos 60 dias e ainda demonstra a intensa formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 10X).....	62
Figura 22 -	Micrografia do biomaterial formado por HA/SiO ₂ 5%, após 90 dias de implante, evidenciando presença de tecido fibroso (seta verde) (Aumento de 500X).....	63
Figura 23 -	Imagens histológicas comparando os tratamentos com 60 dias de pós-operatório. (A) Bio-Oss®: Leve neoformação óssea (setas pretas) demonstrando osteócitos no local e grande quantidade de biomaterial remanescente (BR). (B) TCP-β: Moderada neoformação óssea (setas pretas) com osteócitos no local e biomaterial remanescente (BR). (C) HA/TCP-β: Moderada neoformação óssea (setas pretas), acentuada presença de biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO ₂ 5%: Leve neoformação óssea (setas pretas) e grande formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 40X)....	65
Figura 24 -	Imagens obtidas através de MEV, comparativas dos tratamentos com 60 dias de implantação, (A) Bio-Oss®: Alta formação de tecido fibroso (TF) entre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (B) TCP-β: Neoformação óssea moderada (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR) e tecido fibroso (TF) intergranular. (C) HA/TCP-β: Neoformação óssea moderada (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO ₂ 5%: Formação de tecido fibroso (TF) sobre toda a superfície do biomaterial (Aumento de 100X).....	66
Figura 25 -	Imagens histológicas comparando os tratamentos com 90 dias de pós-operatório. (A) Bio-Oss®: Leve neoformação óssea (seta preta) e acentuada quantidade de biomaterial remanescente. (B) TCP-β: Acentuada neoformação óssea (setas pretas) e ainda havendo grande quantidade de biomaterial remanescente (BR). (C) HA/TCP-β: Moderada neoformação óssea (setas pretas), demonstrando também a presença de osteócitos e acentuada presença de biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO ₂ 5%: Moderada neoformação óssea (setas pretas) demonstrando incremento em relação a avaliação aos 60 dias, presença de osteócitos e ainda, grande quantidade de tecido fibroso (TF). (H&E, Obj. 40X).....	67

Figura 26 - Imagens obtidas através de MEV, comparativas dos tratamentos com 90 dias de implantação, (A) Bio-Oss®: Formação de tecido fibroso (TF) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (B) TCP- β : Neoformação óssea (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR) e intergranular. (C) HA/TCP- β : Moderada neoformação óssea (setas vermelhas). (D) HA/SiO₂ 5%: Observa-se formação de tecido fibroso (TF) sobre toda a amostra (Aumento de 500X).....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Biomateriais aplicados e suas composições correspondentes.....	39
Tabela 2 -	Modelo de avaliação histológica a partir da atribuição de cruzes para determinação dos seguintes parâmetros: neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), presença de osso primário (OP) e presença de osso secundário (OS).....	47
Tabela 3 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Bio-Oss®, com 60 dias de pós-operatório.....	50
Tabela 4 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Bio-Oss®, com 90 dias de pós-operatório.....	51
Tabela 5 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo TCP-β, com 60 dias de pós-operatório.....	53
Tabela 6 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo TCP-β, com 90 dias de pós-operatório.....	55
Tabela 7 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/TCP-β, com 60 dias de pós-operatório.....	57
Tabela 8 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/TCP-β, com 90 dias de pós-operatório.....	58
Tabela 9 -	Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/SiO ₂ 5%, com 60 dias de pós-	

operatório.....	60
Tabela 10 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/SiO₂ 5% com 90 dias de pós-operatório.....	62
Tabela 11 - Comparação entre resultados médios de cada grupo, aos 60 e 90 dias pós-operatório, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

μm	Micrômetro
BR	Biomaterial remanescente
CAM	Concentração Alveolar Mínima
CAV	Centro de Ciências Agroveterinárias
CCT	Centro de Ciências Tecnológicas
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CL	Presença de células de limpeza
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DFC	Deposição de fibras colágenas
HA	Hidroxiapatita
HA/SiO ₂	Hidroxiapatita com dióxido de silício
HA/TCP- β	Hidroxiapatita com fostato tricálcico beta
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
H&E	Hematoxilina e Eosina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MO	Microscopia óptica
NTO	Neoformação de tecido ósseo
OP	Presença de osso primário
OS	Presença de osso secundário
PO	Presença de osteoclastos
PSE	Elétrons retroespalhados
ROG	Regeneração óssea guiada
SE	Elétrons secundários
TCP	Fosfato tricálcico
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	27
1.1 TECIDO ÓSSEO.....	27
1.2 BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS.....	28
1.2.1 Hidroxiapatita (HA).....	30
1.2.2 Fosfato tricálcico- β e composições bifásicas.....	31
1.2.3 Biovidros.....	32
1.2.4 Bio-Oss®.....	33
1.3 CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO.....	34
1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	35
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 BIOMATERIAIS ESTUDADOS.....	39
3.2 MODELO ANIMAL, MANEJO E CUIDADOS.....	40
3.3 PRÉ-OPERATÓRIO E PROCEDIMENTO ANESTÉSICO.....	41
3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO.....	42
3.5 PÓS-OPERATÓRIO.....	44
3.6 COLHEITA DAS CALVÁRIAS PARA AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	45
3.6.1 Avaliação Histológica.....	46
3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	47
4 RESULTADOS.....	49

4.1	BIO-OSS® (Controle).....	49
4.1.1	60 dias pós-operatório.....	50
4.1.2	90 dias pós-operatório.....	51
4.2	FOSFATO TRICÁLCICO- β (TCP- β).....	53
4.2.1	60 dias pós-operatório.....	53
4.2.2	90 dias pós-operatório.....	55
4.3	HIDROXIAPATITA 73,53% + FOSFATO TRICÁLCICO- β 26,47% (HA/TCP- β).....	56
4.3.1	60 dias pós-operatório.....	56
4.3.2	90 dias pós-operatório.....	58
4.4	HIDROXIAPATITA/ SÍLICA (HA/SiO ₂ 5%).....	60
4.4.1	60 dias pós-operatório.....	60
4.4.2	90 dias pós-operatório.....	62
4.5	RESULTADOS COMPARATIVOS.....	64
5	DISCUSSÃO.....	69
5.1	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	73
6	CONCLUSÃO.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

INTRODUÇÃO

O avanço da Medicina Veterinária tem ocorrido juntamente com o aumento significativo dos animais de estimação dentro das famílias, também pela sua longevidade prolongada e bem como, a importância dos mesmos aos seus tutores. A ortopedia, uma das grandes áreas da veterinária, representa uma das maiores casuísticas dentro de uma rotina clínica. É constante a busca de métodos alternativos para uma regeneração óssea mais rápida e eficiente, que atenda as necessidades dos pacientes que, por diversos fatores, apresentam alterações ósseas degenerativas ou decorrentes de fraturas e neoplasias.

É notável ainda, o aprimoramento da Engenharia de Materiais, que para benefício da saúde, tanto humana, quanto animal desenvolve biomateriais que após longos estudos, poderão ser utilizados para fins biomédicos, como substitutos para enxertos ósseos em procedimentos ortopédicos e odontológicos.

A degeneração do sistema esquelético no tempo resulta em disfunção de ossos, dentes e articulações. Defeitos ósseos extensos após a remoção de tumores, infecções ou como resultado de lesões encontram-se idealmente substituídos por tecido ósseo autógeno. A quantidade deste material para o paciente pode ser limitada e a utilização de enxerto alógênico é acompanhado por dificuldades biológicas e mecânicas, existindo uma grande necessidade de busca de materiais alternativos (KOGA et al., 2003).

Em determinadas situações, quando há uma alteração ou perda importante na estrutura óssea, seja de origem traumática ou patológica, a capacidade de reparo ósseo é limitada. Nesses casos, se faz necessário o uso de enxertos para um correto tratamento e bom prognóstico (CARNEIRO et al., 2005).

Os diferentes tipos de materiais para enxerto ósseo disponíveis na atualidade são: autógenos (provenientes do próprio indivíduo), alógenos (provenientes de um outro indivíduo, porém da mesma espécie), xenógenos (provenientes de indivíduos de espécies diferentes) e aloplásticos (materiais sintéticos ou naturais) (SOUZA, 2010).

O autoenxerto é o padrão ouro na prática clínica devido às suas propriedades osteoindutivas e de osteogênese, no entanto, sua disponibilidade é limitada e pode causar danos secundários ao paciente (HUANG et al., 2010). Os aloenxertos superam estes problemas, mas podem introduzir potencialmente o risco de transmissão de infecções, ou provocar uma resposta imunogênica (BROWN et al., 2010). Alternativas biocompatíveis, menos invasivas do que autoenxertos, estão sendo desenvolvidas para o preenchimento de

defeitos ósseos, orientando a regeneração dos tecidos e como veículos para células osteogênicas e fatores de indução (DZIEDZIC; BERTOJA; ZIELAK, 2009).

O objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de quatro biomateriais distintos (HA/SiO₂ 5%, HA/TCP-β 73,53/25,47%, TCP-β e Bio-Oss®) quanto à neoformação óssea, a partir do implante de um sistema guiado em calvárias de coelhos, aos 60 e 90 dias de pós-operatório.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é o componente principal do esqueleto, sendo suporte para os tecidos moles e protegendo órgãos vitais. Ainda aloja e protege a medula óssea, formadora das células sanguíneas e proporciona apoio aos músculos esqueléticos. Além disso, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, para manter constante a concentração desses importantes íons nos líquidos corporais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; WHITEFIELD; ROSENBERG, 2007).

As células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos, células ativas na deposição óssea e precursoras dos osteócitos. Os osteócitos são células maduras derivadas dos osteoblastos, onde se encontra o osso mineralizado, dando sustentação a todo esqueleto. Os osteoclastos são células multinucleadas, com origem similar aos macrófagos, sendo ativas na absorção e na remodelação do osso. Através dos osteoblastos surgem as fibras colágenas e o fosfato de cálcio que mineraliza o osso, assim como os osteócitos mantêm a matriz óssea mineralizada (MACEDO et al., 2010).

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo: o imaturo ou primário e o maduro ou secundário. Os dois tipos possuem as mesmas células e os mesmos constituintes da matriz. No tecido primário as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida. No secundário, as fibras se organizam em lamelas. O osso primário tem menor quantidade de minerais e maiores proporções de osteócitos do que o lamelar. Este por sua vez possui fibras colágenas organizadas em lamelas, que ou ficam paralelas umas às outras, ou se dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando o sistema de Havers. Cada sistema é um cilindro e no centro deste cilindro ósseo existe um canal revestido de endósteo, o canal de Havers, que contém vasos e nervos. Esses canais comunicam-se entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso por meio de canais transversais ou oblíquos, que atravessam as lamelas, os canais de Volkmann (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Na parede externa do osso compacto existe uma membrana de tecido conjuntivo osteogênico, denominada de periôsteo. Este tecido possui uma alta percentagem de células osteoprogenitoras, as quais se multiplicam por mitose e se diferenciam em osteoblastos, desempenhando papel importante no crescimento dos ossos e na reparação de fraturas. A parede interna dos ossos compacto e esponjoso está revestida por uma camada única de

células ósseas, denominada de endósteo, que também contribui para o processo regenerativo e remodelativo do osso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O tecido ósseo está em constante regeneração ao longo da vida. O mesmo se reestrutura continuamente para se adaptar às forças biomecânicas que recebe e também passa pelo processo de remodelação óssea, a qual permite substituir o tecido velho ou com microdanos por um tecido novo e saudável (MOREJÓN-ALONSO et al., 2015). A regeneração óssea natural envolve a formação de osso novo, em vez de tecido fibrótico, que é comum no processo de regeneração de outros tecidos do corpo. O mecanismo de restauração óssea é altamente regulado e influenciado por fatores fisiológicos, celulares e genéticos (SANTOS et al., 2012). A remodelação óssea é um processo que ocorre em consequência da atividade das células osteoblásticas e osteoclásticas responsáveis pela deposição e absorção óssea, respectivamente (MOREJÓN-ALONSO et al., 2015).

A resposta normal de cicatrização do osso é um fenômeno dinâmico no qual as células e os seus metabólitos interagem para reparar o tecido danificado. Muitos tipos de células estão envolvidos neste processo fisiológico de reparação, incluindo os macrófagos, os leucócitos polimorfonucleares e outras células do sistema imunitário. Sendo um tecido vivo, responde às agressões com o mesmo tipo de resposta tecidual e celular que os outros tecidos orgânicos: inflamação, cicatrização ou reação à corpo estranho (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

O processo de reparo ósseo é constituído por quatro fases distintas, mas que se sobrepõem. Inicia-se por uma fase de resposta inflamatória imediata, neste momento há o recrutamento de células osteoprogenitoras indiferenciadas e então, diferenciação em condrocitos que produzem cartilagens e osteoblastos, que formam o osso. Segue-se pela produção de uma matriz cartilaginosa, posteriormente mineralizada, que ossificará. A formação do osso primário é seguida por remodelação, em que o calo ósseo inicial é modificado por formação e absorção óssea secundária para restaurar a estrutura anatômica que suporta cargas mecânicas (GERSTENFELD et al., 2003).

1.2 BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS

Materiais utilizados para a substituição e regeneração da estrutura óssea enquadram-se na classe de materiais denominados biomateriais. Estes materiais devem apresentar um conjunto de propriedades físicas, químicas e biológicas que permitam desempenhar a função desejada, além de estimular uma resposta adequada dos tecidos vivos (KAWACHI et al., 2000).

O substituto ósseo ideal utilizado em técnicas de reconstrução óssea deve apresentar diversas propriedades para que se obtenha a melhor resposta possível por parte do receptor (PRIPATNANONT; NUNTANARANONT; VONGVATCHARANON, 2009):

- Osteoindução: capacidade de atração, proliferação e diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em células ósseas;
- Osteocondução: capacidade de criar suporte estrutural para permitir condições favoráveis para o estabelecimento e desenvolvimento de vasos sanguíneos e de células com potencial osteogênico;
- Osteogênese: capacidade de neoformação óssea pelo enxerto;
- Não induzir reação imunológica.

Entende-se por biomaterial, toda substância ou combinação de substâncias, de origem natural ou sintética, que não sejam drogas ou fármacos, e que podem ser usadas durante qualquer período de tempo, como parte ou como todo de sistemas que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (WILLIANS, 1987).

Estes biomateriais podem ser sintetizados nas mais diversas formas de apresentação (blocos, grânulos, membranas, microesferas e outras) e possuir variadas composições. O formato do biomaterial é definido de acordo com o defeito ósseo. Reconstruções em altura, espessura ou ambas exigem materiais em bloco, partículas são apropriadas para preencher defeitos ósseos pré-existentes ou cirurgicamente criados (ALMEIDA et al., 2014).

Utilizados para reconstrução de defeitos ósseos, funcionam através da promoção de um arcabouço para a angiogênese e consequente neoformação óssea. Em geral, estes materiais exibem boa resistência à compressão e pobre resistência à tensão, similares ao osso humano (TEIXEIRA, 2009).

Dentre os materiais sintéticos usados para biorreparação do tecido ósseo, as cerâmicas, também conhecidas como biocerâmicas, são as mais empregadas. As biocerâmicas apresentam-se na forma de pó, revestimentos ou próteses usados para reparo, aumento ou substituição de tecidos doentes ou danificados, como ossos, articulações e dentes (ANDRADE; DOMINGUES, 2006).

As biocerâmicas nanoestruturadas à base de fosfato de cálcio (Ca/P) são uma nova classe de biomateriais que oferecem características diferenciadas em relação aos biomateriais convencionais, como bioatividade, área superficial de grãos e de microporos, também apresentam semelhança cristalográfica com a apatita óssea do esqueleto humano e biocompatibilidade (CAMARGO et al., 2014; GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

Em comparação com os fosfatos de cálcio microestruturados, as biocerâmicas com micro e nanoestruturas interconectadas, oferecem melhores condições de adesão e proliferação celular, devido às suas mais altas especificidades de superfície, porosidade em micro e nanoescala e topografia de superfície mais favorável. Estas vantagens estruturais demonstram melhor bioatividade, solubilidade e biodegradabilidade destes biomateriais quando aplicados *in vivo* e/ou em meio simulado (HONG et al., 2010).

Grãos nanométricos e a microestrutura microporosa interconectada podem oferecer melhores condições de molhabilidade, capilaridade, adesão celular na superfície de grãos e de microporos, bem como para o interior do biomaterial, assim favorecendo a osteoindução, a osteointegração e formação do novo tecido ósseo (CAMARGO et al., 2014). O tamanho da partícula do biomaterial impacta diretamente no tamanho da área da superfície disponível para reagir com células e fluidos biológicos. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de absorção do biomaterial (TEIXEIRA, 2009).

O controle da macro e microporosidade é um fator de suma importância para a eficiência do material enxertado no paciente. A colonização celular dos substitutos ósseos depende das características de porosidade do biomaterial, em particular ao tamanho e a distribuição dos poros e ao número e tamanho das interconexões entre os macroporos. Estas interconexões formam uma espécie de sistemas de túneis os quais permitem o acesso e o retorno dos fluidos biológicos e a entrada de células ósseas que subsequentemente irão facilitar a neoformação óssea no interior dos macroporos do biomaterial (TEIXEIRA, 2009).

Depois de implantar um material de biocerâmica, um novo osso gradualmente substitui o implante juntamente com a absorção do enxerto; consequentemente, os períodos de absorção do enxerto e regeneração óssea devem ser combinadas para atingir a eficiente regeneração óssea ideal (HUANG et al., 2010). A absorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (KAWACHI et al., 2000).

1.2.1 Hidroxiapatita (HA)

O fosfato de cálcio é amplamente usado como um substituto de enxerto ósseo, devido à biomimética de componentes inorgânicos semelhantes de ossos e dentes (HUANG et al., 2010). A HA representa de 30 a 70% da massa dos ossos e dentes e é o principal constituinte mineral destas estruturas. Por ser sintética e possuir propriedades de biocompatibilidade, a produção de HA vem sendo estudada por diversos grupos de pesquisadores (RIGO et al.,

2007). Portanto, biocerâmicas são definidas como materiais cerâmicos designados para atuar em um meio fisiológico específico, e utilizadas como material de construção de aparelhos, de proteção ou órgãos internos artificiais (RIGO et al., 2007).

A HA é uma biocerâmica de uso clínico, possuindo várias indicações de uso na área biomédica, porém, devido às suas propriedades mecânicas, principalmente baixa resistência mecânica e alta fragilidade, sua utilização é restrita para uso em locais onde não são exigidos grandes esforços mecânicos. Uma alternativa para melhorar essas propriedades é a associação da HA com outros materiais, visando unir as propriedades desejáveis dos materiais utilizados (BONAN et al., 2014).

Durante décadas, devido à sua similaridade com a fase mineral de ossos e dentes, a HA foi a única biocerâmica do sistema dos fosfatos de cálcio empregada como biomaterial para reposição e regeneração óssea. Trata-se de um material que apresenta ausência de toxicidade local e sistêmica, ausência de respostas inflamatórias e aparente habilidade em se ligar ao tecido hospedeiro. Contudo, apesar de suas propriedades biológicas promissoras, seu baixo índice de bioatividade e sua lenta taxa de degradação passaram a se apresentar como fatores limitantes para sua utilização. A partir do reconhecimento da limitação de seu uso clínico, devido à sua lenta biodegradação, outros fosfatos de cálcio passaram a despertar interesse na utilização como biomateriais, como o fosfato tricálcico e o fosfato de cálcio amorfo, por exemplo (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

1.2.2 Fosfato tricálcico- β e composições bifásicas

O fosfato tricálcico- β (TCP- β) foi um dos primeiros compostos de fosfato de cálcio a ser usado como substituto ósseo, sendo que possui propriedades osteointegrativas e osteocondutivas (MOORE; GRAVES; BAIN, 2001). A HA apresenta uma taxa de solubilidade menor que a do TCP- β . Esta taxa está relacionada com a absorção que o biomaterial sofrerá quando este estiver em contato com os fluidos corpóreos, influenciando na osteoindução, osteointegração e na reparação da estrutura óssea (KAMITAKAHARA; OHTSUKI; MIYASAKI, 2008).

Biocerâmicas bifásicas compostas de HA e TCP- β têm sido desenvolvidas, e observa-se que apresentam absorção mais rápida em relação aos fosfatos de cálcio puros, devido ao aumento da sua solubilidade (DACLUSI, 1998). A maior solubilidade destas fases de apatita faz com que suas propriedades físico-químicas e biológicas superem as da HA, guiando o

cenário atual para a classificação destes materiais como substitutos ósseos mais adequados em aplicações onde se requer rápida formação óssea (GUASTALDI; APARECIDA, 2010).

A utilização do TCP juntamente com a HA tem sido uma alternativa viável para aumentar a velocidade de absorção da HA. Nestes casos, a velocidade de dissolução da mistura HA/TCP é controlada pela quantidade de TCP utilizado. Devido ao seu comportamento biodegradável, o TCP nas formas alotrópicas alfa e beta tem se tornado objeto de interesse na área de biomateriais, sendo utilizado na ortopedia e odontologia como material de preenchimento de cavidades e defeitos ósseos e fixação de tecidos moles (GUASTALDI; APARECIDA, 2010). Dentre as fases polimórficas do TCP, a que desperta maior interesse é a fase β , pois apresenta estabilidade química e velocidade de absorção mais adequada para aplicações em implantes ósseos (RODRIGUES et al., 2012).

1.2.3 Biovidros

Dentre as biocerâmicas, os vidros são considerados os mais ativos e favoráveis à regeneração óssea. Quando implantados no osso, reagem com o fluido intersticial, desencadeando uma cascata de reações físico-químicas e eventos celulares que culminam com a formação de uma camada de hidroxiapatita biológica, deposição e mineralização de osteoide em sua superfície, o que favorece sua ligação ao osso e promove uma interface coesa e resistente (HENCH, 2009). A habilidade de um biovidro se ligar ao tecido ósseo, sofrer biodegradação e formar uma camada superficial de apatita, varia em função da sua composição e relação dos seus constituintes (ALMEIDA et al., 2014).

Quando implantadas em sítios ósseos, os biovidros aderem ao colágeno, aos fatores de crescimento e à fibrina, formando uma matriz porosa que permite a infiltração de células osteogênicas. A matriz pode promover algum suporte compressivo, mas não tem suporte estrutural (PINTO et al., 2007).

Pelas qualidades dos biovidros de biocompatibilidade, osteoindução, osteocondução, bioatividade e, em alguns casos estimular a angiogênese têm favorecido o desenvolvimento de várias formulações, inclusive daqueles altamente reativos que conseguem ligar-se a tecidos moles e outros onde a principal condição são as propriedades mecânicas ou biodegradação. Estes materiais foram utilizados diretamente em blocos, grânulos, como componentes de materiais compósitos ou formando suportes que sirvam como substrato para a aderência, proliferação e diferenciação celular (MOREJÓN-ALONSO et al., 2015).

A adição do biovidro à hidroxiapatita visa melhorar suas propriedades, aumentar a dissolução química e aumentar a bioatividade do biomaterial (ALMEIDA et al., 2014).

Biomateriais à base de Sílica são conhecidos pelos seus efeitos benéficos sobre a cicatrização óssea. Embora o mecanismo exato não seja completamente compreendido, além de fornecer íons cálcio e fosfato para a formação de HA, o principal mineral dos ossos, vidros bioativos aumentam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (WILSON, 2011). A versatilidade dos vidros bioativos se deve ao fato de que sua composição química apresenta adequada compatibilidade estrutural com o local de aplicação clínica desejada, sem que o implante gere efeitos prejudiciais aos tecidos circundantes, o que os torna altamente biocompatíveis (MOREJÓN-ALONSO et al., 2015).

A sílica é um polímero inorgânico formado por grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior e de grupos silanóis em sua superfície. A alta densidade dos grupos silanóis (Si-OH) existentes na superfície da sílica amorfada é considerada responsável pelo crescimento da HA e pela formação de osso em vitrocerâmicas (ANDRADE; DOMINGUES, 2006).

1.2.4 Bio-Oss®

Um substituto ósseo amplamente utilizado na área da implantodontia, dentro da odontologia, é o Bio-oss® (Geistlich Pharma, Wolhusen, Suíça). O produto é obtido a partir de osso bovino desproteinizado, liofilizado, com estrutura semelhante ao osso medular humano, tanto em sua morfologia estrutural quanto em sua composição mineral (GUTWALD et al., 2010). A produção do Bio-Oss® ocorre por meio de um processo de esterilização física em torno dos 300°C e de procedimentos químicos que resultam na completa eliminação das proteínas do osso bovino, ocasionando uma matriz óssea mineral, porosa, natural e não antigênica (ACCORSI-MENDONÇA et al., 2008; MELLONIG, 2000).

Após a remoção dos componentes orgânicos, o Bio-Oss® preserva a sua arquitetura trabecular e porosidade e atua como um material osteocondutor (PAKNEJAD et al., 2015). É biocompatível e devido às propriedades osteocondutoras, atua como arcabouço, permitindo a neoformação de capilares, de tecido perivascular e migração de células oriundas do leito receptor (SU-GWAN; HAK-KYUN; SUNG-CHUL, 2001).

O osso bovino desproteinizado é uma hidroxiapatita natural e é, de longe, o material à base de fosfato de cálcio xenogênico melhor documentado utilizado como um substituto ósseo. Estudos clínicos têm relatado que este material promove a cicatrização óssea e osteointegração de implantes durante a regeneração óssea guiada (ELGALI et al., 2016).

Encontra-se disponível em blocos e também em grânulos cortical ou esponjoso. Apresenta uma variação granulométrica de 250 a 1000 µm (microgrânulos) ou de 1000 a 2000µm (macrogrânulos). Em relação aos poros presentes, o Bio-Oss® pode apresentar as seguintes formas: macroporos – Poros com dimensão entre 300 µm e 1500 µm ou microporos – Típicos canais haversianos e pequenos canais vasculares medulares dentro da estrutura óssea e espaços intercristais – Pequenos poros com dimensão entre 3 nm e 26 nm . Estas apresentações resultam em um percentual de porosidade entre 70% e 75% (FERREIRA et al., 2007).

1.3 CRESCIMENTO ÓSSEO GUIADO

O crescimento ósseo guiado baseia-se na criação de um espaço segregado para a invasão de vasos sanguíneos e células osteoprogenitoras, protegendo a reparação óssea contra o crescimento de tecidos não osteogênicos que possuem velocidade de migração maior que as células osteogênicas. Trata-se de uma técnica na qual se utilizam meios físicos, como por exemplo, uma membrana, para impedir que outros tecidos, principalmente tecido conjuntivo, interfiram na osteogênese (DINATO; NUNES; SMIDT, 2007). O princípio básico deste método envolve a colocação de barreiras mecânicas para proteger os coágulos de sangue e para isolar o defeito ósseo do tecido conjuntivo circundante, fornecendo, assim, as células precursoras ósseas, acesso à um espaço isolado destinado à regeneração óssea (EL HADDAD et al., 2014).

O aumento ósseo guiado é definido como a criação de um novo osso através do direcionamento de células ósseas para uma área diferente da original internamente ou externamente ao envelope esquelético (WITHERS, 2010).

Os enxertos ósseos estão inúmeras vezes associados às técnicas de regeneração óssea guiada, especialmente quando se almeja um bom aumento de volume ósseo (AYUB et al., 2011).

Após os procedimentos de crescimento ósseo guiado, segue-se uma sequência específica de eventos. Dentro das primeiras 24 horas após um enxerto ósseo, o material de enxerto e o espaço criado pela barreira é preenchido com coágulo sanguíneo o qual libera fatores de crescimento (por exemplo, plaquetas derivadas do fator de crescimento) e citocinas como a interleucina-8, para atrair os neutrófilos e macrófagos. O coágulo é absorvido e substituído por tecido de granulação que é rico em vasos sanguíneos recentemente formados. Através destes vasos sanguíneos, nutrientes e células tronco mesenquimais capazes de

diferenciação osteogênica podem ser transportadas e contribuir para a formação de osteoide. A mineralização do osteoide forma o tecido ósseo, o qual mais tarde serve como um modelo para a aposição de osso lamelar (LIU; KERNS, 2014).

Para este estudo, foram produzidas guias de crescimento de poliamida com o intuito de isolar todos os fatores supracitados, que pudessem vir a interferir na formação óssea por parte dos biomateriais estudados, de modo que fosse permitida apenas a interação entre a interface biomaterial-leito receptor (calvária). Este mesmo molde já foi utilizado com sucesso no estudo de Colombo (2016). Levandowski-Jr (2014) utilizou um modelo similar, porém elaborado com outro material, o Politetrafluoretileno, conhecido como Teflon.

1.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Os microscópios ópticos convencionais limitam-se a um aumento máximo de 2.000 vezes, porque acima deste valor, detalhes menores são imperceptíveis. No entanto, os aparelhos mais modernos permitem aumentos de 300.000 vezes ou mais, para a maior parte de materiais sólidos, conservando a profundidade de campo compatível com a observação de superfícies rugosas (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

A MEV é uma das mais versáteis análises disponíveis para a observação de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade é a alta resolução que pode ser obtida quando as amostras são observadas. Outra característica importante da MEV é a aparência tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

As imagens fornecidas pela MEV possuem caráter virtual, sendo visualizadas em um monitor através da transcodificação da energia emitida pelos elétrons. A MEV é um recurso especialmente útil na caracterização de amostras biológicas não resistentes a grandes diferenças de pressão e qualquer outro tipo de amostra onde a metalização pode gerar artefatos. Um dos objetivos da MEV é a análise de superfícies irregulares, como é o do osso, possibilitando uma análise qualitativa uma vez que a análise quantitativa acurada de sua superfície é quase impossível pela dificuldade de padronizar amostras biológicas (DIAMANTINO; NICOLAU, 2009).

A análise através da MEV permite observar a topografia superficial dos biomateriais, especialmente em relação ao aspecto microscópico, tamanho dos grânulos e porosidade (AMARAL, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar de forma comparativa a neoformação óssea dos biomateriais de Hidroxiapatita com Sílica a 5% (HA/SiO₂ 5%), Hidroxiapatita com Fosfato tricálcico (HA/TCP-β) na proporção 73,53% de HA e 26,47% de TCP-β, Fosfato tricálcico-β (TCP-β) e Osso bovino inorgânico (Bio-Oss®), com interesse em aplicações como substitutos ósseos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implantar guias de crescimento de poliamida em calvárias de coelhos.
- Comparar em diferentes períodos de observação (60 e 90 dias) a capacidade de neoformação óssea, osteointegração e osteocondução dos biomateriais estudados através de análise histológica por microscopia óptica (MO).
- Avaliar em diferentes períodos de evolução (60 e 90 dias) o comportamento dos diferentes biomateriais aplicados através de guias de crescimento em calvária de coelhos, utilizando microscopia eletrônica por varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi encaminhado ao Comitê de Ética e Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) e obteve aprovação sob o protocolo de número 1.20.15.

3.1 BIOMATERIAIS ESTUDADOS

Dentre os quatro diferentes biomateriais aplicados neste estudo, três deles foram produzidos pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais do Centro de Ciências Tecnológicas (CCT) da UDESC/Joinville. Estes biomateriais são formados pelas seguintes composições: HA/SiO₂ 5% sinterizado a 1300°C/2h, TCP-β e HA/TCP-β 73,53/26,47% sinterizados à temperatura de 1100°C/2h.

A caracterização morfológica e microestrutural destes biomateriais foi realizada em colaboração com o Grupo do CCT/UDESC. A composição HA/SiO₂ 5% se apresenta com uma morfologia formada por nanopartículas com tamanhos inferiores à 100 nm. Os biomateriais compostos por TCP-β e HA/TCP-β evidenciaram uma microestrutura microporosa formada por finos grãos na forma equiaxiais, com tamanhos inferiores a 1µm, observando para a composição HA/TCP-β, a presença de um número ainda maior de finos grãos em sua microestrutura.

O quarto biomaterial, o Bio-Oss® (Geistlich Biomaterials – Suíça) é um produto já amplamente utilizado comercialmente e foi utilizado como controle neste estudo. A apresentação comercial aplicada apresentou grânulos nos tamanhos de 1000 a 2000 µm/0,5g. A Tabela 1 apresenta os biomateriais utilizados e suas respectivas composições.

Tabela 1 – Biomateriais aplicados e suas composições correspondentes.

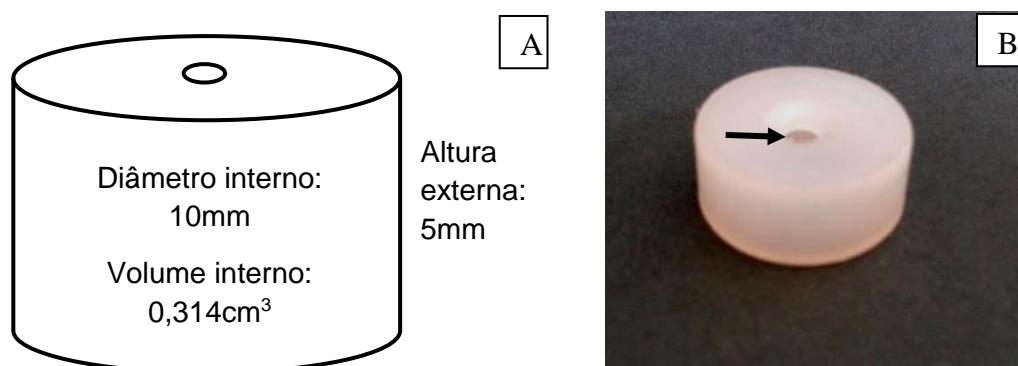
Biomaterial	Composição	Forma	Fabricante
Hidroxiapatita + sílica*	HA/SiO ₂ 5%	Pó	CCT/ UDESC
Fosfato tricálcico-β*	100% TCP-β	Grânulo	CCT/ UDESC
Bifásico (HA/ TCP-β)*	73,53% HA, 26,47% TCP-β	Grânulo	CCT/ UDESC
Bio-Oss®**	Osso bovino inorgânico	Grânulo	Geistlich Pharma

Fonte: * Produção do Grupo de Pesquisa em Biomateriais, UDESC.

** Produto comercializado pela Geistlich Pharma do Brasil.

Para aplicação dos biomateriais nas calvárias, foram utilizados dispositivos de crescimento ósseo guiado, fabricados em poliamida, que é um polímero termoplástico dúctil, com boa usinabilidade e propriedades mecânicas. O dispositivo utilizado foi elaborado com as dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, formando um volume interior de sua cúpula de aproximadamente $0,314 \text{ cm}^3$ (Figura 1).

Figura 1 - (A) Desenho representativo do dispositivo de poliamida que foi elaborado com as dimensões de 5 mm de altura e 10 mm de diâmetro interno, formando um volume interior de sua cúpula de aproximadamente $0,314 \text{ cm}^3$. (B) Guia de crescimento de poliamida. Notar o orifício na região central (seta preta) para colocação do parafuso que fixa a guia à calvária.



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

3.2 MODELO ANIMAL, MANEJO E CUIDADOS

Foram utilizados 14 coelhos hígidos, da raça Nova Zelândia, machos, com idade média de oito meses e com peso médio de $3,43 \pm 0,53 \text{ kg}$, provenientes de criatório do Centro de Educação Profissional Caetano Costa, em São José do Cerrito/SC.

Os animais foram levados ao Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV)/UDESC quinze dias antes do procedimento, para ambientação e adaptação ao manejo. Foram alocados em gaiolas individuais, próprias para a espécie, dentro de uma mesma sala. As gaiolas foram suspensas, a 60 cm do chão, que foi coberto de maravalha. Receberam alimentação à base de ração peletizada para coelhos, duas vezes ao dia, além do fornecimento de vegetais e água *ad libitum*.

Todos os animais passaram por exame físico completo e receberam medicação antiparasitária (única aplicação de Ivermectina 1%, na dose de 0,4 mg/kg, por via subcutânea). Todos os animais foram avaliados quanto aos aspectos clínicos e laboratoriais e através da avaliação de hemograma completo e perfil bioquímico. Para isto, foram colhidos 4mL de sangue da veia auricular marginal de cada animal.

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos de sete. Foram testados os mesmos biomateriais em ambos os grupos, tendo diferença apenas em relação ao período para eutanásia, sendo G60, eutanásia aos 60 dias e G90, eutanásia aos 90 dias de pós-operatório.

3.3 PRÉ-OPERATÓRIO E PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

No dia anterior ao procedimento cirúrgico, foi realizada a tricotomia da porção dorsal do crânio, estendendo-se da base das orelhas até o processo supraorbital rostral e tendo como limites laterais as pálpebras superiores. Foi realizada também a tricotomia das orelhas, para acesso de vasos sanguíneos.

Nas 4 horas antecedentes ao procedimento cirúrgico, os animais permaneceram em jejum sólido, não sendo realizado o jejum hídrico. Após a aplicação da medicação pré-anestésica, os animais foram mantidos em ambiente silencioso e escuro. A medicação pré-anestésica foi baseada na associação de Cloridrato de Dextrocetamina¹ (20 mg kg^{-1}), Midazolam² (2 mg kg^{-1}) e Morfina³ ($0,5\text{mg kg}^{-1}$) por via intramuscular. Após 15 minutos, foi realizado o acesso venoso (veia auricular) com cateter 24G para aporte de fluidoterapia e administração de fármacos. A artéria auricular foi utilizada para coleta de sangue arterial para hidratação do biomaterial e análises hemogasométricas.

A indução anestésica foi realizada com Isoflurano⁴ a 1 CAM diluído em oxigênio à 100%, administrado via máscara facial por vaporizador calibrado. Após, foram submetidos à anestesia geral inalatória com Isoflurano a 1,5 CAM diluído em oxigênio à 100% administrado via máscara laríngea⁵ de tamanho R4, com fluxo variando entre 200 a 300 ml Kg min⁻¹. Devido ao fato de a intubação orotraqueal ser bastante difícil na espécie, optou-se pela utilização das máscaras laríngeas. Esses dispositivos permitem o suporte ventilatório dos animais a partir do seu posicionamento supraglótico, sendo considerado de fácil execução.

Na linha de incisão, no tecido subcutâneo, foi infiltrado Cloridrato de Lidocaína⁶ sem vasoconstritor, na dose de 7 mg Kg^{-1} .

¹ Ketamin®, 50 mg ml⁻¹, Cristália - Itapira/SP

² Dormire®, 5 mg ml⁻¹, Cristália - Itapira/SP

³ Dimorf®, 50 mg ml⁻¹, Cristália - Itapira/SP

⁴ Isoforine®, Cristália – Itapira/SP

⁵ V-gel®, Docsinnovo Ltda - London/ UK

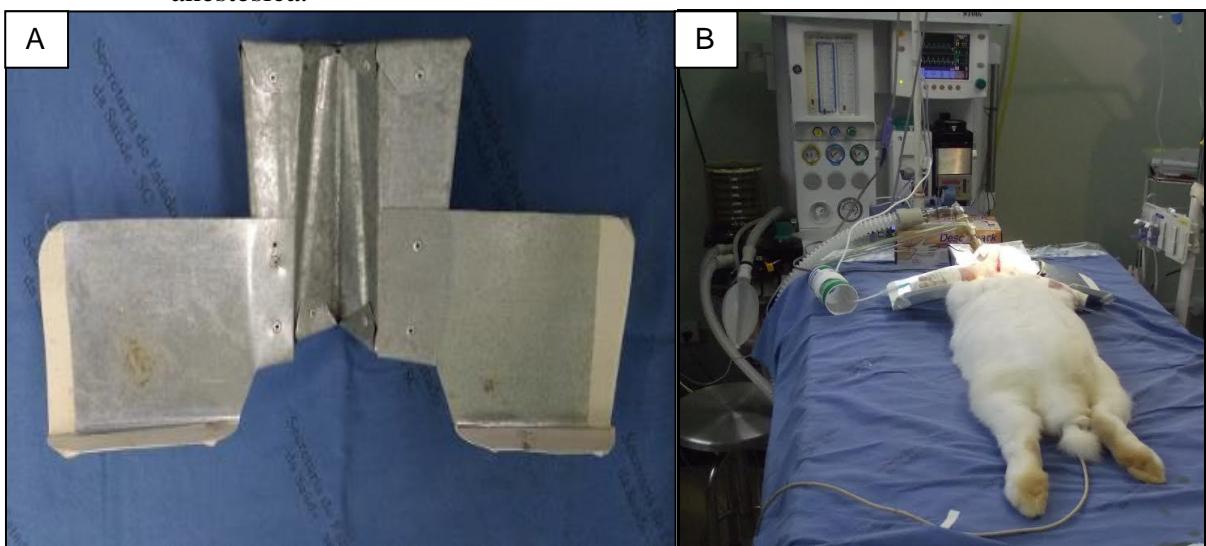
⁶ Xylestesin®, 20 mg ml⁻¹, Cristália - Itapira/SP

Todos os animais receberam antibioticoprofilaxia à base de Enrofloxacino⁷ (10 mg kg⁻¹) por via intravenosa, em torno de 30 minutos antes do início do procedimento cirúrgico. Resgates analgésicos no período transoperatório foram realizados com o uso de Citrato de Fentanila⁸ (5 mcg kg⁻¹) via intravenosa, conforme necessidade.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após a paramentação anestésica e estabilização do animal, o mesmo foi posicionado em decúbito esternal com a cabeça sobre uma calha metálica desenvolvida por Dallabrida (2016) (Figura 2A e B). A calha foi essencial para este tipo de procedimento e adequado plano anestésico, pois fornecia suporte ideal à cabeça do animal durante a manipulação cirúrgica, de forma que a máscara laríngea permanecesse na posição correta.

Figura 2 - (A) Calha metálica desenvolvida por Dallabrida (2016). (B) Animal posicionado em decúbito esternal com a cabeça sobre a calha metálica, após paramentação anestésica.



Fonte: Produção do próprio autor.

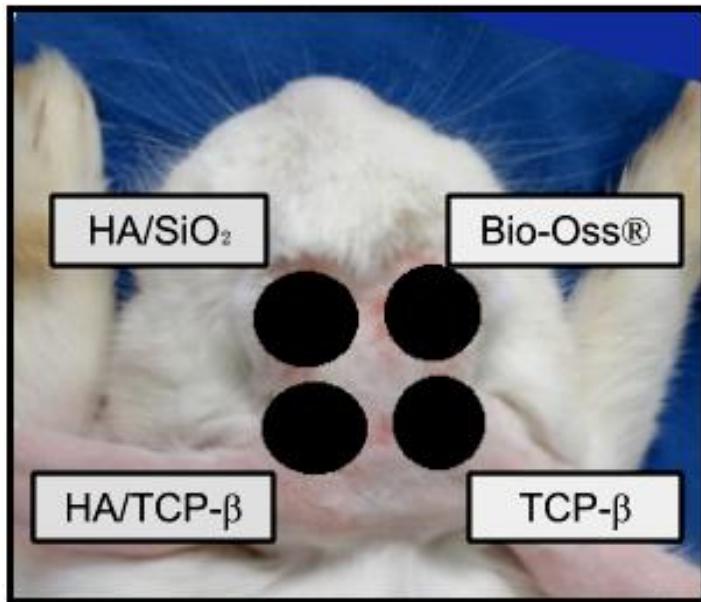
A antisepsia da região do acesso foi executada de modo rotineiro com álcool-iodopolividona-álcool. Os panos de campo foram posicionados de forma a expor a região do crânio, presos com pinças de campo de Backhaus.

A distribuição dos dispositivos de poliamida para colocação dos biomateriais sobre a calvária foi a mesma para todos os animais, sendo essa distribuição determinada previamente, conforme demonstrado na Figura 3.

⁷ Chemitril® 2,5% - Chemitec - São Paulo/SP

⁸ Fentanest®, 0,05 mg ml⁻¹ - Cristália - Itapira/SP

Figura 3 - Fotografia demonstrando a distribuição pré-determinada para implante de cada guia contendo seu biomaterial específico para todos os animais.



Fonte: Produção do próprio autor.

O procedimento cirúrgico foi realizado sempre pelo mesmo cirurgião em todos os animais.

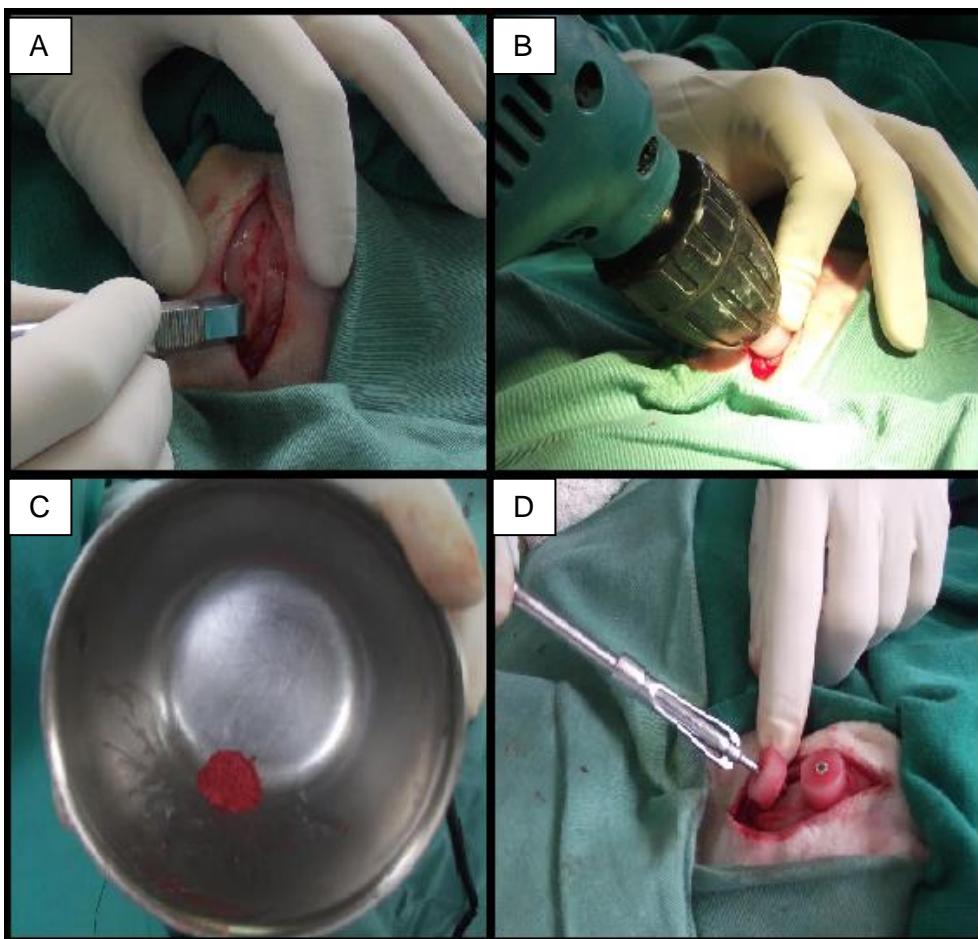
O acesso cirúrgico foi realizado através de uma incisão de pele aproximadamente 5 cm de comprimento sobre a crista sagital, com bisturi. A incisão se deu em sentido rostrocaudal, iniciando próximo à região interorbital estendendo-se até próximo à base das orelhas. O periôsteo também foi incisado e com auxílio de afastadores periosteais, lateralizados, a fim de permitir a exposição da calvária (Figura 4A).

A região exposta foi dividida visualmente em quatro quadrantes, e em cada um deles, foi realizado um orifício com furadeira e broca de calibre 1,5 mm (Figura 4B). Enquanto isso se colocou o biomaterial em uma cuba estéril, onde foi hidratado a partir da mistura com sangue arterial do próprio animal (Figura 4C) e, após o preparo, foram preenchidas as guias de poliamida. Durante o trans-operatório, os animais foram mantidos com acesso na artéria auricular central para a coleta de sangue para hemogasometria.

As guias foram posicionadas e fixadas ao tecido ósseo através de parafuso de aço inoxidável de 2 mm de diâmetro e 8 mm de comprimento (Figura 4D).

Após a fixação das quatro guias com seus respectivos materiais, realizou-se a dermorrafia com fio de náilon monofilamentar 3-0, em padrão Wolff. O periôsteo não foi reduzido, por ser um tecido sem elasticidade, foi impossível cobrir as guias de crescimento, que ficaram 5 mm acima da superfície óssea da calvária.

Figura 4 - (A) Incisão de pele e periósteo sobre a crista sagital e afastamento dele com auxílio de elevador periosteal, (B) realização de um orifício com furadeira e broca de calibre 1,5 mm, (C) hidratação do biomaterial em uma cuba estéril, a partir da mistura com sangue arterial do próprio animal, (D) posicionamento das guias preenchidas com biomaterial e fixação das mesmas à calvária através de parafuso de aço inoxidável de 2mm de diâmetro e 8mm de comprimento.



Fonte: Produção do próprio autor.

3.5 PÓS-OPERATÓRIO

Os animais receberam no pós-operatório imediato e nos três dias subsequentes à cirurgia, Cloridrato de Tramadol⁹ (7 mg kg⁻¹) por via subcutânea, TID, Meloxicam¹⁰ (0,2 mg kg⁻¹) SID e Dipirona Sódica¹¹, (25 mg Kg⁻¹) TID, ambos aplicados por via subcutânea. Além disso, receberam antibioticoterapia por cinco dias à base de Enrofloxacino¹² (10 mg kg⁻¹) BID, via intramuscular.

⁹ Tramadon®, 50mg ml⁻¹ - Cristália – Itapira/SP

¹⁰ Maxicam®, 0,2% - Ouro Fino - Cravinhos/SP

¹¹ Febrax®, 500 mg ml⁻¹ - Lema Biologic - Lagoa Santa/MG

¹² Chemitril®, 2,5% - Chemitec- SP

A ferida cirúrgica foi avaliada diariamente até os 10 dias de pós-operatório, quando os pontos de pele foram removidos. Foi realizada a limpeza da ferida com solução de cloreto de sódio 0,9%, duas vezes por dia neste período. Foi observado ainda, se houve formação de edema local, eritema, supuração da ferida ou deiscência de pontos.

Durante todo o período de estudo, foi realizado o acompanhamento dos animais, de modo que quaisquer alterações comportamentais e fisiológicas que pudessem vir a comprometer a evolução do experimento fossem registradas e os animais, descartados do estudo.

3.6 COLHEITA DAS CALVÁRIAS PARA AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Aos 60 e 90 dias de pós-operatório, os animais foram submetidos à eutanásia, para coleta das amostras, conforme resolução número 13 de 20 de setembro de 2013 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os animais receberam o protocolo de medicação pré-anestésica baseado na associação de Cloridrato de Dextrocetamina¹³ (20 mg kg⁻¹) e Midazolam¹⁴ (2 mg kg⁻¹) seguida por indução anestésica com Propofol¹⁵ (5mg kg⁻¹). Após o plano anestésico adequado, foi administrado por via intravenosa, 10 ml de solução de Cloreto de Potássio 19,1%¹⁶. A parada cardiorrespiratória foi confirmada através de eletrocardiograma.

Para obtenção da calvária com os implantes, foi realizado acesso como para o procedimento cirúrgico. Após incisão da pele e remoção da musculatura sobre a cabeça do animal, foi seccionada, com auxílio de um micromotor elétrico, a porção do tecido ósseo craniano contendo os implantes.

As calvárias coletadas (Figura 5A) foram acondicionadas em frascos individuais com formaldeído tamponado a 10% por 15 dias. Após esse período, as guias de poliamida foram removidas e a calvária com o tecido ósseo neoformado (Figura 5B) foi seccionada em quatro quadrantes com um disco diamantado acoplado a um motor elétrico. Cada quadrante foi acondicionado em frasco identificado, com formaldeído tamponado a 10% por mais 15 dias. Em seguida, foram encaminhados para as análises histológica e de microscopia eletrônica de varredura.

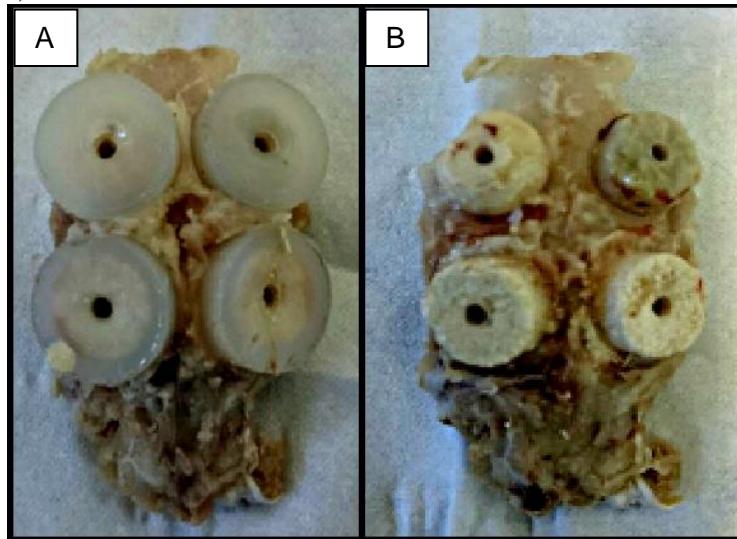
¹³ Ketamin®, 50 mg ml⁻¹, Cristália- Itapira/SP

¹⁴ Dormire®, 5mg ml⁻¹, Cristália- Itapira/SP

¹⁵ Propovan®, 10 mg ml⁻¹, Cristália - Itapira/SP

¹⁶ Samtec Biotecnologia- Ribeirão Preto/SP

Figura 5 - (A) Aspecto da calvária coletada. (B) Calvária após a remoção das guias de poliamida, com o tecido ósseo neoformado.



Fonte: Produção do próprio autor.

3.6.1 Avaliação Histológica

As amostras foram processadas e analisadas pelo Laboratório de Histologia Animal do CAV/UDESC – Lages, sob responsabilidade do Prof. Dr. Celso Pilati. Primeiramente foram descalcificadas com ácido nítrico a 10% por um período de 7 dias. Sendo em seguida, processadas em histotécnico. As amostras passaram pelo álcool para que fossem desidratadas, posteriormente, foram diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados em espessura de 4 a 5 µm com auxílio de um micrótomo e então, corados com Hematoxilina e Eosina de Harris e para serem avaliados através da microscopia óptica (MO).

Para avaliação das lâminas, o histologista desconhecia os tratamentos aplicados e os períodos de evolução, atribuindo cruzes para quantificação de alguns critérios. Os critérios sob análise foram neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), presença de osso primário (OP) e presença de osso secundário (OS). As análises variaram de nenhuma cruz, quando da ausência daquele critério avaliado; uma cruz, presença leve; duas cruzes para presença moderada; três cruzes, presença acentuada ou quatro cruzes quando houvesse presença muito acentuada do mesmo, conforme se observa o modelo na Tabela 2. Esse critério de avaliação foi adaptado de Valiati (2011).

Tabela 2 - Modelo de avaliação histológica a partir da atribuição de cruzes para determinação dos seguintes parâmetros: neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), presença de células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), presença de osso primário (OP) e presença de osso secundário (OS).

	NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
Ausência	0	0	0	0	0	0	0
Leve	+	+	+	+	+	+	+
Moderado	++	++	++	++	++	++	++
Acentuado	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Muito acentuado	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Fonte: Adaptado de Valiati (2011).

3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os estudos de caracterização microestrutural e morfológica foram realizados sobre os materiais coletados aos 60 e 90 dias de pós-operatório, a partir da técnica de MEV, que foi realizada pelo Grupo de Pesquisa em Biomateriais do CCT/UDESC – Joinville, sob responsabilidade do Prof. Dr. Nelson Heriberto Almeida Camargo. Para isso, foi utilizado o equipamento da marca ZEISS®, modelo DSM 940A, através do método por elétrons secundários (SE) e retroespalhados (BSE), com distância de trabalho entre 10 e 15 mm, tensão de aceleração dos elétrons de 15 kV e corrente de operação de 30 a 40 mA.

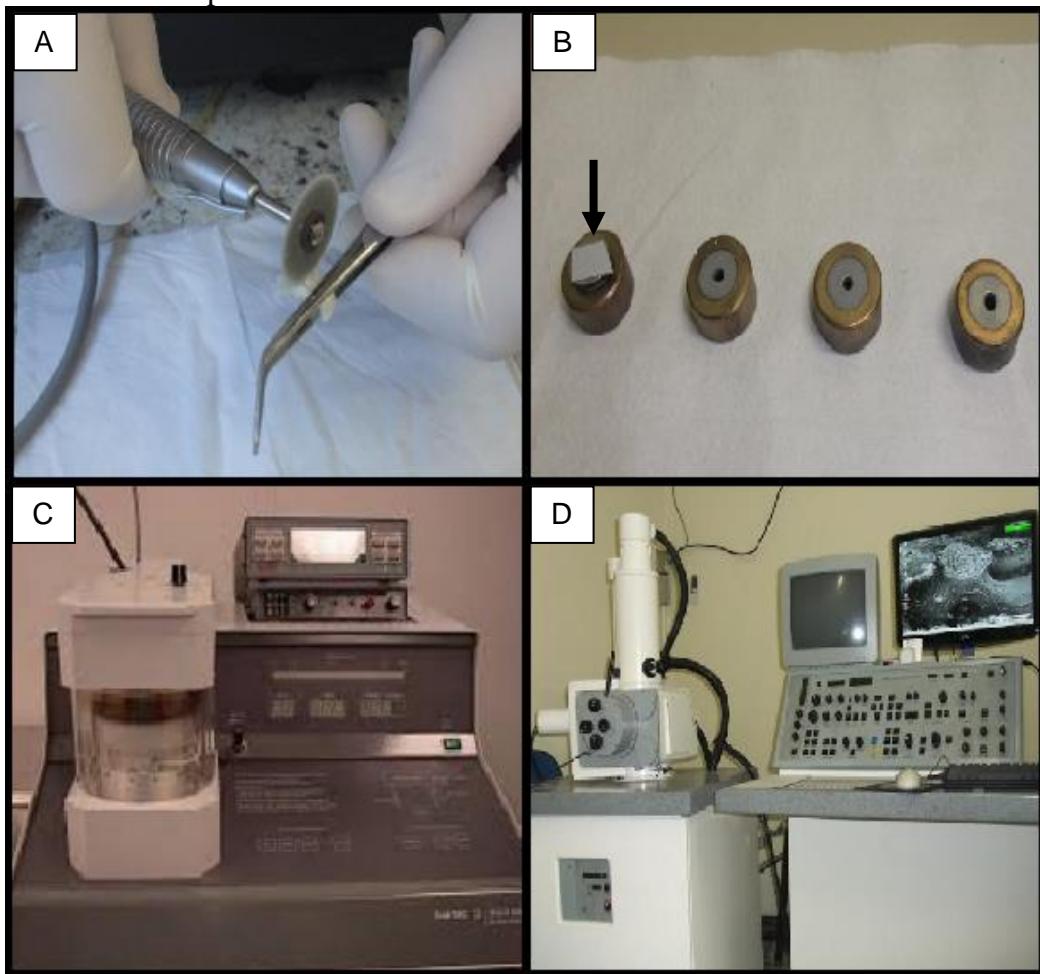
As amostras que estavam conservadas em formaldeído tamponado a 10% sofreram um processo de desidratação utilizando álcool 70% e 100%, por seis dias. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol por uma hora e voltaram para o álcool por mais 48 horas. Para produzir pontos de fragilidade na amostra para sua posterior análise, foram confeccionadas fissuras no material, com o auxílio de um disco diamantado acoplado a um motor de alta rotação (Figura 6A).

Os fragmentos separados foram fixados com uma fita de carbono dupla face sobre um suporte porta-amostra, formado por um disco em liga de alumínio e com superfície lisa (Figura 6B). Os materiais passaram pelo dessecador para então, prosseguir com o processo de metalização por pulverização catódica. O equipamento utilizado foi da marca Bal-Tec® SCD 050 modelo Sputter Coater (Figura 6C). Neste procedimento no qual formava-se um filme de ouro-paládio da ordem de 30 nm sobre o fragmento a fim de evitar os efeitos de carga no interior da câmara do microscópio eletrônico de varredura. Para o processo de deposição

iônica a temperatura da câmara de metalização foi de 25 graus Celsius, corrente de 40mA, tensão de 2 kV e tempo de deposição de 140 segundos.

Através da MEV (Figura 6D) as amostras foram submetidas à análise descritiva morfológica a partir do método visual da interface entre o biomaterial que havia sido implantado e a calvária, que era a superfície receptora. Foi analisado ainda, o biomaterial remanescente e as linhagens de células osteogênicas na região implantada.

Figura 6 - (A) Observa-se o disco diamantado acoplado a um motor de alta rotação, utilizado para criar um ponto de fragilidade nas amostras. (B) Fixação da peça a ser analisada em um porta-amostra (seta preta). (C) Equipamento de metalização da amostra por pulverização catódica. (D) Microscópio eletrônico de varredura utilizado para análise das amostras.



Fonte: Produção do próprio autor.

4 RESULTADOS

Não houve qualquer complicaçāo em relação à execuçāo do procedimento cirúrgico. O procedimento foi considerado simples de ser realizado pelo cirurgião. Logo apóas a intervenção os animais apresentaram comportamento normal e normorexia.

Dentro de um período de 10 dias de pós-operatório, dois animais vieram a óbito, decorrente de infecçāo no sítio cirúrgico. Não havia hiperemia ou supuraçāo visível no local, tampouco deiscênciā da sutura, a qual se removia com os 10 dias de pós-operatório. Apenas foi observada hiporexia e letargia progressiva nos dois animais. Notando essas alterações, foi substituída a antibioticoterapia para Ceftriaxona¹⁷ (40 mg kg⁻¹) BID, via subcutânea, porém, dentro tréas dias, os animais vieram a óbito. Na necropsia, se observou intensa quantidade de secreçāo purulenta entre as guias de crescimento aplicadas, sugerindo septicemia. Apóas o acontecido, foram repetidos dois animais.

Apóas a eutanásia e a coleta dos materiais, foi observado macroscopicamente na maioria das amostras, a não integraçāo do biomaterial HA/SiO₂ 5% ao leito receptor. Com exceçāo de tréas amostras, no momento da remoção do parafuso e da guia, o tecido neoformado desprendia-se juntamente com a guia. Isso ocorreu ainda com apenas uma amostra do material Bio-Oss®. Diferente dos demais, onde na remoção da guia, o tecido neoformado permanecia fixado à calvária.

Ainda macroscopicamente, foi observada a presença de grande quantidade de biomaterial em todos os tratamentos e períodos de evoluçāo.

A seguir, serão apresentados os resultados de cada biomaterial individualmente, de acordo com os períodos de evoluçāo avaliados.

4.1 BIO-OSS® (Controle)

Os resultados das análises encontrados para as amostras do Bio-Oss®, pertencentes tanto ao período de 60 dias quanto ao período de 90 dias, indicam pouco crescimento ósseo e intensa formação de tecido fibroso, sugerindo que tenha um menor potencial osteoindutor em relação a outros biomateriais estudados.

¹⁷ Keftron®, 200 mg ml⁻¹, ABL - Cosmópolis/SP

4.1.1 60 dias pós-operatório

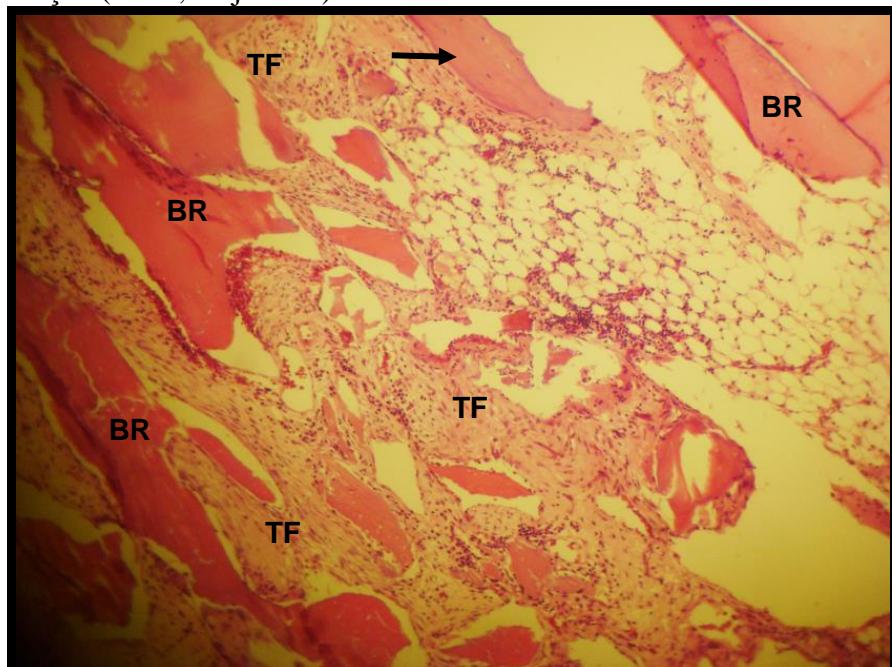
Apresentou mínima neoformação de tecido ósseo, a qual foi leve tanto para osso do tipo primário, quanto para o osso secundário. Apresentou ainda acentuada presença de tecido fibroso já no momento de avaliação aos 60 dias. O material analisado continha moderada presença de células mononucleares de limpeza e pouca quantidade de células gigantes multinucleadas (osteoclastos). A partir da Tabela 3, observam-se os resultados obtidos para a avaliação histológica e a Figura 7, a imagem obtida através de microscopia óptica do tratamento controle Bio-Oss® com evolução de 60 dias. Ainda, na análise por MEV (Figura 8) observa-se essa pequena quantidade de tecido ósseo neoformado e grande quantidade de tecido fibroso.

Tabela 3 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Bio-Oss®, com 60 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+	+++	+	++	+++	+	+

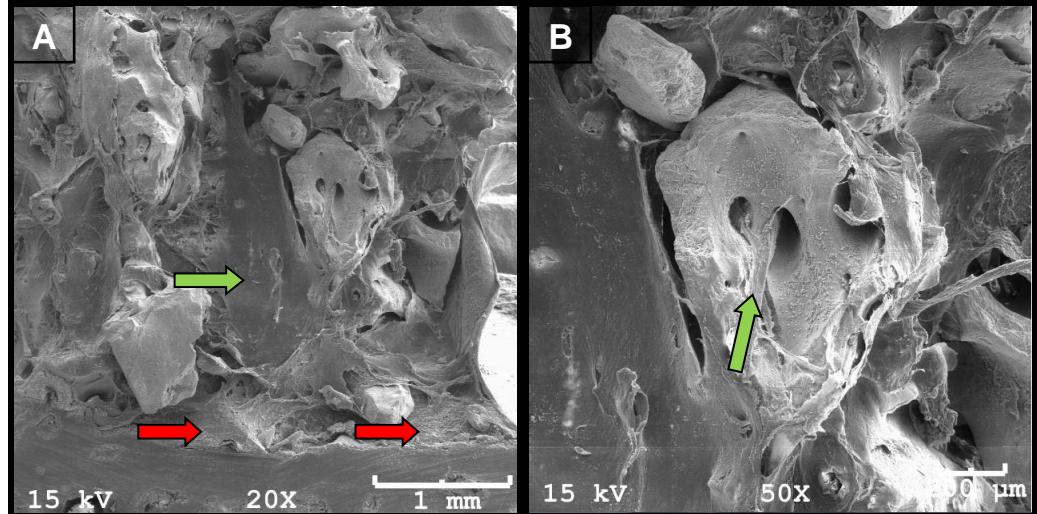
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 7 - Imagem histológica do tratamento controle Bio-Oss®, indicando presença de pequena quantidade de neoformação óssea (seta preta), grande quantidade de tecido fibroso (TF) e de biomaterial remanescente (BR) aos 60 dias após a implantação (H&E, Obj. 10 X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 8 - Micrografia demonstrando grande parte da cúpula preenchida pelo biomaterial Bio-Oss®, após 60 dias de implantação. (A) Observa-se na região de interface entre o osso da calvária e o biomaterial, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado (seta vermelha). Porém em outras porções da cúpula, há grande quantidade de tecido fibroso (seta verde) (Aumento 20x). (B) Observa-se em um maior aumento, o grânulo do biomaterial com prolongamentos de tecido fibroso para o seu interior (seta verde) (Aumento 50x).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.1.2 90 dias pós-operatório

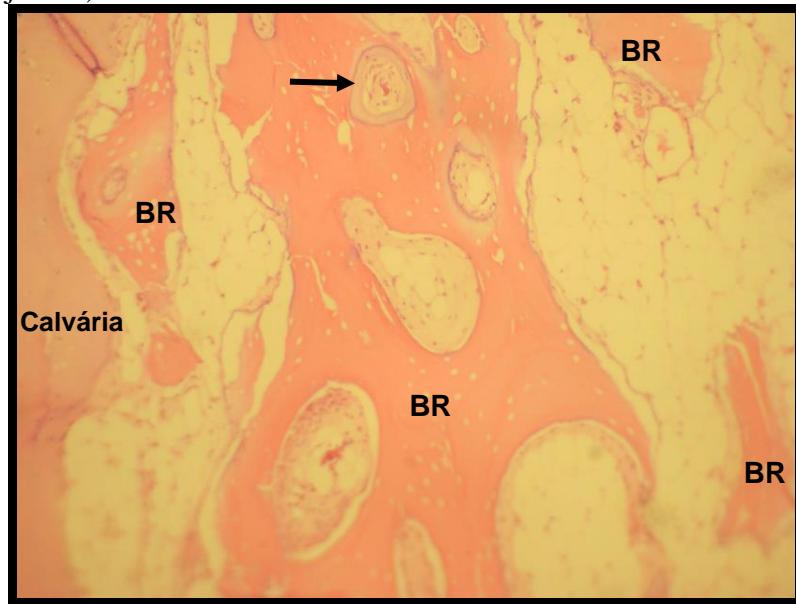
Aos 90 dias de pós-operatório, não foi observada diferença no crescimento ósseo quando comparado aos 60 dias. No entanto, o novo tecido ósseo passou a se apresentar de modo mais organizado, como pode ser observado pela maior quantidade de osso secundário encontrada, em relação ao osso primário. Houve leve presença de fibras colágenas e menor quantidade de células de limpeza (Tabela 4 e Figuras 9 e 10). A quantidade de biomaterial remanescente foi acentuada nos dois períodos de avaliação.

Tabela 4 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo Bio-Oss®, com 90 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+	++	+	+	+++	+	++

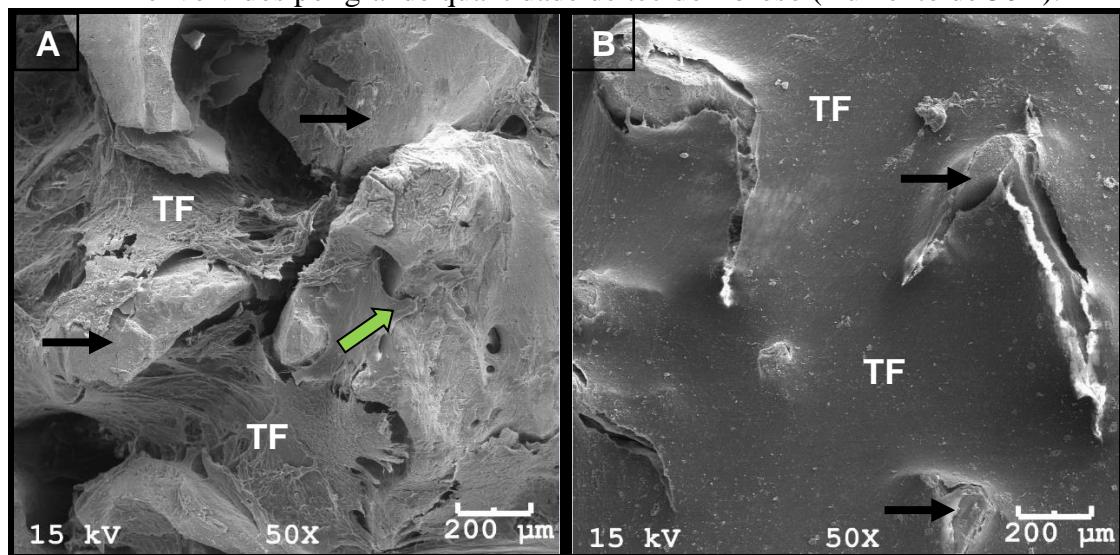
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 9 - Imagem de microscopia óptica para o biomaterial Bio-Oss® após 90 dias de implantação. Ainda há pequena quantidade de neoformação de tecido ósseo (seta preta) e menor atividade de células de limpeza (CL), em comparação aos 60 dias. Observam-se os grânulos de biomaterial remanescente (BR) (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 10 - (A) Imagem obtida através de MEV evidenciando a formação de tecido fibroso (TF) entre os grânulos do biomaterial Bio-Oss® (seta preta) e se prolongando para o interior dos mesmos (seta verde), aos 90 dias de pós-operatório (Aumento de 50X). (B) Grânulos de biomaterial remanescente (seta preta), envolvidos por grande quantidade de tecido fibroso (Aumento de 50X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.2 FOSFATO TRICÁLCICO- β (TCP- β)

De maneira geral, o biomaterial formado pelo TCP- β puro, apresentou boa osteointegração e formação de tecido ósseo, mesmo aos sessenta dias. Mostrou-se bastante osteoindutor e osteocondutor, não demonstrando indícios de rejeição por parte dos animais.

4.2.1 60 dias pós-operatório

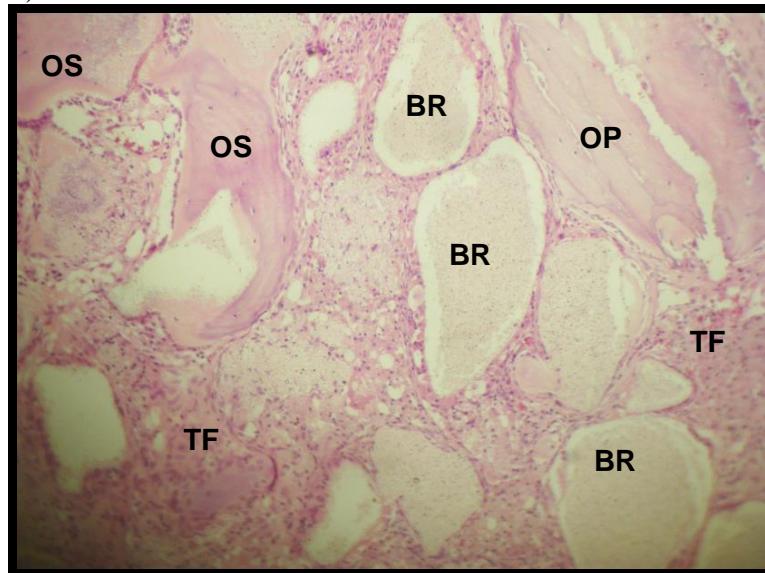
A Tabela 5 demonstra aos 60 dias de pós-operatório, que o TCP- β levou à moderada neoformação de tecido ósseo, tanto do tipo primário quanto secundário, porém havendo ainda acentuada presença de biomaterial remanescente (Figura 11). Constatou-se leve presença de fibras colágenas nestas amostras. Em relação às células de limpeza, foi observada moderada presença de células mononucleares e poucas células gigantes multinucleadas. Havia atividade osteoblástica intensa para este biomaterial, observada a partir de MEV (Figura 12).

Tabela 5 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo TCP- β , com 60 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	+	+	++	+++	++	++

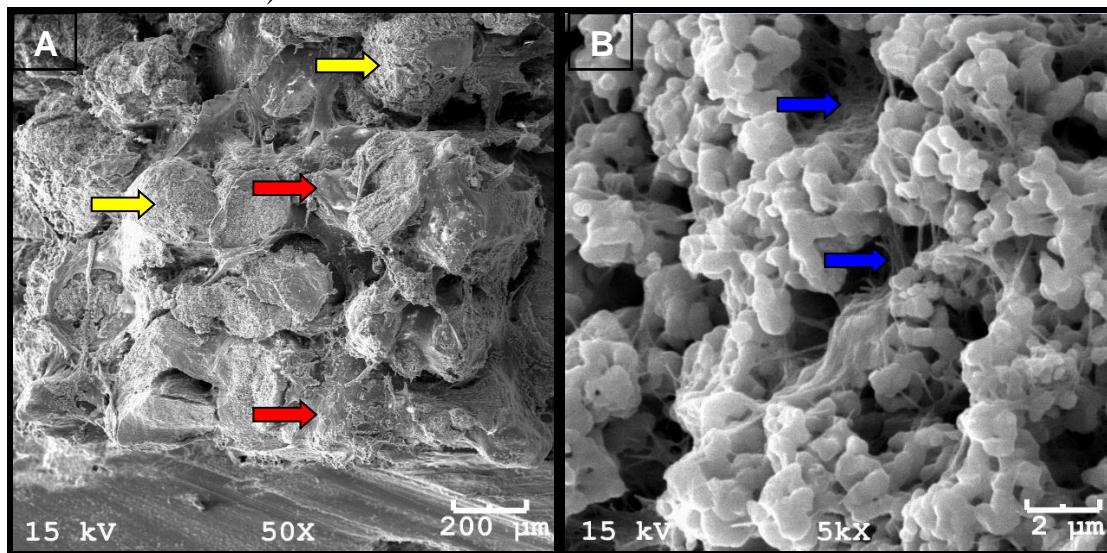
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 11 - Imagem histológica demonstrando moderada neoformação de tecido ósseo tanto do tipo primário (OP), quanto secundário (OS) para o biomaterial TCP- β aos 60 dias após a implantação. Pode-se observar ainda grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) e formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 12 - Imagem obtida através de MEV para o biomaterial TCP- β aos 60 dias de pós operatório. (A) Demonstra a presença de moderada neoformação óssea (seta vermelha) e grande quantidade de biomaterial remanescente (seta amarela) (Aumento de 50X). (B) Demonstra a atividade dos osteoblastos pela emissão de vários prolongamentos (seta azul) para posterior formação óssea (Aumento de 5000X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.2.2 90 dias pós-operatório

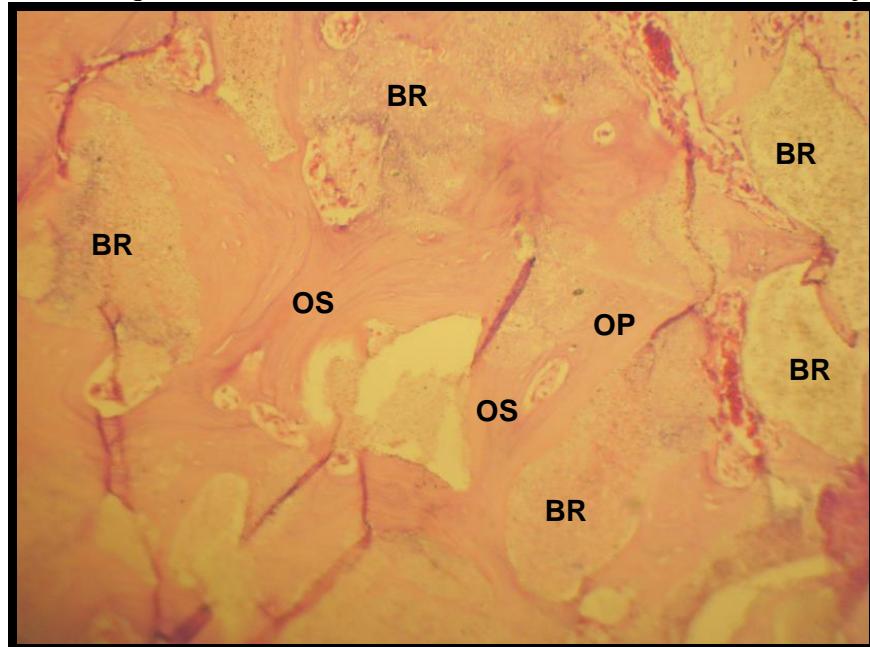
Foi observada acentuada presença de neoformação de tecido ósseo, demonstrando que existe um crescimento através do tempo para este biomaterial, conforme o período de evolução estudado. Ainda há pouca atividade de macrófagos, tanto células mono quanto multinucleadas (Tabela 6). Além disso, o tecido ósseo neoformado imaturo transformou-se em tecido mais organizado, maduro (Figura 13) e nota-se a presença de formação óssea intragranular (Figura 14). Observou-se ainda, boa osteointegração e boa qualidade de tecido ósseo formado, embora ainda haja presença significativa de biomaterial.

Tabela 6 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo TCP- β , com 90 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+++	+	+	+	+++	+	++

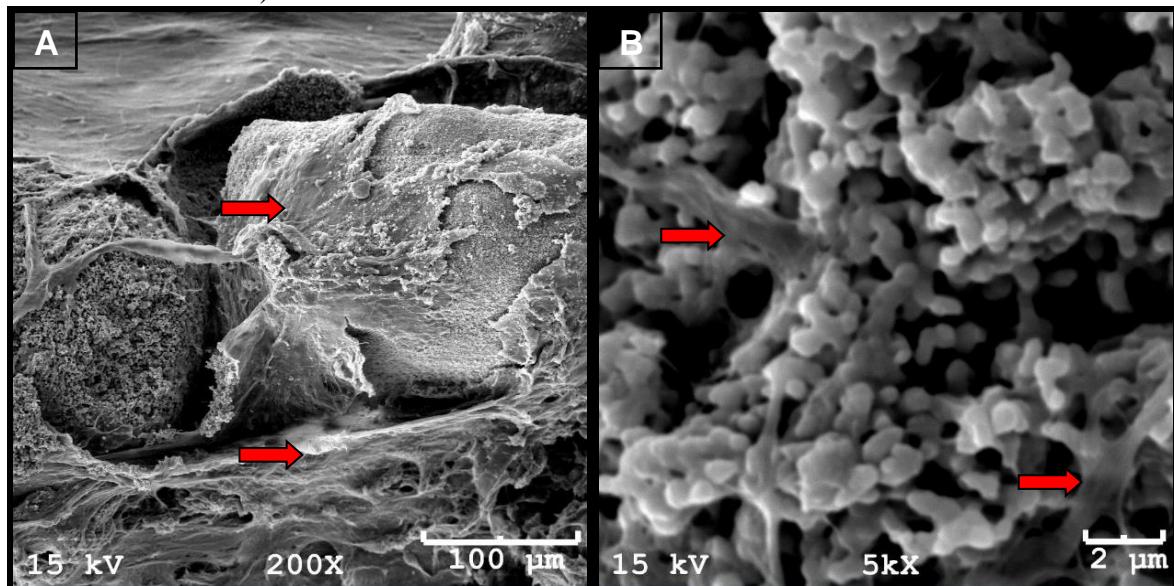
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 13 - Imagem obtida através de microscopia óptica, onde se evidencia a presença de osso primário (OP) e osso secundário maduro em maior quantidade (OS), na amostra de TCP- β aos 90 dias após implantação na calvária de coelhos. Grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (H&E. Obj 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 14 - Micrografia obtida através de MEV para o biomaterial TCP- β aos 90 dias após implantação. (A) Acentuada presença de neoformação óssea (seta vermelha) (Aumento de 200X). (B) Presença de formação óssea intragrangular (seta vermelha) (Aumento de 5000X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.3 HIDROXIAPATITA 73,53% COM FOSFATO TRICÁLCICO- β 26,47% (HA/ TCP- β)

Os estudos realizados com o bifásico HA/TCP- β demonstraram boa osteointegração e formação óssea. Mesmo não havendo um incremento na neoformação de tecido ósseo entre os períodos avaliados, o biomaterial demonstrou ser capaz de predispor à formação de tecido ósseo de boa qualidade.

4.3.1 60 dias pós-operatório

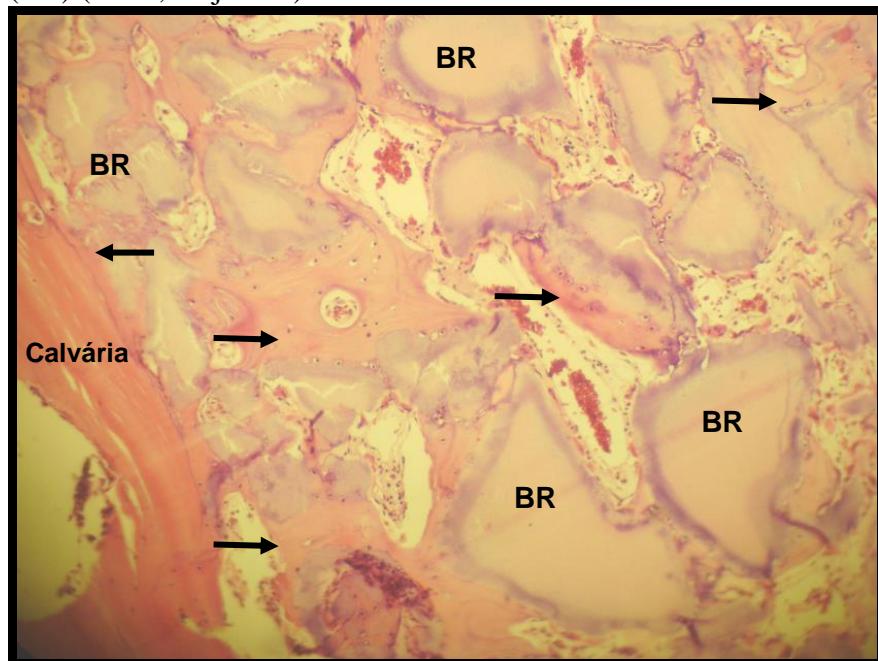
Foi observada nas amostras, a presença de um tecido ósseo com crescimento moderado e com presença de quantidades equivalentes de tecido ósseo primário e secundário, indicando maturação e neoformação óssea muito próximas (Tabela 7). A formação óssea ocorreu bem próxima à calvária, demonstrando boa integração ao leito receptor (Figura 15). Através da MEV demonstra-se a formação de tecido ósseo sobre os grânulos do biomaterial HA/TCP- β , sendo possível, inclusive, observar uma célula de osteoblasto sobre o grânulo do biomaterial (Figura 16).

Tabela 7 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/TCP- β , com 60 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	+	++	++	+++	++	++

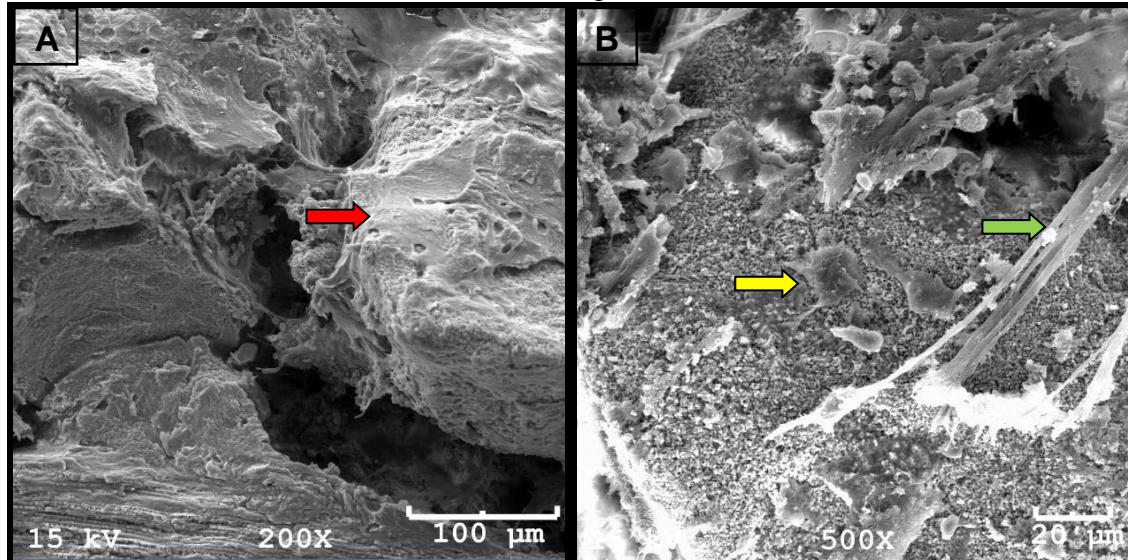
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 15 - Imagem obtida através de microscopia óptica para a amostra de HA/TCP- β aos 60 dias de evolução. Observa-se neoformação de tecido ósseo moderada (setas pretas), sendo essa formação próxima à calvária, demonstrando boa integração ao leito receptor. Ainda há grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 16 - (A) Imagem obtida através de MEV, demonstrando a formação de tecido ósseo sobre o grânulo do biomaterial HA/TCP- β (seta vermelha) aos 60 dias de pós-operatório (Aumento de 200X). (B) Prolongamento fibroso (seta verde) e osteoblasto (seta amarela) sobre o grânulo do biomaterial (Aumento de 500X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.3.2 90 dias pós-operatório

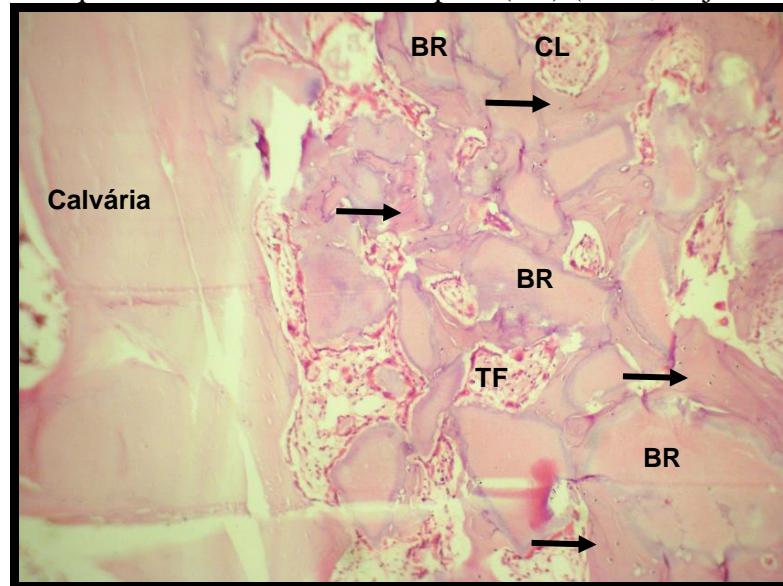
A quantidade de tecido ósseo neoformado não diferiu daquela encontrada aos 60 dias, sendo classificada como moderada, bem como o estágio de maturação óssea. Havia ainda neste período acentuada presença de biomaterial e menor atividade de células de limpeza mononucleares. Porém, a deposição de fibras colágenas passou de leve à moderada. Isto pode ser observado a partir da análise da Tabela 8 e da Figura 17. Através de MEV demonstra-se a presença de tecido fibroso intergranular e a formação de tecido ósseo sobre os grânulos do biomaterial e dentro deles (Figura 18).

Tabela 8 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/TCP- β , com 90 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	++	++	+	+++	++	++

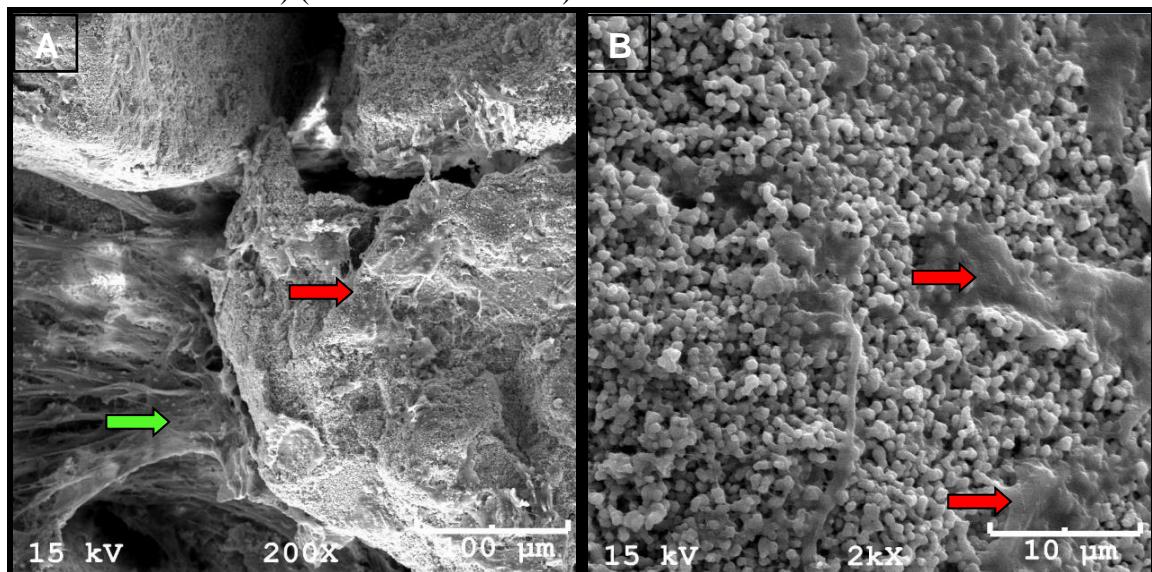
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 17 - Imagem histológica obtida para a amostra de HA/TCP- β com 90 dias de pós-operatório. Observa-se neoformação óssea moderada (setas pretas), formação de tecido fibroso (TF), grande quantidade de biomaterial remanescente (BR) e menor quantidade de células de limpeza (CL) (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 18 - (A) Imagem obtida através de MEV, demonstrando a presença de tecido fibroso intergranular (seta verde) e a formação de tecido ósseo sobre o grânulo do biomaterial HA/TCP- β (seta vermelha) com 90 dias pós-implantação em um aumento de 200X. (B) Neoformação de tecido ósseo intragrangular (seta vermelha) (Aumento de 2000X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.4 HIDROXIAPATITA/ SÍLICA (HA/SiO₂ 5%)

Através das análises das amostras obtidas aos 60 e 90 dias para o bifásico HA/SiO₂ 5% este biomaterial não apresenta boa qualidade de osteoindução, osteocondução e osteointegração.

4.4.1 60 dias pós-operatório

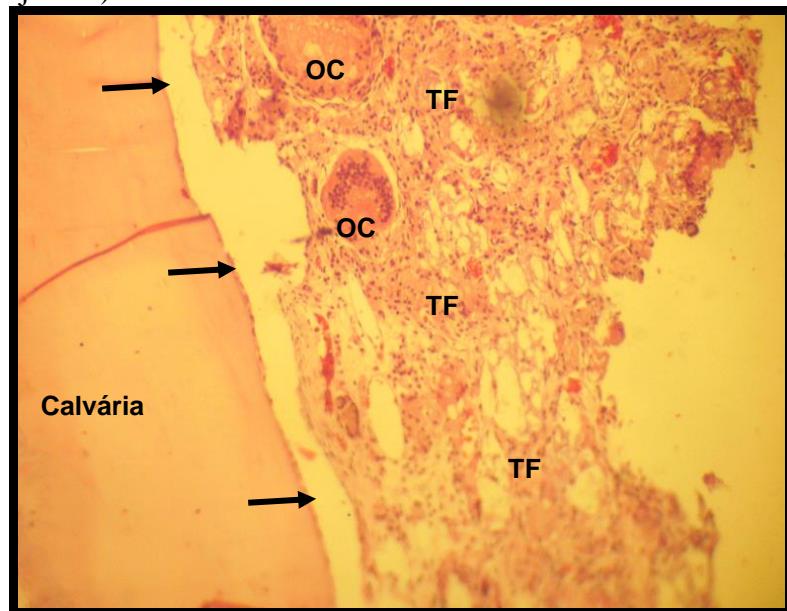
Este biomaterial induziu a muito pouca neoformação de tecido ósseo, formando em sua maior parte, tecido fibroso. Aos 60 dias, havia acentuada quantidade de células mononucleares e poucos osteoclastos. Esta análise pode ser observada na Tabela 9. Além disso, na Figura 19 pode-se notar a formação de tecido fibroso, atividade osteoclástica e ainda, osso da calvária distante da celularidade e o tecido formado, demonstrando não haver integração ao leito receptor. Através da análise de MEV (Figura 20) nota-se que há grande quantidade de material fibroso sobre toda a superfície do biomaterial, não se observando crescimento ósseo.

Tabela 9 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/SiO₂ 5%, com 60 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
+	++	+	+++	+++	++	++

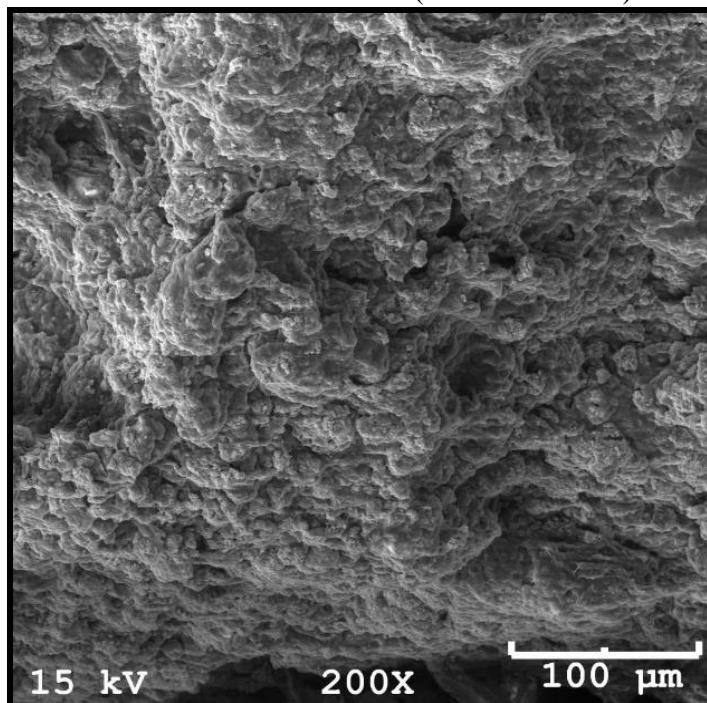
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 19 - (A) Imagem histológica do tratamento com HA/SiO₂ 5% após 60 dias de implantação, indicando a intensa formação de tecido fibroso (TF) e atividade osteoclastica presente (OC). Observa-se o osso da calvária distante da celularidade (setas pretas) não havendo integração ao leito receptor (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 20 - A micrografia do compósito HA/SiO₂ 5% obtida através de MEV, demonstra grande quantidade de material fibroso recobrindo toda sua superfície. Não é possível observar crescimento ósseo (Aumento 200X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.4.2 90 dias pós-operatório

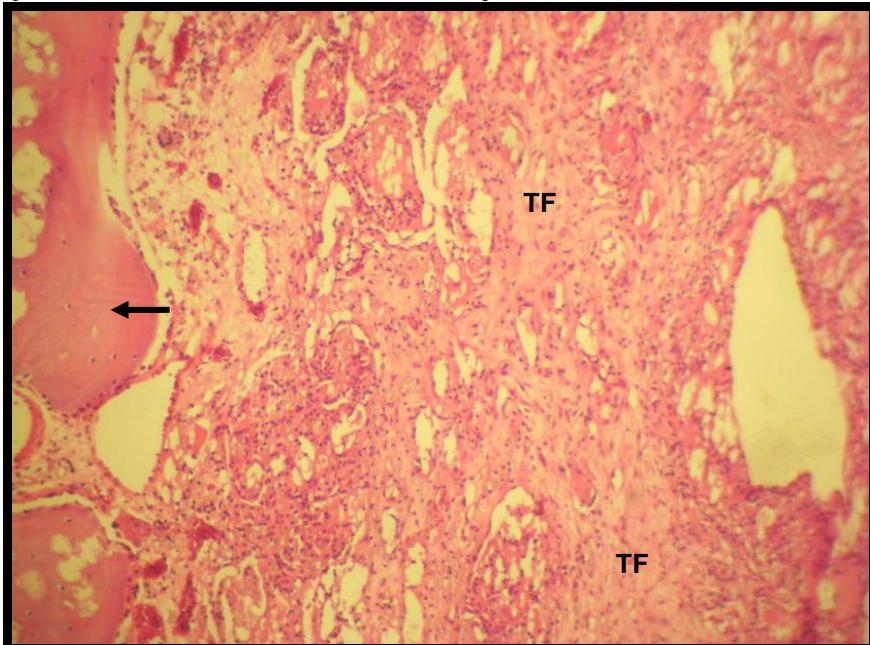
Aos 90 dias de evolução houve redução da quantidade de biomaterial remanescente de acentuada para moderada. Houve uma pequena diminuição na quantidade de células de limpeza em relação aos 60 dias, porém houve um leve aumento na quantidade de osteoclastos (Tabela 10). Este biomaterial apresentou um pequeno incremento em relação à neoformação de tecido ósseo (Figura 21). Neste período de avaliação, na análise através da MEV também se evidencia a formação de tecido fibroso sobre o material e da mesma forma, não se observa o tecido ósseo neoformado (Figura 22).

Tabela 10 - Resultados obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS) do grupo HA/SiO₂ 5% com 90 dias de pós-operatório.

NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
++	++	++	++	++	++	+

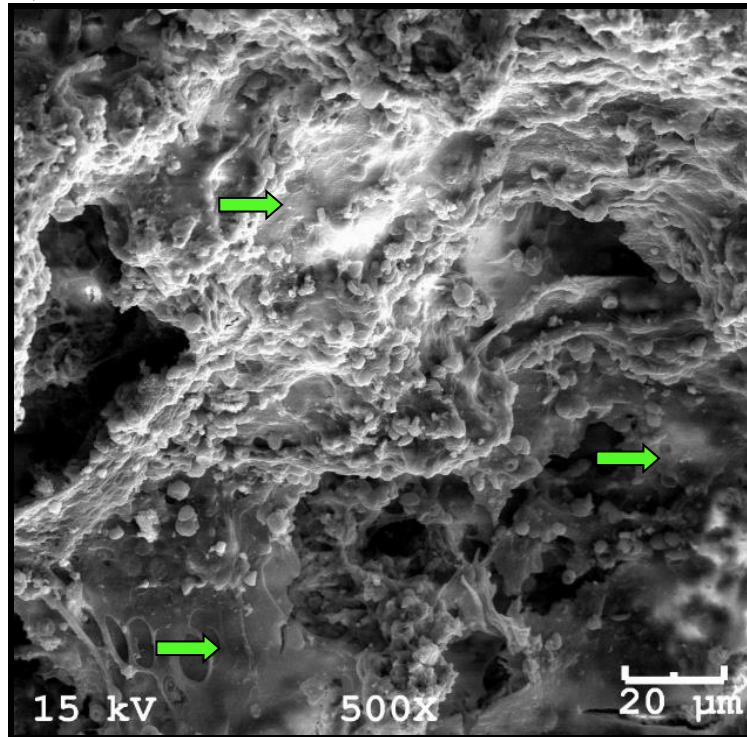
Fonte: Produção do próprio autor.

Figura 21 - Imagem histológica de amostra do grupo HA/SiO₂ 5% com 90 dias de pós-operatório demonstrando um incremento de neoformação de tecido ósseo (seta preta) em comparação à análise aos 60 dias e ainda demonstra a intensa formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 10X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/ UDESC.

Figura 22 - Micrografia do biomaterial formado por HA/SiO₂ 5%, após 90 dias de implante, evidenciando presença de tecido fibroso (seta verde) (Aumento de 500X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

4.5 RESULTADOS COMPARATIVOS

A Tabela 11 faz uma comparação entre os biomateriais que foram estudados, através dos critérios histológicos observados, aos 60 e aos 90 dias de pós-operatório.

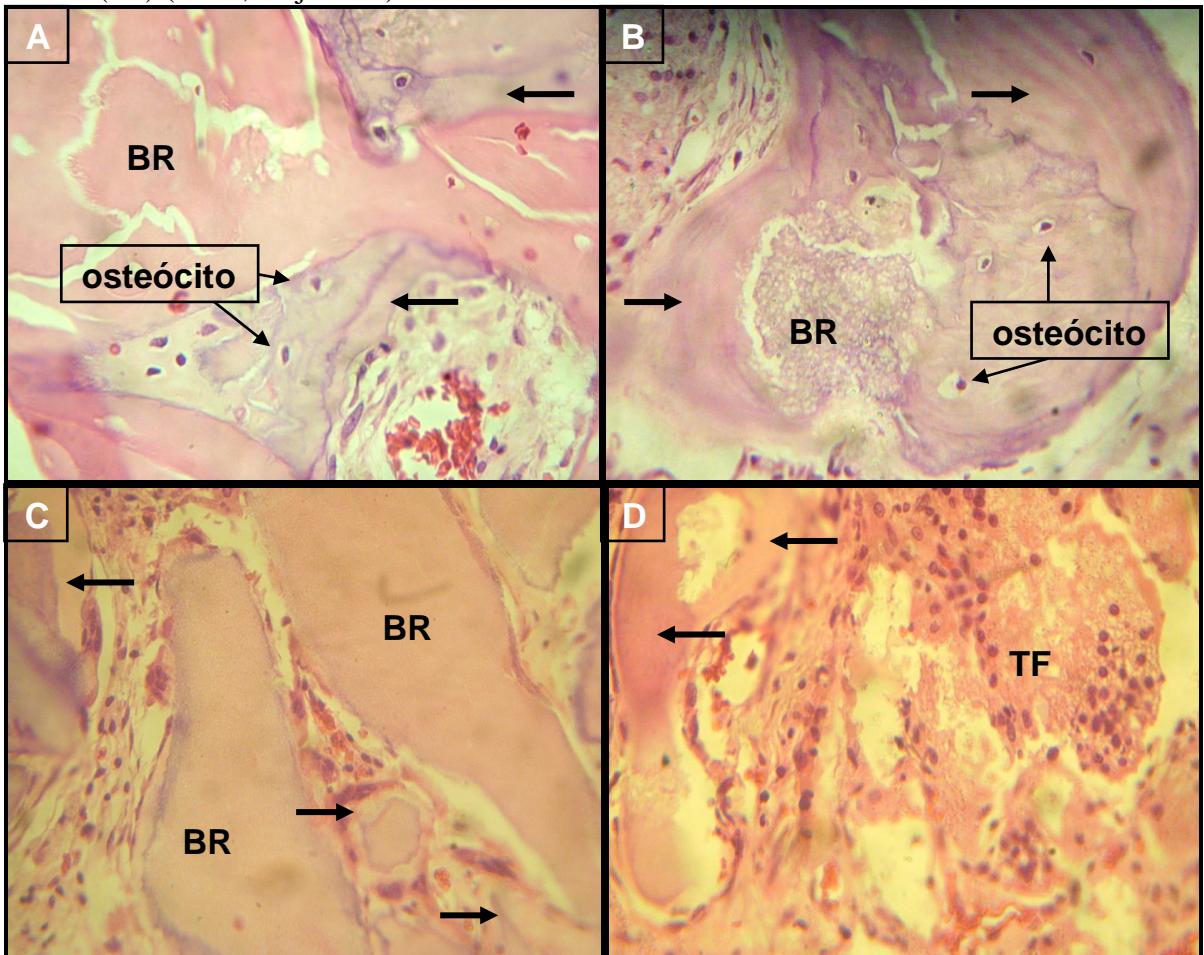
Tabela 11 - Comparação entre resultados médios de cada grupo, aos 60 e 90 dias pós-operatório, obtidos quanto à neoformação de tecido ósseo (NTO), deposição de fibras colágenas (DFC), presença de osteoclastos (PO), células de limpeza (CL), biomaterial remanescente (BR), tecido ósseo primário (OP) e tecido ósseo secundário (OS).

BIOMATERIAL	NTO	DFC	PO	CL	BR	OP	OS
Bio-Oss® 60 dias	+	+++	+	++	+++	+	+
TCP-β 60 dias	++	+	+	++	+++	++	++
HA/TCP-β 60 dias	++	+	++	++	+++	++	++
HA/SiO ₂ 60 dias	+	++	+	+++	+++	++	++
Bio-Oss® 90 dias	+	++	+	+	+++	+	++
TCP-β 90 dias	+++	+	+	+	+++	+	++
HA/TCP-β 90dias	++	++	++	+	+++	++	++
HA/SiO ₂ 90 dias	++	++	++	++	++	++	+

Fonte: Produção do próprio autor.

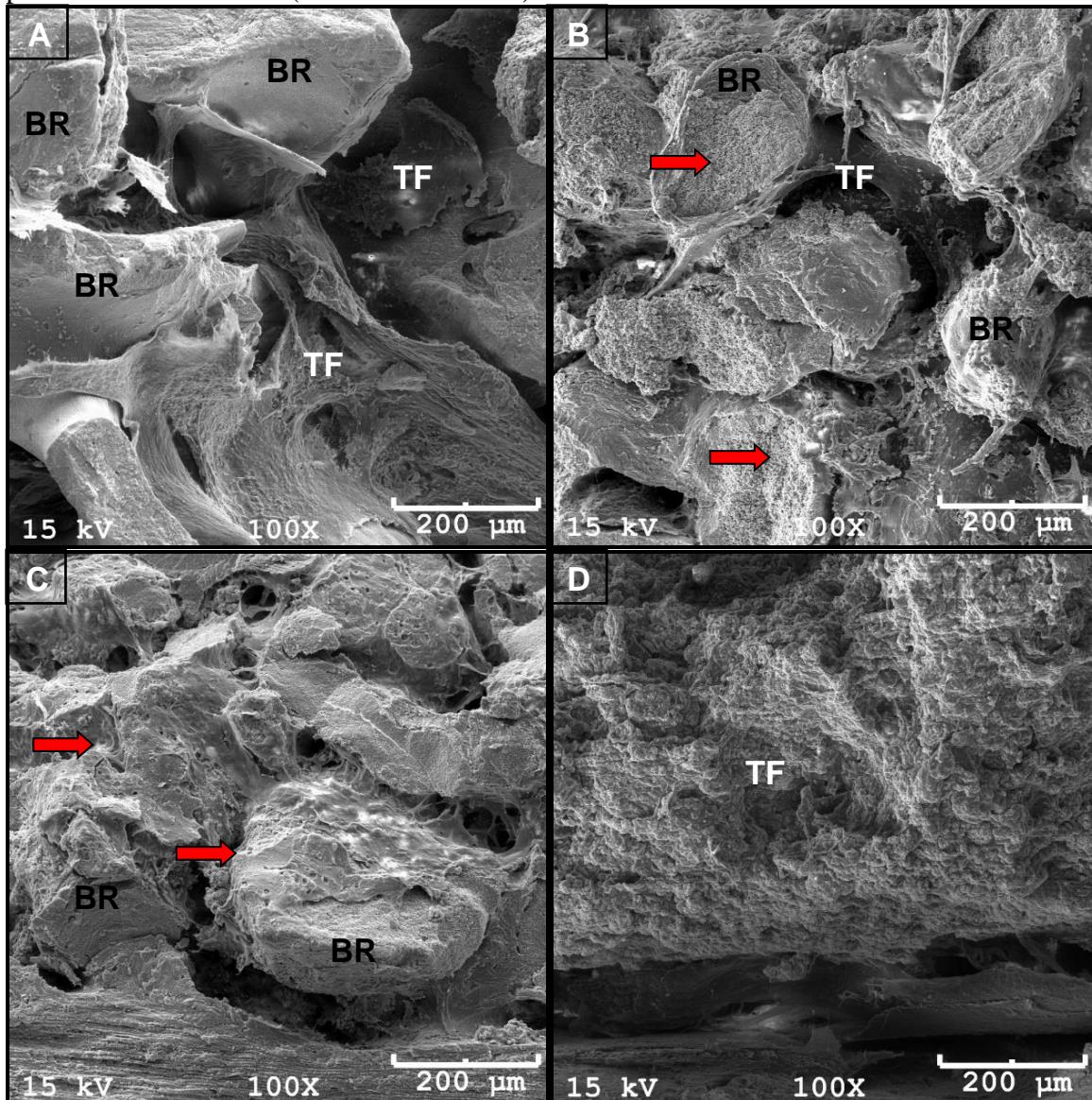
As Figuras 23 e 24 ilustram o comparativo histológico e através de MEV dos tratamentos, aos 60 dias de evolução, respectivamente. As Figuras 25 e 26 ilustram o mesmo comparativo, porém aos 90 dias após a implantação, respectivamente.

Figura 23 – Imagens histológicas comparando os tratamentos com 60 dias de pós-operatório. (A) Bio-Oss®: Leve neoformação óssea (setas pretas) demonstrando osteócitos no local e grande quantidade de biomaterial remanescente (BR). (B) TCP- β : Moderada neoformação óssea (setas pretas) com osteócitos no local e biomaterial remanescente (BR). (C) HA/TCP- β : Moderada neoformação óssea (setas pretas), acentuada presença de biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO₂ 5%: Leve neoformação óssea (setas pretas) e grande formação de tecido fibroso (TF) (H&E, Obj. 40 X).



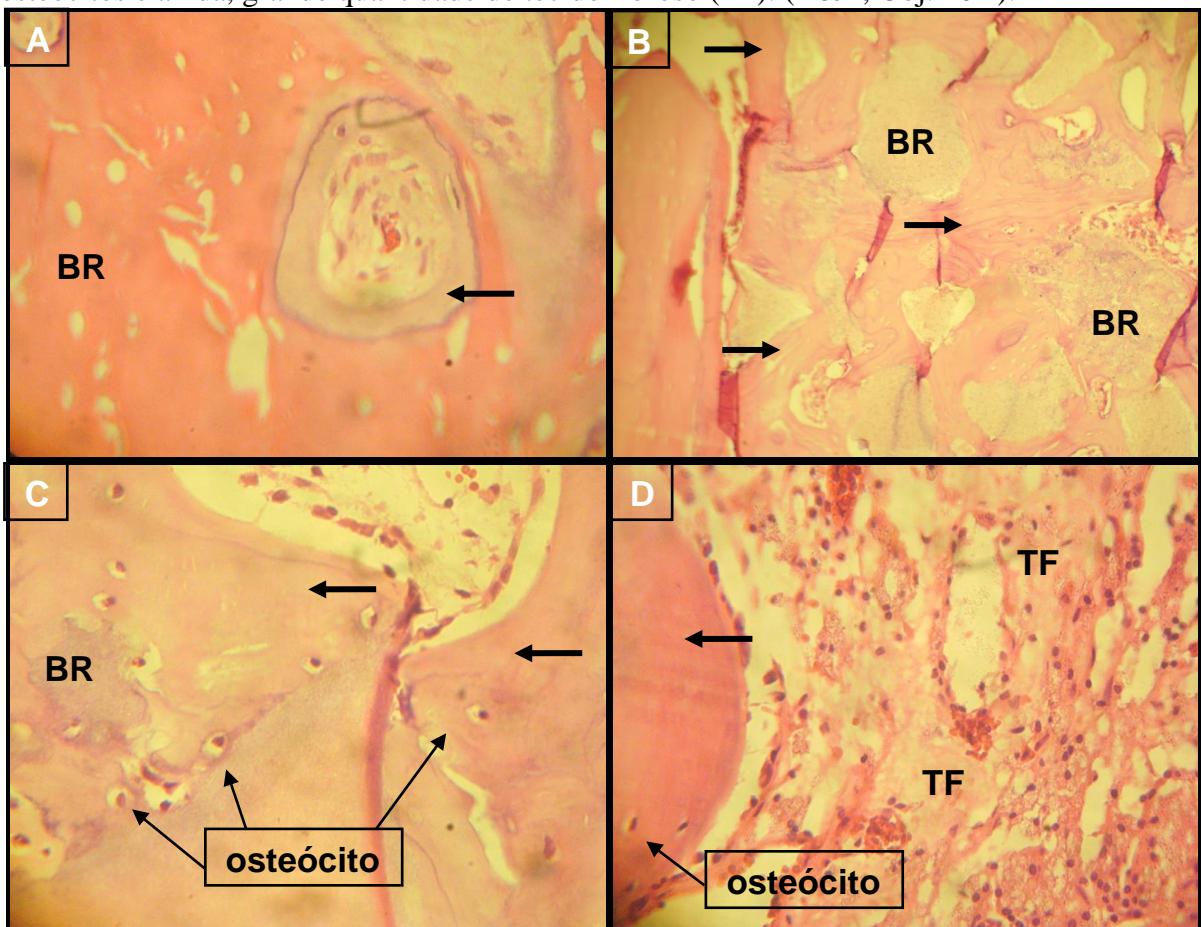
Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/UDESC.

Figura 24 – Imagens obtidas através de MEV, comparativas dos tratamentos com 60 dias de implantação, (A) Bio-Oss®: Alta formação de tecido fibroso (TF) entre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (B) TCP- β : Neoformação óssea moderada (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR) e tecido fibroso (TF) intergranular. (C) HA/TCP- β : Neoformação óssea moderada (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO₂ 5%: Formação de tecido fibroso (TF) sobre toda a superfície do biomaterial (Aumento de 100X).



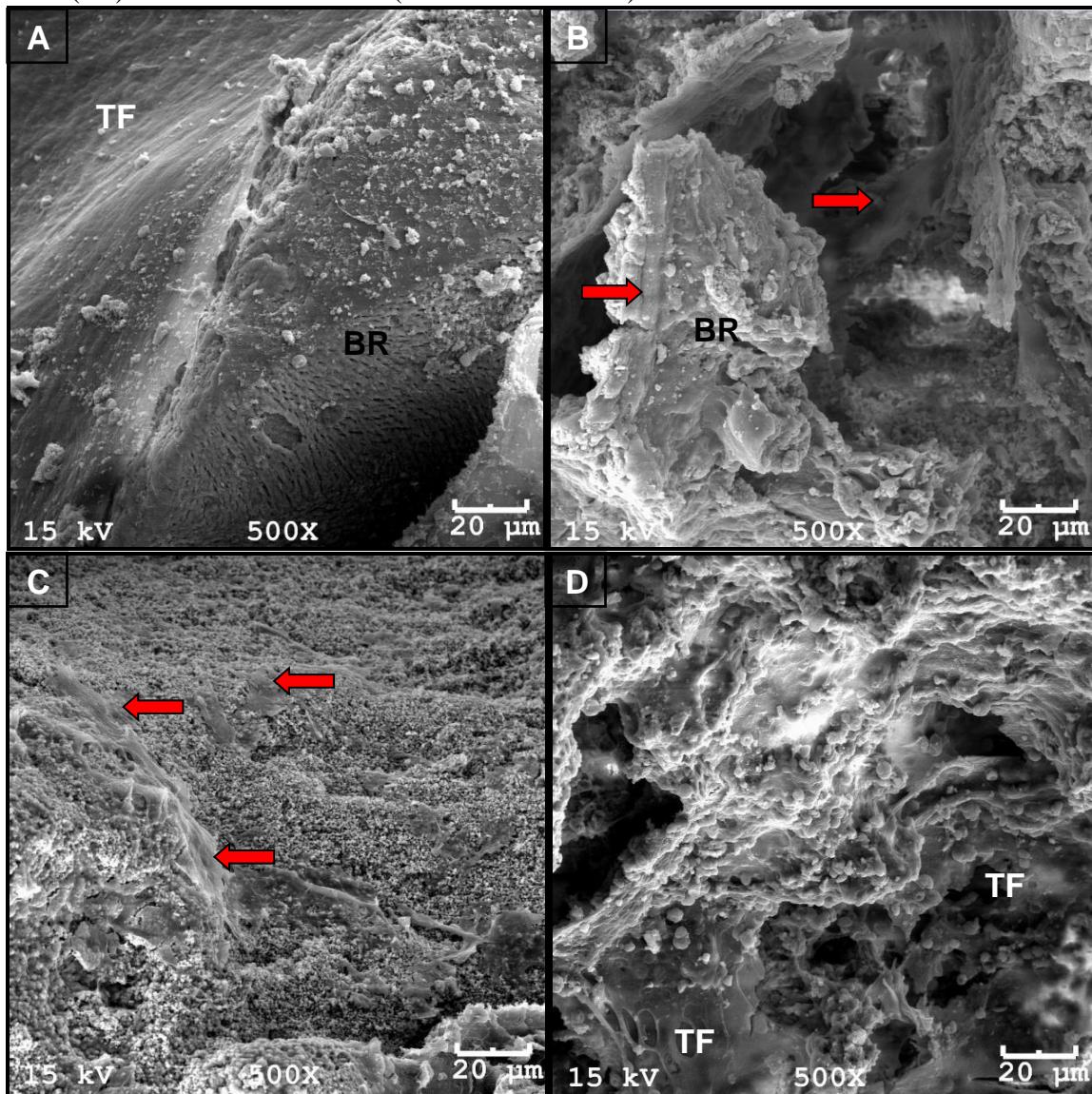
Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

Figura 25 – Imagens histológicas comparando os tratamentos com 90 dias de pós-operatório. (A) Bio-Oss®: Leve neoformação óssea (seta preta) e acentuada quantidade de biomaterial remanescente. (B) TCP-β: Acentuada neoformação óssea (setas pretas) e ainda havendo grande quantidade de biomaterial remanescente (BR). (C) HA/TCP-β: Moderada neoformação óssea (setas pretas), demonstrando também a presença de osteócitos e acentuada presença de biomaterial remanescente (BR). (D) HA/SiO₂ 5%: Moderada neoformação óssea (setas pretas) demonstrando incremento em relação a avaliação aos 60 dias, presença de osteócitos e ainda, grande quantidade de tecido fibroso (TF). (H&E, Obj. 40X).



Fonte: Laboratório de Histologia do CAV/UDESC.

Figura 26 – Imagens obtidas através de MEV, comparativas dos tratamentos com 90 dias de implantação, (A) Bio-Oss®: Formação de tecido fibroso (TF) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR). (B) TCP- β : Neoformação óssea (setas vermelhas) sobre os grânulos do biomaterial remanescente (BR) e intergranular. (C) HA/TCP- β : Moderada neoformação óssea (setas vermelhas). (D) HA/SiO₂ 5%: Observa-se formação de tecido fibroso (TF) sobre toda a amostra (Aumento de 500X).



Fonte: Grupo de Pesquisa em Biomateriais da UDESC/CCT-Joinville.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi escolhido aplicar o método de crescimento ósseo guiado, por permitir avaliar o comportamento da neoformação óssea de forma isolada, por parte do biomaterial, dentro de um implante. Este implante que forma o sistema guiado permite o contato apenas com o tecido ósseo receptor. Metodologias semelhantes já foram utilizadas em outros estudos e demonstrou ser um método adequado (COLOMBO, 2016; EZIRGANLI et al., 2013; LEVANDOWSKI-JR, 2009; LEVANDOWSKI-JR, 2014).

Apesar de ainda ser um método novo para avaliação do comportamento dos biomateriais quanto à neoformação óssea exoesquelética, Levandowski-Jr (2009) refere que este método em estudos comparativos de formação óssea com biomateriais fosfatos de cálcio apresenta vantagens como baixa morbidade e forte semelhança a situações clínicas.

A guia utilizada foi fabricada com poliamida. Isso porque aplicações permanentes ou por longo período dentro do organismo devem ser inertes, biocompatíveis e atóxicos, como é o caso desse polímero. Além de ser um tipo de material já amplamente utilizado na ortopedia (RODRIGUES, 2013). O fato de estes dispositivos serem implantados na calvária dos animais não resultou em qualquer alteração ou rejeição. Colombo (2016) utilizou dispositivos do mesmo material sem qualquer rejeição por parte dos animais. Levandowski-Jr (2014) também utilizou dispositivos similares, porém fabricados em Politetrafluoretileno, material também bioinerte.

É importante ressaltar a opção da utilização dos coelhos como modelos animais. Os coelhos foram um dos primeiros animais utilizados em estudos biomédicos e são considerados animais de laboratório de fácil acesso e manejo, por serem bastante dóceis. Além disso, os coelhos da raça Nova Zelândia são preferíveis pela sua uniformidade de reações nas provas experimentais (COUTO, 2002).

A calvária foi a região cirúrgica escolhida, por ser uma área de fácil acesso cirúrgico, além de oferecer baixa morbidade e as interferências das forças musculares são reduzidas neste local (DE LIMA et al., 2013). Além disso, diversos estudos anteriores relacionados ao crescimento ósseo já demonstraram bons resultados a partir da utilização da calvária de coelhos, tanto para reparação óssea a partir da confecção de defeito crítico (OLIVEIRA, 2016; PAKNEJAD et al., 2015; VALIATI, 2011), quanto para crescimento guiado (COLOMBO, 2016; EZIRGANLI et al., 2013; LEVANDOWSKI-JR, 2009; LEVANDOWSKI-JR, 2014).

A calvária dos coelhos permitiu a implantação de quatro guias de crescimento no estudo de Colombo (2016) e Levandowski-Jr (2014). Já Ezirganli et al. (2013) realizou um

estudo semelhante, porém aplicava apenas duas guias de crescimento em cada calvária. Este último método teria sido a melhor opção para ser executado neste estudo em questão, devido ao tamanho dos animais que foram utilizados. O tamanho da calvária dos mesmos foi um fator complicante, interferindo nos resultados do presente estudo. As guias ultrapassaram um pouco os limites supraorbitais, permanecendo um pequeno ponto de abertura nas duas guias que ficavam posicionadas mais rostralmente.

Tendo o exposto, pode-se pensar que os biomateriais que foram alocados nessas posições podem ter sofrido o efeito da atuação dos fibroblastos e células epiteliais no local (FARZAD; MOHAMMADI, 2012; LIU; KERNS, 2014). Estes autores citados, afirmam que a barreira funciona para exclusão celular, para impedir que os fibroblastos e as células epiteliais tenham acesso ao local da ferida e haja formação de tecido conjuntivo fibroso, interferindo na formação de tecido ósseo. Portanto, os biomateriais HA/SiO₂ 5% e Bio-Oss® podem ter sido desfavorecidos.

O coágulo sanguíneo não foi utilizado como grupo controle neste estudo, pois tanto Levandowski-Jr (2009) quanto Colombo (2016) o utilizaram e observaram que pela metodologia do crescimento ósseo guiado, apenas com a aplicação do coágulo não se obtém uma neoformação de tecido ósseo expressiva. Diferente de quando se tem um defeito ósseo realmente, pois segundo Colombo (2016) o próprio defeito proporciona um arcabouço vascular e de células reparadoras para o local afetado.

Através destes resultados optou-se por utilizar o Bio-Oss® como grupo controle, haja vista este biomaterial já ser utilizado em larga escala na odontologia e sabe-se que tem potencial osteocondutor. Dessa forma, foi possível comparar a capacidade de neoformação de tecido ósseo de um produto comercial com resultados já conhecidos com os biomateriais a serem testados.

A apresentação comercial do Bio-Oss® se dá na forma de microgrânulos (grânulos variando de 250 a 1000 µm) e macrogrânulos (grânulos de 1000 a 2000 µm). Neste estudo, utilizou este biomaterial em macrogrânulos, de forma que já se pudesse comparar esta questão da diferença de tamanho de grão com os outros biomateriais, que apresentaram tamanhos bem inferiores ao Bio-Oss®. No estudo de Carneiro et al. (2005) foi realizada análise microscópica e radiográfica do reparo de um defeito ósseo em fêmures de coelhos com matriz de osso medular bovino desmineralizado em diferentes tamanhos de partículas (micro e macrogranular) e em geral, os defeitos ósseos exibiram significativa formação de osso novo em todos os grupos de estudo, independentemente dos tamanhos das partículas.

Ezirganli et al. (2013) realizou um estudo guiado em calvária de coelhos, utilizando também o Bio-Oss®, porém com a apresentação de grânulos menores, medindo de 250 a 1000 µm. No primeiro mês pós-implantação, não foram observados sinais de absorção das partículas do enxerto. Porém, observou-se atividade osteoclástica no terceiro mês de avaliação. Já neste estudo com os grânulos maiores, foi realizada avaliação ao segundo e terceiro mês pós-implantação, e havia ainda acentuada presença de biomaterial remanescente. No entanto, havia leve atividade osteoclástica tanto aos 60 quanto aos 90 dias de avaliação.

A baixa atividade osteoclástica para o Bio-Oss® já era esperada, já que a absorção deste material tende a ser mais demorada. Pois o tamanho da partícula do biomaterial impacta diretamente no tamanho da área da superfície disponível para reagir com células e fluido biológico. Quanto maior o tamanho das partículas, maior será o tempo de absorção do biomaterial (TEIXEIRA, 2009). Inclusive, Tamimi et al. (2006) referem que em seu estudo o Bio-Oss® mostrou propriedades osteocondutoras, mas a absorção não ocorreu. De acordo com os autores, o Bio-Oss® pode ser considerado um material não absorvível, isso devido ao fato de que a atividade dos osteoclastos é muito lenta para este produto, necessitando de vários anos do período do enxerto para que demonstre alguma absorção.

Tamimi et al. (2006) ainda citam que os biomateriais com absorção lenta, apresentando grânulos não restaurados dentro do osso recém formado interferem na formação de osso novo de forma negativa. O Bio-Oss® neste estudo obteve um resultado ruim em relação à neoformação de tecido ósseo, apesar de os outros biomateriais testados também apresentarem grande quantidade de grânulos remanescentes, a atividade fagocitária foi mais intensa para os demais.

Já se esperava encontrar bons resultados para o TCP-β no presente estudo, pois este material já se destaca também em outros estudos. Jensen et al (2006) realizaram reparação óssea comparativa entre distintos enxertos: autógeno, Bio-Oss® (macrogrânulos) e TCP-β a partir de defeitos criados em mandíbulas de *minipigs*. O material que apresentou menor neoformação óssea foi o Bio-Oss®, e dentro de oito semanas o TCP-β chegou a superar o volume de tecido ósseo neoformado pelo autoenxerto, demonstrando quão promissor é este biomaterial.

Dallabrida (2016) avaliou a capacidade de reparação óssea a partir da criação de defeitos em tíbias de ovelhas. Apesar de a metodologia ser diferente da empregada no presente estudo, dentre os biomateriais testados, esteve o TCP-β e HA/TCP-β. Duas das concentrações utilizadas pelo autor (80/20 e 70/30) eram mais próximas às utilizadas neste estudo, que no caso aplicou-se uma proporção intermediária (HA 73,53% / TCP-β 26,47%).

Os resultados do presente estudo se relacionam com o do autor citado, onde em ambos, o TCP- β foi superior ao composto bifásico de HA/TCP- β . No entanto, o autor mostra que quando se invertem as proporções, utilizando maior proporção de TCP- β em relação à HA como, por exemplo, 20/80, este bifásico sim supera os resultados do TCP- β isolado.

Regalin (2014) também estudou a reparação óssea em tibia de ovelhas, utilizando metodologia semelhante ao de Dallabrida (2016). Avaliou a associação HA/TCP- β na proporção 60/40 e também TCP- β . Este último induziu a maior quantidade de neoformação de tecido ósseo aos 60 e 90 dias de evolução, porém o bifásico também induziu boa neoformação óssea, concordando com os resultados encontrados no presente estudo. A autora sugere que o bifásico pode ser considerado superior por apresentar velocidade de absorção do biomaterial intermediária em relação ao TCP- β isolado, fornecendo ainda uma sustentação adequada ao tecido neoformado. Entretanto, no presente estudo o bifásico apresentou maior atividade de células fagocitárias, demonstrando nesse caso, uma absorção provavelmente mais acelerada do que o TCP- β .

Segundo Regalin (2014), por ser um composto bifásico, a HA em associação com o TCP- β , apresenta solubilidade intermediária entre estes dois biomateriais isoladamente, ou seja, é menos solúvel que o TCP- β , mas solubiliza-se mais depressa do que a hidroxiapatita, o que é interessante para a aplicação prática. Durante o período estudado, de apenas 90 dias, todos os biomateriais apresentaram acentuada presença de biomaterial remanescente, porém, em um estudo mais longo, espera-se que essa quantidade seja reduzida. Para o bifásico, obteve-se maior quantidade de osteoclastos e células de limpeza no geral, do que para o TCP- β , o que demonstra que a atividade fagocitária foi maior para o bifásico.

Esperava-se que o compósito bifásico com sílica obtivesse um melhor resultado, por todas as características dos biovidros, de serem bioativos e ligarem-se diretamente ao osso pela sua reatividade química em fluidos fisiológicos, resultando na formação de uma camada de hidroxiapatita e melhor integração ao leito receptor (ALMEIDA et al., 2014; TIOMIS et al., 2010). Isto não ocorreu, pois a HA/SiO₂ 5% não apresentou incorporação ao leito receptor em onze dos quatorze animais, demonstrando ausência de osteointegração. Isso também ocorreu com apenas uma amostra do Bio-Oss®.

Levandowski (2014) testou o bifásico HA/SiO₂ em calvária de coelhos, também em um estudo guiado, e dentre todos os biomateriais testados, incluindo também o TCP- β , a sílica obteve o melhor resultado na avaliação histomorfométrica em relação à quantidade de tecido ósseo mineralizado aos 45 dias de evolução. Diferente do que foi encontrado no presente

estudo, onde a sílica apresentou o pior resultado. Deve-se levar em consideração a questão da alocação deste biomaterial na calvária, que pode ter sido desfavorecido.

5.1 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Os implantes aplicados na região mais rostral das calvárias não proporcionaram vedação total, como seria o ideal, devido ao fato de que a calvária dos animais era pequena em relação ao tamanho das guias. Permaneceu uma pequena abertura nas duas guias aplicadas próximas à órbita dos animais, podendo desfavorecer o crescimento ósseo pelos biomateriais alocados nessas posições (HA/SiO₂ 5% e Bio-Oss®). Como opção, poderia ter sido feita a randomização dos biomateriais ou a aplicação de somente duas guias em cada calvária.

Outra limitação foi a não realização de análise histomorfométrica, por questão financeira e de tempo do estudo, porém a partir desta técnica poderia ter sido aplicada estatística e não apenas análise qualitativa das amostras.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pela metodologia deste estudo, pode ser concluído que todos os biomateriais aplicados apresentam capacidade de osteoindução e osteocondução, mesmo que em graus variados.

O biomaterial Bio-Oss® apresentou menor capacidade de neoformação de tecido ósseo.

O TCP-β induziu a maior quantidade de neoformação óssea e apresentou maior velocidade de formação e maturação do tecido ósseo. Por esse motivo, dentre os biomateriais estudados, o TCP-β é o biomaterial mais indicado para substituição óssea.

O bifásico HA/TCP-β (73,53/26,27%) apresentou resultados próximos ao TCP-β, porém demonstrou maior atividade fagocitária, o que num período maior de avaliação, deveria apresentar maior velocidade de absorção do biomaterial.

Os resultados obtidos neste estudo para HA/SiO₂ 5% são insuficientes para afirmar que este biomaterial não tem capacidade de osteointegração, já que pela falta da vedação total da guia, outras linhagens celulares podem ter interferido em todo o processo. Sugerem-se novas pesquisas acerca deste biomaterial para melhor avaliação do mesmo.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, T. et al. Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Brazilian Oral Research**, v. 22, n. 1: p. 5-10, 2008.
- ALMEIDA, R. S. et al. Avaliação da fase inicial do reparo ósseo após implantação de biomateriais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 3, p. 331-336, 2014.
- AMARAL, M. B. **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada**. 2013. 110 f. Tese (Doutorado em Bioengenharia). Universidade de São Paulo, São Carlos.
- ANDRADE, A. L.; DOMINGUES, R. Z. Cerâmicas Bioativas - Estado da Arte. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 100-104, 2006.
- AYUB, L. G. et al. Regeneração óssea guiada e suas aplicações terapêuticas. **Brazilian Journal of Periodontology**, v. 21, n. 4, p. 24-31, 2011.
- BONAN, R. F. et al. Métodos de reforço microestrutural da hidroxiapatita. **Cerâmica**, v. 60, p. 402-410, 2014.
- BROWN, O. et al. Sintering of biphasic calcium phosphates. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 2271-2279, 2010.
- CAMARGO, N. H. A. et al. Synthesis and Characterization of Nanocomposite HA/ α -Al₂O₃ Sol-Gel Powders for Biomedical Applications. **Advances in Science and Technology** (Online), v. 87, p. 61-66, 2014.
- CARNEIRO, E. et al. Microscopic and radiographic analysis of the effect of particle size of demineralized bovine cancellous bone matrix on the repair of bone defects in femurs of rabbits. **Journal of Applied Oral Science**, v. 13, n. 2, p. 157- 162, 2005.
- COLOMBO, B. B. **Análise de três formulações de biocimentos aplicados através de guias de crescimento na calvária de coelhos**. 2016. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2016.
- COUTO, S. E. R. Criação e manejo de coelhos. In: ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.

DACULSI, G. Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute. **Biomaterials**, v. 19, n. 16, p. 1473-1478, 1998.

DALLABRIDA, A. L. Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais microestruturados em ovinos. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2016.

DE LIMA, S. A. S. et al. Reparo ósseo utilizando enxerto de matriz orgânica de osso cortical e medular de origem bovina associados ao Plasma Rico em Plaquetas (PRP). **Horizonte Científico**, v. 7, p. 1-29, 2013.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). In: **Microscopia Eletrônica de Varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Edipucrs, Porto Alegre, cap. 1, p. 9-26, 2007.

DIAMANTINO, A. G. ; NICOLAU, R. A. . **Raio-x, EDX e MEV como métodos de avaliação do processo de reparação do tecido ósseo: revisão de literatura.** In: Encontro Latino Americano de Pós-Graduação, 2009, Universidade do Vale do Paraíba, INIC / EPG 2009.

DINATO, J. C.; NUNES, L. S. S.; SMIDT, R. Técnicas cirúrgicas para regeneração óssea viabilizando a instalação de implantes. In: SABA-CHUFJI, E.; PEREIRA, S. A. S. (Org.). **CIPE - Periodontologia: Integração e resultados**. São Paulo: Artes Médicas, 2007. p.183-226.

DZIEDZIC, D. S. M.; BERTOJA, I. C.; ZIELAK, J. C. Initial endosseous healing response to lactide/glycoide copolymer. **Revista Sul-brasileira de Odontologia**, v. 6, n. 2, p. 176-184, 2009.

EL HADDAD, E. et al. Guided bone regeneration is a reliable technique in implant dentistry: An overview and a case report. **Open Access Dentistry**, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2014.

ELGALI, I. et al. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events. **Acta Biomaterialia**, v. 29, p. 409-23, 2016.

EZIRGANLI, Ş. et al. Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. **Clinical Oral Implants Research**, v. 24, n. 3, p. 312-319, 2013.

FARZAD, M.; MOHAMMADI, M. Guided bone regeneration: A literature review. **Journal of Oral Health and Oral Epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 3-18, 2012.

FERREIRA, J. R. M. et al. Enxertos ósseos xenógenos utilizados na implantodontia oral. **Revista Implantnews**, v. 4, n. 3, p. 303-306, 2007.

GERSTENFELD, L. C. et al. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873-884, 2003.

GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H. Fosfatos de Cálcio de Interesse Biológico: Importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010.

GUTWALD, R. et al. Mesenchymal Stem Cells And Inorganic Bovine Bone Mineral In Sinus Augmentation: Comparison With Augmentation By Autologous Bone In Adult Sheep. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 48, n. 4, p. 285-290, 2010.

HENCH, L. L. Genetic design of bioactive glass. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 29, p. 1257-1265, 2009.

HONG, Y. et al. Fabrication, biological effects, and medical applications of calcium phosphates nanoceramics. **Materials Science and Engineering R**. v. 70, n. 3-6, p. 225-242, 2010.

HUANG, M. S. et al. *In vivo* evaluation of poorly crystalline hydroxyapatite-based biphasic calcium phosphate bone substitutes for treating dental bony defects. **Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 100-108, 2010.

JENSEN, S. S. et al. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and b-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. **Clinical Oral Implants Research**, v. 17, p. 237–243, 2006.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: _____. Histologia básica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10.ed, cap. 8 p.136-148, 2004.

KAMITAKAHARA, M.; OHTSUKI, C.; MIYASAKI, T. Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterials Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 23, n. 3, p. 197-212, 2008.

KAWACHI, E. et al. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 518-522, 2000.

KOGA, N. et al. Thermodynamics of non-bridging oxygen in silica bio-compatible glass-ceramics - Mimetic material for the bone tissue substitution. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 71, p. 927–937, 2003.

LEVANDOWSKI-JR, N. **Análise Comparativa de Diferentes Substitutos Ósseos Sintéticos Microporosos em Calvária de Coelhos**, 2014. 154 p. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais – Área: Cerâmicas e Biomateriais) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Joinville, 2014.

LEVANDOWSKI-JR, N. **Biocerâmicas nanoestruturadas para aumento ósseo guiado: um estudo comparativo in vivo**. 2009. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Santo Amaro, 2009.

MACEDO, A. et al. Bone graft in skull: basic principles for osteointegration. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.4, p.617-23, 2010.

LIU, J.; KERNS, D. G. Mechanisms of Guided Bone Regeneration: A Review. **The Open Dentistry Journal**, v.8, p.56-65, 2014.

MELLONIG, J. T. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment periodontal osseous defects. **The International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry**, v.20, n.1, p.19-29, 2000.

MOORE, W.R.; GRAVES, S.E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ Journal of Surgery**, v.71, n.6, p.354-361, 2001.

MOREJÓN-ALONSO, L. et al. In situ Synchrotron X-ray Powder Diffraction Study of the Early Hydration of α -tricalcium Phosphate/tricalcium Silicate Composite Bone Cement. **Materials Research**. v.18, n.1, p.164-169, 2015.

OLIVEIRA, G.A.G. Avaliação comparativa do potencial osteocondutor de quatro diferentes substitutos ósseos em defeitos críticos em calvárias de coelhos. 2016. 78f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, São Paulo, 2016.

PAKNEJAD, M. et al. Histologic Evaluation of Bone Healing Capacity Following Application of Inorganic Bovine Bone and a New Allograft Material in Rabbit Calvaria. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 31-38, 2015.

PINTO, J. G. S. et al. Autogenous bone graft x biomaterials in the treatment of facial fractures and deformities – a review of current concepts. **Revista da Faculdade de Odontologia - UPF**, v. 12, n. 3, p.79-84, 2007.

PRIPATNANONT, P.; NUNTANARANONT, T.; VONGVATCHARANON, S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 38, p. 356–362, 2009.

REGALIN, B. D. C. **Neoformação óssea e osteointegração de biomateriais micro e nanoestruturados em ovinos**. 2014. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2014.

RIGO, E. C. S. et al. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método de precipitação. **Revista Dental Press de Periodontia e Implantologia**, v. 1, n. 3, p. 39-50, 2007.

RODRIGUES, P. L. et al. Effect of alumina addition on the physical and mechanical properties of β -tricalcium phosphate. **Cerâmica**, v. 58, p. 368-373, 2012.

RODRIGUES, L. B. Biomaterials applications in orthopaedics. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 9, n. 2, p. 63-76, 2013.

SANTOS, C. F. L. et al. Design and production of sintered β -tricalcium phosphate 3D scaffolds for bone tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 5, p. 1293-1298, 2012.

SOUZA, C. D. S. **Estudo histomorfometrico da reparação óssea em ratos após o uso de biomaterial de origem sintética (hidroxiapatita + β -tricalcifofosfato)**. 2010. 88 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SU-GWAN, K., HAK-KYUN, K., SUNG-CHUL, L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss®) for bone regeneration in rats. **Journal of Cranio-maxillofacial Surgery**, v. 29, n. 1, p. 282-288, 2001.

TAMIMI, F. M. et al. Bone augmentation in in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 33, p. 922–928, 2006.

TEIXEIRA, L. J. C. **Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos.** 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias - Rio de Janeiro.

TIOMIS, A. C. et al. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.1, p. 80-85, 2010.

VALIATI, R. **Análise do efeito da laserterapia na incorporação de aloenxertos ósseos em blocos processados por congelamento profundo - estudo em coelhos.** 2011. 124 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

WILLIANS, D. F.; Definitions in Biomaterials. **Journal of Polymer Science Part C: Polymer Letters**. v. 26, n. 9, p. 381-416, 1987.

WILSON, T. Effects of silica based materials on bone marrow derived cells – Material aspects of bone regeneration. Department of medical biochemistry and genetics, university of turku, and Turku Clinical Biomaterials Center, Turku, Finland. **Annales Universitatis Turkuensis**, Ser. D, Medica-Odontologica, 2011.

WHITEFIELD, J. F.; ROSENBERG, L. BMUS - The microcrack fixers. In: WHITEFIELD, J. F. **Growing Bone**. 2. ed. Austin: Landes Bioscience, 2007. cap.2. p.3-41.

WITHERS, W. E. L. **Análise crítica do uso de enxertos em situações de elevação do assoalho do seio maxilar.** 2010. 62 f. Monografia (Especialização em Implantodontia) - Instituto Latino Americano de Pesquisa e Ensino Odontológico, Curitiba.