



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



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

Lilian Souza Campos

**REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO COM NOVOS
ARCABOUÇOS À BASE DE MONETITA, HIDROXIAPATITA E FASES
AMORFAS DE FOSFATO DE CÁLCIO E SÍLICA, DOPADOS OU NÃO
COM ZINCO**

Salvador
2015

Lilian Souza Campos

**REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO COM NOVOS
ARCABOUÇOS À BASE DE MONETITA, HIDROXIAPATITA E FASES
AMORFAS DE FOSFATO DE CÁLCIO E SÍLICA, DOPADOS OU NÃO
COM ZINCO**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiana Paim Rosa
Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Maurício C. Mendes
Prof. Dr. Raúl García Carrodegua

Salvador
2015

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

C198 Campos, Lilian Souza.

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

122 f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa.

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

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

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

CDU: 616.314

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA PÚBLICA DE TESE

LILIAN SOUZA CAMPOS

REGENERAÇÃO DE DEFEITO ÓSSEO CRÍTICO COM NOVOS ARCABOUÇOS À
BASE DE MONETITA, HIDROXIAPATITA E FASES AMORFAS DE FOSFATO DE
CÁLCIO E SÍLICA, DOPADOS OU NÃO COM ZINCO

Salvador, Bahia, 16 de dezembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROFA DRA FABIANA PAIM ROSA (Orientador)

PROF DR CARLOS MAURÍCIO CARDEAL MENDES (Examinador Interno)

PROF DR ROBERTO PAULO CORREIA DE ARAUJO (Examinador Interno)

PROFA DRA ELIANA CRISTINA DA SILVA RIGO (Examinador Externo)

PROF DR RAUL GARCIA CARRODEGUAS (Examinador Externo)

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus colegas do grupo LBTB, pela convivência e pela ajuda;

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

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

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

Aos professores que participaram desta jornada;

À minha família, pela compreensão e pelo apoio;

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

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

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

“O homem é do tamanho de seu sonho”.

Fernando Pessoa

CAMPOS, Lilian Souza. **Regeneração de defeito ósseo crítico com novos arcabouços à base de monetita, hidroxiapatita e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com zinco.** Salvador, 2015. 122 f., il. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências de Saúde, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

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

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

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

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

CAMPOS, Lilian Souza. **Critical bone defect regeneration with novel scaffolds based on monetite, hidroxyapatite and amorphous phases of calcium phosphate and silica, doped or not with zinc.** Salvador-BA, 2015. 122 f., II. Thesis (Doctorate in Interactive Processes of Organs and Systems) - Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia.

ABSTRACT

Introduction: Bone regeneration remains a challenge to regenerative medicine and drives the researches for the development of more osteogenic biomaterials. For this purpose, new synthetic biomaterials were designed as scaffolds for bone regeneration. **Objective:** The aim of this study was to evaluate four different formulations of new biomaterials consisting of monetite, hydroxyapatite and amorphous phase of calcium phosphate and silica, doped or not with zinc, in the regeneration of critical bone defect. **Materials and methods:** A total of 105 Wistar Albinus male rats weighing 350-400 g were randomly distributed in seven groups (n=15), named as GLL, GPP, GAA, GOO, GHB, GCS and GCI. A defect (8.5 mm Ø) was drilled in the skull of animals in the first six groups. Defects in the first four groups (GLL, GPP, GAA and GOO) were filled with the experimental synthetic biomaterials, LL, PP, AA (Sil-Oss[®]) and OO, respectively. A commercial bovine hydroxyapatite (Bio-Oss[®]) was deployed in the fifth group (GHB). Defects in the sixth group (GCS) were maintained only with blood clot. In the last group (GCI) the calvaria was kept intact. Five animals of each group, randomly selected, were killed 15, 45 and 120 days after surgery and their calvarias were collected. The samples were processed and submitted to histomorphological and histomorphometric analysis by optical microscopy. Statistical analysis of results was performed by ANOVA-one way with Dunnett's test, Tukey's test, effect size measurements η^2 and d Cohen test. **Results:** Moderate chronic inflammatory reaction and edema were observed 15 days after surgery in the first six groups. A mild chronic inflammatory reaction was still observed in the longer periods, with giant cells nearby the biomaterial particles. The amount of osteoid matrix after 120 days in all groups treated with biomaterials (GAA 78.9%, GLL 52.4%, GPP 59.5%, GOO 79.6% and GHB 51.9%) was significantly (p=0.001) higher than in GCS (24.5%). As well, the amount of osteoid matrix for groups implanted with biomaterials containing zinc (GAA and GOO) at 120 days was significantly (p=0.001) higher in comparison to those without zinc (GLL, GPP and GHB). Also, the lower amount of remaining biomaterial after 120 days was found in groups GAA (11 %) and GOO (14 %). **Conclusion:** All biomaterials tested were biocompatible and osteoconductive. The more extensive regeneration and resorption was observed in defects treated with zinc containing biomaterials (GAA and GOO).

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Formação e maturação do osteócito	24
Figura 2	Esquema do processo de preparação dos biomateriais experimentais sintéticos	39
Figura 3	Gráficos de DRX dos biomateriais	42
Figura 4	Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial AA, Sil-Oss [®]	43
Figura 5	Micrografias de MEV da superfície dos grânulos do biomaterial controle, Bio-Oss [®]	45
Figura 6	Gráfico com a solubilidade dos biomateriais experimentais (LL, AA, PP, OO) e do controle (BioOss [®])	46
Figura 7	Ensaio de citotoxicidade dos biomateriais experimentais e do biomaterial controle (BioOss [®])	48
Figura 8	Sequência cirúrgica	51
Figura 9	Divisão da calvária implantada	53
Figura 10	Vista frontal de corte histológico da calvária na região do defeito	53
Figura 11	Exemplo da avaliação morfométrica de espessura da calvária íntegra em uma fotomicrografia	56
Figura 12	Exemplos das avaliações morfométricas da área de uma partícula de biomaterial	57
Figura 13	Partículas de biomateriais sintéticos experimentais no defeito	62
Figura 14	Partículas de hidroxiapatita bovina no defeito	63
Figura 15	Aspectos inflamatórios nos grupos implantados	64
Figura 16	Vasos sanguíneos na calvária íntegra	65
Figura 17	Vasos sanguíneos nos grupos implantados	66

Figura 18	Proteínas colagênicas nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais	68
Figura 19	Tecido conjuntivo fibroso no grupo GHB	69
Figura 20	Tecido conjuntivo fibroso no GCS	70
Figura 21	Conformação lamelar do tecido ósseo no GCI	70
Figura 22	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 15 dias	73
Figura 23	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 45 dias	74
Figura 24	Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 120 dias	75
Figura 25	Osteogênese GHB	76
Figura 26	Osteogênese GCS	77
Figura 27	Calvária íntegra GCI	77
Figura 28	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 15 dias	79
Figura 29	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 45 dias	82
Figura 30	Gráfico da porcentagem de nova matriz osteoide nos diferentes grupos, no ponto biológico de 120 dias	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química e de fases dos biomateriais experimentais	38
Tabela 2	Superfície específica, densidade aparente e porosidade dos biomateriais experimentais e do controle	45
Tabela 3	Número de animais de acordo com o grupo e ponto biológico	49
Tabela 4	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada de acordo com os grupos aos 15 dias	80
Tabela 5	Comparação múltipla 2 a 2 entre grupos e GCS aos 15 dias	80
Tabela 6	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 15 dias	80
Tabela 7	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 45 dias de acordo com os grupos	83
Tabela 8	Comparações múltiplas 2 a 2 entre grupos e GCS aos 45 dias	83
Tabela 9	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 45 dias	83
Tabela 10	Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 120 dias de acordo com os grupos	85
Tabela 11	Comparações múltiplas 2 a 2 entre grupos e GCS aos 120 dias	85
Tabela 12	Comparação múltipla entre grupos GLL, GPP, GAA e GOO aos 120 dias	85
Tabela 13	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 15 dias	88
Tabela 14	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 45 dias	88
Tabela 15	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da distância linear entre as bordas ósseas do defeito crítico ocupada por matriz osteoide aos 120 dias	88
Tabela 16	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 15 dias	90

Tabela 17	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 45 dias	90
Tabela 18	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso aos 120 dias	90
Tabela 19	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 15 dias	92
Tabela 20	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 45 dias	92
Tabela 21	Medianas e intervalos interquartílicos da porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupada por partículas de biomaterial aos 120 dias	92
Tabela 22	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 15 dias	94
Tabela 23	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 45 dias	94
Tabela 24	Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 120 dias	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	Biomaterial sintético experimental na formulação AA, Sil-Oss [®]
Bm	Biomaterial
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Célula gigante
CI	Células inflamatórias
D	Desvios
DC	Defeito crítico
DRX	Difração de Raios X
E	Espessura
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Fb	Fibroblasto
GAA	Grupo com implantação de biomaterial sintético experimental na formulação AA, Sil-Oss [®]
GCI	Grupo calvária íntegra, sem confecção de defeito ósseo
GCS	Grupo calvária com defeito preenchido por coágulo sanguíneo
GHB	Grupo com implantação de Bio-Oss [®]
GLL	Grupo com implantação de biomaterial sintético experimental na formulação LL
GOO	Grupo com implantação de biomaterial sintético experimental na formulação OO
GPP	Grupo com implantação de biomaterial sintético experimental na formulação PP
HA	Hidroxiapatita
HAB	Hidroxiapatita bovina
HE	Hematoxilina e eosina
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
LBTB	Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais
LL	Biomaterial experimental sintético na formulação LL
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M	Monetita
Mo	Medula óssea

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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. DEFEITO CRÍTICO	22
2.2. TECIDO ÓSSEO	23
2.3. BIOMATERIAIS E REGENERAÇÃO ÓSSEA	25
3. OBJETIVO	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. BIOMATERIAIS	38
4.1.1. Difração de raios X	41
4.1.2. Microestrutura	42
4.1.3. Área superficial, densidade e porosidade	44
4.1.4. Solubilidade <i>in vitro</i>	45
4.1.5. Citotoxicidade <i>in vitro</i>	46
4.2. AMOSTRA	49
4.3. ETAPA CIRÚRGICA	50
4.4. ETAPA LABORATORIAL	52
4.5. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA	54
4.6. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	55
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5. RESULTADOS	60
5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	61
5.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS COM ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
5.2.1. Porcentagem da área do reparo do defeito ósseo crítico ocupado por nova matriz osteoide	78
5.2.2. Porcentagem da distância linear do defeito ósseo crítico ocupada por matriz osteoide	87
5.2.3. Porcentagem da área do defeito ósseo crítico ocupada por tecido conjuntivo fibroso	89
5.2.4. Porcentagem da área do defeito ósseo crítico ocupada por	91

partículas de biomateriais	
5.2.5. Espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico	93
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	107
ANEXO	118

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os defeitos ósseos críticos constituem desafios clínicos para a medicina regenerativa, e são graves prejuízos funcionais e estéticos aos indivíduos por eles acometidos.

O desenvolvimento e o aprimoramento de biomateriais são de relevante importância para a melhoria da qualidade de vida desta população. A depender da sua formulação, características físico-químicas e da forma de obtenção, é possível o aprimoramento de suas capacidades de osteointegração, osteocondutividade, osteoindutividade, bioatividade e biodegradabilidade, importantes na regeneração do tecido ósseo.

Dentre os vários biomateriais com esta finalidade, os compostos à base de fosfato de cálcio têm se destacado devido à sua alta biocompatibilidade, ausência de toxicidade local e sistêmica, além de sua similaridade com os componentes inorgânicos do tecido ósseo, porém, possuem como desvantagem uma baixa resistência mecânica, o que limita sua utilização. Apesar disto, são considerados bons arcabouços para o reparo ósseo e permitem associações a outros biomateriais e substituições iônicas em sua formulação capazes de melhorar as suas capacidades regenerativas.

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

Outro fosfato de cálcio que tem merecido destaque é a monetita que, ao contrário da hidroxiapatita, possui alta solubilidade em fluídos orgânicos e, deste modo, disponibiliza, mais facilmente, íons de alta bioatividade em um microambiente em regeneração óssea. Entretanto, a alta taxa de biodegradação associada a esta

solubilidade pode comprometer a estabilidade do arcabouço prematuramente à completa neoformação e mineralização da matriz osteoide nele recém depositada.

Outros íons, a exemplo do zinco e do silício, também considerados bioativos na regeneração de tecidos ósseos, podem, ainda, ser adicionados aos compostos de fosfato de cálcio e, desta forma, melhorar a resposta biológica desencadeada pela implantação dos biomateriais com esta associação.

Deste modo, estratégias no sentido de associar componentes com habilidade de estimular a osteogênese em defeitos críticos são importantes mecanismos para a geração de biomateriais biodegradáveis, desenvolvidos para atender aos critérios necessários a um substituto ósseo ideal. Estes novos biomateriais deverão ser biometabolizados gradualmente, de forma a favorecer a neoformação óssea, associada à sua completa substituição, com o intuito de devolver ao tecido lesado as suas propriedades morfofisiológicas e mecânicas originais, e contribuir, assim, com a melhoria da qualidade de vida da população.

Portanto, este estudo objetivou o desenvolvimento de novos biomateriais sintéticos compostos por hidroxiapatita, monetita, e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, dopados ou não com zinco.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DEFEITO CRÍTICO

Os defeitos críticos são caracterizados pela incapacidade de regeneração espontânea dos tecidos por eles envolvidos, nos quais ocorre um reparo devido à formação total ou parcial de uma fibrose que, na maioria das situações, ocasiona alterações funcionais e estéticas, com prejuízos à saúde e à inserção social dos indivíduos por eles acometidos. Persistem como um desafio clínico para a medicina regenerativa e podem estar associados às dimensões das lesões, ao metabolismo dos tecidos afetados, à insuficiência de vascularização local e aos distúrbios sistêmicos existentes (BARRETO 2011; BOROJEVIC, 2008; CAMPOS, 2012; CARANO; FILVAROFF, 2003; LIM; LEE; YEO, 2000; KIM *et al.*, 2006; MIGUEL *et al.*, 2006; ROLIM, 2013).

No tecido ósseo, os defeitos críticos estão ainda relacionados à instabilidade de fragmentos e, geralmente, são ocasionados por infecções, traumas e ressecções cirúrgicas de grandes cistos e tumores (BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; CAMPOS; ROSA, 2012; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; ROLIM, 2013).

As dimensões do defeito consideradas críticas ao reparo espontâneo variam consoante a espécie animal e o local por ele acometido. Por exemplo, muitos estudos têm demonstrado que defeitos ósseos com mais de 8 mm de diâmetro efetuados na calvária de rato, associados à completa remoção do perióstio e da porção externa da dura-máter nesta região, apresentam uma neoformação óssea linear restrita às bordas ósseas, com um preenchimento da área remanescente da lesão por tecido conjuntivo fibroso de forma cicatricial (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CARVALHO, 2006; MIGUEL, 2008; MIGUEL *et al.*, 2006; ROLIM, 2010; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Estas dimensões são suficientes na calvária do rato devido à sua morfologia óssea díplôe, com reduzida quantidade de medula óssea entre duas placas de osso cortical e baixo suprimento sanguíneo, o que limita o aporte de moléculas sinalizadoras, nutrientes e fatores de crescimento, e reduz as possibilidades de regeneração óssea espontânea, porém não são válidas para outros locais ou

diferentes espécies animais. No coelho, o defeito em calvária é considerado crítico a partir de 1 cm, no cão, defeitos em fêmures são considerados críticos com um mínimo de 21 mm, enquanto em ovelhas, defeitos em tíbia de 4,8 cm são considerados críticos. (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CANCEDDA; GIANONNI; MASTROGIACOMO, 2007; CARVALHO, 2006; MIGUEL, 2008; MIGUEL *et al.*, 2006; ROLIM, 2010; SCHMITZ; HOLLINGER, 1986).

Para uma melhor compreensão desta problemática e do desenvolvimento de estratégias para a regeneração de defeitos ósseos críticos, é fundamental a compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de formação, neoformação e manutenção do tecido ósseo (ANDRADE *et al.*, 2007).

2.2. TECIDO ÓSSEO

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

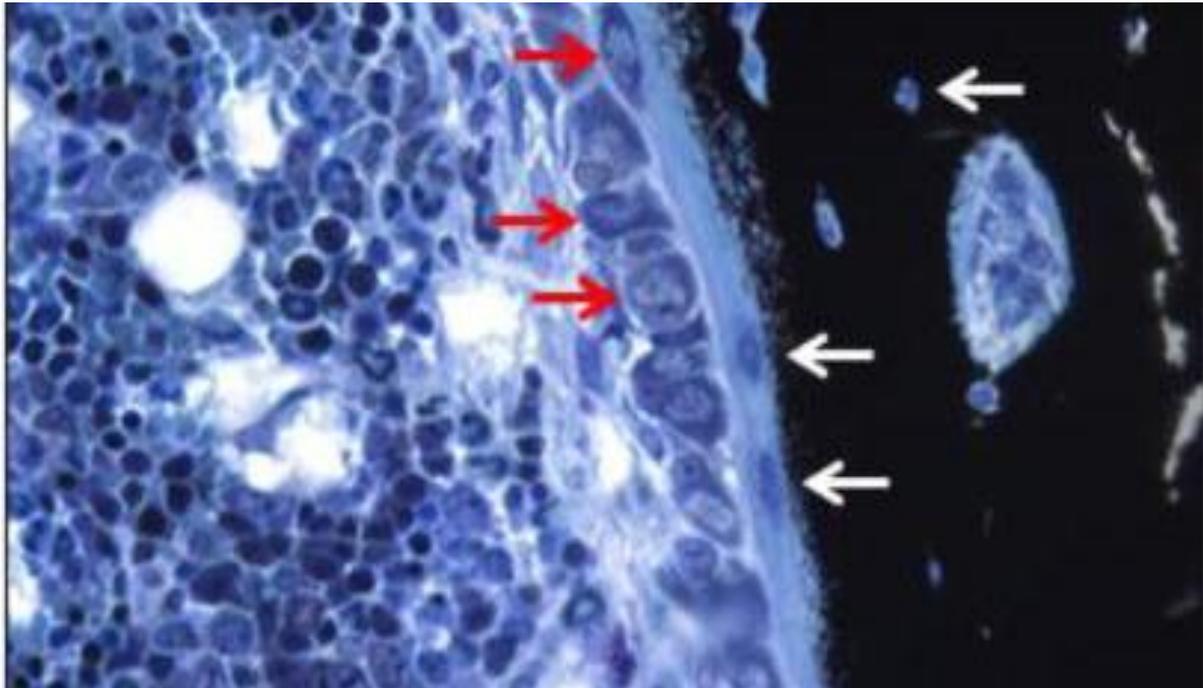
A fase mineral, formada especialmente por hidroxiapatita, contribui para o aumento de sua resistência mecânica, enquanto a fase orgânica, formada sobretudo por células e colágeno tipo I, é responsável pela manutenção de sua vitalidade e por sua plasticidade (ANDRADE *et al.*, 2007; BELLIDO, 2014; KIM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

A remodelação e a regeneração óssea ocorrem de forma ativa durante toda a vida do indivíduo e são dependentes da diferenciação de células mesenquimais para a formação dos osteoblastos, encarregados de sintetizar e secretar a matriz osteoide (Figura 1). A regulação destes processos é mediada por uma sequência de sinais moleculares geneticamente controlados, porém influenciados pelo meio (BELLIDO, 2014; TURHANI *et al.*, 2007).

Quando os osteoblastos ficam aprisionados no interior desta matriz, passam a ser denominados de osteócitos (Figura 1). Estas células ocupam as lacunas do tecido ósseo e, por intermédio de prolongamentos citoplasmáticos nos canalículos

ósseos, são capazes de responder à transmissão de estímulos internos e externos, e desencadear uma cascata de sinalização que irá resultar em reabsorção ou neoformação óssea (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006; BELLIDO, 2014).

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



Fonte: Bellido (2014).

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

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

Esta nova matriz é composta, basicamente, por fibras colágenas, ainda desorganizadas, e com reduzida deposição mineral. Com a evolução deste

processo, ocorre uma organização destas fibras em uma estrutura lamelar, com maior deposição mineral (BELLIDO, 2014; GARRIGUES *et al.*, 2005).

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

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

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

2.3. BIOMATERIAIS E REGENERAÇÃO ÓSSEA

Segundo uma definição clássica, biomateriais são substâncias ou compostos de origem natural ou sintética, biocompatíveis, com exceção dos fármacos e quimioterápicos, que possam substituir de forma permanente ou transitória os tecidos perdidos, e estimular reações químicas e biológicas que melhorem suas funções (FLECKENSTEIN *et al.*, 2006). De acordo com Williams (2009), biomaterial é uma substância manipulada de forma que, por si só ou como parte de um sistema mais complexo, é usada para dirigir, por interações e controle de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, na medicina humana ou veterinária.

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

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

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

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

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

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

Para uma adequada avaliação de um biomaterial, a escolha do modelo animal e as características morfológicas do defeito ósseo são de grande importância, e devem reproduzir as situações críticas ao reparo espontâneo. Dentre os modelos animais, o *Rattus norvegicus* é o mais utilizado em experimentos *in vivo* para testar o

potencial osteogênico de novos biomateriais e oferece várias vantagens com relação aos demais animais como, por exemplo, o porte reduzido, ciclos vitais curtos, prole numerosa, disponibilidade, facilidade de manutenção e manejo, além da possibilidade de padronização genética, entre outras, além disso, dos vários locais de implantação, a calvária do rato adulto oferece facilidade de acesso com reduzido risco de complicações pós-cirúrgicas (ACCORSI-MENDONÇA *et al.*, 2011; BOSCH; MELSEN; VARGERVIK, 1998; CAMPOS, 2012; CONZ; GRANJEIRO; SOARES, 2011; KLENKE *et al.*, 2008; MIGUEL *et al.*, 2006).

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

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

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

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

Na superfície do biomaterial, ocorrem os primeiros contatos com o microambiente e onde são adsorvidas proteínas, biomoléculas e água, importantes

no direcionamento da resposta biológica à implantação (DOROZHKIN, 2010; KURELLA; DAHOTRE, 2005).

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

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

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

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

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

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

Os bioabsorvíveis são degradados, principalmente devido à sua solubilidade e pela ação biológica de células gigantes, características a uma reação inflamatória crônica do tipo corpo estranho. Posteriormente, os compostos resultantes destes eventos são metabolizados e o arcabouço é gradualmente substituído pelo tecido ósseo em neoformação. Esta propriedade é desejável na regeneração óssea, desde que seja mantida a estabilidade dimensional do arcabouço pelo tempo necessário à

completa regeneração tecidual (DALAPICULA *et al.*, 2006; DOROZHKIN, 2010; GARRIGUES *et al.*, 2005).

A osseointegração é, também, um requisito importante em um biomaterial de substituição óssea e relaciona-se com a sua capacidade em formar uma forte ligação com o tecido ósseo, com consequente aumento da atividade celular e de sua neoformação (JENSEN *et al.*, 2013; MOTAMEDIAN *et al.*, 2015).

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

Na osteocondução, o biomaterial serve como arcabouço e propicia a migração, a adesão, a inserção e a proliferação celular. Na osteopromoção, há estimulação das células osteogênicas do leito receptor ou do próprio enxerto ósseo no sentido de promoverem a síntese de matriz osteoide, com consequente mineralização (BHATT; ROZENTAL, 2012; DALAPICULA *et al.*, 2006; JENSEN *et al.*, 2013; MOTAMEDIAN *et al.*, 2015).

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

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

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

Os substitutos ósseos de origem bovina existentes no mercado encontram-se o osso desmineralizado, o osso mineralizado, o osso composto e a proteína

óssea morfogênica, cada um com uma indicação específica, a serem utilizados puros ou combinados com outros biomateriais ou mesmo com o osso autógeno, a ter-se em consideração o respeito aos limites biológicos e mecânicos que o material apresenta (GALINDO-MORENO *et al.*, 2007; KRUSE *et al.*, 2011; TRAINI, *et al.*, 2007; WALLACE; FROUM, 2003).

O Bio-Oss[®] é uma estrutura mineral óssea bovina, obtida por meio de processo termoquímico, com remoção completa de proteínas, restos celulares e lipídios, com eliminação de risco imunológico e de contaminação bacteriológica, e, comparativamente a outras hidroxiapatitas bovinas, considerada de melhor comportamento biológico quando implantada *in vivo* (CHACKARTCHI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2014; LUTZ *et al.*, 2015). Produzido por *Geistlich Biomaterials*, é distribuído na forma de blocos ou como grânulos de 0,25 a 1 mm e de 1 a 2 mm de diâmetro, e possui estrutura química e física comparável à matriz mineral do osso humano, com arquitetura constituída por poros de tamanho variável, que favorecem a migração celular e vascular até o centro do enxerto (DEGIDI *et al.*, 2006; SCARANO *et al.*, 2006; TRAINI *et al.*, 2007).

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

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

Muitos estudos relatam que o Bio-Oss[®] é um substituto ósseo aceitável, pode ser usado como um material único para elevação do seio maxilar e é um método previsível para aumento dimensional da região posterior da maxila (LEE; CHEN; DARBY, 2012; LI *et al.*, 2014; LINDHE *et al.*, 2014; LUTZ *et al.*, 2015; MOON *et al.*, 2015; SCARANO *et al.*, 2006), com melhor performance em relação aos

biomateriais aloplásticos (CORDARO *et al.*, 2008; KRUSE *et al.*, 2011; MAH *et al.*, 2004).

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

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

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

A osteogênese observada frente à implantação de compostos de cálcio e fosfato ocorre, em geral, por meio do mecanismo de osteocondução, além de serem capazes de adsorver proteínas, fatores de crescimento e auxiliar na diferenciação de células da linhagem osteogênica. Entretanto, em geral, possuem como desvantagem uma baixa resistência mecânica, que limita seu uso e estimula o desenvolvimento de novas associações a outros biomateriais que melhorem este comportamento (JENSEN *et al.*, 2013; MOTAMEDIAN *et al.*, 2015; RIMINUCCI; BIANCO, 2003).

Os biomateriais à base de fosfato de cálcio possuem solubilidade que depende de sua composição e síntese, e ainda é influenciada pelo pH do local de implantação, o que altera a sua biodegradabilidade, por exemplo, a liberação de mediadores químicos por células inflamatórias causam uma redução do pH local e conferem um aumento da taxa de biodegradabilidade do implante (THORWARTH *et al.*, 2005).

A formulação de um biomaterial e suas características físico-químicas são determinantes do sucesso do implante em defeitos ósseos críticos. Vários estudos relatam que os íons inorgânicos simples, como o cálcio (Ca) (LU; LENG, 2005; MAENO *et al.*, 2005; MARIE, 2010; VALERIO *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010), o

fósforo (P) (JULIEN *et al.*, 2009), o silício (Si) (REFFITT *et al.*, 2003) e o zinco (Zn) (HALL; DIMAI; FARLEY, 1986; RAMASWAMY, *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2014; YANG *et al.*, 2010), e as suas associações (HOPPE; GÜLDAL; BOCCACCINI, 2011; MURPHY *et al.*, 2009; PADILLA *et al.*, 2015; RAMASWAMY *et al.*, 2008) estão relacionados com o metabolismo ósseo, com a angiogênese e com a mineralização da matriz óssea.

Compostos sintéticos que liberem tais íons para o microambiente biológico podem ser construídos e capazes de atuar tanto no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas como em sua diferenciação e maturação no sentido de promoverem a osteogênese (DE AZA, P.N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. 2005; JONES 2013; PADILLA *et al.*, 2015).

Com esta intenção, biomateriais sintéticos experimentais, compostos por monetita, hidroxiapatita, fosfato de cálcio amorfo e gel de sílica com e sem conteúdos de zinco, foram projetados como arcabouços para a regeneração óssea (GARCÍA DE CASTRO *et al.*, 2010; PADILLA, *et al.*, 2015).

A monetita (CaHPO_4) é um fosfato de cálcio anidro e o principal componente dos biomateriais sintéticos experimentais ora avaliados. Apresenta uma composição química semelhante ao tecido ósseo, e possui grande disponibilidade e alta solubilidade em fluídos fisiológicos. Quando observada *in vivo*, é osteocondutora e absorvível (GBURECK *et al.*, 2004; HABIBOVIC, *et al.*, 2008, MONTAZEROLGHAEM *et al.*, 2015; TAMIMI *et al.*, 2008, 2009, 2010, 2012; TORRES *et al.*, 2011), além de não apresentar antigenicidade e riscos de transmissão de doenças (KLAMMERT *et al.*, 2009).

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

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

Outro importante componente das formulações destes biomateriais sintéticos experimentais é a hidroxiapatita deficiente em cálcio. Dentre os fosfatos de cálcio, é a que mais se assemelha à estrutura mineral do osso humano e, apesar de sua alta estabilidade, possui uma relação não estequiométrica entre os elementos cálcio e fósforo (Ca/P), o que a torna mais solúvel em comparação à hidroxiapatita estequiométrica sintética e às hidroxiapatitas de origem natural (SUCHANEK; YOSHIMURA, 1998).

As suas principais vantagens são a sua biocompatibilidade, osteocondutividade, lenta biodegradabilidade, origem sintética (baixo risco de transmissão de doenças), baixa imunogenicidade. Quando implantada, apresenta uma forte afinidade com o tecido ósseo, o que a torna um excelente biomaterial de substituição do osso humano (POINERN *et al.*, 2009).

Além da monetita e da hidroxiapatita, os biomateriais sintéticos experimentais ainda possuem uma fase amorfa composta por fosfato de cálcio e gel de sílica (PADILLA *et al.*, 2015). Os compostos bifásicos amorfos são biologicamente mais ativos que a hidroxiapatita pura, de elevada cristalinidade, e podem facilitar a neoformação óssea. Este fenômeno pode estar relacionado a uma dissolução mais rápida da fase amorfa (RIBEIRO, 2003).

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

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

A adição de sílica à hidroxiapatita também demonstrou *in vivo* ser eficaz no aumento de sua degradação e no aumento da resistência da união osso-implante, quando comparada à hidroxiapatita pura. Portanto, a sílica adicionada a um implante contribui com o aumento da osteointegração do biomaterial e, posteriormente, auxilia

a reparação do tecido lesado (ARCOS; VALLET-REGI, 2006; BOSSHARDT *et al.*, 2014; DE AZA, P.N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. 2005; IAFISCO *et al.*, 2009; KOKUBO; KIM; KAWASHITA, 2003; REFFITT *et al.*, 2003).

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

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

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

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

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

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

OBJETIVO

3. OBJETIVO

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

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. BIOMATERIAIS

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

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

Tabela 1- Composição química e de fases dos biomateriais experimentais

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

^a Perda por calcinação; ^b Ca_{1-x}Zn_xHPO₄; ^c Hidroxiapatita deficiente em cálcio, Ca₉HPO₄(PO₄)₅OH; ^d fosfato de cálcio amorfo e gel de sílica; ^e x=0; ^f x≈3.

Fonte: Azurebio SL (2015).

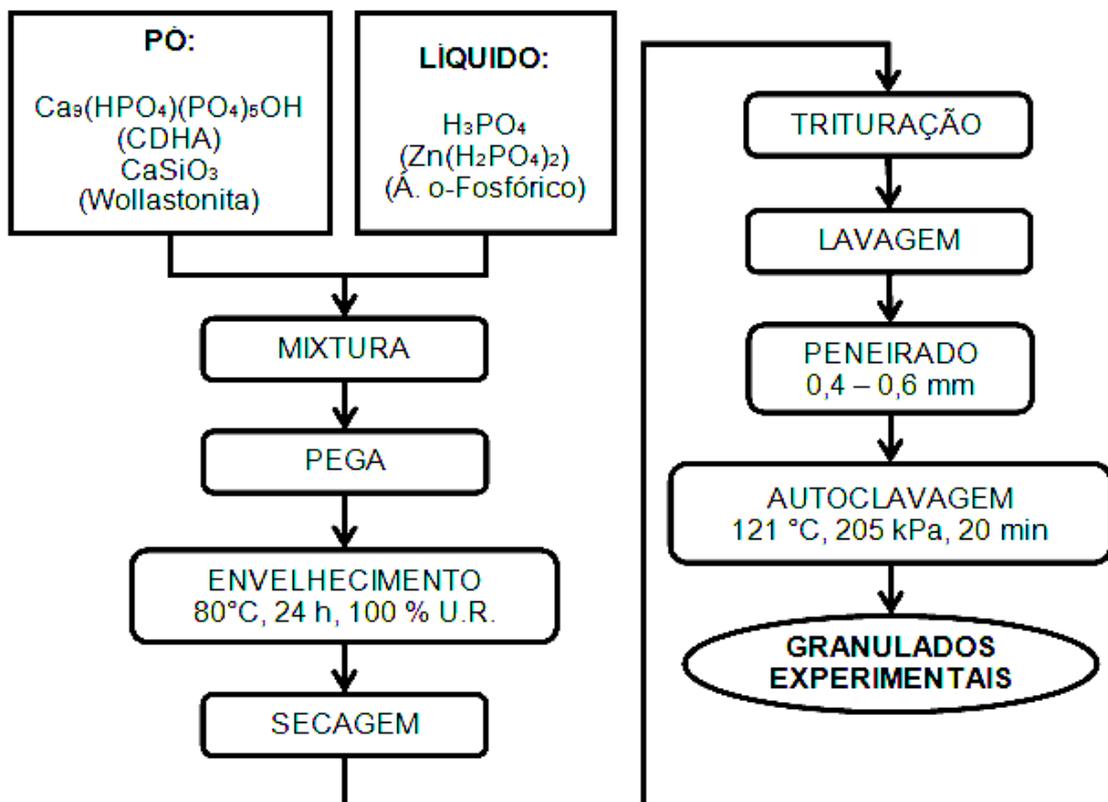
Nos biomateriais AA e OO, o zinco foi introduzido de forma a substituir parcialmente o cálcio na fase da monetita. O biomaterial experimental AA, sob o nome comercial Sil-Oss[®], foi recentemente aprovado na Europa para uso clínico em odontologia e cirurgia maxilo-facial para regeneração de defeitos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

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

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

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

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



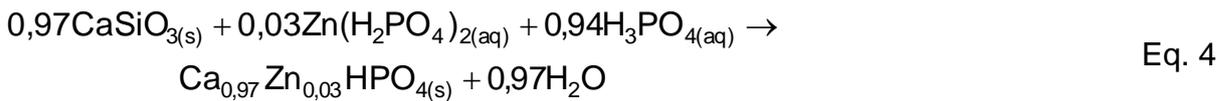
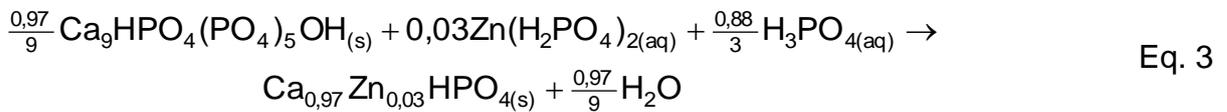
Fonte: Azurebio SL (2015).

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

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



Para a síntese dos biomateriais que contêm zinco, AA e OO, usou-se como líquido uma dissolução de ácido ortofosfórico com a quantidade requerida de zinco, tendo lugar as reações 3 e 4.



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

As amostras de todos os biomateriais foram selecionadas para a faixa granulométrica de 0,4 a 0,6 mm, alicotadas em frascos com 0,25mg cada e esterilizadas em autoclave a 121°C, com 1 atmosfera de pressão, durante 30 minutos.

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

Aos biomateriais experimentais estéreis, foram efetuadas as seguintes caracterizações:

- Análise química quantitativa (fluorescência de raios-X);

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

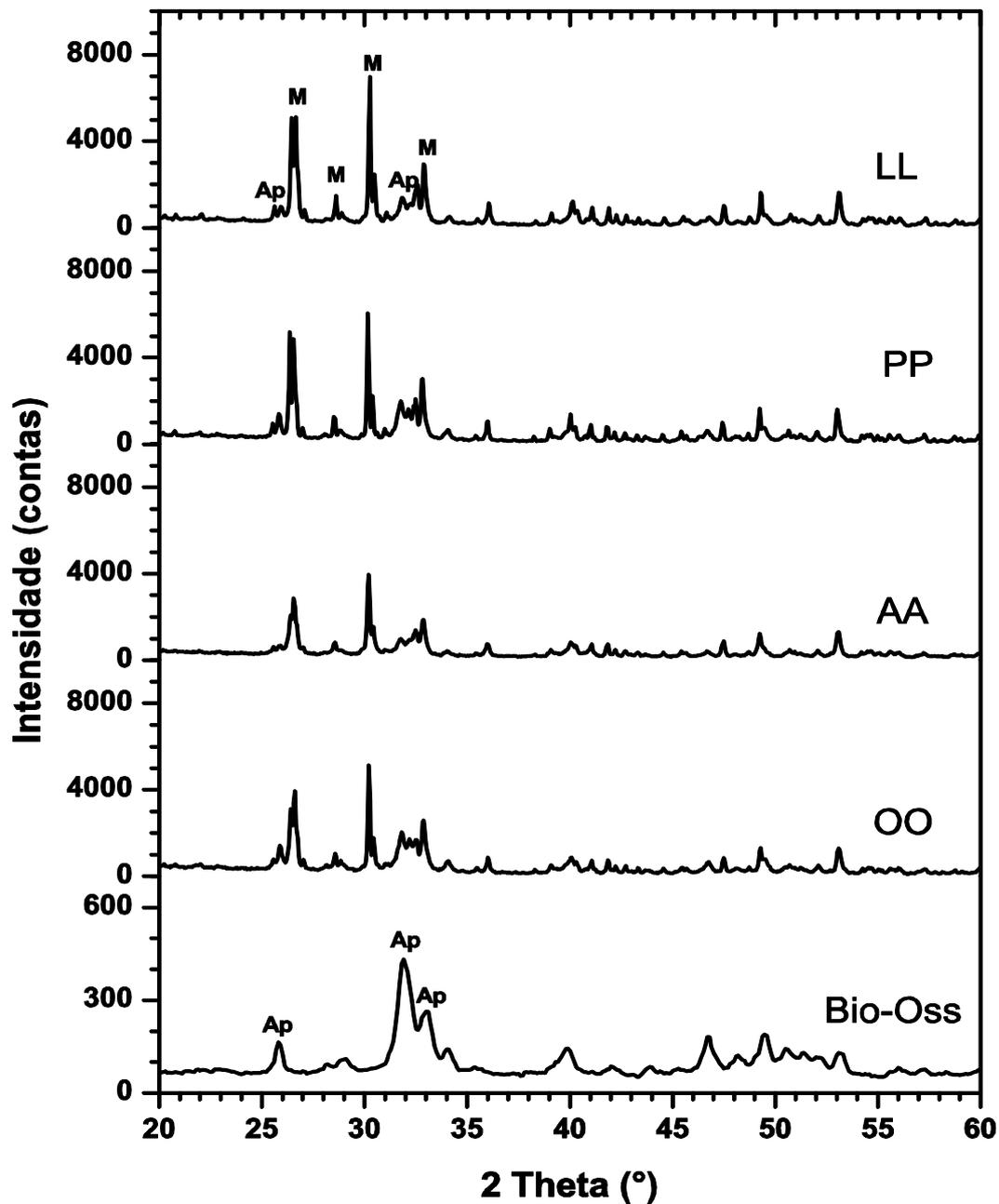
4.1.1. Difração de raios X

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

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

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

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



Fonte: Azurebio SL (2015).

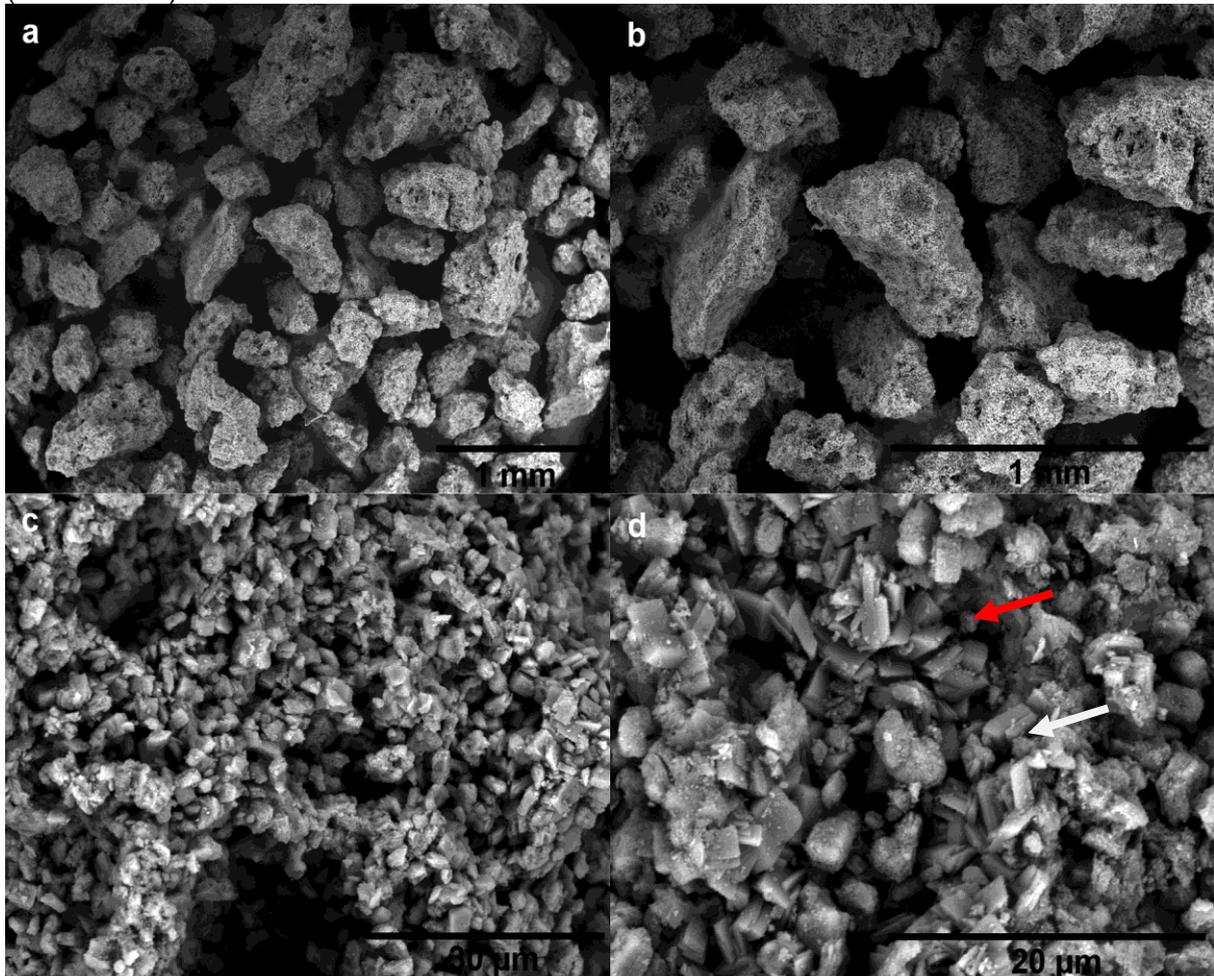
4.1.2. Microestrutura

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

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

Quando examinados com maior magnificação, percebeu-se que todos os biomateriais experimentais estão constituídos por dois tipos de cristais cimentados por uma matriz amorfa. Os cristais maiores com forma tabular (Figuras 4c e 4d) correspondem à monetita, enquanto os menores, com forma de agulha e que se confundem com a matriz amorfa (seta vermelha) (Figura 4d), são típicos da hidroxiapatita.

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

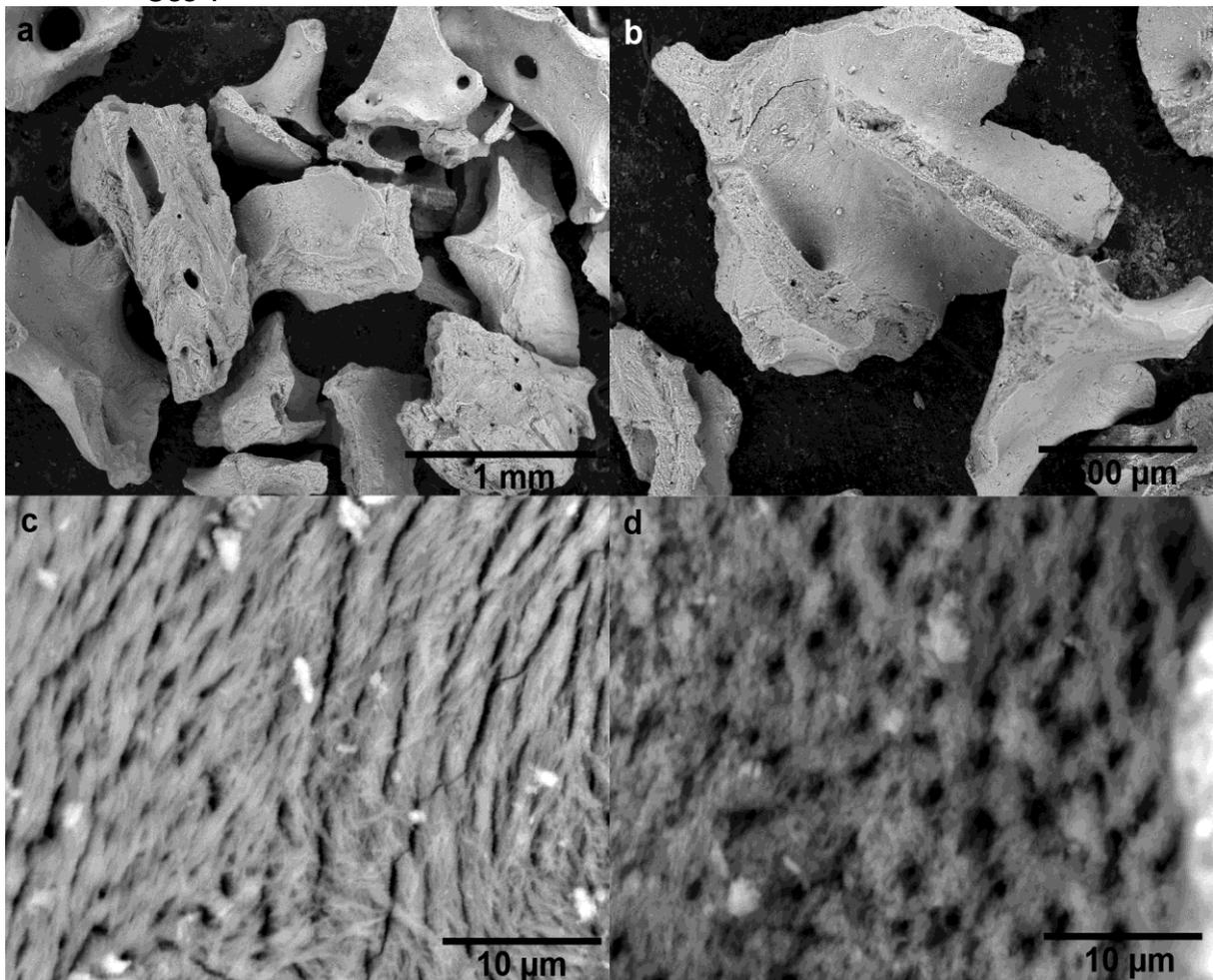


Fonte: Azurebio SL (2015).

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

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

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



Fonte: Azurebio SL (2015).

4.1.3. Área superficial, densidade e porosidade

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

Tabela 2 - Superfície específica, densidade aparente e porosidade dos biomateriais experimentais e do controle.

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

Á.S.E.: Área superficial específica; D_{ap}: Densidade aparente; P_{intra}: Porosidade intragranular; P_{inter}: Porosidade intergranular; D_{médio}: Diâmetro médio de poros;

Fonte: Azurebio SL (2015)

4.1.4. Solubilidade *in vitro*

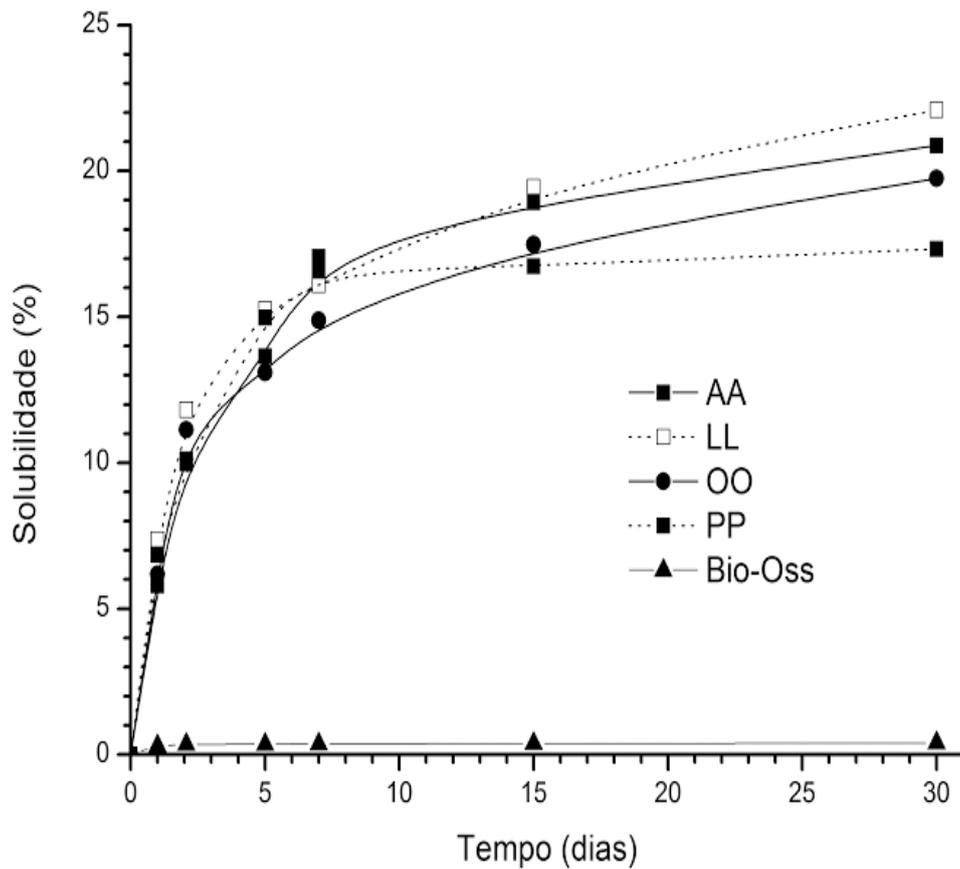
Os testes de solubilidade foram efetuados em tampão de 0,1M de Tris-HCl de pH 7,40 a 37,0 ± 1,5°C. Ao final de cada período de incubação, a suspensão resultante foi filtrada a vácuo e os resíduos sólidos quantitativamente recolhidos, secos a 80°C e ponderados para determinação da sua solubilidade por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

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

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

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

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



Fonte: Azurebio SL (2015).

4.1.5. Citotoxicidade *in vitro*

Para avaliar os possíveis efeitos dos biomateriais experimentais e do controle de hidroxiapatita bovina sobre culturas de osteoblastos humanos, foram preparados extratos aquosos por incubação dos granulados (0,1 g/mL) em meio de cultura DMEM-F12 (DMEM-F12, Sigma D8437) suplementado com 1% de uma solução de 10 UI/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina (Sigma, P0781) em meio completo, durante 24 horas a 37 °C em um agitador orbital a 100 rpm.

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

Para o ensaio de citotoxicidade, osteoblastos humanos (HOb 406-05f, Cell Applications, Inc) foram semeados em placas de 96 poços a uma densidade de 50.000 células/poço em 100 µl/poço de meio DMEM completo, suplementado com F12-FBS a 10% (DMEM-F12 completo/10% FBS) e incubado a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

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

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

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

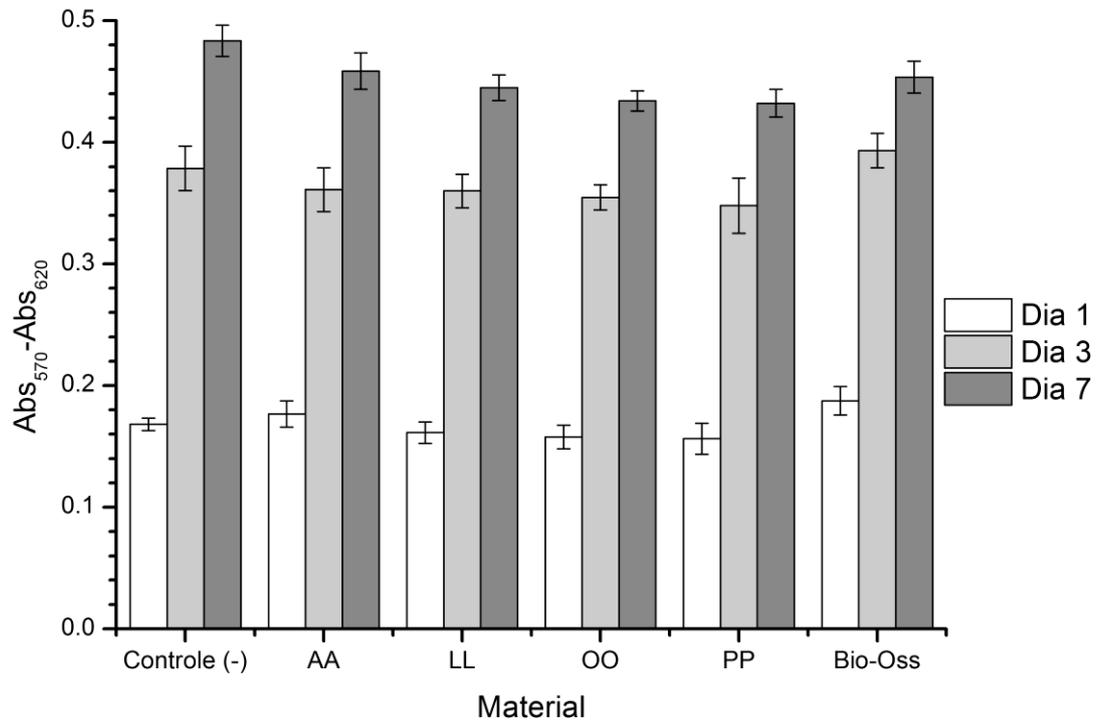
Finalmente, foram adicionados 100 µl de DMEM-F12 completo/10% de FBS nos poços com células e incubado nas mesmas condições por outras 96h após o qual foi repetida a adição do reagente e a leitura.

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

Os resultados do teste são resumidos na Figura 7.

Nenhum dos extratos dos biomateriais experimentais nem do controle foi citotóxico nas condições estudadas. Não houve diferenças significativas entre a viabilidade celular de culturas de osteoblastos humanos expostos aos extratos dos diferentes biomateriais e o controle (Figura 7).

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



Fonte: Azurebio SL (2015)

4.2.AMOSTRA

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

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

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

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

- Grupo GCS: defeito preenchido apenas por coágulo sanguíneo;

- Grupo GCI: calvária íntegra, sem confecção de defeito.

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

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

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3. ETAPA CIRÚRGICA

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

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

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

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

O defeito ósseo crítico na porção mediana da calvária foi efetuado entre os vértices da sutura anterior e posterior, com a utilização de uma fresa tipo trefina com 8,0 mm de diâmetro interno em contra ângulo cirúrgico com redução de 16:1 acoplado em motor elétrico com rotação de 1.500 rpm, com torque de 55N/cm², sob constante irrigação com solução fisiológica estéril.

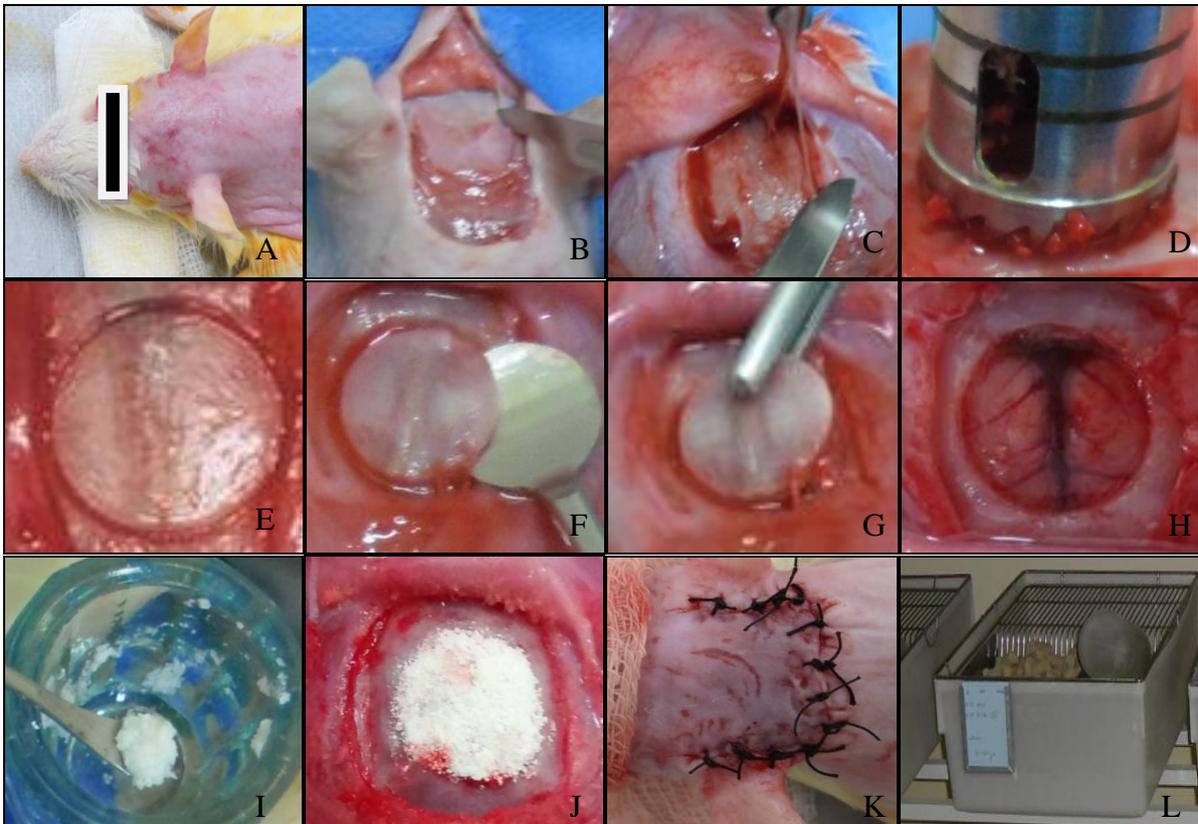
Após a transfixação da calvária, o fragmento foi removido juntamente com a dura-máter com o auxílio de cureta multi e pinça mosquito, sob abundante irrigação, com o cuidado de promover a remoção de espículas ósseas.

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

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

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

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



Fonte: Fotos da autora.

4.4. ETAPA LABORATORIAL

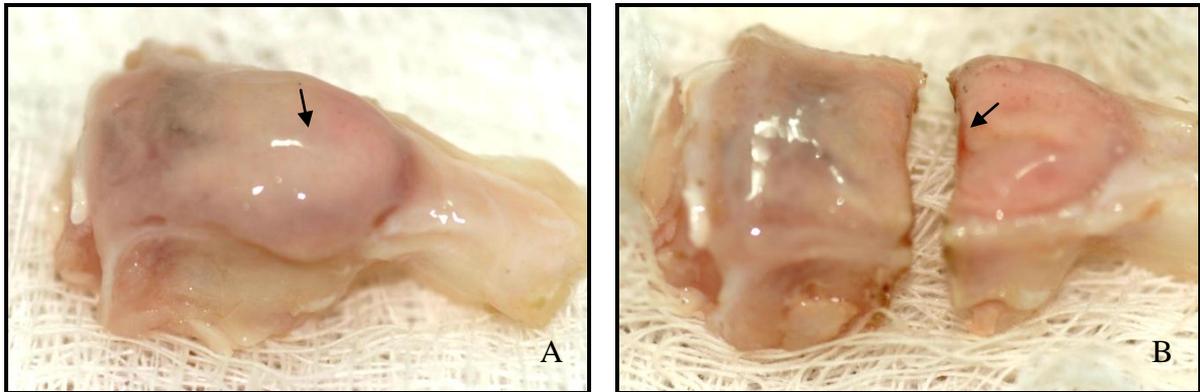
Esta etapa foi realizada no Laboratório de Bioengenharia Tecidual e Biomateriais (LBTB) do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. Os procedimentos para processamento histológico do tecido ósseo foram realizados por meio da utilização de protocolos já estabelecidos em experimentos prévios e obedeceram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

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

A porção anterior da calvária foi descalcificada em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 5% e incluída em parafina. A porção posterior foi incluída em resina e reservada a estudos futuros. Os blocos de parafina foram planificados e cortes seriados foram realizados em micrótomo com quatro micrômetros de espessura. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina eosina (HE) e tricrômico Masson Goldner (TMG) para evidenciar células ósseas, células inflamatórias, fibras colágenas e deposição de matriz osteoide; e picrossírius *fast green* (PIFG) para evidenciar proteínas colagênicas.

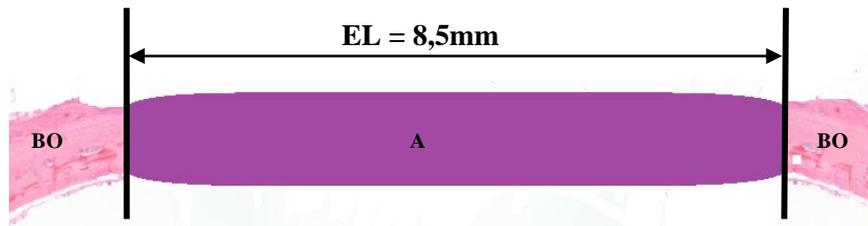
Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz comum (Figura 10).

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



Fonte: Fotos da autora.

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



Fonte: Elaborada pela autora.

4.5. ANÁLISE HISTOMORFOLÓGICA

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

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

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

4.6. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Utilizou-se o programa Leica QWin[®] (Figuras 11 e 12) para a avaliação morfológica. Foram mensuradas:

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

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

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

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

Para a análise estatística, foram consideradas:

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

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

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

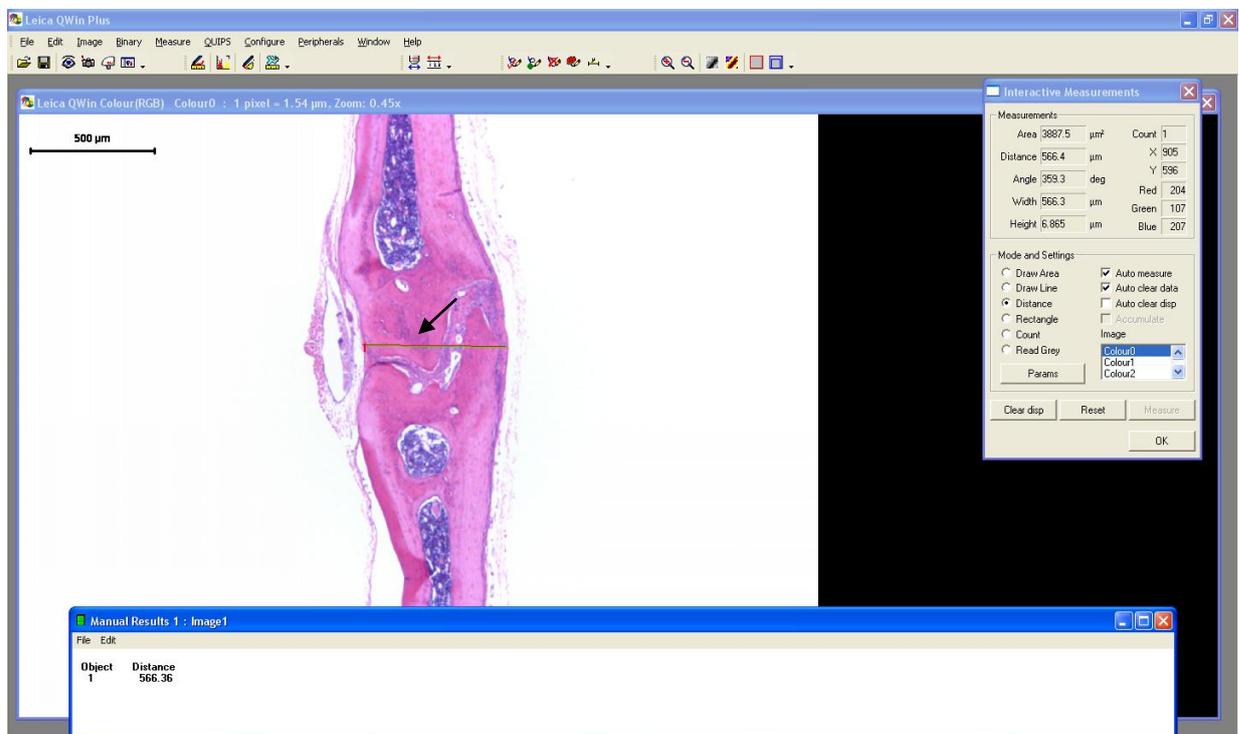
- dividindo-se a soma das áreas de MO pela área total do reparo do DC e multiplicando-se por 100.

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

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

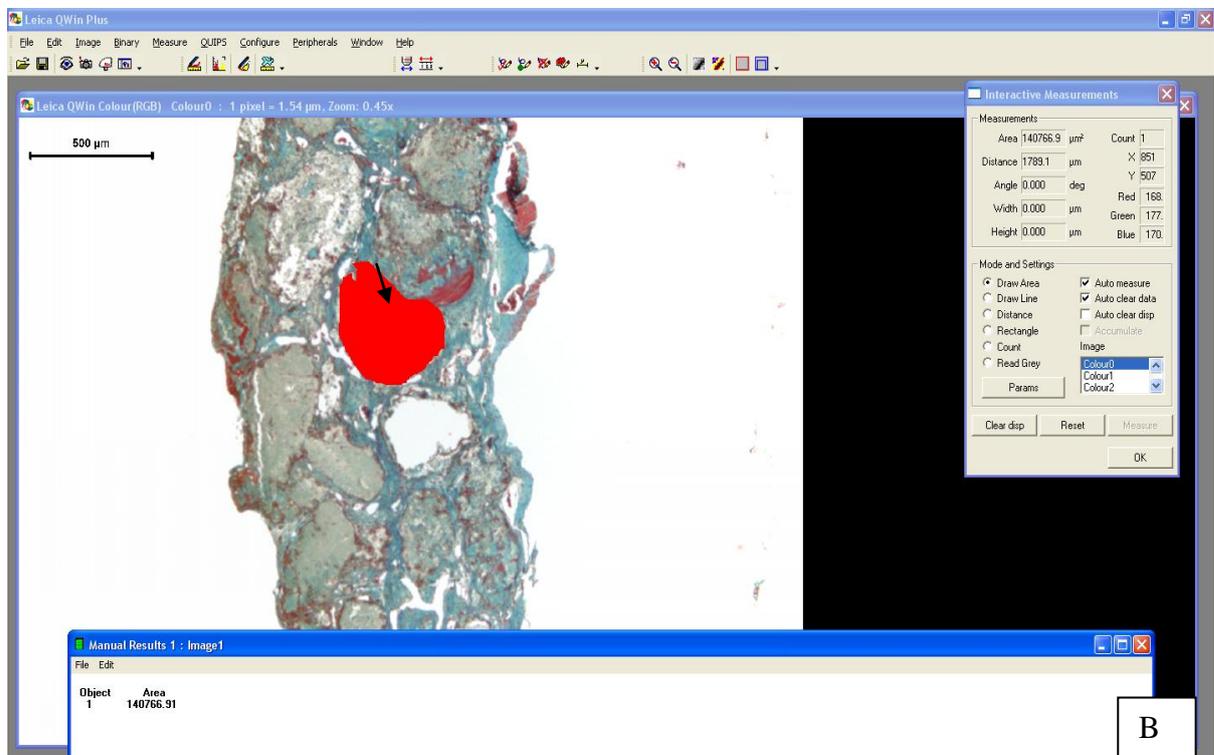
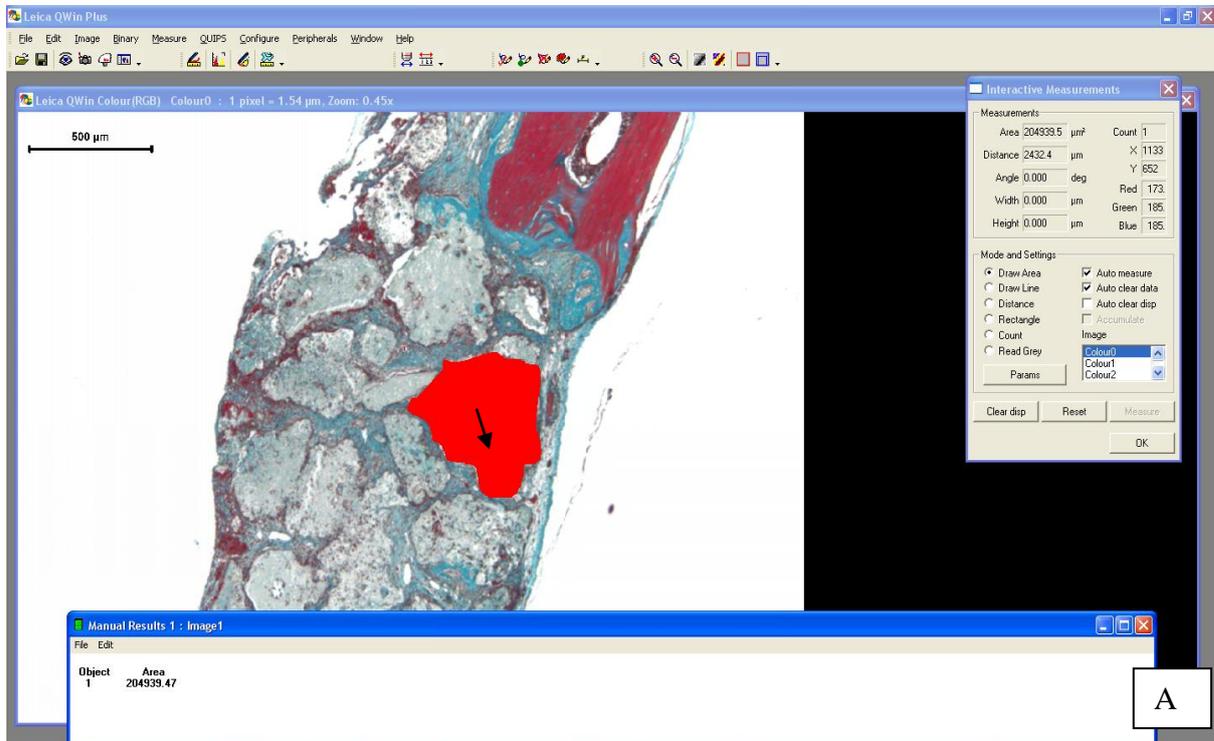
- dividindo-se a soma das distâncias lineares da matriz osteoide neoformada pela distância linear total do reparo do defeito ósseo crítico e multiplicando-se por 100.

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



Fonte: Elaborada pela autora.

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



Fonte: Elaborada pela autora.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

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

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

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

eta-squared -

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

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

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

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

Apesar da classificação para os níveis de magnitude do efeito proposta por Cohen (1988), que sugeriu $d=0,2$ para um tamanho de efeito pequeno, $d=0,5$ para um tamanho de efeito intermediário e $d=0,8$ para um tamanho de efeito grande,

optou-se por estabelecer os pontos de corte para esta medida a diferença das médias entre o GHB e o GCS como um tamanho de efeito mínimo e suficiente, uma vez que a hidroxiapatita bovina (Bio-Oss[®]) foi considerada como um controle de regeneração óssea obtida com implantação de biomaterial substituto ósseo e o coágulo sanguíneo um controle de ausência de biomaterial no defeito.

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

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

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

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

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

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

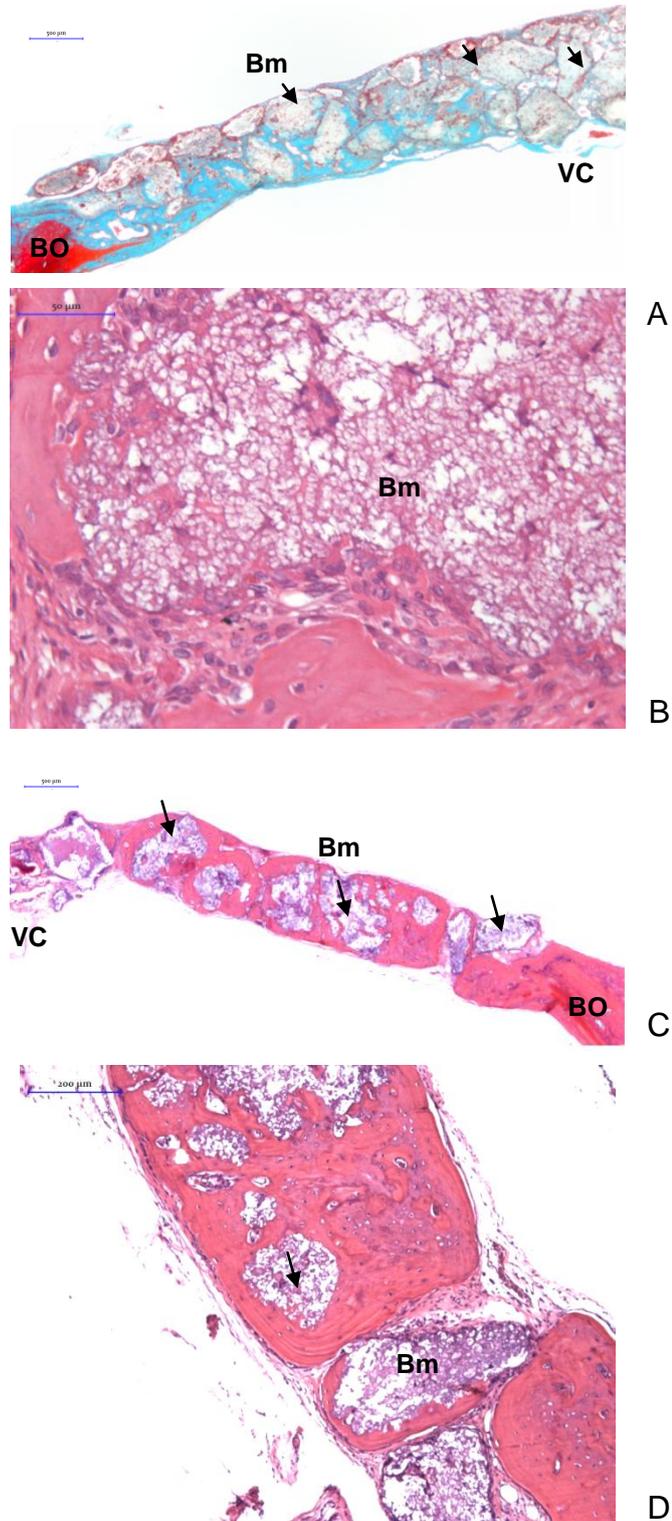
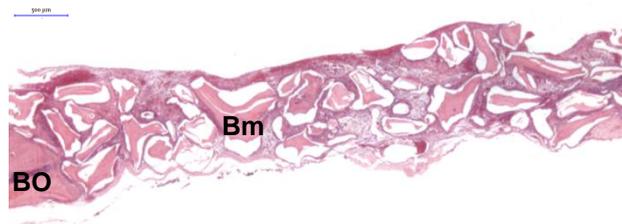
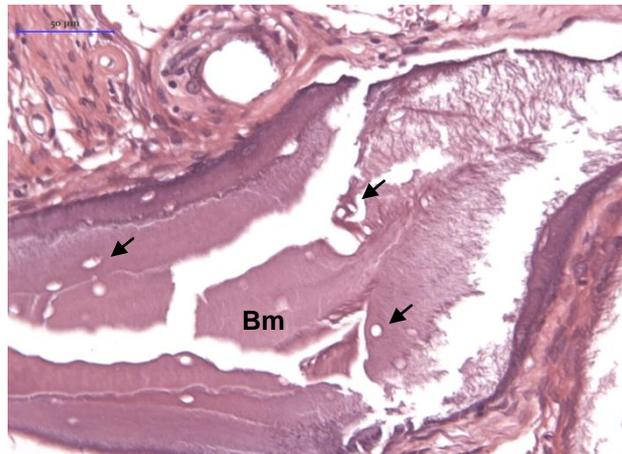


Figura 14 - Partículas de hidroxiapatita bovina no defeito. Observamos no GHB: A) distribuição uniforme das partículas de biomaterial (Bm) aos 15 dias, HE, 2,5x; B) poros e fissuras no interior da partícula de hidroxiapatita bovina (setas) característicos do tecido ósseo, 15 dias, HE, 20x; C) reduzida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



A



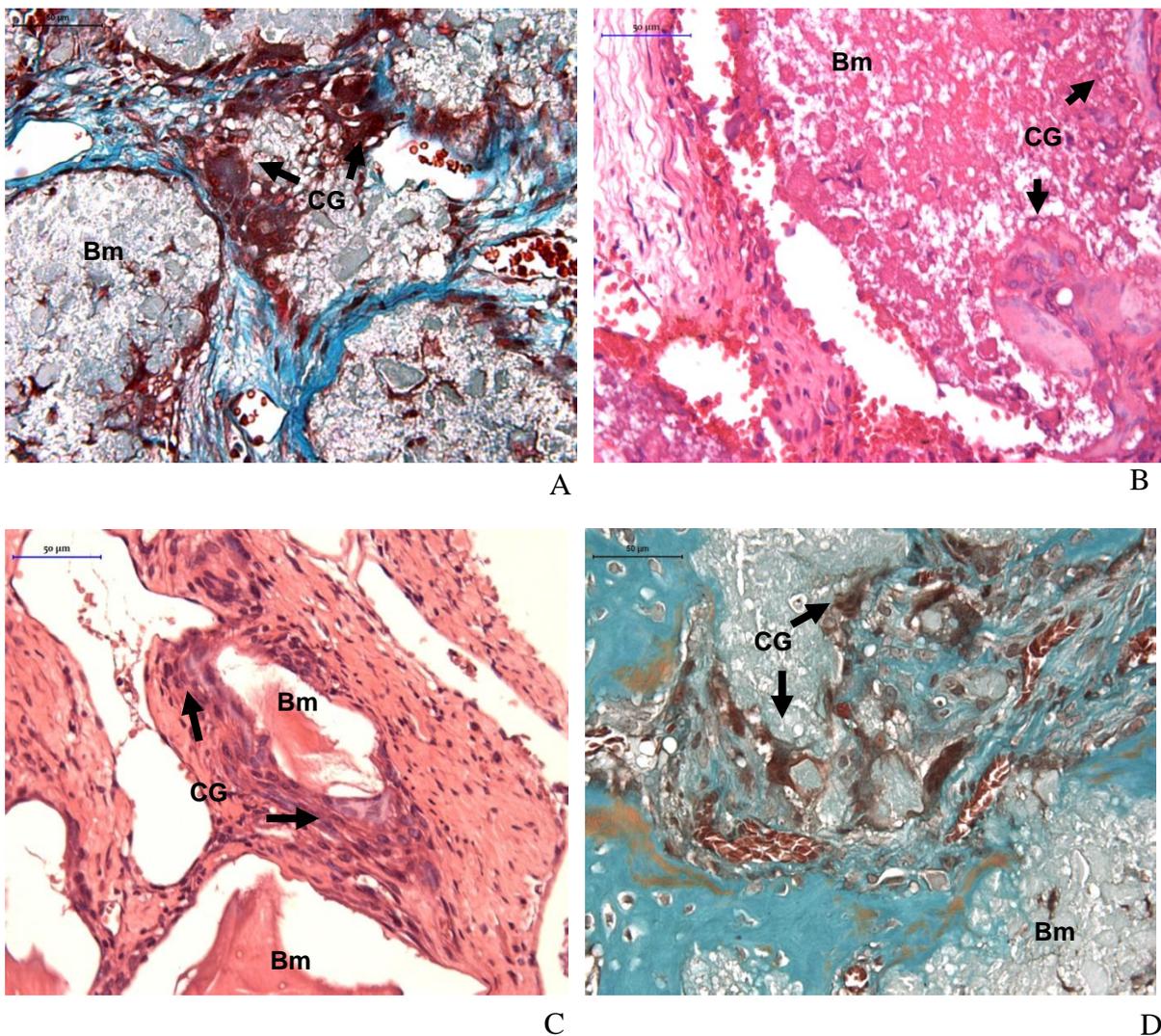
B



C

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

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



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

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

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

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

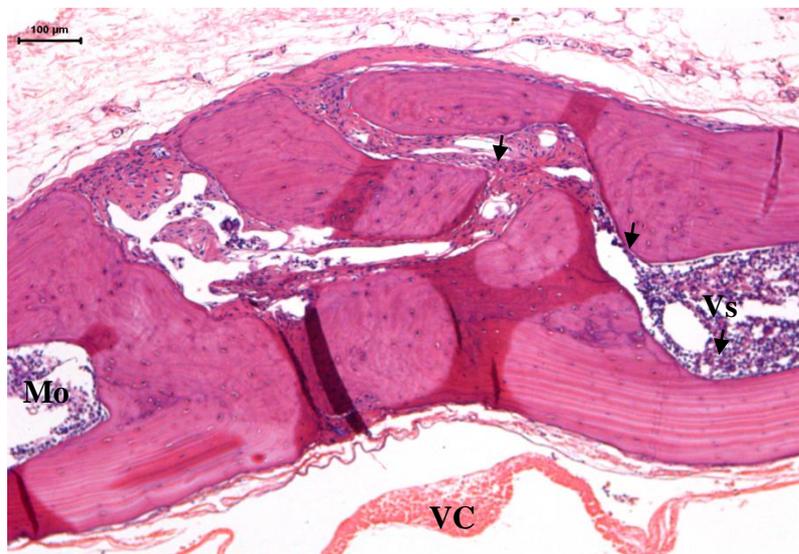
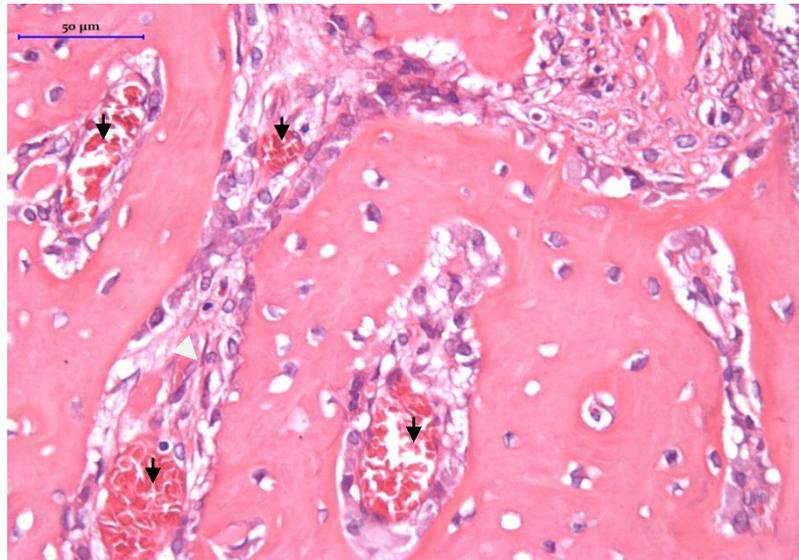
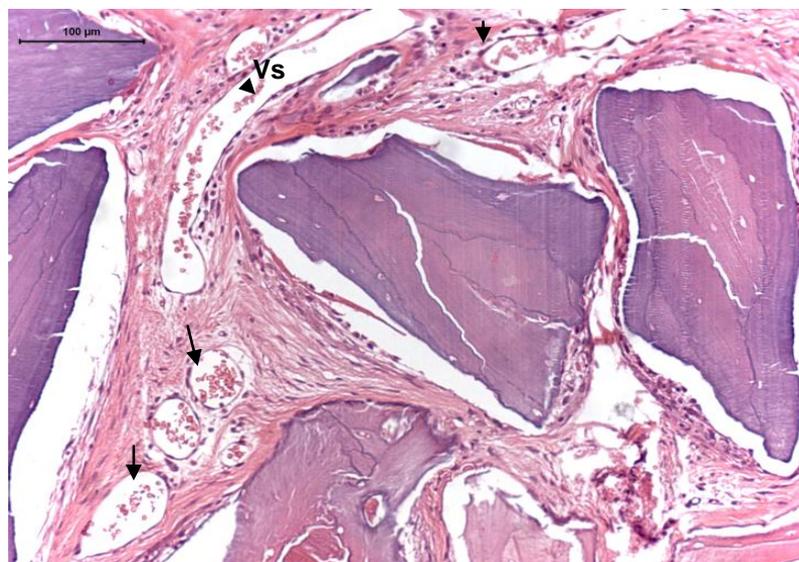


Figura 17 - Vasos sanguíneos nos grupos implantados. Setas nos vasos sanguíneos (Vs) A) GAA HE 15 dias 40x; B) GHB HE 15dias 20x.



A



B

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

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

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

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

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

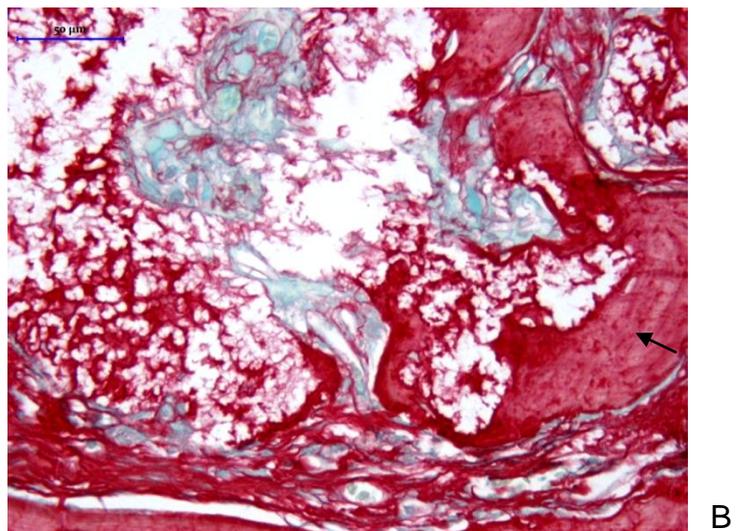
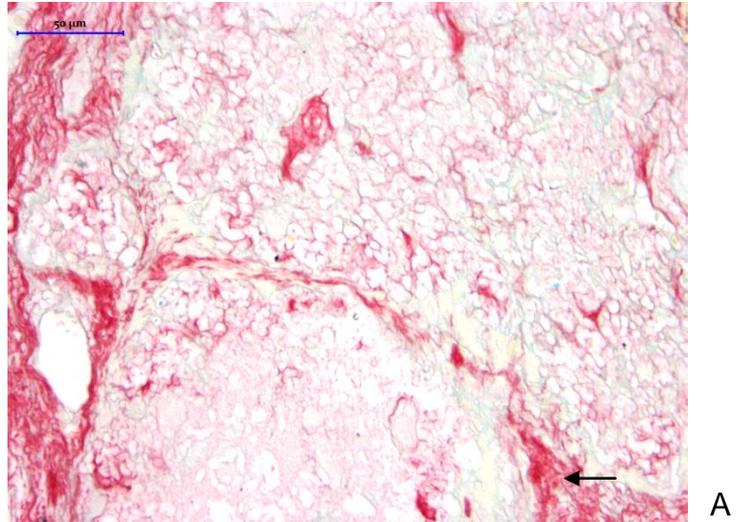


Figura 19 - Tecido conjuntivo fibroso no GHB. Observamos o tecido conjuntivo fibroso (TCF) com uma tendência ao encapsulamento das partículas de hidroxiapatita bovina (Bm), sem permeação A) 15 dias PIFG 10x; B) 45 dias PIFG 40x.

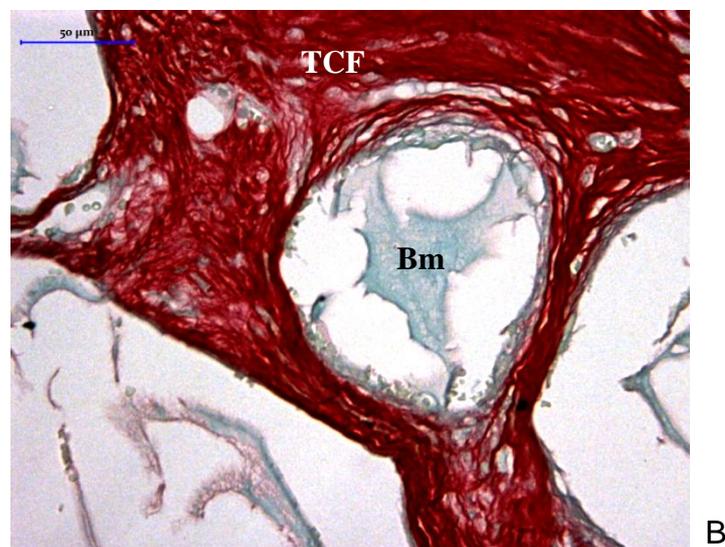
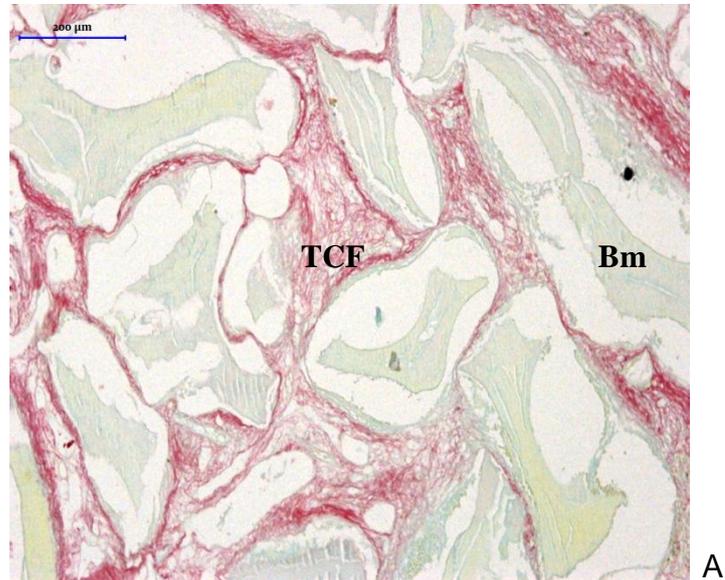


Figura 20- Tecido conjuntivo fibroso no GCS. Observamos uma conformação do tecido conjuntivo fibroso entre as bordas do defeito ósseo crítico. A) PIFG 15 dias 4x; B) PIFG 45 dias 10x.

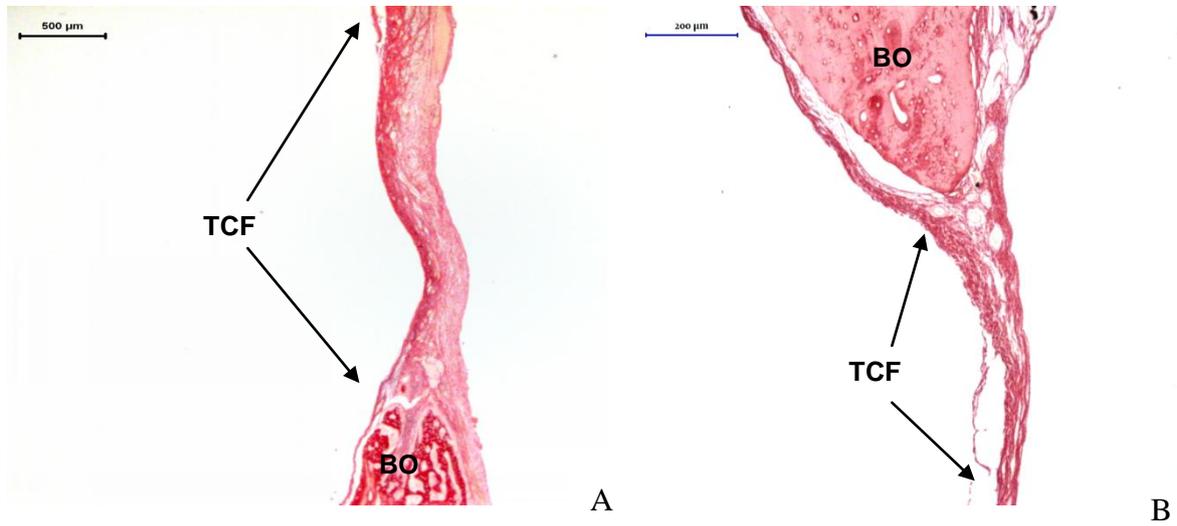
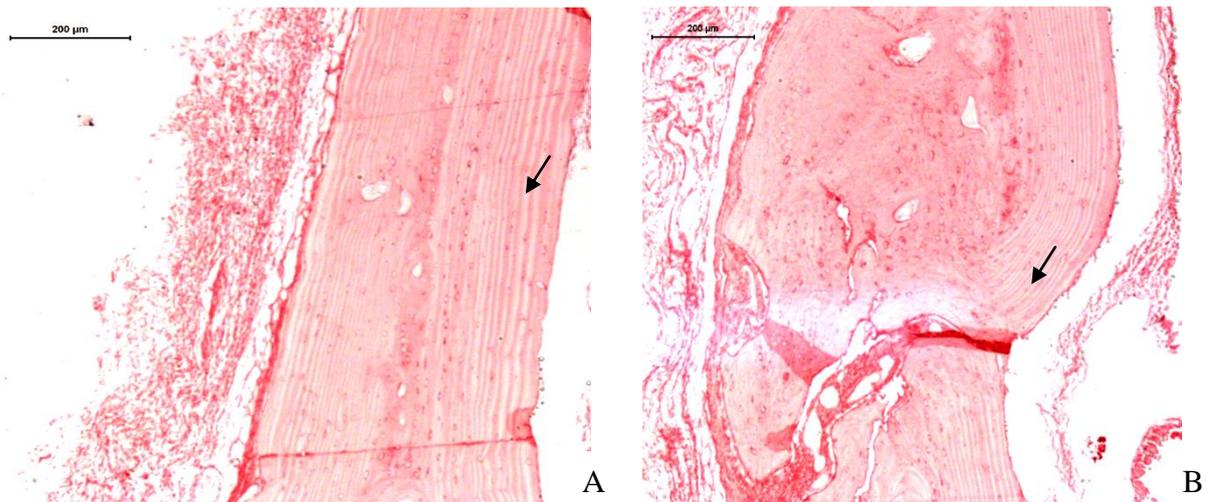


Figura 21 - Conformação do tecido ósseo na calvária íntegra. Lamelas assinaladas (setas), GCI, PIFG, 120 dias, 10x: A) lateralmente à sutura sagital; B) na região da sutura sagital.



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

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

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

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

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

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

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

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

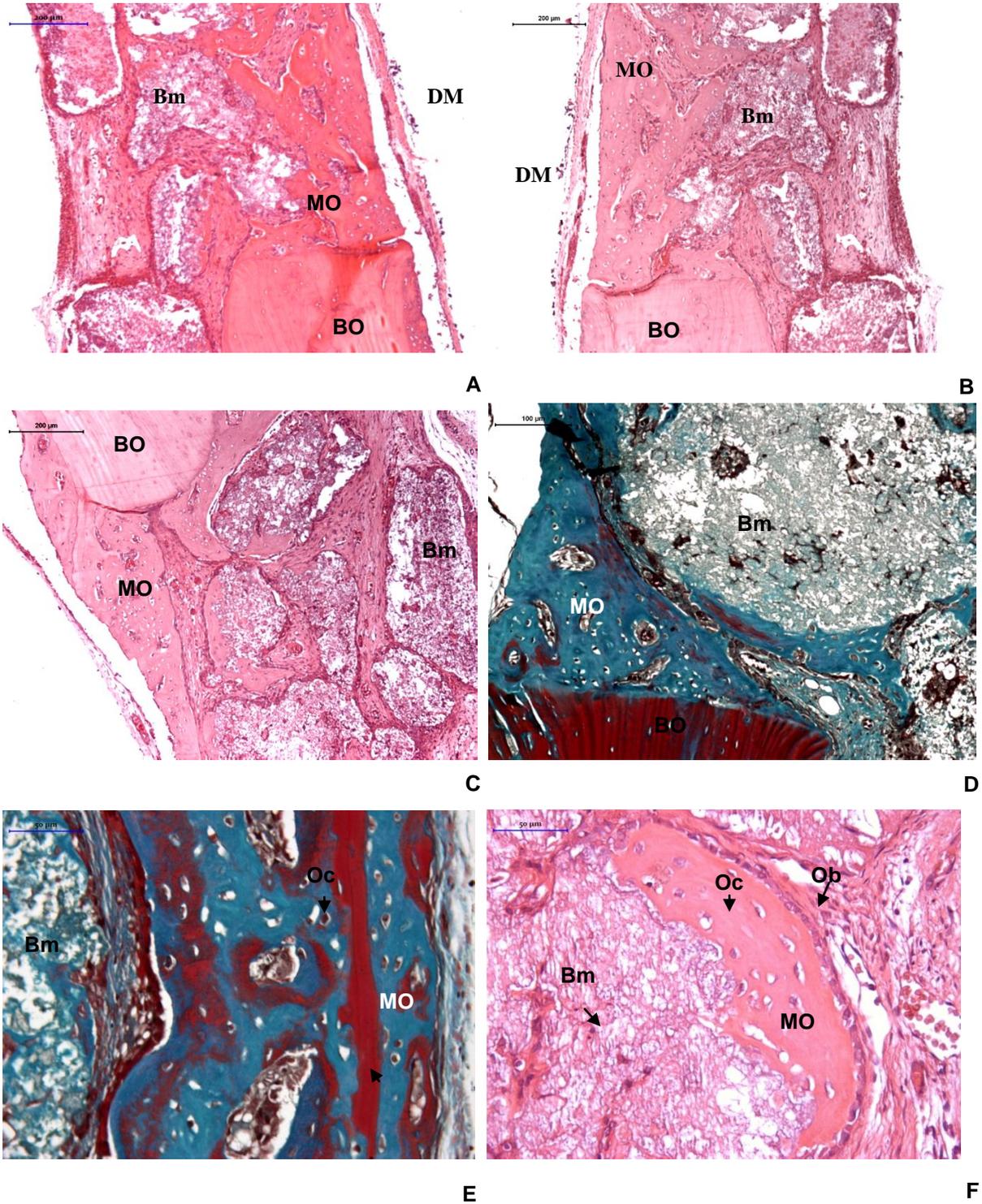


Figura 23 - Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 45 dias. Neoformação óssea com matriz osteoide (MO) ao redor das partículas dos biomateriais (Bm): A) GOO, HE, 4x; B) GPP, HE, 10x; C) GLL, HE, 40x; D) GPP, HE, 40x. Neste ponto biológico, observa-se mineralização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

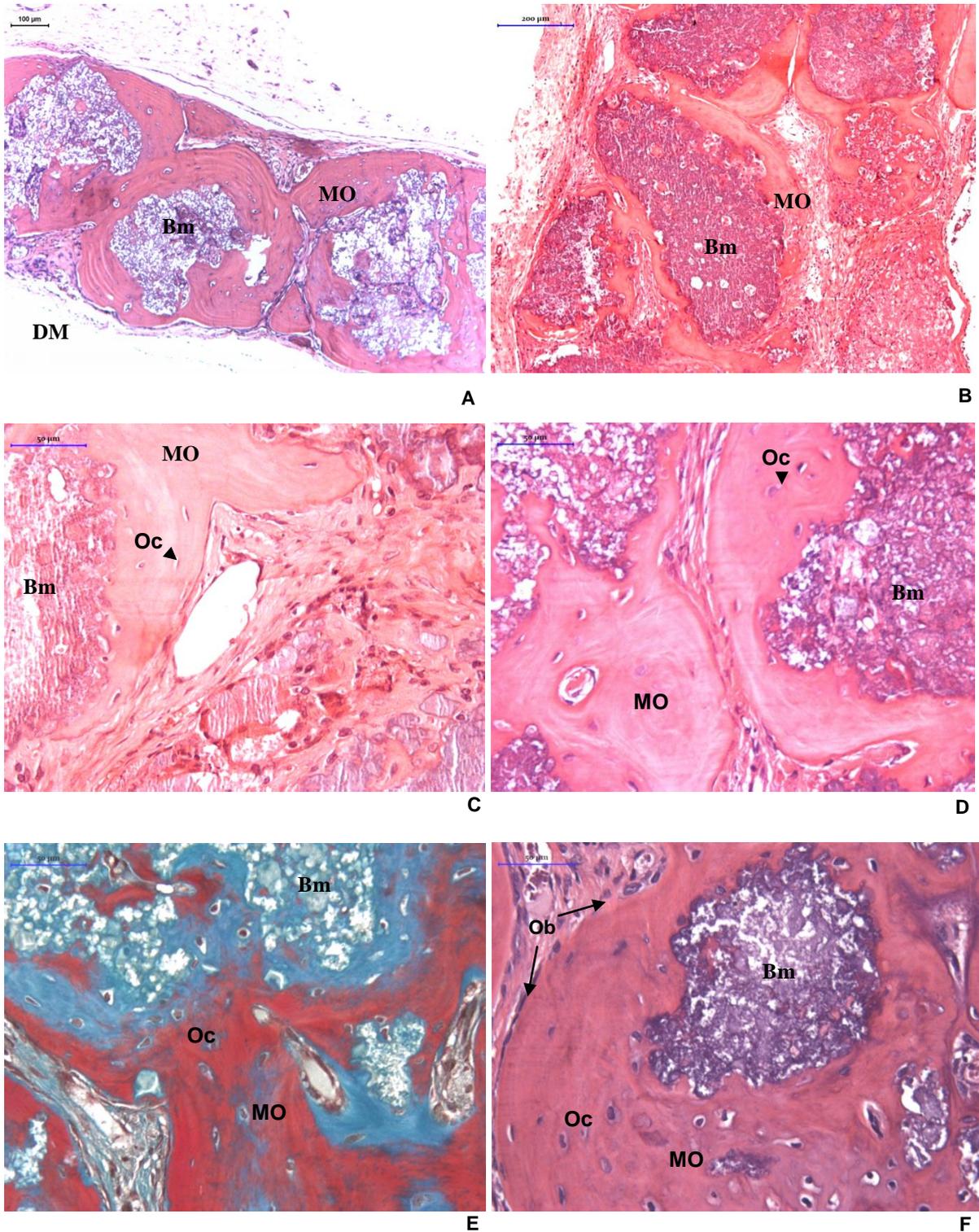


Figura 24 - Osteogênese nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais aos 120 dias. Observamos a regeneração do defeito ósseo crítico com deposição de matriz osteoide (MO) e metabolização dos biomateriais (Bm) (setas), HE, 2,5x: A) GLL; B) GPP; C) GAA; D) GOO. Matriz osteoide integrada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

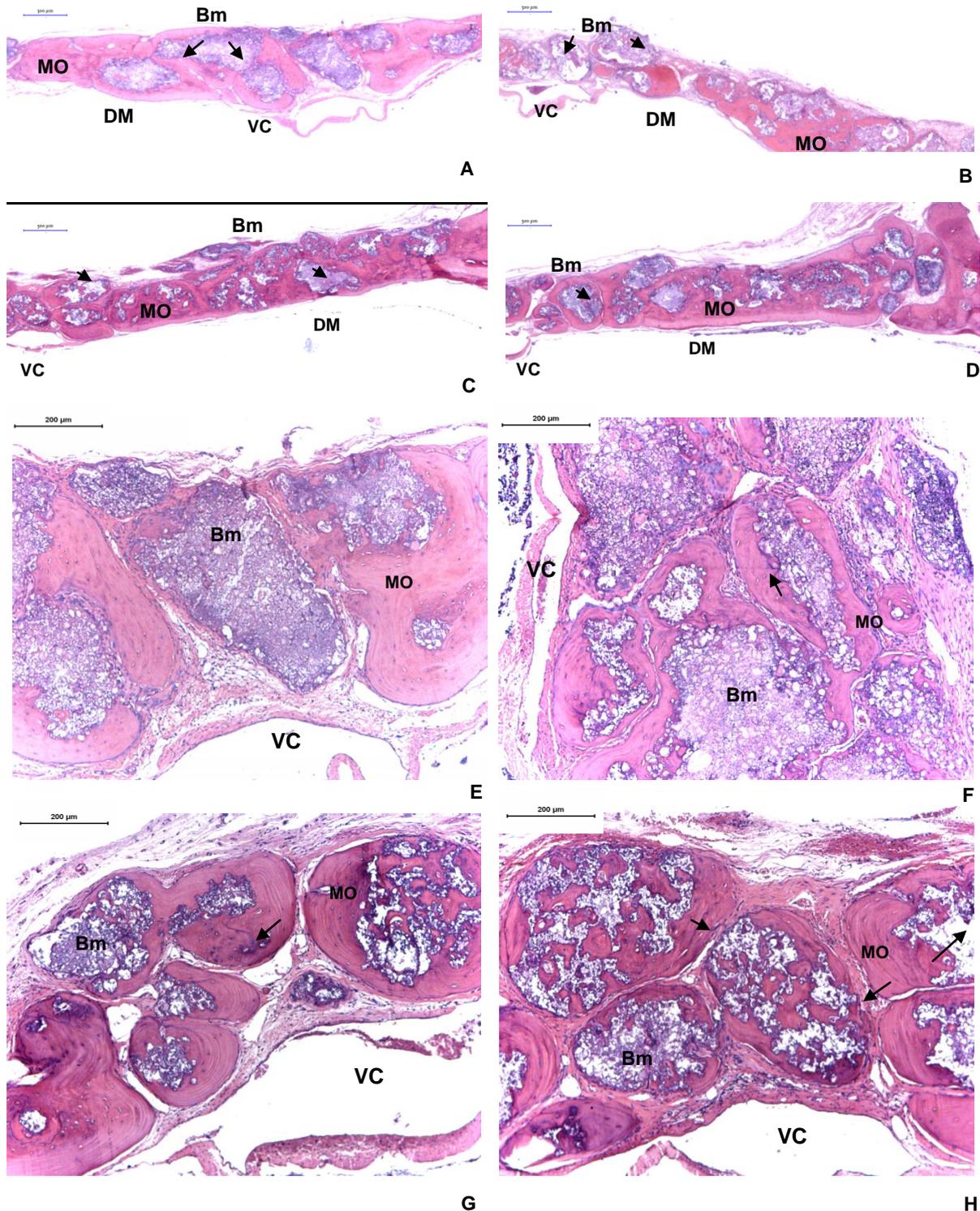
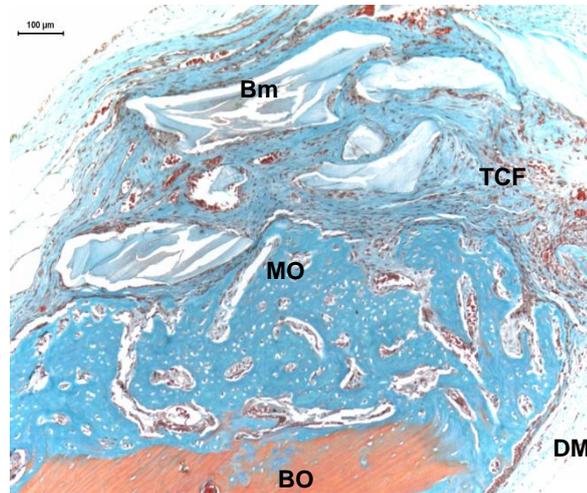
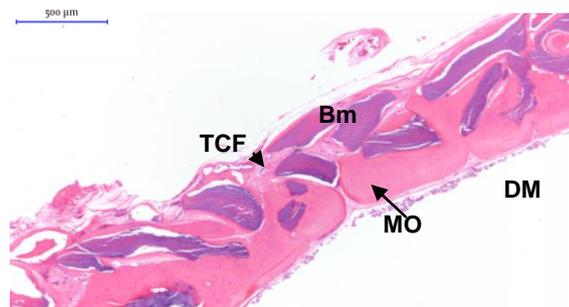


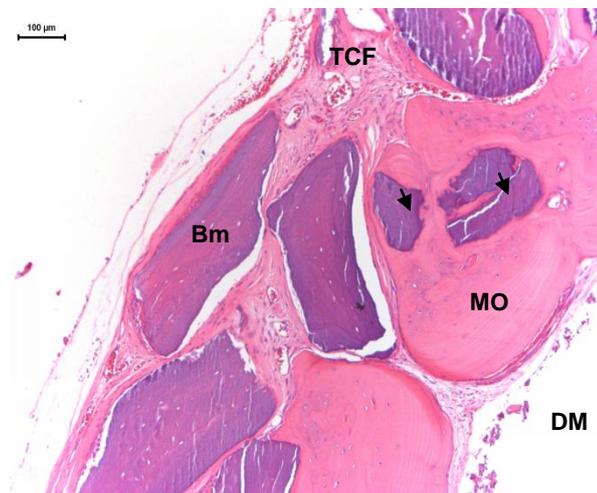
Figura 25 - Osteogênese GHB A) Neoformação óssea reacional com deposição de matriz osteoide (MO) contígua à borda óssea (BO), 15 dias, TMG, 10x; B) Aos 120 dias, observamos neoformação óssea próxima à dura-máter (DM), com presença de grande quantidade de partículas de biomaterial (Bm), circundadas parcialmente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



A



B



C

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

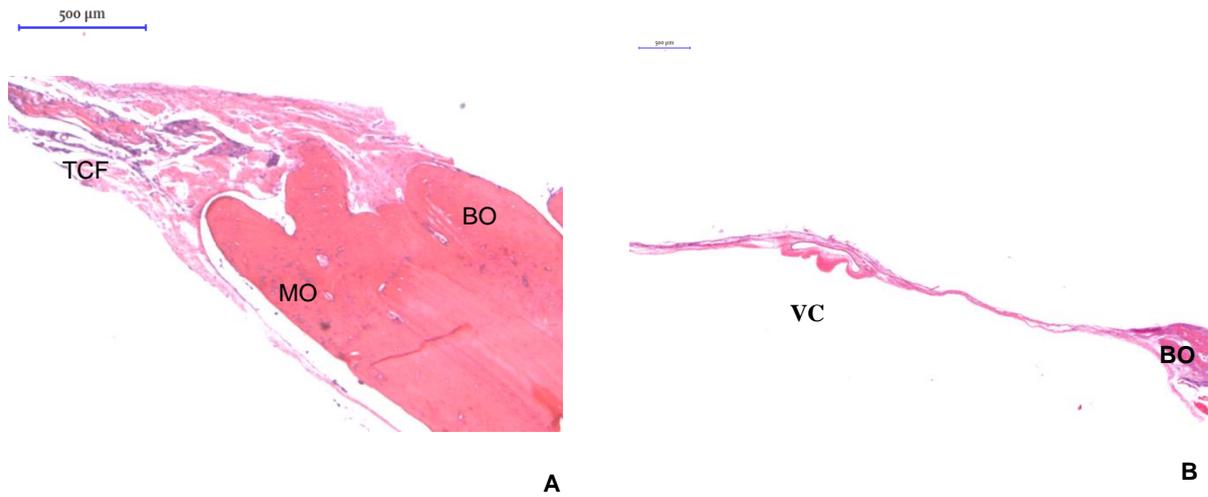
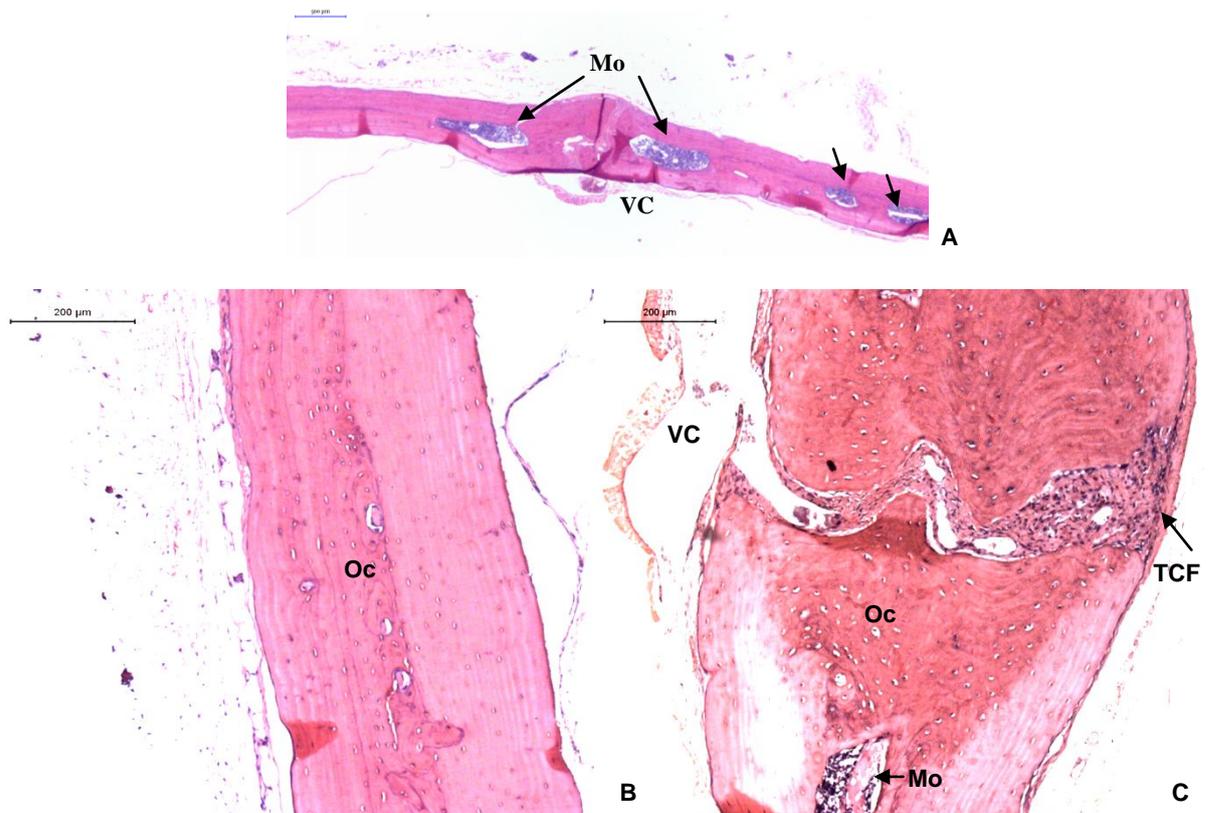


Figura 27 - Calvária íntegra. Observamos a calvária íntegra no GCI aos 120 dias, com reduzida quantidade de medula óssea (Mo) (setas) e tecido conjuntivo fibroso (TCF), e numerosos osteócitos (Oc): A) HE, 2,5x; B) HE, 10x; C) região da sutura sagital, HE, 10x.



5.2. RESULTADOS MORFOMÉTRICOS COM ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

Foram calculadas as médias e os desvios-padrão da porcentagem de matriz osteoide na região do reparo do defeito ósseo crítico, dos grupos do ponto biológico de 15 dias, de acordo com os grupos (Tabela 4), representados graficamente na Figura 28.

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

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

As diferenças entre as médias de todos os grupos e o GCS, pelo teste de Dunnett, com intervalo de confiança de 95% e tamanho do efeito ajustado para cada teste (d), com exceção do GHB ($d = 1,25$; $p = 0,997$), foram estatisticamente significantes, com elevados tamanhos de efeito: GLL ($d = 5,7$; $p < 0,001$), GPP ($d = 6,6$; $p < 0,001$), GAA ($d = 8,8$; $p < 0,001$); GOO ($d = 9,3$; $p < 0,001$), GCI ($d = 106,06$; $p < 0,001$) (Tabela 5).

Com o intuito de comparação entre os grupos experimentais GLL, GPP, GAA e GOO, uma nova análise de variância foi efetuada devido à redução dos grupos, na qual foi encontrado um tamanho de efeito η^2 de 66,1% ($p < 0,001$).

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

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

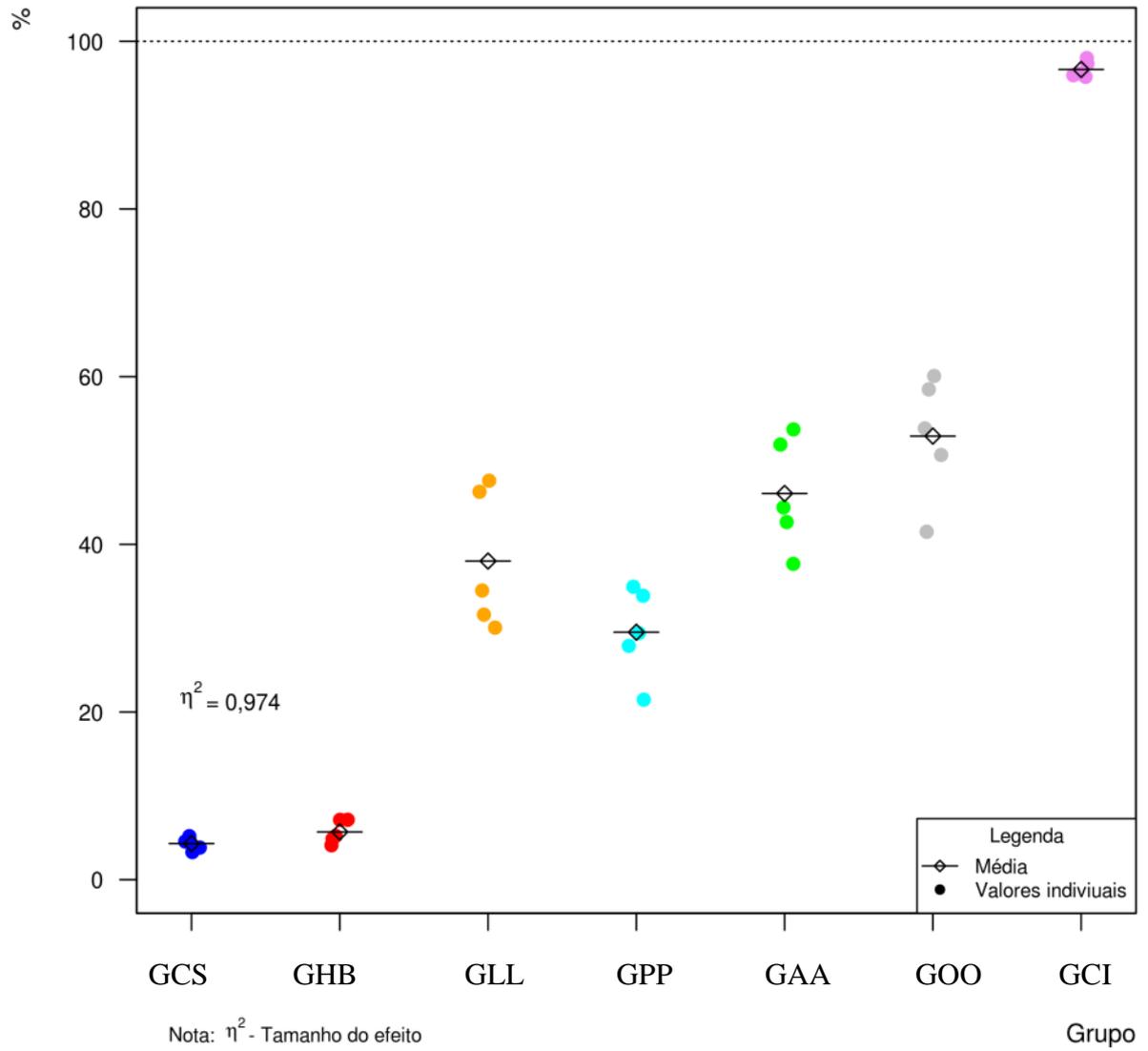


Tabela 4 - Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada de acordo com os grupos aos 15 dias

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

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

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

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

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

Aos 45 dias, as médias e os desvios padrão da percentagem de matriz osteoide nos grupos foram: GLL 50,32% (SD 9,23%), GPP 50,22% (SD 4,88%), GAA 65,43% (SD 5,44%), GOO 68,51% (SD 2,27%), GHB 11,17% (SD 2,07%), GCS 9,61% (SD 1,54%), GCI 96,19% (SD 0,79%), os quais constam na Tabela 7.

De acordo com o observado, ocorreu uma variação entre as médias, com maior percentagem de matriz osteoide formada nos grupos implantados com os biomateriais sintéticos experimentais. O GHB mostrou uma quantidade de matriz osteoide muito próxima à apresentada no GCS. Todos os grupos apresentaram uma grande diferença de percentagem de matriz osteoide com relação ao GCI.

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

A Figura 29 representa os resultados graficamente.

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

Devido à redução dos grupos, uma nova análise de variância foi efetuada para GLL, GPP, GAA e GOO, que encontrou um tamanho de efeito η^2 de 71,2% ($p < 0,001$).

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

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

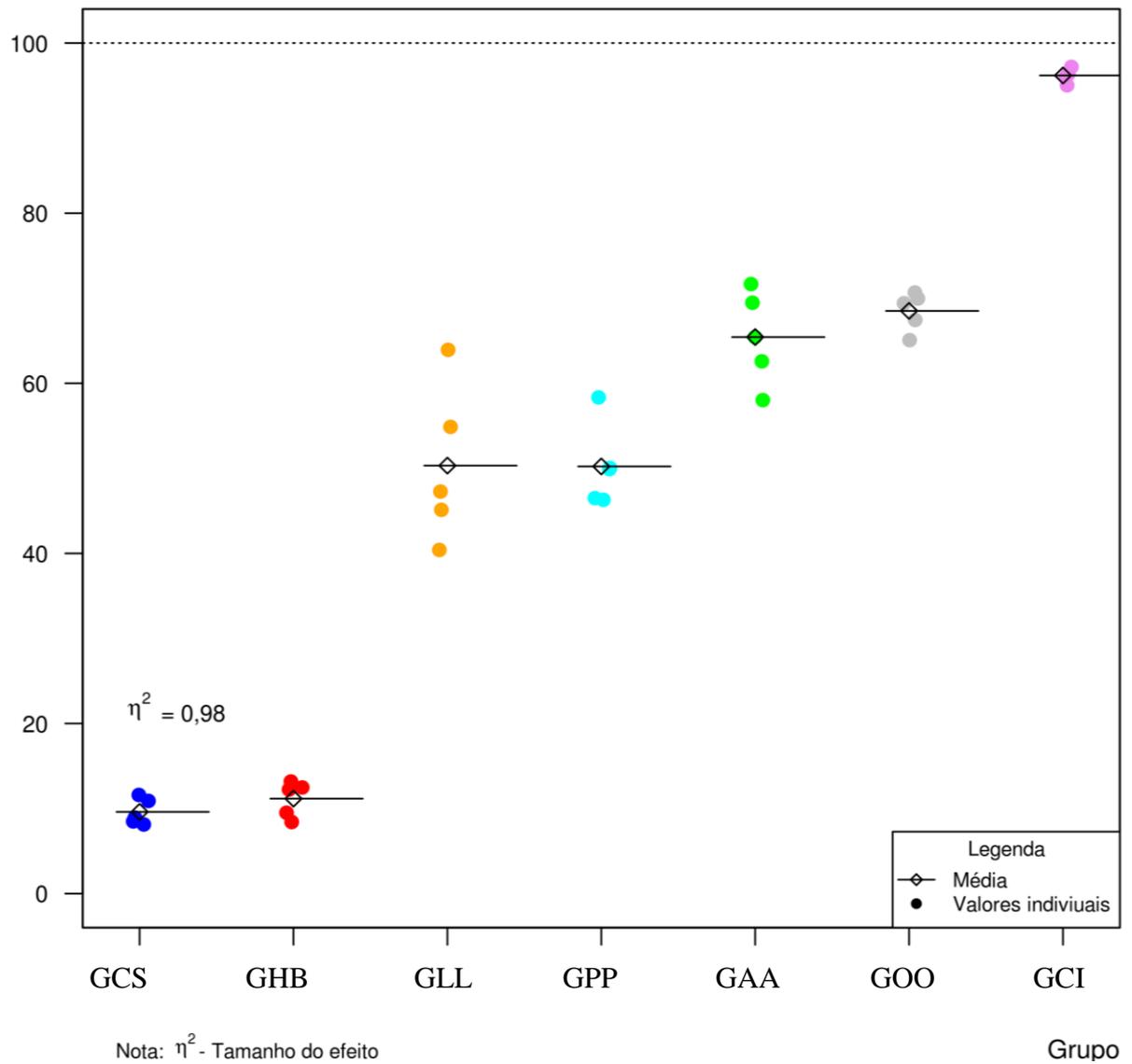


Tabela 7 - Médias e desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 45 dias de acordo com os grupos

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

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

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

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

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

As médias e os desvios padrão da porcentagem de matriz osteoide nos grupos aos 120 dias foram: GLL 52,37% (SD 6,86%), GPP 59,46% (SD 6,86%), GAA 78,91% (SD 5,11%), GOO 79,63% (SD 3,77%), GHB 51,91% (SD 5,43%), GCS 24,54% (SD 9,03), GCI 96,28% (SD 0,92%), os quais constam na Tabela 10.

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

Estes resultados encontram-se representados na Figura 30.

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

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

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

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

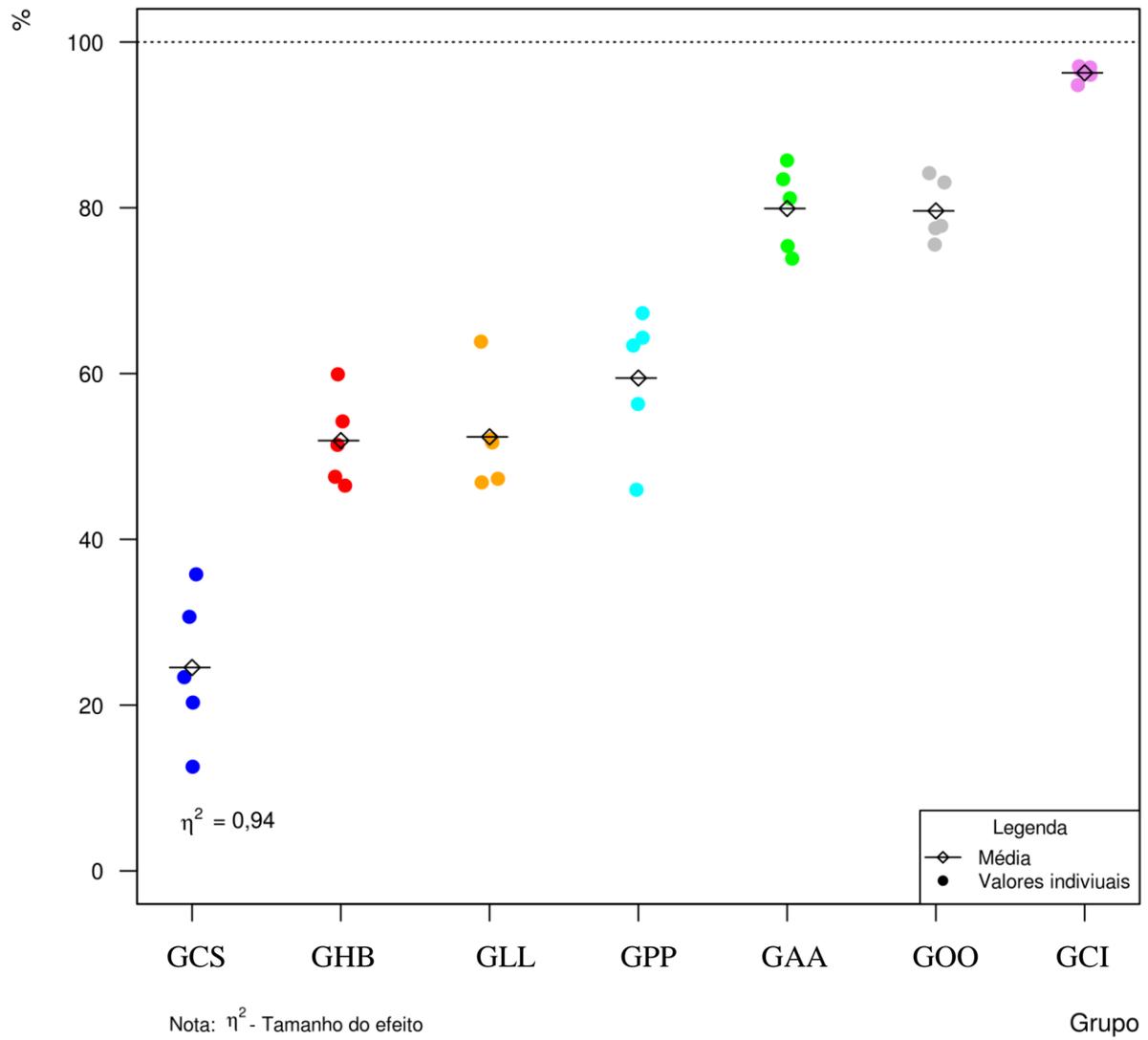


Tabela 10 - Médias (desvios padrão) da porcentagem de matriz osteoide neoformada aos 120 dias

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

Tabela 11 - Comparação múltipla 2 a 2 com o GCS por meio do teste de Dunnett – 120 dias

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

Tabela 12 - Comparação múltipla dos grupos GLL, GPP, GAA e GOO por meio do teste de Tukey – 120 dias

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

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

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

Aos 45 dias, novamente, observou-se uma maior porcentagem de matriz osteoide linearmente formada no defeito nos grupos implantados com os biomateriais experimentais com conteúdo de zinco, GAA (79,9%) e GOO (69,96%), seguidos dos grupos sem conteúdo de zinco, GLL (60,74%) e GPP (54,93%). Os grupos GHB (40%) e GCS (19%) mostraram as menores porcentagens (Tabela 14).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

No ponto biológico de 15 dias, este parâmetro foi superior em GCS (95%), seguido do GHB (41%). Dentre os grupos implantados com os biomateriais experimentais, os sem conteúdo de zinco apresentaram porcentagem de tecido conjuntivo fibroso inferior a 30%, GLL 22% e GPP 29%, e com conteúdo de zinco inferior a 20%, GAA 18% e GOO 16%, de acordo com a Tabela 16.

Aos 45 dias, persistiram os resultados de maior porcentagem de tecido conjuntivo fibroso em GCS (42%) e GHB (42%). Dentre os demais grupos implantados, as maiores porcentagens ocorreram nos grupos sem conteúdo de zinco, GLL (20%) e GPP (11%), seguidos dos grupos com conteúdo de zinco, GAA (11%) e GOO (8%) (Tabela 17).

Aos 120 dias, novamente, a maior porcentagem de tecido conjuntivo fibroso ocorreu no GCS (20%). Dentre os demais grupos implantados, manteve-se a maior porcentagem para o GHB (14%), seguido dos grupos sem conteúdos de zinco, GLL (12%) e GPP (10%), com os menores resultados para os grupos com conteúdo de zinco, GAA (5%) e GOO (6%) (Tabela 18).

O GCI apresentou valores inferiores a 0,1% de tecido conjuntivo fibroso na área correspondente ao defeito crítico em todos os pontos biológicos.

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

Grupo	Mediana (%)	Intervalo interquartílico (%)	[Mínimo- Máximo] (%)
GLL	22	5,5	[20,1 – 27,5]
GPP	29	5,9	[24,8 – 34,7]
GAA	18	2,4	[12,6 – 20,5]
GOO	16	3,0	[13,7–19,6]
GHB	41	3,2	[35,5 – 45,4]
GCS	95	0,3	[94,8 – 96,5]
GCI	< 0,1%	–	–

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.1.1. Espessura do reparo e da calvária íntegra

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

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

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

Tabela 22 - Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 15 dias

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

Tabela 23 - Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 45 dias

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

Tabela 24 - Medianas e intervalos interquartílicos da espessura do reparo e da calvária íntegra na região do defeito ósseo crítico aos 120 dias

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

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Esta porosidade intragranular possivelmente interferiu de forma positiva no aumento da área superficial das partículas dos diferentes biomateriais sintéticos experimentais (PADILLA *et al.*, 2015) que, previamente à implantação, eram similares às da hidroxiapatita bovina, na faixa de 40 a 60m²/g. Apesar de estes parâmetros não terem sido mensurados, é de se esperar que tenham influenciado nas reações tissulares desencadeadas pelo contato biomaterial-célula-matriz extra celular e, conseqüentemente, contribuído para um aumento da bioatividade destes novos compostos.

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

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

A presença dos biomateriais no leito ósseo desencadeou uma reação inflamatória crônica, do tipo granulomatosa, com a presença de células gigantes visualizadas especialmente próximas às partículas, que contribuiu de forma positiva para a metabolização dos biomateriais, e possibilitou a reabsorção desses (BARRETO, 2011; GARRIGUES *et al.*, 2005; ROLIM 2010, 2013; TRAINI, *et al.*, 2007).

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

Estas reações continuaram no decorrer do tempo que, embora não tenha sido considerado uma variável neste estudo, ao compararmos a porcentagem de

partículas presentes na área do reparo entre os diferentes pontos biológicos dos grupos implantados com os mesmos biomateriais, podemos inferir que a metabolização resultante da solubilização, da degradação e da ação de células gigantes, ocorreu de forma expressiva em todos os grupos e de forma contínua pelos pontos biológicos avaliados, em especial, nos grupos com conteúdo de zinco GAA e GOO, seguramente, devido à elevada bioatividade deste elemento, biodisponibilizado de forma lenta e contínua logo após sua implantação.

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

A escolha da faixa granulométrica também colaborou para a modulação da reação inflamatória. Partículas muito diminutas, capazes de exacerbar a reação inflamatória, foram removidas ao selecionarmos, previamente à implantação, uma faixa de tamanho de partículas de 0,4 a 0,6mm (CAMPOS; ROSA, 2012).

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

Além da presença de poros intragranulares característicos dos biomateriais, a proximidade entre as partículas formou poros intergranulares bastante irregulares em consequência das diferentes formas das partículas e de seu arranjo tridimensional. Esta conformação foi de extrema importância para a formação de poros interconectados, que permitiram a angiogênese responsável pela nutrição e pelas trocas metabólicas dos enxertos (KLENKE *et al.*, 2008), além do

entrelaçamento de fibras colágenas, visualizado em todos os grupos implantados, que se manteve presente em todos os pontos biológicos avaliados.

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

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

A conformação das fibras colágenas também influenciou na caracterização do defeito. Dentro deste parâmetro, foi possível confirmar a realização do defeito crítico quando no GCS houve a formação de tecido conjuntivo fibroso por praticamente todo o reparo e em todos os pontos biológicos avaliados, além de termos observado uma grande redução da sua espessura nos três pontos biológicos (15 dias com 0,50mm; 45 dias com 0,40mm; 120 dias com 0,20mm) em relação às bordas ósseas, com outros estudos que corroboram estes resultados (BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; CAMPOS; ROSA 2012; MIGUEL, 2008; ROLIM, 2013).

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

Ainda que estes fatores tenham limitado o reparo, ocorreu, no GCS, uma pequena formação de matriz osteoide desencadeada, provavelmente, pela reação inflamatória deflagrada pelo trauma cirúrgico, que conferiu um aumento da

vascularização na região das bordas ósseas, com liberação de citocinas e fatores de crescimento neste microambiente (CARANO; FILVAROFF, 2003). Esta neoformação óssea, todavia, ocorreu de modo insuficiente para a completa regeneração do defeito crítico (BARRETO, 2011; CAMPOS, 2012; MIGUEL, 2008; ROLIM, 2013).

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

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

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

Esta evidência corrobora a importância da disponibilização contínua de íons bioativos como o cálcio, o fósforo, o silício e o zinco, desde o primeiro momento após a implantação, propiciada por biomateriais de alta solubilidade, como a monetita, o fosfato de cálcio amorfo e o gel de sílica (IDOWU *et al.*, 2014; MURPHY *et al.*, 2009; PADILLA *et al.*, 2015; ROETMAN *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2015). A hidroxiapatita bovina, por sua vez, apenas possibilitou a formação de um arcabouço

estável ao reparo ósseo, sem uma maior bioatividade inicial (CAMPOS; ROSA, 2012; CHACKARTCHI *et al.*, 2011; VOLKOV *et al.*, 2010).

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

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

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

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

A influência da hidroxiapatita no tecido em regeneração foi também importante na manutenção da osseointegração observada ao redor das partículas de todos os biomateriais (SUCHANEK, YOSHIMURA, 1998; THORWARTH *et al.*, 2005) e ainda otimizada pela presença de silício proveniente do gel de sílica, liberado quando de sua dissolução, em todas as formulações LL, PP, AA e OO (BOCCACCINI, 2011; HOPPE; GÜLDAL; JONES, 2013).

Apesar de muitos estudos indicarem um potencial osteoindutivo de compostos à base de monetita, de silício e de zinco, (GONZÁLEZ-VASQUES; HABIBOVIC *et al.*, 2008; IDOWU *et al.*, 2014; PLANELL; ENGEL, 2013), não nos foi possível concluir esta afirmação. Para isso, o local de implantação deveria ser outro, que não oferecesse um ambiente osteogênico, mas podemos inferir que todos os biomateriais, apesar de serem totalmente inorgânicos, possuem facilidade de adsorção de proteínas específicas que permitiram o crescimento e o contato com a nova matriz osteoide de forma contínua nos pontos biológicos avaliados (ALBREKTSSON; JOHANSSON, 2001; SUH *et al.*, 2001).

Assim, com a metodologia empregada neste trabalho, foi possível constatar que todas as formulações experimentais ora avaliadas formaram arcabouços porosos, biocompatíveis, biodegradáveis, com estabilidade suficiente para que ocorresse a osteocondução observada, favoreceram a formação de tecido ósseo de forma integrada às suas partículas e com a proliferação de novos vasos, com resultados osteogênicos superiores nos grupos com conteúdo de zinco, em especial, no grupo GOO.

Embora este estudo contemple os pontos biológicos de 15, 45 e 120 dias, para a análise estatística o tempo não foi considerado uma variável, em virtude de os animais terem sido mortos ao final dos períodos propostos. Isto constituiu uma limitação metodológica deste trabalho, uma vez que os animais não foram controles deles mesmos. Entretanto, devido à reduzida variabilidade genética dos animais, podemos inferir que estes resultados refletiram uma continuidade do processo de reparo do tecido ósseo com o uso de biomateriais, observada com a evolução da regeneração óssea do primeiro até o último ponto biológico.

Sob esta ótica, todos os biomateriais sintéticos experimentais tiveram uma taxa de reabsorção variável, de acordo com a sua formulação, e adequada à

neoformação óssea, e a melhor relação entre a metabolização do biomaterial e neoformação óssea foi encontrada no GOO. Este resultado provavelmente ocorreu devido a um aprimoramento das quantidades de monetita, hidroxiapatita, e fases amorfas de fosfato de cálcio e sílica, além do zinco, que influenciou de forma marcante a estimulação da osteogênese neste modelo de defeito ósseo crítico.

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

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

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

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

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Todas as formulações dos biomateriais sintéticos experimentais formaram bons arcabouços, biocompatíveis e osteocondutores.
- Os resultados osteogênicos obtidos com as implantações dos biomateriais sintéticos experimentais, nas formulações sem conteúdo de zinco, LL e PP, foram superiores aos obtidos com a implantação da hidroxiapatita bovina (Bio-Oss[®]) nos pontos biológicos de 15 e 45 dias, e similares no ponto biológico de 120 dias.
- A associação do zinco à monetita configurou uma maior biodisponibilidade deste íon, e potencializou a osteogênese nos arcabouços formados pelos biomateriais nas formulações AA (Sil-Oss[®]) e OO, com resultados superiores às formulações LL e PP, e à hidroxiapatita bovina (Bio-Oss[®]), em todos os pontos biológicos avaliados.
- As formulações AA (SilOss[®]) e OO produziram resultados similares na porcentagem de área do defeito preenchido por nova matriz osteoide, sem diferenças estatisticamente significantes, nos três pontos biológicos avaliados.
- A formulação OO foi capaz de manter um arcabouço tridimensional mais estável e melhor associou osteogenicidade, biodegradabilidade e manutenção do arcabouço na regeneração de defeito ósseo crítico em calvária de rato, nos três pontos biológicos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ACCORSI-MENDONÇA, T. *et al.* Physicochemical characterization of two deproteinized bovine xenografts. **Braz. oral res.**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 5-10, 2008.
- ACCORSI-MENDONÇA, T. *et al.* Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. **J. materials sci.**, London, v. 22, n. 4, p. 997-1004, 2011.
- ALBREKTSSON, T.; JOHANSSON, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur. spine.**, Heidelberg, v. 10, p. 96-101, 2001.
- ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Semin. immunol.**, Philadelphia, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.
- ANDIA, D. C.; CERRI P, S.; SPOLIDORIO, L. C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Rev. odontol. UNESP**, Araraquara, v. 35, n. 2, p. 191-198, 2006.
- ANDRADE, A. D. *et al.* Biologia óssea: uma revisão da literatura. **ImplantNews**, São Paulo, v. 4, n. 6, p. 659-662, 2007.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 121, n. 7, p. 667-668, 2000.
- ARCOS, D.; VALLET-REGI, M. Sol-gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration. **Acta biomater.**, Oxford, v. 6, p. 2874-2888, 2006.
- ARTZI, Z. *et al.* Qualitative and quantitative expression of bovine bone mineral in experimental bone defects. Part 2: Morphometric analysis. **J. periodontol.**, Indianapolis, v. 74, n. 8, p. 1153-1160, 2003.
- AZUREBIO SL. Madrid, [s.n], 2015.
- BHATT, R. A.; ROZENTAL, T. D. Bone Graft Substitutes. **Hand. clin.**, Philadelphia, v. 28, p. 457-468, 2012.
- BARONE, A. *et al.* A prospective, randomized, controlled, multicenter evaluation of extraction socket preservation comparing two bovine xenografts: clinical and histologic outcomes. **Int. j. periodontics restor. dent.**, Chicago, v. 33, n. 6, p. 795-802, 2013.
- BARRETO, I. C. **Utilização de ranelato de estrôncio associado a biometrias para regeneração óssea.** 2011. 176f. Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- BELLIDO, T. Osteocyte-Driven Bone Remodeling. **Calcif. tissue int.**, New York, v. 94, n. 1, p. 25-34, 2014.

BEST, S. M. *et al.* Bioceramics: Past, present and for the future. **J. eur. ceramic. society**, Barking, v. 28, p.1319-1327, 2008.

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

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

BOSSHARDT, D. D. *et al.* Maxillary sinus grafting with a synthetic, nanocrystalline hydroxyapatite-silica gel in humans: histologic and histomorphometric results. **Int. j. periodontics restor. dent.**, Chicago, v. 34, n. 2, p. 259-267. 2014.

CALASANS-MAIA, M. *et al.*, Short-term in vivo evaluation of zinc-containing calcium phosphate using a normalized procedure. **Mater. sci. eng.**, Amsterdam, v. 41, p. 309-319, 2014.

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

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

CANCEDDA, R.; GIANONNI, P.; MASTROGIACOMO, M. Biomaterials: review tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. **Biomaterials**. Amsterdam, n. 28, p. 4240-4250, 2007.

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

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

CATAURO, M. T *et al.* Synthesis of SiO₂ and CaO rich calcium silicate systems via sol-gel process: Bioactivity, biocompatibility, and drug delivery tests. **J. biomed. mater. res. part. A**, Hoboken, v. 101, p. 1-6, 2013.

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

CHOU, J. *et al.* Effect of biomimetic zinc-containing tricalcium phosphate (Zn-TCP) on the growth and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. tissue eng. Regen. med.**, Chichester, v. 9, n. 7, p. 852-858, 2015.

- COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. Hillsdale- NJ: Erlbaum, 1988.
- CONZ, M. B.; GRANJEIRO, J. M.; SOARES, G. A. Hydroxyapatite crystallinity does not affect the repair of critical size bone defects. **J. appl. oral sci.**, Bauru, v. 19, n. 4, p. 337-342, 2011.
- CORDARO, L. *et al.* Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicentre clinical trial. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 19, n. 8, p. 796-803, 2008.
- DALAPICULA, S. S. *et al.* Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **ImplantNews**, São Paulo, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.
- DAHLIN, C; JOHANSSON, A. Iliac crest autogenous bone graft versus alloplastic graft and guided bone regeneration in the reconstruction of atrophic maxillae: A 5-year retrospective study on cost-effectiveness and clinical outcome. **Clin. implant. dent. relat. res.**, Malden, v. 13, n. 4, p. 305-310, 2011.
- DE AZA, P. N.; DE AZA, A. H.; DE AZA, S. Bioactive glasses and glass-ceramics. **Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio.**, Madrid, v. 44, n. 3, p.135-145, 2005.
- DEGIDI, M. *et al.* Microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in sinus augmentation using Bio-Oss. **Oral dis.**, Houndmills, v. 12, n. 5, p. 469-475, 2006.
- DIETMAR, W. H.; GARCIA, A. J. Scaffold-based bone engineering by using genetically modified cells. **Gene**, Amsterdam, v. 347, n.1, p.1-10, 2005.
- DOROZHUKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, Guildford, v. 31, p. 1465-1485, 2010.
- FLECKENSTEIN, K. B. *et al.* Effect of a hydroxyapatite tricalcium phosphate alloplast on osseous repair in the rat calvarium. **J. periodontol.**, Chicago, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.
- GALINDO-MORENO, P. *et al.* Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 18, n. 3, p. 376-382, June 2007.
- GARCÍA DE CASTRO, A. *et al.* Osseous regeneration material from combinations of monetite with other bioactive calcium compounds. **WO2010/092001 A1** (Patent) Madrid, 2010.
- GARRIGUES, G.E. *et al.* Gene expression clustering using self-organizing maps: analysis of the macrophage response to particulate biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 26, n. 16, p. 2933-2945, 2005.

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

GONZÁLEZ-VASQUES, A.; PLANELL, A.; ENGEL, E. Extracellular calcium and CaSR drive osteoinduction in mesenchymal stromal cells. **Acta biomater.**, Kidlington, v. 10, n. 6, p. 2824-2833, 2014.

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

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

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

HALL, S. L.; DIMAI, H. P.; FARLEY, J. R. Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity in vitro. **Calcif. tissue int.**, New York, v. 64, p.163-172, 1999.

HING, K. A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? **Philos. Trans. R. Soc. Lond. Series A**, London, v. 362, n. 1825, p. 2821-2850, 2004.

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

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

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

ITO, A. *et al.* Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation. **Mater. sci. eng., C, Biomim. mater., sens. syst.**, Lausanne, v. 22, n.1, p. 21-25, Oct. 2002.

JENSEN, T. *et al.* Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 24, n. 6, p.635-644, 2013.

JONES, J. R. Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta biomater.**, Oxford, v. 9, n.1, p. 4457-4486, 2013.

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

- KIM, S. S. *et al.* Poly (lactide-co-glycolide)/ hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, Guildford, v. 27, n. 8, p. 1399-1409, 2006.
- KLAMMERT, U. *et al.* Cytocompatibility of brushite and monetite cell culture scaffolds made by three-dimensional powder printing. **Acta biomater.**, Oxford, v. 5, p. 727-734, 2009.
- KLENKE, F. M. *et al.* Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. **J. biomed. mater. res. A**, Hoboken, v. 85, n.3, p. 777-786, 2008.
- KOKUBO, T.; KIM, H.; KAWASHITA, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials**, Guilford, v. 24, n. 13, p. 2161-2175, 2003.
- KRUSE, A. *et al.* Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide -based and a xenogeneic hydroxyapatite-based bone substitute material. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 22, n. 5, p. 506-11, 2011.
- KURELLA, A.; DAHOTRE, N.B. Review paper: Surface Modification for Bioimplants: The Role of Laser Surface Engineering. **J. biomater. appl.**, Lancaster, v. 20, p. 5-50, 2005.
- LEE, D. Z.; CHEN, S. T.; DARBY, I. B. Maxillary sinus floor elevation and grafting with deproteinized bovine bone mineral: a clinical and histomorphometric study. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 23, n. 8, p. 918-924, 2012.
- LEGEROS, R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. **Clin. orthop. related. res.**, Philadelphia, v. 395, p. 81-98, 2002.
- LI, B.; LIU, H.; JIA, S. Zinc enhances bone metabolism in ovariectomized rats and exerts anabolic osteoblastic/adipocytic marrow effects ex vivo. **Biol. trace elem. res. biol.**, London, v. 163, n.1-2, p. 202-207, 2015.
- LI, H. Y. *et al.* Bio-Oss[®] for delayed osseointegration of implants in dogs: a histological study. **Br. j. oral maxillofac.surg.**, Edinburgh, v. 52, n. 8, p. 729-734, 2014.
- LIM, S. C. C.; LEE, M. J.; YEO, H. H. Effects of various implant materials on regeneration of calvarial defects in rats. **Pathol. inter.**, Oxford, v. 50, n. 8, p. 594-602, 2000.
- LIND, M. *et al.* Stimulating Bone Healing. Critical Reviews, **TM. phys. rehabil. med.**, Chicago, v.12, p. 313-343, 2000.
- LINDHE, J. *et al.* Ridge preservation with the use of deproteinized bovine bone mineral. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 25, n. 7, p. 786-90, 2014.
- LU, X.; LENG, Y. Theoretical analyses of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, p. 1097-108, 2005.

LONG, P. H. Medical devices in orthopedic applications. **Toxicol. pathol.**, Thousand Oaks, v. 36, n.1, p. 85-91, 2008.

LUTZ, R. *et al.* Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 26, n. 6, p. 644-648, 2015.

MAENO, S. *et al.* The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. **Biomaterials**, Guilford, v. 26, n. 23, p. 4847-4855, 2005.

MAH, J. *et al.* The efficacy of various alloplastic bone grafts on the healing of rat calvarial defects. **Eur. j. orthod.**, London, v. 26, n. 5, p. 475-482, 2004.

MARIE, P, J. The calcium-sensing receptor in bone cells: a potential therapeutic target in osteoporosis. **Bone**, New York, v. 46, n. 3, p. 571-576, 2010.

MASTRANGELO, F. *et al.* A comparison of bovine bone and hydroxyapatite scaffolds during initial bone regeneration: an in vitro evaluation. **Implant. dent.**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 613-622. 2013.

MENDONÇA, T. A. **Caracterização físico-química e análise histológica do potencial osteocondutor de diferentes implantes xenogênicos no reparo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de ratos (*Rattus norvegicus*)**. 2005. 111 f. Dissertação(Mestrado) - Faculdade de Odontologia de São Paulo, Bauru, 2005.

MIGUEL, F. B. **Avaliação do potencial osteogênico de matrizes tridimensionais colagênicas aniônicas, reticuladas ou não em glutaraldeído, na regeneração de defeitos críticos, em calvária de rato**. 2008.158f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MIGUEL, F. B. *et al.* Morphological assessment of the behavior of threedimensional anionic collagen matrices in bone regeneration in rats. **Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 78, n. 2, p.334-339, 2006.

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

MONTAZEROLGHAEM, M. *et al.* Resorption of monetite calcium phosphate cement by mouse bone marrow derived osteoclasts. **Mater sci. eng. C mater boil. appl.**, Amsterdam, v. 52, p. 212-218, 2015.

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

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

MOTAMEDIAN, S. R. *et al.* Smart scaffolds in bone tissue engineering: A systematic review of literature. **World J. Stem Cells.**, Pleasanton, v. 7, n. 3, p.657-668, 2015.

MURPHY, S. *et al.* The effect of composition on ion release from Ca-Sr-Na-Zn-Si glass bone grafts. **Mater sci. mater. med.**, London, v. 20, n. 11, p. 2207-2214, 2009.

OONISHI, H. *et al.* Comparative bone ingrowth behavior in granules of bioceramic material of various sizes. **J. biomed. mater. res. A**, Hoboken, v. 44, p. 31-43, 1999.

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

PAKNEJAD, M. *et al.* Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: a histological and histomorphometric study of rabbit calvaria. **J. dent.**, Tehran, v. 11, n. 6, p. 687-695, 2014.

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

POINERN, G. E. *et al.* Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. **Ultrason. sonochem.**, Amsterdam, v. 16, p. 469-474, 2009.

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

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

REFFITT, D. M. *et al.* Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. **Bone**, New York, v. 32, n. 2, p. 127-135, 2003.

RIBEIRO, C. **Processamento e caracterização de cerâmicas a base de hidroxiapatita e fosfato-tricálcico.** 2003. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear- Materiais) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Nucleares, São Paulo, 2003.

RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology. **Braz. j. med. biol. res.**, Ribeirão Preto, v. 36, n. 8,p. 1027-1036, 2003.

ROETMAN, B. *et al.* Microvascular response to calcium phosphate bone substitutes: an intravital microscopy analysis. **Langenbecks arch surg.**, Germany, v. 395, n. 8, p. 1147-1155, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20213461>>. Acesso em: 15 maio 2015. DOI: 10.1007/s00423-010-0608-3

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

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

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

SCHMITT, C. M. *et al.* Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. **Clin. oral implants res.**, Copenhagen, v. 24, n. 5, p. 576-585, 2012.

SCHMITZ, J. P.; HOLLINGER, J. O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. **Clin. orthop. relat. res.**, New York, n. 205, p. 299-308, 1986.

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

SHEN, X. *et al.* Regulation of the biological functions of osteoblasts and bone formation by Zn-incorporated coating on microrough titanium. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, Washington, v. 6, n. 18, p.16426-16440, 2014.

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

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

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

TAMIMI, F. *et al.* Bone regeneration in rabbit calvaria with novel monetite granules. **J. biomed. mater. res. A**, Hoboken, v. 87, n. 4, p. 980-985, 2008.

TAMIMI, F. *et al.* Minimally invasive maxillofacial vertical bone augmentation using brushite based cements. **Biomaterials**, Amsterdam, n. 30, p. 208-216, 2009.

TAMIMI, F. *et al.* Resorption of monetite granules in alveolar bone defects in human patients. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 31, n. 10, p. 2762-2769, 2010.

TAMIMI, F. *et al.* The effect of autoclaving on the physical and biological properties of dicalcium phosphate dihydrate bioceramics: brushite vs. monetite. **Acta biomater.**, Oxford, v. 8, n. 8, p.3161-3169, 2012.

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

TORRES, J. *et al.* Vertical bone augmentation with 3D-synthetic monetite blocks in the rabbit calvaria. **J. clin. periodontal.**, Malden, v. 38, n.12, p. 1147-1153, 2011.

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

TORRONI, A. Engineered Bone Grafts and Bone Flaps for Maxillofacial Defects: State of the Art. **J. oral maxillofac. surg.**, Philadelphia, v. 67, p. 1121-1127, 2009.

TRAINI, T. *et al.* A histologic and histomorphometric evaluation of anorganic bovine bone retrieved 9 years after a sinus augmentation procedure. **J. periodontal.**, Chicago, v. 78, n. 5, p. 955-961, 2007.

TURHANI, D. *et al.* Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules. **J. oral maxillofac. surg.**, Philadelphia, v. 65, p. 485-493, 2007.

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

VOLKOV, V. *et al.* Regeneration of Skull Bones in Adult Rabbits after Implantation of Commercial Osteoinductive Materials and Transplantation of a Tissue-Engineering Construct. **Bull. exp. biol. med.**, New York, v. 149, n. 2, p. 505-510, 2010.

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

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 30, p. 5897-5909, 2009.

YAMAGUCHI, M. Role of zinc in bone formation and bone resorption. **J. trace elem. exp. med.**, New York, v. 11, p.119-35, 1998.

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

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

ANEXO



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

Ofício: 07/2012

Feira de Santana, 21 de março de 2012

DE: Eraldo Medeiros Costa Neto
Coordenador da CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa

Prezada Senhora,

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

Atenciosamente,

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

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

PARECER

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

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

1- DO PROJETO

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

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

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

2- DA FOLHA ROSTO

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

3- DO PROTOCOLO

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

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

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

PARECER FINAL

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

Feira de Santana, 26 de dezembro de 2011

IRACI GOMES BONFIM



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

Ofício: 03/2013

Feira de Santana, 30 de janeiro 2013.

DE: Iraci Gomes Bonfim
CEUA/UEFS

PARA: Fabiana Paim Rosa

Prezada Senhora,

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

Atenciosamente,



Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora em exercício na CEUA-UEFS