DANIEL FALBO MARTINS DE SOUZA

O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos

São Paulo
2015

DANIEL FALBO MARTINS DE SOUZA

O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais

Orientador: Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni

São Paulo

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Souza, Daniel Falbo Martins de.

O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos / Daniel Falbo Martins de Souza ; orientador Maria Cristina Zindel Deboni.

-- São Paulo, 2015.

74 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofaciais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Regeneração óssea. 2. Ratos Wistar. 3. Fosfato. 4. Cálcio. I. Deboni, Maria Cristina Zindel. II. Título.

Souza DFM. O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*À minha esposa Francèle Monguilhott Falbo e ao meu filho
Enzo Monguilhott Falbo Martins de Souza, vocês tornam real o
sentido da palavra família, onde encontro o meu porto segu-
ro...*

Amo vocês muito e para sempre...

Meus "amorinhos"...

*À minha mãe Zuleika Falbo Martins, você me deu a vida e o amor
incondicional... me ensinou os verdadeiros
valores da família...*

Obrigado por estar sempre ao meu lado...Te amo...

*À minha irmã Christiane, o mais importante e belo elo com a
minha história, desde a mais tenra infância...Te amo...*

*Ao meu avô Délio da Rosa Martins (em memória), minha figura
paterna de honra, caráter e ética... À minha avó Aida Falbo
Martins (em memória), que saudades do seu colo
e das nossas conversas...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, o Grande Arquiteto do Universo, que ilumina o meu caminho diariamente com sua infinita sabedoria.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cristina Zindel Deboni, professora associada da Disciplina de Cirurgia Odontológica e Buco Maxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; por ter me orientado com sabedoria e paciência. Agradeço principalmente por me apoiar e incentivar, com firmeza nos momentos de extrema dificuldade.

À Profa. Dra. Maria da Graça Naclério-Homem, professora associada da Disciplina de Cirurgia Odontológica e Buco Maxilo Facial, Responsável pela área de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais do Programa Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da FOU SP; pela oportunidade de cursar um dos mais respeitados Cursos de Doutorado da nossa especialidade e por me acolher tão generosamente.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa, professora doutora da Disciplina de Patologia Geral da FOU SP; pela dedicação no auxílio da interpretação das lâminas histológicas.

Aos professores da disciplina de Cirurgia Odontológica e Buco Maxilo Facial: Prof. Dr. Marcos Vianna Gayotto, Profa. Dra. Marina Cleia Palo Prado, Prof. Dr. Fernando Melhem Elias e Profa. Dra. Andréia Aparecida Traina Hanna, Prof. Dr. José Luiz Piratininga; por todo o aprendizado.

À Professora Vera Regina Pozzani, pela amizade e pelo importante aprendizado na área da medicina.

À minha amiga Mariana Brozowski, que tenho o prazer de conviver desde os tempos da Santa Casa de São Paulo, e quem muito me incentivou a ingressar no Doutorado.

Aos meus amigos Daniel Isaac Sendyk e Rafael Augusto Burim, que participaram de todas as etapas deste trabalho, e cuja amizade e motivação, foram essenciais para sua concretização.

Aos amigos da pós-graduação, Júlio Leonardo Oliveira Lima, Alexandre Borba, Ana Carolina Junqueira, Gabriel Franchin, Michelle Bianchi, Fabiana Ferreira Alves, Marcello Roberto Manzi, Matheus Furtado de Carvalho e Rubens Camino Junior, pela excelente convivência e pela amizade.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia, Aparecida Conceição de Souza, Edison Henrique Vicente, Natália Conceição Afonso e Roseli de Andrade, pela dedicação e amparo em todas as nossas atividades no Departamento.

À Simone Gomes Ferreira, técnica de laboratório do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP, pela aquisição das imagens microtomográficas do nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Jorge Vicente Lopes da Silva, Pesquisador e Coordenador da Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer – CTI, por permitir a análise e reconstrução das imagens microtomográficas do nosso trabalho.

Ao Paulo Henrique Junqueira Amorim, Analista de Sistemas do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer – CTI, pela análise e reconstrução das imagens microtomográficas do nosso trabalho.

Ao Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela diagramação e revisão desta tese.

À família Monguilhott, representada pelo meu sogro Janilton, minha sogra Elizabeth minhas cunhadas Dayana, Luana e meu querido afilhado Vinícius pelo amor e apoio constantes.

À família Borgerth, representada pelo meu cunhado Marcelo, minha irmã Christiane e minha querida afilhada Pietra, pelo carinho e compreensão nesses momentos de ausência para a concretização deste trabalho.

Ao meu pai Ismael Alves de Souza e minha avó Maria Furgeri, pelas orações, apoio e carinho.

Ao meu grande amigo e padrinho Dr. Eduardo Vasques da Fonseca, Chefe do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais do Conjunto Hospitalar do Mandaqui, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; pelo apoio incondicional permitindo a minha ausência, em alguns momentos, neste respeitado Serviço, para a realização deste trabalho.

Aos residentes e ex-residentes do Serviço de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Faciais do Conjunto Hospitalar do Mandaqui: Vinicius Teixeira, Bruna Caroline, Eduardo Isomura, Glaucia Faro, Leandro Scomparin, Nickolas Mendes, Rodrigo Bracco, Gabriel Baldasserin, Nilo Alves e Mariana Chagas; por entenderem a minha ausência em muitos momentos do curso, para a finalização deste importante trabalho.

Aos meus irmãos da Loja Luiz Gama (0464) do GOSP, pelos seus eflúvios positivos constantes e principalmente por compreenderem e apoiarem a minha ausência nesses três anos de curso.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na elaboração desta tese.

“... combater o despotismo, a ignorância, os preconceitos e os erros...glorificar a verdade e a justiça... promover o bem estar da pátria e da humanidade, levantando templos à virtude e cavando masmorras ao vício.”

GOB REAA

RESUMO

Souza DFM. O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseos críticos em calvária de ratos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Nos defeitos bucomaxilofaciais, a intervenção cirúrgica utilizando enxertos ou substitutos ósseos é indicada para reestabelecer a forma e a função perdidas. Nesse contexto, enxertos autógenos e alógenos têm sido substituídos por biomateriais osteocondutores e reabsorvíveis. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de microtomografia e dos aspectos histológicos do reparo ósseo, se um novo cimento bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta, poderia induzir ou conduzir a neoformação óssea em defeitos críticos, produzidos em calvárias de ratos. Foi realizado um defeito crítico de 8mm de diâmetro na calvária de 40 ratos Wistar machos. No grupo teste (n=20) os defeitos foram preenchidos pelo cimento. No grupo controle (n=20) os defeitos não foram preenchidos e permaneceram apenas com o coágulo. Os animais sofreram eutanásia em 7, 14, 21 e 42 dias do pós operatório. Espécimes da região da ferida foram microtomografados e posteriormente as amostras foram preparadas para análise histológica. A análise histomorfológica incluiu a avaliação morfológica da histopatologia do reparo, a avaliação morfométrica da área de formação das trabéculas ósseas comparativamente entre os grupos. Realizamos ainda a coloração com fosfatase tartrato-resistente (TRAP) para identificação de osteoclastos. Os resultados mostraram que os defeitos preenchidos pelo cimento não apresentaram diminuição significativa da área de acordo com a progressão dos períodos pós-operatórios, pelo contrário, em alguns animais, o defeito aparentemente aumentou. A histomorfologia do reparo mostrou agrupamentos mais expressivos de células gigantes no grupo teste sugerindo resposta a corpo estranho e osso neoformado mais maduro no grupo controle. No grupo teste houve permanência do material e resposta corpo estranho até os últimos períodos de observação. Na histomorfometria, a área total de neoformação óssea na região da ferida foi significativamente maior e crescente com o passar do tempo experimental no grupo controle do que no grupo teste. As células gigantes

apresentaram expressão histoquímica positiva para TRAP e não foram identificados osteoclastos. Concluimos que neste modelo de estudo, o cimento cerâmico não induziu ou conduziu a neoformação óssea de defeitos ósseos críticos criados em calvária de ratos sob o ponto de vista microtomográfico e histológico.

Palavras-chave: Regeneração óssea. Ratos Wistar. Cimento Beta Fosfato Tricálcico. Potencial Zeta.

ABSTRACT

Souza DFM. The effect of calcium sulfate and beta-tricalcium phosphate composite with zeta potential control on the healing process of bone critical defects in rats [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Surgical intervention employing grafts and bone substitutes is the best choice in oral and maxillofacial bone defects reconstruction for structural and functional lost. Regarding this, autogenous and alogenuous grafts have been used as osteoconductive and resorbable biomaterials. The aim of this study was to evaluate if a new bone biphasic composite of calcium sulfate and beta tricalcium phosphate with zeta potential control could induce or conduct bone formation in rats' calvarias critical defects model. Forty male Wistar rats underwent 8mm diameter calvaria perforation under general anesthesia. Animals were randomly allocated to group test (n=20), when the defects were filled with the biphasic phosphate and group control (n=20) when the wound was left just with blood clot. Animals underwent euthanasia 7, 14, 21 and 42 days after surgery. Bone calvaria specimens underwent microtomography and histological processing for analysis. Histomorphological and histomorphometry were performed regarding aspects of bone healing evolution and new bone total area within the defect. Additionally, histological samples were tartrate-resistant phosphatase (TRAP) stained for osteoclasts identification. The results showed that defects filled by the composite did not present significant bone formation considering postoperative evolution, on the contrary it seemed that the defect area increased in some animals. The bone repair histomorphology in test-group showed expressive giant cells nests involving the ceramic material suggesting foreign body reaction. A mature bone tissue neoformation was significantly more intense in the control-group. In the test-group the permanence of the exogenous material caused the sustained foreign body reaction until the last observational periods. Histomorphometric analysis showed that in control-group the total area of bone formation was significantly greater and progressive along the experiment than the test-group. Osteoclasts were not identified but the giant cells presented positive reaction to TRAP. It was possible to conclude

that the biphasic ceramic with zeta potential control was not capable to induce or conduct bone neoformation in critical defects created in rats' calvaria.

Keywords: Bone Repair. Wistar rat. Beta Tricalcium Phosphate Cement. Zeta Potential.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 4.1 - Cirurgia Experimental: (A) acesso à calvária do animal, osteotomia e confecção do defeito com broca trefina de 8 mm de diâmetro; (B) remoção do fragmento ósseo e obtenção do defeito ósseo crítico; (C) preenchimento do defeito crítico no Grupo-teste com o cimento beta fosfato tricálcico (geneX®)38
- Figura 4.2 - Imagem do crânio dissecado para ser fixado em formol a 10% para os procedimentos de preparo histológico39
- Figura 4.3 - (A) Aparelho de microtomógrafo SkyScan 100kV; (B) Amostras posicionadas e fixadas à sela do aparelho40
- Figura 4.4 - Fluxograma do processo realizado pelo *Software InVesalius* (Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer)41
- Figura 5.1 - Imagens microtomográficas das calvárias com os defeitos no Grupo Teste e no Grupo Controle nos quatro períodos de estudo (7, 14, 21 e 42 dias)46
- Figura 5.2 - Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “Infiltrado inflamatório” comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p < 0.05$ Teste de Kruskal-Wallis49
- Figura 5.3 - Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “reação a corpo estranho” comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p < 0.05$ Teste de Kruskal-Wallis49
- Figura 5.4 - Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “neoformação óssea” comparativamente entre grupos e períodos de observação. NS – não significativo pelo Teste de Kruskal-Wallis50
- Figura 5.5 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 7 dias em **A** *Grupo Controle* apresenta região do corte do defeito infiltrado inflamatório neutrofilico (asterisco) e área de hemorragia; em **B** *Grupo Teste* com maior quantidade de infiltrado inflamatório e tecido de granulação e agrupamentos de material exógeno (seta). Período de 14 dias em **C** *Grupo Controle* mostrando organização do tecido de granulação (seta) células gigantes e início de neoformação óssea (seta descontinua) em **D** *Grupo Teste* presença de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação, intenso tecido conjuntivo com agrupamentos de material exógeno(seta). Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 10X51

Figura 5.6 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 21 dias em **A Grupo Controle** presença de tecido de granulação organizado e formação de trabéculas ósseas na região do defeito (seta); em **B Grupo Teste** presença de intenso infiltrado inflamatório, células gigantes multinucleadas e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso. Período de 42 dias em **C Grupo Controle** formação de trabéculas ósseas mais maduras na região do defeito (seta); em **D Grupo Teste** presença células gigantes e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso. Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 10X ..52

Figura 5.7 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 7 dias em **A Grupo Controle** apresenta região do corte infiltrado inflamatório neutrofílico sem neoformação óssea expressiva mas com organização de fibras colagênicas (*em azul*) (asterisco); em **B Grupo Teste** com maior quantidade de infiltrado inflamatório e tecido de granulação e agrupamentos de material exógeno. Período de 14 dias em **C Grupo Controle** mostrando organização do tecido de granulação e neoformação óssea imatura (seta) em **D Grupo Teste** presença de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação, e organização de fibras colagênicas (*em azul*) em fibrose dos agrupamentos de material exógeno (seta descontinua). Tricrômio de Masson, aumento original, objetiva 10X53

Figura 5.8 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 21 dias em **A Grupo Controle** presença de tecido de granulação bem vascularizado e formação de trabéculas ósseas maduras e imaturas na região do defeito (seta); em **B Grupo Teste** presença de intenso infiltrado inflamatório, células gigantes multinucleadas e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso colagênico (setas descontínuas). Período de 42 dias em **C Grupo Controle** formação de trabéculas ósseas mais maduras na região do defeito, *em vermelho* (seta); em **D Grupo Teste** presença células gigantes e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso colagênico e áreas de hemorragia (setas). Tricrômio de Masson, aumento original, objetiva 10X54

Figura 5.9 - Representação gráfica dos valores médios das áreas de neoformação óssea comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p < 0.05$ Teste de Kruskal-Wallis55

Figura 5.10 - Cortes histológicos apresentando em A: região do reparo do defeito crítico no período de 42 dias exibindo coleções difusas de material exógeno (seta larga) permeados por tecido fibroso e inflamatório com presença de células gigantes coradas por TRAP (setas finas). Aumento original objetiva 40x. Em B: corte histológico de fêmur de rato com ferida óssea em processo de reparo exibindo osteoclastos corados por TRAP (seta fina). Aumento 40x.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Achados microtomográficos de quatro ratos do Grupo Teste e de quatro ratos do Grupo Controle distribuídos nos quatro períodos de estudo (7, 14, 21 e 42 dias)	45
Tabela 5.2 - Valores das Medianas [Max-Mim] das intensidades dos escores para as variáveis histológicas do defeito ósseo	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HA	hidroxiapatita
HE	hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IPEN	Instituto de Pesquisas Nucleares
kg	quilograma
LIDO	Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia
Max	máximo
Mim	mínimo
Mm	milímetro
mg	miligramas
pH	potencial Hidrogeniônico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
TCP	fosfato tricálcico
TRAP	fosfatase tartrato-resistente
UI	Unidades Internacionais
USP	Universidade de São Paulo
μCT	microtomografia computadorizada
μm	micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento (porcentagem)
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual a
≤	Menor que ou igual a
C	Carbono
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcico
Ca	Cálcio
O	Oxigênio
P	Fósforo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISTA DA LITERATURA	21
2.1 O reparo e a reconstrução de defeitos em tecido ósseo	21
2.1.1 Enxertos ósseos	23
2.1.2 Biomateriais aloplásticos	26
2.1.2.1 <i>Beta fosfato tricálcico</i>	27
2.2 Modelos animais para o estudo de biomateriais	32
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Procedimento cirúrgico experimental	37
4.1.1 Descrição da técnica cirúrgica	37
4.1.2 Pós-operatório	39
4.2 Microtomografia das amostras	40
4.3 Preparo das amostras histológicas	42
4.3.1 Análise histomorfológica	42
4.3.2 Análise histomorfométrica	43
4.3.3 Análise histoquímica para identificação de osteoclastos	43
4.4 Análise dos dados	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Achados microtomográficos	45
5.2 Análise histológica	47
5.2.1 Histomorfologia	47
5.2.2 Achados histomorfométricos	55
5.2.3 Achados histoquímicos	56
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

O enxerto autógeno ainda é o material de escolha para a maioria das grandes perdas de tecido ósseo, no entanto o aumento no tempo operatório, o traumatismo cirúrgico e as possíveis complicações inerentes à abordagem da área doadora nem sempre o tornam viável. Além de atuar como um importante material osteogênico e osteocondutor, o osso autógeno apresenta propriedade osteoindutora pela sua celularidade e suas características orgânicas. Para reconstruções maiores, onde os defeitos abrangem extensos espaços dos maxilares, há exigência de áreas doadoras extra-orais. As desvantagens associadas a este tipo de enxerto estão relacionadas à necessidade de um segundo leito cirúrgico.

Neste contexto, o desenvolvimento de novos biomateriais e substâncias que possam imitar as características inerentes ao tecido ósseo autógeno tem sido uma busca constante da bioengenharia. Diversos biomateriais têm apresentado índices de sucesso variáveis que dependem da técnica empregada, do tipo de material, de suas características físico-químicas e de seus potenciais de estimulação de crescimento do tecido ósseo. Cada novo biomaterial que é desenvolvido e lançado no mercado tenta acrescentar fatores ou tratamentos estruturais, bioquímicos e físico-químicos que favoreçam suas propriedades biológicas.

Dentre os materiais aloplásticos mais utilizados na atualidade encontram-se as biocerâmicas, principalmente a hidroxiapatita e o beta fosfato tricálcico. Este, apresenta uma biodegradação mais rápida que a hidroxiapatita e que em algumas situações pode ser uma característica mais vantajosa como biomaterial, principalmente quando não há requisição de resistência mecânica. Além disso, o beta fosfato tricálcico tem sido muito utilizado como biomaterial carreador ou arcabouço em engenharia tecidual com grandes vantagens (Polo et al., 2013).

Recentemente, um material bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com carga de superfície negativa, denominada controle de potencial zeta, foi lançado no mercado com a proposta de tornar esta biocerâmica um substituto ósseo indutivo e assim favorecer a regeneração óssea (Biocomposites, 2014).

A literatura é escassa sobre a análise do comportamento biológico deste novo biomaterial no reparo ósseo. Desta forma uma proposta de um estudo in vivo, em modelos de defeito ósseo crítico, poderia contribuir para analisar o seu real potencial osteoindutor.

2 REVISTA DA LITERATURA

Devido a complexidade do estudo, a descrição da revista da literatura foi efetuada em tópicos.

2.1 O reparo e a reconstrução de defeitos em tecido ósseo

O tecido ósseo é uma estrutura em constante renovação, que se desenvolve em decorrência da atividade dos osteoblastos (aposição óssea) e dos osteoclastos (reabsorção óssea), e que possui grande capacidade de remodelação (Dempster, 1999; Schindeler et al., 2008).

Células-tronco osteoprogenitoras mesenquimais estimuladas por fatores de crescimento e de transcrição se diferenciam dando origem aos osteoblastos, que são células ricas em fosfatase alcalina (enzima essencial para a mineralização da matriz), envolvidas na deposição e na calcificação da matriz colágena extracelular, e responsáveis pela síntese do colágeno tipo I (90% da matriz orgânica) e pela produção de outras proteínas não colagênicas (por exemplo, sialoproteína óssea, osteopontina, osteonectina, osteocalcina, proteínas morfogenéticas ósseas, proteoglicanas, entre outras). Osteoblastos estimulados liberam fatores, como a osteoprotegerina, que levam à ativação da reabsorção óssea pelos osteoclastos, que são células multinucleadas derivadas dos monócitos, que chegam ao tecido ósseo por diapedese, onde se fundem para produzir um microambiente ácido capaz de reabsorver o tecido mineral (McSheehy; Chambers, 1986; Marx; Garg, 1998; Klein et al., 2003).

Assim como a osteogênese, também o reparo de tecido ósseo danificado depende fundamentalmente dos osteoblastos e dos osteoclastos.

O processo fisiológico de regeneração óssea ocorre, didaticamente, em três etapas. Na primeira etapa, ocorre processo inflamatório intenso, seguido de formação de coágulo sanguíneo e de remoção dos restos celulares e da matriz colágena por ação dos macrófagos, até a formação de tecido de granulação (Tsiridis et al.,

2007; Schindeler et al., 2008).

No segundo estágio, ocorre a deposição de matriz mineral pela ação dos osteoblastos. No caso de formação de uma matriz fibrocartilaginosa anterior à deposição de colágeno e de matriz mineral, que ocorre quando não há contato direto entre os fragmentos ósseos, caracteriza-se a osteogênese endocondral. Quando essa matriz fibrocartilaginosa não precede a formação de tecido ósseo, o que ocorre na presença de contato entre os segmentos da ferida óssea, caracteriza-se a osteogênese intramembranosa (Shapiro, 2008). A regeneração óssea adequada depende fundamentalmente da estabilidade da ferida nos dois processos osteogênicos (Epari et al., 2007).

Na terceira e última etapa, ocorre a remodelação do tecido ósseo em sua configuração original por ação dos osteoclastos (Ragatt; Partridge, 2010).

A regeneração do tecido ósseo, assim como ocorre com os tecidos não ósseos, segue, portanto, uma sequência complexa de eventos moleculares e celulares fundamentais para a homeostasia dos organismos vivos, cuja atuação coordenada resulta na regeneração de estruturas de alguma forma danificadas (Sen; Roy, 2008).

Nos casos de lesões ou perdas ósseas muito extensas, o processo fisiológico de regeneração do tecido ósseo danificado é prejudicado a tal ponto que impede a sua ocorrência espontânea (Guerrier et al., 2012), impondo a necessidade de intervenções clínico-cirúrgicas, representadas por reconstrução óssea por meio de enxertos (autógenos ou exógenos), de retalhos microvascularizados, ou de biomateriais. Para a escolha do tipo de reconstrução a ser empregada, deve-se considerar tanto a extensão do defeito ósseo quanto a vascularização do sítio receptor (Foster et al., 1999).

A produção experimental destes defeitos ósseos, chamados de críticos, que não se regeneram, senão por meio de alguma intervenção clínica, tem o propósito de servir de modelo para a avaliação da eficácia de procedimentos e materiais propostos para o tratamento de perdas e/ou defeitos ósseos importantes em humanos, decorrentes de traumas, infecções, anomalias de desenvolvimento, patologias específicas, ressecções oncológicas e, mesmo, da perda fisiológica de massa óssea (Spicer et al., 2012). O termo “defeito crítico” foi inicialmente proposto em 1986, por

Schmitz e Hollinger, para se referir “ao menor tamanho de lesão intraóssea em determinado osso e em determinada espécie, lesão essa não passível de regeneração espontânea ao longo da vida de um animal de experimentação”.

Para que os objetivos experimentais, sejam atingidos os defeitos críticos em tecido ósseo devem ser produzidos levando-se em consideração uma série de aspectos que podem interferir tanto na qualidade quanto na quantidade de regeneração óssea. O tamanho adequado de um defeito ósseo crítico é fundamental para a observação de neoformação óssea, uma vez que a reparação desse tipo de defeito inicia com a formação de osso lamelar nas bordas da ferida e, dependendo do tamanho do defeito, o processo de regeneração óssea não atinge o centro da ferida, o que acarreta formação de tecido conjuntivo em vez de osso. A neoformação óssea também depende da estrutura interna do tecido ósseo, do suprimento sanguíneo, do envolvimento do osso cortical, e da presença / ausência de periósteo (Schmitz; Hollinger, 1986). Ainda, a localização anatômica e a estabilidade do defeito crítico também devem ser adequadamente consideradas, uma vez que micro movimentos de fragmentos de osso ou do material de enxerto podem prejudicar a neoformação óssea (Carter et al., 1998; Gomes; Fernandes, 2011).

2.1.1 Enxertos ósseos

Materiais e procedimentos empregados na reconstrução óssea devem possuir características bem definidas, a saber: integridade estrutural do material; capacidade de fornecimento de células ao local de destino; capacidade de reabsorção, reformulação e substituição pelo osso natural viável; estabilidade do osso resultante regenerado ao longo do tempo; facilidade de coleta e colocação do material; previsibilidade de sucesso e de morbidade mínima ao paciente e fácil reprodutibilidade do procedimento (Block, 2006).

Os procedimentos para reconstrução de tecido ósseo extensamente danificado realizados por médicos e cirurgiões-dentistas somavam, em 2005, mais de dois milhões de casos por ano em todo o mundo (Giannoudis et al., 2005), e ultrapassavam um milhão de casos apenas nos Estados Unidos da América (Fierz et al., 2008).

esses procedimentos são frequentemente representados pelos enxertos ósseos, tanto na área médica quanto na área odontológica (implantodontia e cirurgia buco-maxilofacial).

Na área odontológica, em especial, seu emprego é frequente nas cirurgias para reconstrução do maxilar, anteriormente à colocação de implantes dentários de titânio, na regeneração periodontal, e na reconstrução de rebordo alveolar em fissuras labiopalatinas congênitas (Finkemeier, 2002; De Long et al., 2007; Jensen et al., 2012). Os defeitos ósseos da mandíbula decorrentes de traumas faciais graves (por exemplo, traumatismos por projétil de arma de fogo ou ressecções cirúrgicas para tratamento oncológico) também vêm sendo frequentemente reparados com emprego de enxertos ósseos para reconstrução estética e funcional (Zemann et al., 2007).

O enxerto autógeno possui as propriedades de osteocondução, osteoindução e osteogênese. A osteocondução é a capacidade do enxerto servir de arcabouço para o crescimento tecidual interno. À medida que o osso autógeno é reabsorvido, ele libera fatores de crescimento que estimulam a formação óssea, caracterizando a osteoindução. A capacidade do enxerto autógeno levar células viáveis ao leito receptor é a osteogênese (Dimitriou et al., 2005; Giannoudis et al., 2005; Laurencin et al., 2006; Bielby et al., 2007; Dinopoulos et al., 2012; Handa et al., 2012).

Enxertos ósseos que imitam tanto a estrutura física quanto a composição química do osso parecem otimizar a osteocondução que, por sua vez, será mais efetiva em materiais que também apresentem osteoindução e osteogênese (Giannoudis et al., 2005).

Além disso, para que haja formação de osso de modo que ocorra o reparo ósseo, é fundamental o crescimento vascular suficiente no interior do enxerto (Eckardt et al., 2005; Alt et al., 2011). Quando os enxertos ósseos não possuem células, a vascularização, a colonização celular e a produção de matriz ocorrem mais lentamente, o que pode acarretar prejuízo à osteogênese em longo prazo, já que a vascularização rápida do enxerto é imprescindível para o sucesso do reparo ósseo (Keramaris et al., 2008).

Existe grande variedade de enxertos ou substitutos ósseos, dentre essa variedade, o enxerto ósseo autógeno é o único que possui as quatro propriedades biológicas básicas para o sucesso do reparo ósseo. Os demais, possuem uma ou outra dessas propriedades, o que os torna menos efetivos em relação ao enxerto ósseo autógeno (Laurencin et al., 2006).

Por essa razão, associada à ausência de antigenicidade e à presença de completa histocompatibilidade (Khan et al., 2005), o enxerto ósseo autógeno, obtido de outras áreas disponíveis do esqueleto, como a crista ilíaca, a tíbia, a calota craniana, a mandíbula ou a maxila, é padrão-ouro para procedimentos de reparo ósseo (Zouhary, 2010; Dimitriou et al., 2011).

Geralmente, esse tipo de enxerto possui células osteogênicas viáveis e proteínas da matriz óssea, além de fornecer suporte estrutural, sobretudo em sua porção cortical que se incorpora ao leito receptor, o que permite que seja progressivamente reabsorvido e substituído por tecido ósseo novo (Greenwald et al., 2001).

Apesar dessas características altamente positivas, o enxerto ósseo autógeno apresenta alguns inconvenientes. A coleta do enxerto vem sendo associada a complicações importantes, representadas por dor no leito doador, formação de hematoma, neuroma e, especialmente quando esse sítio é a crista ilíaca, dor crônica e infecção (Meads et al., 2003). A taxa de complicações dessa ordem varia de 9% a 49%, a depender do procedimento cirúrgico realizado e da quantidade de osso retirado (Schwartz et al., 2009). A necessidade de cirurgia adicional na área doadora aumenta a taxa de morbidade em 20% a 30%, e acarreta maior tempo operatório, período mais longo de convalescença e internação, risco de infecção da área doadora e custo mais elevado (Dahabreh et al., 2009; Aghdasi et al., 2013).

Os enxertos ósseos alógenos, colhidos de cadáveres humanos de diferentes formas, com diferentes tamanhos e sem limite de quantidade, representariam uma alternativa aos enxertos autógenos, já que eliminam qualquer possibilidade de morbididades ao paciente. Por outro lado, embora possuam boa osteocondução, a osteoindução é reduzida, não há osteogenicidade, e há risco relativo de infecções virais (especialmente por HIV e por vírus da hepatite B e C). Além disso, a obtenção, o tratamento e a conservação dos enxertos alógenos acarretam custos elevados (Holtzclaw et al., 2008). Esse conjunto de desvantagens, portanto, impede a sua utiliza-

ção como substitutos efetivos dos enxertos autógenos.

No intuito de compensar as desvantagens dos enxertos tanto autógenos quanto alógenos, já foi proposta grande diversidade de materiais sintéticos para o reparo de grandes defeitos ósseos, que se encontram amplamente disponibilizados na atualidade.

2.1.2 Biomateriais aloplásticos

O desenvolvimento de biomateriais aloplásticos para reparos ósseos surgiu da necessidade de procedimentos de reconstrução óssea em grandes perdas em especial, que dispensassem o processo convencional de enxertia óssea, mas que mantivessem as propriedades de osteoindução e crescimento ósseo (Luvizuto et al., 2011). Também se fundamentou na capacidade de restauração da continuidade óssea desses biomateriais, prescindindo de cirurgia para coleta de osso em área doadora (Herford; Boyne, 2008).

Os biomateriais vêm sendo cada vez mais frequentemente empregados como substituto ósseo devido à série de vantagens que apresentam, como a impossibilidade de infecção do leito doador, a boa disponibilidade no mercado em ampla variedade de tamanhos, formas, texturas e composições, a facilidade de manuseio, a possibilidade de adição de fármacos, moléculas e células de maneira controlada, e a boa aceitação por parte do paciente (Li et al., 2011).

Dentre os biomateriais, as cerâmicas bioativas representam o principal grupo de materiais aloplásticos, dentre os quais se destacam o Fosfato Tricálcico (TCP), a hidroxiapatita (HA), o sulfato de cálcio, o carbonato de cálcio, polímeros à base de hidróxido de cálcio e as cerâmicas de vidro bioativo. Embora se caracterizem por força de compressão excelente, alta resistência ao carregamento e baixas propriedades friccionais, as cerâmicas são materiais biocompatíveis com propriedades baixas de tração (Larson, 2010).

As biocerâmicas mais utilizadas para a reconstrução de defeitos ósseos incluem a hidroxiapatita e o fosfato de cálcio, uma vez que se assemelham aos minerais do osso natural e possuem biocompatibilidade e bioatividade excelentes (Val et al., 2012).

De toda forma, uma série de biomateriais se encontra ainda em estudos experimentais que possam evidenciar as suas eficácias na reconstrução óssea, e, para tanto, já foram propostos alguns modelos animais para avaliação do reparo de defeitos ósseos.

2.1.2.1 Beta fosfato tricálcico

Os fosfatos de cálcio são minerais compostos de íons de cálcio, ortofosfatos, metafosfatos ou pirofosfatos e, ocasionalmente, hidrogênio ou íons de hidróxido. Desse modo, apresentam composição química bastante semelhante à fase mineral dos ossos, dos dentes e dos tecidos calcificados. Esses compostos cerâmicos também apresentam biocompatibilidade ideal, bioatividade, habilidade aparente em se ligar ao tecido hospedeiro, osteocondutividade, e taxas variáveis de degradação. Por outro lado, não causam toxicidade local ou sistêmica nem resposta a corpo estranho ou inflamações. Por esse conjunto de características, as cerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo amplamente utilizadas no desenvolvimento de biomateriais que sirvam para reparo de defeitos ósseos (Zavaglia, 2011; Gomes et al., 2012).

Os fosfatos de cálcio incluem, por ordem da relação cálcio/fósforo, o fosfato tetracálcico, a hidroxiapatita, o fosfato de cálcio amorfo, os fosfatos tricálcicos alfa, beta e gama, o fosfato octacálcico, o mono-hidrogênio fosfato de cálcio di-hidratado, o mono-hidrogênio fosfato de cálcio, o pirofosfato de cálcio, o pirofosfato de cálcio hidratado, o fosfato heptacálcico, o di-hidrogênio fosfato tetracálcico, o fosfato monocálcico mono-hidratado e o metafosfato de cálcio alfa, beta e gama (Neo et al., 1998).

Os cimentos de fosfato de cálcio são biomateriais constituídos por um pó e um líquido, os quais, ao serem misturados, formam uma pasta que toma presa espontaneamente à temperatura ambiente ou corporal como resultado da precipitação de um ou vários fosfatos de cálcio. O pó pode estar composto por um ou vários fosfatos de cálcio, outros sais de cálcio e certos aditivos orgânicos. Por sua vez, o líquido pode ser água ou soluções aquosas de compostos de cálcio ou fosfato, que também podem conter certos aditivos orgânicos. Do ponto de vista clínico, existem certos requisitos que um cimento ósseo deva cumprir. Esses requisitos são: possuir uma resistência mecânica apropriada durante o período requerido, pH neutro (6,5 – 8,5) durante e depois da cicatrização, para evitar efeitos citotóxicos, fácil manipulação, ausência de toxicidade, perfeita adesão ao tecido ósseo e ausência de características alergênicas e cancerígenas (Zavaglia, 2011).

Ao longo de muito tempo, a única biocerâmica da família dos fosfatos de cálcio empregada para reparo ósseo foi a hidroxiapatita, motivo pelo qual ainda é considerada referência no campo dos biomateriais (Guastaldi; Aparecida, 2010). No entanto, a lenta biodegradação desse tipo de fosfato de cálcio é um fator limitante para a sua aplicação clínica, o que fez surgir a necessidade de se estudarem outros tipos de fosfato de cálcio para essa finalidade (Pioletti et al., 2000).

Os fosfatos tricálcicos foram, então, eleitos para investigações e uso clínico. Esses fosfatos de cálcio são classificados como cerâmicas policristalinas com diferentes graus de densidade e porosidade, e a sua taxa de degradação depende diretamente das formas cristalinas e da área da superfície (Handschele et al., 2002). As formas cristalinas, determinadas por pressão ambiente, compreendem o alfa fosfato tricálcico (α TCP), o beta fosfato tricálcico (β TCP) e o gama fosfato tricálcico (γ TCP) (Gomes et al., 2012).

Desde a década de 1990, os fosfatos de cálcio e seus derivados vêm sendo amplamente estudados, *in vivo* e *in vitro*, no que concerne ao seu efeito sobre os osteoblastos. Os resultados desses estudos vêm se mostrando de certa forma controversos, devido às diferentes metodologias de estudo e aos diferentes materiais testados (Meyer et al., 1993; Möller et al., 1994; Neo et al., 1998; Pioletti et al., 2000; Handschele et al., 2002).

De toda forma, dentre os fosfatos tricálcicos, o β -TCP é um substituto ósseo sintético disponível em forma de grânulos, caracterizado por boa biocompatibilidade e osteocondução (Boos et al., 2013), razão pela qual vem sendo investigado, isolado ou associado a outros materiais, com maior ênfase como arcabouço inorgânico para regeneração do tecido ósseo (Knabe et al., 2000; Boo et al., 2002; Livingston et al., 2002; Shimaoka et al., 2004; Ruhé et al., 2004). Já foi evidenciado que o β -TCP tem a vantagem de ser degradado naturalmente pelos sistemas biológicos, o que sugere sua superioridade sobre a hidroxiapatita, que permanece no tecido ósseo regenerado (Matsumoto et al., 2009).

Também já foi demonstrado que o β -TCP é um biomaterial promissor tanto para o reparo de lesões nos maxilares (Aguirre Zorzano et al., 2007), quanto para a regeneração óssea após implante dentário (Ortega et al., 2007; Mourelo et al., 2010), embora tenha sido bem evidenciada a pobre osteogênese desse substituto ósseo (Oriei et al., 2005; Gupta et al., 2007).

Matsumoto et al. (2009) avaliaram a osteogenicidade de um biomaterial esponjoso composto de uma mistura biodegradável de gelatina e β -TCP com ou sem incorporação de proteínas ósseas morfogenéticas tipo-2 em defeitos de tamanho crítico produzidos em ratos. Constataram que a incorporação de proteínas ósseas morfogenéticas tipo 2 à mistura gelatina-beta fosfato tricálcico aumentou significativamente tanto a atividade osteocondutiva quanto o conteúdo de osteocalcina. Achados histológicos mostraram que o osso regenerado foi totalmente substituído por osso novo. Zhao et al. (2010) observaram, também em estudo com defeitos de tamanho crítico em ratos avaliados por radiografia, microtomografia e análises histológicas, que a associação entre proteínas ósseas morfogenéticas tipo 2 e arcabouço de beta fosfato tricálcico promoveu tanto o reparo do defeito quanto a regeneração do tecido ósseo, o que ocorreu de forma significativamente mais discreta e menos bem sucedida nos defeitos reparados apenas com o beta fosfato tricálcico.

Por outro lado, Luvizuto et al. (2011) observaram que o beta fosfato tricálcico foi mais eficiente do que enxerto autólogo particulado na neoformação óssea em defeitos de tamanho crítico em calvária de ratos. Também relataram que o uso isolado de beta fosfato tricálcico promoveu nível máximo de neoformação óssea, sem que a suplementação de proteínas ósseas morfogenéticas tipo 2 tenham melhorado

a osteogênese.

Frota et al. (2011) não encontraram diferenças significativas na regeneração óssea de defeitos críticos em calvária de ratos reparados com e sem beta fosfato tricálcico, e que essa regeneração foi similar nos diferentes momentos do estudo (avaliações realizadas sete, 15 e 30 dias após o reparo). Ressalte-se que, nesse estudo, as amostras experimentais e as amostras-controle eram provenientes dos mesmos animais (lado direito e esquerdo do defeito crítico).

Polo et al. (2013) avaliaram o cimento de beta fosfato tricálcico como um dos meios carreadores para a proteína morfogenética óssea recombinante humana tipo 2 em um modelo de regeneração óssea guiada vertical em calvária de coelhos. Obtendo um aumento significativo da formação óssea, quando comparado com o grupo controle.

Além dos estudos experimentais, também os relatos clínicos sobre o uso do beta fosfato tricálcico em reparo ósseo odontológico nem sempre convergem. Em 21 casos de tratamento de duas a três paredes verticais de defeitos ósseos periodontais com beta fosfato tricálcico, houve grande variação na tendência à regeneração óssea, e os melhores resultados foram observados em defeitos de três paredes (Gera et al., 2002). Em um relato de 171 implantes dentários (Velasco Ortega et al., 2007) e em outro de 48 cirurgias para aumento dos seios maxilares (Simunek et al., 2008), os autores imputaram sucesso ao uso do beta fosfato tricálcico, tanto pela ausência de complicações tardias quanto pela quantidade de neoformação óssea. Ressalte-se, todavia, que, no segundo estudo, apesar da eficácia do beta fosfato tricálcico, houve maior neoformação óssea nas cirurgias em que se utilizou osso bovino inorgânico.

Mais recentemente, a indústria britânica disponibilizou um substituto ósseo sintético bifásico composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico para reparo ósseo, com o nome comercial de GeneX[®]. De acordo com os fabricantes, trata-se de material totalmente sintético, composto de poros “espertos” que produzem macroporosidade crescente, o que permite que células e nutrientes se concentrem nesses poros, de modo que o enxerto possa ser eventualmente absorvido. É apresentado em forma de pasta injetável que deve contornar o campo cirúrgico, e atinge o mais alto grau de força compressiva *in situ* 15 minutos após a aplicação (Biocomposites,

2014).

O potencial zeta é utilizado para conferir a estabilidade das suspensões de colóides. Partículas em suspensão nestes colóides que possuam grandes valores de potenciais zeta positivos ou negativos mostram a tendência destas partículas em se atraírem ou repelirem. Se o potencial zeta caracterizar instabilidade na suspensão ele será mais favorável a osteocondutividade (Carvalho, 2013).

A aplicação experimental desse novo biomaterial tem sido inicialmente relatada para o reparo de defeitos da coluna ou de outros ossos longos, e estudos demonstraram que, enquanto o componente de sulfato de cálcio é reabsorvido por dissolução nas 12 semanas posteriores ao implante (Yang et al., 2012), o período de reabsorção é mais longo no componente remanescente de beta fosfato tricálcico (Liu; Lan, 2012).

Na experiência clínica de Saadoun et al. (2011) composta de três pacientes idosos submetidos a reparo ósseo em coluna, o GeneX[®] provocou mais inflamação e mais destruição de tecidos moles, o que levou os autores a desencorajar o seu uso em áreas próximas de estruturas com paredes mais finas (como a pele), uma vez que o material pode infiltrar nesse tipo de tecidos. Estudo prospectivo idealizado por Friesenbichler et al. (2014) para avaliar a eficácia desse material sintético no reparo de tumores ósseos malignos em 40 pacientes teve de ser interrompido prematuramente, devido ao alto número de complicações (16%) observadas nos primeiros 31 procedimentos, incluindo sintomatologia dolorosa e inflamação estéril com cicatrização tardia da ferida e formação de cistos em tecido mole.

Alguns autores atribuem esses resultados inesperados ao uso inadequado do biomaterial (Laycock; Cooper, 2014).

Smeets et al. (2009) haviam, entretanto, descrito um caso levantamento de seios maxilares bilaterais onde mostraram que a propriedade do controle de potencial zeta do beta fosfato tricálcico (geneX) apresentou uma melhor regeneração óssea se comparado com o beta fosfato tricálcico tradicional.

Ghanaati et al. em 2010 descreveram que grânulos de beta fosfato tricálcico são capazes de induzir a formação de células gigantes em maior ou menor grau dependendo das características físico-químicas dos materiais e. Diferenças nos tama-

nhos, na porosidade e na morfologia dos grânulos induzem diferentes números de células gigantes. Além disso os osteoclastos são fenotipicamente diferentes das células gigantes encontradas no tecido ósseo. Para as células gigantes expressarem marcadores fenotípicos dos osteoclastos seriam necessários sinais específicos do microambiente do tecido ósseo o que para os autores ocorreu. Os autores lembraram ainda que a maioria das cerâmicas promovem reações de estímulo a formação de células gigantes principalmente nos biomateriais nanoparticulados. E que a angiogênese se correlaciona positivamente com o número de células gigantes que se expressam na região do reparo.

2.2 Modelos animais para o estudo de biomateriais

Modelos experimentais têm sido amplamente utilizados na investigação da aplicabilidade de diferentes biomateriais e técnicas propostas para a reconstrução de defeitos ósseos extensos sem possibilidade de regeneração óssea fisiológica. Apesar de a seleção desses modelos animais levar em consideração a árvore filogenética, deve-se dar preferência ao uso de animais menores, como os roedores, desde que se possam produzir dados fidedignos (Gomes; Fernandes, 2011). Especificamente para a avaliação de regeneração óssea, a preferência pelos roedores se fundamenta na melhor relação custo-benefício, na facilidade de manutenção e manuseio, e na possibilidade de padronização de condições experimentais em seres geneticamente similares (Pellegrini et al., 2009), além da fácil reprodutibilidade (Spicer et al., 2012).

A calvária do rato, por sua vez, consiste de uma camada de osso medular envolto por duas corticais ósseas, o que a torna anatomicamente similar à mandíbula humana, razão pela qual se constitui em um modelo adequado para a avaliação dos efeitos biomateriais ou substâncias produzidas por engenharia de tecidos no reparo ósseo particularmente para uso nas regiões craniofaciais (Schmitz; Hollinger, 1986).

O defeito de tamanho crítico em calvária de ratos é um dos modelos animais mais frequentemente utilizados na avaliação de regeneração óssea. A partir da defi-

nição original dada ao termo defeito de tamanho crítico, como vimos no início deste capítulo, Gosain et al. (2000) postularam que, em pesquisas experimentais, defeito de tamanho crítico deve se referir ao tamanho de um defeito ósseo que não terá condições de regeneração espontânea até o término do estudo.

Dentre as vantagens desse modelo animal, deve-se destacar a inércia biológica do crânio do rato, a padronização das dimensões do defeito, o acesso cirúrgico adequado, e a estabilidade dos biomateriais no sítio, graças à presença de dura-máter e de pele subjacente (Gomes; Fernandes, 2011). Como desvantagem, se apresentam tanto a impossibilidade de avaliação da regeneração óssea em condições de cargas fisiológicas e biomecânicas quanto a limitação na quantidade de tecido ósseo disponível para as avaliações histológicas, principalmente no que tange às fases iniciais da regeneração óssea (Vajgel et al., 2014).

Discute-se, ainda, qual seria a melhor localização anatômica para a produção desse defeito crítico, especialmente no que se refere à realização ou não realização de sutura médio-sagital, devido à possibilidade de influenciar o processo de regeneração (Bosh et al., 1996). Mas o ponto mais controverso em relação a esse modelo animal tem sido a dimensão ideal do defeito produzido na calvária (Cooper et al., 2010; Vajgel et al., 2014).

Embora se saiba que o tamanho mínimo do defeito em milímetros seja diferente para cada animal, vem sendo defendida e bastante utilizada a produção de defeito circular com 8 milímetros na calvária de ratos Wistar (Einhorn, 1999; Caccioli et al., 2006; Bodde et al., 2008; Messori et al., 2008; Efeoglu et al., 2009; Paulo Ade et al., 2011; Scotchford et al., 2011; Spicer et al., 2012).

De toda forma, em recente revisão sistemática da literatura realizada por Vajgel et al. (2014), foram analisados estudos em que se avaliou a regeneração óssea em defeito produzido na calvária de ratos Wistar e ratos Sprague-Dawley em dimensões de 5, 6, 7, 8 e 9 milímetros. Segundo os autores, houve evidências significativas de que defeitos com diâmetro de 5 milímetros na calvária de ratos poderiam ser considerados defeitos de tamanho crítico.

De fato, vários parâmetros biológicos devem ser avaliados no reparo do defeito ósseo, como a quantidade de osso neoformado, o remanescente do biomaterial,

os componentes celulares presentes, a vascularização e a porosidade do biomaterial. Essas avaliações devem ser realizadas por meio de métodos complementares, que geralmente incluem radiografias convencionais e, mais recentemente, microtomografias associadas a análises histológicas (Gomes; Fernandes, 2011).

Os exames de imagem permitem a avaliação das características estruturais do reparo ósseo, a interface com o material e a sua biocompatibilidade (Schortinghuis et al., 2003; Efeoglu et al., 2007; Efeoglu et al., 2009). A microtomografia computadorizada (μ CT), em especial, apresenta vantagens importantes por ser uma técnica rápida e não destrutiva que caracteriza e mensura as propriedades tridimensionais do biomaterial e da regeneração do tecido ósseo. Geralmente, os achados estruturais microtomográficos são complementados pela análise histológica (Jones et al., 2004; Jones et al., 2007).

Dentre as análises histológicas mais utilizadas, a histomorfologia evidencia dados da morfologia celular e da estrutura celular e a disposição das células na interface com a matriz extracelular ou com o enxerto implantado (Spicer et al., 2012). A análise semi-quantitativa dos achados histomorfológicos é feita a partir de um sistema de graduação, que pontua desde a ausência do parâmetro avaliado (menor pontuação) até a presença intensa ou muito intensa desse parâmetro (maior pontuação). Já por meio da histomorfometria, é possível uma análise quantitativa da área de tecido neoformado e do número de componentes da região em análise (Parfitt et al., 1987; Efeoglu et al., 2007; Efeoglu et al., 2009).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar por meio de microtomografia e dos aspectos histológicos do reparo ósseo, se o cimento bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta, pode induzir ou conduzir a neoformação óssea em defeitos críticos de 8 mm de diâmetro, produzidos em calvária de ratos Wistar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sob o protocolo número 88/2011 (ANEXO A) e renovado pela CEUA da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) sob o protocolo número 006/2014 (ANEXO B), estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL). A declaração de isenção de conflito de interesses por parte do pesquisador neste estudo está ao final deste volume no ANEXO C.

Todos os procedimentos cirúrgicos experimentais foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia, Prótese e Traumatologia Maxilofaciais da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo.

O preparo e as análises histológicas foram processados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal e no Laboratório de Informática dedicado à Odontologia (LIDO) da Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

As microtomografias foram realizadas no Departamento de Fisiologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo; as imagens microtomográficas foram processadas e analisadas na Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer do Ministério da Ciência e Tecnologia e Inovação de Campinas – São Paulo.

Quarenta (40) ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com peso entre 200 g e 250 g, e idade aproximada de 45 dias, provenientes do Biotério Central do Instituto de Pesquisas Nucleares (IPEN), foram selecionados para o estudo. Durante todo o período da pesquisa, os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, ventiladas, forradas com maravalha de madeira esterilizada, com ciclo dia/noite de 12/12 horas, e alimentados por meio de ração para roedores (*Labina for Rodents*, Purina®) e água *ad libitum*.

Todos os animais foram pesados para o cálculo da dose referente aos medicamentos de sedação, anestesia, analgesia e antibioticoterapia. Os 40 animais foram divididos em dois grupos. O Grupo-teste ($n = 20$), que recebeu o cimento beta fosfato tricálcico para preenchimento do defeito crítico na calvária, e o Grupo-controle ($n = 20$), que permaneceu com o defeito crítico preenchido apenas por coágulo.

4.1 Procedimento cirúrgico experimental

Após a pesagem, os animais foram mantidos em gaiolas individuais. Para a realização da anestesia, cada animal foi separado dos demais, procedimento que permitiu que cada rato fosse anestesiado isoladamente, visando à redução do estresse dos demais. Em seguida, a anestesia geral foi realizada pela injeção por via intramuscular, na pata traseira direita de cada animal, do anestésico cloridrato de cetamina (Dopalen®, Vetbrands) na dose de 0,8 mg/kg de peso do animal, associado ao relaxante muscular cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) na dose de 0,3 mg/kg de peso. Depois de atingido o plano anestésico, foi realizada profilaxia antibiótica por via intramuscular com benzilpenicilina benzatina (Roche®) na dose de 150.000 UI/kg. Dez ratos morreram em decorrência de complicações anestésicas e foram substituídos por outros de mesma procedência e de mesmas características.

O preparo do leito cirúrgico consistiu da realização de tricotomia na região da calvária, seguida de antissepsia da pele do mesmo local com digluconato de clorexidina a 2%. Os animais foram posicionados em uma bancada utilizada para cirurgias experimentais, isolada com campos cirúrgicos esterilizados.

4.1.1 Descrição da técnica cirúrgica

O acesso à calvária foi feito por meio de uma incisão retilínea de 2 cm na pele da região mediana do crânio, estendendo-se da região nasofrontal até a protuberân-

cia occipital. A pele, o tecido subcutâneo, o músculo temporal e o periósteo foram divulsionados lateralmente para completa exposição dos ossos parietais do animal.

O defeito ósseo foi confeccionado por meio de uma broca trefina em aço de 8 mm de diâmetro (Sistemas de Implantes Nacionais – SIN®), adaptada a um contra-ângulo em motor de implante (Driller®) sob baixa rotação e irrigação constante com soro fisiológico a 0,9%. Após a confecção do defeito ósseo, foi realizada a irrigação constante da ferida cirúrgica com soro fisiológico a 0,9%.

Os animais do Grupo Teste tiveram o defeito crítico preenchido com cimento beta fosfato tricálcico (geneX, Biocomposites®), seguindo as normas do fabricante na quantidade aproximada de 25mm³ por defeito, e os do Grupo Controle tiveram o defeito preenchido apenas com coágulo.

Por fim, realizou-se a síntese da pele com fio de sutura de seda 3-0 (Ethicon®).

As principais etapas do procedimento cirúrgico experimental estão ilustradas na figura 4.1(A-C).

Figura 4.1 - Cirurgia Experimental: (A) acesso à calvária do animal, osteotomia e confecção do defeito com broca trefina de 8 mm de diâmetro; (B) remoção do fragmento ósseo e obtenção do defeito ósseo crítico; (C) preenchimento do defeito crítico no Grupo-teste com o cimento beta fosfato tricálcico (geneX®)

Imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o dia da eutanásia, recebendo analgesia com paracetamol 200 mg/Kg.

4.1.2 Pós-operatório

Cinco animais de cada grupo sofreram eutanásia em câmara de CO₂ nos períodos de 7, 14, 21 e 42 dias pós-operatórios. Após a eutanásia, os crânios foram dissecados e fragmentos significativos da calvária contendo a região do defeito foram fixados em formol a 10% para a obtenção de imagens microtomográficas e de preparo histológico (Figura 4.2).

Figura 4.2 – Imagem do crânio dissecado para ser fixado em formol a 10% para os procedimentos de preparo histológico (Grupo teste de 14 dias).

4.2 Microtomografia das amostras

Previamente ao processamento laboratorial para análise histológica, as peças cirúrgicas de um rato do Grupo Teste e de um rato do Grupo Controle em cada um dos períodos do estudo foram microtomografadas. As imagens foram obtidas com uso de microtomógrafo SkyScan 100kV – 100µA no Instituto de Biologia no Departamento de Fisiologia Animal da Universidade de São Paulo. As amostras foram posicionadas e fixadas à sela do aparelho, de maneira que não se movimentassem durante o experimento (Figura 4.3). O aparelho foi ajustado a uma resolução de 2.000 x 2.000 pixels e cortes com 16 µm de espessura. O tempo de aquisição das imagens foi de aproximadamente duas horas por amostra.

As imagens foram analisadas e reconstituídas em duas e três dimensões, por meio do *Software InVesalius* (Figura 4.4), na Divisão de Tecnologias Tridimensionais do Centro de Tecnologia da Informação “Renato Archer” de Campinas – São Paulo.

Figura 4.3 – (A) Aparelho de microtomógrafo SkyScan 100kV; (B) Amostras posicionadas e fixadas à sela do aparelho

Figura 4.4 – Fluxograma do processo realizado pelo *Software InVesalius* (Centro de Tecnologia da Informação Renato Archer)

Embora tenha se constatado, durante a análise das imagens, que a intensidade em níveis de cinza do biomaterial era próxima à do osso, o biomaterial apresentava granularidade, o que permitiu diferenciá-lo do osso. Desse modo, o volume do biomaterial foi quantificado em milímetros cúbicos (mm^3).

Nas imagens bidimensionais foram mensuradas em milímetros (mm) as distâncias axial e sagital do reparo ósseo. Também foi mensurada em milímetros (mm) a sua distância tridimensional axial.

4.3 Preparo das amostras histológicas

Após a fixação das peças cirúrgicas em solução de formol tamponado a 10% por 48 horas, os crânios foram imersos em solução de EDTA 10% (pH 7.4) durante seis semanas para descalcificação do tecido ósseo.

A região de ferida foi seccionada ao meio, exatamente no plano sagital mediano da calvária do rato, resultando em duas partes da ferida: o lado esquerdo e o direito. Cada lado da ferida foi incluído em respectivo bloco de parafina e, posteriormente, quatro cortes parassagitais com espessura de 4,5 µm foram realizados e submetidos à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) e Tricrômio de Masson.

A amostra constituiu-se da análise de duas lâminas histológicas (L1 e L2) de cada animal, com quatro cortes histológicos em cada uma delas.

4.3.1 Análise histomorfológica

Os cortes histológicos foram analisados por meio de um microscópio de luz convencional (Olimpus® CH2, Olympus Optical Co. Ltd, Japan), sob foco fixo e clareza de campo, com aumento final de 400X.

A análise dos aspectos histomorfológicos do reparo ósseo foi realizada por um patologista de forma cega, considerando a presença das seguintes características do reparo: edema, infiltrado inflamatório, tecido de granulação, hemorragia / coágulo, neoformação óssea, reação de corpo estranho, e material exógeno.

Esses parâmetros ponderados por meio de uma escala arbitrária, classificada de zero a quatro:

- 0 = ausente;
- 1 = discreto;
- 2 = discreto a moderado;
- 3 = moderado a intenso
- 4 = intenso.

4.3.2 Análise histomorfométrica

A metodologia de estudo histomorfométrico foi padronizada pelo Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia da Faculdade (LIDO-FOUSP).

Para a histomorfometria, cada corte histológico de cada lâmina foi dividido em duas partes: região anterior da ferida (próxima ao osso nasal) e região posterior da ferida (próxima ao osso occipital).

Imagens de cada região do corte histológico (aumento de 400x) foram obtidas por meio de uma câmera tipo CCD (Sony®) acoplada a um microscópio (Jeol®) e a uma placa de digitalização de imagens (Captivator®). Em seguida, essas imagens foram transferidas para um programa de morfometria digital (ImageLab 2000®).

Por meio das ferramentas disponíveis no programa ImageLab 2000®, as regiões correspondentes às trabéculas ósseas neoformadas nas regiões anterior, posterior e central da ferida foram delimitadas em cada um dos quatro cortes histológicos de cada lâmina, permitindo estimar a evolução da neoformação óssea.

A quantidade de neoformação óssea de cada lado da ferida foi obtida pela soma das médias de neoformação óssea dos quatro cortes das regiões anterior e posterior de cada lâmina (L1 e L2), ou seja: a neoformação óssea do lado esquerdo da ferida óssea (L1) = média de neoformação da região anterior + média de neoformação da região posterior. O cálculo foi realizado da mesma forma para o lado direito (L2).

Assim, a neoformação óssea total de cada animal foi obtida por meio da soma da neoformação óssea das lâminas 1 e 2 (L1 + L2).

4.3.3 Análise histoquímica para identificação de osteoclastos

A fim de identificar células osteoclásticas, dois cortes randomizados de cada lado da ferida de dois animais de cada grupo foram escolhidos aleatoriamente e

submetidos à coloração histoquímica para demonstrar fosfatase ácido tártaro-resistente (TRAP). Os cortes histológicos foram incubados por três horas em temperatura ambiente, em solução contendo tartarato de sódio, ácido tartárico e sal disódico (Sigma™). Após a incubação, os cortes foram lavados em água corrente, deixados para secagem ao ar a 25°C e contra corados por *Fast Green* a 1% (Fisher Scientific Co.) por aproximadamente um minuto. Como controle positivo desta reação histoquímica foi utilizado um corte de fêmur de rato apresentando reparo de ferida óssea. Após a coloração, as lâminas foram mantidas em campo escuro para posteriormente serem observadas em microscopia de luz.

4.4 Análise dos dados

Os dados microtomográficos foram analisados qualitativamente em estatística descritiva. Os dados histológicos foram analisados por estatística inferencial não paramétrica. Desse modo, os dados histomorfológicos foram transformados em valores medianos e comparados com aplicação do Teste da Mediana, com a hipótese de nulidade testada com o emprego da Prova do Qui-quadrado (para a comparação dos períodos do estudo) ou com o Teste Exato de Fisher (para a comparação entre os grupos). Os dados histomorfométricos foram transformados em médias e desvios-padrão e testados com o emprego do Teste de Kruskal-Wallis.

Em todas as estatísticas inferenciais, adotou-se nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Os resultados são apresentados de acordo com as análises descritas na metodologia.

5.1 Achados microtomográficos

Amostras de dois animais (um teste e um controle) foram microtomografadas e os achados estão apresentados apenas em carácter ilustrativo. Os achados microtomográficos se encontram descritos na tabela 5.1, e imagens das microtomografias são apresentadas na figura 5.1. Com relação ao volume do biomaterial mensurado por microtomografia na amostra do Grupo Teste houve redução gradual entre o período de 7 e o de 21 dias. As distâncias bidimensionais e tridimensionais do Grupo Teste, aumentaram entre o período inicial (7 dias) e o período final (42 dias.) A figura 5.1 ilustra os defeitos ósseos nos dois Grupos e a imagem do biomaterial no Grupo Teste em todos os períodos.

Tabela 5.1 – Achados microtomográficos de quatro ratos do Grupo Teste e de quatro ratos do Grupo Controle distribuídos nos quatro períodos de estudo (7, 14, 21 e 42 dias)

Período do estudo	Animais	Achados microtomográficos			
		Volume do biomaterial (mm ³)	Distâncias bidimensionais Axial (mm)	Sagital (mm)	Distância axial tridimensional (mm)
7 dias	Teste	25,11	8,32	8,16	9,39
	Controle	-	8,97	8,95	8,96
14 dias	Teste	10,96	7,72	10,81	7,34
	Controle	-	9,46	9,41	9,50
21 dias	Teste	7,00	7,77	9,55	9,51
	Controle	-	8,41	8,58	8,15
42 dias	Teste	11,64	9,88	11,51	11,10
	Controle	-	8,75	8,56	9,06

Figura 5.1 – Imagens microtomográficas das calvárias com os defeitos no Grupo Teste e no Grupo Controle nos quatro períodos de estudo (7, 14, 21 e 42 dias)

5.2 Análise histológica

5.2.1 Histomorfologia

Os valores medianos, máximos e mínimos dos parâmetros avaliados na histomorfologia do reparo ósseo estão apresentados na tabela 5.2.

A comparação desses valores entre os períodos de estudo em cada grupo mostra que a presença de tecido de granulação foi significativamente mais intensa nos dois primeiros períodos de estudo no Grupo-Teste e no primeiro período de estudo no Grupo-Controle, não tendo sido encontradas diferenças significativas entre os períodos de estudo nos demais parâmetros avaliados (Tabela 5.2).

Quando comparados os dois grupos em cada período de estudo, os achados estatísticos mostram que: (1) a presença de infiltrado inflamatório foi significativamente mais intensa no Grupo Teste em todos os quatro períodos de estudo; (2) a presença de tecido de granulação foi significativamente mais intensa no Grupo Teste nas avaliações realizadas aos 14 e aos 21 dias, equiparando-se à do Grupo Controle no primeiro e no último período de estudo (Tabela 5.2).

Esses dados são melhor visualizados nas figuras: 5.2, 5.3 e 5.4.

Os aspectos histológicos dos reparos dos defeitos ósseos podem ser observados nas figuras: 5.5, 5.6, 5.7 e 5.8.

Tabela 5.2 - Valores das Medianas [Max-Mim] das intensidades dos escores para as variáveis histológicas do defeito ósseo

Variáveis	7 Dias			14 Dias			21 Dias			42 Dias		
	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p	Controle	Teste	p
Edema	2 [2-1]	1[2-1]	0.220	2[2-1]	1[1-0]	0.075	1[1-0]	1[1-0]	1.000	0[2-0]	0[1-0]	0.916
Infiltrado Inflamatório	1[2-1]	4[4-4]	0.004	1[3-1]	4[4-3]	0.008	1[1-0]	4[4-4]	0.003	1[1-0]	4[4-3]	0.006
Tecido de Granulação	3[4-3]	3[3-2]	0.212	2[3-1]	4[4-3]	0.011	1[1-1]	2[3-2]	0.004	1[2-1]	1[1-1]	0.317
Hemorragia/coágulo	3[3-1]	2[3-1]	0.496	2[3-2]	1[4-0]	0.193	3[3-1]	0[4-0]	0.106	2[3-0]	1[3-0]	0.335
Neoformação óssea	1[2-1]	1[1-1]	0.317	2[2-1]	2[3-1]	0.605	2[3-1]	2[2-1]	0.339	2[3-1]	1[2-1]	0.418
Reação de corpo estranho	0[1-0]	4[4-4]	0.005	1[2-1]	4[4-4]	0.005	0[2-0]	4[4-3]	0.007	1[2-0]	4[4-3]	0.006
Material Exógeno	0[0-0]	4[4-3]	0.007	0[0-0]	4[4-4]	0.005	0[0-0]	2[3-2]	0.005	0[0-0]	3[4-2]	0.008

0 – ausente. 1 – discreto. 2 – discreto a moderado 3 – moderado a intenso. 4 – intenso. P valores para Teste de Kruskal-Wallis. Significante quando $p < 0.05$

Figura 5.2 – Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “Infiltrado inflamatório” comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p<0.05$ Teste de Kruskal-Wallis

Figura 5.3 – Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “reação a corpo estranho” comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p<0.05$ Teste de Kruskal-Wallis

Figura 5.4 – Representação gráfica dos valores médios dos escores de intensidade para a variável “neoformação óssea” comparativamente entre grupos e períodos de observação. NS – não significativo pelo Teste de Kruskal-Wallis

Figura 5.5 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 7 dias em **A** *Grupo Controle* apresenta região do corte do defeito infiltrado inflamatório neutrofílico (asterisco) e área de hemorragia; em **B** *Grupo Teste* com maior quantidade de infiltrado inflamatório e tecido de granulação e agrupamentos de material exógeno (seta). Período de 14 dias em **C** *Grupo Controle* mostrando organização do tecido de granulação (seta) células gigantes e início de neoformação óssea (seta descontinua) em **D** *Grupo Teste* presença de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação, intenso tecido conjuntivo com agrupamentos de material exógeno(seta). Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 10X

Figura 5.6 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 21 dias em **A** *Grupo Controle* presença de tecido de granulação organizado e formação de trabéculas ósseas na região do defeito (seta); em **B** *Grupo Teste* presença de intenso infiltrado inflamatório, células gigantes multinucleadas e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso. Período de 42 dias em **C** *Grupo Controle* formação de trabéculas ósseas mais maduras na região do defeito (seta); em **D** *Grupo Teste* presença células gigantes e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso. Hematoxilina e eosina, aumento original, objetiva 10X

Figura 5.7 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 7 dias em **A Grupo Controle** apresenta região do corte infiltrado inflamatório neutrofílico sem neoformação óssea expressiva mas com organização de fibras colagênicas (*em azul*) (asterisco); em **B Grupo Teste** com maior quantidade de infiltrado inflamatório e tecido de granulação e agrupamentos de material exógeno. Período de 14 dias em **C Grupo Controle** mostrando organização do tecido de granulação e neoformação óssea imatura (seta) em **D Grupo Teste** presença de infiltrado inflamatório e de tecido de granulação, e organização de fibras colagênicas (*em azul*) em fibrose dos agrupamentos de material exógeno (seta descontinua). Tricrômio de Masson, aumento original, objetiva 10X

Figura 5.8 - Aspecto histológico do reparo do defeito ósseo: Período de 21 dias em **A** *Grupo Controle* presença de tecido de granulação bem vascularizado e formação de trabéculas ósseas maduras e imaturas na região do defeito (seta); em **B** *Grupo Teste* presença de intenso infiltrado inflamatório, células gigantes multinucleadas e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso colagênico (setas descontinuas). Período de 42 dias em **C** *Grupo Controle* formação de trabéculas ósseas mais maduras na região do defeito, *em vermelho* (seta); em **D** *Grupo Teste* presença células gigantes e manutenção de material exógeno envolto por tecido fibroso colagênico e áreas de hemorragia (setas). Tricrômio de Masson, aumento original, objetiva 10X

5.2.2 Achados histomorfométricos

A análise dos achados histomorfométricos evidenciaram que, aos 7 dias, a neoformação óssea foi significativamente maior no Grupo-teste em comparação ao Grupo-controle, e que esses valores não foram estatisticamente diferentes aos 14 dias, a despeito da variância significativa maior observada no Grupo-teste. Nos dois últimos períodos do estudo (21 e 42 dias), no entanto, houve neoformação óssea significativamente maior no Grupo-controle. Esses achados estão ilustrados na figura 5.9.

Figura 5.9 – Representação gráfica dos valores médios das áreas de neoformação óssea comparativamente entre grupos e períodos de observação. * diferenças significativas $p < 0.05$ Teste de Kruskal-Wallis

Nessa figura 5.9 é possível visualizar que não houve aumento importante na neoformação óssea do Grupo-teste do início ao fim do estudo ($p = 0,207$). Por outro lado, houve aumento significativo ($p < 0,0001$) na neoformação óssea do Grupo-controle a partir do 14º dia de estudo até o 42º dia de estudo.

5.2.3 Achados histoquímicos

A coloração do TRAP não mostrou presença de osteoclastos mas houve coloração positiva para algumas células gigantes que permeavam o tecido de granulação. O controle positivo utilizado para a coloração histoquímica mostrou coloração positiva para osteoclastos em ferida em processo de reparo em fêmur de rato (Figura 5.10).

Figura 5.10 - Cortes histológicos apresentando em A: região do reparo do defeito crítico no período de 42 dias exibindo coleções difusas de material exógeno (seta larga) permeados por tecido fibroso e inflamatório com presença de células gigantes coradas por TRAP (setas finas). Aumento original objetiva 40x. Em B: corte histológico de fêmur de rato com ferida óssea em processo de reparo exibindo osteoclastos corados por TRAP (seta fina). Aumento 40x

6 DISCUSSÃO

A literatura descreve que os fosfatos de cálcio e seus derivados, dentre eles o beta fosfato tricálcico, agem mais diretamente sobre os osteoblastos, e vêm sendo bastante estudados e utilizados como substitutos ósseos, já há mais de duas décadas, por promoverem neoformação óssea por osteocondução e por apresentarem boa biocompatibilidade (Meyer et al., 1993; Möller et al., 1994; Neo et al., 1998; Pioletti et al., 2000; Handschel et al., 2002; Matsumoto et al., 2009). Os seus efeitos como arcabouço inorgânico para regeneração do tecido ósseo já estão bem documentados, inclusive em lesões odontológicas (Aguirre Zorzano et al., 2007; Ortega et al., 2007; Mourelo et al., 2010; Zavaglia, 2011), apesar de achados ainda controversos, que variam desde neoformação óssea superior à observada em enxertos autógenos (Luvizuto et al., 2011) e a enxerto de osso bovino inorgânico (Velasco Ortega et al., 2007), até evidências robustas de osteogênese insuficiente (Orii et al., 2005; Gupta et al., 2007).

Neste estudo pudemos observar que o cimento composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com potencial zeta, não estimulou a neoformação óssea nos defeitos críticos confeccionados em calvária de ratos.

O biomaterial utilizado neste estudo (GeneX®) é relativamente novo e se trata de um composto cerâmico preparado com carga de superfície negativa. As investigações acerca de sua eficácia têm se voltado mais frequentemente para o reparo de defeitos da coluna vertebral ou de outros ossos longos (Liu; Lun, 2012; Yang et al., 2012). Alguns autores observaram efeitos adversos (Friesenbichler et al., 2014) desse biomaterial sobre os tecidos moles a despeito de boa neoformação óssea (Saadoun et al., 2011), embora outros autores atribuam esses resultados inesperados ao uso ainda inadequado do biomaterial (Laycock; Cooper, 2014).

Publicações recentes, como vimos no capítulo da Revista de Literatura concluíram que este tipo de substituto ósseo não deveria ser utilizado para o tratamento de defeitos ósseos (Friesenbichler et al., 2014). Entretanto, como ainda não há na literatura estudos in vivo que tenham se preocupado em verificar os efeitos deste tipo de material sobre reparos de defeitos ósseos o presente estudo vem corroborar com os resultados clínicos relatados tentando mostrar seu comportamento nos tecidos

dos sob o ponto de vista histológico. A relevância deste estudo deve ser ressaltada pois sob o ponto de vista histopatológico não existiam estudos que revelassem o comportamento deste material no tecido vivo.

Como a proposta do fabricante foi inserir um tratamento de superfície nas partículas de fosfato de cálcio que possibilitasse a osteoindução, um modelo de defeito ósseo crítico poderia fornecer informações importantes se a neoformação óssea ocorresse onde ela não seria esperada. Este tipo de modelo é bastante descrito na literatura e está de certa forma consagrado para este tipo de ensaio in vivo (Einhorn, 1999; Cacchioli et al., 2006; Bodde et al., 2008; Messori et al., 2008; Efeoglu et al., 2009; Paulo Ade et al., 2011; Scotchford et al., 2011; Spicer et al., 2012). Utilizamos o modelo de defeito crítico em calvária de ratos pela facilidade de confecção, reprodutibilidade e pelo fato de que em 8mm de extensão o defeito permitiria verificar a ocorrência de osteocondução ou indução do material de forma padronizada e confiável.

O geneX® foi aplicado de forma a preencher os defeitos com uma quantidade padronizada para cada um seguindo rigorosamente as instruções de uso fornecida pelo fabricante. Nesse sentido, propusemo-nos a imitar a prática clínica. Como os defeitos produzidos foram rigorosamente padronizados, acreditamos que pequenas variações na quantidade de biomaterial possam ter ocorrido mas estamos certos de que este fato não influenciaria de forma contrária os resultados encontrados.

A apresentação dos achados microtomográficos de forma apenas ilustrativa pode ser considerada uma das fragilidades deste estudo. Uma análise mais aprofundada das imagens não foi possível devido ao número pequeno de espécimes alocados para este fim. A possibilidade de obtenção destas imagens surgiu junto ao equipamento multiusuário no Instituto de Biociências da Universidade na metade do desenvolvimento deste experimento e o processamento histológico havia se iniciado impossibilitando a seleção de outros espécimes. Reconhecemos entretanto que este tipo de avaliação seja encorajado pois pode permitir importante diminuição do número de animais utilizados em pesquisas semelhantes com grande precisão nos resultados. Neste contexto julgamos importante divulgar as imagens obtidas.

Obviamente, a presença de um infiltrado inflamatório significativamente maior no Grupo-teste está diretamente relacionada com a maior resposta a corpo estranho presente quando comparado ao grupo-controle. Este achados corroboram e contribuem para justificar as complicações inflamatórias exacerbadas em tecidos moles referidas por outros autores (Saadoun et al., 2011; Friesenbichler et al., 2014) que empregaram esta cerâmica como substituto ósseo em estudo clínico. O fato da resposta corpo estranho permanecer por todo o período do experimento pode levar a formação de agrupamentos de material que de forma encapsulada deverão ser expulsos da região da ferida isso pode contribuir para a explicação da descrição dos “cistos de tecido mole” feita por alguns autores (Friesenbichler et al., 2014).

Conforme os achados histomorfométricos, a proposta de uma neoformação óssea mais significativa no Grupo Teste também não foi comprovada por este modelo. Os resultados mostram que ocorreu formação óssea mais intensa no Grupo Controle significativamente maior que no Grupo-Teste, negando nossa hipótese que poderia haver um potencial osteoindutivo neste tipo de fosfato de cálcio. Os resultados mostraram que a superioridade na formação óssea no controle leva-nos a acreditar que o beta fosfato tricálcico não só impediu como atrapalhou a neoformação óssea no defeito.

Nossos resultados estão de acordo ainda com o de outros autores (Gera et al., 2002; Frota et al., 2011) nos quais a aplicação de beta fosfatos tricálcicos para reparo de perda óssea, em defeito menores e estudos cruzados no mesmo animal, também não influenciou na quantidade de neoformação óssea.

Para nos certificarmos que poderia haver uma maior reabsorção óssea foi realizada reação histoquímica para expressão de osteoclastos na região da ferida, realizada a coloração de TRAP. Entretanto, os resultados mostraram que as células gigantes da resposta corpo estranho mostraram positividade para este marcador bioquímico. Isto pode levar a hipótese que a presença do material no tecido possa ter induzido sinalizações bioquímicas específicas para que isso ocorresse. Assim, provavelmente as células gigantes na tentativa de reabsorver material exógeno também pode ter reabsorvido osso. Para que este fato seja melhor explicado estudos que mostrem a expressão imunoistoquímica ou a quantificação de proteínas específicas relacionadas com o reparo e a indução de formação de tecido ósseo devem ser

realizadas.

Obviamente que estudos de biologia molecular poderiam mostrar com maior consistência se ocorre ou não o estímulo de proteínas, ou fatores de crescimento de indução óssea ou de reabsorção óssea na presença de beta fosfato tricálcico com tratamento de superfície dependendo de sua nanoestrutura como explicaram alguns autores (Ghanaati et al., 2010).

Uma série de aspectos que envolvem os beta-fosfatos tricálcicos, aqui representados pelo GeneX®, enquanto biomateriais para reconstrução de perdas ósseas foram discutidos. Procuramos destacar o quanto são controversos os efeitos clínicos descritos desses materiais.

No momento em que esta pesquisa foi planejada, esperávamos encontrar efeitos benéficos do GeneX® na regeneração óssea, sobretudo considerando que se trata de material que já era aplicado clinicamente.

Ao final, nossos resultados são relevantes considerando que ratificam que este tipo de cerâmica não deva ser utilizado como substituto ósseo. E que os resultados apresentados contribuam para a modificação da estrutura físico-química e das características granulares deste material e que sinalizem a necessidade da melhora na manufatura de um biomaterial seguro.

7 CONCLUSÃO

Nos limites deste estudo, o cimento cerâmico bifásico composto por sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta não induziu ou conduziu a neoformação óssea de defeitos ósseos críticos de 8 mm criados em calvária de ratos Wistar.

REFERÊNCIAS¹

Aghdasi B, Montgomery SR, Daubs MD, Wang JC. A review of demineralized bone matrices for spinal fusion: the evidence for efficacy. *Surgeon*. 2013 Feb;11(1):39-48.

Aguirre Zorzano LA, Rodríguez Tojo MJ, Aguirre Urizar JM. Maxillary sinus lift with intraoral autologous bone and B--tricalcium phosphate: histological and histomorphometric clinical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 Nov 1;12(7):E532-6.

Alt V, Kögelmaier DV, Lips KS, Witt V, Pacholke S, Heiss C, Kampschulte M, Heine-mann S, Hanke T, Thormann U, Schnettler R, Langheinrich AC. Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta Biomater*. 2011 Oct;7(10):3773-9.

Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S26-32.

Biocomposites L. GeneX[®]. Injectable bone graft with ZPC. Biocomposites, Ltda. [Citado 15 fe. 2014]. Disponível em: <http://www.biocomposites.com/ortho/Genex2.asp>.

Block MS. Horizontal ridge augmentation using particulate bone. *Atlas Oral Maxillo-fac Surg Clin North Am*. 2006 Mar;14(1):27-38.

Bodde EW, Boerman OC, Russel FG, Mikos AG, Spauwen PH, Jansen JA. The kinetic and biological activity of different loaded rhBMP-2 calcium phosphate cement implants in rats. *J Biomed Mater Res A*. 2008 Dec 1;87(3):780-91.

Boo JS, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2002 Mar;13(2):231-9; discussion 240-3.

Boos FBDJ, Pereira RS, Pellizzer EP, Garcia Junior IR, Vieira EH. O uso do beta-tricálcio fosfato como substituto ósseo em Odontologia. *Implant News*. 2013;10(1):89.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

Bosch C, Melsen B, Gibbons R, Vargervik K. Human recombinant transforming growth factor-beta 1 in healing of calvarial bone defects. *J Craniofac Surg*. 1996 Jul;7(4):300-10.

Cacchioli A, Spaggiari B, Ravanetti F, Martini FM, Borghetti P, Gabbi C. The critical sized bone defect: morphological study of bone healing. *Ann Fac Med Vet Parma*. 2006;26:97-110.

Carter DR, Beaupré GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res*. 1998 Oct;(355 Suppl):S41-55.

Carvalho EV. Desenvolvimento de nanobiocompósitos para aplicação em sistemas de liberação controlada de fármaco [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Engenharia e Ciências de Materiais; 2013.

Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg*. 2010 Jun;125(6):1685-92.

Dahabreh Z, Calori GM, Kanakaris NK, Nikolaou VS, Giannoudis PV. A cost analysis of treatment of tibial fracture nonunion by bone grafting or bone morphogenetic protein-7. *Int Orthop*. 2009 Oct;33(5):1407-14.

De Long WG Jr, Einhorn TA, Koval K, McKee M, Smith W, Sanders R, Watson T. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2007 Mar;89(3):649-58.

Dempster DW. New concepts in bone remodeling. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP. *Dynamics of bone and cartilage metabolism*. San Diego: Academic Press; 1999. p. 261-73.

Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011 Sep;42 Suppl 2:S3-15.

Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005 Dec;36(12):1392-404.

Dinopoulos C. Re: The article "Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. Bone graft substitutes: what are the options? Surgeon. 2012 Aug;10(4):230-9. Retraction in: Surgeon. 2013 Apr;11(2):115.

Eckardt H, Ding M, Lind M, Hansen ES, Christensen KS, Hvid I. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model. J Bone Joint Surg Br. 2005 Oct;87(10):1434-8.

Efeoglu C, Burke JL, Parsons AJ, Aitchison GA, Scotchford C, Rudd C, Vikram A, Fisher SE. Analysis of calvarial bone defects in rats using microcomputed tomography: potential for a novel composite material and a new quantitative measurement. Br J Oral Maxillofac Surg. 2009 Dec;47(8):616-21.

Efeoglu C, Fisher SE, Ertürk S, Oztop F, Günbay S, Sipahi A. Quantitative morphometric evaluation of critical size experimental bone defects by microcomputed tomography. Br J Oral Maxillofac Surg. 2007 Apr;45(3):203-7.

Einhorn TA. Clinically applied models of bone regeneration in tissue engineering research. Clin Orthop Relat Res. 1999 Oct;(367 Suppl):S59-67.

Epari DR, Kassi JP, Schell H, Duda GN. Timely fracture-healing requires optimization of axial fixation stability. J Bone Joint Surg Am. 2007 Jul;89(7):1575-85.

Fierz FC, Beckmann F, Huser M, Irsen SH, Leukers B, Witte F, Degistirici O, Andronache A, Thie M, Müller B. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. Biomaterials. 2008 Oct;29(28):3799-806.

Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. J Bone Joint Surg Am. 2002 Mar;84-A(3):454-64.

Foster RD, Anthony JP, Sharma A, Pogrel MA. Vascularized bone flaps versus non-vascularized bone grafts for mandibular reconstruction: an outcome analysis of primary bony union and endosseous implant success. Head Neck. 1999 Jan;21(1):66-71.

Friesenbichler J, Maurer-Ertl W, Sadoghi P, Pirker-Fruehauf U, Bodo K, Leithner A. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: lessons learned from using tricalcium phosphate geneX®. Clin Orthop Relat Res. 2014 Mar;472(3):976-82.

Frota R, Da Silva-Júnior VA, Teixeira M, Sobral AP, Emanuel-Dias-de Oliveira e Silva, Da Silveira MM, Aragão-Neto AC. Histological evaluation of bone repair using β -tricalcium phosphate. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e190-4.

Gera I, Döri F, Keglevich T, Anton S, Szilágyi E, Windisch P. [Experience with the clinical use of beta-tri-calcium phosphate (Cerasorb) as a bone replacement graft material in human periodontal osseous defects]. *Fogorv Sz*. 2002 Aug;95(4):143-7.

Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater*. 2010 Dec;6(12):4476-87.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 3:S20-7.

Gomes LC, Di Lello BC, Campos JB, Sampaio M. Síntese e caracterização de fosfatos de cálcio a partir da casca de ovo de galinha. *Cerâmica*. 2012 oct./dec.;58(348):448-52.

Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011 Jan;45(1):14-24.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT. Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF-beta isoforms. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Aug;106(2):360-71; discussion 372.

Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN; American Academy of Orthopaedic Surgeons. The Committee on Biological Implants. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 2 Pt 2:98-103.

Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova* 2010; 33(6):1352-8.

Guerrier G, Alaqeeli A, Al Jawadi A, Foote N, Baron E, Albustanji A. Reconstruction of residual mandibular defects by iliac crest bone graft in war-wounded Iraqi civilians, 2006-2011. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jun 28. pii: S0266-4356(12)00450-0. doi: 10.1016/j.bjoms.2012.06.003. [Epub ahead of print]

Gupta MC, Theerajunyaporn T, Maitra S, Schmidt MB, Holy CE, Kadiyala S, Bruder SP. Efficacy of mesenchymal stem cell enriched grafts in an ovine posterolateral lumbar spine model. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2007 Apr 1;32(7):720-6; discussion 727.

Handa T, Anada T, Honda Y, Yamazaki H, Kobayashi K, Kanda N, Kamakura S, Echigo S, Suzuki O. The effect of an octacalcium phosphate co-precipitated gelatin composite on the repair of critical-sized rat calvarial defects. *Acta Biomater*. 2012 Mar;8(3):1190-200.

Handschel J, Wiesmann HP, Stratmann U, Kleinheinz J, Meyer U, Joos U. TCP is hardly resorbed and not osteoconductive in a non-loading calvarial model. *Biomaterials*. 2002 Apr;23(7):1689-95.

Herford AS, Boyne PJ. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Apr;66(4):616-24.

Holtzclaw D, Toscano N, Eisenlohr L, Callan D. The safety of bone allografts used in dentistry: a review. *J Am Dent Assoc*. 2008 Sep;139(9):1192-9.

Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 Jan;41(1):114-20.

Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials*. 2007 May;28(15):2491-504.

Jones AC, Milthorpe B, Averdunk H, Limaye A, Senden TJ, Sakellariou A, Sheppard AP, Sok RM, Knackstedt MA, Brandwood A, Rohner D, Hutmacher DW. Analysis of 3D bone ingrowth into polymer scaffolds via micro-computed tomography imaging. *Biomaterials*. 2004 Sep;25(20):4947-54.

Kerammaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis PV. Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008 Sep;39 Suppl 2:S45-57.

Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg*. 2005 Jan-Feb;13(1):77-86.

Klein P, Schell H, Streitparth F, Heller M, Kassi JP, Kandziora F, Bragulla H, Haas NP, Duda GN. The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res*. 2003 Jul;21(4):662-9.

Knabe C, Driessens FC, Planell JA, Gildenhaar R, Berger G, Reif D, Fitzner R, Radlanski RJ, Gross U. Evaluation of calcium phosphates and experimental calcium phosphate bone cements using osteogenic cultures. *J Biomed Mater Res*. 2000 Dec 5;52(3):498-508.

Larsson S. Calcium phosphates: what is the evidence? *J Orthop Trauma*. 2010 Mar;24 Suppl 1:S41-5.

Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. 2006 Jan;3(1):49-57.

Laycock PA, Cooper JJ. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: lessons learned from using tricalcium phosphate geneX®. *Clin Orthop Relat Res*. 2014 Feb;472(2):765-6.

Li Y, Dänmark S, Edlund U, Finne-Wistrand A, He X, Norgård M, Blomén E, Hulténby K, Andersson G, Lindgren U. Resveratrol-conjugated poly- ϵ -caprolactone facilitates in vitro mineralization and in vivo bone regeneration. *Acta Biomater*. 2011 Feb;7(2):751-8.

Liu B, Lun DX. Current application of β -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. *Orthop Surg*. 2012 Aug;4(3):139-44.

Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res*. 2002 Oct;62(1):1-13.

Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials*. 2011 May;32(15):3855-61.

Marx RE, Garg AK. Bone structure, metabolism, and physiology: its impact on dental implantology. *Implant Dent*. 1998;7(4):267-76.

Matsumoto G, Omi Y, Kubota E, Ozono S, Tsuzuki H, Kinoshita Y, Yamamoto M, Tabata Y. Enhanced regeneration of critical bone defects using a biodegradable gelatin sponge and beta-tricalcium phosphate with bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res.* 2009 Nov;24(4):327-42.

McSheehy PM, Chambers TJ. Osteoblast-like cells in the presence of parathyroid hormone release soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption. *Endocrinology.* 1986 Oct;119(4):1654-9.

Meads BM, Scougall PJ, Hargreaves IC. Wrist arthrodesis using a Synthes wrist fusion plate. *J Hand Surg Br.* 2003 Dec;28(6):571-4.

Messora MR, Nagata MJ, Dornelles RC, Bomfim SR, Furlaneto FA, de Melo LG, De-liberador TM, Bosco AF, Garcia VG, Fucini SE. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *J Periodontol Res.* 2008 Dec;43(6):723-9.

Meyer U, Szulczewski DH, Möller K, Heide H, Jones DB. Attachment kinetics and differentiation of osteoblasts on different biomaterials. *Cells Mater.* 1993;3(2):129-40.

Möller K, Meyer U, Szulczewski DH, Heide H, Priessnitz B, Jones DB. The influence of zeta potential and interfacial tension on osteoblast-like cells. *Cells Mater.* 1994;4(3):263-74.

Mourelo JP, Guerra AJ, Guil LM, Egea JJS, Ortega EV. Regeneración ósea guiada con implante unitario con nanosuperficie y betafosfato tricálcico. *Rev Periodoncia.* 2010 dic.;22(3):127-37.

Neo M, Herbst H, Voigt CF, Gross UM. Temporal and spatial patterns of osteoblast activation following implantation of beta-TCP particles into bone. *J Biomed Mater Res.* 1998 Jan;39(1):71-6.

Orii H, Sotome S, Chen J, Wang J, Shinomiya K. Beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion. *J Med Dent Sci.* 2005 Mar;52(1):51-7.

Ortega EV, Mourelo JP, Egea JJS, Perez OP, Soteras RM. La utilización del betafosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. *Rev Periodoncia.* 2007 dic.;19(3):141-9.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res.* 1987 Dec;2(6):595-610.

Paulo Ade O, Castro-Silva II, Oliveira DF, Machado ME, Bonetti-Filho I, Granjeiro JM. Repair of critical-size defects with autogenous periosteum-derived cells combined with bovine anorganic apatite/collagen: an experimental study in rat calvaria. *Braz Dent J.* 2011;22(4):322-8.

Pellegrini G, Seol YJ, Gruber R, Giannobile WV. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res.* 2009 Dec;88(12):1065-76.

Pioletti DP, Takei H, Lin T, Van Landuyt P, Ma QJ, Kwon SY, Sung KL. The effects of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions. *Biomaterials.* 2000 Jun;21(11):1103-14.

Polo CI, Lima JL, De Lucca L, Piacezzi CB, Naclério-Homem Mda G, Arana-Chavez VE, Sendyk WR. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein 2 associated with a variety of bone substitutes on vertical guided bone regeneration in rabbit calvarium. *J Periodontol.* 2013 Mar;84(3):360-70.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010 Aug 13;285(33):25103-8.

Ruhé PQ, Kroese-Deutman HC, Wolke JG, Spauwen PH, Jansen JA. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants in cranial defects in rabbits. *Biomaterials.* 2004 May;25(11):2123-32.

Saadoun S, Macdonald C, Bell BA, Papadopoulos MC. Dangers of bone graft substitutes: lessons from using GeneX. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011 Aug;82(8):e3. doi: 10.1136/jnnp.2010.232371. Epub 2011 Mar 8. Erratum in: *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011 Aug;82(8):944.

Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Oct;19(5):459-66. doi: 10.1016/j.semcdb.2008.07.004. Epub 2008 Jul 25.

Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 1986 Apr;(205):299-308.

Schwartz CE, Martha JF, Kowalski P, Wang DA, Bode R, Li L, Kim DH. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health Qual Life Outcomes*. 2009 May 29;7:49. doi: 10.1186/1477-7525-7-49.

Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B. Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol*. 2003 Feb;48(2):155-60.

Scotchford CA, Shahtaheri M, Chen PS, Evans M, Parsons AJ, Aitchison GA, Efeoglu C, Burke JL, Vikram A, Fisher SE, Rudd CD. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated, degradable, long fibre composite implants. *J Biomed Mater Res A*. 2011 Jan;96(1):230-8.

Sen CK, Roy S. Redox signals in wound healing. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1348-61.

Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008 Apr 1;15:53-76.

Shimaoka H, Dohi Y, Ohgushi H, Ikeuchi M, Okamoto M, Kudo A, Kirita T, Yonemasu K. Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal stem cells in porous hydroxyapatite ceramic. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Jan 1;68(1):168-76.

Smeets R, Kolk A, Gerressen M, Driemel O, Maciejewski O, Hermanns-Sachweh B, Riediger D, Stein JM. A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. *Head Face Med*. 2009 Jun 13;5:13. doi: 10.1186/1746-160X-5-13.

Simunek A, Kopecka D, Somanathan RV, Pilathadka S, Brazda T. Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008 Sep-Oct;23(5):935-42.

Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1918-29.

Tsiridis E, Upadhyay N, Giannoudis P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*. 2007 Mar;38 Suppl 1:S11-25.

Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Aug;25(8):879-93. doi: 10.1111/clr.12194. Epub 2013 Jun 7.

Val JEMS, Guirado JLC, Ruiz RAD, Fernandez MPR, Martinez IM, Marin JMG, Negri B, Chiva-Garcia F, Martinez-Gonzalez JM, Aza PN. New block graft of α -TCP with silicon in critical size defects in rabbits: chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. *Ceramics International* 2012 Mar;38(2):1563-70.

Velasco Ortega E, Pato Mourelo J, Segura Egea JJ, Pérez Pérez O, Medel Soteras R. La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral. *Avances Periodoncia*. 2007 dic.;19(3):141-50.

Yang HL, Zhu XS, Chen L, Chen CM, Mangham DC, Coulton LA, Aiken SS. Bone healing response to a synthetic calcium sulfate/ β -tricalcium phosphate graft material in a sheep vertebral body defect model. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012 Oct;100(7):1911-21.

Zavaglia FC. Síntese, caracterização e processamento de beta fosfato tricálcico para a manufatura de implantes personalizados [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 2011.

Zemann W, Feichtinger M, Kowatsch E, Kärcher H. Extensive ameloblastoma of the jaws: surgical management and immediate reconstruction using microvascular flaps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007 Feb;103(2):190-6.

Zhao J, Hu J, Wang S, Sun X, Xia L, Zhang X, Zhang Z, Jiang X. Combination of β -TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs to heal critical size mandibular defects in rats. *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):46-54.

Zouhary KJ. Bone graft harvesting from distant sites: concepts and techniques. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Aug;22(3):301-16.

ANEXO A – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **88** nas fls. **106** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Maria Cristina Zindel Deboni**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "*O uso do icariin sistêmico no reparo de defeitos ósseos-estudo em ratos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rafael Augusto Burim, Daniel Falbo, Camilla Vieira Esteves dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **25.08.2011**, com validade de 1 anos.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

ANEXO B – Aprovação do CEP/CEUA da FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Tel. (11) 3091 7887/7863

Certificado

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **006/2014** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a). **Maria Cristina Zindel Deboni** Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Avaliação da reparação de defeitos ósseos críticos na calvária de ratos Wistar preenchidos com cimento de β -Tricálcio**" do qual participam o(s) pesquisador(es) **Daniel Falbo Martins de Souza e Daniel Isaak Sendyk**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **16/06/2014**, com validade de **03 (três)** anos.

São Paulo, 16 de junho de 2014.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEUA-FOUSP

ANEXO C – Declaração de conflito de interesse

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

O autor, Daniel Falbo Martins de Souza, abaixo assinado da Tese intitulada **“O efeito do cimento composto de sulfato de cálcio e beta fosfato tricálcico com controle de potencial zeta sobre o reparo de defeitos ósseocríticos em calvária de ratos”** declara a inexistência de conflito de interesses em relação ao presente trabalho.

Dr. Daniel Falbo M. Souza
Cirurgião Buco-Maxilo-Facial
67083

Daniel Falbo Martins de Souza

São Paulo, 02 de julho de 2015.