

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**EDUARDO QUINTÃO MANHANINI SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA HAP-91® E VIDRO BIOATIVO NO REPARO  
DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATOS.**

**Alfenas/MG**

**2017**

**EDUARDO QUINTÃO MANHANINI SOUZA**

**AVALIAÇÃO DA HIDROXIAPATITA HAP-91® E VIDRO BIOATIVO NO REPARO  
DE DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS EM CALVÁRIAS DE RATOS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG.  
Orientador: Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes.

**Alfenas/MG**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Souza, Eduardo Quintão Manhanini.

Avaliação da hidroxiapatita HAP-91® e vidro bioativo no reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos / Eduardo Quintão Manhanini Souza. -- Alfenas/MG, 2017.  
69 f.

Orientador: Leandro Araújo Fernandes.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2017.  
Bibliografia.

1. Hidroxiapatitas. 2. Ratos. 3. Regeneração Óssea. 4. Vidro.  
I. Fernandes, Leandro Araújo. II. Título.

CDD-617.605



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG  
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Alfenas/MG . CEP 37130-000



EDUARDO QUINTÃO MANHANINI SOUZA

**“Avaliação da hidroxiapatita HAP-91® e vidro bioativo no reparo de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Odontologia.

Aprovado em: 18/05/17

Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: Leandro Araújo Fernandes

Prof. Dr. Noé Vital Ribeiro Júnior  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: Noé Vital Ribeiro Júnior

Prof. Dr. Luís Otávio de Miranda Cota  
Instituição: UFMG

Assinatura: Luís Otávio de Miranda Cota

Dedico a Deus e a minha família.

Meus pais José de Assis e Souza,

Maria Helena Quintão Manhanini Souza,

e ao meu irmão José de Assis e Souza Júnior.

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Alfenas**, em especial à **Faculdade de Odontologia** da Unifal-MG, pela oportunidade acadêmica, a todos os **Mestres**, os quais tenho profundo respeito pelos ensinamentos durante o curso de graduação e agora pelo mestrado. **Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação** por contribuírem ainda mais para minha formação, e a todos os funcionários;

Aos professores **Leandro Araújo Fernandes, Noé Vital Ribeiro Júnior, Carlos Eduardo Gomes do Couto Filho, Victor Humberto Orbegoso Flores e André Gustavo Paleari**, pelas oportunidades e confiança em mim depositada durante esse período, pelos ensinamentos, e principalmente pela amizade de cada um.

Ao Professor **Dr. Leandro Araújo Fernandes** em especial, meu orientador, o qual não mediu esforços para a realização deste trabalho, pela dedicação, por ser um exemplo profissional e humano, e pelos conhecimentos compartilhados. Que Deus abençoe sempre você e a sua família. Obrigado.

Ao professor **Alberico Alencar Vilela Azevedo** por todos os ensinamentos e pela ajuda com o trabalho, a **Sheyla M. C. Máximo Bicalho** e a empresa **JHS Biomateriais**, por gentilmente cederem os materiais de enxerto ósseo para a pesquisa;

A secretária do curso de Odontologia, **Neuza Aparecida Vieira**, pelas conversas, ajudas e amizade;

Aos funcionários da Clínica Integrada I e Cirurgia, **Luzia, Ermelinda, Ana Paula, Val e Dayana**;

Aos **Funcionários do Biotério da Unifal**, pelo suporte na realização da parte cirúrgica da pesquisa e aos **animais** que perderam suas vidas para que este estudo se concretizasse;

A professora **Manuella Carvalho da Costa**, e aos técnicos do laboratório de histologia **Andréa** e **Fernando**, por tornarem possível a realização da parte histológica deste trabalho. A funcionária do laboratório de histologia **Marta**;

A **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Júlio Mesquita Filho (UNESP)** agradeço pelo apoio nas marcações imunoistoquímicas do trabalho, em especial na pessoa do professor **Edilson Ervolino** pela oportunidade, e a toda a sua equipe;

A **Capes** pela concessão da Bolsa de Estudos;

A aluna de graduação **Aline Klaus**, a Mestre **Bianca Espósito**, por toda a ajuda na realização deste trabalho, pela parceria formada, pelo sacrifício em comunhão.

Aos **Amigos discentes da pós-graduação** que compartilharam tanto aprendizado e sonhos comigo.

Aos meus pais **José de Assis e Souza** e **Maria Helena Quintão Manhanini Souza**, os quais eu não só dedico este trabalho, mas também agradeço por todo o apoio incondicional que me deram durante esta etapa, e toda a vida, por me criarem ensinando os maiores valores, por serem meus maiores mestres e exemplos de vida. Cada conquista minha é de vocês também.

**Obrigado a todos** que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

**Muito Obrigado.**

## RESUMO

Materiais sintéticos, como as biocerâmicas a base de fosfato e cálcio possuem uma composição semelhante ao tecido ósseo, e são cada vez mais utilizados no reparo de defeitos ósseos na região craniomaxilofacial. Entender o comportamento desses materiais é de extrema importância para a sua correta indicação e sucesso clínico. Desta forma o objetivo deste estudo foi avaliar a Hidroxiapatita HAP-91® e o Vidro Bioativo como substitutos ósseos em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Para isto, sessenta ratos foram divididos em três grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais: Grupo Controle (C) – realização de um defeito ósseo na calvária dos animais que foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo; Grupo Hidroxiapatita (HA) – defeito preenchido com Hidroxiapatita (HAP-91®) e Grupo Vidro Bioativo (VB) – defeito preenchido com o Vidro Bioativo. Os animais foram eutanasiados aos 30 e 60 dias pós-operatórios para análise histomorfométrica e imunoistoquímica. Na análise inter-grupos, os resultados mostraram que o Grupo C apresentou uma maior área de neoformação óssea (ANO) comparado ao Grupo HA e VB. Além disso, o Grupo HA apresentou uma maior ANO comparado ao Grupo VB aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ). Em nossos resultados imunoistoquímicos o Grupo C não apresentou expressão de Osteocalcina (OC) aos 30 dias, enquanto que os Grupos HA e VB apresentaram altas e moderadas expressões de OC respectivamente. O Grupo HA apresentou um maior número de células TRAP positivas comparado ao Grupo C e ao Grupo VB aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ). Dentro dos limites deste estudo podemos concluir que tanto a Hidroxiapatita (HAP-91®) quanto o Vidro Bioativo guiaram a formação de um novo tecido ósseo, servindo de arcabouço para a manutenção espacial de defeitos ósseos de tamanho crítico na calota craniana de ratos.

Palavras chave: Hidroxiapatita. Ratos. Regeneração óssea. Vidro.

## ABSTRACT

Synthetic materials, such as bioceramics based on phosphate and calcium, have a composition similar to bone tissue, and are increasingly used in the repair of bone defects in the craniomaxillofacial region. Understanding the behavior of these materials is extremely important for their correct indication and clinical success. Thus the objective of this study was to evaluate HAP-91® Hydroxyapatite and Bioactive Glass as bone substitutes in critical-sized defects in rat calvaria. For this, sixty rats were divided into three groups according to the following local treatments: Control Group (C) - accomplishment of a bone defect in calvaria of the animals that was filled only with blood clot; Hydroxyapatite Group (HA) - defect filled with Hydroxyapatite (HAP-91®) and Bioactive Glass Group (VB) - defect filled with Bioactive Glass. The animals were euthanized at 30 and 60 postoperative days for histomorphometric and immunohistochemical analysis. In the intergroup analysis, the results showed that Group C presented a greater area of bone neoformation (ANO) compared to Group HA and VB. In addition, the HA Group presented a higher ANO compared to Group VB at 30 and 60 days post- ( $P < 0.05$ ). In our immunohistochemical results, Group C showed no expression of Osteocalcin (OC) at 30 days, while HA and BV Groups presented high and moderate expressions of OC respectively. The HA group presented a higher number of TRAP positive cells compared to Group C and Group VB at 30 and 60 postoperative days ( $p < 0.05$ ). Within the limits of this study we can conclude that both Hydroxyapatite (HAP-91®) and Bioactive Glass guided the formation of a new bone tissue, serving as a scaffold for the spatial maintenance of critical-sized bone defects in the calvaria of rats

Key words: Hydroxyapatite. Mice. Bone regeneration. Glass.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Implantes feitos de conchas do mar em mandíbula humana, datados de 600 a.C.....	15
Figura 2 -	Mesa Clínica.....	30
Figura 3 -	Anestesia Geral.....	30
Figura 4 -	Tricotomia.....	30
Figura 5 -	Assepsia pré-operatória.....	30
Figura 6 -	Incisão semilunar.....	31
Figura 7 -	Retalho de Espessura Total.....	31
Figura 8 -	Remoção do tecido ósseo.....	32
Figura 9 -	Marcações de amálgama.....	32
Figura 10 -	Defeito preenchido com Hidroxiapatita (HAP-91®).....	33
Figura 11 -	Defeito preenchido com Vidro Bioativo.....	33
Figura 12 -	Transfixação da agulha.....	33
Figura 13 -	Sutura finalizada.....	33
Figura 14 -	“Ilhotas” de tecido ósseo sendo formado no meio do defeito ósseo aos 60 dias, Grupo HA. Aumento 400x.....	40
Figura 15 -	Características das partículas dos biomateriais HA e VB. a) Grupo HA- 30 dias; b) Grupo HA- 60 dias; c) Grupo VB- 30 dias d) Grupo VB- 60 dias. Aumento de 100x. Picrosirius.....	40
Figura 16 -	Formação de tecido ósseo em meio às partículas de Vidro Bioativo aos 60 dias, Grupo VB. Aumento de 400x.....	41
Figura 17 -	Imagem histológica da calota de um animal do Grupo C. Período de 30 dias. Aumento 50x.....	43
Figura 18 -	Imagem histológica da calota de um animal do Grupo HA. Período de 30 dias. Aumento 50x.....	43
Figura 19 -	Imagem histológica da calota de um animal do Grupo VB. Período de 30 dias. Aumento 50x.....	43
Figura 20 -	Imagem histológica da calota de um animal do Grupo C. Período de 60 dias. Aumento 50x.....	44

Figura 21 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo HA. Período de 60 dias. Aumento 50x.....	44
Figura 22 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo VB. Período de 60 dias. Aumento 50x.....	44
Figura 23 - Marcações para OC, Grupo HA, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	46
Figura 24 - Marcações para OC, Grupo VB, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	46
Figura 25 - Marcações para OC, Grupo HA, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	46
Figura 26 - Marcações para OC, Grupo VB, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	46
Figura 27 - Marcação para TRAP, Grupo C, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	48
Figura 28 - Marcação para TRAP, Grupo C, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	48
Figura 29 - Marcação para TRAP, Grupo HA, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	48
Figura 30 - Marcação para TRAP, Grupo HA, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	48
Figura 31 - Marcação para TRAP, Grupo VB, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	49
Figura 32 - Marcações para TRAP, Grupo VB, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Razões de recusa dos pacientes para os diferentes tipos de enxertos ósseos.....	22
Tabela 2 -	Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da AONA ( $\text{mm}^2$ ) de acordo com cada grupo e período.....	42
Tabela 3 -	Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da AHA e AVB ( $\text{mm}^2$ ) de acordo com cada grupo e período.....	45
Tabela 4 -	Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da expressão de TRAP (unidades) de acordo com cada grupo e período.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>a.C.</b>	-Antes de Cristo
<b>b-TCP</b>	-b- Tricálcio Fosfato
<b>DO</b>	-Defeito ósseo
<b>C</b>	-Celsius
<b>Ca</b>	-Cálcio
<b>CEUA</b>	-Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>Cm</b>	-Centímetros
<b>DP</b>	-Desvio padrão
<b>dpi</b>	-Pixels por polegada
<b>g</b>	-Gramas
<b>Grupo C</b>	-Grupo controle
<b>Grupo HA</b>	-Grupo Hidroxiapatita
<b>Grupo VB</b>	-Grupo Vidro Bioativo
<b>HA</b>	-Hidroxiapatita
<b>Kg</b>	-Quilogramas
<b>Kvp</b>	-Quilovoltagem
<b>M</b>	-Média
<b>mA</b>	-Miliamperagem
<b>mg</b>	-Miligramas
<b>mm</b>	-Milímetros
<b>mm<sup>2</sup></b>	-Milímetros quadrados
<b>ml</b>	-Mililitros
<b>OC</b>	-Osteocalcina
<b>P</b>	-Fósforo
<b>TRAP</b>	-Fosfatase Ácida Tartarato Resistente
<b>TCP</b>	-Tricálcio Fosfato
<b>Mm</b>	-Micrometros

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
2.1	ENXERTOS ÓSSEOS.....	19
2.2	SUBSTITUTOS ÓSSEOS SINTÉTICOS.....	22
2.2.1	Hidroxiapatita.....	24
2.2.2	Vidro Bioativo.....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
4.1	PERÍODO PRÉ-OPERATÓRIO.....	29
4.2	PERÍODO TRANS-OPERATÓRIO.....	30
4.3	PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	34
4.4	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	35
4.4.1	Histométrica.....	35
4.5	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	36
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	39
5.1	HISTOMÉTRICOS.....	42
5.1.1	Área de Neoformação Óssea (ANO).....	42
5.1.2	Área de Hidroxiapatita (AHA) E Área de Vidro Bioativo (AVB).....	45
5.2	IMUNOISTOQUÍMICOS.....	45
5.2.1	Osteocalcina (OC).....	45
5.2.2	Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP).....	47
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	54
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
	<b>ANEXOS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

A medicina regenerativa é uma área do conhecimento médico que cria tecidos funcionais para reparar e substituir tecidos e órgãos danificados ou com defeito (JIMI, 2012). Os Biomateriais são amplamente utilizados nessa área médica, na odontologia e biotecnologia. Os fundamentos dessa base de pesquisa foram estabelecidos por estudos realizados em sua grande parte entre os anos de 1920 a 1980 e a cerca de 60 anos atrás a palavra “biomaterial” não era utilizada como a conhecemos hoje (RATNER et al., 2013).

Muitas definições foram propostas para o termo "biomaterial". Uma definição sugerida por Williams (1986) e aprovada por um consenso de especialistas na área é: um biomaterial é um material não vivo utilizado na medicina com o propósito de interagir com um sistema biológico vivo. A definição de "biocompatibilidade" foi considerada complementar e essencial para seu entendimento, sendo: Biocompatibilidade a capacidade de um material desenvolver a sua função específica com uma resposta apropriada do tecido do hospedeiro (RATNER et al., 2004).

Turrer et al. (2008) define o termo biomaterial como um material de origem biológica ou sintética utilizado para confecção de implantes, aparelhos ou sistemas que entrarão em contato com sistemas biológicos e tecidos vivos com objetivo de reparar perdas teciduais e restaurar funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismos.

A adaptação do homem a materiais não biológicos vem sendo presenciada ao longo de sua história, restos de um humano descoberto em Kennewick, Washington, EUA, com cerca de 9000 anos de idade foi encontrado com uma ponta de lança incorporada em seu quadril, aparentemente ele tinha se curado do ferimento e a lança não atrapalhava de forma significativa suas atividades. Esse implante não intencional ilustra a capacidade do corpo humano de lidar com materiais estranhos implantados (RATNER et al., 2013).

Outro exemplo da interação de materiais sintéticos com o corpo humano seria de uma mandíbula datada a cerca de 600 anos a.C., que foi encontrada em Honduras. Ela mostra três incisivos esculpidos feitos de conchas do mar implantadas no osso alveolar. A formação de cálculo, nos leva a acreditar que esses implantes tiveram uma substituição fixa, funcional e estética dos dentes, e que não foi realizada em uma cerimônia de sepultamento (MISCH et al., 2009) (FIGURA 1).

Figura 1- Implantes feitos de conchas do mar em mandíbula humana, datada de 600 anos a.C.



Fonte: Misch et al., 2009.

Atualmente existe uma enorme diversidade de biomateriais no mercado, que se diferem pelo material utilizado na sua fabricação, modo de aplicação e tempo de permanência com os tecidos. Esses materiais são usados na prática médica desde implantes dentários ou de articulações, parafusos ortopédicos, válvulas cardíacas, lentes de contato ocular, aparelhos intrauterinos, fios de sutura e enchimentos para cirurgia plástica entre inúmeros outros (DANTAS et al., 2011).

Dentre as diversas aplicabilidades na odontologia, o desenvolvimento desses materiais se justifica principalmente quando se trata de defeitos ósseos (AMARAL, 2006). Comumente o cirurgião-dentista se depara com rebordos

reabsorvidos, os quais requerem uma reconstrução prévia à reabilitação. Situações como a reabsorção fisiológica do rebordo alveolar por falta de estímulo fisiológico, exodontias traumáticas, fraturas radiculares, infecções periodontais e endodônticas, parafunção, apicectomia, cistos, tumores e traumas bucomaxilofaciais podem agravar ainda mais essa condição (ANDRÉ, 2011).

O reparo de defeitos ósseos extensos na região craniomaxilofacial, provocados por trauma ou patologias, constitui um grande problema para cirurgiões dessa área, uma vez que, mesmo com a alta capacidade de regeneração do tecido ósseo, esse tipo de defeito não regenera por si só (MARTINS, 2010).

Os tratamentos tradicionais para aumento de tecido ósseo incluem materiais autógenos e homólogos/alógeno (AL RUHAIMI, 2001). Sendo os enxertos alógenos e xenógenos os mais utilizados hoje em dia para a reconstrução de rebordos alveolares reabsorvidos (LI, et al., 2015). O osso autógeno apresenta-se como uma excelente alternativa biológica pelas suas propriedades osteocondutora, osteoindutora e osteogênica. Entretanto, a necessidade de uma área doadora, limitada quantidade de tecido ósseo, custo elevado e um procedimento cirúrgico adicional representam fatores que podem limitar sua utilização (CHAN et al., 2002; CRUZ, 2006 ; KAUFMANN et al., 2000).

O enxerto alógeno fresco congelado, oriundo de banco de tecidos humanos, seria uma alternativa ao autógeno, porém, muita controvérsia há em relação à possibilidade de transmissão de doenças e reações imunogênicas, e muitos pacientes não aceitam a idéia de ter um tecido transplantado oriundo de cadáveres (JIANG, 2012).

Para que as limitações da remoção dos enxertos autógenos sejam superadas, os cirurgiões podem lançar mão da utilização de biomateriais de origem sintética que possibilitam, em muitos casos, a diminuição ou a eliminação do uso de materiais de origem biológica (BOOS, 2013). A produção controlada de materiais sintéticos com características físico-químicas selecionadas, em comparação com a utilização de enxertos autógenos, elimina a necessidade de um segundo local da cirurgia, reduzindo assim o tempo cirúrgico e morbidade.

Ele também aumenta a segurança do paciente, eliminando a possibilidade de transmissão de doenças (COSTA, 2009).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o comportamento de dois biomateriais de origem sintética, a Hidroxiapatita HAP-91® e o Vidro Bioativo, como substitutos ósseos em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

O esqueleto humano é composto por aproximadamente 200 ossos. O tecido ósseo mantém a postura corporal e participa de sua movimentação, trabalhando em cooperação com os músculos. Possui um papel importante no metabolismo do cálcio, e apesar de sua estrutura dura, apresenta-se em constante remodelação (JIMI, 2012). Em um indivíduo adulto esse tecido consiste em cerca de 80% de osso cortical ou compacto, e 20% de osso esponjoso ou trabecular. O osso compacto é praticamente sólido, apresentando 10% de porosidade, enquanto o osso esponjoso apresenta uma porosidade que varia de 50% a 90% da sua totalidade (SIKAVITAS, et al., 2001).

Ossos maduros, sejam compactos ou trabeculares, são histologicamente idênticos, por serem constituídos de lamelas microscópicas, podendo ser estas circunferenciais, concêntricas e intersticiais. As lamelas concêntricas formam a unidade metabólica básica do osso, o *ósteon*, também conhecido como sistema harversiano, o qual no seu centro passa o *Canal de Harvers*, conectados entre si pelos *Canais de Volkman*, esse sistema é responsável pela vascularização óssea (TEN CATE, 2008).

Tanto o osso cortical quanto o osso medular sofrem uma remodelação constante. A reabsorção do osso está sempre associada com a ação dos Osteoclastos, que na sua fase ativa se aderem à superfície óssea e produzem lacunas chamadas *Lacunas de Howship*. Após um curto período os osteoblastos começam a depositar novo osso, e finalmente uma unidade óssea multinuclear é formada. Os osteócitos ficam aprisionados em lacunas dentro do osso maduro, e se comunicam através de canalículos, prolongando seus citoplasmas e mantendo contato entre si, esse sistema lacuna-canalículos é essencial para o metabolismo da célula, difundindo nutrientes e eliminando produtos tóxicos (LINDHE et al., 2010).

Mesmo com a constante remodelação óssea, defeitos considerados críticos não conseguem ser reparados por esse mecanismo. Eles podem ser considerados críticos em relação ao segmento esquelético envolvido e a extensão da perda de massa óssea: 3 cm para o antebraço, 5 cm para o fêmur e tibia e 6 cm no úmero. Para além das técnicas habitualmente conhecidas para a correção deste tipo de defeito, como a artrodese, distração osteogênica e enxertos autógenos, a engenharia de tecidos e a medicina regenerativa usando novas biotecnologias podem ser muito úteis (CALORI et al.,2011).

O osso precisa de estímulo para manter sua densidade e forma original, a largura óssea chega a diminuir cerca de 25% durante o primeiro ano da perda dental. A perda óssea não se restringe ao osso alveolar, mas porções do osso basal também podem ser reabsorvidas, principalmente na parte posterior da mandíbula, chegando a mais de 80% de perda de volume (MISCH, et al., 2009). A rápida perda do osso alveolar ocorre devido a falta de estimulação intra-óssea nas fibras do ligamento periodontal (KUMAR et al., 2013).

Os enxertos ósseos são uma opção terapêutica para corrigir relações intermaxilares anormais, e atingir volume ósseo e morfologia adequada. Eles funcionam como um arcabouço, servindo de reservatório mineral, promovendo cicatrização das feridas e permitindo a formação de um novo osso (SAIMA et al., 2016).

## 2.1 ENXERTOS ÓSSEOS.

Os tipos de enxertos ósseos mais frequentemente utilizados em odontologia são os autógenos, alógenos, xenógenos e aloplásticos (FERNÁNDEZ et al., 2016). Essa classificação se baseia na origem do material, podendo o mesmo ser obtido e empregado no mesmo indivíduo (Autógeno); obtido de indivíduos da mesma espécie, porém geneticamente distintos (Alógeno); obtido e

empregado em espécies diferentes (Xenógeno); e obtidos de forma sintética e biocompatível (Aloplástico) (ANDRÉ, 2011).

O osso autógeno ainda é considerado o padrão ouro para a correção cirúrgica de deformidades craniofaciais e cirurgia reconstrutiva (GAO et al., 2016; GLOWACKI e; MULLIKEN, 1985; JONES, L. et al., 2007; LENZ et al., 2003; MERKX et al., 1999; STRECKBEIN et al., 2013). Ele fornece uma biologia ideal, devido a suas características únicas de osteogênese, osteocondução e osteoindução, podendo ter áreas doadoras intraorais como o corpo e o ramo da mandíbula, mento, tuberosidade maxilar, exostoses ósseas e regiões edêntulas, e extraoralmente da crista ilíaca e da calota craniana (OTONNI, 2011). Porém o enxerto autógeno apresenta desvantagens relacionadas à morbidade do sítio doador, como dor, hematoma, infecção, fratura cirúrgica e disponibilidade limitada (AHMET et al., 201; CHAN et al., 2002; CRUZ, 2006).

Materiais osteogênicos têm a capacidade de estimular o crescimento ósseo através da presença de células, geralmente células tronco mesenquimais osteoprogenitoras. Osteocondução é a capacidade do material de formar um "arcabouço" para o crescimento ósseo, uma superfície onde as células podem se anexar e proliferar, principalmente de colágeno do tipo I. A osteoindução, segundo Marshal Urist (1965), um dos primeiros a descrever este como, um processo que suporta a mitose de células mesenquimais indiferenciadas perivasculares, levando à formação de células osteoprogenitoras com a capacidade de formar novo osso (BLOKHUIS e; ARTS, 2011).

O osso alógeno, ou homólogo é colhido de doadores de órgãos, podendo ser classificado dependendo do processamento realizado para que possa ser utilizado. O osso colhido pode ser apenas congelado, mantendo sua resistência mecânica, ou ainda pode sofrer maior processamento como a desidratação e a desmineralização, o que acaba tornando-o mais friável e menos resistentes à manipulação durante o procedimento cirúrgico (HAYASHI, et al., 2011).

O enxerto homólogo, oriundo de banco de tecidos humanos, seria uma alternativa ao autógeno, porém muita controvérsia há em relação à possibilidade de transmissão de doenças e reações imunogênicas (JIANG,

2012). Rondinelli et al (1994) aponta como desvantagem deste tipo de enxerto o risco de transmissão de doenças através do bloco ou do osso particulado, a possibilidade de reações imunológicas provocadas pelo enxerto, o risco de infecção cruzada e a maior absorção do osso enxertado.

Uma terceira opção seria os enxertos de origem animal, dentre eles, os materiais de origem bovina são frequentemente utilizados para enxertia em procedimentos cirúrgicos orais. Esses materiais consistem num esqueleto de hidroxiapatita altamente poroso, similar ao osso cortical. Seus componentes orgânicos são retirados quimicamente ou por calor lento (CORREIA et al., 2012). Existe uma variedade de métodos para a extração do produto final a partir do osso bruto. Em um processamento típico o osso cru é limpo de gorduras e outros restos em um processo primariamente não químico a base de água, vapor e pressão. Em seguida uma exposição à alta temperatura por longos períodos de tempo é realizada para eliminação da matéria orgânica, em uma média de 600° C por 6 horas. A estrutura cristalina e a fase química são então confirmadas e caracterizadas por difração de raios-X, e o processo é confirmado por testes à base de nitrogênio e carbono (SOGAL e; TOF, 1999).

Desterro et al. (2014) avaliou as características físico-químicas de três enxertos de origem bovina no mercado, o Bio-Oss®, GenoxInorgânico® e Bonefill®. O Bio-Oss® após seu processamento mostrou ser o único material que manteve a morfologia óssea original, mostrando que sua manufatura não alterou algumas propriedades físico-químicas, como o tamanho dos cristais de hidroxiapatita de 15µm. O GenoxInorgânico® apresentou cristais de 39 µm e uma área de contato de superfície menor. O Bonefill® apresentou uma baixa cristalinidade, e marcação para Nitrogênio, o que demonstra uma possível presença de proteínas dentro de suas camadas superficiais.

Em um estudo avaliando a preferência de pacientes em relação à origem do material a ser enxertado, Fernádes et al. (2016) relatou que o maior índice de recusas ao tratamento foi para os enxertos alógenos e xenógenos. As razões mais relevantes para a recusa desses materiais pelo paciente foi o medo da possível transmissão de doenças e infecções, e motivos socioculturais, como a

não aceitação de materiais de origem animal ou de outros seres humanos para benefício próprio (TABELA 1).

Tabela 1- Razões de recusa dos pacientes para os diferentes tipos de enxertos ósseos.

<b>Tipos de Enxerto</b>	<b>Medo de possível transmissão de doença ou infecção</b>	<b>Dor, desconforto ou medo de intervir em outra parte do corpo</b>	<b>É errado usar animais para o benefício humano</b>	<b>É errado usar material ósseo de outro ser humano</b>	<b>Razões religiosas</b>	<b>Simples preferência</b>	<b>Prefere materiais naturais</b>
<b>Aloplástico</b>	1%	-	-	-	2%	2%	4%
<b>Autógeno, sítio doador intraoral</b>	-	4%	-	-	1%	1%	-
<b>Autógeno, sítio doador extraoral</b>	-	11%	-	-	1%	-	-
<b>Xenógeno</b>	16%	-	12%	-	2%	1%	-
<b>Alógeno</b>	15%	-	-	17%	1%	3%	-

Fonte: Adaptado de Fernádes et al., 2016.

## 2.2 SUBSTITUTOS ÓSSEOS SINTÉTICOS

Vários materiais diferentes são clinicamente empregados na prática odontológica tanto para reabilitação funcional quanto estética (COSTA, 2009). Dentre estes materiais, os sintéticos, vêm ganhando mais aceitação, já que são substâncias que podem ser fabricadas em quantidade ilimitada, são imunologicamente inertes e bem tolerados pelo organismo (CARLO, 2007; HATTAR et al., 2005).

O grupo de biomateriais sintéticos que mais se assemelham a composição do osso é o das biocerâmicas de fosfato de cálcio (LEGEIROS, 2002). A principal vantagem do enxerto à base de Fosfato de Cálcio é que os íons nele presente não interferem na função celular fisiológica do organismo (SALGADO, et al., 2011). Os fosfatos de cálcio são altamente biocompatíveis e, além disso, agem como arcabouço, osteocondutores, após a implantação no osso. Quando colocado numa configuração estável, adjacente ao osso, uma matriz osteóide é formada diretamente sobre a superfície do Fosfato de Cálcio, sem tecidos moles interpostos (LARSSON, 2010).

Bioativos sintéticos e materiais bioabsorvíveis são regularmente usados para a reconstrução do tecido ósseo. Entre eles, a hidroxiapatita (HA), o tricálcico fosfato (TCP) e os vidros bioativos são considerados os substitutos ósseos mais promissores (ABIRAMAN, 2002; DOROZHKKIN, 2002; HENCH, 1991; JOHN, 2009; LEGEROS, 2003;).

Os sais minerais sintéticos, como a HA e b-TCP, são cerâmicas a base de cálcio e fosfato. As cerâmicas são sólidos inorgânicos, produzidos num processo com altas temperaturas, conhecido como "sinterização", onde elas são aquecidas entre 700°C e 1300°C para formar a sua estrutura cristalina. Isto permite melhorar sua resistência (força), mas torna sua reabsorção mais lenta (BHATT e; ROZENTAL, 2012; MOORE, 2001; VAN DER STOK, 2011).

As cerâmicas podem existir em fases totalmente amorfas ou cristalinas, com as mesmas proporções de substâncias elementares (cálcio e fósforo). Diferenças no grau de cristalinidade do arranjo impactam significativamente as características físicas e biológicas da cerâmica, incluindo resistência, módulo, e velocidade de dissolução (LEMONS 1990; REYNOLDS et al, 2010).

Apesar dos avanços no desenvolvimento desses biomateriais, ainda existem lacunas no entendimento da resposta biológica aos materiais implantados. É bem conhecido, no entanto, uma vez que o biomaterial é introduzido no corpo, uma sequência de eventos ocorre nos tecidos circundantes, o que pode culminar com a formação de células gigantes de corpo estranho e cápsulas

fibrosas (ANDERSON, 2001; COSTA, 2009; GRETZER et al., 2006; LUTTIKHUIZEN et al., 2006;).

O futuro dos substitutos ósseos continua a ser um tema atual (NANDI, 2010), pois alguns biomateriais não são capazes de replicar completamente a superfície e/ou as propriedades do osso substituído, conduzindo a falhas devido à ligação insuficiente com osso justaposto, a perda óssea, afrouxamento de implantes dentários na área enxertada e/ou fratura óssea (SALGADO, 2011).

### 2.2.1 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), é o principal componente inorgânico do osso e tem sido amplamente utilizada na restauração de tecido ósseo humano. Atualmente, existem dois métodos principais de obtenção da HA: 1) síntese através de métodos químicos e físicos (CHOI e; KUMTA, 2006); e 2) extração a partir de tecidos naturais, tais como ossos, dentes e escamas (HUANG, 2011; ZHANG, 2012). O produto do qual é definido como a hidroxiapatita natural. Estudos têm demonstrado que a HA tem boa biocompatibilidade e desempenho osteocondutivo (KURKCU, 2012; ROJBANI, 2011; ZHANG, 2014).

Várias estratégias têm sido empregadas para a produção da Hidroxiapatita sintética. Com o desenvolvimento da nanotecnologia, materiais nanométricos a base de HA com diferentes tamanhos de poros, áreas de superfície e morfologia foram fabricados para tentar imitar a nanoestrutura do osso natural (LIU, et al., 2013). A utilização da Hidroxiapatita porosa substituiu a utilização da forma densa de HA, devido à sua melhor integração ao osso por ligação direta. Isto facilita a proliferação dos osteoblastos dentro dos microporos favorecendo a regeneração óssea (DUTTA et al., 2015).

Materiais osteocondutivos, como a Hidroxiapatita, funcionam como “arcabouço” para o crescimento ósseo, ela precisa mimetizar ao máximo a morfologia, estrutura e a função óssea, otimizando assim a integração com o tecido circundante. A presença de poros é essencial para a formação de um novo tecido ósseo, pois permite a migração e a proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, assim como uma nova vascularização. O tamanho mínimo desses poros, necessário para o crescimento de células ósseas é de 100  $\mu\text{m}$  (KARAGEORGIU e; KAPLAN, 2005). Whang et al. (1999) demonstrou que poros de no mínimo 100-350  $\mu\text{m}$  eram necessários para que se conseguisse a proliferação de células ósseas no interior do material. Poros próximos a 5 $\mu\text{m}$  podem ainda facilitar a capilaridade e a permeabilidade de fluídos, bem como a troca de íons e contribuir para a dissolução do material (FOOK et al., 2010).

As cerâmicas a base de cálcio e fosfato como as HAs, são produzidas num processo com altas temperaturas. Val et al. (2015) demonstrou que ao aumentar a temperatura de sinterização da HA, ocorre um aumento da cristalinidade e também do tamanho dos seus cristais. O tamanho desses cristais afeta diretamente os padrões de absorção do material utilizados, bem como a possibilidade de melhorar suas propriedades mecânicas (VAL, et al. 2016).

Em temperatura ambiente, a HA apresenta-se estável, e com valores de PH entre 4 a 12. Ela não demonstra quaisquer propriedades citotóxicas, mostrando biocompatibilidade excepcional com tecidos duros, pele e tecidos musculares (ZACARIA et al., 2013). Sua taxa de solubilidade depende das diferenças na relação de Ca/P, porosidade, tamanho do cristal, e cristalinidade (AOKI, 1994). A hidroxiapatita óssea na fase mineralizada tem uma fração de cálcio (Ca) de 39,9% e fósforo (P) de 18,5%, com uma razão Ca/P de 2,15% (PETTINICCHIO et al., 2012). As HAs com pouca cristalinidade são mais solúveis que as HAs sintetizadas com alta cristalinidade (FULMER et al., 2002).

A HAP-91® é um Hidroxiapatita sintética, sintetizada a partir do calcário, sua estrutura foi caracterizada por diferentes técnicas, tais como: difração e

fluorescência de raios-X, infra vermelho (IV), complexometria, entre outras. Seus cristais mostraram as principais características cristalográficas das apatitas, com forma hexagonal, cristais prismáticos longos, curtos ou tabulares em agulhas. Em relação a sua porosidade, o diâmetro dos poros foi de 110,6 Å (SHEYLA et al. 2008).

### 2.2.2 Vidro Bioativo

Dentre os materiais cerâmicos utilizados como substitutos ósseos, os Vidros Bioativos representam materiais promissores por sua biocompatibilidade (AL RUHAIMI, 2001; KAUFMAN et al., 2000; SILVER et al., 2001; VOGEL et al., 2001). E por suas propriedades osteocondutivas (CRUZ, 2006; FURUSAWA e; MIZUNUMA, 1997).

O Vidro Bioativo proposto por Larry Hench, teve sua primeira publicação em 1971, e tinha como base um composto de 45% SiO<sub>2</sub>; 24,5% de Na<sub>2</sub>O; 24,5% de CaO e 6% de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. O Vidro foi fundido, e transformado em pequenos implantes retangulares para testes em um modelo de implante no fêmur de ratos (HENCH, 2006). Desde a invenção do 45S5 Bioglass® por Hench e colaboradores, o vidro bioativo e vidros cerâmicos têm sido amplamente investigados pela engenharia de materiais, devido a sua capacidade de formar uma ligação interfacial com os tecidos do hospedeiro, e estimular via liberação de íons, genes de células para a regeneração e auto-reparação (FIORILLI et al., 2015).

Sua forma particulada (90-710 µm) é composta de óxidos de cálcio e sódio, óxido de fósforo e dióxido de silício (DEFORGE, 1997; GREER e; PEARSON, 1998). Inicialmente ocorre uma troca de íons com concomitante dissolução do dióxido de silício. Ocorre então a formação de um gel de silício que serve como núcleo para a formação de uma camada de fosfato de cálcio (CaP). Essa camada cristaliza em uma estrutura de apatita, onde colágeno, sulfato de condroitina e glicosaminoglicanos do microambiente local são incorporados por

essa camada crescente, o que produz uma ligação mecânica muito forte entre o material implantado e o tecido do hospedeiro. Estudos indicaram que a ligação do colágeno ao gel de silício ocorre muito rapidamente, sendo esse um dos fatores importantes para a “bioatividade” destas cerâmicas (CARLO, 2007; GAO et al., 1995; HENCH e; WILSON, 1984; LOSSDORFER, 2004; SHAPOFF et al., 1997; SILVER et al., 2001).

A dissolução de íons de cálcio e sílica solúvel a partir do Vidro Bioativo estimula a divisão de osteoblastos, produção de fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (JONES, 2013). Xynoset al. (2001) também relataram que o biovidro pode promover a expressão de genes específicos que afetam a diferenciação de osteoblastos. Os produtos da dissolução do biovidro parecem ter efeito direto na expressão gênica dos osteoblastos humanos, caracterizando o seu efeito osteoindutor (TIOMIS, 2010).

Segundo Gestel, et al. (2015), o Vidro Bioativo pode ser considerado um material osteoestimulativo e osteocondutor, e não um material osteoindutor, uma vez que só consegue formar um novo osso ortotópico, enquanto materiais osteoindutores são capazes de formar um novo osso ectópico.

A característica ideal do biovidro é a reação rápida com os tecidos biológicos que causa uma forte ligação entre eles (DEHCORDI, et al., 2016), a sua capacidade de ligar-se a tecidos moles e ósseos parece fazer a diferença quando comparado com outros materiais aloplásticos disponíveis (CHACKO, 2014). Este material mostra excelentes propriedades de ligação ao osso tornando a interface osso/materiais muito firme e estável (GROSS, 1990; HENCH, 1988; JOHN, 2009).

### 3 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a Hidroxiapatita HAP-91® e o Vidro Bioativo como substitutos ósseos em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos.

O objetivo específico foi analisar histomorfometricamente, descrevendo as características histológicas e medindo a quantidade de tecido ósseo neoformado (AON) em  $\text{mm}^2$ , e a área de Hidroxiapatita HAP-91® (AHA) e Vidro Bioativo (AVB) remanescente em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos;

E também analisar imunoistoquimicamente através de marcadores, a Hidroxiapatita HAP-91® e o Vidro Bioativo como substitutos ósseos em defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos.

## 4 MATERIAS E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, com número do parecer consubstanciado 673/2015 (Anexo A), seguindo as normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

A amostra foi composta por 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando entre 375 a 450g, com média de três meses de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Eles foram mantidos em condições padronizadas com água e ração *ad libitum*, temperatura ambiente e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

### 4.1 PERÍODO PRÉ-OPERATÓRIO

Os materiais utilizados durante a cirurgia foram esterilizados na central de esterilização da Unifal-MG. Uma mesa clínica foi montada previamente a cada cirurgia, separando os materiais que seriam utilizados. Anteriormente a confecção do defeito ósseo (DO) realizou-se a anestesia dos animais através de injeção intramuscular com uma agulha de insulina (13mmx 0,04mm) (Becton Dickinson Ind. Cirur. Ltda, Curitiba, PR, Brasil), associando 0,14 ml/Kg de Cloridrato de Quetamina (Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e 0,06 ml/Kg de Cloridrato de Xilazina (Syntec do Brasil Ltda, Santana de Parnaíba, SP, Brasil). Após a anestesia geral dos animais, foram realizadas as tricotomias de forma manual, e as assepsias foram realizadas com um produto a base de Polivinilpirrolidona iodo (PVPI) em solução aquosa, contendo 1% de Iodo Ativo (Rioquímica Ltda, São Paulo, SP, Brasil) (Figuras 2 a 5).

Figura 2 – Mesa Clínica



Fonte: Do Autor

Figura 3 – Anestesia Geral



Fonte: Do Autor

Figura 4 – Tricotomia



Fonte: Do Autor

Figura 5 – Assepsia pré-operatória



Fonte: Do Autor

## 4.2 PERÍODO TRANS-OPERATÓRIO

Após a preparação asséptica e tricotomia, os animais foram anestesiados localmente com Lidocaína 2% + Epinefrina 1:100.00 (Alphacaine 100 – Nova DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), posteriormente e anteriormente a área de incisão. Uma incisão semilunar, utilizando uma lâmina de bisturi de aço carbono 15c (Suzhou Kyuan Medical App. Co. Ltd., Beiqiao Town, Suzhou City, China), foi então realizada no couro cabeludo na região anterior da calvária, permitindo a reflexão de um retalho de espessura total em direção posterior (NAGATA, 2009) (Figuras 6 e 7)

Figura 6 – Incisão Semilunar



Fonte: Do Autor

Figura 7 – Retalho de Espessura Total



Fonte: Do Autor

O DO foi realizado com uma broca trefina circular de 8 milímetros (mm) (Alpha Instrumentos Cirúrgicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) acoplada a um motor de baixa rotação sob constante irrigação com solução salina estéril a 0,9% (Eurofarma Laboratório AS, Ribeirão Preto, SP, Brasil). O DO foi confeccionado na porção média da calvária medindo 8 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de profundidade, correspondente a uma área de cerca de 50 mm<sup>2</sup> (CARDOSO et al., 2006). Uma espátula Lecron 3S foi utilizada para verificar a profundidade da perfuração durante a cirurgia, bem como para a remoção cuidadosa do tecido ósseo seccionado.

Duas marcas em forma de L foram feitas dois (2) mm anterior e uma outra realizada 2mm milímetros posterior às margens do defeito cirúrgico usando uma broca diamantada esférica, para criar uma fissura cirúrgica. As marcas foram preenchidas com amálgama (MESSORA et al., 2008). O seu objetivo foi permitir a identificação da linha de centro do defeito original durante processamento laboratorial. As marcas também serviram como referências para localizar as margens ósseas originais do defeito cirúrgico durante as análises histomorfométricas e imunoistoquímicas (GARCIA et al., 2014; MESSORA et al., 2008; NAGATA et al., 2009) (Figuras 8 e 9).

Figura 8 – Remoção do tecido ósseo.



Fonte: Do Autor

Figura 9 – Marcações em amálgama.



Fonte: Do Autor

Os animais foram então divididos em três grupos de acordo com os seguintes tratamentos locais dos DOs: Grupo Controle (C) – realização de um DO na calvária dos animais que foi preenchido apenas com coágulo sanguíneo; Grupo Hidroxiapatita (HA) - realização de um DO ósseo na calvária dos animais que foi preenchido com Hidroxiapatita (HAP-91®) e Grupo Vidro Bioativo (VB) - realização de um DO na calvária dos animais que foi preenchido com o Vidro Bioativo.

Os materiais enxertados foram cedidos pela empresa JHS BIOMATERIAIS, Sabará, MG, Brasil, CNPJ: 71.029.631/0001-81. No Grupo HA foi utilizada uma Hidroxiapatita Sintética (HAP-91®), enquanto que no Grupo VB foi utilizado um Vidro Bioativo. Nesses grupos a quantidade de material enxertado foi padronizada com uma colher dosadora, e sua acomodação no DO também foi realizada de forma padronizada, com um peso específico para esse fim. A sutura foi cuidadosamente realizada acomodando o retalho sobre a área cirúrgica, onde os tecidos foram pinçados e aproximados para a transfixação da agulha, com a intenção de que o material recebesse a menor movimentação possível e permanecesse no local desejado. A sutura foi feita com pontos simples com fio de seda 3-0 (Technew Comercio e Indústria Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figuras 10 a 13).

Figura 10 – Defeito preenchido com Hidroxiapatita (HAP-91).



Fonte: Do Autor

Figura 11 – Defeito preenchido com Vidro Bioativo.



Fonte: Do Autor

Figura 12 – Transfixação da agulha.



Fonte: Do Autor

Figura 13 – Sutura finalizada.



Fonte: Do Autor

Após o procedimento cirúrgico, os animais foram medicados com duas gotas de analgésico (Dipirona Sódica 500 mg/ml – Medley Indústria Farmacêutica, Campinas, SP, Brasil).

Dez animais de cada grupo experimental foram eutanasiados com utilização da câmara de dióxido de carbono, cujo uso reflete uma ausência de odor; rápida depressão do sistema nervoso central e ausência de resíduos no animal. As eutanásias foram praticadas aos 30 e 60 dias após a cirurgia. As calotas foram

removidas e fixadas em formol tamponado a 10% por um período de no mínimo 48 horas e dissecadas para a realização das análises.

#### 4.3 PROCESSAMENTO LABORATORIAL

As espécimes foram desmineralizadas em uma solução de EDTA neutro, na proporção de 250 mg de sal de EDTA dissódico por 1.750 ml de água destilada, e neutralizada (pH = 7,0) com a adição de aproximadamente 25 g de hidróxido de sódio por aproximadamente 45 dias (MOLINARO, et al., 2010). O processamento do material foi realizado seguindo o protocolo do laboratório de histologia da Universidade Federal de Alfenas (Unifal- MG), com banhos sequências em álcool 70%, 90%, 95%, absoluto I, absoluto II, absoluto III, álcool + Xilol, Xilol I, Xilol II, por uma hora em cada solução. Após esta seqüência, o material foi banhado por parafina líquida a 60° C por 12 horas.

O tecido analisado foi incluído em parafina com a parte do centro do defeito ósseo voltado para baixo. Cortes seriados de 4 micrómetros de espessura foram então realizados com um micrótomo e capturados em banho maria a 40°C com lâminas previamente preparadas com solução de 1 ml de Poly-L-lysine e 10 ml de água destilada. A coloração realizada foi a de Picrosirius (BEDOYA, et al., 2016).

Após 12 horas da “pescagem” do tecido pelas lâminas, seguiu-se a coloração com banhos sequências em Xilol I e Xilol II por 5 minutos, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 90%, álcool 70% por 1 minuto, água corrente por 5 minutos, Hematoxilina de Harris por 2 minutos, água corrente por 5 minutos, Picrosirius por 10 minutos, álcool 70%, álcool 90%, álcool absoluto III, álcool absoluto II, álcool absoluto I, Xilol II, Xilol I por 2 minutos cada.

#### 4.4 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise histológica descritiva foi realizada em aumentos de 100 e 400X (BOSCO et al., 2016; GARCIA et al. 2011).

##### 4.4.1 Histométrica

A análise histométrica foi realizada por meio de um sistema de avaliação de imagem por computador, utilizando o “software” ImageLab 2000 (Dracon Bio Informática Ltda., Vargem Grande do Sul, SP, Brasil).

Foram selecionados 5 cortes histológicos da área central do defeito cirúrgico de cada espécime. Cada corte teve sua imagem capturada por meio de uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico e salva em um computador. Em cada imagem, foi realizada uma delimitação da área analisada, que correspondeu à região do osso da calvária onde o defeito foi originalmente criado, denominada Área Total (AT) (PANG et al., 2005; TAKAHIRO et al., 2016). Esta área foi determinada, primeiramente, pela identificação das superfícies externa e interna da calvária original nas margens direita e esquerda do defeito cirúrgico. Essas superfícies foram conectadas com linhas desenhadas seguindo suas respectivas curvaturas. Considerando o comprimento total do espécime histológico, foram medidos 2 mm, a partir das extremidades direita e esquerda do mesmo, em direção ao centro do defeito, com o objetivo de localizar as margens do defeito cirúrgico original. A Área de Osso Neoformado (AON), bem como as áreas ocupadas pelos remanescentes dos materiais implantados, denominadas de Área de Hidroxiapatita (AHA) e Área de Vidro Bioativo (AVB), foram delineadas dentro dos limites da AT. O valor da AT foi considerado como sendo 100% da área analisada e os valores de AON, AHA e AVB foram calculados como sendo uma porcentagem de AT

da seguinte forma (BOSCO et al., 2016; OLIVEIRA, et al., 2015; PARK et al., 2014; TAKAHIRO et al., 2016):

Média de AT em  $\text{mm}^2$  \_\_\_\_\_ 100% da área analisada.

Média de AON, AHA e AVB em  $\text{mm}^2\%$  \_\_\_\_\_ X% de AON, AHA e AVB da área analisada.

$$\text{Portanto: \%AON, AHA e AVB} = \frac{100 \times \text{AON} (\text{mm}^2)}{\text{AT} (\text{mm}^2)}$$

A ANO, AHA e AVB das respectivas espécies, foram avaliadas três vezes pelo mesmo examinador e em dias diferentes. As três medidas obtidas foram analisadas estatisticamente para análise de concordância com nível de 5% de significância (Teste Kappa). Os valores médios foram averiguados e comparados estatisticamente (OLIVEIRA, et al., 2015).

Foram criadas imagens digitais compostas pela combinação de três imagens menores, tendo em vista a impossibilidade de capturar todo o defeito ósseo em apenas uma imagem, devido à ampliação utilizada. A imagem foi criada tendo como referência estruturas anatômicas (como vasos sanguíneos, trabéculas ósseas) em cada uma das secções histológicas (BOSCO et al., 2016).

#### 4.5 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Foram realizadas reações imunoistoquímicas utilizando-se anticorpos primários contra a proteína Osteocalcina (OC) e Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP) nas duas extremidades e no centro do defeito ósseo (NAGATA et al., 2009). A Osteocalcina é uma proteína da matriz extracelular sintetizada e secretada durante o processo de diferenciação e mineralização osteoblástica, indicando uma fase da formação óssea (MARQUES, et al, 2015). As marcações de TRAP estão presentes em células gigantes multinucleadas (osteoclastos),

caracterizando um processo de reabsorção óssea (ISSA et al., 2015; SOUZA et al., 2016)

Para as reações imunoistoquímicas, as lâminas foram submetidas a imunoperoxidase indireta empregando os anticorpos primários policlonais para OC e TRAP (Goat anti-trap, Goat anti-oc – Santa Cruz Biotechnology, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em 10 ml de albumina de soro bovino (BSA), com 2 ml de diluente (DAKO – Carpinteria, CA, USA.) e 120 microlitros de soro normal (3%, Sigma, CA, USA).

Inicialmente, os cortes histológicos foram desparafinizados na estufa à 56°C por 30 minutos, e um segundo ciclo de deparafinização iniciou com banhos em xilol, reidratados em soluções decrescentes de álcoois e lavados em sucessivos banhos em tampão fosfato de sódio (PBS). Após a lavagem com PBS as lâminas foram colocadas em uma solução de 198 ml de água destilada com 2 ml de tampão citrato 100X à 95°C por 5 minutos, para recuperação antigênica. Estes cortes histológicos foram tratados para bloqueio da peroxidase endógena empregando peróxido de hidrogênio a 3% em PBS por 1 hora e lavados novamente com PBS. Em seguida incubados com os anticorpos primários mencionados anteriormente a temperatura ambiente durante 18 a 24 horas e lavados com PBS. Uma segunda incubação foi realizada através do uso de anticorpo secundário biotinilado universal (Anti-Goat made in Horse, DAKO – Carpinteria, CA, USA) durante 2 horas em temperatura ambiente, seguido de lavagens com PBS. Uma terceira incubação foi realizada com uma solução contendo estreptavidina conjugada com peroxidase (DAKO – Carpinteria, CA, USA.) a temperatura ambiente, durante 2 horas. A revelação da reação de imunoperoxidase foi realizada com tampão de revelação (DAB-Substrato, DAKO – Carpinteria, CA, USA.) e diaminobenzidina (DAB – Cromógeno - DAKO - Carpinteria, CA, USA.) durante 60 segundos para TRAP e 5 minutos para OC, em temperatura ambiente. Finalmente, os cortes histológicos foram lavados várias vezes em PBS e submetidos à contracoloração por 15 segundos pela hematoxilina. Todas as reações de imunoperoxidase foram acompanhadas por um controle negativo, através da omissão dos anticorpos primários.

As imunomarcações localizadas nas duas margens e no centro do defeito foram analisadas em um aumento de 400X, através de microscopia de campo claro. A expressão de OC foi mensurada semiquantitativamente em ausente, leve, moderada e intensa (MARQUES et al, 2015). As células TRAP positivas foram contadas e os resultados expressos em unidades (GARCIA et al., 2011). Foram consideradas células TRAP positivas osteoclastos maduros contendo três ou mais núcleos (GARCIA et al., 2011).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

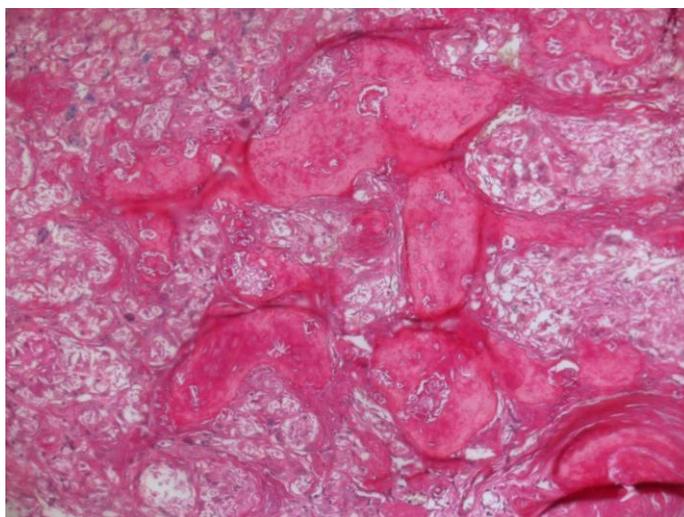
A análise estatística dos dados histométricos e imunoistoquímicos obtidos foram realizados pelo programa BioEstat (Bioestat Windows 1995 Sonopress. Indústria Brasileira, Manaus, A.M, Brasil). A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos e períodos foi testada. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk e observou-se que os dados eram paramétricos (distribuição normal dos dados). O teste paramétrico de análise de variância Anova com complementação de Tukey com  $p < 0,05$  foi utilizado.

## 5 RESULTADOS

Os resultados do Grupo C, em todos os períodos experimentais mostraram, que nenhum espécime apresentou preenchimento completo da cavidade com tecido ósseo. Praticamente toda a extensão do defeito cirúrgico estava ocupado pelo perióstio e por uma fina camada de tecido conjuntivo que se apresentava com uma espessura menor que a do tecido ósseo original da calvária, feixes de fibras colágenas orientadas paralelamente à superfície da ferida e um número pouco expressivo de fibroblastos. O infiltrado inflamatório presente era predominantemente crônico. Observou-se, junto às margens do defeito cirúrgico, pequena quantidade de tecido ósseo neoformado.

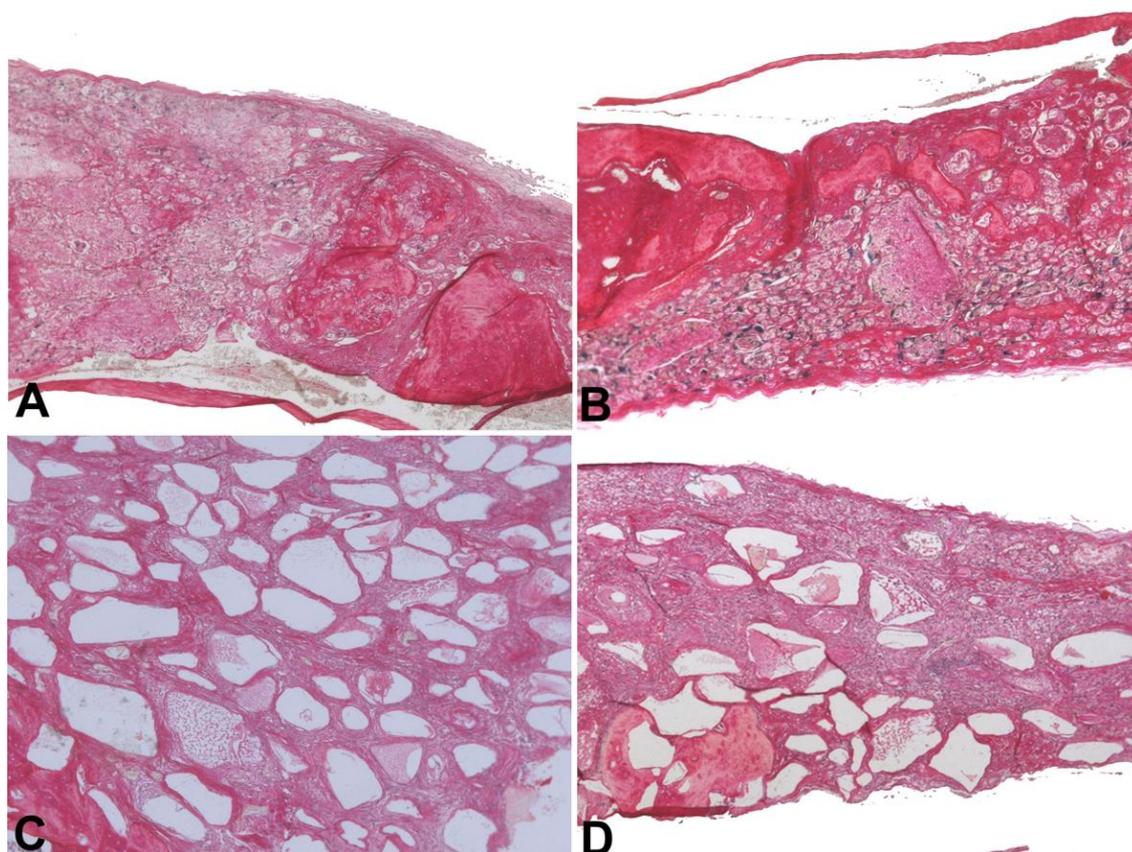
Nos Grupos HA e VB observaram-se tecido ósseo neoformado, restrito às margens originais do defeito cirúrgico, em ambos os períodos de análise, com uma formação mais acentuada aos 60 dias, a presença de tecido ósseo no centro do defeito foi caracterizada por “ilhotas isoladas” (Figura 14). Além disso, aos 60 dias, as partículas de Hidroxiapatita e Vidro Bioativo eram menores do que aos 30 dias. Os Grupos HA e VB apresentaram uma maior quantidade de partículas remanescentes dos respectivos biomateriais aos 30 dias ocorrendo uma diminuição dos mesmos no período de 60 dias. As partículas do Vidro Bioativo apresentaram uma morfologia mais bem definida em relação às da Hidroxiapatita, aos 30 e 60 dias, mostrando uma característica de menor reabsorção do material enxertado (Figura 15).

Figura 14 – “Ilhotas” de tecido ósseo sendo formado no meio do defeito ósseo aos 60 dias, Grupo HA. Aumento 400X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

Figura 15 – Características das partículas dos biomateriais Hidroxiapatita e Vidro Bioativo. A) Grupo HA- 30 dias; B) Grupo HA- 60 dias; C) Grupo VB- 30 dias e D) Grupo VB- 60 dias. Aumento de 100X. Coloração Picrosirius.

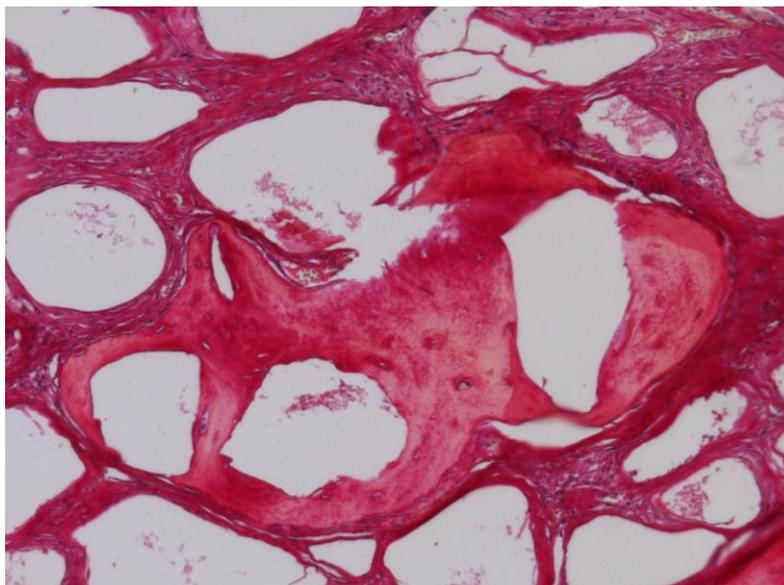


Fonte: Do Autor

Em alguns espécimes dos Grupos HA e VB, observaram-se limitada formação óssea ou matriz osteóide rica em osteócito ao redor das partículas (Figura 16). Em todos os espécimes, as partículas de Hidroxiapatita e Vidro Bioativo, juntamente com o tecido conjuntivo circunjacente neoformado, formaram uma faixa com espessura similar à do tecido ósseo original da calota, onde o Grupo VB por vezes apresentou um maior volume de preenchimento do defeito que o tecido ósseo original.

Na maior parte do defeito, as partículas de Hidroxiapatita e Vidro Bioativo estavam circundadas por tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas e elevado número de fibroblastos. Em algumas áreas, principalmente nos espécimes de 30 dias, o tecido conjuntivo circundante era frouxo e pouco organizado. O Grupo VB apresentou uma maior orientação das fibras colágenas ao redor das partículas do biomaterial. A maioria das partículas de Hidroxiapatita apresentava fissuras com invaginações de tecido conjuntivo, em ambos os períodos de análise.

Figura 16 – Formação de tecido ósseo em meio às partículas de Vidro Bioativo aos 60 dias, Grupo VB. Aumento de 400X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

## 5.1 HISTOMÉTRICOS

Em nossas análises histométricas tivemos resultados para a Área de Neoformação óssea (ANO) e Área de Hidroxiapatita (AHA) e Área de Vidro Bioativo (AVB)

### 5.1.1 Área de Neoformação Óssea (ANO)

Na análise intra-grupos, houve uma maior ANO aos 60 dias comparado aos 30 dias, em todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ).

Na análise inter-grupos, os resultados mostraram que o Grupo C ( $25,37 \pm 1,05 \text{mm}^2$ ;  $32,11 \pm 0,78 \text{mm}^2$ ) apresentou uma maior ANO comparado ao Grupo HA ( $19,87 \pm 1,10 \text{mm}^2$ ;  $23,47 \pm 1,34 \text{mm}^2$ ) e VB ( $15,61 \pm 1,63 \text{mm}^2$ ;  $18,76 \pm 0,13 \text{mm}^2$ ) aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ). Além disso, o Grupo HA ( $19,87 \pm 1,10 \text{mm}^2$ ;  $23,47 \pm 1,34 \text{mm}^2$ ) apresentou uma maior ANO comparado ao Grupo VB ( $15,61 \pm 1,63 \text{mm}^2$ ;  $18,76 \pm 0,13 \text{mm}^2$ ) aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3 e Figuras de 17 a 22).

Tabela 2- Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da AON ( $\text{mm}^2$ ) de acordo com cada grupo e período.

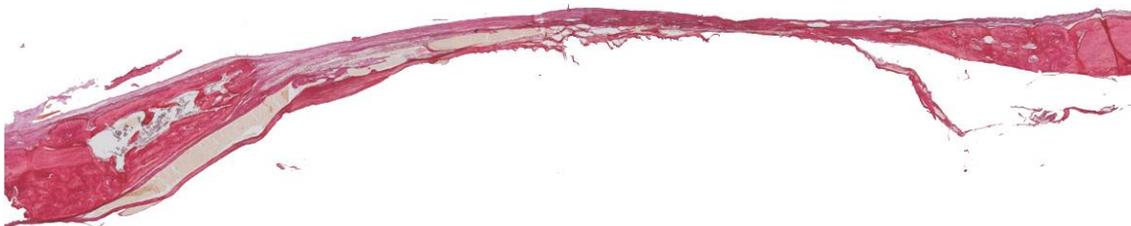
<b>Períodos</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Grupos</b>		
<b>C</b>	$25,37 \pm 1,05^{*x}$	$32,11 \pm 0,78^{*x}$
<b>HA</b>	$19,87 \pm 1,10^{*x}$	$23,47 \pm 1,34^{*x}$
<b>VB</b>	$15,61 \pm 1,63^{*x}$	$18,76 \pm 0,13^{*x}$
<b>N</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

Fonte: Do autor

\*Diferença estatisticamente significativa entre os períodos, mesmos grupos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

<sup>x</sup>Diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmos períodos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

Figura 17 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo C. Período de 30 dias.  
Aumento 50X. Coloração Picrosirius.



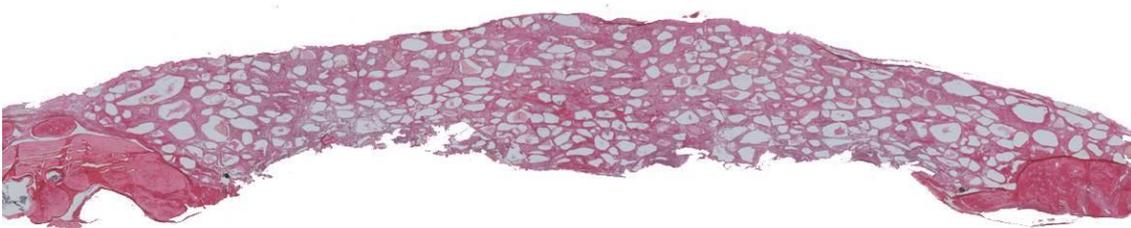
Fonte: Do Autor

Figura 18 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo HA. Período de 30 dias.  
Aumento 50X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

Figura 19 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo VB. Período de 30 dias.  
Aumento 50X. Coloração Picrosirius.



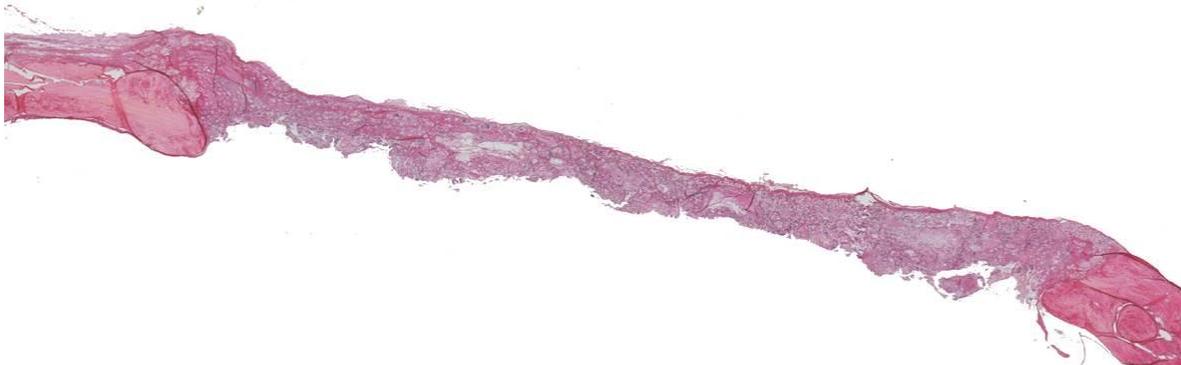
Fonte: Do Autor

Figura 20 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo C. Período de 60 dias. Aumento 50X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

Figura 21 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo HA. Período de 60 dias. Aumento 40X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

Figura 22 - Imagem histológica da calota de um animal do Grupo VB. Período de 60 dias. Aumento 40X. Coloração Picrosirius.



Fonte: Do Autor

### 5.1.2 Área de Hidroxiapatita (AHA) E Área de Vidro Bioativo (AVB)

Na análise intra-grupos, houve uma maior AHA e AVB aos 30 dias comparado aos 60 dias ( $p < 0,05$ ).

Na análise inter-grupos, os resultados mostraram que o Grupo VB ( $80.25 \pm 2,06 \text{mm}^2$ ;  $77.11 \pm 1,62 \text{mm}^2$ ) apresentou uma maior AVB comparado à AHA remanescente do Grupo HA ( $75,15 \pm 0,45 \text{mm}^2$ ;  $69,47 \pm 1,65 \text{mm}^2$ ), aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3- Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da AHA e AVB ( $\text{mm}^2$ ) de acordo com cada grupo e período.

<b>Períodos</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Grupos</b>		
<b>HA</b>	$75,15 \pm 0,45^{*x}$	$69,47 \pm 1,65^{*x}$
<b>VB</b>	$80.25 \pm 2,06^{*x}$	$77.11 \pm 1,62^{*x}$
<b>N</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

Fonte: Do autor

\*Diferença estatisticamente significativa entre os períodos, mesmos grupos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

<sup>x</sup>Diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmos períodos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

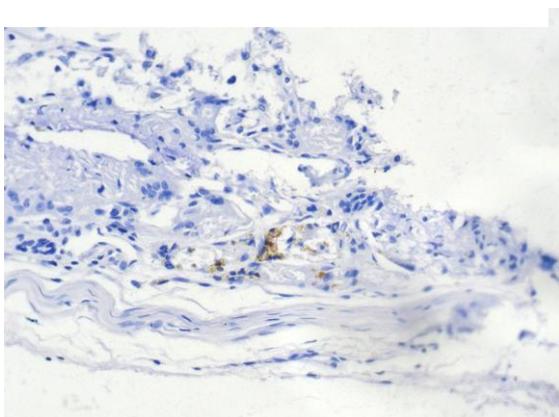
## 5.2 IMUNOISTOQUÍMICOS

Em nossas análises Imunoistoquímicas tivemos resultados para Osteocalcina (OC) e Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP).

### 5.2.1 OSTEOCALCINA (OC)

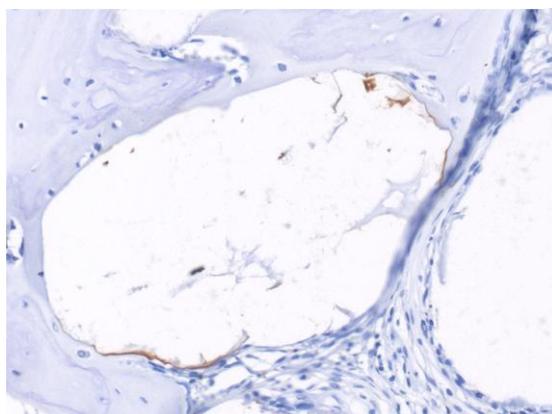
Aos 30 dias o Grupo C não apresentou expressão de OC enquanto que os Grupos HA e VB apresentaram altas e moderadas expressões de OC respectivamente (Figuras 23 e 24). Aos 60 dias, os Grupos C e VB apresentaram leve expressão de OC e o Grupo HA apresentou sua expressão moderada (Figuras 25 e 26).

Figura 23 – Marcações para OC, Grupo HA, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



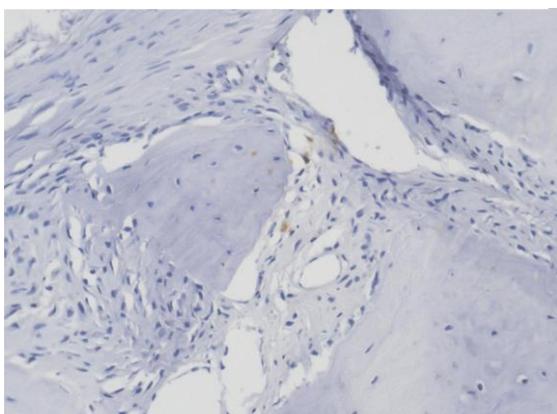
Fonte: Do Autor

Figura 24 – Marcações para OC, Grupo VB, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



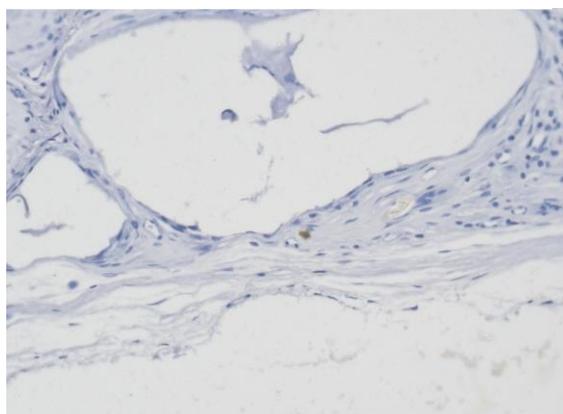
Fonte: Do Autor

Figura 25 – Marcações para OC, Grupo HA, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



Fonte: Do Autor

Figura 26 – Marcação para OC, Grupo VB, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



Fonte: Do Autor

### 5.2.2 Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP)

A análise intra-grupos mostrou que o Grupo VB apresentou um maior número de células TRAP positivas aos 30 ( $2,70 \pm 1,63$ un) dias comparado aos 60 dias ( $0,10 \pm 0,31$ un) ( $p < 0,05$ ).

Na análise inter-grupos, os resultados mostraram que o Grupo HA ( $6,90 \pm 0,31$ un;  $6,10 \pm 1,45$ un) apresentou uma maior número de células TRAP positivas comparado ao Grupo C ( $1,00 \pm 1,50$ un;  $0,16 \pm 0,21$ un) e ao Grupo VB ( $2,70 \pm 1,63$ un;  $0,10 \pm 0,31$ un) aos 30 e 60 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ). Além disso, o Grupo VB ( $2,70 \pm 1,63$ un) apresentou um maior número de células TRAP positivas comparado ao Grupo C ( $1,00 \pm 1,50$ un) aos 30 dias pós-operatórios ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4 e Figuras de 27 a 32).

Tabela 4- Média e desvio padrão ( $M \pm DP$ ) da expressão de TRAP (un) de acordo com cada grupo e período.

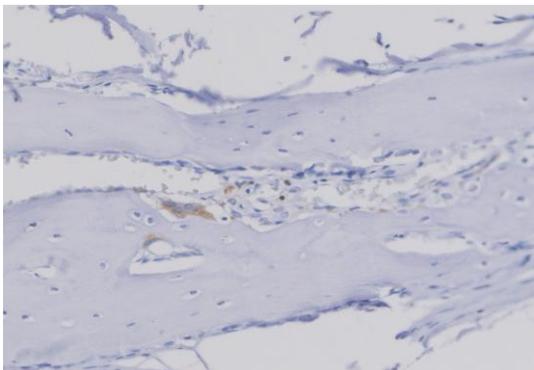
<b>Períodos</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Grupos</b>		
<b>C</b>	$1,00 \pm 1,50^{\times}$	$0,16 \pm 0,21^{\times}$
<b>HA</b>	$6,90 \pm 0,31^{\times}$	$6,10 \pm 1,45^{\times}$
<b>VB</b>	$2,70 \pm 1,63^{*\times}$	$0,10 \pm 0,31^{*\times}$
<b>N</b>	<b>30</b>	<b>30</b>

Fonte: Do autor

\*Diferença estatisticamente significativa entre os períodos, mesmos grupos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

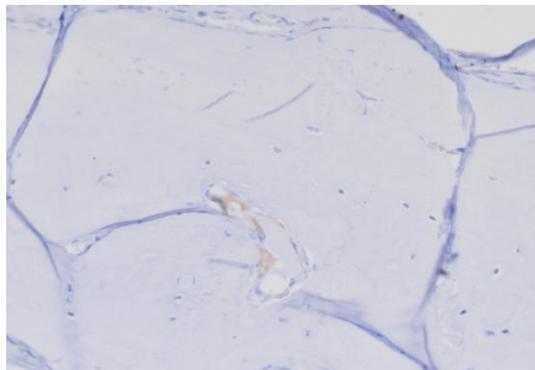
$\times$ Diferença estatisticamente significativa entre os grupos, mesmos períodos (Anova e Tukey com  $p < 0,05$ ).

Figura 27 – Marcação para TRAP, Grupo C, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



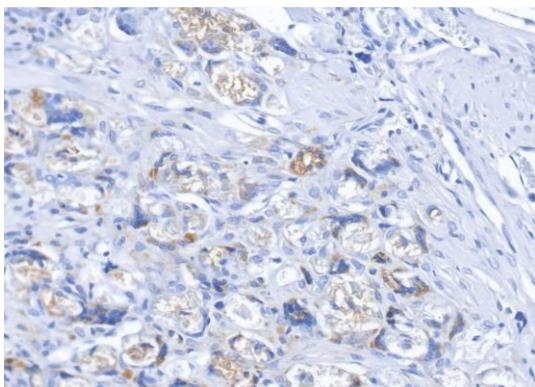
Fonte: Do Autor

Figura 28 – Marcação para TRAP, Grupo C, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



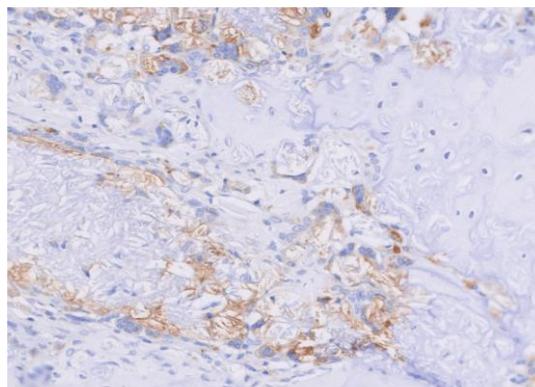
Fonte: Do Autor

Figura 29 – Marcações para TRAP, Grupo HA, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



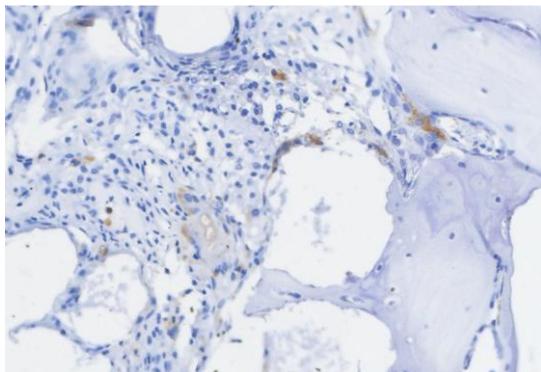
Fonte: Do Autor

Figura 30 – Marcações para TRAP, Grupo HA, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



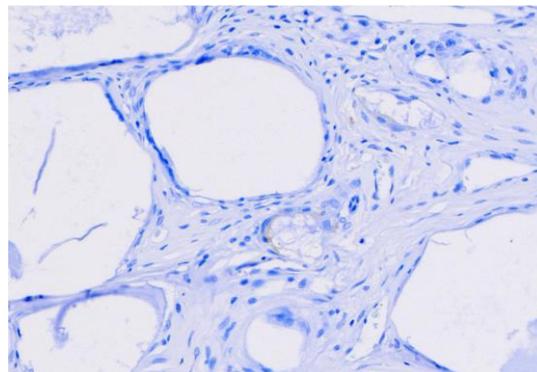
Fonte: Do Autor

Figura 31 – Marcações para TRAP, Grupo VB, 30 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



Fonte: Do Autor

Figura 32 – Marcação para TRAP, Grupo VB, 60 dias. Aumento 400 X. Contracoloração Hematoxilina.



Fonte: Do Autor

## 6 DISCUSSÃO

Defeitos ósseos congênitos ou adquiridos no complexo bucomaxilofacial apresentam ainda uma terapia desafiadora. As abordagens atuais de tratamento incluem os enxertos autógenos, alógenos, e os materiais sintéticos, que funcionam com arcabouço para o crescimento celular. O transplante autógeno apresenta alguns inconvenientes, como oferta limitada, dor na área doadora e morbidade, enquanto os enxertos alógenos podem apresentar rejeição por parte do hospedeiro, infecção, inflamação e transmissão de doenças (SARKAR e; LEE, 2015; SUENAGA et al., 2015).

Neste estudo avaliamos a capacidade de formação óssea de dois biomateriais de origem sintética em defeitos críticos na calota craniana de ratos. Defeitos ósseos de tamanho crítico não se reparam de forma fisiológica pelo organismo, possuindo diferenças neste processo influenciado pelo local onde ocorre e pela espécie animal (CALORI, et al., 2011),. O defeito de 8 mm de diâmetro na calota craniana de ratos é considerado crítico por diversos autores (ALMEIDA et al., 2010; FERREIRA et al., 2004; LOHMANN, et al., 2017; MARTINS, 2010; SUENAGA et al., 2015). Este foi o modelo de escolha nesta pesquisa. Em nossos resultados, nenhum animal do Grupo C apresentou preenchimento completo do defeito ósseo, apresentando na maior parte dos defeitos apenas o periósteo em conjunto com uma fina camada de tecido conjuntivo.

Apesar da maior neoformação de tecido ósseo no Grupo C, o preenchimento de um defeito ósseo apenas com o coágulo sanguíneo nem sempre é eficaz clinicamente. Procedimentos envolvendo aumento de espessura e/ou altura óssea muitas vezes são necessários para a colocação de implantes dentários, onde a falta de resistência do coágulo por compressão a partir dos tecidos moles não mantém um arcabouço para o crescimento ósseo, sendo necessário um material de enxerto com características osteocondutoras, capaz de criar um suporte estrutural para a formação de um novo osso (TAKAUTI, et al., 2014).

Os nossos resultados demonstraram que o Grupo C apresentou uma maior ANO comparado ao Grupo HA aos 30 e 60 dias pós-operatórios. Estes resultados são contrários aos achados de Kim et al., 2016 que demonstrou que em defeitos de tamanho crítico de 8mm em calvárias de ratos, o Grupo 1 sem enxerto (Controle) apresentou uma menor ANO que o Grupo 3 preenchido com Hidroxiapatita (Bongros®). Esses resultados podem estar relacionados a diferenças metodológicas entre os trabalhos. Um dos fatores que poderíamos citar seria o número de animais utilizados em cada Grupo/Período, pois o presente trabalho utilizou um N de 10 animais por Grupo/Período enquanto que o trabalho de Kim et al., 2016 utilizou um N de 4 animais em alguns Grupos/Períodos. Este fato poderia trazer inconsistências na realização da análise estatística. Além disso, o trabalho de Kim et al., 2016 realizou dois defeitos de tamanho crítico no mesmo animal, enquanto que neste trabalho houve a realização de um único defeito por animal.

Com as várias opções de enxertos ósseos disponíveis no mercado, o cirurgião-dentista deve-se atentar às características e a capacidade dos materiais enxertados. Diferentes aplicações requerem materiais com diferentes índices de reabsorção. A composição química, tamanho das partículas, rugosidade superficial e a cristalinidade do biomaterial afetam sua taxa de reabsorção, podendo ser ajustadas para a finalidade clínica desejada (CONZ, et al., 2011). No presente estudo, as partículas de Vidro Bioativo apresentaram uma morfologia mais bem definida em relação às da Hidroxiapatita, aos 30 e aos 60 dias, mostrando uma característica de menor reabsorção do material enxertado, característica essa que pode estar relacionada ao maior tamanho das partículas, maior cristalinidade, menor rugosidade e menor pureza em sua composição (HOPPE, et al., 2011).

O primeiro Vidro Bioativo descoberto foi o 45S5 Bioglass, por Hench, em 1969. Sua composição possui óxidos de cálcio, sódio, fósforo e dióxido de silício. Com o acréscimo de óxidos de Magnésio e Potássio à composição básica do vidro de Hench, foi descoberto o vidro 13-93®, e conseguiu-se então um material mecanicamente mais forte (BI, et al., 2012). Esses dois Vidros formam um gel de sílica, que se convertem lentamente e incompletamente em HA

( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) no fluido corporal. Os cristais que não se convertem podem permanecer no corpo por um período prolongado de tempo (BI, et al., 2013; CARLO, 2007). Enquanto o 45S5 Bioglass® e o 13-93® demonstraram uma conversão lenta e incompleta à Hidroxiapatita, vidros que contém Boro em sua composição tem demonstrado uma conversão mais rápida e completa (DELIORMANLI et al., 2014). O vidro boro silicato (13-93B1) e o vidro borato (13-93B3), que substituem parcialmente ou totalmente a sílica por óxido de boro, respectivamente, tem demonstrado que a taxa de conversão à hidroxiapatita aumenta de 3 a 4 vezes a medida que se aumenta os níveis de óxido de boro, porém, devido a sua rápida reabsorção e microestrutura trabecular, tem sido indicado apenas para defeitos ósseos que apresentam paredes ósseas bem definidas (FU, et al., 2010). Essa taxa de conversão explica em parte nossos achados, onde as partículas de Vidro Bioativo se apresentaram em maior quantidade e menos degradadas que as de Hidroxiapatita. A hidroxiapatita apresenta uma reabsorção mais rápida que o Vidro Bioativo, levando a uma formação óssea mais precoce, porém o Vidro Bioativo mantém um arcabouço e um volume de preenchimento maior que a Hidroxiapatita devido a sua menor taxa de solubilidade.

Na análise intra-grupos, houve uma maior área de Hidroxiapatita (AHA) e Vidro Bioativo (AVB) remanescentes nos defeitos ósseos aos 30 dias comparado aos 60 dias, sendo que este fato demonstra a capacidade do organismo em reabsorver estes biomateriais durante o processo de reparo (CHAI et al., 2017). A maior taxa de reabsorção da Hidroxiapatita observada no presente estudo, através dos resultados imunoistoquímicos, pode estar associada ao maior número de células TRAP positivas, demonstrando uma maior resposta celular do organismo quando em contato com este biomaterial, enquanto o Vidro Bioativo apresentou uma resposta mais branda do hospedeiro. Em contrapartida, a maior expressão de Osteocalcina (OC) nos espécimes do Grupo HA poderia indicar um estágio mais avançado no processo de remodelação óssea comparado ao Grupo VB. Estes resultados confirmam nossos achados histométricos em relação à área de neoformação óssea, que foi maior no Grupo HA aos 30 e 60 dias comparado ao Grupo VB, indo de

encontro ao estudo de Marques et al. 2015, onde a maior expressão de OC foi associada a maior formação de tecido ósseo. Nagata et al., 2009 e Alpan et al., 2016 também associaram a expressão de Osteocalcina à maior porcentagem de osso vital em defeitos críticos na calota craniana de ratos.

Biocerâmicas a base de fosfato de cálcio apresentam propriedades osteocondutoras, sendo biocompatíveis, biodegradáveis e agindo como arcabouço para o crescimento ósseo (GARETA, et al., 2015; LARSSON, 2010; SALGADO et al., 2011). Os biomateriais testados em nosso estudo apresentaram essas características demonstradas pela análise histológica, uma vez que possibilitaram a formação de uma matriz osteóide e de um novo tecido ósseo diretamente sobre sua superfície, sem interposição de tecido mole.

Apesar de haver grande semelhança fisiológica, celular e molecular entre os modelos animais e humanos, existem limitações em seu uso, e a extrapolação de resultados dos modelos animais para humanos deve ser realizada com cautela (DAMATTA, 2010). A cavidade bucal representa um ambiente único em nosso corpo, pertencendo ao sistema digestório, e sendo uma via de acesso às vias aéreas, provê condições favoráveis para a proliferação de vários microorganismos, sendo que cerca de 350 espécies constituem a microbiota bucal, com uma média de 750 milhões de bactérias/ml de saliva (PALONE, et al., 2013). Replicar tais condições em um modelo animal se torna de extrema dificuldade, tendo em vista suas diferenças anatômicas, fisiológicas, do funcionamento de órgãos, metabolismo, absorção de drogas, mecanismos genéticos, entre as outras (KITADA et al., 2016). O presente estudo apresenta limitações em relação a real aplicação destes resultados na clínica odontológica, e embora novos métodos tenham sido propostos para a substituição da experimentação animal, nem sempre esses métodos alternativos tem a capacidade de substituir esse modelo experimental (SILVA, et al., 2016). Devido a estas questões, se faz necessário à realização de novas e futuras pesquisas na literatura para avaliar a Hidroxiapatita e o Vidro Bioativo como substitutos em defeitos ósseos.

## **7 CONCLUSÃO**

Dentro dos limites deste estudo podemos concluir que tanto a Hidroxiapatita (HAP-91®) quanto o Vidro Bioativo guiaram a formação de um novo tecido ósseo, servindo de arcabouço para a manutenção espacial de defeitos ósseos de tamanho crítico na calota craniana de ratos.

## REFERÊNCIAS

ABIRAMAN, S. et al. Preliminary in vitro and in vivo characterizations of a sol-gel derived bioactive glass-ceramic system. **Bulletin of Materials**, Indian, v. 25, n. 5, p. 419-429, 2002.

AHMET, K. et al. Trends in Bone Graft Use in the United States. **Orthopedics**, Vienna, v. 37, n. 9, p. 783-788, 2014.

ALMEIDA J. M. et al. Estudo Histomorfométrico Do Processo De Cicatrização Óssea Em Defeitos Cirúrgicos De Tamanho Crítico Em Calvárias De Ratos Preenchidos Com Polímero De Mamona. **Revista Odontológica de Araçatuba**. São Paulo, v. 31, n. 1, p. 22-27, 2010.

ALPAN, A. L. et al. Ozone Therapy Enhances Osseous Healing in Rats With Diabetes With Calvarial Defects: A Morphometric and Immunohistochemical Study. **J Periodontol**, Massachusetts, v. 87, n. 8, p. 982-989, 2016.

AI RUHAIMI, K. A. Bone graft substitutes: a comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials. **Int J Oral Maxillofac Implant**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 105-114, 2001.

AMARAL, M. B. **Citotoxicidade in vitro e biocompatibilidade in vivo de compósitos a base de hidroxiapatita, colágeno e quitosana**. 2006. 98 folhas. Dissertação para título de Mestre (Mestrado em Odontologia), USP, São Carlos, 2006.

ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, California, v. 31, p. 81-110, 2001.

ANDRÉ, L. F. M. **Atlas de implantes Cone Morse**: da cirurgia à prótese. São Paulo. Editora Napoleão, 2011.

AOKI, H. Medical applications of hydroxyapatite. **Takayama Press System Center Co.** 1 ed. Tokyo; 1994.

BEDOYA, S. A. O. et al. Caracterização de colágenos tipos I e III no estroma do carcinoma de células escamosas cutâneo em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** São Paulo, v. 68, n. 1, p. 147-154, 2016.

BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. **Hand Clin**, Filadélfia, v. 28, n. 4, p. 457–468, 2012.

BI, L. et al. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds. **Journal Of Biomedical Materials Research**, Estados Unidos, v. 100A. n. 12. p. 3267-3275, 2012.

BI, L. et al. Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 9, n. 8, p. 8015–8026, 2013.

BLOKHUIS, T. J. e ARTS J. J. C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. **Injury, Int. J. Care Injured**, Washington, v. 42, n. 2, p. S26–S29, 2011.

BOOS, F. B. D. J. et al. O uso do beta-tricálcio fosfato como substituto ósseo em Odontologia. **ImplantNews**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 89-92, 2013.

BOSCO, A. F. Effects of low-level laser therapy on bone healing of critical-size defects treated with bovine bone graft. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, Amsterdam, v. 163. p. 303–310, 2016.

CALORI G. M. et al. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? **Injury, Int. J. Care Injured**, Washington, v. 42, n. 2, p. S56–S63, 2011.

CARDOSO, A. K. M. V. et al. Histomorphometric Analysis of Tissue Responses to Bioactive Glass Implants in Critical Defects in Rat Calvaria. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 184, p. 128–137, 2006.

CARLO, E.C. et al. Avaliação do efeito osteoindutor da hidroxiapatita a do biovidro implantados em tecido subcutâneo de cão. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 54, n. 316, p. 492-500, 2007.

CHACKO, N. L. et al. A Clinical and Radiographic Evaluation of Periodontal Regenerative Potential of PerioGlas®: A Synthetic, Resorbable Material in Treating Periodontal Infrabony Defects. **Journal of International Oral Health**, India, v. 6, n. 3, p. 20-26, 2014.

CHAI, Y. C. et al. Harnessing the Osteogenicity of In Vitro Stem Cell-Derived Mineralized Extracellular Matrix as 3D Biotemplate to Guide Bone Regeneration. **Tissue Eng Part A**. Mar 24. doi: 10.1089/ten.tea.2016.0432. [Epub ahead of print], 2017.

CHAN, C. et al. Evaluation of Bioglass/dextran composite as a bone graft substitute. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 31, n. 1, p. 73-77, 2002.

CHOI, D.; KUMTA, P. N. An alternative chemical route for the synthesis and thermal stability of chemically enriched hydroxyapatite. **J. Am. Ceram. Soc.** California, v. 89, n. 2, p. 444–449, 2006.

CONZ, M. B. et al. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **J Appl Oral Sci**. São Paulo, v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.

CORREIA, F. et al. Levantamento do seio maxilar pela técnica da janela lateral: tipos enxertos. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac**. Porto, v. 5, n. 3, p. 190–196, 2012.

COSTA, N. M. F.; MELO, B. R.; et al. Quality and Intensity of the Tissue Response to Two Synthetic Granular Hydroxyapatite Implanted in Critical Defects of Rat Calvaria. **Materials Research**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 245-251, 2009.

CRUZ, A. C. C. et al. Use Of Bioactive Glasses as bone graft substitutes – A review of literature. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. São Paulo, v. 18, n. 3, p. 287-295, 2006.

DA MATTA R. A. Modelos Animais na Pesquisa Biomédica. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 20, n. 3, p. 210-211, 2010.

DANTAS, T. S. et al. Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**. Pernambuco, v. 13, n. 2, p. 131-135, 2011.

DEFORGE, D. H. Evaluation of Bioglass®/Perioglastm (Consiltm) synthetic bone graft particulate in the dog and cat. **Journal of Veterinary Dentistry**. Belo Horizonte, v. 14, n. 4, p. 141-145, 1997.

DEHKORDI, et al. Radiological and histological comparison between nano-bioglass and commercial bioglass in bone healing in a rabbit model. **Comp Clin Pathol**. Harrow, v. 25, n. 1, p. 37–41, 2016.

DELIORMANLI, A. M. et al. Evaluation of borate bioactive glass scaffolds with different pore sizes in a rat subcutaneous implantation model. **Journal of Biomaterials Applications**, Canada, v. 28, n. 5, p. 643–653, 2014.

DESTERRO, Fernanda de P. et al. Can Inorganic Bovine Bone Grafts Present Distinct Properties? **Brazilian Dental Journal**. São Paulo, v. 25, n. 4. p. 282-288, 2014.

DOROZHKIN, S. V.; EPPLE, M. Biological and medical significance of calcium phosphates. **Angew. Chem. Int.** v. 41, n. 17, p. 3130, 2002.

DUTTA, S. R. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. **Ir J Med Sci**, Online, v 184, n 1, p. 101–106. 2015.

FERNÁNDEZ R. F. et al. Bone grafts utilized in dentistry: an analysis of patients' preferences. **BMC Med Ethics**, Egito, v. 20, n. 16, p. 2-6, 2016.

FERREIRA, G. R. et al. Lack of Repair of Rat Skull Critical Size Defect Treated with Bovine Morphometric Protein Bound to Microgranular Bioabsorbable Hydroxyapatite. **Braz Dent J**, Bahia, v. 15, n. 3, p. 175-180, 2004.

FIORILLI, S. et al. Electrophoretic deposition of mesoporous bioactive glass on glass–ceramic foam scaffolds for bone tissue engineering. **J Mater Sci: Mater Med**, Online, v. 26, n. 21, p. 16-21, 2015.

FOOK, A. C. B. M.; APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de biocerâmicas porosas de hidroxiapatita para utilização como scaffolds para

regeneração óssea. **Revista Matéria**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 392 - 399, 2010.

FU, Q. et al. Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation. **J Biomed Mater Res A**, Europa, v. 95, n. 1, p. 164-171, 2010.

FULMER, M. T. et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 751-755, 2002.

FURUSAWA, T.; MIZUNUMA, K. Osteoconductive properties and efficacy of resorbable bioactive glass as a bone grafting material. **Implant Dent**, Florida, v. 6, n. 2, p. 93-101, 1997.

GAO, R. et al. Local Application of Lactoferrin Promotes Bone Regeneration In a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model As Demonstrated by Micro-CT And Histological Analysis. **J Tissue Eng Regen Med**, doi: 10.1002/term.2348, 2016.

GAO, T. J. et al. Microscopic evaluation of bone implant contact between hydroxyapatite, bioactive glass and tricalcium phosphate implanted in sheep diaphyseal defects. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 16, n. 15, p.1175-1179, 1995.

GARCIA, G. V. et al. Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats. **J Clin Periodontol**, Nova Jersey, v. 38, n. 12. p. 1106-1114, 2011.

GARCIA, G, V. Effect of LLLT on autogenous bone grafts in the repair of critical size defects in the calvaria of immunosuppressed rats. **J of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, Amsterdam, v. 42, n. 7, p. 1196-1202, 2014.

GARETA, E. G. et al. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**, Amsterdam, v 81, p. 112-121, 2015.

GESTEL, N. A. P. V. et al. Clinical Applications of S53P4 Bioactive Glass in Bone Healing and Osteomyelitic Treatment: A Literature Review. **BioMed Research International**, Hindawi, v. 2015, p. 1-12, 2015.

GLOWACKI, J.; MULLIKEN, J. B. Demineralized bone implants. **Clin Plast Surg**, Boston, v. 12, p. 233–241, 1985.

GREER, R. T.; PEARSON, P. T. Biomateriais. In: Slatter D (Ed) **Manual de cirurgia de pequenos animais**. São Paulo, Editora Manole. p. 133-142, 1998.

GRETZER, C. et al. The inflammatory cell influx and cytokines changes during transition from acute inflammation to fibrous repair around implanted materials. **Journal of biomaterials science. Polymer edition**. São Carlos, v. 17, n. 6, p. 669-687, 2006.

GROSS, U. M.; MULLER-MAI, C. M.; VOIGT, C. The interface of calcium-phosphate and glass-ceramic in bone; a structural analysis **Biomaterials**, Amsterdam, v. 11, p. 83–85, 1990.

HATTAR, S. et al. Potential of biomimetic surfaces to promote in vitro osteoblast-like cell differentiation. **Biomaterials**, Amsterdam, v 26, n 8, p. 839-848, 2005.

HAYASHI, Fernando; Junior, Luiz R. **Implantes em áreas estéticas: Conceitos atuais de cirurgia e prótese**. Nova Odessa, São Paulo. Ed Napoleão, 1ª edição, 2011.

HENCH, L. L. Bioactive ceramics. **Ann. NY Acad. Sci**, Nova York, v. 524, p. 54–71, 1988.

\_\_\_\_\_. Bioceramics: from concept to clinic **J. Am. Ceram. Soc**, California, v. 74, n. 7, p. 1487, 1991.

\_\_\_\_\_. The story of Bioglass. **J Mater Sci: Mater Med**, Nova York, v. 17, n. 11, p. 967–978, 2006.

HENCH, L. L.; WILSON, J. Surface-active biomaterials. **Science**, Washington, v. 226, p. 630-640, 1984.

HOPPE, A. et al. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 32, n. 11, p. 2757-2774, 2011.

HUANG, Y. C.; HSIAO, P. C.; CHAI, H. J. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. **Ceram. Int**, Taiwan, v. 37, n. 6, p.1825–1831, 2011.

ISSA, J. P. et al. Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rhBMP-2. **Clinical Oral Implants Research**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 558-566. 2015.

JIANG, Z. Q. et al. Repair of calvarial defects in rabbits with platelet-rich plasma as the scaffold for carrying bone marrow stromal cells. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, Amsterdam, v. 113, n. 3, p. 327-333, 2012.

JIMI, E.; HIRATA, S. et al. The Current and Future Therapies of Bone Regeneration to Repair Bone Defects. **International Journal of Dentistry**, São Paulo, v. 2012, p. 1-7, doi:10.1155/2012/148261, 2012.

JOHN, A.; et al. In vitro investigations of bone remodeling on a transparent hydroxyapatite ceramic. **Biomed. Mater.** Cambridge, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2009.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. **Acta Biomaterialia**, Amsterdam, v. 9, p. 4457–4486, 2013.

JONES, L. et al. Biomechanical evaluation of rat skull defects, 1, 3, and 6 months after implantation with osteopromotive substances. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, Amsterdam, v. 35, n. 8, p. 350–357, 2007.

KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 27, p. 5474–5491, 2005.

KAUFMANN, E. A.; DUCHEYNE, P.; SHAPIRO, I. M. Effect of varying physical properties of porous, surface modified bioactive glass 45S5 on osteoblast proliferation and maturation. **J Biomed Mat Res**, Nova Jersey, v. 52, n. 4, p. 784-796, 2000.

KIM, R. W. et al. Effect of hydroxyapatite on critical-sized defect. **Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery**, Korea, v. 38, n. 26, p. 1-6, 2016.

KITADA, M.; OGURA, Y.; KOYA, D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. **Int J Nephrol Renovasc Dis**, Brussels, v.14, n. 9, p. 279-290, 2016.

KUMAR, P.; BELLIAPPA, V.; GHOSIA, F. Bone Grafts in Dentistry. **J Pharm Bioallied Sci.** v 5, n 1, p. S125–S127, 2013.

KURKCU, M. et al. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs betatricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study **J. Oral Implantol**, Winston, v. 38, n 1, p. 519–526, 2012.

LARSSON, S. Calcium Phosphates: What Is the Evidence? **J Orthop Trauma**, Filadelfia, v. 24, n. 3, p. 41-45, 2010.

LEGEROS, R. Z. et al. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **J. Mater. Sci., Mater. Med**, Nova York, v. 14, n. 3, p. 201–209, 2003.

\_\_\_\_\_. Properties os osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. Orthop. Rel. Res**, Nova York, v. 395, p. 81-98, 2002.

LEMONS, J. E. Bioceramics. Is there a difference? **Clin Orthop Relat Res**, Nova York, v. 261, p. 153. 1990.

LENZ, J. H. et al. Reconstruction of the frontal calvarian continuity in a child using a freeze-preserved autogenous bone graft. **J Cranio-Maxillofac Surg**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 154–158, 2003.

LI, et al. Minimally traumatic alveolar ridge augmentation with a tunnel injectable thermo-sensitive alginate scaffold. **J Appl Oral Sci**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 215-223, 2015.

LINDHE, J; NIKLAUS P. L.; THORKILD K. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª edição, 2010.

LIU, T. et al. Synthesis and characterization of a novel mesoporous bioactive glass/hydroxyapatite nanocomposite. **Materials Letters**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 444–447, 2013.

LOHMANN, P. et al. Bone Regeneration induced by a 3D architected hydrogel in a rat critical-size calvarial defect. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 113, p. 158-169, 2017.

LOSSDORFER, S.; et al. Osteoblast response to bioactive glasses in vitro correlates with inorganic phosphate content. **Biomaterials**. Amsterdam, v. 25, n. 13, p. 2457-2555, 2004.

LUTTIKHUIZEN, D. T.; HARMSE, M. C.; VAN LUYN, M. J. Cellular and molecular dynamics in the foreign body reaction. **Tissue engineering**. v 12, n 7, p. 1955-1970, 2006.

MARQUES, E. et al. New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers Med Sci**, Nova York, v. 30, n. 4, p. 1225-1230, 2015.

MARTINS, A. C. O. **Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com B-fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + B-fosfato tricálcio e osso autógeno**. 180 f. Dissertação para título de Mestre (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo. 2010.

MESSORA, M. R. et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma: a histologic and histometric study in rat calvaria. **J Periodontol Res**, Nova Jersey, v. 43, n. 2, p. 217–223, 2008.

MERKX, M. A. et al. Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 20, n. 7, p. 639–645, 1999.

MISCH, C. E. **Implantes dentais contemporâneos**. Rio de Janeiro: Elsevier, 3ª edição, 2009.

MOLINARO, E. et al. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde**. Rio de Janeiro, Volume 2, EPSJV; IOC, 2010.

MOORE, W. R.; GRAVES, S. E.; BAIN, G.I. Synthetic bone graft substitutes. **ANZ J Surg**, Nova Jersey, v. 71, n. 6, p. 354–361, 2001.

NAGATA M. et al. Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, Amsterdam, v. 45, n. 2. p. 339-345, 2009.

NANDI, S.K. et al. "Orthopaedic Applications of Bone Graft & Graft Substitutes: A Review," **Indian Journal of Medical Research**, India, v. 132, n. 1, p. 15-30, 2010.

OLIVEIRA, M.R. et al. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg**, Amsterdam, v. 44, n. 5, p. 649–655, 2015.

OTONNI, J. M. Pinheiro, et al. **Manipulação Tecidual – possibilidades e realidade**. Nova Odessa, São Paulo. Editora Napoleão, 1ª edição, 2011.

PALONE, M. R. T. et al. A importância do controle da microbiota bucal e o uso de biomaterial em cirurgias de enxerto alveolar secundário nos pacientes com fissura labiopalatina. **Investigação**, Franca, v. 13, p. 19-23, 2013.

PANG, E. K. et al. Effects of Chitosan on Human Periodontal Ligament Fibroblasts In Vitro and on Bone Formation in Rat Calvarial Defects. **J Periodontol**, Nova Jersey, v. 76, n. 9, p. 1526-1533, 2005.

PARK, J. W. et al. Bone healing with oxytocin-loaded microporous b-TCP bone substitute in ectopic bone formation model and critical-sized osseous defect of rat. **J Clin Periodontol**, Nova Jersey, v. 41, n. 2, p. 181–190, 2014.

PETTINICCHIO, M. et al. Histologic and histomorphometric results of three bone graft substitutes after sinus augmentation in humans. **Clin Oral Invest.**, Nova York, v. 16, n. 1, p. 45-53, 2012.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials Science: A Introduction to Materials in Medicine**. 3 ed. Elsevier, Amsterdam, 2013.

\_\_\_\_\_. **Biomaterials Science: A Introduction to Materials in Medicine**. Academic Press. Elsevier, Amsterdam, 2004.

REYNOLDS, M. A.; REIDY, M. E. A.; MAYS, G. L. B. Regeneration of Periodontal Tissue: Bone Replacement Grafts. **Dent Clin N Am**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 55–71, 2010.

ROJBANI, H. et al. Evaluation of the osteoconductivity of alpha-tricalcium phosphate, beta-tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. **J. Biomed. Mater. Res. A**, Nova Jersey, v. 98A, n. 4, p. 488–498, 2011.

RONDINELLI P.C, et al. Rotina do banco de ossos do Hospital de Traumatologia e Ortopedia (HTO-RJ). **Rev. Bras. Ortopedia**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 6, p. 385-388, 1994.

SAIMA, S. et al. Bone grafts and bone substitutes in dentistry- Review Article. **Journal of Oral Research and Review**, India, v. 8, n. 1, p. 36-38, 2016.

SALGADO, P. C. et al. Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, California, v. 2, n. 1, p. 318-328, 2011.

SARKAR, S. K. e LEE, B. T. Hard tissue regeneration using bone substitutes: an update on innovations in materials. **Korean J Intern Med**, Korea, v. 30, n. 3, p. 279-293, 2015.

SHAPOFF, C. A.; ALEXANDER, D. C.; CLARK, A. E. Clinical use of a bioactive glass particulate in the treatment of human osseous defects. **Compendium**, v. 18, n. 4, p. 352-363, 1997.

SHEYLA, M. C. et al. **HAP-91® E COL.HAP-91® CASUÍSTICAS E ESTUDOS CIENTÍFICOS**. 4a Edição. JHS Biomaterials, Sabará. 2008.

SILVA, R. M. et al. Experimentação Animal e Ensino. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 1, p. 90-100, 2016.

SILVER, I. A.; DEAS, J.; ERECINSKA, M. Interactions of bioactive glasses with osteoblasts in vitro: effects of 45S5 Bioglass, and 58S and 77S bioactive glasses on metabolism, intracellular ion concentrations and cell viability. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 175-85, 2001.

SIKAVITAS, V. I. et al. Review Biomaterials and bone mechanotransduction. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 22, n. 19, p. 2581-2593, 2001.

SOGAL, A. and TOF, A. J. Risk Assessment of Bovine Spongiform Encephalopathy Transmission Through Bone Graft Material Derived From Bovine Bone Used for Dental Applications. **J Periodontol**, Nova Jersey, v. 70, n. 9, p. 1053-1063, 1999.

SOUZA, D. F. M. et al. Adverse effect of beta-tricalcium phosphate with zeta potential control in repairing critical defects in rats' calvaria. **Rev Bras Ortop**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 3, p. 346-352, 2016.

STRECKBEIN, P. et al. Reconstruction of critical size mandibular defects in immunoincompetent rats with human adipose-derived stromal cells. **J Craniomaxillofac Surg**, Amsterdam, v. 41, n. 6, p. 496-503, 2013.

SUENAGA, H. et al. Bone regeneration in calvarial defects in a rat model by implantation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell spheroids. **J Mater Sci: Mater Med**, Nova York, v. 254, n. 26, p. 2-6, 2015.

TAKAHIRO, B. et al. Effect of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA)-coated beta-tricalcium phosphate on the healing of rat calvarial bone defects: a comparative study with pure-phase beta-tricalcium phosphate. **Clini Oral Impl. Res**, Nova Jersey, v. 27, n. 11, p. 1360–1367, 2016.

TAKAUTI, C. A. Y. et al. Assessment of Bone Healing in Rabbit Calvaria Grafted with Three Different Biomaterials. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 5, p. 379-384, 2014.

TEN CATE. **Histologia Oral: Desenvolvimento, estrutura e função**. Rio de Janeiro: Elsevier, 7ª edição, 2008.

TIOMIS, A. C. et al. Avaliação histológica do biovidro particulado na reparação de defeito experimental em mandíbula de cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, Belo Horizonte, v. 62, n. 1, p. 80-85, 2010.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em Cirurgia Craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações - revisão de literatura. **Rev. Bras. Cir. Plást**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 234-239, 2008.

URIST, M. R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, Washington, v. 150, n. 3698, p. 893–899, 1965.

VAL, J. E. M. S. et al. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction in vivo. Part A: synthesis, characterization of the materials, and SEM analysis. **Clin. Oral Impl. Res.**, Nova Jersey, v. 27, n. 11, p.1–8, 2015.

\_\_\_\_\_. et al. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction in vivo. Part B: a comparative study with biphasic synthetic biomaterials. **Clin. Oral Impl. Res.**, Nova Jersey, v. 00, p. 1–8, 2016.

VAN DER STOK, J. et al. Bone substitutes in the Netherlands: a systematic literature review. **Acta Biomater**, Amsterdam,, v. 7, n. 2, p. 739–750, 2011.

VOGEL, M.; et al. In vivo comparison of bioactive glass particle in rabbits. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 357-62, 2001.

WHANG, K., et al., “Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture”. **Tissue Engineering.**, Nova Jersey, v. 5, n. 35, p. 35-51, 1999.

WILLIAMS I. F. Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials. **Elsevier**, Amsterdam, v. 4, March, 1986.

XYNOS, I. D. et al. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass® 45S5 dissolution. **J. Biomed. Mater. Res.**, Nova Jersey, v. 55, n. 2, p. 151-157, 2001.

ZACARI, S. M. et al. Nanophase Hydroxyapatite as a Biomaterial in Advanced Hard Tissue Engineering:A Review. **TISSUE ENGINEERING: Part B.**, Nova Jersey, v. 19, n. 5, p. 431-441, 2013.

ZHANG, X. et al. Osteoconductive effectiveness of bone graft derived from antler cancellous bone: an experimental study in the rabbit mandible defect model **Int. J. Oral Maxillofac Surg.**, Amsterdam, v. 41, n. 11, p. 1330–1337, 2012.

ZHANG, Z.; WANG, J.; LU, X. An integrated study of natural hydroxyapatite-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells using transcriptomics, proteomics and microRNA analyses. **Biomed. Mater.** Bristol, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.

## ANEXOS

### ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 673/2015, sob responsabilidade de Leandro Araújo Fernandes, referente ao projeto intitulado "Avaliação da hidroxiapatita HAP-91 e biovidro no reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos" está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL).

Alfenas, 02 de outubro de 2015.

*Estela Regina de Oliveira*

Prof.ª Dr.ª Estela Regina de Oliveira  
Presidente CEUA/UNIFAL