

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GERALDO ALVES VILLELA JUNIOR

**AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DE
CIMENTO BIOCERÂMICO REPARADOR EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE
RATOS.**

Alfenas/MG

2023

GERALDO ALVES VILLELA JUNIOR

**AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DE
CIMENTO BIOCERÂMICO REPARADOR EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE
RATOS.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano

Alfenas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca

Villela Junior, Geraldo Alves.

Avaliação tomográfica, histológica e histométrica de cimento biocerâmico reparador em defeitos de calvária de ratos. / Geraldo Alves Villela Junior. - Alfenas, MG, 2023.

75 f. : il. -

Orientador(a): Ronaldo Célio Mariano.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Biomateriais. 2. Cimento biológico. 3. Biocerâmica. 4. Osso autógeno. 5. Osso bovino. I. Mariano, Ronaldo Célio, orient. II. Título.

GERALDO ALVES VILLELA JUNIOR

**AVALIAÇÃO TOMOGRÁFICA, HISTOLÓGICA E HISTOMÉTRICA DE
CIMENTO BIOCERÂMICO REPARADOR EM DEFEITOS DE CALVÁRIA DE
RATOS.**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da 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

Aprovada em: 29 de junho de 2023.

Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG

Prof. Dr. José Dias da Silva Neto
Instituição: Universidade do Vale do Sapucaí-MG

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



Documento assinado eletronicamente por Ronaldo Célio Mariano, Professor do Magistério Superior, em 30/06/2023, às 13:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1013165 e o código CRC 36366983.

Dedico esse trabalho ao meu pai, Geraldo Alves Villela (*in memoriam*), mesmo ausente, sempre sinto seu apoio e presença.

AGRADECIMENTOS

Impossível iniciar a sessão de agradecimentos sem agradecer inicialmente ao criador de tudo, sem Deus nada faria sentido.

Agradeço as mulheres da minha vida: mãe, esposa e filhas.

Minha mãe, Maria Aparecida Diniz, quem sempre me apoiou e além disso sempre me cobrou para ser a cada dia um homem melhor. Esse apoio iniciou desde muito antes dessa pós-graduação, iniciou quando foi obrigada pelo destino a exercer o papel de pai, função da qual cumpriu com maestria, não sei se eu teria tanto força e determinação que senhora teve.

Minha esposa, Nadiele Ribeiro Marques, fiel companheira que desde o início dessa jornada foi uma entusiasta, me apoiando incondicionalmente, vivendo essa etapa da minha jornada na terra como se fosse sua.

Agradeço as minhas filhas, Mariana Marques Villela e Alice Marques Villela, se hoje busco ser um homem melhor é para que algum dia tenham orgulho de mim.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano que quando o procurei além de me receber de braços abertos, mesmo após 10 anos de formado, ainda se lembrava de mim. Na primeira conversa com o Prof. Ronaldo jamais esquecerei do que me disse “Você não poderia ter saído do meio acadêmico, mas ainda é tempo de voltar!”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG, todo corpo docente e discente que juntos formamos um excelente grupo de estudos, tenho certeza de que todos evoluíram em nossas reuniões.

Durante os 10 anos após minha formatura sempre acreditei que não seria possível conciliar vida acadêmica e profissional, mas com o surgimento do coronavírus SARS-CoV-2, fui obrigado a reduzir minha carga horária de trabalho, graças a esse vírus eu enxerguei que seria possível voltar a vida acadêmica, como Jesus falou: “Deus escreve certo por linhas tortas.” Sendo assim devo agradecer à COVID-19 ou até hoje não teria criado coragem de iniciar essa pós-graduação.

À Universidade Federal de Alfenas, a universidade do meu coração.

O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

Mas o que para o mundo é loucura, Deus o escolheu para envergonhar os sábios, e que para o mundo é fraqueza, Deus o para envergonhar o que é forte.

(PAULO DE TARSO, Bíblia, 1 Coríntios 1:27)

RESUMO

Estabelecer estratégias para restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos ósseos, envolve a investigação de biomateriais que demonstrem capacidade de melhorar a reparação óssea, especialmente quando defeitos ósseos críticos estão presentes. O estudo avaliou o comportamento do cimento biocerâmico PBS CIMMO HP[®] (Pozzolana Biologic Silva) quando utilizado como material de preenchimento de defeitos em calvária de ratos, isoladamente ou associado ao osso autógeno ou bovino, através de análises histológica, histométrica e tomográfica. Foram utilizados 60 ratos albinos Wistar para criação de defeitos críticos de 6 mm nas calvárias, divididos em 6 grupos: coágulo sanguíneo, osso autógeno, cimento biocerâmico PBS CIMMO[®], osso bovino particulado, osso bovino particulado + PBS CIMMO[®], osso autógeno + PBS CIMMO[®]. Após a eutanásia ao 30 e 60 dias exame tomográfico permitiu o cálculo da densidade óssea através de análise das imagens utilizando o software ImageJ e OneVolumeViewer. Para realizar o exame histológico seguiu o protocolo habitual de descalcificação e coloração em hematoxilina e eosina, e as análises foram realizadas em microscopia de luz em objetivas de 2,5, 10 e 40. Na análise tomográfica apresentou maiores densidades para o grupo PBS CIMMO[®] em relação ao osso autógeno ($p=0,0305$). Avaliação histológica qualitativa o grupo PBS demonstrou boa formação óssea e presença de material osteóide. A avaliação histomorfométrica mostrou que cimento PBS CIMMO não apresentou diferença estatística em relação ao grupo osso autógeno ($p=0,8641$). O cimento PBS CIMMO[®] isolado, aos 60 dias, mostrou maior densidade em relação ao osso autógeno, sugerindo melhorar reparação óssea, visto que imagens histológicas de colágenos precursores foram evidenciadas nesse período.

Palavras chaves: biomateriais; cimento biológico; biocerâmica; osso autógeno; osso bovino.

ABSTRACT

Establishing strategies to restore, maintain, or improve the function of bone tissues involves the investigation of biomaterials that demonstrate the ability to enhance bone repair, especially when critical bone defects are present. The study evaluated the behavior of the bioceramic cement PBS CIMMO HP® (Biologic Silva Pozzolana) when used as a filling material for defects in rat calvaria, either alone or in association with autogenous or bovine bone, through histological, histometric, and tomographic analyses. Sixty Wistar albino rats were used to create critical defects of 6 mm in the calvaria, divided into 6 groups: blood clot, autogenous bone, PBS CIMMO® bioceramic cement, particulate bovine bone, particulate bovine bone + PBS CIMMO®, autogenous bone + PBS CIMMO®. After euthanasia at 30 and 60 days, tomographic examination allowed the calculation of bone density through image analysis using ImageJ software and OneVolumeViewer. For the histological examination, the usual protocol of decalcification and hematoxylin and eosin staining was followed, and the analyses were performed using light microscopy with objectives of 2.5, 10, and 40. In the tomographic analysis, higher densities were observed for the PBS CIMMO® group compared to the autogenous bone group ($p=0.0305$). Qualitative histological evaluation showed that the PBS group demonstrated good bone formation and the presence of osteoid material. Histomorphometric evaluation showed that PBS CIMMO cement did not present statistical differences compared to the autogenous bone group ($p=0.8641$). The isolated PBS CIMMO® cement, at 60 days, showed higher density compared to autogenous bone, suggesting improved bone repair, as histological images of precursor collagens were evidenced during this period.

Keywords: biomaterials; biological cement; bioceramics; autogenous bone; bovine bone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Calibração do software ImageJ para valores da escala de cinza, densidade	29
Figura 2 –	Calibrando ferramentas de medidas do software ImageJ	30
Figura 3 –	Delimitação da área do defeito e obtenção da densidade	31
Figura 4 –	Escala numérica de Hounsfield	32
Figura 5 –	Obtenção da densidade padrão	33
Figura 6 –	Obtenção da densidade no defeito ósseo.	33
Figura 7 –	Demarcação das áreas totais para quantificação de formação óssea ..	34
Figura 8 –	Delimitação das áreas de formação óssea	35
Figura 9 –	Demonstração do agrupamento das imagens histológicas tornando-as em uma imagem panorâmica (aumento de 100X – HE)	39
Figura 10 –	Delimitação da área total e de neoformação óssea (aumento 100X – HE)	37
Figura 11 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos COA e AUT no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X -HE)	43
Figura 12 –	Imagens em aumento de 400X – HE demonstrando a grande quantidade de tecido conjuntivo e poucas fibras colágenas no grupo COA 30 dias	43
Figura 13 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos BOV e PBS no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X - HE)	45
Figura 14 –	Aumento de 400X em HE do grupo BOV no período experimental de 30 dias evidenciando tecido conjuntivo rico em fibroblastos	46
Figura 15 –	Aumento de 400X em HE do grupo BOV no período experimental de 30 dias evidenciando matriz osteóide e osteoblastos	49
Figura 16 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos AUT+PBS e BOV+PBS no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X - HE).	48
Figura 17 –	Aumento de 400X em HE do grupo AUT+PBS no período experimental de 30 dias evidenciando ilhas de ossificação	49

Figura 18 –	Aumento de 100X em HE do grupo AUT no período experimental de 60 dias mostrando o espécime em teve reparação completa do defeito	50
Figura 19 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos COA e AUT no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE)	50
Figura 20 –	Aumento de 400X em HE do grupo AUT no período experimental de 60 dias evidenciando osteoblastos e fibroblastos em meio a fibras colágenas, mais organizadas	51
Figura 21 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos BOV e PBS CIMMO no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE)	52
Figura 22 –	Aumento de 400X em HE do grupo AUT+PBS no período experimental de 60 dias.....	53
Figura 23 –	Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos AUT +PBS e BOV+PBS no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE).....	54
Figura 24 –	Imagem de microscopia com luz polarizada do espécime corado por Picrosirius.....	57
Fotografia 1 –	Sequência cirúrgica demonstrando a utilização do osso autógeno associado ao cimento PBS CIMMO®	26
Fotografia 2 –	Fotografia da realização do exame tomográfico nas calvárias de ratos	28
Fotografia 3 –	Fotografia da configuração do tomógrafo para aquisição das imagens	28
Gráfico 1 –	Gráfico comparando a densidade entre os grupos experimentais no <i>software</i> ImageJ.....	39
Gráfico 2 –	Gráfico comparando a densidade entre os grupos experimentais em HU.....	41
Gráfico 3 –	Quantificação óssea.....	42
Gráfico 4 –	Histometria.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das densidades nos diferentes grupos referentes aos dados coletos nos animais com 4 semanas de eutanásia.....	39
Tabela 2 – Valores das densidades nos diferentes grupos referentes aos dados coletos nos animais com 8 semanas de eutanásia.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

AUT	Grupo tratado com osso autógeno
AUT+PBS	Grupo tratado com osso autógeno associado com cimento PBS CIMMO®
BOV	Grupo tratado com osso bovino
BOV+PBS	Grupo tratado com osso bovino associado ao cimento PBS CIMMO®
COA	Grupo coágulo
FIB	Fibroblastos
MO	Matriz osteóide
MTA	Agregado de trióxido mineral
OB	Partículas de osso bovino
OST	Osteoblastos
ON	Osso neoformado
PBS	Grupo tratado com cimento PBS CIMMO®
ROS	Espécie reativa de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.2.1	Os biomateriais para enxerto ósseos.....	17
2.2.2	O cimento PBS CIMMO®.....	21
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
2.2.1	Animais e delineamento experimental.....	24
2.2.2	Procedimento Cirúrgico.....	25
2.2.3	Análise Tomográfica	27
2.2.3.1	Análise da densidade pelo <i>software</i> ImageJ.....	29
2.2.3.2	Análise da densidade no <i>software</i> OneVolumeViewer.....	31
2.2.3.3	Quantificação de formação óssea.....	34
2.2.4	Análise histológica e histométrica.....	35
2.2.4.1	Processamento das calvárias.....	35
2.2.4.2	Análise Histológica e Histométrica.....	36
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
2.4	RESULTADOS.....	38
2.4.1	Densidade ótica pelo <i>software</i> ImageJ.....	38
2.4.2	Densidade em Unidades de Hounsfield	40
2.4.3	Quantificação da formação óssea na análise tomográfica.....	41
2.4.4	Análise histológica.....	42
2.4.5	Análise histométrica.....	54
2.5	DISCUSSÃO.....	55
3	CONCLUSÃO.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	APÊNDICES	69
	ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

A saúde bucal tem relação direta com a saúde geral. Problemas bucais podem gerar distúrbios mastigatórios, fonéticos e estéticos. Essas alterações podem evoluir para comprometimento sistêmico como: má nutrição, doenças crônicas e psicológicas causadas pela redução da autoestima (FERNANDEZ; ROSA; FERREIRA, 2020).

Frente às mutilações de tecidos decorrentes de patologias bucais, traumas teciduais ou tratamentos mutiladores, a odontologia demonstra constante preocupação com o aprimoramento de recursos e técnicas, bem como aprimora estudos para caracterizar substitutos, principalmente ósseos para reabilitar rebordos alveolares mutilados, principalmente pelas perdas dentárias (MACBETH; DONOS; MARDAS, 2022).

Durante algum tempo o sucesso na Implantodontia seria dependente basicamente da osseointegração, caracterizada pela união tecido ósseo vivo ao implante em níveis macroscópios, com ausência de movimentação entre osso e implante e em níveis microscópicos, à luz da microscopia eletrônica, interação entre osteoblastos e implante (ALBREKTSSON, 1983). Brånemark (1983) definiu, então, o processo de osseointegração como “uma conexão direta estrutural e funcional entre o tecido ósseo normal viável e o implante em função”. Atualmente esse sucesso suplanta conceitos estéticos, saúde periimplantar e parâmetros protéticos associados à osseointegração, é o que pode ser considerado como sucesso. Com o objetivo de alcançar a satisfação máxima do paciente em serreabilitado, fatores relacionados ao paciente como idade, gênero, condições sistêmicas, tabagismo, higiene bucal, quantidade e qualidade do osso residual do rebordo alveolar devem ser levadas em consideração (MOREIRA *et al.*, 2023).

Observa-se grande preocupação em encontrar recursos e materiais eficazes para melhorar qualidade e ganhar quantidade óssea em pacientes com defeitos ou atrofia de rebordos alveolares, impeditivos para a reabilitação com próteses implantossuportadas (FERRATINO *et al.*, 2023).

Uma vez que para realizar uma reabilitação implantossuportada a necessidade de tecido ósseo sadio é pré-requisito indispensável. Biomateriais para substituir o tecido ósseo perdido precisam fornecer estrutura e composição química semelhante ao osso humano. Um material adequado deve apresentar como características: biocompatibilidade (capaz de interagir com o organismo sem provocar respostas adversas), osteocondução, osteoindução e serem absorvíveis (ser substituído por osteoblastos do hospedeiro), serem

seguros, de fácil manipulação e apresentarem custo-benefício (CYPHER E GROSSMAN, 1996).

Os biomateriais são substâncias ou conjunto de substâncias, sintéticas ou naturais, usadas com objetivo de aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no corpo humano completa ou parcialmente perdida ou mutilada (SILVA *et al.*, 2018; GALLO *et al.*, 2022). A Engenharia Tecidual é uma área que pesquisa novos biomateriais que apresentam propriedades químicas e biológicas que objetivam reconstruir ou regenerar tecidos ou órgãos. Conta com o desenvolvimento de materiais para serem aplicados na reconstrução de tecidos moles ou duros como o tecido ósseo, utilizando-se de estratégias diferenciadas. De modo geral, as estratégias da engenharia tecidual podem estar apresentadas em três grupos: implantação de células ou substituição de células, liberação de substâncias que induzem o crescimento tecidual e a união de células em diferentes matrizes (SOBCZAK-KUPIEC *et al.*, 2021).

Os cimentos odontológicos bioativos, biocerâmicos, originados do cimento Portland da construção civil, proporcionam formação de fosfatos de cálcio amorfos, precursores de carbonato de apatita. Essa interação na interface entre cimento e osso, promove a biomineralização e tal mecanismo de ação, aplicado na região do ápice radicular, leva à formação de ligamento periodontal na interface osso-dentina. (BHAGAVALDAS *et al.*, 2017; BOCZAR *et al.*, 2020; SANTIAGO *et al.*, 2021; PEDROSA *et al.*, 2021; GANDHI B.; HALEBATHI-GOWDRA R., 2017; REYES-CARMONA *et al.*, 2009; TORABINEJAD *et al.*, 1993). Vários cimentos odontológicos originados do cimento Portland apresentam semelhanças de pH, solubilidade, densidade, atividade microbiana, comportamento biológico, além de apresentarem baixa resistência a compressão (PEDROSA *et al.*, 2022; GONÇALVES *et al.*, 2022; PEDROSA *et al.*, 2022).

Os cimentos biocerâmicos indutores de formação de tecido mostram promissora aplicação em tecidos mineralizados e sua investigação em modelos animais de defeitos críticos pode trazer informações importantes sobre seu comportamento quando aplicados diretamente em contato com o osso em cicatrização. Esses cimentos também podem contribuir para aprimorar ou agregar características importantes a outros biomateriais de enxerto (DE OLIVEIRA JUNIOR J. M. *et al.* 2021; LU, J.; YU, H.; CHEN, C., 2018).

O Cimento PBS CIMMO[®] é um desses cimentos odontológicos disponíveis no mercado para uso especialmente em tratamento endodôntico. Diante de resultados inusitados, a respeito do comportamento dos cimentos CIMMO[®], nos tecidos periapicais e perirradiculares, que indicam possibilidade de contribuição para formação óssea (SILVA NETO *et al.*, 2010; SILVA NETO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2016). Diante

dos poucos trabalhos publicados na literatura, associados aos estudos incipientes que investigaram o seu comportamento no preenchimento de defeitos ósseos em fêmur de animais (CORRÊA, 2019) ou nas adjacências de implantes osseointegráveis (ZERBINATTI *et al.*, 2019), além de 2 estudos clínicos (MOYSÉS *et al.*, 2020 e FREITAS PEDROSA *et al.*, 2022), tornou-se oportuna a avaliação do cimento PBS em defeitos ósseos críticos em modelos de calvária de ratos albinos.

Justifica-se, o estudo utilizando o cimento biocerâmico PBS CIMMO[®] e, principalmente considerando que as biocerâmicas são compostos biocompatíveis que apresentam propriedades de bioatividade e biomimetismo, por sua similaridade com o processo biológico de formação de hidroxiapatita e por sua capacidade de osteoindutoras na presença de processo de cicatrização óssea (LU, J.; YU, H.; CHEN, C., 2018).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do cimento PBS CIMMO HP[®], associado ou não ao osso autógeno bovíno, quando utilizados como material de preenchimento de defeitos ósseos críticos em calvárias de ratos adultos metabolicamente normais.

1.1.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos do presente trabalho:

- a) Avaliar e quantificar a formação de tecido ósseo em defeitos críticos em calvária de ratos através de análises histométrica e tomográfica;
- b) Comparar estatisticamente a formação óssea promovida pelo cimento PBS CIMMO[®] frente ao osso autógeno, bovíno e associações com o cimento PBS CIMMO[®] na reparação óssea de defeitos críticos em calvária de ratos Wistar.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Os biomateriais para enxerto ósseos

A reconstrução dos maxilares tem o intuito de proporcionar quantidade e qualidade de tecido ósseo para permitir métodos de reabilitação mastigatória, especialmente através das próteses implanto suportadas. A quantidade óssea suficiente e a qualidade do osso adequadas são consideradas como principais fatores de sucesso nos tratamentos com implantes dentários. Com o recontorno dos rebordos alveolares atrofiados ou mutilados, é possível melhorar o posicionamento dos implantes e conseqüentemente otimizar a função, a estética buco-maxilo-facial e a fonética evidentemente perdidas com as mutilações ocorridas no sistema estomatognático (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009).

O osso autógeno é o padrão ouro em materiais de enxerto. Por ser o único material que apresenta características osteogênica (capacidade de formar tecido ósseo), osteocondutora (capacidade de servir como um arcabouço para proliferação de osteoblastos) e osteoindutora (capacidade de diferenciar células mesenquimais em osteoblastos), uma busca constante e novos estudos são encontrados na literatura visando identificar biomateriais capazes de o substituir pois para a utilização do osso autógeno como enxertos nas correções dos defeitos ósseos mutiladores do complexo bucomaxilofacial, maior custo biológico trazido pela necessidade de cirurgia adicional no leito doador, proporcionam maior morbidade e riscos de complicações trans e pós-operatórias. Além desta evidente desvantagem, associa-se à disponibilidade limitada de tecido ósseo nas diferentes áreas doadoras, principalmente quando intrabucais (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009).

Considerando as características de osteogenicidade, osteocondução e osteoindução propiciadas pelo osso autógeno, que o tornam o material ideal para guiar a regeneração óssea, nem sempre estão todas presentes com a mesma magnitude. Dependendo da área doadora, a capacidade osteogênica e a taxa de reabsorção podem apresentar diferenças (KLIJN *et al.*, 2010). Essa diferença de estabilidade do osso autógeno está principalmente relacionada com a origem doadora do tecido ósseo (intra ou extrabucal). Duas teorias parecem explicar a maior ou menor taxa de reabsorção: a Lei de Wolf que afirma que um osso originário de uma determinada área doadora que recebe mais forças e é transplantado para uma área de menor presença de cargas tende a reabsorver mais rápido (como exemplo, um enxerto ósseo obtido da

área doadora crista ilíaca e transplantado para região que recebe menos carga como os rebordos alveolares); e a segunda teoria diz respeito às diferentes origens embriológicas entre os ossos doadores (maxilares apresentam origem ectodérmica e crista ilíaca mesenquimal) (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009).

Sakkas *et al.* (2017) concluíram que enxerto com osso autógeno independente da área doadora, intra ou extraoral, apresentou taxa de sucesso de 95,6% e apenas 0,38% de falhas em implantes com acompanhamento de no mínimo três anos. Alertou ainda que no passado a principal desvantagem de enxertos autógenos era alterações em tecido nervoso mas acredita que novas tecnologias como piezocirurgias e cirurgias guiadas podem reduzir os riscos dessa complicação independentemente do nível de experiência do profissional.

Os agregados plaquetários, como o L-PRF, promovem uma ação osteoindutora, uma vez que a rede de fibrina favorece a migração de células e a liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento vaso endotelial, responsáveis pela ação quimiotática de células mesenquimais e angiogênese respectivamente. Mas normalmente são associados com algum material osteocondutor para fornecer a eles a atividade osteoindutora (CHOU; CHANG; WANG, 2020). Em uma revisão narrativa, os resultados de 18 artigos foram sintetizados por Stumbras *et al.* (2019) e as conclusões encontradas demonstraram que: (a) o osso autógeno tem o melhor potencial regenerativo, (b) os biomateriais combinados com osso autógeno resultam em neoformação óssea, com osso mais amadurecido e melhor osseointegração do enxerto, e (c) os concentrados de plaquetas usados em conjunto com biomateriais aumentam a formação óssea e a vascularização do local. Os resultados promissores com a associação de recursos de enxertia também foram mostrados evidenciando um melhor desempenho do osso autógeno quando o período de comparação com outros biomateriais foi menor de 6 meses, enquanto a maioria dos biomateriais produziram resultados histomorfométricos semelhantes após períodos cicatriciais mais longos. Associações de osso autógeno ou concentrado de células autólogas a qualquer biomaterial aumentaram a capacidade de formação óssea (AL-MORASSI *et al.* 2020).

A substituição do osso autógeno se dá através do uso de biomateriais de outras origens (homógena, xenógena ou sintética), que de maneira geral têm maior disponibilidade e não necessitam de cirurgia adicional do leito doador (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009). Outra vantagem dos substitutos ósseos é a maior estabilidade volumétrica, muito embora, em alguns casos, não ocorra a completa substituição do biomaterial por osso neoformado (GORLA *et al.*, 2015; SCHLEGEL *et al.*, 2016). Os biomateriais alternativos ao osso autógeno podem ser obtidos de várias fontes naturais como

ossos de mamíferos, origens aquáticas, conchas e/ou fontes minerais, entretanto, sempre atento a biocompatibilidade (PU'AD *et al.*, 2019).

O osso homogêneo ou homólogo (de banco de osso) é o tecido ósseo originado de indivíduos da mesma espécie, ou seja, doados por humanos livres de doenças, que passa por um processo de remoção das células, com utilização da parte mineral do tecido ósseo, podendo ser osso fresco congelado ou desmineralizado. Há relatos de possuírem características osteoindutoras que, por ação dos osteoclastos, quando absorvem esse material liberam proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), entretanto em quantidade muito pequena, o que faz muito pesquisadores considerá-lo como osteocondutor apenas. Não apresenta atividade osteogênica (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH; 2009). O osso homólogo além do risco de transmissão de doenças apresenta como desvantagem obstáculos éticos e religiosos na sua utilização (FUKUBA *et al.*, 2021; WINKLER *et al.* 2018).

Os biomateriais de origem xenóloga podem ter variações quanto ao tamanho dos grãos e porosidade. Tem propriedade osteocondutora, serve como um arcabouço para proliferação de osteoblastos, entretanto não apresenta atividade osteoindutora (capacidade de diferenciar células mesenquimais em osteoblastos) nem osteogênica (capacidade de formar tecido ósseo). Os materiais xenólogos podem ter os grãos envolvidos por colágeno o que facilita a proliferação e diferenciação dos osteoblastos (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009).

Os biomateriais de origem sintética (aloplásticos), como por exemplo biovidro, possuem propriedade osteocondutora e são de reabsorção lenta. Encontram-se com resultados mais favoráveis na forma particulada e são de custo mais elevado. Não apresenta propriedade osteoindutora e nem osteogênica (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012; MISCH, 2009).

A maioria dos substitutos ósseos apresentam-se em forma particulada, entretanto pode ainda apresentar-se em bloco, pasta, gel, esponja, discos ou gesso. Algumas formas como esponja é para facilitar a manipulação pelo cirurgião (FUKUBA *et al.*, 2021), e são mais frequentemente utilizadas no preenchimento de defeitos ósseos especialmente no preparo do leito receptor para inserção de implantes dentários (MAZZONETTO; DUQUE; NASCIMENTO, 2012), entretanto também são utilizados para tratamento de defeitos periodontais, levantamento de soalho de seio maxilar, regeneração óssea guiada, periimplantites e por fim, aumento e/ou preservação do rebordo alveolar (FUKUBA *et al.*, 2021). E há na literatura revisões sistemáticas de ensaios longitudinais relatando resultados promissores na reabilitação de próteses implantossuportadas, quando são observadas maiores

taxas de sobrevivência dos implantes dentários colocados em área previamente aumentada com algum biomaterial (AL-NAWAS; SCHIEGNITZ, 2014; DEL FABBRO; ROSANO; TASCHIERI, 2008).

Sem desconsiderar que o enxerto autógeno pareça ainda ser a melhor opção para a correção de defeitos ósseos, pesquisadores e clínicos consideram a utilização de biomateriais com taxas de reabsorção menores pois nem sempre as técnicas de enxertia permitem sobrecorreções do defeito com osso autógeno para compensar a posterior remodelação óssea. Como os xenoenxertos e materiais aloplásticos (DANESH-SANI; LOOMER; WALLACE, 2016; GERRESSEN *et al.*, 2015) demonstram taxas de reabsorção mais lenta que o osso autógeno, sua remodelação ocorre, mesmo que de forma variada de material para material, às custas de absorção do material e deposição de osteoblastos. O processo normalmente demora alguns meses ou anos, por motivos como exemplificados pela diferença de tempo de absorção de alguns componentes minerais. Os α -fosfatos tricálcicos são reabsorvidos mais lentamente do que β -fosfatos tricálcicos e a atuação dos macrófagos ainda permanecem presentes depois de muitos anos gerando relatos contraditórios sobre a taxa de formação e reabsorção de osso novo (KUBLER *et al.*, 2004; MISCH, 2009).

Em função da inexistência de um biomaterial/substituto ósseo capaz de apresentar todas as características desejáveis para garantir resultados semelhantes ao osso autógeno, constantemente associações deles são empregadas (DANESH-SANI; ENGBRETSON; JANAL, 2017), especialmente associando o osso autógeno à biomateriais xenógenos, aloplásticos bem como à outros recursos otimizadores da regeneração tecidual como os concentrados plaquetários. Essas associações com osso autógeno também auxiliam na questão da quantidade do osso autógeno, pois muitas vezes a quantidade disponível de osso autógeno é insuficiente (CHOU; CHANG; WANG, 2020).

No futuro pode ter materiais aloplásticos seguros e padronizados que serão a primeira escolha, em detrimento do osso autógeno, pois apresentarão manipulação mais fácil, alta moldabilidade aos defeitos ósseos e periodontais e com taxa de reabsorção adequada e ainda potencializando as propriedades dos biomateriais associando-os com fatores de crescimento ou transplantes de células (FUKUBA *et al.*, 2021).

Comparando 136 resultados histomorfométricos de ensaios prospectivos, concluíram que: a) o osso autógeno apresenta maior quantidade de osso neoformado e menor quantidade de resíduo de enxerto; b) materiais xenógenos, alógenos e aloplásticos não apresentam diferenças significativas na quantidade de osso neoformado em diferentes períodos de cicatrização; c) tempo de cicatrização do enxerto menor de 4,5 meses está direcionado há uma

menor taxa de osso neoformado e d) a combinação de biomateriais, autógeno e mais algum outro, não apresentam melhor formação óssea (DANESH-SANI; ENGBRETSON; JANAL, 2017).

Resultados bastante semelhantes ao estudo anteriormente citado foram encontrados por Trimmel *et al.* (2021). Considerando as limitações da meta-análise, diversos biomateriais apresentaram o mesmo potencial para neoformação após o levantamento do soalho do seio maxilar. No entanto, o uso de biomateriais pode reduzir significativamente a quantidade de osso autógeno necessária para o enxerto, resultando em uma intervenção cirúrgica menos invasiva e menor tempo cirúrgico. A combinação de biomateriais com osso autógeno, ou concentrados de células autólogas, representam uma alternativa viável para a substituição de osso autógeno para atingir altos níveis de formação óssea com os períodos de cura convencionalmente usados de 5 a 8 meses. Desse ponto de vista, a afirmação de que osso autógeno sozinho como material de enxerto é o padrão-ouro, é questionável para este período de cicatrização, embora haja outros aspectos da escolha do enxerto. Para períodos de cura mais curtos, mais rápidos, capacidade de remodelação de osso autógeno pode ser vantajosa.

Dentre os biomateriais sintéticos, as biocerâmicas, obtidas pelo cozimento ou queima de minerais não metálicos, englobam uma gama enorme de composições não metálicas/inorgânicas, com aplicações médicas e odontológicas, pois possuem composição muitas vezes semelhante à matriz óssea inorgânica e sem limitações em termos de quantidade disponível. Entre eles estão o sulfato de cálcio, os já citados biovidros e os materiais cerâmicos à base de fosfato de cálcio (fosfato tricálcio, hidroxiapatita, biocompósitos à base de fosfato de cálcio, o silicato tricálcico e dicálcico, o aluminato tricálcico, ferrealuminato tetracálcico, óxido de silicato e sulfato de cálcio hidratado (gesso) e cimentos de cerâmica injetáveis). As biocerâmicas por apresentarem apenas característica de osteocondução, muitas vezes são associadas aos enxertos ósseos autógenos e alógenos para potencializar a regeneração óssea e diminuir a reabsorção destes enxertos. Cimentos biocerâmicos baseados em cálcio e fosfato, por exemplo, β -tricálcio fosfato, são considerados materiais adequados para serem utilizados em enxertos ósseos devido a sua similaridade química e estrutural com o osso humano (PATEL *et al.* 2019).

2.1.2 O cimento PBS CIMMO®

A utilização de cimentos tanto em Odontologia quanto em Ortopedia é comum. Na Odontologia é principalmente utilizado na Endodontia. Para Torabinejad *et al.* (2009), define-se como cimento biológico aquele que apresenta capacidade indutora de formação de células ósseas.

Segundo Vaidergorin (1983), os principais compostos do cimento Portland, calculados a partir de constituintes maiores da análise química, incluem silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, ferrealuminato tetracálcico e sulfato de cálcio di-hidratado, e esses compostos são considerados elementos bioativos (BAKHTIAR *et al.*, 2017; PARIROKH; TORABINEJAD; DUMMER, 2018, SILVA NETO, 2012; SILVA *et al.*, 2015; TORABINEJAD *et al.*, 2009; VAIDERGORIN, 1983).

O cimento endodôntico bioativo considerado pioneiro foi o Agregado de Trióxido Mineral (MTA), derivado do cimento Portland, e possui como matéria prima o calcário e silicato de cálcio. A adição do óxido de bismuto ao cimento Portland para gerar radiopacidade ao material, interferiu na resistência do cimento, requisito importante quando se avalia a necessidade de suportar forças mastigatórias (SILVA NETO *et al.*, 2010; SILVA NETO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2015; SILVA, S.R. *et al.*, 2016). O cimento PBS CIMMO® (Pozzolana Biologic Silva - PBS) apresenta a mesma base do MTA, entretanto contém adicionados elementos naturais biocompatíveis, a pozolana e o carbonato de cálcio, que são responsáveis pela alta resistência e radiopacidade biomimética do cimento. A pozolana é um aluminossilicato amorfo proveniente da reação de silicato de cálcio hidratado, aluminato de cálcio hidratado com hidróxido de cálcio, sendo um componente adicionado ao concreto utilizado na construção civil (PRESA *et al.* 2020).

O cimento PBS CIMMO® apresenta propriedades físicas interessantes que foram comprovadas quando obteve alta taxa de sucesso das restaurações definitivas realizadas em dentes decíduos. O PBS CIMMO® foi empregado como base do material restaurador definitivo em dentes que foram submetidos à pulpotomias, simplificando a técnica por utilizar apenas um material frente à técnica convencional que utiliza vários materiais (formocresol, hidróxido de cálcio, óxido de zinco e eugenol e resina fotopolimerizável) (MOYSÉS *et al.*, 2020).

A bioatividade dos cimentos endodônticos bioativos implica na liberação de íons cálcio, eletrocondutividade, produção de hidróxido de cálcio, formação de uma camada interfacial entre cimento e parede dentinária e formação de cristais de apatita sobre a superfície do cimento quando em contato com o ligamento periodontal e osso alveolar, auxiliando na regeneração radicular e perirradicular por promoverem alcalinização, o que cria um ambiente

inóspito à propagação microbiana. Portanto foi estabelecida uma regeneração tanto internamente à raiz dentária interagindo com a dentina quanto externamente, quando interage com o ligamento periodontal e osso alveolar perirradicular (BOCZAR *et al.*, 2018; PARIROKH; TORABINEJAD; DUMMER, 2018; SILVA; ZOTARELLI; SILVA NETO, 2018; TORABINEJAD; PARIROKH; DUMMER, 2018).

Os estudos iniciais sobre o cimento PBS CIMMO[®] foram realizados em um modelo animal de tratamento de lesões de furcas em cães (SILVA NETO *et al.*, 2010). A partir desse estudo novas aplicações do cimento foram investigadas como o seu comportamento como cimento reparador em perfurações radiculares, perfuração de furca, zips – desvios da luz do canal com perfuração lateral, arrombamento de forame radicular apical, rizogênese incompleta, capeamento pulpar direto, pulpotomias, trincas radiculares causadas por trauma e retro-obturações, uma vez que o PBS CIMMO[®] apresenta capacidade de regeneração óssea e de estruturas do ligamento periodontal, além de manter integridade em longo prazo devido a presença de seus aditivos (SILVA *et al.*, 2015; SILVA, S.R. *et al.*, 2016).

O cimento PBS CIMMO[®], utilizado no tratamento para perfurações radiculares realizadas em modelo animal (cães) ou em tratamento de lesões perirradiculares como material obturador apical, em tratamento cirúrgico de lesões endodônticas, proporcionou reparação dos tecidos perirradiculares (ligamento periodontal, cimento, dentina e osso alveolar) (SILVA NETO *et al.*, 2012).

Em um relato de caso, o paciente de 36 anos de idade, com o dente 22 necrosado e com rizogênese incompleta, devido a um traumatismo que ocorreu quando o mesmo apresentava 10 anos de idade, 26 anos depois o dente começou a apresentar desconfortos clínicos e alterações patológicas radiográficas (presença de fistula e lesão periapical). O material em questão foi utilizado como barreira apical sintética e foi capaz de além de reduzir os sinais e sintomas do comprometimento dentário, induziu regeneração óssea periapical e do ligamento periodontal (SILVA; ZOTARELLI; SILVA NETO, 2018).

O cimento PBS CIMMO[®], por ser material biocompatível e bioativo, já teve inferência de poder ser usado em outros tipos de defeitos ósseos. O cimento poderia trazer grande resistência e boa interação com materiais de fixação óssea como parafusos e miniplacas, pois apresenta em sua constituição o composto α -fosfato tricálcio (VLAD *et al.*, 2010).

A comparação entre PBS CIMMO[®] e PMMA (polimetilmetacrilato) em modelo animal de feridas cirúrgicas induzidas em fêmur de ratos Wistar, preenchidas com um dos materiais citados, mostrou diferenças no processo inflamatório local, formação de capsula

fibrosa e neoformação óssea. Após análise estatística ficou demonstrado que o cimento PBS CIMMO® teve melhor resposta que o PMMA, além de apresentar reação exotérmica local e ainda demonstrou manipulação mais fácil (CORRÊA, 2019).

Avaliando a aplicabilidade do PBS CIMMO® na Implantodontia, 36 ratos Wistar foram divididos em 3 grupos (grupo 1: PBS e implante, grupo 2: somente PBS e grupo 3: controle) foram submetidos a procedimento cirúrgico em que induzia no fêmur do animal condição semelhante a um alvéolo dental pós-exodontia. O estudo objetivou avaliar a capacidade do PBS em induzir a formação óssea em uma condição similar a instalação de implantes imediatos, ou seja, instalação do implante dentário imediatamente após a exodontia. Os animais dos grupos 1 e 2 mostraram presença de neoformação óssea. Conforme os autores, os implantes instalados em contato com o cimento PBS, previamente inserido na cavidade óssea, mostraram maior rigidez e resistência ao movimento do implante, evidenciando integração cimento, osso e implante e acarretando melhor estabilidade primária (ZERBINATTI *et al.*, 2019).

O cimento PBS CIMMO® possui três patentes que foram depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (processos INPI: 2015 909673667, 2017 0227480 e 2018 0044340), além de marca registrada no mesmo instituto (registro 909673500). O produto foi posteriormente licenciado e aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (registro ANVISA 81518240 001) (SILVA *et al.*, 2015; SILVA, S.R. *et al.*, 2016; BOCZAR *et al.*, 2018).

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais e delineamento experimental

Esse trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas, com o número de registro nº 0049/2021.

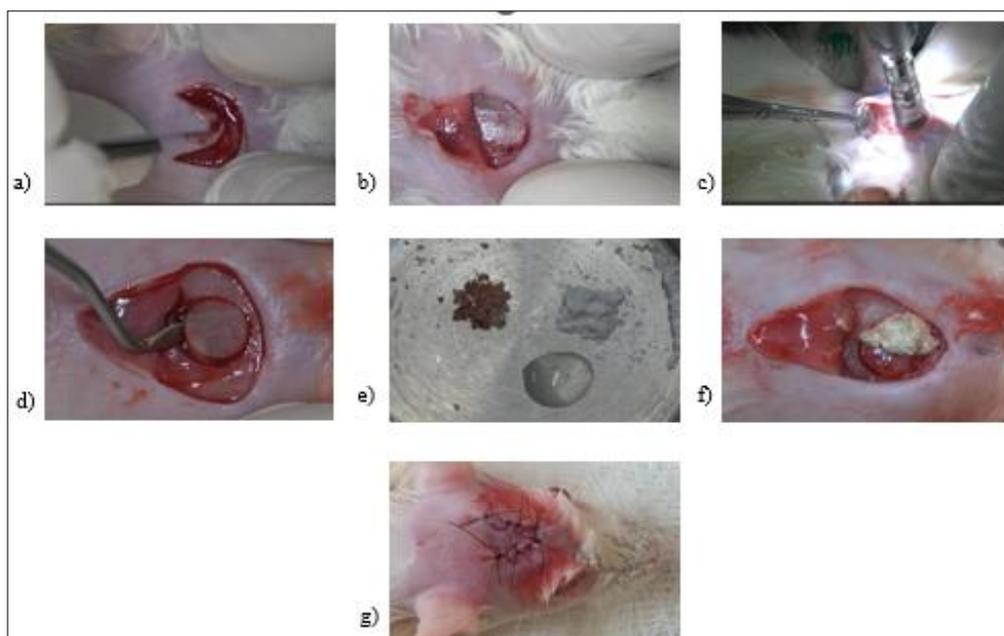
A determinação do tamanho amostral e a randomização dos animais seguiram a metodologia empregada por Silva *et al.*, 2021.

Para o presente trabalho foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 175 e 352 gramas (Biotério da Universidade Federal de Alfenas-MG – UNIFAL-MG). Os animais foram mantidos em um ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e consumo de ração sólida e água *ad libitum* durante todo período experimental.

2.2.2 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por injeção intramuscular de xilazina (6mg/kg) e quetamina (70mg/kg). Inicialmente foi realizada tricotomia na região fronto-parietal da calvária dos animais, antissepsia foi feita com clorexidina 2%. A seguir, com uma lâmina de bisturi n ° 15c foi realizada uma incisão em “U”, com base caudal na calvária do rato. As incisões atingiram o periósteo, permitindo o descolamento de um retalho de espessura total em direção posterior. Com broca trefina de 5mm de diâmetro interno, acoplada em motor NSK SurgicPro® e sob refrigeração abundante com soro fisiológico estéril, foi preparada uma cavidade cirúrgica circular com 6 mm de diâmetro (defeito de tamanho crítico) na calvária do rato, somando o diametro interno e ponta ativa da trefina gera um defeito de 6 mm. O defeito incluiu uma porção da sutura sagital. As cavidades foram parcialmente preenchidas de acordo com grupo experimental apenas na metade esquerda mantendo a metade direita apenas com coágulo no intuito de avaliar a propriedade osteoindutora do biomaterial PBS CIMMO HP® (FOTOGRAFIA 1).

Fotografia 1 – Sequência cirúrgica demonstrando a utilização do osso autógeno associado ao cimento PBS CIMMO HP®.



Fonte: Do autor.

Legendas: a) Incisão com base caudal.

b) Divulsão e retalho afastado.

c) Ostectomia com broca trefina de 6 mm de diâmetro externo.

d) Defeito ósseo de 6 mm de diâmetro demarcado e removendo o fragmento da coleta craniana.

e) Osso autógeno e cimento PBS CIMMO®, em partes iguais antes da manipulação do cimento e associação dos biomateriais.

f) Defeito crítico parcialmente preenchido com associação de osso autógeno com cimento PBS CIMMO®.

g) Sutura interrompida simples com fio de nylon 5.0.

Os animais foram aleatoriamente divididos em 6 grupos, cada animal foi submetido a um procedimento cirúrgico em que se criou uma cavidade de 6mm de diâmetro na calvária e então receberam os biomateriais de acordo com os seguintes grupos experimentais:

GRUPO COA (COÁGULO): a cavidade não foi preenchida com nenhum material de enxerto, foi mantida apenas com o coágulo sanguíneo.

GRUPO AUT (AUTÓGENO): a cavidade foi parcialmente preenchida com osso autógeno particulado a partir da calvária removida, utilizando um triturador ósseo.

GRUPO PBS CIMMO (cimento biocerâmico): a cavidade foi parcialmente preenchida com o cimento PBS CIMMO HP®, manipulado conforme o fabricante.

GRUPO BOV (osso bovino particulado, Bio-Oss®, Geistlich Pharma AG, Suíça): a cavidade foi parcialmente preenchida com enxerto bovino particulado com granulos de 0,25 à 1 mm.

GRUPO BOV+PBS (Bio-Oss[®], Geistlich Pharma AG, Suíça): a cavidade foi parcialmente preenchida com osso bovino particulado associado com o cimento PBS CIMMO[®] em partes iguais.

GRUPO AUT+PBS: a cavidade foi parcialmente preenchida com o osso autógeno da calvária particulado e misturado com o cimento PBS CIMMO[®] em partes iguais.

Depois de preenchidos os defeitos, os tecidos moles foram reposicionados e feitas suturas interrompidas simples com fio de nylon 5-0.

Os animais receberam doses de cloridrato de tramadol (12,5 mg/kg p.c 8/8 horas por 3 dias) e a primeira dose foi intraperitoneal anterior à anestesia e as demais subcutânea diluída em solução salina.

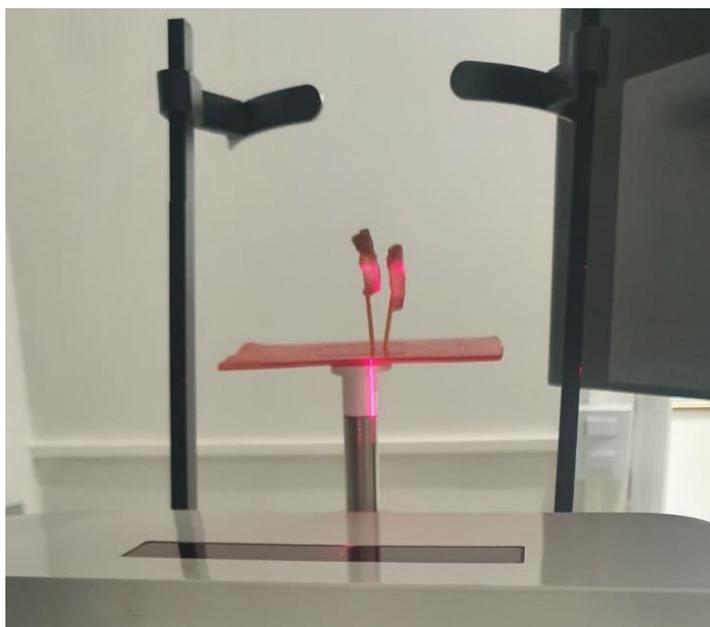
O registro de monitoramento do animal após procedimento para determinação da necessidade do ponto final humanitário foi aplicado. Este monitoramento foi realizado 3 vezes ao dia, durante a administração do fármaco analgésico, durante 3 dias, e exclusivamente para cada animal.

Os animais sofreram eutanásia aos 30 ou 60 dias pós-operatórios por inalação excessiva de CO₂.

2.2.3 Análise Tomográfica

Antes do processamento das calvárias obtidas dos animais, a avaliação da densidade tomográfica na região do defeito foi realizada através da tomografia computadorizada volumétrica – 3D cone beam (FOTOGRAFIA 2).

Fotografia 2 – Fotografia da realização do exame tomográfico nas calvárias de ratos.



Fonte: Do autor.

A aquisição das imagens foi realizada de forma padronizada. Para isso, utilizou-se um tomógrafo de feixes cônicos do tipo dedicado, modelo Veraview X800, marca J. MORITAM FG. CORP, com potência de 70 kVp, intensidade de 5 mAs, tempo de varredura de 17,86 segundos e resolução de voxel igual a 0,2 mm conforme é demonstrado na (FOTOGRAFIA 3).

Fotografia 3 – Fotografia da configuração do tomógrafo para aquisição das imagens.



Fonte: Do autor

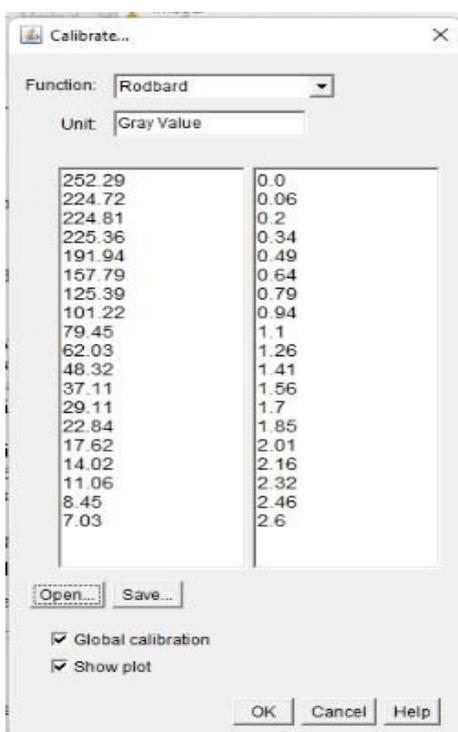
2.2.3.1 Análise da densidade pelo *software* ImageJ

A análise da densidade foi realizada por um único examinador, em esquema cego para o tipo de tratamento realizado, depois de concluído o processo de reenderização pós-processamento das imagens utilizando o *software* OneVolumeViewer.

Os seguintes critérios foram utilizados para padronizar a análise tomográfica:

- a. Todas as calvárias foram analisadas nos 3 cortes obtidos na TCCB, ou seja, axial, sagital e coronal.
- b. Os *slices* ou cortes obtidos apresentaram 2mm de espessura;
- c. Para realizar o cálculo da densidade foi utilizado *software* ImageJ. Para isso cada imagem do corte axial da tomografia das calvárias era convertida em 8 bits, transformando-as em imagem preto e branco.
- d. Foi realizado a calibração do *software* quanto à avaliação de densidade radiográfica de acordo com as instruções no site do *software* (FIGURA 1).

Figura 1 - Calibração do *software* ImageJ para valores da escala de cinza, densidade.



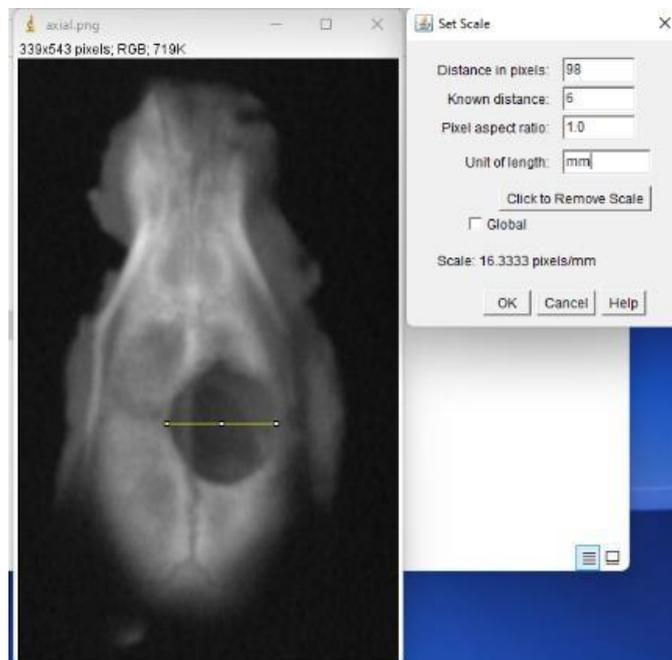
Fonte: Do autor.

A densidade óptica foi determinada pelo grau de enegrecimento da imagem, sendo assim, o valor 0 representou o branco, enquanto na escala de cinza o branco foi representado pelo valor 255, ou seja, essas escalas são inversamente proporcionais como demonstrado na Figura 1, em que a coluna da direita se referiu a valores referentes à escala de cinza e a coluna da esquerda densidade óptica (COCLETE; TAVANO; PAVAN, 2003).

A imagem radiográfica foi formada por diferentes tons de cinza. Se considerar uma escala numérica em que cada tom corresponda a um número (um nível de cinza), quanto mais claro maior o número que o representa. A imagem digital analisou 256 tons de cinza, denominados de densidade radiográfica (COCLETE; TAVANO; PAVAN, 2003), essa mesma análise foi utilizada por Chaprazov *et al* (2022).

Em seguida, foi realizada a calibração convertendo a unidade de medidas em *pixels* para centímetros. Para isso realizou-se uma reta no tamanho do diâmetro do defeito, ou seja, 6 milímetros e utilizando a função *Set Scale* o programa passou a utilizar as ferramentas de medidas em centímetros (FIGURA 2).

Figura 2 - Calibrando ferramentas de medidas do *software* ImageJ.

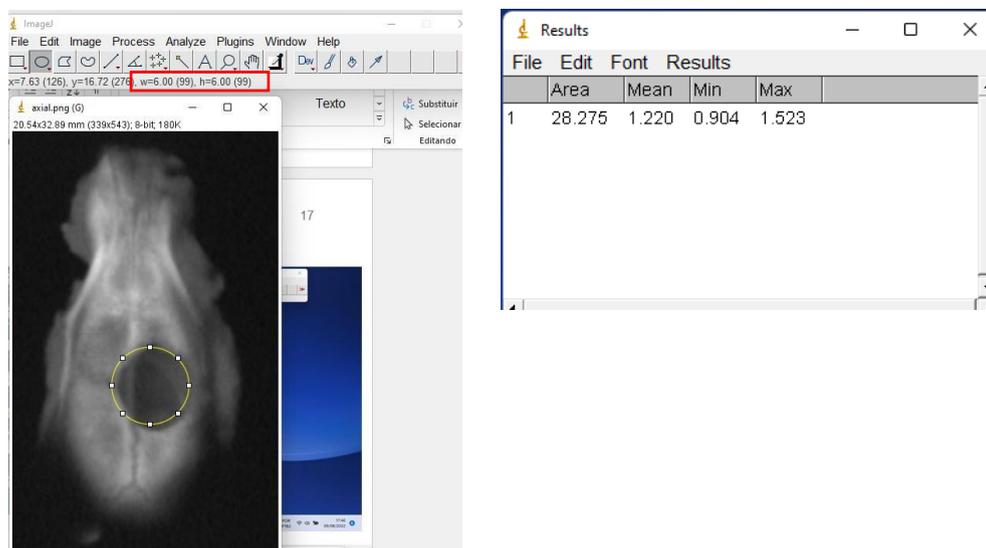


Fonte: Do autor.

Através de uma ferramenta de medida circular delimitou-se um círculo com 6 mm de diâmetro tanto no sentido vertical quanto horizontal, no intuito de promover um círculo perfeito. Após a confecção do círculo, o *software* disponibilizou a área do círculo, a densidade

média e os valores de densidade mínima e máxima encontrados dentro da circunferência. Para a análise estatística foram utilizadas as médias (FIGURA 3).

Figura 3 - Delimitação da área do defeito e obtenção da densidade.



Fonte: do autor.

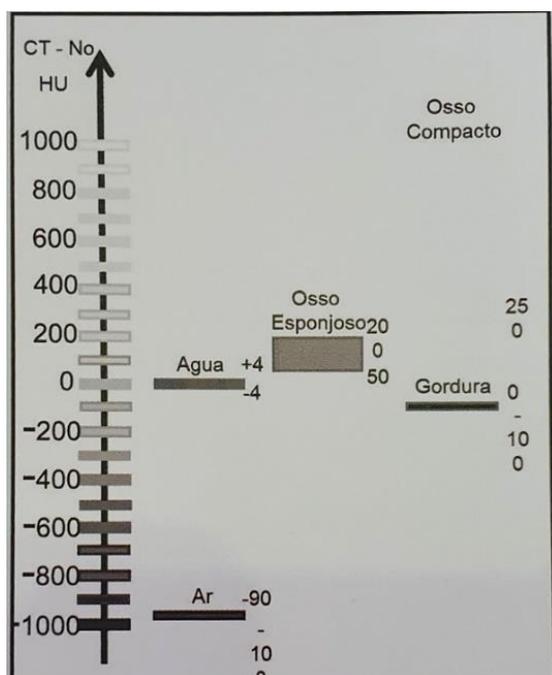
A coleta das médias das densidades foi realizada por único examinador calibrado e cego aos grupos, em triplicata e com as coletas realizadas em dias diferentes.

2.2.3.2 Análise da densidade no *software* OneVolumeViewer

Em decorrência da análise de densidade ter sido realizada pelo *software* ImageJ, seguiu-se padrão de análise de densidade inversa do que é realizado na prática clínica. Foi realizado outro teste de densidade utilizando a escala de Hounsfield. Enquanto no ImageJ a densidade foi aumentada de acordo com o enegrecimento da imagem, na prática clínica considera-se maior densidade, aquela relacionada ao branco que representa osso compacto.

A escala de Hounsfield é expressa em radiodensidade, na qual a água destilada em condições padrão de temperatura e pressão apresentou zero HU, enquanto o ar e o osso apresentaram -1000 e +1000 HU respectivamente. Sendo assim os tecidos de alta densidade foram denominados de hiperdensos e os de baixa densidade de hipodensos (HAITER NETO; KURITA; CAMPOS, 2018) (FIGURA 4).

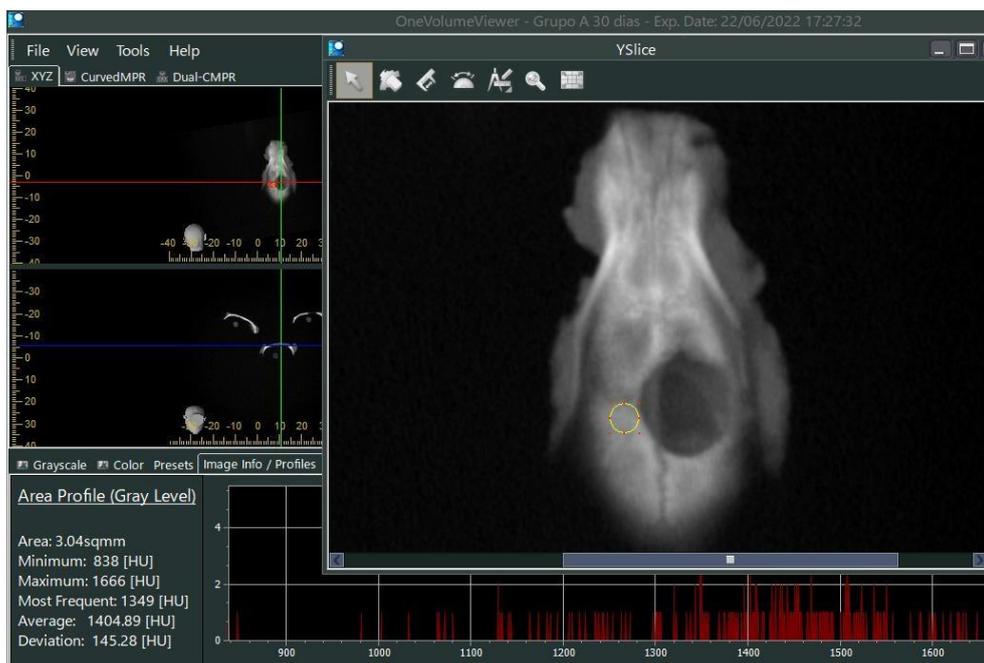
Figura 4 - Escala numérica de Hounsfield.



Fonte: HAITER NETO; KURITA; CAMPOS, 2018

A análise das densidades em HU foi realizada através do *software* de manipulação das imagens tomográficas OneVolumeViewer. Após a seleção do corte axial das calvárias, a imagem foi ampliada em 200% e foi realizado um círculo de 3mm², para determinação da densidade da calvária. Essa densidade foi estabelecida como padrão: 100% referiu-se ao valor da densidade, conforme demonstrado na (FIGURA 5).

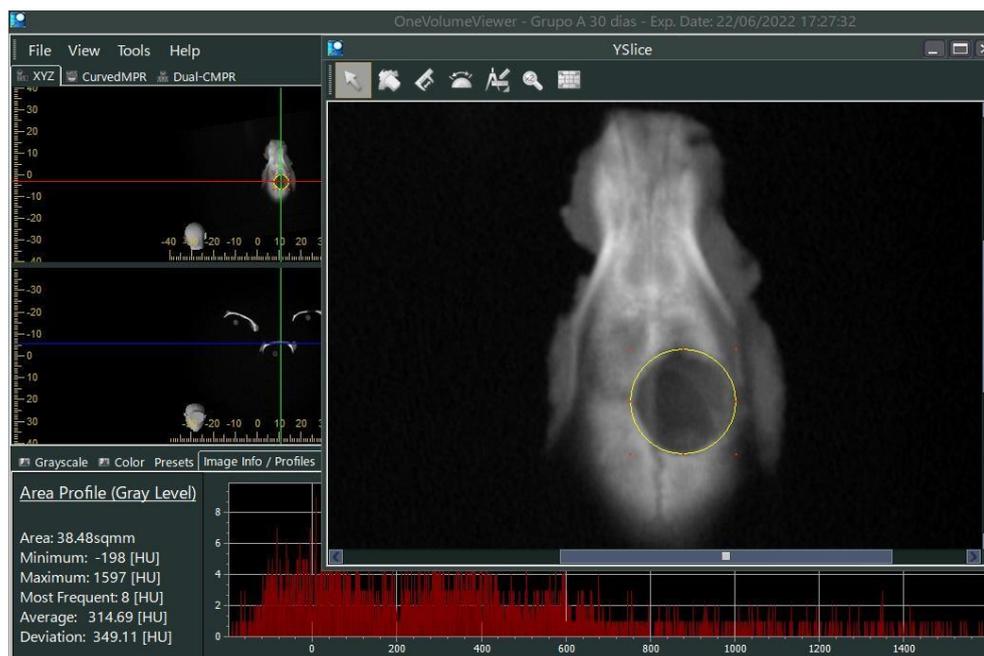
Figura 5 - Obtenção da densidade padrão.



Fonte: Do autor.

Após a determinação da densidade padrão, foi realizado um círculo que envolveu todo o defeito ósseo e obteve-se os resultados das densidades (FIGURA 6). O valor da densidade encontrado foi convertido em porcentagem referente à densidade padrão.

Figura 6 - Obtenção da densidade no defeito ósseo.



Fonte: Do autor.

Através dessas análises, o *software* forneceu a área demarcada, densidade máxima e mínima, moda, média e desvio padrão. Entretanto para a análise estatística, utilizou-se a média.

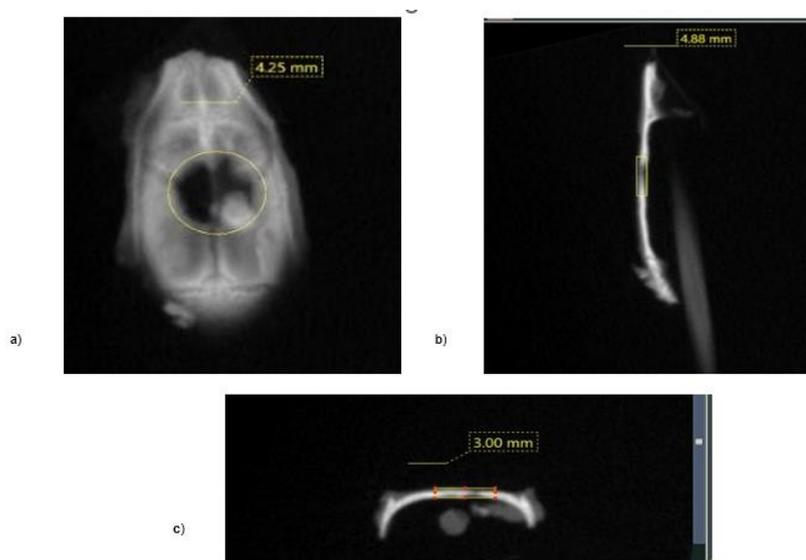
Os valores foram obtidos através de um examinador calibrado e cego aos grupos que determinou as densidades em triplicatas e realizou as análises em dias diferentes.

2.2.3.3 Quantificação de formação óssea.

Optou-se por realizar essa análise uma vez, visto que biomateriais diferentes geram diferentes densidades, situação que poderia determinar resultado que não representasse a real formação de tecido ósseo.

Para realizar essa quantificação, foi determinada a área total do defeito em uma imagem no corte axial, cinco imagens nos cortes sagitais e 5 imagens nos cortes coronais. O objetivo de ter tantas imagens foi contabilizar formação óssea nos três planos e assim verificar todo tecido ósseo formado. A demarcação da área total foi realizada no *software* OneVolumeViewer (FIGURA 7).

Figura 7 – Demarcação das áreas totais para quantificação de formação óssea.



Fonte: Do autor.

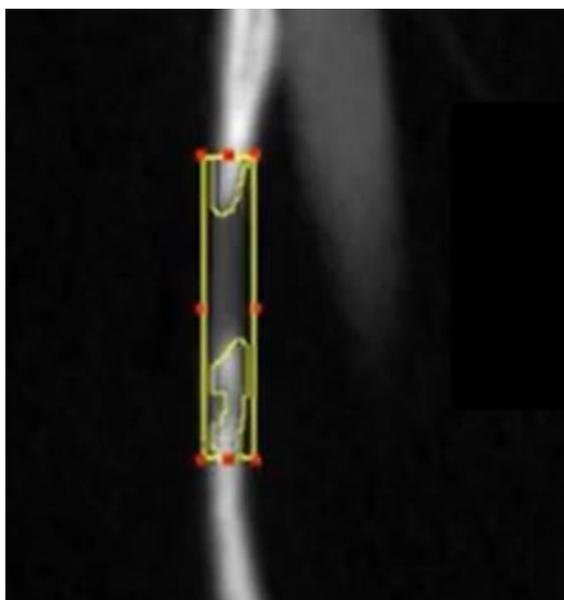
Legenda: a) imagem demarcada no plano axial.

b) imagem demarcada no plano coronal.

c) imagem demarcada no plano sagital.

Após a determinação da área total no *software* ImageJ, foi delimitada a área de formação óssea em todas as onze imagens (1 axial, 5 coronais e 5 sagitais) (FIGURA 8).

Figura 8 - Delimitação das áreas de formação óssea.



Fonte: Do autor.

Embora a Figura 8 represente apenas um corte sagital, a mesma aferição de tecido ósseo neoformado foi realizada em todas as imagens: onze imagens da calvária.

A partir do valor obtido da área total de cada corte e a área de neoformação óssea, obteve-se a porcentagem de osso neoformado em cada corte e conseqüentemente, a porcentagem média de cada calvária.

Essa análise foi realizada por três examinadores calibrados e cegos aos tratamentos recebidos em cada calvária.

2.2.4 Análise histológica e histométrica.

2.2.4.1 Processamento das calvárias.

As peças foram fixadas em formol neutro a 10% (Formol Estabilizado sol. 10%, Sciavico Comércio e Indústria Ltda, Sabará, Minas Gerais, Brasil), lavadas em água corrente e descalcificadas em solução de ácido etilendiaminotetracético (E.D.T.A.) a 18% (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada, Rio Grande do Sul, Brasil). Após descalcificação inicial, cada

peça foi seccionada transversalmente. Foi escolhido esse sentido de secção devido à metodologia de preencher parcialmente o defeito cirúrgico criado. Desta maneira cada corte representou o lado esquerdo que recebeu tratamento com biomaterial e direito que permaneceu com coágulo.

Após um período de descalcificação adicional, as peças foram processadas e incluídas em parafina. Foram então realizados cortes seriados no sentido transversal da peça com seis micrometros de espessura, iniciados a partir do centro do defeito cirúrgico original, os quais foram corados pela técnica da Hematoxilina e Eosina (HE), para análise com microscopia de luz.

2.2.4.2 Análise Histológica e Histométrica.

Os cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina foram avaliados morfológicamente de forma descritiva, qualitativamente em microscopia ótica, observou-se os seguintes aspectos:

- Qualidade e intensidade da reação inflamatória desenvolvida;
- Presença de fibroblastos e fibras colágenas;
- Presença de tecido de granulação e formação de trabéculas ósseas;
- Tipo e qualidade do tecido formado no interior do defeito cirúrgico.

As análises histológicas e histométricas foram realizadas por um único examinador, em triplicata e em esquema cego para o tipo de tratamento realizado. As imagens dos cortes histológicos foram capturadas por meio de uma câmera digital (Axiocam ICc3 - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), acopladas a microscópio óptico binocular (Axio Lab - Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), com um aumento original de 2,5, 10 e 40x (lente objetiva Plan - NEOFLUAR) e salvas em computador.

Para realizar a análise histomorfométrica, selecionou-se o melhor corte e na objetiva de 10X capturou-se as imagens em sequência para posteriormente no *software* Adobe Photoshop CC 2019 realizar-se o agrupamento das imagens e obter-se imagens iguais à demonstrada na figura 9

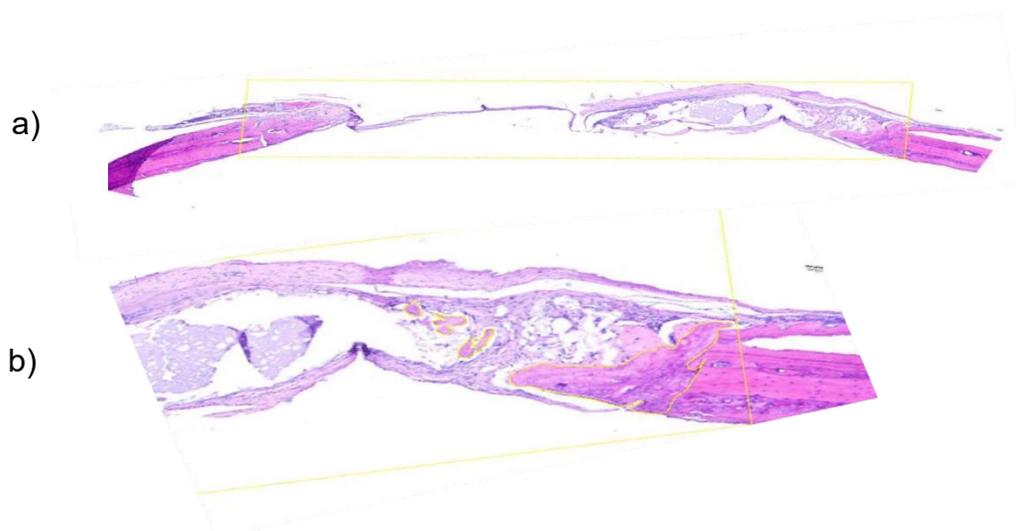
Figura 9 - Demonstração do agrupamento das imagens histológicas tornando-as em imagem panorâmica (aumento de 100X – HE).



Fonte: Do autor.

Após a unificação das imagens, foi delimitado o defeito e determinado o tamanho da área total em μm^2 . A próxima etapa consistiu em determinar a área de neoformação óssea. Após a determinação dessas áreas, foi calculada a porcentagem de formação óssea em cada calvária (FIGURA 10).

Figura 10 – Delimitação da área total e de neoformação óssea (aumento 100X HE).



Fonte: Do autor.

Legenda: a) determinação da área total

b) determinação da área de neoformação óssea

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças entre os grupos e os períodos foram determinadas pela análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey à 5% de significância quando a ANOVA sugeriu diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Para isso, o programa GraphPad Prism 9 foi utilizado.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Densidade ótica pelo *software* ImageJ

Comparando os grupos PBS CIMMO[®] 30 e 60 dias, o grupo com 60 dias apresentou redução significativa na densidade, $p = 0,0188$, situação não encontrada entre os grupos AUT de 30 e 60 dias ($p = 0,9999$), que são os grupos controles positivos (padrão ouro).

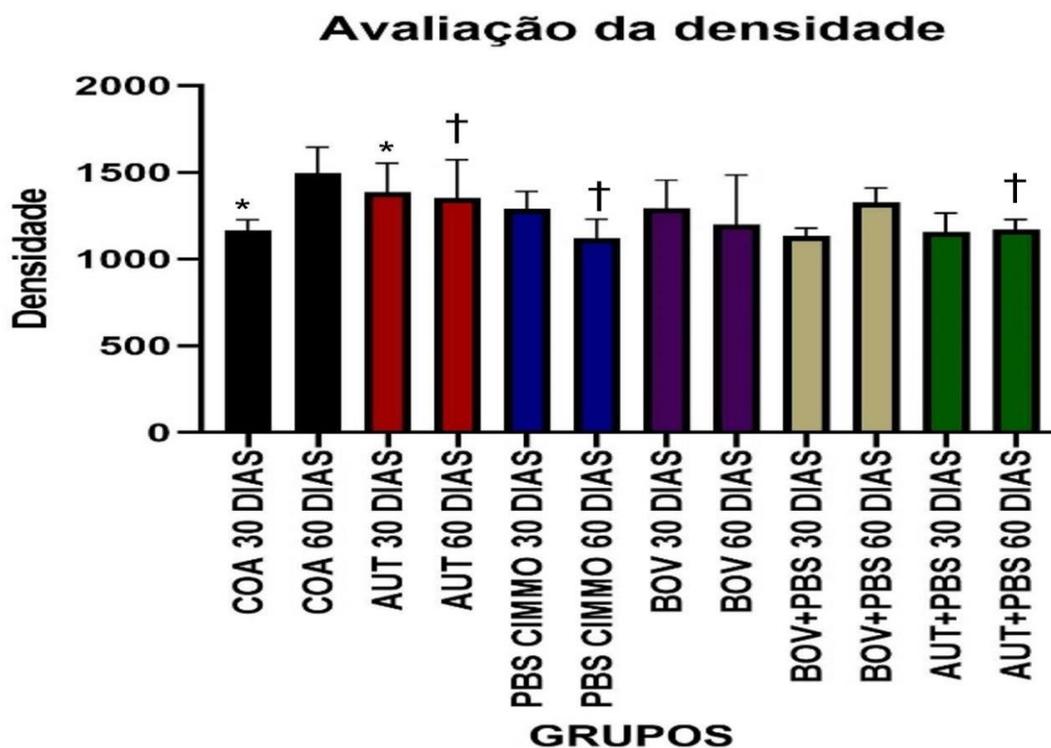
Embora os grupos AUT, PBS CIMMO[®] e BOV com 30 dias não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$; APÊNDICE A), os grupos BOV + PBS e AUT + PBS, apresentaram menor densidade que o grupo AUT, com 30 dias, com valores de $p = 0,003$ e $p = 0,038$ respectivamente.

Em comparação com o grupo COA 30 dias, apenas o grupo AUT 30 dias apresentou diferença estatística. Entretanto apresentou maior densidade ($p = 0,0096$). Em relação aos grupos AUT 30 e 60 dias, não apresentaram diferença estatística, $p = 0,9999$. Em contrapartida, entre os grupos COA 30 e 60 dias, obteve-se aumento da densidade, $p = 0,0002$.

Comparou-se a densidade do grupo AUT 60 dias, tanto para o grupo PBS CIMMO[®] quanto para o AUT + PBS 60 dias. Apresentaram redução na densidade, $p = 0,0305$ e $p = 0,0275$ respectivamente, o que não aconteceu nos grupos BOV e BOV + PBS, ambos com 60 dias $p = 0,9575$.

Em relação ao grupo COA 60 dias, tanto o grupo AUT quanto o BOV, ambos com 60 dias, não apresentaram diferenças estatísticas, $p = 0,8618$ e $p = 0,0652$. Entretanto os grupos PBS CIMMO[®], AUT + PBS ou BOV + PBS 60 dias, apresentaram menor densidade em relação ao grupo COA 60 dias.

Resultados demonstrados por meio do gráfico 1 e das tabelas 1 e 2.

Gráfico 1- Densidade entre os grupos experimentais no *software* ImageJ.

Fonte: Do autor.

Legenda: * Demonstra diferença estatística entre grupo COA 30 dias e AUT 30 dias

† Demonstram que tanto os grupos PBS CIMMO® e AUT+PBS ambos com 60 dias apresentaram menores densidades que o grupo AUT 60 dias.

Tabela 1 – Valores das densidades nos diferentes grupos referentes aos dados coletos nos animais com 30 dias de eutanásia.

GRUPOS	AUT 30 DIAS	PBS CIMMO30 DIAS	BIO 30 DIAS	BIO+PBS 30 DIAS	AUT+ PBS 30 DIAS	COA 30 DIAS
N (avaliação em triplicatas)	5	5	5	5	5	5
Valores mínimos	1124	1075	1022	1050	994	1033
Valores Máximos	1677	1409	1543	1199	1379	1273
Varição	553	334	521	149	385	240
Média	1388	1291	1294	1134	1155	1167
Desvio padrão	166,2	101	160,7	44,24	110,9	60,54
Erro padrão Médio	42,92	26,08	41,5	11,42	28,63	15,63

Fonte: Do autor.

Tabela 2 – Valores das densidades nos diferentes grupos referentes aos dados coletos nos animais com 60 dias de eutanásia.

GRUPOS	AUT 60 DIAS	PBS CIMMO60 DIAS	BIO 60 DIAS	BIO+PBS 60 DIAS	AUT+ PBS 60 DIAS	COA 60 DIAS
N (avaliação em triplicatas)	5	5	5	5	5	5
Valores mínimos	1150	998	862	1173	1103	1254
Valores máximos	1798	1334	1622	1413	1281	1704
Variação	648	336	760	240	178	450
Média	1355	1119	1199	1326	1169	1497
Desvio padrão	219,3	112,1	286,5	84,62	59,04	148,7
Erro padrão Médio	56,62	28,94	73,97	21,85	15,24	38,4

Fonte: Do autor.

2.4.2 Densidade em Unidades de Hounsfield

Os grupos COA e AUT, independentes das mensurações em 30 ou 60 dias após o procedimento cirúrgico, não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$; APÊNDICE B).

Em relação aos grupos AUT com 30 e 60 dias, não apresentaram diferenças estatísticas $p > 0,9999$.

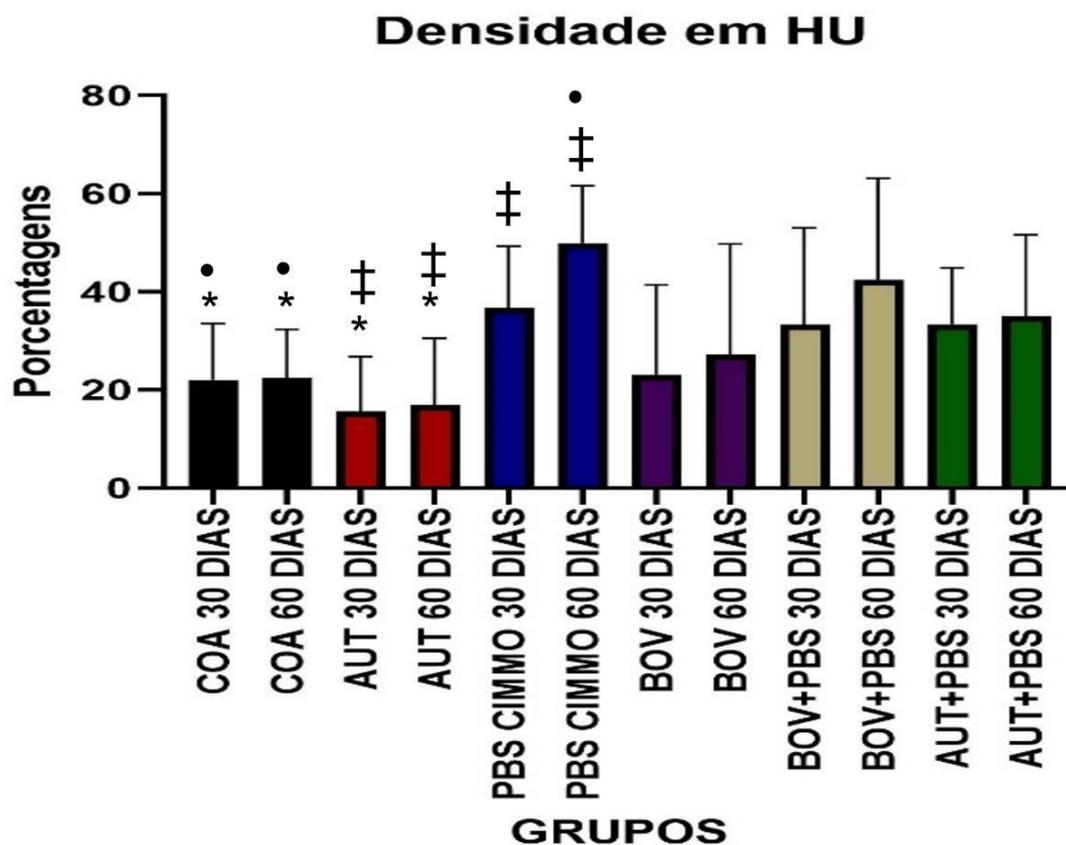
Diferentemente dos grupos AUT e COA, que não apresentaram diferenças estatísticas entre si, o grupo PBS CIMMO[®] 60 dias; apresentou diferença estatística em relação aos grupos COA 30 e 60 dias $p = 0,0001$ e $p = 0,0002$ respectivamente.

O grupo PBS CIMMO[®] independente do tempo, apresentou maior densidade em relação ao grupo AUT, tanto com 30 e 60 dias ($p < 0,05$; APÊNDICE B)

Em relação aos grupos em que se utilizou osso bovino, apenas o grupo BOV+PBS demonstrou maior densidade em relação ao grupo AUT. Ambos com 60 dias $p = 0,0008$. Entretanto, os grupos BOV 30 e 60 dias, apresentaram menor densidade quando comparados ao grupo PBS CIMMO[®] 60 dias $p = 0,0003$ e $p = 0,0051$.

Os resultados descritos acima estão representados na Gráfico 2.

Gráfico 2: Gráfico comparando a densidade entre os grupos experimentais em HU.



Fonte: Do autor.

Legenda: * Demonstra que os grupos não apresentaram diferenças entre si independente do tempo.

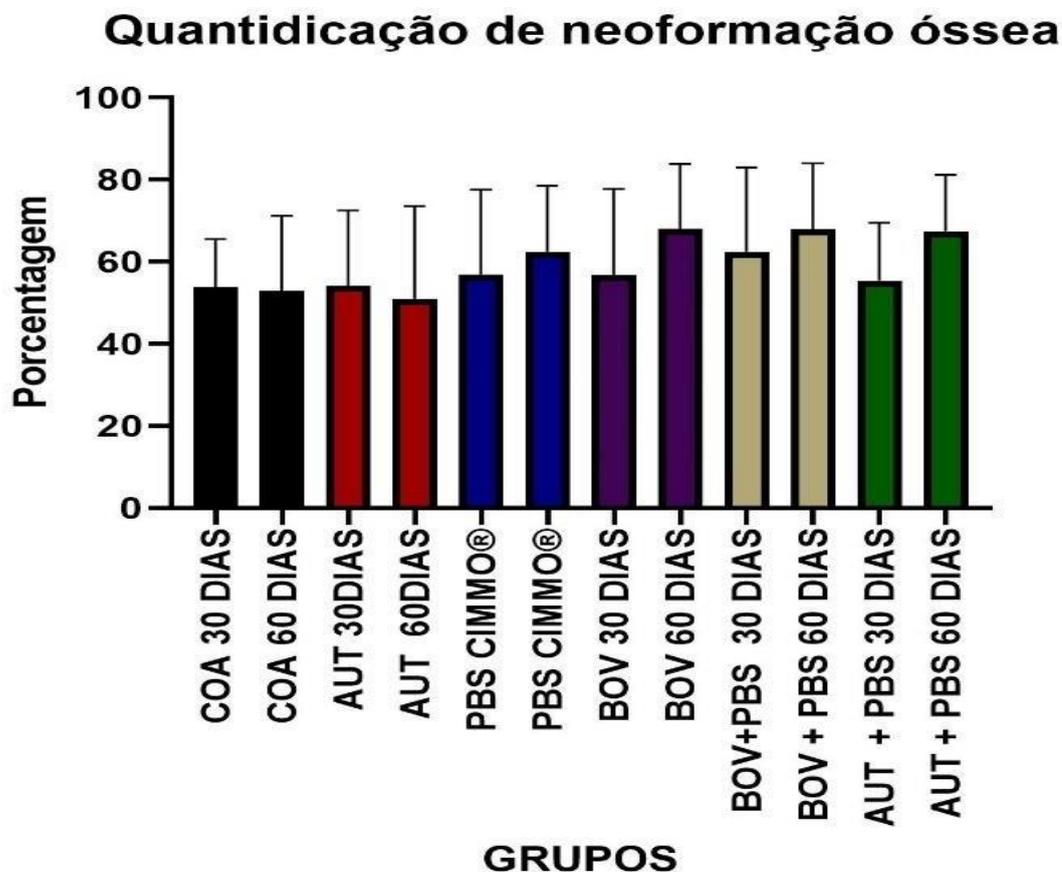
‡ Demonstra que os grupos apresentaram diferenças entre si independente do tempo.

• Demonstra a diferença entre o grupo PBS CIMMO 60 dias e os grupos COA30 e 60 dias.

2.4.3 Quantificação da formação óssea na análise tomográfica.

Após a análise estatística, demonstrou-se que a quantificação óssea não apresentou diferença estatística ($p=0,0518$), conforme representado pelo gráfico 3.

Gráfico 3 - Quantificação óssea.

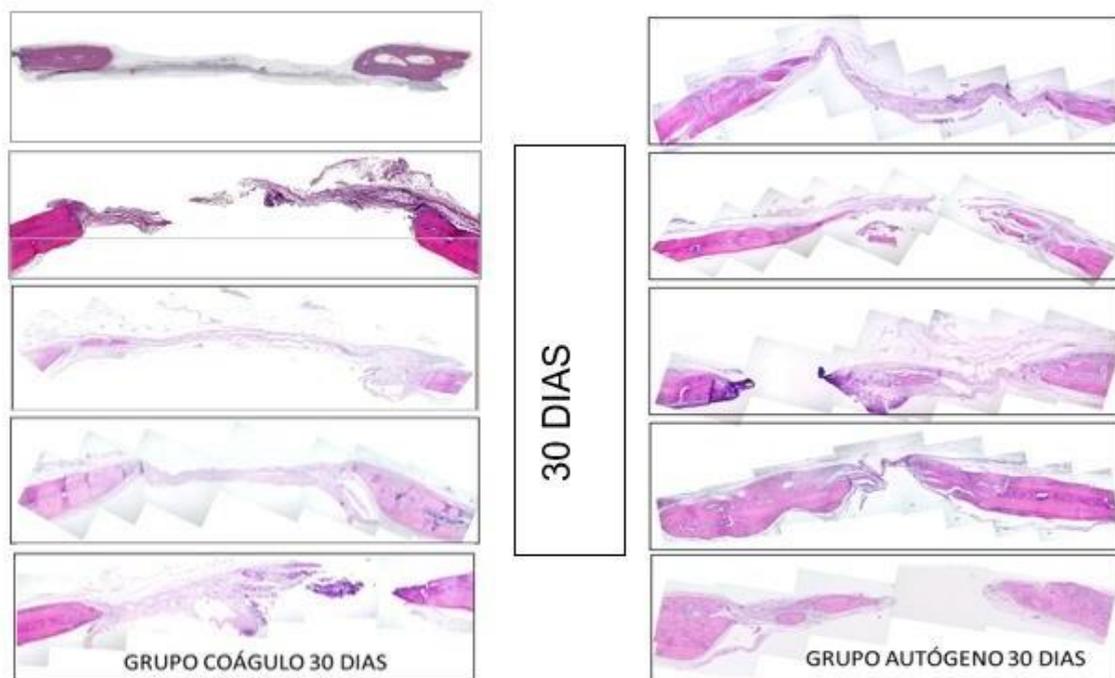


Fonte: Do autor

2.4.4 Análise histológica

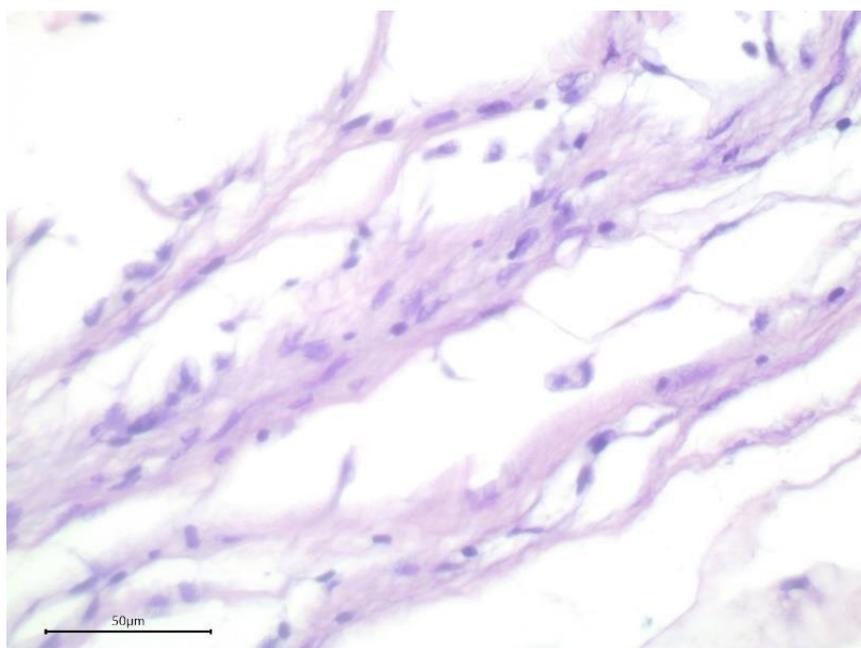
Grupo COA 30 dias. Todos os espécimes mostraram formação óssea incompleta, conforme demonstrado na figura 11. Em nenhum foi constatada a reparação óssea total do defeito cirúrgico. Apenas nas margens ósseas do defeito cirúrgico, foi observada neoformação óssea discreta. A região central do defeito mostrou espessura menor que a espessura da calvária original, sendo predominante a presença de tecido conjuntivo com muitos fibroblastos e poucas fibras colágenas (FIGURA 12). Ao longo do defeito ósseo, em alguns espécimes, observou-se infiltrado inflamatório crônico e discreto.

Figura 11 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos COA e AUT, no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Figura 12 – Imagens em aumento de 400X – HE demonstra a quantidade de tecido conjuntivo e poucas fibras colágenas no grupo COA 30 dias.

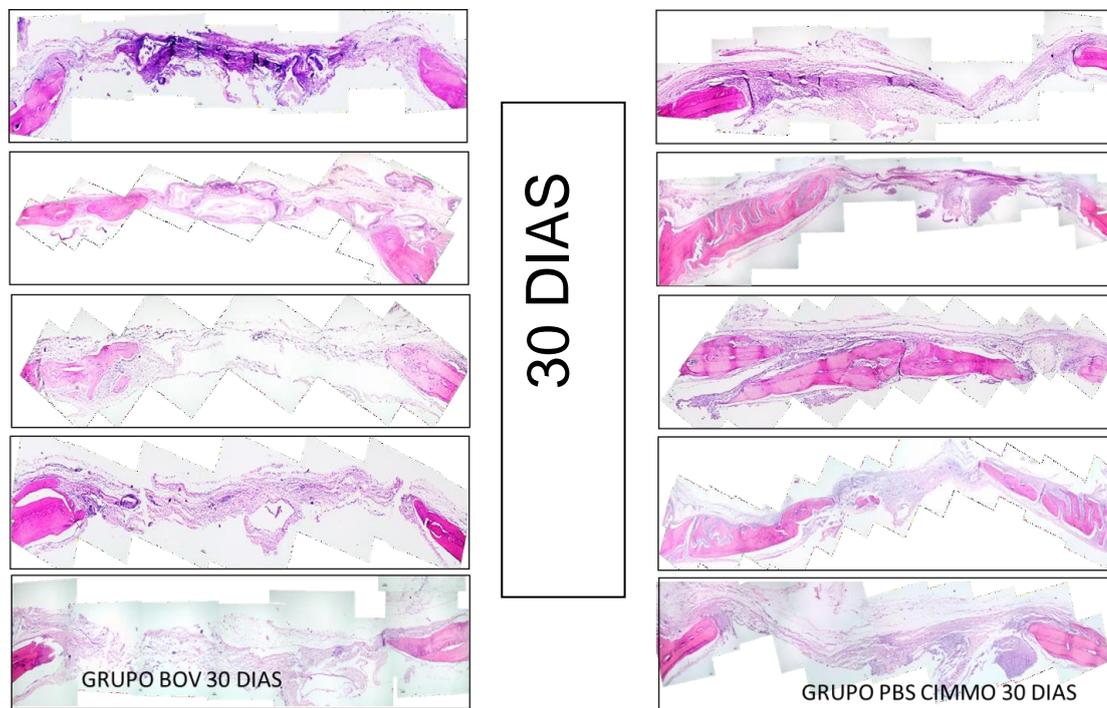


Fonte: Do autor.

Grupo AUT 30 dias. Não foi constatado a reparação completa do defeito em nenhum espécime deste grupo. No entanto evidenciou-se por meio da microscopia, neoformação óssea a partir das bordas do defeito em direção ao centro. Observou-se na região do osso neoformado, manutenção da espessura da calota craniana original. O tecido ósseo neoformado apresentou aspecto menos denso e mais vascularizado em relação ao osso nativo da calvária. Permitiu-se a diferenciação da interface do osso neoformado com o osso nativo, bem como presença de fibroblastos e osteoblastos. Observou-se que em um lado do defeito, correspondente ao lado que recebeu osso particulado autógeno, ocorreu maior preenchimento por tecido ósseo, demonstrado na figura 11.

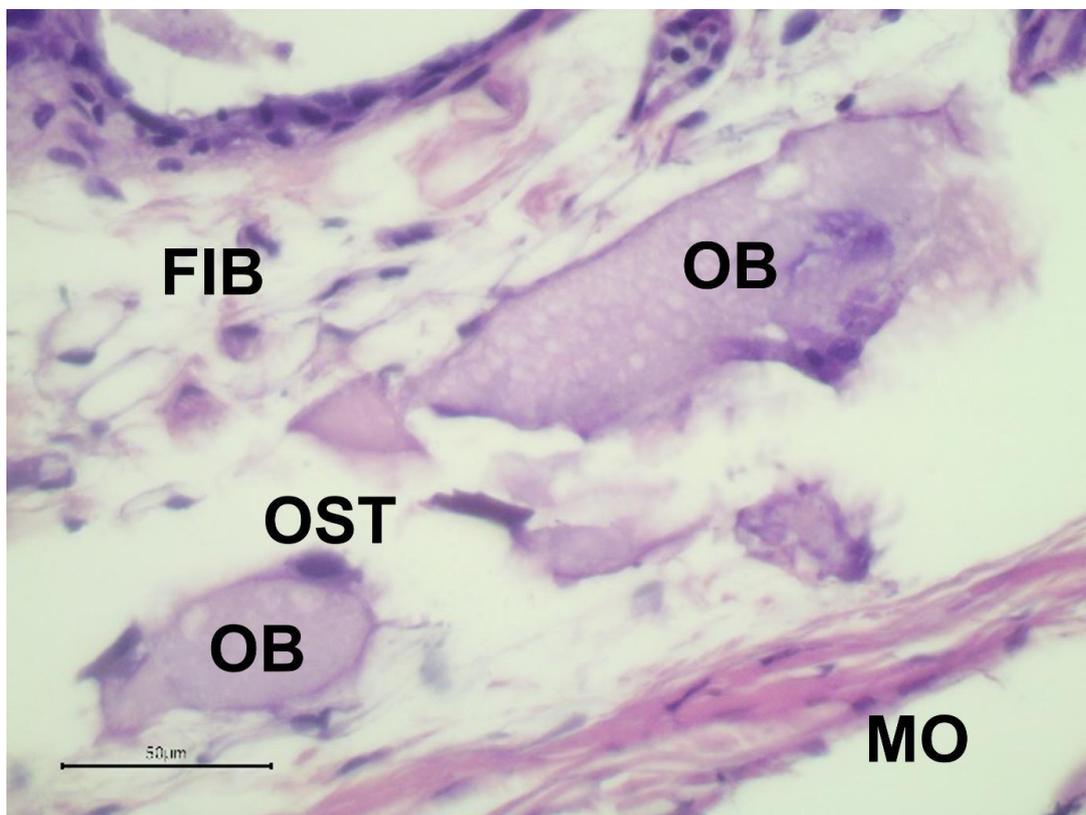
Grupo BOV 30 dias. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. Novo osso bem desenvolvido foi observado restrito às margens do defeito. Em algumas regiões, do lado onde foi inserido o biomaterial, as partículas de osso bovino preencheram parte do defeito, conforme representado na figura 13. Manteve-se a espessura da calvária original e apresentaram-se, circundadas por tecido conjuntivo rico em fibroblastos (FIGURA 14). Em alguns pontos, o tecido apresentou-se com características de tecido maduro e bem organizado, com presença de matriz osteóide e osteoblastos (FIGURA 15). Em outras regiões a matriz apresentou-se frouxa e desorganizada. Em algumas áreas, foi observada a presença de infiltrado inflamatório. Em decorrência do método de preenchimento do defeito, com o osso bovino ocupando apenas um dos lados do defeito, alguns espécimes mostraram evidente formação óssea mais relacionada ao lado preenchido.

Figura 13 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos BOV e PBS, no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Figura 14 - Aumento de 400X em HE do grupo BOV no período experimental de 30 dias, evidenciando tecido conjuntivo rico em fibroblastos.



Fonte: Do autor.

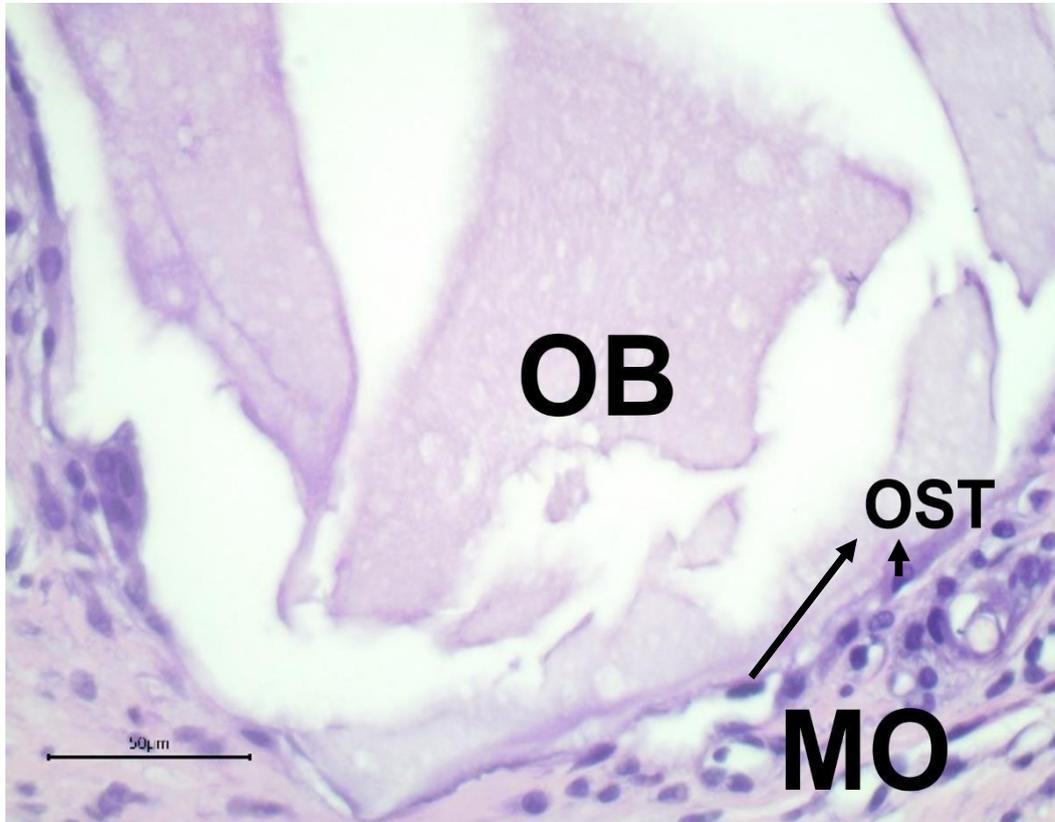
Legenda: OB) partículas de osso bovino.

OST) Osteoblastos.

MO) Matriz osteóide.

FIB)Fibroblastos.

Figura 15: Aumento de 400X em HE do grupo BOV no período experimental de 30 dias, evidenciando matriz osteóide e osteoblastos.



Fonte: Do autor.

Legenda: OB) partículas de osso bovino.

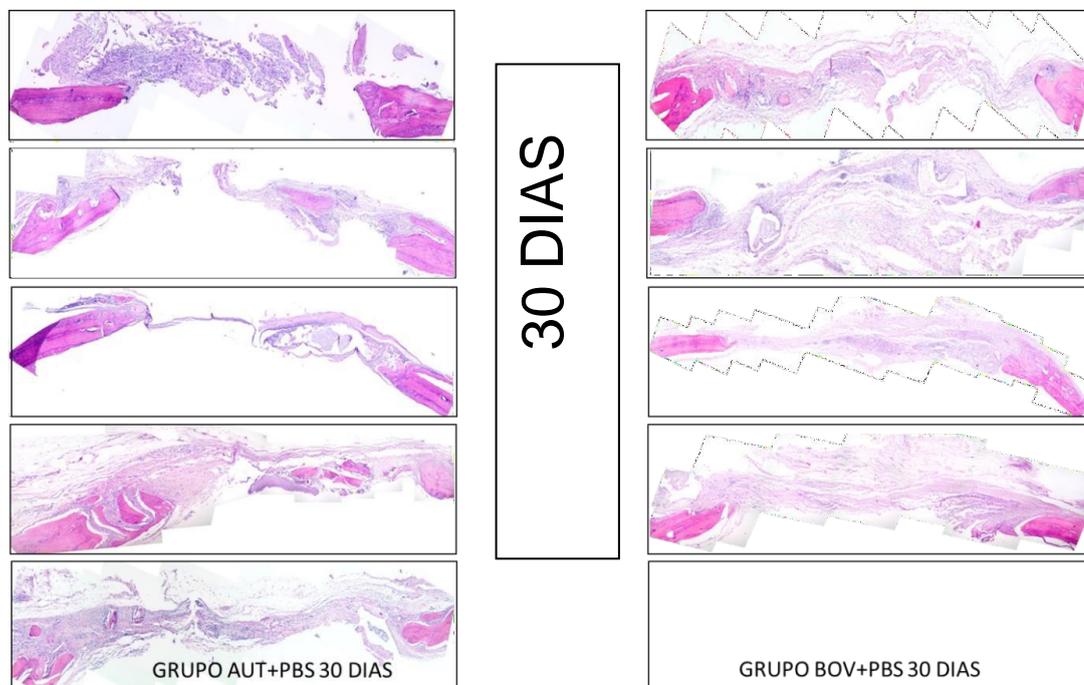
OST) Osteoblastos.

MO) Matriz osteóide.

Grupo PBS CIMMO 30 dias: A maioria dos espécimes não mostrou formação óssea completa, No entanto, apresentou maior evidência de formação óssea do lado em que o material estava presente. Observou-se que o centro dos defeitos ósseos apresentou menor espessura de tecido. Um dos espécimes mostrou boa formação óssea, mas incompleta (FIGURA 13).

Grupo AUT + PBS 30 dias. Não houve preenchimento completo do defeito ósseo por osso maduro. Observou-se maior manutenção da espessura do defeito na maioria dos espécimes, onde a porção central do defeito mostrou-se preenchida por tecido conjuntivo fibroso (FIGURA 16). Em alguns espécimes, ilhas de ossificação foram notadas (FIGURA 17), especialmente do lado preenchido com o material.

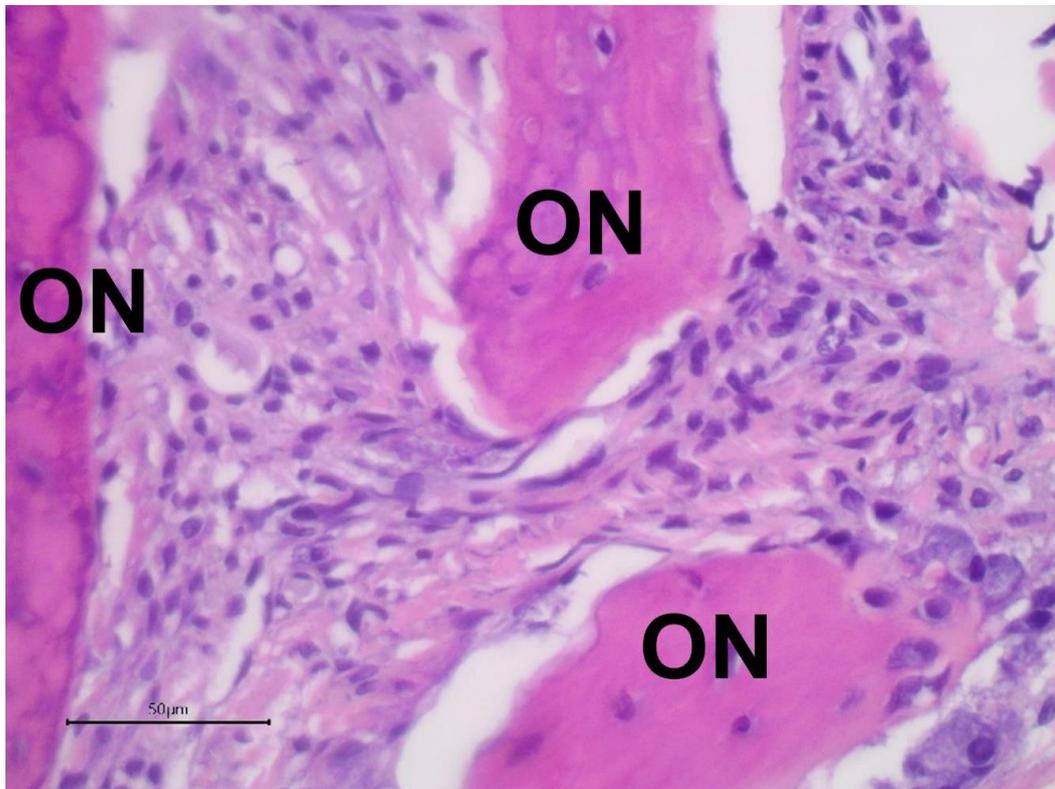
Figura 16 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos AUT+PBS e BOV+ PBS no período experimental de 30 dias (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Nota: um espécime do grupo BOV+PBS 30 dias foi perdido no processamento laboratorial.

Figura 17 – Aumento de 400X em HE do grupo AUT+PBS no período experimental de 30 dias, evidenciando ilhas de ossificação.



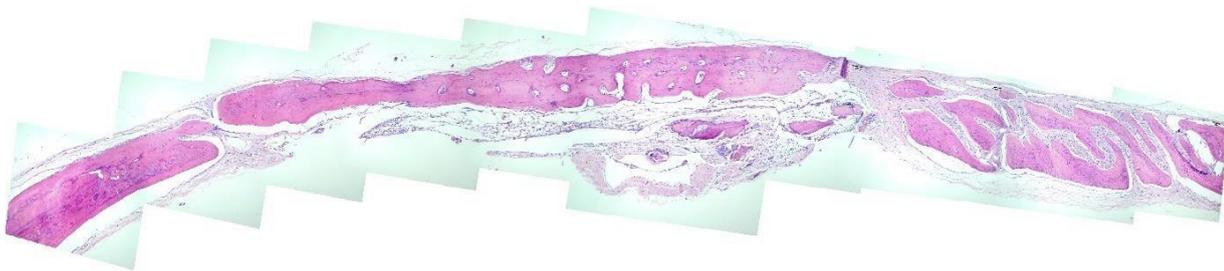
Fonte: Do autor.

Legenda: (ON) Osso neoformado.

Grupo BOV+PBS 30 dias. Observou-se maior manutenção da espessura do defeito ósseo, preenchida por tecido conjuntivo fibroso, com ilhas de ossificação. Observou-se presença de partículas espalhadas do lado preenchido com o biomaterial (FIGURA 16).

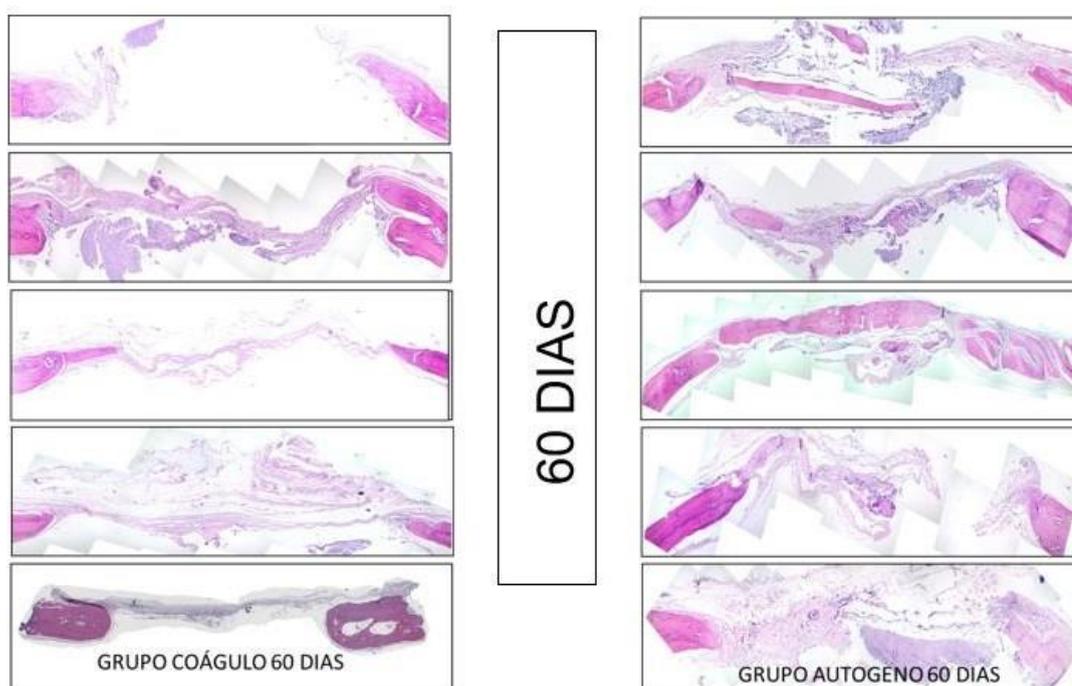
Grupo AUT 60 dias. Um dos espécimes mostrou reparação completa do defeito (FIGURA 18), e os demais mostraram neoformação óssea mais densa, nas margens do defeito cirúrgico em direção ao centro, com maior intensidade em relação ao período de 4 semanas. Uma das margens apresentou maior neoformação óssea que a outra. A maior parte do defeito foi preenchida por novo tecido ósseo e com manutenção da espessura da calvária (FIGURA 19). Presença de osteoblastos e fibroblastos em meio a fibras colágenas mais organizadas (FIGURA 20).

Figura 18 - Aumento de 100X em HE do grupo AUT no período experimental de 60 dias, demonstrou o espécime com reparação completa do defeito.



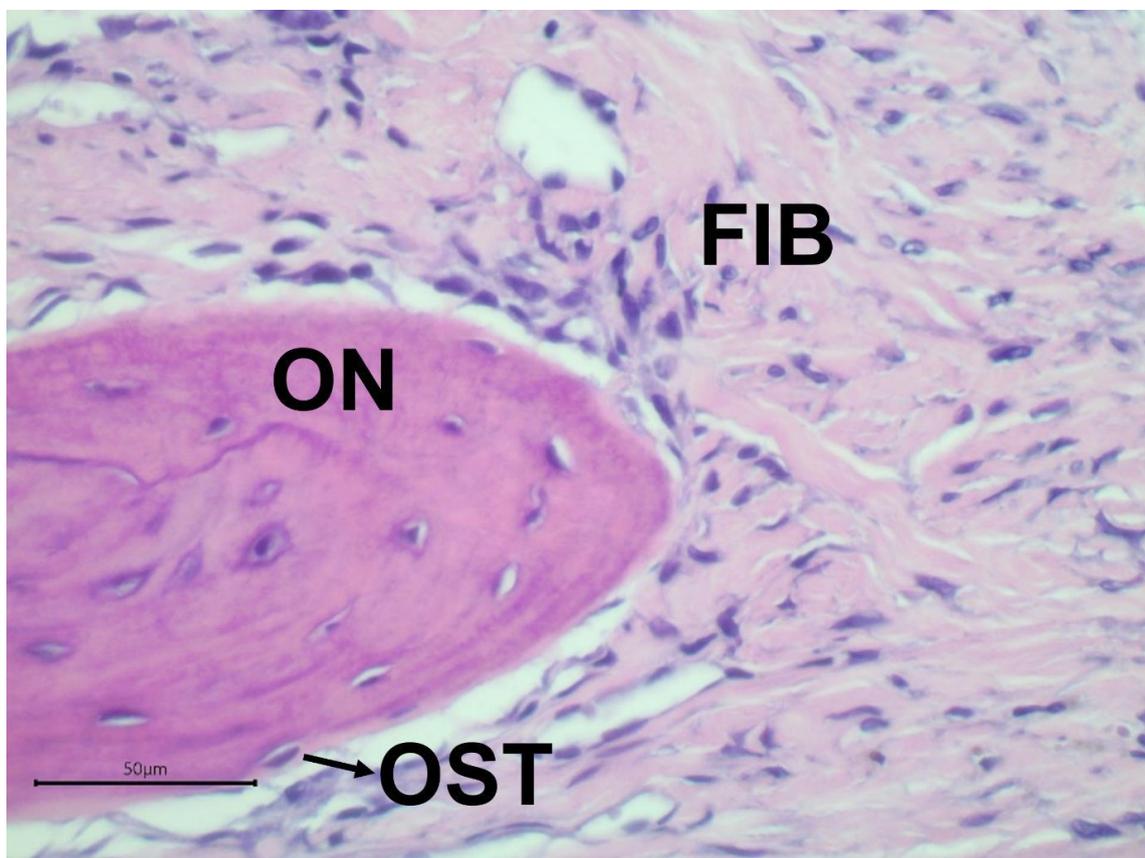
Fonte: Do autor.

Figura 19 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos COA e AUT no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Figura 20 – Aumento de 400X em HE do grupo AUT no período experimental de 60 dias evidenciando osteoblastos e fibroblastos em meio a fibras colágenas, mais organizadas.



Fonte: Do autor.

Legenda: OB) partículas de osso bovino.

MO) Matriz osteóide.

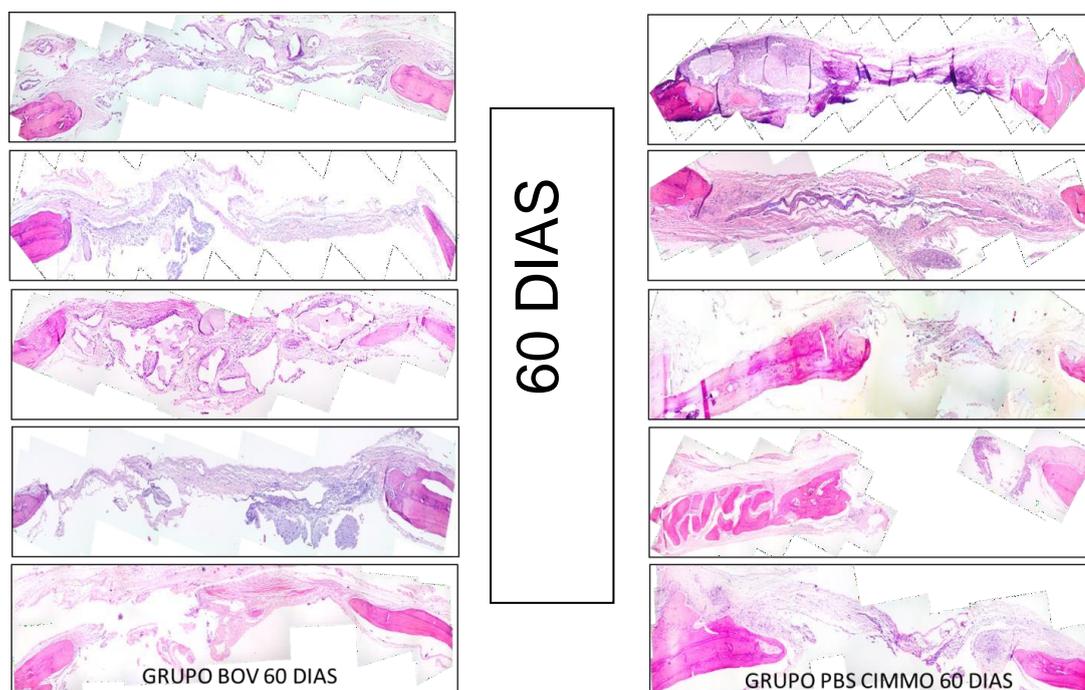
FIB)Fibroblastos.

Grupo COA 60 dias. Assim como no período de 4 semanas, a área de novo osso formado após 8 semanas permaneceu restrita às margens do defeito. Poucas trabéculas ósseas foram verificadas e o pequeno tecido ósseo neorformado apresentou-se com maior maturação. Ao longo do defeito, o tecido conjuntivo fibroso apresentou grande quantidade de fibras colágenas, mas com espessura menor que a da calvária original, devido à falta total de tecido ósseo no centro do defeito (FIGURA 19).

Grupo PBS CIMMO 60 dias. A espessura dos defeitos ósseos foi melhor mantida, com alguns espécimes evidenciando boa quantidade de osso neorformado, especialmente do lado

em que o defeito esteve preenchido com o biomaterial. Tecido conjuntivo fibroso foi observado preenchendo as demais áreas do defeito (FIGURA 21).

Figura 21 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos BOV e PBS CIMMO no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE).

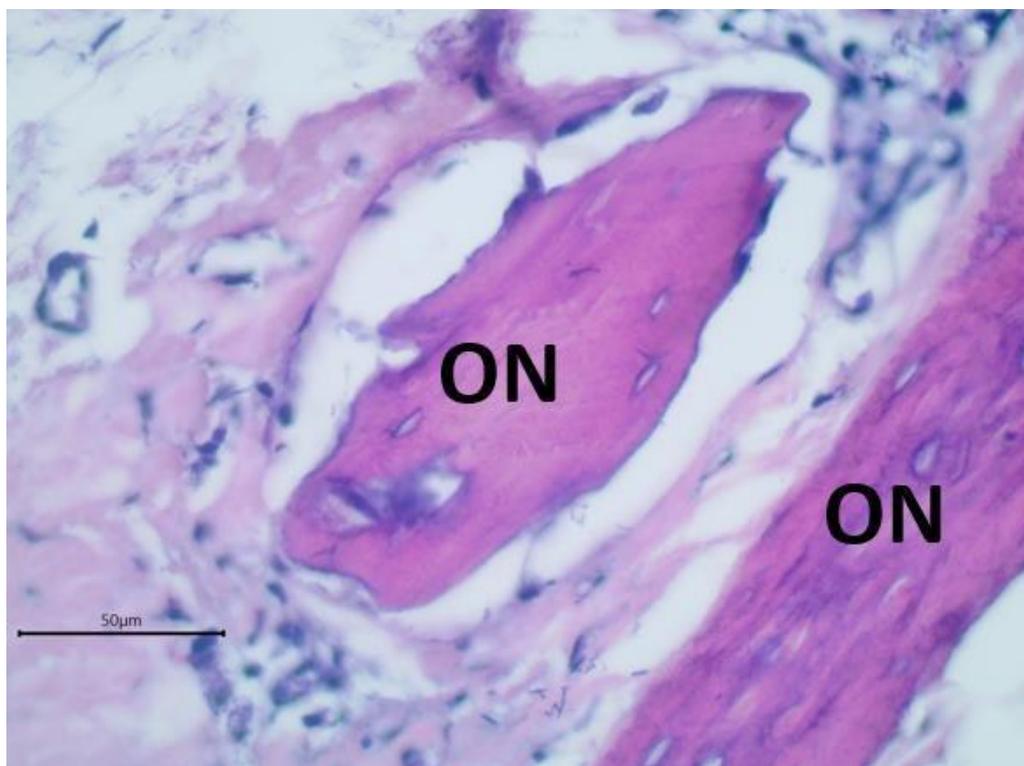


Fonte: Do autor.

Grupo BOV 60 dias. Nenhum espécime apresentou fechamento completo do defeito. A maior neoformação óssea localizou-se próxima às margens do defeito de ambos os lados, estendendo-se em direção ao seu centro. Em vários pontos foram observadas trabéculas ósseas isoladas ao longo do defeito. Foi observado tecido conjuntivo mais denso, organizado e com presença de matriz osteóide e maior neoformação óssea neste período experimental do que no período de 4 semanas. Uma tendência de manutenção da espessura da calvária original no novo osso depositado e tecido conjuntivo circunjacente foi observada (FIGURA 21).

Grupo AUT + PBS 60 dias: o preenchimento do defeito por tecido ósseo e tecido conjuntivo esteve mais evidente. O tecido conjuntivo permeiou ilhas de tecido osteóide (FIGURA 22), garantiu maior espessura de preenchimento do defeito. Mas nenhum espécime mostrou-se com o defeito completamente preenchido (FIGURA 23).

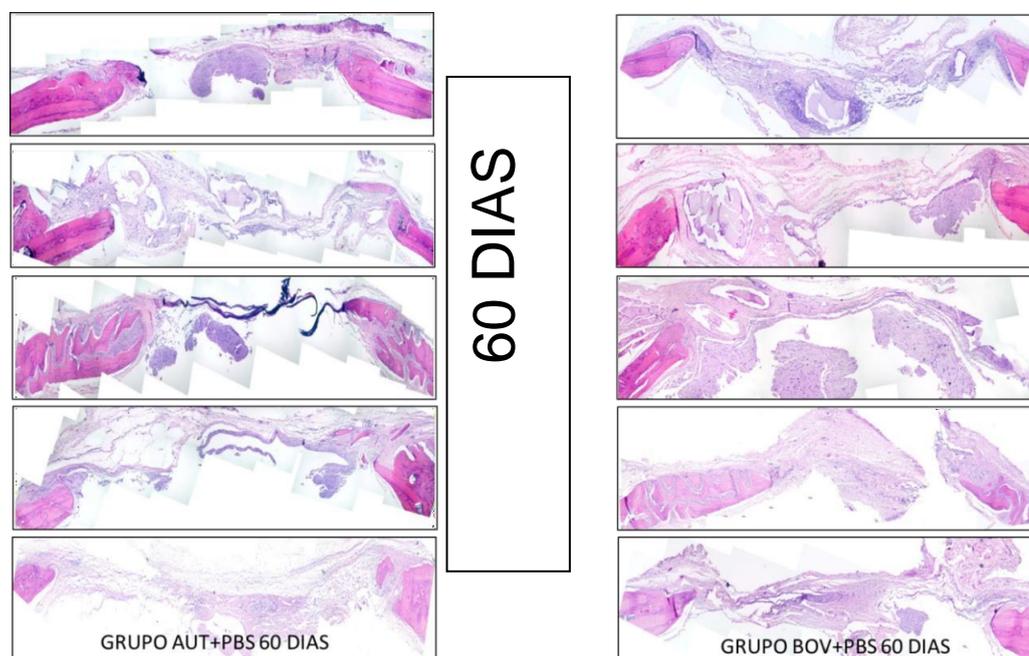
Figura 22 – Aumento de 400X em HE do grupo AUT+PBS no período experimental de 60 dias.



Fonte: Do autor.

Legenda: (ON) Osso neoformado.

Figura 23 - Visão panorâmica dos defeitos ósseos dos grupos AUT +PBS e BOV+PBS no período experimental de 60 dias (Aumento de 100X - HE).



Fonte: Do autor.

Grupo BOV+PBS 60 dias. Não houve preenchimento completo do defeito em nenhum espécime. Algumas partículas de osso bovino foram identificadas. Tecido conjuntivo fibroso preencheu os defeitos com melhor manutenção da espessura do defeito. O espécime que mostrou maior formação óssea evidenciou osso maduro (FIGURA 23).

2.4.5 Análise histométrica

Diferente dos resultados obtidos das análises tomográficas, na histometria o grupo AUT 60 dias, apresentou maior formação óssea que no grupo COA 30 dias, $p=0,0264$. Entretanto, a comparação entre os demais grupos AUT e COA, não apresentaram diferenças estatísticas $p>0,05$ (APÊNDICE C).

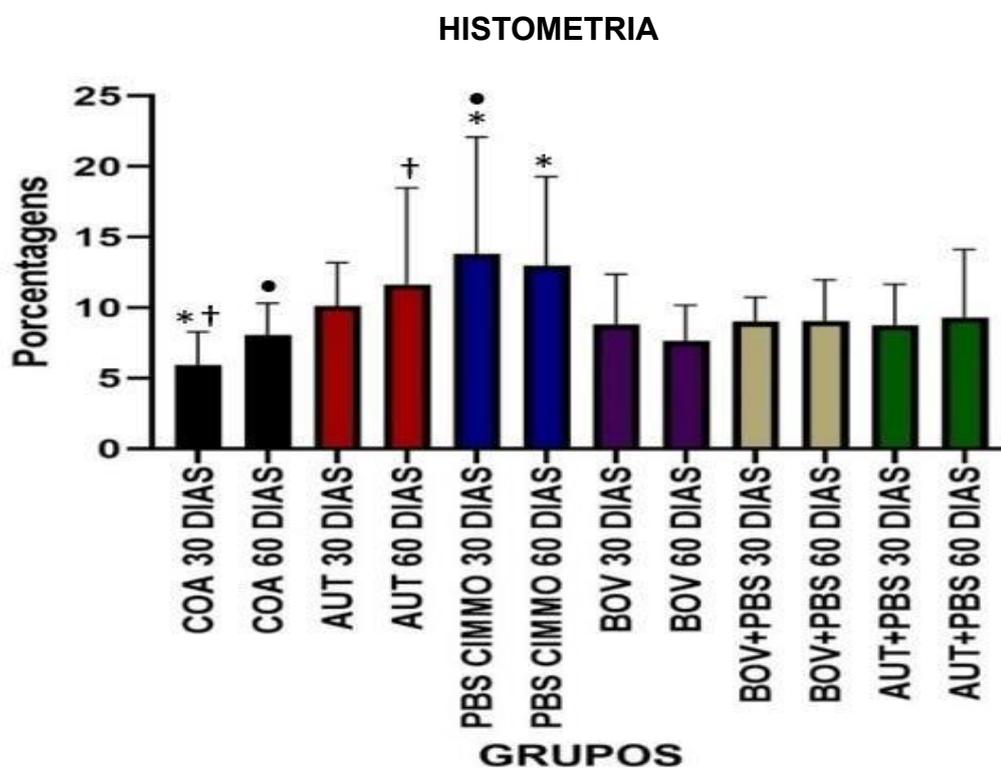
Analisando-se os grupos experimentais PBS CIMMO, tanto com 30 e 60 dias, apresentaram maior formação óssea comparada com grupo COA 30 dias $p=0,0002$ e $p=0,0014$ respectivamente. Em relação ao grupo COA 60 dias, apenas o grupo PBS CIMMO 30 dias, apresentou maior formação óssea $p=0,0237$. Enquanto a comparação entre os grupos COA e PBS CIMMO ambos com 60 dias, não apresentaram diferenças estatísticas $p=0,1048$.

Em relação ao grupo AUT controle positivo, apenas o grupo AUT 30 dias demonstrou menor formação óssea que o grupo PBS CIMMO ($p=0,0454$), enquanto os demais grupos, AUT e PBS CIMMO, tanto com 30 ou 60 dias apresentaram $p>0,05$ (APÊNDICE C).

Os grupos de associações do cimento PBS CIMMO, BOV + PBS e AUT + PBS, não apresentaram diferenças estatísticas entre si, em relação aos demais grupos $p>0,05$ (APÊNDICE C).

Os resultados estão demonstrados no gráfico 4.

Gráfico 4 – Histometria



Fonte: Do autor.

Legenda: * Demonstra que tanto o grupo PBS CIMMO 30 dias quanto PBS CIMMO 60 dias apresentaram maior formação óssea em relação ao grupo COA 30 dias.

† Demonstra que o grupo AUT 60 dias apresentou maior formação óssea que o grupo COA 30 dias.

• Demonstra a diferença entre o grupo PBS CIMMO 60 dias e o grupo COA 60 dias.

2.4 DISCUSSÃO

As pesquisas envolvendo modelos animais atuam como uma importante ligação entre os experimentos *in vitro* e os experimentos clínicos. Dentre os modelos animais, os roedores têm sido amplamente utilizados em pesquisas relacionadas à regeneração do tecido ósseo. Embora os animais primatas não humanos sejam a primeira escolha, questões éticas e as facilidades quanto aos experimentos com roedores (facilidade de manipulação, de alojamento, reprodução rápida e menor preocupação social) tornam os roedores como animais preferenciais para experimentos relacionados à regeneração óssea (GOMES E FERNANDES, 2011; DAMANAKI *et al.*, 2023).

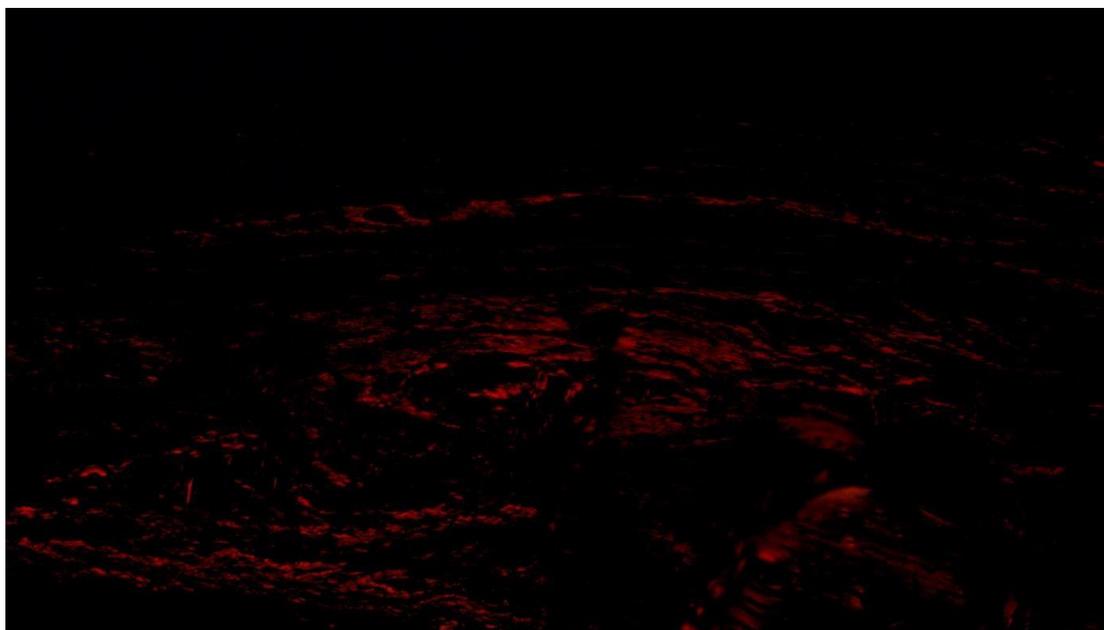
O modelo de calvária apresenta várias vantagens e por isso é popular entre os pesquisadores. Dentre as vantagens destaca-se a estrutura óssea da calvária que permite o estabelecimento de uma estrutura uniforme, defeito reprodutível e padronizado, facilmente avaliado pela análise radiográfica e histológica. A localização anatômica favorece um tamanho adequado para acesso cirúrgico e fácil manuseio intraoperatório; a dura-máter e a pele sobreposta estabelecem um suporte adequado para os materiais implantados (GOMES E FERNANDES, 2011; HONMA *et al.* 2008), sem necessidade de fixação interna ou externa. Em contrapartida apresenta desvantagem: quando carga biomecânica fisiológica é necessária para avaliar a formação óssea. Nesses casos, são indicados outros modelos como defeitos ósseos em mandíbula, fêmur ou tíbia (GOMES E FERNANDES, 2011).

O modelo animal com defeito crítico pode ser considerado como protótipo de defeitos de descontinuidade, como condição específica em que não ocorre regeneração tecidual espontânea. Dessa maneira, Honma *et al.* (2008) compararam o processo de regeneração em defeitos de tamanho subcrítico (3,8 mm de diâmetro) e crítico (8,8 mm de diâmetro), estabelecidos na calvária de ratos Wistar. Nova formação óssea foi observada em ambos os tamanhos de defeito. Entretanto, com 24 semanas, os defeitos subcríticos estavam completamente preenchidos, enquanto os defeitos críticos apresentaram reparação óssea parcial e formação de uma pseudoartrose com tecido conjuntivo fibroso no defeito criado. Verificou ainda que, após 24 semanas, o processo regenerativo cessa independentemente do tamanho ou da conclusão da cicatrização do defeito.

Os mesmos autores verificaram que, defeitos de tamanho crítico, apresentam maior reparação óssea na quarta semana e que regridem gradualmente. Verificaram ainda a presença de colágeno tipo I e osteocalcina na terceira semana e comparado com a vigésima quarta semana, tanto as fibras colágenas quanto a osteocalcina não estavam mais presentes (HONMA *et al.*, 2008). Mesmo realizando a coleta dos espécimes com quatro e oito semanas, verificou-se no estudo atual, que tanto na análise histológica quanto tomográfica, o aspecto

que demonstrava grande parte de tecido em processo de formação óssea, ainda caracterizado como fibras colágenas em processo de calcificação e áreas com leves alterações de densidade, sugestivas também de calcificação inicial, o que faz acreditar que um período cicatricial maior que o recomendado por Honma *et al.* (2008) seja interessante para a metodologia que foi empregada. Diante das observações realizadas como continuidade do trabalho, foi realizada análise imunoistoquímica com coloração de Picrosirius que permitirá a identificação de colágeno tipo I e III (FIGURA 30).

Figura 29 – Imagem de microscopia com luz polarizada do espécime corado por Picrosirius.



Fonte: Do autor.

O cimento PBS CIMMO[®] apresenta uma vasta aplicação na Odontologia, principalmente na Endodontia, e pelos bons resultados obtidos, em casos que seria necessária grande reparação óssea como em lesões endodônticas periapicais. Por esse motivo despertou a curiosidade de investigar a capacidade osteoindutora do cimento PBS CIMMO[®]. Escolheu-se modelo experimental em que produziu defeito crítico em calvárias de ratos Wistar para analisar as capacidades osteocondutora e indicativos osteoindutores desse biomaterial.

Para Lucattelli *et al.* (2018) e Silva *et al.* (2022), a neoformação óssea foi observada na periferia de defeitos de tamanho crítico, de forma bastante discreta nos grupos controles negativos. Essa formação foi evidenciada nos estudos histomorfométricos citados. Para Honma *et al.* (2008), a reparação óssea em calvaria de ratos origina-se do periósteo em ambos

os lados do osso parietal, periósteo externo e dural, e não da superfície da borda óssea em torno do defeito original. Mesmo que o preenchimento parcial da cavidade cirurgicamente preparada em calvaria de ratos possa ter contribuído para menor formação óssea nas calvárias, a metodologia de preenchimento parcial possibilitaria avaliação da capacidade de condução e ou indicativos de indução óssea do cimento PBS CIMMO[®], visto que a identificação de osso neoformado na porção não preenchida do defeito crítico, no período de 4 semanas, estaria sendo contribuída pelo biomaterial.

Silva *et al.* (2022) avaliaram a formação óssea em modelo experimental em calvária de roedores de dois cimentos endodônticos, AH Plus (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Vaud, Switzerland) e Sealer Plus (MK LIFE – Michel E. Klymus Me, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Embora ambos os cimentos terem demonstrado a capacidade de estimular a formação óssea, o objetivo daquele trabalho foi voltado para avaliar o comportamento biológico desses cimentos, enquanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade ósseo-formadora do cimento PBS CIMMO[®]. No trabalho de Silva, *et al.* 2022 o defeito crítico na calvária foi totalmente preenchido enquanto no presente trabalho, foi preenchido parcialmente com a expectativa de identificar formação óssea no lado oposto ao preenchido, como descrito na metodologia.

Não somente o autor citado acima preencheu em totalidade o defeito cirúrgico criado. Vários outros autores também preencheram a cavidade formada em sua totalidade, (DA SILVA *et al.*, 2022; DE OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2021; LUCATELI *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2016), pois esse é o padrão seguido nesse modelo experimental. Acredita-se que ao preencher parcialmente o defeito ósseo, a identificação da presença de osso no lado não preenchido, pode pressupor capacidade osteoindutora do biomaterial, que, sem dúvida, precisa ser investigada posteriormente com estudos imunoistoquímicos. Além disso, considerando a origem do biomaterial empregado, o cimento PBS CIMMO[®], material derivado do MTA, se permanecesse por longo tempo como material preenchedor de todo o defeito ósseo, estaria se comportando como um material osteo-obstrutor (KOLERMAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2012; MORDENFELD *et al.* 2010; VALENTINI *et al.*, 2000), impedindo desta maneira, no tempo estudado, a investigação da formação de novo osso.

Pesquisas avaliando neoformação óssea utilizando biocerâmicas não é uma novidade. A maioria dos trabalhos utilizaram biocerâmicas em diferentes granulações de α e ou β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita, fosfato de cálcio bifásico (DE OLIVEIRA JUNIOR J. M. *et al.* 2021; LU; YU; CHEN, 2018). Diante de defeitos com conformações variadas e de

etiologias diferentes (trauma, neoplasia, doença periodontal), é de importância o desenvolvimento de várias formas de apresentação dos biomateriais para permitir o seu uso em diferentes complexidades de defeitos ósseos a serem reconstruídos. Encontra-se até formas líquidas de cimento para o preenchimento de cavidades ósseas (SCHMIDT *et al.*, 2019).

Na formulação do cimento PBS CIMMO há vários componentes herdados do MTA (silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico, ferrealuminato tetracálcico e sulfato de cálcio di-hidratado), além do carbonato de cálcio, α -fosfato tricálcio (VLAD *et al.*, 2010) e a pozolana. Este último é um aluminossilicato amorfo proveniente da reação de silicato de cálcio hidratado, aluminato de cálcio hidratado com hidróxido de cálcio, geralmente adicionado ao concreto utilizado na construção civil (PRESA *et al.* 2020) para aumentar a resistência do produto.

Compostos de cálcio-fósforo, sílica e materiais à base de metal são as categorias mais comuns de nanomateriais inorgânicos para reparo de defeitos ósseos. A nano sílica pode realizar a estrutura hierárquica semelhante a um osso através do processo de mineralização da biossílica, e as silicificações biomiméticas poderiam estimular a atividade dos osteoblastos para a formação óssea e inibir a diferenciação dos osteoclastos (FU *et al.*, 2021).

O mecanismo de osteoindução promovido pelos íons Ca e P é complexo e desencadeado por várias vias e sinalizadores biológicos, por exemplo, fator de crescimento beta (TGF- β), BMPs e Wnt. A sinalização de TGF- β primeiro transmite sinais através da membrana plasmática por meio da formação de complexos heteroméricos de receptores específicos de serina/treonina quinase tipo I e tipo II. O receptor tipo I é fosforilado após a ativação de receptores específicos tipo II. Os receptores tipo I ativados iniciam a sinalização intracelular através da fosforilação de proteínas Smad específicas, R-Smads. R-Smads ativados formam um complexo com co-Smad e Smad4 e então se translocam para o núcleo para direcionar a resposta transcricional. Existe outra molécula capaz de realizar a osteoindução, a Wnt, ela pode promover a osteoindução sozinha ou em sinergia com BMPs (LU; YU; CHEN, 2018).

Associando os fatos de que o cimento PBS CIMMO apresenta excelentes resultados clínicos na Endodontia, sua formulação e os mecanismos de reparação óssea de cada componente (cálcio, silicatos e fosfatos) demonstram a possibilidade do cimento PBS CIMMO possuir a indicação como um biomaterial reparador ósseo além das indicações já presentes na área da Endodontia.

De acordo com os resultados apresentados, mesmo realizando três tipos de análises das imagens tomográficas, não foi possível verificar uma semelhança entre os resultados. Isso ficou mais evidente quando as análises de quantificação óssea pela tomografia não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto as análises por densidade demonstraram apenas alguns grupos com diferenças estatísticas. A pequena variação radiográfica observada pode ter acontecido pelo fato de que para apresentar notável alteração o processo cicatricial ósseo deve apresentar pelo menos 40 % de mineralização (CHAPRAZOV *et al.* 2022). Comparando os resultados dos trabalhos de Chaprazov *et al.* 2022 e Honma *et al.* 2008 com os nossos resultados das análises histológicas e tomográficas, fica evidente a necessidade de um período cicatricial mais prolongado para que pudessem ser evidenciados os aspectos histológicos de formação óssea madura.

A intenção de verificar a quantidade de osso neoformado e não apenas a diferença das densidades teve objetivo de evitar o viés que poderia ocorrer uma vez que diferentes biomateriais apresentam densidades diferentes. Em se tratando do biomaterial pesquisado ser um cimento endodôntico e na sua formulação ser necessário elementos que promovam radiopacidade, essa característica pode levar o *software* a calcular uma densidade mais elevada que não corresponda necessariamente ao tecido ósseo neoformado.

Os resultados das análises tomográficas corresponderam com aqueles obtidos pela análise histomorfométrica. A neoformação óssea observada no grupo PBS CIMMO através da histomorfometria também foi demonstrada pela maior densidade calculada pelos *softwares* ImageJ e OneVolumeWiewer (dados em HU). E esses resultados foram superiores àqueles encontrados no grupo AUT.

O mais conflitante dos resultados obtidos foi a relação dos grupos COA e AUT que praticamente não apresentarem diferenças entre si nos períodos de 30 e 60 dias. Essa questão fica exacerbada pelo fato de se tratar de dois grupos controles, um negativo e outro positivo respectivamente. Esperava-se que no grupo COA a neoformação óssea fosse mínima e restrita às margens do defeito, visto que o defeito na calvária era crítico, enquanto no grupo AUT a neoformação óssea fosse mais representativa. Acredita-se que o preenchimento incompleto do defeito por partículas ósseas autógenas tenha contribuído para maiores taxas de reabsorção dos fragmentos.

Sabe-se que quando fragmentos ósseos são deixados no interior de cavidades, o comportamento deles pode variar de acordo com o tamanho, localização e quantidade dos fragmentos. Em alguns casos, os fragmentos ósseos podem ser reabsorvidos. Em outros casos, os fragmentos podem permanecer no lugar por longos períodos de tempo sem causar nenhum

problema. No entanto, em alguns casos, os fragmentos ósseos podem causar inflamação ou infecção (CAMPOS, 2009). Durante o processo cicatricial de um defeito ósseo, uma série de eventos biológicos complexos está envolvida, incluindo a formação de um coágulo sanguíneo no local e dando início ao processo de cicatrização. Para que o processo de cicatrização ocorra, há um envolvimento da ativação de várias vias bioquímicas e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) passam a ter efeitos oxidativos e redutores. Se houver produção excessiva de ROS, pode-se ter um estresse oxidativo que danifica as células do tecido em cicatrização e retardam o processo cicatricial. Por outro lado, a presença de ROS também é necessária para a ativação de enzimas e fatores de crescimento envolvidos na cicatrização. Assim, é importante manter um equilíbrio adequado entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante durante o processo de cicatrização (SALLES, 2007).

A metodologia empregada deixou metade da cavidade preenchida com coágulo sanguíneo em todos os grupos e pode ter contribuído de maneira negativa no processo cicatricial. Novos estudos deverão ser realizados para investigar as ROS e o seu papel na cicatrização de defeitos em calvarias tratadas como no presente trabalho.

Em geral, o objetivo do preenchimento de defeitos ósseos com biomateriais é proporcionar um suporte estrutural para a regeneração óssea e estimular a proliferação de células ósseas, levando à formação de novo osso. Quando um defeito ósseo não é completamente preenchido com biomaterial, é possível que ocorra uma absorção do material pelo organismo ou uma infiltração de tecido mole no espaço vazio.

No caso de partículas de biomaterial, é possível que essas partículas sejam reabsorvidas pelo organismo, ou seja, incorporadas ao novo tecido ósseo formado. Biomateriais como o fosfato tricálcico e a hidroxiapatita, biocompatíveis e bioabsorvíveis, são gradualmente reabsorvidos ao longo do tempo.

No entanto, se as partículas do biomaterial não forem completamente absorvidas ou incorporadas ao novo tecido ósseo, elas podem formar um ambiente propício para crescimento de bactérias e levar ao desenvolvimento de infecções. Além disso, as partículas de biomaterial não absorvidas também podem causar irritação tecidual e inflamação.

No presente estudo, acredita-se que a quantificação óssea reduzida em todos os grupos pode estar associada a esses aspectos decorrentes do preenchimento incompleto do defeito ósseo, mas o cimento PBS CIMMO mostrou-se biocompatível, pois não foram identificados espécimes com desenvolvimento de processos infecciosos evidentes ou reação tipo corpo estranho.

3 CONCLUSÃO

O cimento PBS CIMMO[®] isolado, aos 60 dias, mostrou maior densidade em relação ao osso autógeno, sugerindo melhor reparação óssea, visto que imagens histológicas de colágenos precursores foram evidenciados nesse período.

Diante dos resultados histológicos e tomográficos, é notável a capacidade que o cimento PBS CIMMO apresenta em estimular a formação óssea. Entretanto mais estudos são necessários para adequação da metodologia empregada, aumentando o tempo de avaliação.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, D. *et al.* An evaluation of accelerated Portland cement as a restorative material. **Biomaterials**, v. 23, n. 19, p. 4001–4010, 2002.
- ALBREKTSSON, T. Direct bone anchorage of dental implants. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 50, n. 2, p. 255-261, 1983.
- AL-NAWAS, B.; SCHIEGNITZ, E. Augmentation procedures using bone substitute materials or autogenous bone-a systematic review and meta-analysis. **Eur J Oral Implantol**, v. 7, n. Suppl 2, p. 219-234, 2014.
- AL-MORAISSEI, E. A. *et al.* Do osteoconductive bone substitutes result in similar bone regeneration for maxillary sinus augmentation when compared to osteogenic and osteoinductive bone grafts? A systematic review and frequentist network meta-analysis. **International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 49, p. 107–120, 2020.
- BAKHTIAR, H. *et al.* Human pulp responses to partial pulpotomy treatment with theraCal as compared with Biodentine and ProRoot MTA: a clinical trial. **J Endod**, v. 43, n. 11, p. 1786-91, 2017.
- BHAGAVALDAS, M. C. *et al.* Efficacy of two rotary retreatment systems in removing Gutta-percha and sealer during endodontic retreatment with or without solvent: A comparative in vitro study. **J Conserv Dent**, v. 20, n. 1, p. 12–16, 2017.
- BÍBLIA, N. T. 1 Coríntios. In BÍBLIA. Português. **Sagrada Bíblia Católica: Antigo e Novo Testamentos**. Tradução de CNBB. São Paulo: Editora Canção Nova, 2011. p. 1401.
- BOCZAR, R. M. L. *et al.* Bioceramic cement in endodontic fillings: a randomized clinical trial. **Journal of Dental Health, Oral Disorders & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 78-84, 2020.
- CAMPOS, C. N. **Análise comparativa da eficiência de três raspadores ósseos com diferentes aberturas da área coletora**. 2009. 73f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, 2009.
- CHAPRAZOV, T. *et al.* Diagnostic imaging studies on local and systemic erythropoietin application for promoting bone regeneration in rat calvarial defects. **Vet. Sci.**, v. 9, n. 578, 2022.
- CHOU, T. M.; CHANG, H. P.; WANG, J. C. Autologous platelet concentrates in maxillofacial regenerative therapy. **Kaohsiung J Med Sci**, v. 36, n. 5, p. 305-310, May 2020.
- COCLETE, G. A.; TAVANO, O.; PAVAN, A. J. A comparison of optical and radiographic densities, analyzed by MRA photodensitometer and digora digital system. **Rev. Odontol. UNESP**, v. 32, n. 2, p. 93-98, jul./dez., 2003.
- CORRÊA, A. **Cimento PBS CIMMO® versus polimetilmetacrilato (PMMA) na reparação de falhas ósseas em ratos**. 2019. 29f. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência Aplicada à Saúde) – Universidade do Vale do Sapucaí, Pouso Alegre, 2019.

CYPHER, T. J.; GROSSMAN, J. P. Biological principles of bone graft healing. **J. Foot Ankle Surg.**, v. 35, p. 413–417, 1996.

DA SILVA, A. A. F. *et al.* The effectiveness of hydroxyapatite-beta tricalcium phosphate incorporated into stem cells from human exfoliated deciduous teeth for reconstruction of rat calvarial bone defects. **Clinical Oral Investigations**, v. 26, p. 595-608, 2022.

DANESH-SANI, S. A.; ENGBRETSON, S. P.; JANAL, M. N. Histomorphometric results of different grafting materials and effect of healing time on bone maturation after sinus floor augmentation: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, p. 301–312, 2017.

DANESH-SANI, S. A.; LOOMER, P. M.; WALLACE, S. S. A comprehensive clinical review of maxillary sinus floor elevation: Anatomy, techniques, biomaterials and complications. **British Journal of oral and Maxillofacial Surgery**, v. 54, p. 724–730, 2016.

DE OLIVEIRA JUNIOR, J. M. *et al.* Physical characterization of biphasic bioceramic materials with different granulation sizes and their influence on bone repair and inflammation in rat calvaria. **Sci Rep.**, v. 11, n. 1, 2021.

DEL FABBRO, M.; ROSANO, G.; TASCHIERI, S. Implant survival rates after maxillary sinus augmentation. **European Journal of Oral Sciences**, v. 116, p. 497–506, 2008.

FERNANDEZ, M. S.; ROSA, J. A. A.; FERREIRA, G. S. Perfil epidemiológico das alterações bucais na população brasileira: revisão integrativa de literatura. **Revista Ciências e Odontologia**, v. 5, n. 1, p. 29-37, 2020.

FERRANTINO L. *et al.* Five-year outcomes of a randomized controlled clinical trial comparing single-tooth implant-supported restoration with either zirconia or titanium abutments. **J Clin Periodontol.**, v. 50, n. 6, p. 744-754, 2023.

FIGUEIRÊDO JÚNIOR, E. C. *et al.* Cimentos biocerâmicos reparadores fabricados e/ou disponíveis no Brasil: uma revisão de literatura e análise bibliométrica sobre suas propriedades biológicas. **Archives of Health Investigation**, v. 10, n. 2, p. 187-191, 2021.

FREITAS PEDROSA, S. S. *et al.* Dental Cavity Lining, Composite Resin and Bioceramic: Randomized Clinical Trial. **International Journal of Innovative Research in Medical Science**, v. 7, n. 2, p. 79-85, 2022.

FU Y. *et al.* Novel inorganic nanomaterial-based therapy for bone tissue regeneration. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, 2021.

FUKUBA, S. *et al.* Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. **Materials**, v. 14, n. 5, 2021.

GALLO, P. *et al.* Comparative analysis of two biomaterials mixed with autogenous bone graft for vertical ridge augmentation: A histomorphometric study in humans. **Clin Implant Dent Relat Res.**, v. 24, n. 5, p. 709-719, 2022.

- GANDHI, B.; HALEBATHI-GOWDRA, R. Comparative evaluation of the apical sealing ability of a ceramic based sealer and MTA as root-end filling materials - An in-vitro study. **J Clin Exp Dent.**, v. 9, n. 7, p. 901-905, 2017.
- GERRESSEN, M. *et al.* The volume behavior of autogenous iliac bone grafts after sinus floor elevation: A clinical pilot study. **The Journal of Oral Implantology**, v. 41, p. 276–283, 2015.
- GOMES, P. S.; FERNANDES, M. H. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 1, p. 14-24, 2011.
- GONÇALVES, L. A. C. *et al.* Chemo-mechanical properties of the new bioceramic cement PBS CIMMO® compared to MTA REPAIR HP Angelus® cement. **J Dent Health Oral Disord Ther.**, v. 13, n. 4, p. 109-113, 2022.
- GORLA, L. F. D. O. *et al.* Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: A prospective, randomized, volumetric computed tomography study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, p. 1486–1491, 2015.
- HAITER NETO, F.; KURITA, L. M.; CAMPOS, P. S. F. **Diagnóstico por imagem em Odontologia**. Nova Odessa: Napoleão, 2018.
- HONMA, T. *et al.* Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. **Oral Dis.**, v. 14, n. 5, p. 457–64, 2008.
- KIM, D. M. *et al.* The clinical and histologic outcome of dental implant in large ridge defect regenerated with alloplast: a randomized controlled preclinical trial. **Journal of Oral Implantology**, v. 39, n. 2, p. 148-153, 2013.
- KLIJN, R. J. *et al.* Sinus floor augmentation surgery using autologous bone grafts from various donor sites: A meta-analysis of the total bone volume. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, p. 295–303, 2010.
- KOLERMAN, R. *et al.* Histomorphometric analysis of newly formed bone after bilateral maxillary sinus augmentation using two different osteoconductive materials and internal collagen membrane. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 32, p. 21-28, 2012.
- KUBLER, A. *et al.* Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. **Implant Dent**, v. 13, n. 2, p. 171-9, 2004.
- LEE, D. Z. *et al.* Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 23, p. 918–924, 2012.
- LOXLEY, E. C. *et al.* The effect of various intracanal oxidizing agents on the push-out strength of various perforation repair materials. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 95, n. 4, p.490–494, 2003.

LU, J.; YU, H.; CHEN, C. Biological properties of calcium phosphate biomaterials for bone repair: A review. **RSC Adv.**, v. 8, p. 2015–2033, 2018.

LUCATELLI, *et al.* Doxycycline and Autogenous Bone in Repair of Critical-Size Defects. **Implant Dent.**, v. 27, n. 4, p. 461-466, 2018.

MACBETH, N. D; DONOS, N.; MARDAS, N. Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration or socket seal technique. A randomised, single-blind controlled clinical trial. **Clin Oral Implants Res.**, v. 33, n. 7, p. 681-699, 2022.

MAZZONETTO, R.; DUQUE NETO, H.; NASCIMENTO, F. F. **Enxertos ósseos em Implantodontia.** São Paulo: Napoleão, 2012.

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

MOYSÉS, F. V. *et al.* Bioactive and biocompatible cement as a single element in pulpotomy of deciduous teeth: a randomized clinical trials. **RGO Rev Gaúch Odontol**, v. 68, 2020.

MORDENFELD, A. *et al.* Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. **Clinical Oral Implants Research**, v. 21, p. 961–970, 2010.

MOREIRA, T. C. A. *et al.* Reabilitação com implantes em maxila atrófica por meio de cirurgia guiada utilizando a técnica “All-on-four”. **Research, Society and Development.**, v. 12, n. 5, 2023.

PATEL, P. P. *et al.* Mechanical and biological evaluation of a hydroxyapatite-reinforced scaffold for bone regeneration. **J Biomed Mater Res Part A.** v. 107, p. 732–741, 2019.

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview. Part I: vital pulp therapy. **Int Endod J**, v. 51, n. 2, p. 177-205, 2018.

PEDROSA, M. D. S. *et al.* Cytotoxicity and cytokine production by calcium silicate-based materials on periodontal ligament stem cells. **Braz Dent J.**, v. 32, n. 3, p. 65-74, 2021.

PEDROSA, M. D. S. *et al.* Response of periodontal ligament stem cells to lipopolysaccharide and calcium silicate-based materials. **Braz Dent J.**, v. 33, n. 2, p. 73-82, 2022.

PEDROSA, M. D. S. *et al.* Exposure to lipopolysaccharide and calcium silicate-based materials affects the behavior of dental pulp cells. **Braz Dent J.**, v. 33, n. 5, p. 9-17, 2022.

PRESA, L. *et al.* Natural Mordenite from Spain as Pozzolana. **Molecules**, v. 25, n. 5, 2020.

PU'AD, N. A. S. M. *et al.* Syntheses of hydroxyapatite from natural sources. **Heliyon**, v. 5, n. 5, 2019.

REYES-CARMONA, J. F.; FELIPPE, M. S.; FELIPPE, W. T. Biomineralization ability and interaction of mineral trioxide aggregate and white Portland cement with dentin in a phosphate-containing fluid. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 731–6, 2009.

SAKKAS, A. *et al.* Risk factors for post-operative complications after procedures for autologous bone augmentation from different donor sites, **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.46, n.2, p. 312-322, 2018.

SALLES, M. B. **Avaliação do estresse oxidativo agudo após trauma cirúrgico realizado em tecido ósseo de ratos Wistar**. 2007. 67 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SANTIAGO, M. C. *et al.* Calcium silicate-based cements cause environmental stiffness and show diverse potential to induce osteogenesis in human osteoblastic cells. **Sci Rep.**, v. 11, n. 1, 2021.

SCHLEGEL, K. A. *et al.* Hard tissue augmentation —material selection. **Implantologie**, v. 24, p. 7–15, 2016.

SCHMIDT, L. E. *et al.* Critical Defect Healing Assessment in Rat Calvaria Filled with Injectable Calcium Phosphate Cement. **J Funct Biomater.**, v. 10, n. 2, 2019.

SILVA, G. F. *et al.* Laboratory study of tissue repair of resin-based endodontic sealers in critical surgical defects. **J Appl Oral Sci.**, v. 30, 2022.

SILVA, A. A. F.. **Associação da hidroxiapatita e beta-tricálcio fosfato incorporados em culturas de células-tronco, obtidas de dentes decíduos esfoliados humanos, em defeitos de calvária de ratos**. 2021. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2021.

SILVA, A. C., *et al.* Effect of Doxycycline in Gel Form on Bone Regeneration: Histomorphometric and Tomographic Study in Rat Calvaria. **J Periodontol**, v. 87, n. 1, 2016.

SILVA NETO, J. D. *et al.* Root perforations treatment using mineral trioxide aggregate and Portland cements. **Acta Cir Bras**, v. 25, n. 6, p. 479-484, 2010.

SILVA NETO, J. D. *et al.* Portland cement with additives in the repair of furcation perforations in dogs. **Acta Cir Bras**, v. 27, n. 11, p. 809- 814, 2012.

SILVA, S. R. *et al.* Portland cement versus MTA as a root-end filling material. A pilot study. **Acta Cir Bras**, v. 30, n. 2, p.1601644, 2015.

SILVA, S. R. *et al.* The use of a biocompatible cement in endodontic surgery. A randomized clinical trial. **Acta Cir Bras**, v. 31, n. 6, p. 422-427, 2016.

SILVA, S. R.; ZOTARELLI, I. J. F.; SILVA NETO, J. D. Incomplete rhizogenesis and necrosis treated with PBS® HP cement synthetic barrier: case report. **J Dent Health Oral Disord Ther**, v. 9, n. 3, p. 205- 208, 2018.

SOBCZAK-KUPIEC, A. *et al.* Review of the Applications of Biomedical Compositions Containing Hydroxyapatite and Collagen Modified by Bioactive Components. **Materials (Basel)**, v. 14, n. 9, Apr, 2021.

STUMBRAS, A. *et al.* Regenerative bone potential after sinus floor elevation using various bone graft materials: A systematic review. **Quintessence International**, v. 50, p. 548–558, 2019.

TETÈ, S. *et al.* Maxillary sinus augmentation procedures through equine-derived biomaterial or calvaria autologous bone: immunohistochemical evaluation of OPG/RANKL in humans. **European Journal of Histochemistry**, v. 57, n. 10, p. 60 – 65, 2013.

TRIMMEL, B. *et al.* Relative performance of various biomaterials used for maxillary sinus augmentation: A Bayesian network meta-analysis. **Clin Oral Implants Res**, v. 32, n. 2, p. 135-153, Feb 2021.

TORABINEJAD, M.; WATSON, T. F.; PITT FORD, T. R. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root end filling material. **J Endod**, v. 19, n. 12, p. 591–595, 1993.

TORABINEJAD, M. *et al.* Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. **Int Endod J**, v. 42, n. 5, p. 408–411, 2009.

TORABINEJAD, M.; PARIROKH, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an overview updated. Part II: other clinical applications and complications. **Int Endod J**, v. 51, n. 3, p. 284-317, 2018.

VAIDERGORIN, E. I. L. Características dos cimentos Portland: uma abordagem química. **A Construção**, São Paulo, 1983.

VALENTINI, P. *et al.* Sinus grafting with porous bone mineral (Bio-Oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 20, p. 245-253, 2000.

VLAD, M. D. *et al.* Osteogenic biphasic calcium sulphate dihydrate/iron-modified alpha-tricalcium phosphate bone cement for spinal applications: in vivo study. **Acta Biomater**, v. 6, n. 2, p.607–616, 2010.

WINKLER, T. *et al.* A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. **Bone Jt. Res.**, v. 7, p. 232–243, 2018.

ZERBINATTI, C. C. *et al.* Bioceramic cement in the filling of bone defects in rats. **Acta Cir Bras**, v. 34, n. 6, Aug. 2019.

APÊNDICE A – Resultados do Teste de Tukey à 5%, com os valores de p, na análise da densidade no software ImageJ.

Number of families					1
Number of comparisons per family					66
Alpha					0,05
Tukey's multiple comparisons test					
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 30 DIAS	97,33	No	ns	0,6408	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. BIO OSS 30 DIAS	93,53	No	ns	0,9211	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS	253,7	Yes	**	0,003	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS	232,7	Yes	*	0,038	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. COÁGULO 30 DIAS	220,9	Yes	**	0,0096	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	33,13	No	ns	>0,9999	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	269,3	Yes	****	<0,0001	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	188,8	No	ns	0,2017	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	62,4	No	ns	0,9765	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	218,5	Yes	**	0,0059	
AUTÓGENO 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-109	No	ns	0,4562	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BIO OSS 30 DIAS	-3,8	No	ns	>0,9999	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS	156,4	Yes	***	0,001	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS	135,3	No	ns	0,2277	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. COÁGULO 30 DIAS	123,5	No	ns	0,0746	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	-64,2	No	ns	0,9972	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	172	Yes	*	0,0188	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	91,47	No	ns	0,8792	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-34,93	No	ns	0,9994	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	121,2	Yes	*	0,027	
PBS CIMMO 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-206,3	Yes	*	0,0228	
BIO OSS 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS	160,2	No	ns	0,0715	
BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS	139,1	No	ns	0,069	
BIO OSS 30 DIAS vs. COÁGULO 30 DIAS	127,3	No	ns	0,4403	
BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	-60,4	No	ns	0,9998	
BIO OSS 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	175,8	No	ns	0,221	
BIO OSS 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	95,27	No	ns	0,9524	
BIO OSS 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-31,13	No	ns	>0,9999	
BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	125	No	ns	0,4902	
BIO OSS 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-202,5	Yes	*	0,0333	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS	-21,07	No	ns	0,9998	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. COÁGULO 30 DIAS	-32,87	No	ns	0,4021	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	-220,6	Yes	*	0,0296	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	15,6	No	ns	>0,9999	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	-64,93	No	ns	0,9986	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-191,3	Yes	****	<0,0001	
PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	-35,2	No	ns	0,4018	

PBS CIMMO + BIO OSS 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-362,7	Yes	****	<0,0001
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. COÁGULO 30 DIAS	-11,8	No	ns	>0,9999
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	-199,5	No	ns	0,301
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	36,67	No	ns	0,9987
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	-43,87	No	ns	>0,9999
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-170,3	Yes	**	0,0015
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	-14,13	No	ns	>0,9999
AUTÓGENO + PBS CIMMO 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-341,7	Yes	****	<0,0001
COÁGULO 30 DIAS vs. AUTÓGENO 60 DIAS	-187,7	Yes	*	0,0419
COÁGULO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	48,47	No	ns	0,8383
COÁGULO 30 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	-32,07	No	ns	>0,9999
COÁGULO 30 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-158,5	Yes	****	<0,0001
COÁGULO 30 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	-2,333	No	ns	>0,9999
COÁGULO 30 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-329,9	Yes	***	0,0002
AUTÓGENO 60 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	236,2	Yes	*	0,0305
AUTÓGENO 60 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	155,7	No	ns	0,9235
AUTÓGENO 60 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	29,27	No	ns	>0,9999
AUTÓGENO 60 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	185,4	Yes	*	0,0275
AUTÓGENO 60 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-142,1	No	ns	0,8618
PBS CIMMO 60 DIAS vs. BIO OSS 60 DIAS	-80,53	No	ns	0,9917
PBS CIMMO 60 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-206,9	Yes	***	0,0004
PBS CIMMO 60 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	-50,8	No	ns	0,8514
PBS CIMMO 60 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-378,3	Yes	****	<0,0001
BIO OSS 60 DIAS vs. PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS	-126,4	No	ns	0,9575
BIO OSS 60 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	29,73	No	ns	>0,9999
BIO OSS 60 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-297,8	No	ns	0,0652
PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS vs. AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS	156,1	Yes	***	0,0007
PBS CIMMO + BIO OSS 60 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-171,4	Yes	*	0,0421
AUTÓGENO + PBS CIMMO 60 DIAS vs. COÁGULO 60 DIAS	-327,5	Yes	***	0,0006

APÊNDICE B – Resultados do Teste de Tukey à 5%, com os valores de p, na análise da densidade em Unidades de Hounsfield.

Number of families	1				
Number of comparisons per family	66				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
COA 30 DIAS vs. COA 60 DIAS	-0,422	-19,23 to 18,38	No	ns	>0,9999
COA 30 DIAS vs. AUT 30 DIAS	6,511	-12,30 to 25,32	No	ns	0,9919
COA 30 DIAS vs. AUT 60 DIAS	5,097	-13,71 to 23,90	No	ns	0,9991
COA 30 DIAS vs. PBS CIMMO 30 DIAS	-14,58	-33,39 to 4,224	No	ns	0,3053
COA 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	-27,86	-46,66 to -9,050	Yes	***	0,0001
COA 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	-1,086	-19,89 to 17,72	No	ns	>0,9999
COA 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-5,132	-23,94 to 13,67	No	ns	0,999
COA 30 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-11,27	-30,08 to 7,531	No	ns	0,7013
COA 30 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-20,42	-39,22 to -1,612	Yes	*	0,0208
COA 30 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-11,32	-30,13 to 7,482	No	ns	0,6955
COA 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-12,98	-31,79 to 5,825	No	ns	0,4892
COA 60 DIAS vs. AUT 30 DIAS	6,933	-11,87 to 25,74	No	ns	0,9865
COA 60 DIAS vs. AUT 60 DIAS	5,519	-13,29 to 24,32	No	ns	0,9981
COA 60 DIAS vs. PBS CIMMO 30 DIAS	-14,16	-32,97 to 4,646	No	ns	0,35
COA 60 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	-27,43	-46,24 to -8,628	Yes	***	0,0002
COA 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	-0,664	-19,47 to 18,14	No	ns	>0,9999
COA 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-4,71	-23,52 to 14,10	No	ns	0,9996
COA 60 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-10,85	-29,66 to 7,953	No	ns	0,7496
COA 60 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-20	-38,80 to -1,190	Yes	*	0,0264
COA 60 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-10,9	-29,71 to 7,904	No	ns	0,7441
COA 60 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-12,56	-31,36 to 6,247	No	ns	0,5423
AUT 30 DIAS vs. AUT 60 DIAS	-1,414	-20,22 to 17,39	No	ns	>0,9999
AUT 30 DIAS vs. PBS CIMMO 30 DIAS	-21,09	-39,90 to -2,286	Yes	*	0,0141
AUT 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	-34,37	-53,17 to -15,56	Yes	****	<0,0001
AUT 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	-7,597	-26,40 to 11,21	No	ns	0,9727
AUT 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-11,64	-30,45 to 7,163	No	ns	0,6571
AUT 30 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-17,79	-36,59 to 1,020	No	ns	0,0829
AUT 30 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-26,93	-45,73 to -8,122	Yes	***	0,0003
AUT 30 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-17,83	-36,64 to 0,9711	No	ns	0,0809
AUT 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-19,49	-38,30 to -0,6856	Yes	*	0,0348
AUT 60 DIAS vs. PBS CIMMO 30 DIAS	-19,68	-38,48 to -0,8722	Yes	*	0,0315
AUT 60 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	-32,95	-51,76 to -14,15	Yes	****	<0,0001
AUT 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	-6,183	-24,99 to 12,62	No	ns	0,9948
AUT 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-10,23	-29,03 to 8,577	No	ns	0,8142
AUT 60 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-16,37	-35,18 to 2,434	No	ns	0,1557

AUT 60 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-25,51	-44,32 to -6,708	Yes	***	0,0008
AUT 60 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-16,42	-35,23 to 2,385	No	ns	0,1526
AUT 60 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-18,08	-36,88 to 0,7284	No	ns	0,072
PBS CIMMO 30 DIAS vs. PBS CIMMO 60 DIAS	-13,27	-32,08 to 5,532	No	ns	0,4531
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	13,5	-5,310 to 32,30	No	ns	0,4263
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	9,449	-9,356 to 28,26	No	ns	0,881
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	3,307	-15,50 to 22,11	No	ns	>0,9999
PBS CIMMO 30 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-5,836	-24,64 to 12,97	No	ns	0,9968
PBS CIMMO 30 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	3,257	-15,55 to 22,06	No	ns	>0,9999
PBS CIMMO 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	1,601	-17,21 to 20,41	No	ns	>0,9999
PBS CIMMO 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	26,77	7,964 to 45,58	Yes	***	0,0003
PBS CIMMO 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	22,72	3,918 to 41,53	Yes	**	0,0051
PBS CIMMO 60 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	16,58	-2,225 to 35,39	No	ns	0,1426
PBS CIMMO 60 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	7,438	-11,37 to 26,24	No	ns	0,9767
PBS CIMMO 60 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	16,53	-2,274 to 35,34	No	ns	0,1456
PBS CIMMO 60 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	14,87	-3,931 to 33,68	No	ns	0,2762
BOV 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-4,046	-22,85 to 14,76	No	ns	0,9999
BOV 30 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-10,19	-28,99 to 8,617	No	ns	0,8181
BOV 30 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-19,33	-38,14 to -0,5256	Yes	*	0,038
BOV 30 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-10,24	-29,04 to 8,568	No	ns	0,8133
BOV 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-11,89	-30,70 to 6,911	No	ns	0,6259
BOV 60 DIAS vs. BOV+PBS 30 DIAS	-6,143	-24,95 to 12,66	No	ns	0,9951
BOV 60 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-15,29	-34,09 to 3,520	No	ns	0,2384
BOV 60 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-6,192	-25,00 to 12,61	No	ns	0,9947
BOV 60 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-7,849	-26,65 to 10,96	No	ns	0,9652
BOV+PBS 30 DIAS vs. BOV+PBS 60 DIAS	-9,143	-27,95 to 9,663	No	ns	0,9026
BOV+PBS 30 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	-0,04933	-18,86 to 18,76	No	ns	>0,9999
BOV+PBS 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-1,706	-20,51 to 17,10	No	ns	>0,9999
BOV+PBS 60 DIAS vs. ATU+PBS 30 DIAS	9,093	-9,712 to 27,90	No	ns	0,9059
BOV+PBS 60 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	7,437	-11,37 to 26,24	No	ns	0,9767
ATU+PBS 30 DIAS vs. AUT+PBS 60 DIAS	-1,657	-20,46 to 17,15	No	ns	>0,9999

APÊNDICE C – Resultados do Teste de Tukey à 5%, com os valores de p, na análise histométrica.

Number of families	1				
Number of comparisons per family	66				
Alpha	0,05				
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Below threshold?	Summary	Adjusted P Value
COA 30 DIAS vs. COA 60 DIAS	-0,3493	-9,086 to 8,387	No	ns	>0,9999
COA 30 DIAS vs. AUT 30 DIAS	-4,715	-13,45 to 4,021	No	ns	0,8217
COA 30 DIAS vs. AUT 60 DIAS	-11,66	-20,40 to -2,923	Yes	**	0,001
COA 30 DIAS vs. PBS 30 DIAS	-2,837	-11,57 to 5,899	No	ns	0,9953
COA 30 DIAS vs. PBS 60 DIAS	-7,169	-15,91 to 1,568	No	ns	0,2259
COA 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	4,815	-3,921 to 13,55	No	ns	0,8009
COA 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	0,5579	-8,179 to 9,294	No	ns	>0,9999
COA 30 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	2,893	-5,843 to 11,63	No	ns	0,9944
COA 30 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	2,936	-5,800 to 11,67	No	ns	0,9937
COA 30 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-2,729	-11,47 to 6,008	No	ns	0,9966
COA 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-3,41	-12,15 to 5,326	No	ns	0,9789
COA 60 DIAS vs. AUT 30 DIAS	-4,366	-13,10 to 4,370	No	ns	0,8848
COA 60 DIAS vs. AUT 60 DIAS	-11,31	-20,05 to -2,574	Yes	**	0,0017
COA 60 DIAS vs. PBS 30 DIAS	-2,488	-11,22 to 6,248	No	ns	0,9985
COA 60 DIAS vs. PBS 60 DIAS	-6,82	-15,56 to 1,917	No	ns	0,2953
COA 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	5,164	-3,572 to 13,90	No	ns	0,7198
COA 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	0,9072	-7,829 to 9,644	No	ns	>0,9999
COA 60 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	3,243	-5,494 to 11,98	No	ns	0,9858
COA 60 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	3,285	-5,451 to 12,02	No	ns	0,9842
COA 60 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-2,379	-11,12 to 6,357	No	ns	0,999
COA 60 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-3,061	-11,80 to 5,675	No	ns	0,9911
AUT 30 DIAS vs. AUT 60 DIAS	-6,944	-15,68 to 1,792	No	ns	0,2692
AUT 30 DIAS vs. PBS 30 DIAS	1,878	-6,859 to 10,61	No	ns	0,9999
AUT 30 DIAS vs. PBS 60 DIAS	-2,454	-11,19 to 6,283	No	ns	0,9987
AUT 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	9,53	0,7939 to 18,27	Yes	*	0,0197
AUT 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	5,273	-3,463 to 14,01	No	ns	0,6923
AUT 30 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	7,609	-1,128 to 16,35	No	ns	0,1553
AUT 30 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	7,651	-1,085 to 16,39	No	ns	0,1494
AUT 30 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	1,987	-6,750 to 10,72	No	ns	0,9998
AUT 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	1,305	-7,431 to 10,04	No	ns	>0,9999
AUT 60 DIAS vs. PBS 30 DIAS	8,822	0,08593 to 17,56	Yes	*	0,0454
AUT 60 DIAS vs. PBS 60 DIAS	4,491	-4,246 to 13,23	No	ns	0,8641
AUT 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	16,47	7,738 to 25,21	Yes	****	<0,0001
AUT 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	12,22	3,481 to 20,95	Yes	***	0,0004
AUT 60 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	14,55	5,817 to 23,29	Yes	****	<0,0001
AUT 60 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	14,6	5,859 to 23,33	Yes	****	<0,0001
AUT 60 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	8,931	0,1947 to 17,67	Yes	*	0,0402

AUT 60 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	8,249	-0,4870 to 16,99	No	ns	0,084
PBS 30 DIAS vs. PBS 60 DIAS	-4,332	-13,07 to 4,405	No	ns	0,8902
PBS 30 DIAS vs. BOV 30 DIAS	7,652	-1,084 to 16,39	No	ns	0,1493
PBS 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	3,395	-5,341 to 12,13	No	ns	0,9796
PBS 30 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	5,731	-3,006 to 14,47	No	ns	0,5704
PBS 30 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	5,773	-2,963 to 14,51	No	ns	0,5588
PBS 30 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	0,1088	-8,628 to 8,845	No	ns	>0,9999
PBS 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-0,5729	-9,309 to 8,164	No	ns	>0,9999
PBS 60 DIAS vs. BOV 30 DIAS	11,98	3,248 to 20,72	Yes	***	0,0006
PBS 60 DIAS vs. BOV 60 DIAS	7,727	-1,010 to 16,46	No	ns	0,1395
PBS 60 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	10,06	1,326 to 18,80	Yes	**	0,01
PBS 60 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	10,11	1,369 to 18,84	Yes	**	0,0094
PBS 60 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	4,44	-4,296 to 13,18	No	ns	0,8727
PBS 60 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	3,759	-4,978 to 12,50	No	ns	0,9568
BOV 30 DIAS vs. BOV 60 DIAS	-4,257	-12,99 to 4,479	No	ns	0,9012
BOV 30 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	-1,922	-10,66 to 6,815	No	ns	0,9999
BOV 30 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	-1,879	-10,62 to 6,857	No	ns	0,9999
BOV 30 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-7,544	-16,28 to 1,193	No	ns	0,1646
BOV 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-8,225	-16,96 to 0,5111	No	ns	0,0861
BOV 60 DIAS vs. BOV + PBS 30 DIAS	2,336	-6,401 to 11,07	No	ns	0,9992
BOV 60 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	2,378	-6,358 to 11,11	No	ns	0,999
BOV 60 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-3,287	-12,02 to 5,450	No	ns	0,9842
BOV 60 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-3,968	-12,70 to 4,768	No	ns	0,9372
BOV + PBS 30 DIAS vs. BOV + PBS 60 DIAS	0,04257	-8,694 to 8,779	No	ns	>0,9999
BOV + PBS 30 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-5,622	-14,36 to 3,114	No	ns	0,6
BOV + PBS 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-6,304	-15,04 to 2,433	No	ns	0,4175
BOV + PBS 60 DIAS vs. AUT + PBS 30 DIAS	-5,665	-14,40 to 3,072	No	ns	0,5884
BOV + PBS 60 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-6,346	-15,08 to 2,390	No	ns	0,4067
AUT + PBS 30 DIAS vs. AUT + PBS 60 DIAS	-0,6817	-9,418 to 8,055	No	ns	>0,9999

ANEXO A - Aprovação do comitê de ética

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG
 Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **Avaliação histológica, histométrica e tomográfica de cimento biocerâmico reparador em defeitos de calvária de ratos.**, registrada com o nº **0049/2021**, sob a responsabilidade de **Ronaldo Célio Mariano**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/10/2021 a 28/02/2023**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	60	60	0	Centro de bioterismo da unifal-mg

Alfenas, 14 de Fevereiro de 2022

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 3b61c770ea07147ba1c3d9c1751eb48d