UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

LEONARDO MARQUES

**Desenvolvimento, caracterização e desempenho biológico de um
novo biomaterial de liberação controlada à base de carbonato de
lítio aplicado ao reparo ósseo**

BAURU
2017

LEONARDO MARQUES

Desenvolvimento, caracterização e desempenho biológico de um novo biomaterial de liberação controlada à base de carbonato de lítio aplicado ao reparo ósseo

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Reabilitação Oral.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida

Versão corrigida

BAURU
2017

M348d Marques, Leonardo
Desenvolvimento, caracterização e desempenho
biológico de um novo biomaterial de liberação controlada
à base de carbonato de lítio aplicado ao reparo ósseo /
Leonardo Marques. – Bauru, 2017.
170 p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de
Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a. Dr^a Ana Lúcia Pompéia Fraga de
Almeida

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru FOB/USP

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 026/2013
Data: 20/08/2013

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à **Maria Aparecida Simionato Marques**, minha mãe, que nunca mediu esforços no que se diz respeito a minha formação pessoal e profissional, pelo amor, pelo exemplo e pela incansável dedicação frente às dificuldades.

E ainda, a todos os mestres que participaram desta realização.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela força, determinação e proteção durante esse anos de estudo e dedicação à Odontologia.

Meu agradecimento especial a minha orientadora e amiga **Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Fraga Pompéia de Almeida**, pela recepção, carinho e competência com que me recebeu na Faculdade de Odontologia de Bauru em 2013. Agradeço a todas as oportunidades de estar ao seu lado, pelos ensinamentos, pelo otimismo, ética, honestidade e competência com que sempre demonstra ao seu redor.

Meu imenso agradecimento a **Prof. Dra. Simone Soares**, pela amizade, carinho e pelo exemplo profissional que sempre me serviu de exemplo profissional e pessoal, além da contribuição com a valiosa experiência científica e intelectual. Estendo meu sincero agradecimento ao amigo **José Homero Elias** pela amizade e parceria sempre presente.

Agradeço imensamente a **Prof^a. Dr^a. Angela Kinoshita** pelas orientações de Iniciação Científica, Mestrado, e pelo valioso auxílio no tratamento estatístico desde trabalho. Agradeço ainda pela amizade e carinho com que ela e o **Prof. Dr. Sérgio Koodi Kinoshita** sempre me trataram.

Agradeço aos **Prof. Dra. Karin Hermana Neppelenbroek**, **Prof. Dra. Lucimar Falavinha**, **Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos**, **Prof. Dr. Accácio Lins Do Valle**, **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, pelos ensinamentos a mim dispensados.

Agradeço especialmente as auxiliares de saúde bucal **Rosimeire Rita Nunes**, **Fernanda Lorigeto** e **Keyla Mara Pertuzzati** pelo auxílio na fase de preparação das peças histológicas e pela companhia agradável e alegria nos plantões noturnos na UPA Zona Norte.

Aos amigos **Gabriela Cristina Oliveira, Marlos Giuliano Terccioti, Luis Fernando Simoneti, Priscila Gonçalves, Vinicius Rizzo Marques, Roberta Handem Abujamra, Luis Augusto Espero e Michyele Sbrana** pelo auxílio na fase experimental.

Aos funcionários do Biotério, **Luís e Erasmo**, pelo cuidado com os animais e pela colaboração neste projeto. À amiga veterinária **Dra. Amanda Maia** que contribuiu no piloto experimental deste trabalho.

Ao funcionário **João Bosco de Mendonça e Marcos Silva de Souza** do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA e amigo e funcionário do Laboratório de Biologia Molecular e Fotomicroscopia, **Wilson Orcini**, no auxílio da aquisição de imagens microscópicas.

Agradeço especialmente a colega **Dra. Roberta Heiffig Handen Abujamra** pela amizade, parceria e auxílio nas fases metodológicas deste trabalho. Estendo meu agradecimento à gerente da clínica RADIOFAST Bauru **Vanderléia Durães** pelo auxílio nas aquisições de imagens tomográficas.

Meu agradecimento ao **Prof. Dr. Estevam Bonfante e Prof. Dra. Vanessa Soares Lara**, membros da banca de qualificação deste trabalho, pelas sugestões e considerações científicas prestadas.

Aos amigos e colegas da Turma de Doutorado pelo companheirismo, sugestões e participação neste trabalho.

A todos funcionários e professores do Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – USP

Agradeço à Coordenadoria de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – CAPES, pelo auxílio financeiro.

*“Só os que arriscam ir longe demais são capazes de descobrir o
quão longe se pode ir”.*

Thomas Stearns Eliot

RESUMO

Neste trabalho desenhrou-se bases de desenvolvimento, caracterização e avaliação dos aspectos biológicos relacionados ao Sistema BoneLithium, idealizado a partir da associação de partículas de carbonato de lítio dispersas em matriz gel de caropol®, com capacidade de atuar como um sistema liberador de fármacos. Metodologicamente este estudo se dividiu em quatro partes: Na primeira delas, o objetivo central foi o desenvolvimento e a caracterização do biomaterial através da manipulação farmacológica. Na segunda etapa, avaliou-se a reação tecidual em subcutâneo de ratos, na terceira a influência das partículas de lítio liberadas pelo Sistema BoneLithium no reparo ósseo através de modelos experimentais utilizando coelhos, e por ultimo, a capacidade de cicatrização de defeitos ósseos criados cirurgicamente em calvária de ratos, tratados com o biomaterial e diferentes opções de enxertos ósseos com o objetivo de comparar a eficiência do Sistema BoneLithium aos protocolos pré-existentes. Experimentalmente, avaliou-se a reação tecidual onde se utilizou 15 ratos machos divididos aleatoriamente em 5 grupos onde implantou-se no subcutâneo tubos de “butterfly” contendo o biomaterial por períodos de preservação recomendados pela norma ADA 10993 para teste de reação tecidual. Os resultados demonstram que o Sistema BoneLithium apresenta reação tecidual normal. Para a avaliação do comportamento biológico do Sistema BoneLithium foram utilizados coelhos brancos adultos da raça *New Zealand* nos quais defeitos ósseos bilaterais de 1 cm de diâmetro foram confeccionados cirurgicamente na calvária e foram Tratados com o *Sistema Bone Lithium* do (lado Direito) e somente o Gel de Carbopol (lado esquerdo)/Coágulo sanguíneo (controle). A Histomorfometria demonstrou comportamento favorável ao reparo ósseo e adicionalmente através de Microtomografia Computadorizada (μ CT SKYSCAN), foi possível constatar diferenças significativas considerando $p > 0.05$ (ANOVA, Tukey) para o processo de reparo ósseo. A avaliação da performance do Sistema BoneLithium utilizando ratos *Wistar* nos quais foram criados defeitos críticos no centro da calvária e tratados com diferentes modalidades de enxertos ósseos (controle, autógeno, osso de banco (Unioss®, Marília Brasil), Bio-Oss® e associações com o Sistema BoneLithium. A histomorfometria mostrou diferenças significativas considerando $p > 0.05$ (ANOVA, Tukey) para avaliação de tecido conjuntivo pré-osteogênico e tecido ósseo neoformado, e quando avaliado qualitativamente por tomografia computadorizada de feixe cônico (I cat – Cone Beam – FOV 0.05 – Xoran Technology, LLC, EUA e E-vol, CDT, Brasil), observaram-se áreas de neoformação óssea compatíveis com hiperdensidade óssea em toda a extensão do defeito quando apuradas em análises de paridade em escala Hounsfield. Dessa forma, conclui-se que no contexto deste estudo é possível concluir que *Sistema BoneLithium* representa uma alternativa com potencial viabilidade clínica e necessita seguimento de aplicação em novas metodologias.

Palavras-chave: Lítio. Reparo Ósseo. Processo de Reparo. Enxerto Ósseo

ABSTRACT

Development, characterization and biological performance of a new biomaterial of controlled release based on lithium carbonate applied to bone repair

In this work, bases for the development, characterization and evaluation of the biological aspects related to the BoneLithium System were designed, based on the association of lithium carbonate particles dispersed in carbopol® gel matrix, capable of acting as a drug-releasing system. Methodologically this study was divided in four parts: In the first one, the central objective was the development and characterization of the biomaterial through the pharmacological manipulation. In the second step, the tissue reaction was evaluated in subcutaneous of rats, in the third the influence of the lithium particles released by BoneLithium System in the bone repair through experimental models using rabbits, and finally, the capacity of healing of bone defects created surgically in Calvaria of rats, treated with the biomaterial and different options of bone grafts with the objective to compare the efficiency of the BoneLithium System to the preexisting protocols. Experimentally, the tissue reaction was evaluated in which 15 male rats were randomly divided into 5 groups, where butterfly tubes containing the biomaterial were implanted in the subcutaneous tubes for preservation periods recommended by the ADA 10993 standard for biocompatibility test. The results demonstrate that the BoneLithium System is tissue reaction positive. To evaluate the biological behavior of the BoneLithium System, adult New Zealand white rabbits were used in which bilateral bone defects of 1 cm in diameter were surgically made on calvaria and treated with the Bone Lithium System (right side) and only Gel Of Carbopol (left side) / blood clot (control). Histomorphometry showed a favorable behavior to bone repair and, in addition, through Computerized Microtomography (μ CT SKYSCAN), it was possible to verify significant differences considering $p > 0.05$ (ANOVA, Tukey) for the bone repair process. The evaluation of the performance of the BoneLithium System using Wistar rats in which critical defects were created at the calvarial center and treated with different bone graft modalities (control, autogenous, bone bank (Uniooss®, Marília Brazil), Bio-Oss® and associations (ANOVA, Tukey) for evaluation of pre osteogenic connective tissue and neoformed bone tissue, and when assessed qualitatively by cone beam computed tomography (I cat - Cone Beam - FOV 0.05 - Xoran Technology, LLC, USA and E-vol, CDT, Brazil), areas of bone neoformation compatible with bone hyperdensity throughout the extent of the defect were ascertained in Hounsfield scale parity analyzes, It is concluded that in the context of this study it is possible to conclude that the BoneLithium System represents an alternative with potential clinical feasibility And requires follow-up of application in new methodologies.

Key words: Lithium. Bone Repair. Repair Process. Bone graft

.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Fotografia do Biomaterial: Sistema BoneLithium em seringas de dispensação.....	53
Figura 02:	Fotografia do Biomaterial: Sistema BoneLithium (gel de Carbopol®)	53
Figura 03:	Distribuição das amostras de biomateriais/implantes de tubo de polietileno contendo biomaterial. Ilustração por KATO, R. K, 2017....	56
Figura 04:	Procedimentos Cirúrgicos. a) Incisão b)Divulsão c)Implante dos tubos contendo biomateriais d) Sutura	57
Figura 05:	Modelo esquemático da região anatômica onde os defeitos ósseos foram criados. Calvária de Coelho <i>New Zealand</i> . Craniotomia Bilateral. Ilustração: KATO, R. K., 2017.....	59
Figura 06:	Sequência Cirúrgica da confecção de Defeitos Críticos em calota craniana de coelho: a) Delimitação e confecção defeito sob irrigação constante. (b) Área esquemática dos defeitos. (c) Exérese do fragmento ósseo e tratamentos propostos: Lado Direito: <i>Sistema Bone Lithium</i> e o defeito do lado esquerdo: Gel Carbopol®	61
Figura 07:	Análise tomográfica - Software E-vol3D – CDT, Brasil	63
Figura 08:	Imagem da tela Software <i>Image J</i> utilizado na análise histomorfométrica das imagens microscópicas	65
Figura 09:	Modelo esquemático da região anatômica do defeito ósseo crítico (0,8mm). Calvária de Rato <i>Rattus novergicus</i> . Ilustração: KATO, R. K., 2017.....	65
Figura 10:	Sequência Cirúrgica da confecção de Defeitos Críticos de 0,8mm em calota craniana de rato: a) Anestesia Infiltrativa Subperiosteal b) Incisão Linear c) Calota craniana com referencias anatômica d) Delimitação e confecção defeito sob irrigação constante e) Defeito crítico. (f) Tratamento do Defeito com Enxerto ósseo: Osso de Banco - Unioss® + Sistema BoneLithium.....	66

Figura 11:	Fotografia dos espécimes de tecido. Observe integridade dos a área onde o tudo de polietileno esta inserido. Grupo 180 dias – Biomaterial: Sistema BoneLithium.....	75
Figura 12:	Fotomicrografia da amostra de 7 dias após implante de tudo de polietileno em (A) vazio, (B) contendo gel de Carbopol® e (C) contendo SistemaBoneLithium no subcutâneo do dorso de ratos. Percebe-se que na imagem (C) a evolução celular inflamatória esta mais adiantada, caracterizada por aumento de células mononucleares e aparecimento de células gigantes. Aumento 40X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.....	76
Figura 13:	Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno contendo gel de Carbopol® em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	76
Figura 14:	Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	77
Figura 15:	Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno vazio (controle negativo) em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	77
Figura 16:	Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno vazio (controle negativo) em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para conteúdo tecidual no interior do tubo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	78
Figura 17:	Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para organização tecidual com resposta leve, formação de barreira fibrosa próximo a localização do tubo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	78
Figura 18:	Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para organização tecidual com resposta leve, formação de barreira fibrosa próximo a localização do tubo. Neste espécime o tudo foi removido para melhor visualização das áreas histológicas de conexão com a superfície do tudo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE	79

Figura 19:	Grupo Experimental Carbopol® - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).	79
Figura 20:	Grupo Experimental BoneLithium - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).	80
Figura 21:	Grupo Experimental BoneLithium - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).	80
Figura 22:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 7 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	81
Figura 23:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 14 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	81
Figura 24:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 60 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	82
Figura 25:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 84 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	82
Figura 26:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 180 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	83
Figura 27:	Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Mononucleares - Período: 7 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	83
Figura 28:	Macroscopia e identificação das peças anatômicas após coleta e corte na região dos defeitos	84
Figura 29:	Microtomografia computadorizada μ CT – Grupo Controle (coágulo) Período: 45 dias. SkyScan MicroCT	84

Figura 30:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 1 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol® - Período de 7 dias, formação de tecido conjuntivo Aumento 2X, Coloração – Hematoxilina Eosina HE e Tricrômico de Masson. Todas as lâminas foram coradas em ambas colorações85
Figura 31:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo) Período de 7 dias, formação de tecido conjuntivo Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson85
Figura 32:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol®) Período de 15 dias, neoformação óssea a partir de matriz de tecido conjuntivo. Observe que o Lado direito apresenta maiores quantidades de tecido ósseo, em ambos os grupos (G1/G2) sendo deste lado utilizado Sistema BoneLithium. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson87
Figura 33:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo) Período de 15 dias, neoformação óssea a partir de matriz de tecido conjuntivo. Observe que o Lado direito apresenta maiores quantidades de tecido ósseo, em ambos os grupos (G1/G2) sendo deste lado utilizado Sistema BoneLithium. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson88
Figura 34:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol®) Período de 45 dias, neoformação óssea caracterizada por maturação da matriz e deposição de minerais. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson88
Figura 35:	Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo. Período de 45 dias, neoformação óssea caracterizada por maturação da matriz e deposição de minerais. Observe que do lado esquerdo permanece sem completo fechamento do defeito. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson89
Figura 36:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (7 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda) considerando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).89

Figura 37:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (7 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	90
Figura 38:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (15 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda) considerando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	90
Figura 39:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (15 Dias – Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).	91
Figura 40:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (45 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	91
Figura 41:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (15 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	92
Figura 42:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (7 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	92
Figura 43:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (7 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	93
Figura 44:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (15 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	93
Figura 45:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (15 Dias – Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	94
Figura 46:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (45 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis)	94

Figura 47:	Gráfico da Morfometria de Tecido Conjuntivo (45 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).	95
Figura 48:	Macroscopia e identificação das peças anatômicas após coleta e corte na região dos defeito	95
Figura 49:	Manipulação de imagens tomográficas em Software E-Vol 3D CDT, Bauru, Brasil. Observe a padronização na tomada radiográfica - <i>Ratus norvegicus</i> . Grupos Experimentais.....	95
Figura 50:	Reconstrução 3D utilizando Software E-Vol 3D CDT, Bauru, Brasil. Observe a variação de filtros utilizada - <i>Ratus norvegicus</i> . Grupos Experimentais	96
Figura 51:	Padronização metodológica para análise e reconstrução tridimensional – E-vol 3D – CDT, Bauru, Brasil - <i>Ratus norvegicus</i> . Grupos Experimentais.....	99
Figura 52:	Fotomicrografia dos grupos <i>Sistema BoneLithium</i> - 15 dias após a cirurgia, evidenciando áreas de tecido conjuntivo osteogênico e presença de coágulo sanguíneo (A) células pré-osteogênicas e permeado por tecido conjuntivo (B) . Aumento 20X, coloração e Tricrômico de Masson	101
Figura 53:	Fotomicrografia dos grupos <i>Sistema BoneLithium</i> - 45 dias após a cirurgia, evidenciando áreas de tecido conjuntivo osteogênico e neoformação óssea característica: (A) Lacunas e Matriz óssea em mineralização (B) deposição de minerais, tecido em organização (C) trabéculas ósseas definidas. Aumento 20X, coloração e Tricrômico de Masson.	103
Figura 54:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 1 (coágulo) - 7 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson	103
Figura 55:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 2 (<i>Sistema BoneLithium</i>) - 7 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson	104
Figura 56:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 3 (osso autógeno) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson	104

Figura 57:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 4 (osso autógeno + sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.	104
Figura 58:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Uniooss®) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.....	105
Figura 59:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Uniooss® + Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson	105
Figura 60:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 45 (BioOss ®) - 15 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson	105
Figura 61:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 45 (BioOss ® + Sistema BoneLithium) - 15 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.....	106
Figura 62:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 3 (Autógeno + Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.....	106
Figura 63:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Uniooss®+ Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.....	106
Figura 64:	Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 8 (BioOss®- Uniooss®+ Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.....	107
Figura 65:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo controle - Coágulo - Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes (p<0.05, ANOVA, Tukey).....	107
Figura 66:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo controle - Coágulo - Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes (p<0.05, ANOVA, Tukey)	108

Figura 67:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 2 – <i>Sistema BoneLithium</i> Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	108
Figura 68:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 2 – <i>Sistema BoneLithium</i> - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	109
Figura 69:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Enxerto Autógeno</i> - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	109
Figura 70:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Enxerto Autógeno</i> – Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	110
Figura 71:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Enxerto Autógeno</i> + <i>Sistema BoneLithium</i> - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey).....	110
Figura 72:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Enxerto Autógeno</i> + <i>Sistema BoneLithium</i> - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	111
Figura 73:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Osso de Banco - Uniooss®</i> - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey).....	111
Figura 74:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – <i>Osso de Banco - Uniooss®</i> - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p<0.05$, ANOVA, Tukey)	112

Figura 75:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – Osso de Banco - Uniooss® + Sistema BoneLithium - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey)	112
Figura 76:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 3 – Osso de Banco - Uniooss® + Sistema BoneLithium - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	113
Figura 77:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo Geistlich Bio-Oss® - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).	113
Figura 78:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo Geistlich Bio-Oss® - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	114
Figura 79:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo Geistlich Bio-Oss® + Sistema BoneLithium - Borda Direita/BordaEsquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	114
Figura 80:	Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo Geistlich Bio-Oss® + Sistema BoneLithium – Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).	115
Figura 81:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	115
Figura 82:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	116

Figura 83:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	117
Figura 84:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	117
Figura 85:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	118
Figura 86:	Gráfico Histomorfometria de tecido ósseo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	118
Figura 87:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	119
Figura 88:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	119
Figura 89:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	120

Figura 90:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	120
Figura 91:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (Bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	121
Figura 92:	Gráfico Histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Descrição dos Grupos de animais.....	55
-----------	--------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURA, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Símbolo percentual
cm	Unidade de medida
mm	Unidade de medida
FDA	Food and Drug Administration
μCT	Micro Computer Tomograph (Micro Tomografia computadorizada)
kV	Quilovolt
μA	Microampére
pH	Potencial Hidrogeniônico
cps	Derivada da unidade de pascal para Viscosidade
mg/L	Miligrama por litro
LQ	Limite de quantificação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	29
2.1	Tecido Ósseo	29
2.2	Reparo Ósseo	30
2.3	Substitutos Ósseos.....	33
2.4	Carbonato de Lítio	35
2.5	Aplicações Científicas do Lítio	37
3	JUSTIFICATIVA.....	43
4	OBJETIVOS.....	47
4.1	Objetivo Geral	47
4.2	Objetivos Específicos	47
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
5.1	Aspectos Metodológicos.....	51
5.2	Delineamento dos Experimentos	51
5.3	PARTE A - “Desenvolvimento e Caracterização do Sistema BoneLithium”	52
5.3.1	Preparação do Biomaterial	52
5.3.2	Caracterização Físico-química.....	53
5.4	PARTE B – Estudo in vivo da reação tecidual do Sistema BoneLithium”	54
5.4.1	Procedimentos Cirúrgicos.....	54
5.4.2	Análise dos Resultados	57
5.5	PARTE C - “Estudo da Influência das partículas de Carbonato de Lítio liberadas pelo biomaterial no Reparo Ósseo”	58
5.5.1	Grupos Experimentais	59
5.5.2	Procedimentos Cirúrgicos.....	60
5.5.2.1	Anestesia e Assepsia	60
5.5.2.2	Técnica Cirúrgica.....	60
5.5.2.3	Preparo das peças e forma de análise dos resultados	61
5.5.2.1	Análise Microscópica: Histomorfometria	61
5.5.3	Análise por MicroCT (SkyScan µCT)	62
5.5.4	Análise Microscópica – Histomorfometria	62

5.6	PARTE D - “Desempenho do Sistema BoneLithium no processo de cicatrização de defeitos críticos criados na calvária de ratos, tratados com diferentes opções de enxertos”	64
5.6.1	Grupos Experimentais	64
5.6.2	Procedimentos Cirúrgicos	65
5.6.3	Análise dos Resultados	66
5.6.4	Preparação Histotécnica e Análise Microscópica	68
5.6.5	Análise Tomográfica	68
5.6.6	Análise Estatística	69
6	RESULTADOS.....	72
6.1.	PARTE A.....	72
6.1.1	Caracterização Físico-química.....	72
6.2	PARTE B.....	73
6.2.1	Descrição Macroscópica e Histológica	73
6.2.2	Tratamento Estatístico.....	79
6.3.	PARTE C.....	84
6.3.1	Análise Macroscópica.....	84
6.3.2	Análise Descritiva por Microtomografia Computadorizada μ CT	84
6.3.3	Descrição Histológica	86
6.3.4	Tratamento Estatístico.....	86
6.4	PARTE D.....	96
6.4.1	Análise Macroscópica.....	96
6.4.2	Análise Tomográfica	96
6.4.3	Descrição Histológica	99
6.4.4	Análise Estatística	107
7	DISCUSSÃO	124
8	CONCLUSÃO	130
9	REFERÊNCIAS.....	134
	ANEXOS	142

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A engenharia tecidual tem se mostrado um caminho promissor para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos aplicados aos mais diversos tipos de alterações patológicas, fisiológicas ou traumáticas que podem acometer diversas regiões do corpo humano. O desenvolvimento de novos biomateriais e sua aplicação em meio biológico constituiu uma ferramenta de alta viabilidade com foco em aplicações clínicas.

Os defeitos ósseos podem ser ocasionados por malformações congênitas, como é o caso das fissuras labiopalatinas (FREITAS et al., 2012), e pode ser decorrente de processos traumáticos ou patológicos.

O tecido ósseo apresenta um alto potencial de cicatrização, o que o torna capaz de cicatrizar fraturas ou defeitos locais com tecido regenerado, ou regenerar com organização estrutural muito similar ao tecido ósseo maduro adjacente.

O potencial regenerador do tecido ósseo, embora alto, tem limitações. Dessa maneira, se não houver um adequado suprimento vascular, uma estabilidade mecânica favorável, os defeitos forem extensos, pode-se ocorrer falhas no reparo. (BOSSHARDT; SCHENK, 2010; BUSER, 2010). Diante dessas limitações existe uma constante busca por substitutos ósseos, biomateriais, com mesmas características do osso autógeno que possam otimizar o processo de reparo ósseo (ALMEIDA et al., 2016).

Um biomaterial pode ser definido como todo e qualquer os material destinado a possuir uma interface com os sistemas biológicos seja para tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano (CALLIESTER, 2002).

As características que os biomateriais devem possuir são biocompatibilidade, não ser tóxico nem carcinogênico, apresentar bioestabilidade, propriedades mecânicas adequadas, peso e densidade adequados, ter custo relativamente baixo e ser de fácil processamento e manuseio, e além de, idealmente, ser bom osteocondutor e osteoindutor (BOOTH; PRICE, 1989; CALLIESTER, 2002; ALMEIDA et al., 2016).

O Lítio é uma droga que têm sido utilizadas no tratamento de diversas desordens psiquiátricas, tal como a depressão e o transtorno bipolar uma vez que

sua presença possibilita a estabilização do humor, controle de crises maníacas e também atua secundariamente como antidepressivo. Embora ainda não se tenha total conhecimento acerca da atuação do Lítio em diversas entidades fisiológicas, existem relatos na literatura acerca do aumento da massa óssea e da atividade de atuação no processo de reparação óssea (SCHOU, 2001; CLEMENT et al., 2005; YUN et al., 2013).

Autores descrevem que o Lítio atua no processo fisiológico da reparação óssea tendo como hipótese principal a indução da expressão da fosfatase alcalina e estímulo as β cateninas, atuando também em células pluripotentes que induzem a expressão de RNAm, expressando a ativação da sinalização Wnt β -catenina na regulação da homeostase óssea, fortemente ligada a regulação da proliferação e diferenciação celular dos osteoblastos (CHEN, 2007; WHETSTON, 2008; ZENG et al., 2011; ZENG et al., 2013; Li et al., 2017).

A estimulação da via canônica Wnt β -catenina promove a diferenciação osteoblástica de forma que a resposta de células mesenquimais ou osteoblásticas convergem para a oferta de fatores de diferenciação celular que guia a neoformação óssea aumentando a diferenciação ao longo da linhagem osteoblástica, que tomados em conjunto com a inibição de fatores de expressão gênica (GSK3b), desencadeiam o reparo ósseo. Um estudo publicado na Nature Medicine descreve a sinalização da via Wnt β -catenina como um fator crucial na homeostase óssea e demonstram que o lítio é um dos ativadores devem ser testados como uma abordagem possível para melhorar a neoformação óssea (BARON; KNEISSEL et al., 2012).

Diante de tais evidências científicas, este estudo objetiva o desenvolvimento, a caracterização e avaliação do desempenho biológico de um novo biomaterial de liberação controlada de carbonato de lítio que visa à otimização do processo de reparo ósseo.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido Ósseo

O tecido ósseo é o componente essencial do sistema esquelético, formando os ossos e conferindo a essas estruturas importantes funções, tais como: suporte, auxílio na movimentação e locomoção, proteção de órgãos vitais, alojamento da medula óssea, além servir como um reservatório de cálcio e fosfato ao organismo. Tal capacidade multifuncional desse tecido está diretamente relacionada com as características da sua matriz mineralizada, cuja integridade é mantida pela atividade coordenada de células ósseas especializadas (TAKAYANAGI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SCHROEDER; MOSHEIFF, 2011).

O osso é um tecido conjuntivo especializado, caracterizado principalmente, pela mineralização da sua matriz orgânica, a qual é composta de colágeno, proteínas não-colágenas e proteoglicanos. Dentro dessa matriz, íons de cálcio e fósforo se organizam na forma de hidroxiapatita, o que garante que esse tipo de tecido conjuntivo especializado resista a fortes pressões de cargas (BOSSHARDT; SCHENK, 2010; LINDHE, 2010).

De acordo com Katchburian e Arana (1999), o tecido ósseo é caracterizado pela fase mineral, constituída de diversos minerais tal como o fosfato de cálcio, sob a forma de cristais de hidroxiapatita associados à matriz orgânica previamente formada por água, células e componentes orgânicos. Os percentuais de constituição giram em torno de 65% da sua massa, sendo 65% de minerais e os 35% restantes por material orgânico (20%) e água (15%). Basicamente, no tecido ósseo têm-se três tipos celulares presentes nas diferentes fases do desenvolvimento do osso: as células formadoras da matriz orgânica óssea, os osteoblastos, os osteócitos, que são osteoblastos localizados no interior da matriz orgânica quando esta sofre o processo de calcificação, e os osteoclastos, que são células que atuam na reabsorção do osso mineralizado. (KATCHBURIAN; ARANA, 1999).

O osso é uma estrutura que se mantém em constante remodelamento e, quando sofre alguma lesão, é capaz de ser reparado fisiologicamente (SCHENK, 1994). A reparação é um processo gerado por uma lesão inicial, ocorrendo uma

sequência contínua de eventos celulares e terminando com a completa remodelação óssea, sem deixar cicatriz, muitas vezes não deixando sequelas e garantindo sua funcionalidade (BOSTROM; CAMACHO, 1988; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Em geral, as superfícies ósseas são revestidas externa e internamente por membranas conjuntivas, denominadas de periósteo e endostel, respectivamente. O revestimento das superfícies ósseas é essencial para sua manutenção, pois áreas de reabsorção óssea aparecem nos locais que perderam o revestimento conjuntivo ou a camada de osteoblastos. As células do periósteo transformam-se muito facilmente em osteoblastos e têm importante papel no desenvolvimento dos ossos e na reparação das fraturas. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Toda alteração óssea ligada ao reparo deste tecido é proveniente de eventos fisiológicos que são mediados por processos celulares e moleculares que embora tenha um aspecto macroscópico aparentemente inerte, as interações que ocorrem no seu microambiente tornam o tecido ósseo metabolicamente muito dinâmico e com alta capacidade de remodelação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ERIKSEN, 2010).

A remodelação óssea consiste em um processo fisiológico altamente equilibrado, no qual deve ocorrer reabsorção via osteoclastos seguida de neoformação óssea nas mesmas proporções (osteoblasto-Osteócito) permitindo a renovação do tecido ósseo sem que haja alterações funcionais. Assim, o desenvolvimento, a homeostasia, e a capacidade de reparo do tecido ósseo dependem do balanço dinâmico entre estes dois eventos, e para que ocorram é necessária uma sequência de processos metabólicos mediados por diferentes vias de sinalização celular que caracterizam a reparação óssea (TAKAYANAGI, 2007; DATTA et al., 2008; ERIKSEN, 2010).

2.2 Reparo Ósseo

A otimização da regeneração óssea é um assunto de grande interesse na Odontologia e Medicina, pois está diretamente relacionada a vários tratamentos como as cirurgias ortopédicas, enxertos ósseos, movimentação ortodôntica, ósseo-integração de implantes dentários e distração osteogênica.

Na literatura existe uma vasta lista de indicações de terapias clínicas que visam à regeneração óssea, e sem dúvida as novas pesquisas têm mudado o panorama da aplicabilidade clínica, visto que a regeneração óssea é um dos processos de reparo mais importantes do corpo porque o osso é um dos poucos órgãos aptos a sofrer regeneração espontânea em vez de apenas restaurar uma estrutura. Os ossos regeneram-se de duas formas distintas: por formação de calo ósseo de origem tanto periostal como endocondral e por regeneração intramembranosa. As mudanças associadas à regeneração óssea podem ser descritas como uma série de estágios ou fases, que ocorrem em sequência, visando o processo de reparo ósseo (LINDE et al., 1993).

O processo de ossificação endocondral ocorre do centro da cartilagem para as extremidades, e, na intramembranosa, ocorre de forma inversa, das extremidades para o centro. O crânio, por exemplo, se ossifica a partir das extremidades, onde as trabéculas se formam no interior de uma membrana do tecido conjuntivo. Neste processo, as trabéculas são constituídas por osso primário, que se forma a partir do mesênquima embrionário, sem um modelo cartilaginoso, sendo necessário que o suprimento sanguíneo e a base sólida para deposição óssea sejam mantidos de forma adequada (LINDE et al., 1993).

Particularmente na Odontologia após as extrações dentárias indicadas por doenças inflamatórias ou traumas, nota-se reabsorção do osso alveolar com perda de 40 a 60% das suas dimensões, nos primeiros dois anos devido aos processos de reparação óssea (ALMEIDA et al., 2016), muitas vezes apresentando perda em altura do osso alveolar, espessura no sentido vestibulo lingual causada pela reabsorção óssea na direção posterior, causando uma redução progressiva da relação entre os arcos maxilar e mandibular o que por sua vez dificulta clinicamente a instalação de implantes osseointegrados no contexto da reabilitação oral (LINDHE, 1999, LINDHE; ARAUJO, 2005) Sabe-se que em condições homeostáticas de reparo, ocorre a instalação inicial de um processo inflamatório moderado e transitório no processo de proliferação celular e nos processos de neoformação, o qual diminui a medida em que o reparo progride com a formação de um tecido de granulação, seguido da diferenciação de células ósseas e produção de matriz colágena mineralizada, resultando finalmente na completa neoformação óssea, eventos mediados pela liberação/secreção sequencial de diferentes fatores de crescimento, tal como as BMPs, mediadores inflamatórios e citocinas, os quais

em conjunto são responsáveis por mediar o reparo ósseo adequadamente através de vias específicas da expressão gênica, indicando um papel fundamental de células e fatores do sistema imunológico neste processo (RODRIGUES, 2007; POLETI, 2009, CARDOSO, 2009; CARDOSO et al., 2010).

Em síntese, as vias de sinalização permitem que os osteoblastos secretem fatores de crescimento que se aderem à superfície da matriz celular e iniciam a síntese de colágeno e de outras proteínas não colagenosas, que são secretadas dentro da cavidade para formar o complexo osteóide uma matriz de tecido conjuntivo não mineralizada, que posteriormente em condições normais dará origem ao osso neoformado, onde a quantidade de osso novo sintetizado em cada sítio de remodelação é exatamente igual àquela que foi removida pelos osteoclastos; e sequencialmente há a deposição de minerais (hidroxiapatita) na matriz óssea caracterizando a reparação óssea (RODRIGUES, 2007).

Atualmente encontra-se na literatura a descrição de várias técnicas e materiais que, isoladamente ou em associação para o tratamento de defeitos ósseos. Dentre os quais, podemos citar o uso de materiais naturais ou sintéticos com propriedades osteocondutoras e/ou osteoindutoras (ALMEIDA et al 2016). Outras técnicas, como a distração osteogênica, constituem possibilidades clínicas de reposição ou aumento do volume de tecido ósseo em áreas onde, este, foi perdido, lesado ou traumatizado. (FRIEDLAENDER, 1987; FINKEMEIER, 2002; LEKOVIC et al., 2003; JENSEN, 2009).

O processo de reparo ósseo ocorre em diversas etapas e caracteriza-se por fases distintas entre si. Inicialmente, forma-se coágulo sanguíneo, reação inflamatória e tecido de granulação mesenquimal em substituição ao coágulo. Subsequentemente, o processo regenerativo pode evoluir por dois caminhos diferentes, denominados direto (ossificação intra-membranosa) e indireto (ossificação endocondral) (CATANZARO-GUIMARÃES et al., 1986). O caminho direto forma calo osteogênico constituído, em sequência, por osso imaturo não-lamelar, formado em substituição ao tecido de granulação mesenquimal e osso lamelar maduro formado em consequência da remodelação do osso não-lamelar imaturo. O caminho indireto forma calo osteogênico através de uma cascata de transformações teciduais que envolvem primeiro a formação de tecido cartilaginoso em substituição ao tecido de granulação mesenquimal e, segundo, pela formação de tecido ósseo imaturo não-lamelar em substituição à cartilagem que, em sequência,

sofre remodelação para tecido ósseo lamelar. O resultado de ambos os processos é a regeneração de novo osso cuja estrutura é indistinguível do osso maduro preexistente. (CATANZARO-GUIMARÃES et al., 1986).

Muitos estudos envolvendo reparação óssea têm sido realizados nos últimos anos esclarecendo que o tratamento de defeitos ósseos extensos envolve inúmeras particularidades, visto que os processos fisiológicos envolvidos têm alta complexidade e a sua otimização é o alvo principal no contexto da busca por alternativas terapêuticas. (CATANZARO-GUIMARÃES et al., 1986, MARQUES, L, 2014; KINOSHITA, et al, 2013).

Vajgel et al (2014) em sua revisão sistemática esclarecem que determinação do tamanho do defeito ósseo criado na calvária de ratos é um dos modelos experimentais mais difundidos no contexto da avaliação do processo de reparo. Os autores relatam que avaliaram 257 textos completos, e encontraram grande variabilidade entre os modelos pré-clínicos, ensaios randomizados e experimentais e concluiu que há uma grande heterogeneidade nas indicações e classificação dos defeitos ósseos. Concluíram que o defeito na calvária de 5.0 mm de diâmetro pode ser considerado como crítico para ratos e defeitos de 1.0 cm para coelhos.

Dessa maneira, é de extrema importância na definição de modelos experimentais a observação de critérios que contemplem características que possam simular o processo de reparo ósseo para garantir similaridade fisiológica ao organismo humano o que justifica a revisão de literatura previamente a execução de ensaios pré-clínicos na busca pela otimização do processo de reparo ósseo.

2.3 Substitutos Ósseos

Os substitutos ósseos são atualmente objeto de intensa investigação científica a nível mundial, uma vez que representa a principal alternativa terapêutica no processo de reparação óssea visto suas vastas aplicações na medicina e odontologia. Historicamente, a aplicação de biomateriais remonta à pré-história, como o evidenciado na descoberta de crânios com trepanações nas quais foram utilizadas placas de ouro e prata como opção de tratamento. Sendo assim define-se como biomateriais “todo o material de origem humana, animal, vegetal ou sintético,

destinado à implantação no homem com a perspectiva de uma reconstituição do capital ósseo, para o reforço de uma estrutura óssea ou para o preenchimento de uma perda ou tratamento de um defeito ósseo decorrente de processos fisiológicos e/ou traumático”. (CATANZARO-GUIMARÃES et al., 1986) Os enxertos podem possuir características osteogênicas, quando o crescimento ósseo se dá em função das células viáveis, transferidas dentro do osso enxertado, osteoindutivas quando possuem a capacidade de atrair células mesenquimais, que posteriormente se diferenciarão em osteoblastos servindo como arcabouço, sustentando uma estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo então os componentes necessários à formação óssea, sendo esta decorrida nos enxertos homogêneo (MATHIAS, et al. 2003, JAMES, et al, 1998).

Os enxertos ósseos se classificam em autógenos, quando o enxerto é transplantado de um local para outro no mesmo indivíduo, alógenos, quando o enxerto é obtido de um indivíduo geneticamente diferente, mas da mesma espécie e xenógenos, quando o material transferido é de um indivíduo de uma outra espécie (DAVIES, 2000; VACCARO, 2002; SUTHERLAND, 2005).

O enxerto ósseo autógeno é o que apresenta maior evidência científica de aplicações na odontologia e medicina, sendo considerado por muitos autores o “padrão ouro” nas terapias de utilização devido as suas propriedades osteogênica, osteocondutora e osteoindutora, a sua biocompatibilidade, ausência de transmissão de doenças e retenção de osteoblastos (SUTHERLAND, 2005). Contudo, as suas desvantagens devem-se à morbidade relacionada com o local doador, disponibilidade limitada, maior tempo cirúrgico (ALMEIDA et al., 2016).

Na maioria das grandes reconstruções maxilares os enxertos autógenos são utilizados, sendo estes removidos da crista ilíaca ou calota craniana, em forma de blocos. A regulação dos rebordos e encaixe são realizadas no mesmo momento cirúrgico, o que amplia o tempo operatório e, conseqüentemente, a morbidade pós-operatória do paciente (SUTHERLAND, 2005).

Uma alternativa ao uso do enxerto autógeno, tendo em vista os problemas associados, é a reconstrução com osso homogêneo ou aloenxertos (banco de ossos), evitando-se a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica (BURG, et al, 2000; BOWMEN, 1989; ALMEIDA et al 2016).

Os materiais alógenos surgem como uma alternativa nas cirurgias reconstrutivas, são oriundos de fontes de cadáveres humanos, como os bancos de

ossos, e compreendem enxertos ósseos congelados, desmineralizados e sofrendo diferentes processamentos e armazenamentos. Assim como o enxerto autólogo, os aloenxertos podem ser de osso cortical e medular tendo seu uso difundido em odontologia e ortopedia. (GOMES, 2008; BARONE 2009). Como vantagens podemos destacar possibilidade de armazenamento, disponibilidade, resistência mecânica e, por eliminarem a necessidade de um sítio doador do próprio paciente (FONTANARI, et al, 2005). Outras vantagens são redução do tempo cirúrgico, menor morbidade, redução de lesões vasculo-nervosas e infecções (SIMPSON, et al., 2007). Apresentam osteocondução, por ser um arcabouço para a neoformação óssea e, possivelmente, a osseointegração. Esta característica é motivo de bastante controvérsia na literatura e alvo de mais estudos até o momento, mesmo com o desenvolvimento de osteoblastos *in vitro*, a partir de osso homogêneo fresco congelado (JESUS-GARCIA, 1992; SIMPSON, et al., 2007).

O uso de enxerto ósseo homogêneo, proveniente de banco de ossos, previamente à instalação de implantes representa uma alternativa viável para o aumento do volume de rebordo ósseo. Após estudo microscópico, demonstraram ser biocompatíveis, com ausência de reação imunológica (SIMPSON, et al., 2007)

Uma outra opção são os enxertos xenógenos, sendo o mais comum, o enxerto de osso bovino ou xenoenxerto. É um derivado ósseo poroso, inorgânico e desproteinizado com a composição mineral comparável a estrutura microporosa do osso humano. O osso bovino inorgânico tem apresentado ganhos significativos de tecido ósseo em nível clínico no preenchimento de defeitos intra-ósseo. Comercialmente o Bio-Oss[®] é o substituto ósseo líder usado em Odontologia no mundo inteiro, pois segundo autores o biomaterial apresenta excelentes propriedades osteocondutivas uma vez que as partículas se tornam parte integral da estrutura óssea recém-formada e conservam seu volume a longo do tempo (ROTHAMEL, 2008; ORSINI, 2005; MORDENFELD, 2012).

2.4 Carbonato de Lítio

O lítio é um fármaco utilizado em tratamento de condições psiquiátricas em particular, para a mania, e pode ser usado tanto para tratamento de curto ou longo prazo. O uso contínuo de Carbonato de Lítio sugere a massa óssea foi

aumentada em pacientes tomando lítio para o tratamento de transtornos mentais, e as transformações ósseas também foi diminuída nesses pacientes (SCHOU, 2001; CLEMENT et al., 2005; YUN et al., 2013).

Após uma dose única, o lítio, normalmente dado como carbonato, atinge uma concentração plasmática máxima a 1 à 2 horas para formas de dosagem de liberação normalizada e 4 à 5 horas para formas de liberação controlada (FDA, 2010; consulta in BULA).

A sua biodisponibilidade é de 80-100%, apresentando depuração total 10-40 mL/min e meia-vida de eliminação é de 18 à 36 horas. A utilização da formulação de liberação prolongada resulta em reduções de 30-50% nas concentrações plasmáticas máximas sem grandes alterações na área sob a curva de concentração plasmática (GRANDJEAN, 2009; FDA, 2010).

A distribuição de lítio para o cérebro, avaliada usando a espectroscopia de ressonância magnética, mostra concentrações cerebrais de aproximadamente metade daquelas no soro, aumentando ocasionalmente para 75-80%. O lítio é excretado quase exclusivamente através do rim como um íon livre (GRANDJEAN, 2009).

Durante os últimos meses de gestação, a depuração de lítio aumenta em 30-50% como resultado de um aumento na taxa de filtração glomerular, tornando seguro para utilização em gestantes, uma vez que não passa livremente do plasma materno para o leite materno. Trata-se de um fármaco de uso controlado, pois há inúmeras interações cinéticas descritas para o lítio, normalmente envolvendo uma diminuição na depuração do fármaco e, conseqüentemente, aumentando a sua potencial toxicidade. Estudos de farmacologia clínica realizados em voluntários saudáveis investigaram um possível efeito do lítio nas funções cognitivas. A maioria destes estudos relatou um efeito ligeiramente negativo sobre a vigilância, o estado de alerta, a aprendizagem e a memória de curto prazo após administração a longo prazo apenas (GRANDJEAN, 2009; AUBRY, 2009; FDA, 2010).

Devido à gama terapêutica estreita de lítio, a monitorização terapêutica é a base para uma utilização e administração ideais deste fármaco. As dosagens de lítio devem ser ajustadas com base na concentração sérica desenhada para cada ação terapêutica, sendo a eficácia do lítio é claramente dependente da dose e correlaciona-se de forma fiável com as concentrações séricas (AUBRY, 2009).

Atualmente, na psiquiatria é aceitável que as concentrações devem ser mantidas entre 0,6 e 0,8 mmol/L, embora alguns autores ainda recomendem preparações de liberação controlada e devido ao pico mais tardio da concentração sérica de lítio, recomenda-se manter as concentrações séricas, sendo a dose diária de manutenção habitual é de 25-35 mmol (carbonato de lítio 925-1300 mg) para doentes com idade <40 anos; 20-25 mmol (740-925 mg) para aqueles com idade entre 40-60 anos; E 15-20 mmol (550-740 mg) para doentes com idade > 60 anos. A dose inicial recomendada é normalmente de 12-24 mmol (450-900 mg) por dia, dependendo da idade e do peso corporal. O esquema de administração clássico é duas ou três vezes ao dia, embora não haja evidência forte em favor de um esquema de três vezes ao dia, e a conformidade com a dose do meio-dia seja questionável. Com uma moderna preparação de liberação controlada, o programa de duas vezes ao dia está bem estabelecido, minimizando riscos terapêuticos e obtendo resultados satisfatórios, sem exposição a riscos de toxicidade (GRANDJEAN, 2009).

De acordo com a literatura, existem relatos que sugerem que o lítio pode ser utilizado clinicamente como um fármaco candidato para o tratamento da osteoporose. (ZENG et al., 2011). O lítio foi originalmente aprovado como um medicamento seguro para o tratamento de transtornos mentais, porém atualmente têm suscitado aplicações clínica diversas, sendo encontrado na literatura relatos de uso em biologia óssea (CHEN, 2007; WHETSTON, 2008; ZENG et al., 2011; ZENG et al., 2013; Li et al., 2017).

2.5 Aplicações Científicas do Lítio

Um estudo, conduzido por Benjamin Alman, do Hospital For Sick Children de Toronto, avaliou o papel da via de sinalização de α -catenina, responsável pela transcrição do gene dependente do fator de célula T e que é conhecida por ter um papel regulador no desenvolvimento do esqueleto embrionário, e concluiu em seus experimentos que o uso de lítio contínuo em casos de fraturas ósseas pode interferir na ativação da α -catenina, através da via Wnt β -catenina e que o tratamento com lítio tem potencial para melhorar a cicatrização da fratura (CHEN, 2007; WHETSTON, 2008).

Em 2011, Zeng e colaboradores estudaram a entrega de lítio durante a expansão palatina e concluíram que o tratamento com lítio pode ser um auxiliar farmacêutico para melhorar a estabilidade do tratamento ortodôntico como expansão rápida, uma vez que o lítio regula a proliferação e maturação de osteoprogenitoras de osteoblastos durante palatina sutura expansão da osteogênese, e que o lítio aumenta a regeneração óssea, elevando expressão β -catenina (ZENG, et al 2011).

Zeng e colaboradores, em 2013, estudaram os efeitos do lítio sobre alvéolos após extrações dentárias, e concluíram que o lítio aumenta a reparação óssea em cavidades de extração quando entregues antes da extração do dente (ZENG, et al 2013).

A via de sinalização de Wnt β -catenina está envolvida no processo fisiológico da reparação óssea através da inibição da glicogênio sintase quinase (GSK-3) e a consequente ativação da via de sinalização de para osteoblastos, conforme foram relatada em estudos que delineia a resposta bioquímica e celular da via canônica Wnt β -catenina, que esta ligada ao aumento do volume ósseo. Em experimentos in vitro, examinamos os efeitos dos inibidores de (GSK-3) na osteoblastogênese de células progenitoras mesenquimais C3H10T1/2 e osteoclastogênese de células RAW-D precursoras de osteoclastos, em decorrência da utilização de Cloreto de Lítio (LiCl) e concluiu-se que o uso do Lítio nas condições do experimento promoveram a diferenciação dos osteoblastos, avaliados pela atividade da fosfatase alcalina e deposição de cálcio, estimulado pela via de sinalização de Wnt β -catenina. (ARIOKA, et al, 2014).

Em estudos subsequentemente realizados in vivo, examinou-se o efeito de Li_2CO_3 administrado localmente na recuperação de um defeito parcial feito na tíbia de rato. Através de tomografia computadorizada e a histomorfometria óssea conclui-se que o Lítio acelerou a regeneração óssea em lesões de defeito com aumento da proporção óssea lamelar em comparação com os controles. Estes resultados sugeriram que a aplicação local de lítio (ou outros inibidores de GSK-3) poderiam efetivamente facilitar a recuperação da lesão óssea promovendo a osteoblastogênese e inibindo a osteoclastogênese (ARIOKA, et al, 2014).

Estudo realizado em 2016, por Jin e colaboradores, relatam que pacientes com osteoporose têm alto risco de falência de implantes dentários e ortopédicos e o uso de cloreto de Lítio pode ser uma alternativa para aumento da massa óssea, no entanto afirmam que o LiCl utilizado em condições osteoporóticas ainda é

desconhecido, e para tanto realizaram experimentos em ratas ovariectomizadas simulando o comportamento do reparo ósseo em condições de utilização de cloreto de lítio, e em conclusão, salientam que o LiCl reforçou a osseointegração de implante, a fixação do implante e a formação óssea em condições osteoporóticas, sugerindo LiCl pode ser um agente terapêutico promissor para prevenir a falha do implante e a perda óssea em condições osteoporóticas (Y JIN, et al, 2016).

Vale destacar nesta revisão de literatura um estudo publicado em 2017, na *Nature*, revista científica de grande impacto no cenário mundial, acerca da aceleração da regeneração óssea através da ativação da via de sinalização Wnt / β -catenina via lítio liberado de cimento de cloreto de lítio associado ao fosfato de cálcio na osteoporose. Li e colaboradores (2017) investigaram o efeito de cura da fratura de defeitos osteoporóticos com cimento de fosfato de cálcio dopado com lítio (Li / CPC) e concluíram que os extratos de Li/CPC estimularam a proliferação e diferenciação dos osteoblastos após a libertação de íons de lítio (Li +) ativando a via Wnt β -catenina in vitro permitindo inferir que a administração localmente sobre defeitos na tíbia de rato apresentava melhor osteogênese, aumentando a massa óssea e a reparação de defeitos em relação ao grupo controle. Estes achados sugerem que a liberação local de Li + a partir de da utilização da proposta dos autores no uso do cimento de cloreto de lítio associado ao fosfato de cálcio (Li/CPC) pode acelerar a regeneração óssea da lesão através da ativação da via Wnt β -catenina.

3 Justificativa

3 JUSTIFICATIVA

O *Sistema BoneLithium* foi idealizado com o objetivo de promover a otimização do processo de reparo ósseo, uma vez que o Lítio, apesar de controvérsias científicas atua no processo de diferenciação e maturação de osteoblastos, sendo esta, uma importante característica no processo de reparação óssea.

Dentro destas perspectivas, pretende-se com este estudo o desenvolvimento, a caracterização e avaliação do desempenho biológico através da investigação da influência das partículas de carbonato de Lítio liberadas pelo *Sistema BoneLithium* no processo de reparo ósseo já que este novo biomaterial pode ser uma nova alternativa na busca por novos protocolos de tratamento e aplicação de biomateriais com foco na otimização do processo de reparo ósseo, tendo então, um grande destaque terapêutico e científico de interesse a classe médica-odontológica, que comumente atua na busca por novos protocolos terapêuticos.

4 Objetivos

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar o comportamento biológico de um novo biomaterial: Sistema BoneLithium.

4.2 Objetivos Específicos

- Desenvolvimento, através de manipulação farmacológica, do Sistema BoneLithium, concebido a partir da aglutinação de carbonato de Lítio em matriz de polímero Carbopol®.
 - Caracterização físico-química do Sistema BoneLithium através de metodologias específicas.
 - Avaliar a reação tecidual *in vivo* do Sistema BoneLithium em sítio específico com foco na reação tecidual preconizados pela norma ISO 10993.
 - Avaliar o padrão de reparo ósseo em defeitos criados em calvária de coelhos, tratados com o Sistema BoneLithium e adicionalmente, estabelecer a comparação da formação óssea decorrente da presença de lítio em comparação com o grupo controle através da histomorfometria, tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) e Microtomografia computadorizada (SKYSCAN MicroCT).
 - Avaliar a performance do Sistema BoneLithium no processo de cicatrização de defeitos críticos criados na calvária de ratos, tratados com diferentes opções de enxertos através da histomorfometria, tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) e Microtomografia computadorizada (SKYSCAN MicroCT).
-
-

5 Material e Métodos

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Aspectos metodológicos

Considerando que é de responsabilidade do pesquisador o delineamento de estudos experimentais, os pesquisadores devem certificar-se de que o protocolo a ser desenvolvido deve estar de acordo com o princípio ético universalmente aceito dos três R (redução, remanejamento, refinamento) em pesquisa, com o objetivo máximo de salvaguardar o bem-estar dos animais e garantir a qualidade dos estudos experimentais, todos os procedimentos cirúrgicos, referentes às etapas deste estudo foram realizados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, após análise e aprovação do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animal (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru - Universidade de São Paulo (FOB/USP), São Paulo, Brasil, tendo como protocolo o nº. 026/13 (Anexo 1).

O Desenvolvimento do biomaterial: Sistema BoneLithium foi realizado seguindo os princípios de manipulação farmacológica preconizados pela Farmacopéia Brasileira em estabelecimento farmacêutico comercial com os registros técnicos necessários sob supervisão de farmacêutica bioquímica habilitada para a finalidade, considerando controles sanitários necessários. Por se tratar de substância de uso controlado e restrito a aplicações clínicas específicas, todos os materiais produzidos foram devidamente registrados prescritos a cada manipulação, em consonância com a Portaria SVS/MS nº 344/1998 que regulamenta as listas de substâncias de uso controlado em Notificação de Receita do tipo B e subsequente acompanhamento de notificação de receita na Vigilância Sanitária do serviço de epidemiologia do município de Bauru com identificação de Material restrito ao USO EM PESQUISA, conforme protocolo municipal.

5.2 Delineamento dos experimentos

Para o desenvolvimento da metodologia aprovada pelo CEEPA, foram utilizados coelhos brancos adultos machos da raça *New Zealand*, com peso médio

de 3,5 kg, idade média entre quatro e cinco meses, mantidos durante todo o período experimental em condições de supervisão por médica veterinária, considerando as necessidades ambientais de alimentação, temperatura, higiene e iluminação e em gaiolas individuais no Biotério da FOB/USP, São Paulo, Brasil. Os coelhos foram obtidos através de compra regulamentada pela GTA – Guia de Transporte Animal (Anexo2) da Fazenda Lajeado da Universidade Estadual Paulista – Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Para assegurar a sanidade de todos os coelhos, foi realizado um Hemograma Completo conferido pelo Laboratório Integrado Bauru previamente a realização dos procedimentos, tendo como objetivo inicial assegurar que após os procedimentos cirúrgicos não houve liberação sistêmica do Biomaterial que porventura poderia afetar os aspectos neurológicos e/ou psíquicos dos animais, uma vez que o carbonato de lítio é utilizado para tratamento de desordens psiquiátricas.

Para o teste de reação tecidual e avaliação da performance do *Sistema BoneLithium* com diferentes tipos de enxertos ósseos, foram utilizados ratos machos adultos (*rattus norvegicus albinus*) da raça Wistar, com aproximadamente 4 meses de idade, peso médio de 300 gramas, fertilizados a partir de cruzamento de matrizes controladas geneticamente, produzidos e criados pelo Biotério da FOB/USP, São Paulo, Brasil.

5.3 PARTE A - “Desenvolvimento e Caracterização do Sistema BoneLithium”

5.3.1 Preparação do biomaterial: Sistema BoneLithium

O Sistema BoneLithium foi preparado a partir de manipulação farmacológica (Farmácia Específica, Bauru, São Paulo, Brasil) através da deposição de carbonato de lítio dispersos em matriz gelatinosa de Carbopol®, um tipo de carbômero da família de polímeros hidrossolúveis utilizados para estabilizar emulsões e dar viscosidade a soluções, bastante utilizado na indústria cosmética e farmacológica. As concentrações foram elaboradas a partir da observação de artigos prévios, e a formulação original não será divulgada neste trabalho a fim de proteção técnica, no entanto padronizou-se nas embalagens do produto a formulação em

2mg/g, aviado (*pró-manipulare*) para a preparação farmacotécnica de 10 g de Gel Carbopol®, contendo 20 mg de carbonato de lítio (Figuras 1 e 2).

Figura 1: Fotografia do Biomaterial: Sistema BoneLithium em seringas de dispensação.

Figura 2: Fotografia do Biomaterial: Sistema BoneLithium (gel de Carbopol®)

Todo o processo de manipulação foi realizado sob condições assépticas e mantidos em seringas esteréis, seguindo os rigorosos padrões de qualidade necessários a farmácias de manipulação.

5.3.2 Caracterização Físico-química

Para a Metodologia de Caracterização Físico-química do Sistema BoneLithium, procedeu-se a análise a partir de duas amostras em paridade do Gel de Carbopol e do Sistema BoneLithium realizadas pelo Laboratório Natron (Bauru, São Paulo, Brasil) com CERTIFICADO OFICIAL DE ANÁLISE (COA) 09690.04/2017 expresso em laudo técnico certificado por profissional habilitada e com registro, seguindo método de referência analítica em controle de qualidade de produtos cosméticos preconizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2º edição, revista – Brasília: Anvisa 2008 e Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21ª Ed., 2005.

Procedeu-se teste de pH, seguindo metodologia ANVISA, viscosidade através da metodologia Copo Ford, Aspecto (metodologia ANVISA) e alcalinidade de carbonatos utilizando metodologia SM 2320 B (Anexo 3 – Laudo Técnico).

5.4 PARTE B - " Teste de Reação Tecidual do Sistema BoneLithium"

Esta etapa metodológica consiste no estudo da reação tecidual do novo biomaterial Sistema BoneLithium, composto de partículas de carbonato de lítio dispersas em matriz gelatinosa obtida através da manipulação farmacológica utilizando base o polímero hidrossolúvel Carbopol®. O modelo de experimentação adotado foi o preconizado pela Norma ISO 10993, que regulamenta critérios para análise da reação tecidual de materiais aplicados em meio biológico. Para tanto foi utilizado o teste *in vivo* (em subcutâneo) tendo como cobaia os ratos da raça Wistar (*rattus novergicus*, Wistar), cedidos pelo Biotério da FOB/USP.

Para o teste de reação tecidual foram utilizados 15 ratos (*rattus novergicus albinus*, Wistar), machos, com peso médio de aproximadamente 300g, divididos em 5 grupos: Grupo 1, 2, 3, 4 e 5, descritos na tabela 1, a seguir:

Tabela 1: Descrição dos Grupos de animais

Grupo	Número de Animais	Período de Preservação
G1	3	7 dias
G2	3	14 dias
G3	3	60 dias
G4	3	84 dias
G5	3	180 dias

5.4.1 Procedimentos Cirúrgicos

Inicialmente, os animais foram submetidos à anestesia geral através da injeção de cloridrato de cetamina e xilasina (Vetbrands, Paulinia, Brasil), associados numa relação de 1:1, com dose de 0,1 ml/100g de peso corpóreo. Em seguida, foi realizada a tricotomia na região dorsal e a antissepsia com PVPI (polivinilpíloridona) tópico.

Na sequência, após a montagem dos campos estéreis, em cada animal, foram realizadas 6 incisões de aproximadamente 1,5cm, seguida de divulsão com tesoura cirúrgica reta no dorso do animal. Em cada animal serão implantadas duas frações de cada biomaterial dentro de tubos de polietileno (“tipo butterfly”, Cirúrgica Moreira, Brasil), ao qual foi tomado o cuidado de não repetir a localização dentro mesmo grupo, e assim descartar a possível influência da localização do implante dos biomateriais nos resultados. Após a implantação dos tubos de polietileno foi realizada a sutura do tecido, com fio de sutura seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). Através deste procedimento são geradas 6 amostras (n=6) para cada material implantado por período de observação.

O esquema abaixo ilustra todos os implantes no subcutâneo do dorso do animal, sendo destacado a distribuição sequenciada do Sistema BoneLithium, do gel de carbopol puro (sem princípio ativo), e dos tubos de polietileno sem nenhum material (controle), observando a alteração de posição dos implantes no mesmo grupo a fim de descartar qualquer viés na resposta biológica. A Figura 03, ilustra o modelo experimental utilizado:

Figura 3: Distribuição das amostras de biomateriais/ implantes de tubo de polietileno contendo biomaterial. Ilustração por KATO, R. K, 2017.

Figura 4: Procedimentos Cirúrgicos. a) Incisão b) Divulsão c) Implante dos tubos contendo biomateriais d) Sutura

Após a realização dos procedimentos cirúrgicos, todos os animais permaneceram no biotério nos períodos de preservação pré-determinados nesta etapa metodológica, armazenados em caixas específicas, recebendo água e dieta balanceada conforme normas de rotina do biotério da universidade.

Após os períodos de preservação, descritos na tabela 1, os animais foram eutanasiados com superdosagem de anestésico geral (Cetamin®, Vetbrand, Brasil). Para a coleta das peças, primeiramente foi realizada a tricotomia da região do dorso e, em seguida, remoção da peça com tesoura cirúrgica reta. Subseqüentemente as peças fixadas em formol a 10% e, nessa ocasião, realizadas a análise macroscópica das peças colhidas, seguida de preparação das lâminas através de histotécnica apropriada, onde os cortes foram obtidos no sentido longitudinal com seis micrômetros de espessura e corados pelos métodos da hematoxilina/eosina (HE) para posterior análise microscópica.

5.4.2 Análise dos Resultados

Os espécimes coletados após a eutanásia dos animais foram analisados macroscopicamente em suas dimensões e coloração e fotografados em lente de aproximação com o objetivo de verificar a presença ou ausência de alterações de necrose tecidual. Baseado na metodologia adotada por Minnen et al (2006) e

Marques et al (2011) onde a resposta tecidual foi estudada através da observação da presença de necrose e células inflamatórias: Polimorfonucleares, Mononucleares e Células Gigantes.

A análise microscópica foi realizada através da aquisição de imagens utilizando através da utilização do Fotomicroscópio Nikon e utilização do Software Image J® (Image J desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland), para quantificação do padrão de resposta tecidual.

Todos os cortes foram submetidos à contagem de células agrupadas nas seguintes classes celulares: polimorfonucleares, mononucleares e células gigantes, bem como para a mensuração da espessura da cápsula fibrosa. Para cada material implantado serão selecionadas 5 regiões de interface entre o tecido e o biomaterial para a realização das contagens. Assim, para cada material e período (N=6), serão contadas 5 regiões, totalizando 30 imagens para contagem de células e posterior análise estatística pelo teste *Kruskall Wallis*, seguido de Comparações *Student-Newman-Keuls*, utilizando-se o software Biostat 5.0, - Tefé, Amazonas, Brasil considerando-se o nível de significância ($p < 0.05$) e o Software Origin 8.1 – Austin, Texa, EUA para elaboração de gráficos.

5.5 PARTE C - “Estudo da Influência das partículas de Carbonato de Lítio liberadas pelo biomaterial no Reparo Ósseo”

5.5.1 Grupos experimentais

Os 36 coelhos foram submetidos ao procedimento cirúrgico de craniotomia sob anestesia geral para a confecção de defeitos cirúrgicos bilaterais com os quais foram tratados de acordo com a modalidade proposta. A figura 4 apresenta de forma esquemática a localização dos defeitos criados com broca trefina (Neodente, Curitiba, Paraná, Brasil)

Figura 04: Modelo esquemático da região anatômica onde os defeitos ósseos foram criados. Calvária de Coelho *New Zealand*. Craniotomia Bilateral. Ilustração: KATO, R. K., 2017.

Os coelhos foram aleatoriamente distribuídos em 2 grupos experimentais de acordo com o tratamento proposto:

✓ **GRUPO 1:** Foi tratado o defeito do lado direito do animal com Sistema Bone Lithium e o defeito do lado esquerdo gel carbopol (sem princípio ativo).

✓ **GRUPO 2:** Foi tratado o defeito do lado direito do animal com do Sistema BoneLithium e o defeito do lado esquerdo tratado com coágulo sanguíneo.

Os animais foram observados pelos períodos de 7, 15 e 45 dias. Decorrido este período, 6 animais foram eutanasiados através de dose letal de anestésico, obtendo uma amostragem de 6 espécimes para cada período de observação, e os mesmos foram coletados para análise macroscópica e microscópica (histomorfometria), microtomografia computadorizada (SKYSCANK) e tomográfica computadorizada de feixe cônico TCFC (I CAT – KAVO, RADIOFAST).

5.5.2 Procedimentos Cirúrgicos

5.5.2.1 Anestesia e Assepsia

Para a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram submetidos à anestesia geral com administração pré-anestésica de relaxante muscular por via intramuscular (IM) de cloridrato de xilazina (Anasedan® – Vetbrands, Paulinia, São Paulo, Brasil) 10,0mg/kg de peso corpóreo, seguido pela administração intramuscular de anestésico geral de cloridrato de Ketamina (Dopalen® – Vetbrands, Paulinia, São Paulo, Brasil) 50,0mg/kg de peso corpóreo.

Após o início de ação da anestesia foi realizado o procedimento de tricotomia da calota anti-sepsia com PVPI (polivinilpíloridona) tópico e infiltração com anestésico local Mepivacaína 2% em associação com adrenalina 1: 100.000, na região a ser operada, com o objetivo de causar isquemia local.

5.5.2.2 Técnica cirúrgica

A área a ser operada foi isolada pelo uso de campos cirúrgicos estéreis a fim de diminuir contaminações biológicas. Foi realizada uma incisão na pele no plano sagital desde a região occipital até a região fronto nasal de aproximadamente 4,0cm e o tecido foi divulsionado cuidadosamente, logo após o periósteo foi incisado e descolado com o uso de um Hollembach 3S (SSWhite/Duflex, Rio de Janeiro, Brasil) e Descolador de Molte expondo a calota craniana. Com o uso de uma broca trefina (Neodente, Curitiba, Paraná, Brasil), foi realizado um defeito ósseo circular de 10,0 mm de diâmetro, em ambos lados da calota, sob abundante irrigação com soro fisiológico estéril, tomando o cuidado para não lesar a membrana dura-máter. Foi removido todo osso cortical e esponjoso, expondo a membrana meníngea, conforme ilustrado sequencialmente nas figuras 5, 6.

O defeito bilateral permaneceu separado através da sutura sagital. Após a confecção dos defeitos cirúrgicos, procedeu-se o tratamento proposto seguido da realização da sutura por planos, primeiramente do periósteo sobre o defeito com fio de sutura reabsorvível vicryl 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil), seguido pela sutura da pele com fio de nylon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil).

Decorrido os períodos de observação de 7, 15 e 45 dias os animais foram eutanasiados por superdose de anestésico geral (Ketamina) 120mg/kg em associação com relaxante muscular (Anasedan®) 10 mg/kg nas concentrações 1:1 em injeção intracardíaca.

Figura 6: Sequência Cirúrgica da confecção de Defeitos Críticos em calota craniana de coelho: a) Delimitação e confecção defeito sob irrigação constante. (b) Área esquemática dos defeitos. (c) Exérese do fragmento ósseo e tratamentos propostos: Lado Direito: *Sistema Bone Lithium* e o defeito do lado esquerdo: Gel Carbopol

5.5.2.3 Preparo das Peças e Forma de Análise dos Resultados

Após a eutanásia dos animais, a coleta das peças foi realizada utilizando um disco de carborundum com auxílio de caneta de alta rotação. Subsequentemente, as peças foram fixadas em formoldeído 10% para que posteriormente fosse realizada a análise de microtomografia (SKYSCAN) e Histomorfométrica.

5.5.3 Análise por MicroCT (SkyScanCT - μ CT)

A MicroCT SkyScanCT foi empregada neste estudo como um método complementar de análise considerando aspectos qualitativos na descrição dos resultados através de reconstrução tridimensional (3D) do reparo ósseo durante os diferentes períodos experimentais. Para tanto, após aquisição tomografia (TCFC –

Tomografia de feixe cônico – I cat KAVO, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil), todos os espécimes foram cortados observando a preservação dos defeitos considerando margem de segurança de aproximadamente 0,5 mm em todas as direções, e as peças foram escaneadas em MicroCT da marca SkyScan, modelo 1174 (Kontich, Bélgica), da disciplina de Endodontia da FOB/USP, bem como reconstruídas e analisadas com softwares próprios do aparelho (NRecon, Dataviewer, e CT-Vox). O escaneamento dos espécimes foram realizados com um tempo de aquisição médio de 45 minutos, utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 50 kV, 800 uA, com filtro de 0,5 mm Al, com 180 graus de rotação e intervalo de exposição de 1 grau, sendo as imagens capturadas com uma resolução de 1304 x 1024 pixels, com um tamanho de voxel de 14,12µm, conforme preconizado por Vivan et al (2015).

5.5.4 Análise Microscópica - Histomorfometria

Os espécimes foram identificados e acondicionados em frascos contendo solução de

Formaldeído 10% por um período de 48 horas. Na sequência foram submetidos a processo de desmineralização em solução de ácido etilenodiaminotetra-44acético (EDTA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por trinta dias, aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com navalha. Nesse momento, os espécimes foram encaminhados para procedimento histotécnico de rotina. Esses foram, então, lavados em água corrente, desidratados em álcool, diafanizados em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e incluídos em parafina (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Realizaram-se cortes semisseriados de 6 µm de espessura de cada bloco, no sentido longitudinal, utilizando-se micrótomo rotatório elétrico (Leica RM, Leica, Wetzlar, Alemanha). Os métodos de coloração empregados foram o da hematoxilina-eosina de Harris (HE) e Tricrômico de Masson, seguindo-se os protocolos técnicos do Laboratório de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, Marília – SP.

Os cortes microscópicos corados pelo método Tricrômico de Masson referentes a cada grupo e período de estudo foram submetidas à microscopia ótica e descritos em todas as suas peculiaridades. Foram selecionados e fotografados os cortes utilizando o fotomicroscópio Nikon H550L, e o Software ImagePro-Plus para a

aquisição das imagens, realizados na Universidade do Sagrado Coração, Bauru – SP.

Após esta etapa, utilizou-se o software *Image J*® para a análise morfométrica, onde se empregou a colocação padronizada de um retículo o qual foi colocado sobre as imagens histológicas e, a partir daí, foi possível mensurar as áreas que os tecidos ocuparam em cada defeito.

A histomorfometria foi realizada utilizando o programa *Image J*® (NIH – National Institute of Health). Uma grade foi superposta à fotomicrografia para contagem dos quadros relativos aos tecidos. Foram selecionadas três regiões e cada corte sendo: região central do defeito e bordas direita e esquerda do defeito. Foram usadas ampliação de 20x. Foi padronizada a contagem do tecido ósseo e tecido conjuntivo, o tecido em diferenciação foi considerado como tecido conjuntivo. Para a análise do resultado, foi considerada a proporção de tecido ósseo: Sendo a área total a soma das áreas de todos os tecidos considerados. Os resultados foram submetidos ao teste estatístico de ANOVA seguido de Tukey, considerando $p < 0.05$ para significância estatística.

A figura 8, ilustra o procedimento de mensuração dos tecido observados, utilizando ferramentas do software *Image J*®.

Figura 8: Imagem da tela Software *Image J*® utilizado na análise histomorfométrica das imagens microscópicas.

5.6 PARTE D - “Desempenho do Sistema BoneLithium no processo de cicatrização de defeitos críticos criados na calvária de ratos, tratados com diferentes opções de enxerto ósseo”

5.6.1 Grupos Experimentais

Nesta etapa metodológica serão utilizados 96 ratos albinos *Wistar*, pesando em média 200g (8 semanas) oriundos do biotério da FOB/USP, mantidos em gaiolas de polietileno, alimentados com água e ração, num ambiente de temperatura e luz controladas. Os ratos foram aleatoriamente distribuídos em 6 grupos experimentais, que receberam os tratamentos conforme descrito abaixo:

- ✓ **GRUPO 1** (G1) - Grupo Controle (coágulo)
- ✓ **GRUPO 2** (G1) – Tratado com Sistema BoneLithium
- ✓ **GRUPO 3** (G3) - Tratados com enxerto ósseo autógeno
- ✓ **GRUPO 4** (G4) - Tratados com enxerto ósseo autógeno + Sistema BoneLithium
- ✓ **GRUPO 5** (G5) - Tratados com enxerto ósseo homogêneo (Unioss®, Hospital Universitário de Marília, Marília, São Paulo, Brasil)
- ✓ **GRUPO 6** (G6) - Tratados com enxerto ósseo homogêneo (Unioss®) + Sistema BoneLithium
- ✓ **GRUPO 7** (G7) - Tratados com Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Suíça)
- ✓ **GRUPO 8** (G8) - Tratados com Bio-Oss® + Sistema BoneLithium

Os animais foram preservados por 7, 15, e 45 dias. Após estes períodos de preservação, os animais foram eutanasiados através de superdosagem anestésica e a área contendo o defeito foi coletada para realização de análise microscópica, microtomografia computadorizada e tomografia computadorizada de feixe cônico.

5.6.2 Procedimentos Cirúrgicos

Inicialmente os animais serão submetidos a anestesia geral através da injeção de cloridrato de cetamina e xilasina (I.M.), associados numa relação de 1:1, com dose de 0,1 ml/100g de peso corpóreo. Será realizada a tricotomia na região da calota craniana seguida de antissepsia com PVPI tópico e a área a ser operada será isolada com campos cirúrgicos estéreis.

Dessa maneira, na sequencia, será realizada uma incisão mucoperiosteal linear, de aproximadamente 1,5cm no plano sagital mediano do osso parietal com lâmina de bisturi número 15C, seguida, da dissecação cuidadosa utilizando descoladores específicos. O defeito ósseo crítico será criado no centro da calvária do rato, com uma broca trefina de 8mm de diâmetro (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil), usando um motor de baixa rotação, sob irrigação constante e abundante de solução fisiológica, a fim de evitar aquecimento na região.

Figura 9: Modelo esquemático da região anatômica do defeito ósseo crítico (0,8mm). Calvária de Rato *Rattus norvegicus*. Ilustração: KATO, R. K., 2017.

Após a criação do defeito crítico, foi realizado os tratamentos conforme descrito nesta etapa metodológica, observando os grupos experimentais e os períodos de preservação, seguido de sutura por planos, primeiramente do periósteeo

sobre o defeito com fio de sutura reabsorvível vicryl 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil), seguido pela sutura da pele com fio de nylon 4-0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, Brasil). A figura, resume os passos da técnica cirúrgica:

Figura 10: Sequência Cirúrgica da confecção de Defeitos Críticos de 0,8mm em calota craniana de rato: a) Anestesia Infiltrativa Subperiosteal b) Incisão Linear c) Calota craniana com referências anatômicas d) Delimitação e confecção defeito sob irrigação constante e) Defeito crítico. (f) Tratamento do Defeito com Enxerto ósseo: Osso de Banco - Unioss® + Sistema BoneLithium

5.6.3 Análise dos Resultados

A análise microscópica foi realizada através da observação das lâminas, que por sua vez serão descritas em suas peculiaridades, salientando os aspectos

relacionados ao processo de reparação óssea. A análise quantitativa (histomorfometria) será realizada pela mensuração da fração de tecido ósseo maduro na região do defeito, e também pela quantidade de tecido conjuntivo presente no local do defeito ósseo através do software Image J®.

5.6.4 Preparação Histotécnica e Análise Microscópica

Inicialmente o material foi submetido ao processo de desmineralização em solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a 10% tamponado com pH 7,0, com trocas realizadas duas vezes por semana por 30 dias, aproximadamente, até que não apresentassem resistência ao corte com lâmina de microtomo (Leica, Wetzlar, Alemanha). Cada peça foi cortada ao meio, na posição central do defeito. Posteriormente realizou-se procedimento histotécnico de rotina preconizado pela Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA, Marília, São Paulo, Brasil. Estas foram então lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídos em parafina. Realizaram-se cortes semi-seriados de 6µm de espessura de cada bloco, no sentido longitudinal utilizando-se micrótomo rotatório elétrico (Leica RM, Leica, Wetzlar, Alemanha). Os métodos de coloração empregados foram o da hematoxilina-eosina (HE) e Tricrômico de Masson.

5.6.5 Análise Tomográfica

As imagens por Tomografia Computadorizada dos espécimes do período de 60 dias foram realizadas na clínica RADIOFAST - Bauru. Foram adquiridas imagens axiais com 0,3mm de espessura, diâmetro de reconstrução 133 mm, distância fonte – detector 940 mm, distância fonte – amostra 535 mm, altura 115 mm, direção de rotação CW, tempo de exposição 800s, corrente do tubo 75mA, exposição 60mAs, tensão 110kV. Foram obtidas imagens axiais com 1mm de espessura. Os dados digitais da imagem produzida pelo tomógrafo foram gerados no padrão DICOM (Digital Imaging Communications in Medicine) os quais, posteriormente, foram processados para a reconstrução da imagem utilizando o Software E-vol3D – CDT, Brasil (figura7).

Figura 11: Análise tomográfica - Software E-vol3D – CDT, Brasil

Os espécimes estavam mantidos fixados em solução de formalina 10% antes da aquisição das imagens tomográficas.

5.6.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos na histomorfometria foram avaliados estatisticamente pelo teste estatístico de Kruskal Wallis e Student-Newman-Keuls. As diferenças das médias foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

6 Resultados

6 RESULTADOS

6.1 PARTE A

6.1.1 Caracterização físico-química

Os ensaios de Controle de Qualidade têm por objetivo avaliar as características físicas, químicas e microbiológicas das matérias-primas, embalagens, produtos em processo e produtos acabados. Dessa forma, a verificação da conformidade das especificações deve ser vista como um requisito necessário para a garantia da qualidade, segurança e eficácia do produto e os testes realizados no Sistema BoneLithium, foram ensaios analíticos que fazem parte do Controle de Qualidade preconizado pela ANVISA e teve como objetivo verificar a conformidade do biomaterial frente às especificações estabelecidas. A execução desses ensaios foi realizada por profissional qualificado e devidamente certificada pelo Laboratório NATRON, Bauru, Brasil.

Avaliou-se o pH através de metodologia ANVISA, e o resultado foi pH = 5,11 para o Sistema BoneLithium e pH = 5,22 para o Gel de Carbopol® (controle positivo) , obtido por potenciometria, ou seja, pela determinação da diferença de potencial entre dois eletrodos: o de referência e o de medida, imersos na amostra analisada. O valores representam um logaritmo negativo da concentração molar de íons de hidrogênio. Representa convencionalmente a acidez ou a alcalinidade de uma solução ou produto. A escala de pH vai de 1 (ácido) a 14 (alcalino), sendo que o valor 7 é considerado pH neutro.

A viscosidade é a resistência que o produto oferece à deformação ou ao fluxo. A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material e neste estudo foi avaliada através de metodologia: Copo Ford (Newtoniano), onde realizou-se o teste usando o viscosímetro de orifício que consiste na medição do tempo de escoamento do material comparado com a água. Utiliza-se um copo na forma de cone (copo Ford), com um orifício na parte inferior por onde escoar o fluido. A escolha do diâmetro do orifício é feita em função da faixa de viscosidade a ser determinada e os resultados obtidos através desta metodologia foi de 6010,64 cps, o que de acordo com a normatização o biomaterial se classifica

como um gel de alta viscosidade e com potencial de fixação ou diluição em meio líquido contendo água.

O aspecto analisado através de metodologia ANVISA revelou um gel de odor característico, incolor através de unidades sensoriais considerando valor máximo conforme legislação vigente.

Por fim, avaliou-se a alcalinidade de carbonatos no Sistema BoneLithium e no gel de Carbopol® e obteve-se através de metodologia SM2320B limite de quantificação em 0,001mg/L tendo resultado $< 0,001\text{mg/L}$ e para o sistema BoneLithium 0,001mg/L tendo resultado $< 0,001\text{mg}$, estabelecendo que não há alcalinidade de carbonatos, no entanto devido a sensibilidade do teste concluiu-se que a metodologia utilizada não foi satisfatória para a amostra uma vez que não houve variação em comparação com o limite de quantificação (LQ).

6.2 PARTE B

6.2.1 Descrição Histológica

A análise macroscópica das peças permitiu concluir que não houve qualquer processo infeccioso na região dos implantes em subcutâneo. As figuras XX e XX demonstram a localização dos tubos no período de 84 Dias de preservação:

Figura 11: Fotografia dos espécimes de tecido. Observe integridade dos a área onde o tudo de polietileno esta inserido. Grupo 180 dias – Biomaterial: Sistema BoneLithium.

Observa-se tecido de granulação com moderado infiltrado por leucócitos mononucleares por toda a extensão dos espécimes, presença de fibras colágenas

em organização em todos os espécimes observados. Aos 7 dias, é possível observar no grupo carbopol e Sistema BoneLithium a presença de maiores quantidades de células polimorfonucleares em organização e fibras colágenas disposta de forma mais organizadas quanto comparados ao controle (somente tubo de Butterfly), que em proximidade das bordas apresenta conteúdo de fibras colágenas dispostas em maior quantidade indicando resposta inflamatória condizente.

Aos 14 dias, o padrão microscópico é similar ao período anterior, com uma diminuição do tecido de granulação com persistência do infiltrado inflamatório mononuclear e presença de células polimorfonucleares na extensão do corte microscópico realizado. O tecido conjuntivo demonstra uma maior organização das fibras colágenas, apresentando áreas focais de leucócitos mononucleares em todos os espécimes analisados, além de grande atividade angiogênica (fluxo de hemácias) no interior próxima ao tubo de butterfly contendo o biomaterial, caracterizado pela presença de vasos sanguíneos em formação. Ainda, é possível observar áreas de organização tecidual com aumento de células infiltrada, indicando que o processo de reparo tecidual esta evoluindo sem interferências do processo natural. A Figura 12: A, B e C, exemplifica as evoluções celulares.

(A)

(B)

(C)

Figura12: Fotomicrografia da amostra de 7 dias após implante de tudo de polietileno em (A) vazio, (B) contendo gel de Carbopol® e (C) contendo SistemaBoneLithium no subcutâneo do dorso de ratos. Percebe-se que na imagem (C) a evolução celular inflamatória esta mais adiantada, caracterizada por aumento de células mononucleares e aparecimento de células gigantes. Aumento 40X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Aos 60 dias e no grupo de preservação de 84 dias é possível verificar a presença de resposta inflamatória caracterizada pela presença de tecido conjuntivo organizado com fibras colágenas dispostas horizontalmente ao redor dos tubos, caracterizadas por encapsulamento ao redor da extensão do tudo, com presença de células gigantes e mononucleares em maiores quantidades do que observadas no períodos iniciais.

Figura 13: Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno contendo gel de Carbopol® em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Figura 14: Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Figura 15: Fotomicrografia da amostra de 60 dias após implante de tudo de polietileno vazio (controle negativo) em subcutâneo do dorso de ratos. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Destaca-se nesta descrição que os espécimes contendo somente o tubo de polietileno (controle negativo) aos 180 dias após implante (Figura XXXX), apresentou formação de tecido em seu interior, caracterizado pela presença de fibras colágenas e células mononucleadas e células gigantes em formação próxima as arestas da matriz colágena de tecido conjuntivo. Ao redor, houve encapsulamento como esperado para períodos tardios, caracterizada por reação tecidual leve, o que permite inferir que este é um modelo aceitável para metodologias com objetivo de avaliar reação tecidual de biomateriais.

Figura 16: Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno vazio (controle negativo) em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para conteúdo tecidual no interior do tubo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Aos 180 dias, análise do controle (somente tubo de Butterfly) é possível observar intensa fibrose ao redor do tubo, com fibras colágenas dispostas em sentido organizado linearmente ao redor do tudo. Na análise qualitativa é possível observar que houve invasão de tecido fibroso para o interior do tubo, com presença de fibras colágenas em seu interior, aprisionando células mononucleares, hemácias em exteriorização, células polimorfonucleares em apoptose e fibroblastos com emissão de septos finos e incompletos atravessando toda a espessura da amostra, caracterizando fibrose cicatricial (figura 17).

Figura 17: Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para organização tecidual com resposta leve, formação de barreira fibrosa próximo a localização do tubo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

Figura 18: Fotomicrografia da amostra de 180 dias após implante de tudo de polietileno contendo o Sistema BoneLithium em subcutâneo do dorso de ratos. Destaque para organização tecidual com resposta leve, formação de barreira fibrosa próximo a localização do tubo. Neste espécime o tudo foi removido para melhor visualização das áreas histológicas de conexão com a superfície do tudo. Aumento 2X, Coloração Hematoxilina Eosina HE.

6.2.2 Tratamento Estatístico

O gráfico Box-Plot de medianas e quartis representa a evolução celular após implante dos biomateriais em subcutâneo do dorso de ratos para os períodos preconizados pela norma ISSO 10993, com períodos de 7, 14, 60, 84 e 180 dias. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste Kruskal Wallis, seguido do teste pos hoc Student-Newman-Keuls. Houve redução estatisticamente significativa no numero de polimorfonucleares decorrente do tratamento nos grupos onde letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Figura 19: Grupo Experimental Carbopol® - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 20: Grupo Experimental BoneLithium - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 21: Grupo Experimental BoneLithium - Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Na comparação entre os diferentes grupos experimentais em relação aos períodos de preservação, os gráficos seguintes demonstra a evolução estatística:

Figura 22: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 7 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 23: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 14 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 24: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 60 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 25: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 84 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 26: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Polimorfonucleares - Período: 180 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Para Células Mononucleares:

Figura 27: Gráfico Box-Plot Mediana e quartis. Critério: Mononucleares - Período: 7 Dias. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

6.3 PARTE C

6.3.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica a olho nu permite concluir que não foram observados sinais de agressão aos tecidos subjacentes ao implante dos tubos de polietileno, em todos os períodos estudados. Na figura abaixo (Figura XXX), percebe-se que o biomaterial permaneceu intacto, sem sinais de degradação visíveis macroscopicamente.

Figura 28: Macroscopia e identificação das peças anatômicas após coleta e corte na região dos defeitos.

6.3.2 Análise Descritiva por Microtomografia computadorizada μ CT

O escaneamento dos espécimes foi realizado com um tempo de aquisição de 46 minutos, utilizando-se os seguintes parâmetros tomográficos: 50 kV, 800 μ A, com filtro de 0,5 mm Al, com 180 graus de rotação e intervalo de exposição de 1 grau, sendo as imagens capturadas com uma resolução de 1304 x 1024 pixels, com um tamanho de voxel de 14,12 μ m.

As imagens obtidas em cortes tomográficos foram reconstruídas no software NRecon v1.6.4.8 (Skyscan), com parâmetros de reconstrução padronizados para todas as amostras. Na sequência, para obtenção das imagens em diferentes

planos de secção (transaxial e sagital), as imagens reconstruídas no software NRecon foram realinhadas no software DataViewer1.4.4.0 por meio de renderização de volume, técnica que permite uma análise interativa da morfologia óssea observando as áreas dos defeitos. Na figura abaixo, exemplo um espécime do grupo 1 (Lado Direito: Sistema BoneLithium / Lado Esquerdo: Gel de Carbopol® que na análise comparativa foi a que obteve menor quantidade óssea no interior do defeito).

Figura 29: Microtomografia computadorizada μ CT – Grupo Controle (coágulo) Período: 45 dias. SkyScan MicroCT

A análise qualitativa dos cortes tomográficos obtidos foi realizada por profissional especialista em radiologia e imaginologia e considerou a comparação entre todos os grupos estudados para estabelecer a conclusão de que os espécimes tratados com Sistema BoneLithium apresenta maior hiperdensidade na região dos defeitos, seguido do grupo onde se realizou o tratamento com Gel de Carbopol® apresentando hiperdensidade menor que o grupo BoneLithium, e por ultimo o grupo controle (coágulo) apresentando menor hiperdensidade nas regiões do defeito. Nas proximidades com as bordas do defeito todos os espécimes apresentaram hipodensidade parecida não havendo diferenças perceptíveis que suscite discussões.

6.3.3 Descrição Histológica

Todos os espécimes foram analisados microscopicamente e a critério de padronização das amostras, inicialmente avaliou-se o corte histológico como um todo na procura de afecções ou alterações infecciosas. Verificou-se que todos os espécimes apresentam as paredes do defeito bem definidas e observa-se uma discreta neoformação óssea nesta região caracterizada por presença de células osteogênicas da matriz de osso nativo que evidencia esforço no processo de reparo ósseo. Em ambos os grupos experimentais (G1 e G2) observou-se a área de defeito bilaterais. Aos 7 dias percebe-se que os defeitos encontram-se principalmente preenchidos por coágulo sanguíneo e nota-se a presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Observa-se áreas de tecido conjuntivo ao longo do defeito, caracterizando a presença de tecido conjuntivo fibroso formação. As figuras XXXX ilustram a evolução histológica:

Figura 30: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 1 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol® - Período de 7 dias, formação de tecido conjuntivo Aumento 2X, Coloração – Hematoxilina Eosina HE e Tricrômico de Masson.

Figura 31: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo) Período de 7 dias, formação de tecido conjuntivo Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson.

No grupo de preservação de 15 dias, é possível observar que os defeitos encontram-se preenchidos por tecido conjuntivo fibroso em processo de ossificação. Em alguns cortes existem ilhas de tecido ósseo na região central do defeito cirúrgico. Observa-se neoformação óssea nas bordas do defeito, mais evidentes em relação ao período de 7 dias, com presença de espaços medulares bastante evidentes, com atividade hematopoietica na região da bordas do defeito. Ainda, é possível a observação de áreas com tecido conjuntivo osteogênico em grandes quantidades mais ao centro do defeito nos espécimes tratados com o sistema BoneLithium.

Figura 32: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol®) Período de 15 dias, neoformação óssea a partir de matriz de tecido conjuntivo. Observe que o Lado direito apresenta maiores quantidades de tecido ósseo, em ambos os grupos (G1/G2) sendo deste lado utilizado Sistema BoneLithium. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson

Figura 33: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo) Período de 15 dias, neoformação óssea a partir de matriz de tecido conjuntivo. Observe que o Lado direito apresenta maiores quantidades de tecido ósseo, em ambos os grupos (G1/G2) sendo deste lado utilizado Sistema BoneLithium. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson.

Em alguns espécimes, aos 45 dias, observa-se que os defeitos encontram-se preenchidos por tecido ósseo em toda sua extensão, formando uma ponte óssea unindo as bordas do defeito nos grupos tratados com o Sistema BoneLithium e gel de Carbopol, evidenciado por uma ponte de tecido ósseo primário na parte inferior do defeito, e ilhas de tecido ósseo permeadas por tecido conjuntivo fibroso com padrão organizado.

Alguns espécimes apresentam trabeculado ósseo em organização e já possui característica de osso lamelar, evidenciando um estágio avançado de amadurecimento, percebido pela deposição mineral na matriz, além de tecido ósseo em maturação onde é possível observar a região do defeito com neoformação óssea em fase de amadurecimento evidenciado pela presença de lamelas concêntricas, presença de células organizadas.

Figura 34: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Gel de Carbopol®) Período de 45 dias, neoformação óssea caracterizada por maturação da matriz e deposição de minerais. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson.

Figura 35: Fotomicrografia panorâmica da amostra Grupo 2 (Lado Direito - Sistema BoneLithium/ Lado Esquerdo – Coágulo). Período de 45 dias, neoformação óssea caracterizada por maturação da matriz e deposição de minerais. Observe que do lado esquerdo permanece sem completo fechamento do defeito. Aumento 2X, Coloração Tricrômico de Masson.

6.3.4 Tratamento Estatístico

O gráficos abaixo, apresentam na sequencia o tratamento estatístico realizado utilizando comparação do volume de tecido ósseo e tecido conjuntivo, respectivamente para a comparação entre os biomateriais (BoneLithium/Carbopol/Coágulo) em função da morfometria realizada.

Figura 36: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (7 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda) considerando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 37: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (7 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 38: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (15 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda) considerando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 39: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (15 Dias – Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 40: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (45 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 41: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (15 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 42: Gráfico da morfometria de tecido conjuntivo (7 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 43: Gráfico da morfometria de tecido conjuntivo (7 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 44: Gráfico da morfometria de tecido conjuntivo (15 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 45: Gráfico da morfometria de tecido conjuntivo (15 Dias – Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 46: Gráfico da morfometria de tecido conjuntivo (45 Dias – Borda Direita/BordaEsquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

Figura 47: Gráfico da Morfometria de tecido conjuntivo (45 Dias – Centro) considerando diferenças estatisticamente significantes quando ($p < 0.05$, Kruskal Wallis).

6.4 PARTE D

6.4.1 Análise Macroscópica

A análise macroscópica das peças permitiu concluir que não houve qualquer processo infeccioso, fratura ou deterioração das peças anatômicas obtidas após a eutanásia dos animais. A figura exemplificação a organização para início do processo de descalcificação e histotécnica (figura 48).

Figura 48: Macroscopia e identificação das peças anatômicas após coleta e corte na região dos defeitos.

6.4.2 Análise Tomográfica

As figuras 49 e 50 mostram, respectivamente, imagens tomográficas de uma secção próxima à região central dos defeitos do grupo 45 dias (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, respectivamente) através de corte tomográfico com padrão DICOM (Digital Imaging Communications in Medicine) – tomógrafo I Cat Cone Beam – Xoran

visualizador View, RADIOFAST, Bauru, Brasil). A imagem 3D foi reconstruída utilizando-se software E-vol 3D – CDT, Brasil, com padronização da área do defeito crítico, seguindo metodologia de referência em cortes corono/axiais no sentido sagital obtidos através de localização de estruturas anatômicas nativas do animal.

Figura 49: Manipulação de imagens tomográficas em Software E-Vol 3D CDT, Bauru, Brasil. Observe a padronização na tomada radiográfica - *Ratus norvegicus albinus*. Grupos Experimentais.

Figura 50: Reconstrução 3D utilizando Software E-Vol 3D CDT, Bauru, Brasil. Observe a variação de filtros utilizada - *Ratus novergicus albinus*. Grupos Experimentais.

Na análise tomográfica destaca-se os reparos anatômicos específicos dos ossos parietais, que apresentam-se fusionados entre si bem como com os interparietais, constituindo um único elemento, amplo e convexo tanto anteroposterior quanto latero-lateralmente, tendo a sutura entre os parietais e a porção anterior da sutura entre os interparietais não fusionadas, embora cada parietal esteja fusionado ao interparietal do mesmo lado. Esse elemento único tem sua maior largura logo posteriormente aos arcos zigomáticos. Sua margem lateral, ao longo da sutura com o esquamosal, é extensa e côncava. Sua margem posterior é medialmente retilínea ou côncava e lateralmente, ao nível do processo temporal do supra-occipital, ela é levemente inclinada anteriormente, podendo alcançar o nível posterior do meato auditivo externo.

A crista sagital sobre a sutura entre os interparietais e em pequena extensão sobre aquela entre os parietais, é normalmente curta e baixa. O limite anterior da fossa temporal é frequentemente impreciso. Em alguns exemplares, a parte medial deste limite é marcada pela crista temporal superior que se estende em direção anteroventral desde o ponto mais anterior da crista sagital (ou algo posterior) à sutura parietoesquamosal.

Após localização e demarcação das referências anatômicas (figura 51), padroniza-se em $32,99\text{mm}^2$ o tamanho do defeito calculado pela área do cilindro considerando $\pi = 3,14$. Os resultados demonstram em escala Hounsfield, considerando variância nos diferentes tons de cinza, adquiridos no imageamento com raios-X, em valores numéricos. Esta transformação possibilita a abertura de janelas dentro da escala de cinza obtida nas imagens, permitindo maior diferenciação entre cores anteriormente muito semelhantes que possam quantificar e qualificar a análise utilizando o Software Evol – 3D através da seleção de filtros apropriados para análise interativa do processo de reparo ósseo. Os resultados demonstram que os grupos o qual receberam enxertos associados ao Sistema BoneLithium (G4, G6 e G8) apresentam maiores valores números na escala Hounsfield, sendo considerado maior hiperdensidade nos espécimes avaliados.

Figura 51: Padronização metodológica para análise e reconstrução tridimensional – E-vol 3D – CDT, Bauru, Brasil - *Ratus norvegicus albinus*. Grupos Experimentais.

6.4.3 Descrição Histológica

No período de 7 dias todos os espécimes analisados (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8) apresentaram-se permeados por tecido conjuntivo em estágio de organização, altamente vascularizado. Foi possível observar área de intenso infiltrado inflamatório na região central do defeito com presença de células gigantes

multinucleadas, caracterizando processo inflamatório esperado devido ao trauma cirúrgico local. Observa-se que no grupo controle (G1) e no grupo tratado com o Sistema BoneLithium (G2), os defeitos apresentam livres de partículas ósseas e/ou biomaterias, apresentado assim, maiores quantidades de células inflamatórias.

As amostras dos grupos tratados com enxertos ósseos no período de 7 dias apresenta as áreas do defeito preenchidas quase que em sua totalidade com partículas dos materiais utilizados (G3, G4, G5, G6, G7, G8) com áreas de tecido conjuntivo em processo de vascularização e presença de células inflamatórias dispersas na extensão do defeito. Não foi observado em nenhum espécime áreas de necrose óssea e/ou severas agressões teciduais.

Aos 15 dias, nas amostras tratadas com o Sistema BoneLithium, observou-se áreas do defeito preenchida por tecido conjuntivo fibroso em organização, infiltrado inflamatório e áreas discretas de atividade osteoblástica a partir das bordas do defeito, conforme a figura 52: A e B.

(A)

(B)

Figura 52: Fotomicrografia dos grupos Sistema BoneLithium - 15 dias após a cirurgia, evidenciando áreas de tecido conjuntivo osteogênico e presença de coágulo sanguíneo (A) células pré-osteogênicas e permeado por tecido conjuntivo (B) . Aumento 20X, coloração e Tricrômico de Masson.

Aos 15 dias, os defeitos do grupo controle (G1) apresentam-se preenchidos por uma delgada camada de tecido conjuntivo fibroso em organização e presença de infiltrado inflamatório discreto e difuso. Nota-se atividade osteogênica nas bordas do defeito ósseo, e também a presença de curtas trabéculas ósseas primárias, localizadas próximas a parede do defeito, conforme observado na figura 53.

No grupo Tratado com o Sistema BoneLithium (G2) observa-se que os 15 dias, os defeitos apresentam-se preenchidos por tecido conjuntivo fibroso, e osso em processo de neoformação, caracterizado pela presença de lacunas ósseas e células osteogênicas em organização, caracterizando aceleração no processo de maturação do tecido ósseo em neoformação, exemplificados na figura 53A, é possível verificar a deposição de minerais em áreas próximo as bodas do defeito.

Observou-se aos 45 dias, a presença de tecido conjuntivo organizado e fibroso preenchendo a intimidade do defeito cirúrgico do grupo controle (G1) e Sistema BoneLithium (G2) algumas áreas de neoformação óssea a partir das bordas do defeito, enquanto que nos grupos onde se utilizou enxerto ósseo (G3, G5, G7) sem associação com o biomaterial testado neste estudo, observou-se a presença de

tecido ósseo em neoformação nas regiões centrais do defeito exemplificado por presença de trabéculas ósseas, além de partículas de tecido ósseo e/ou biomaterial dispersas em toda a extensão do defeito. Nas bordas do defeito, é possível observar áreas de tecido ósseo em processo de mineralização, com lamelas bem definidas ao redor de toda a extensão do defeito crítico. A figura 53B, ilustra em maior aumento a presença de tecido conjuntivo em finalização de organização, intensa atividade osteoblástica a partir das bordas do defeito e áreas de neoformação óssea e a presença de osso em maturação, caracterizado pela presença de trabéculas ósseas. A figura 53 abaixo mostra esse processo:

(A)

(B)

(C)

Figura 53: Fotomicrografia dos grupos Sistema BoneLithium - 45 dias após a cirurgia, evidenciando áreas de tecido conjuntivo osteogênico e neoformação óssea característica: (A) Lacunas e Matriz óssea em mineralização (B) deposição de minerais, tecido em organização (C) trabéculas ósseas definidas. Aumento 20X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 54: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 1 (coágulo) - 7 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 55: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 2 (Sistema BoneLithium) - 7 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de

Figura56 : Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 3 (osso autógeno) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 57: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 4 (osso autógeno + sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 58: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Uniooss®) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 59: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Uniooss® + Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 60: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 45 (BioOss ®) - 15 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 61: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 45 (BioOss ® + Sistema BoneLithium) - 15 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Na análise comparativa dos corte histológicos dos resultados, os grupos tratados com o Sistema BoneLithium em associação com diferentes tipos de enxerto ósseo apresentou melhores respostas biológicas no processo de reparo, conforme pode ser visualizado nas figuras abaixo:

Figura 62: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 3 (Autógeno + Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 63: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 5 (Osso de Banco - Unioss®+ Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

Figura 64: Fotomicrografia de reconstrução panorâmica - Grupo 8 (BioOss®-Unioss®+ Sistema BoneLithium) - 45 dias após a cirurgia - Aumento 2X, coloração e Tricrômico de Masson.

6.4.5 Análise Estatística

Figura 65: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo controle - Coágulo - Borda Direita/Borda Esquerda). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 66: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo controle - Coágulo - Centro). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 67: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 2 – Sistema BoneLithium Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 68: Gráfico da Morfometria de Tecido Ósseo (Grupo 2 – Sistema BoneLithium - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 69: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Enxerto Autógeno* - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 70: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Enxerto Autógeno* – Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 71: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Enxerto Autógeno* + *Sistema BoneLithium* - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 72: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Enxerto Autógeno + Sistema BoneLithium* - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 73: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Osso de Banco - Unioss®* - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 74: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – Osso *de Banco* - *Unioss*® - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 75: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – Osso *de Banco* - *Unioss*® + Sistema BoneLithium - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 76: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo 3 – *Osso de Banco - Unioss®* + Sistema BoneLithium - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 77: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo Bio-Oss® - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 78: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo Bio-Oss® - Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 79: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo Bio-Oss® + Sistema BoneLithium - Borda Direita/Borda Esquerda em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 80: Gráfico da morfometria de tecido ósseo (Grupo Bio-Oss® + Sistema BoneLithium – Centro em função dos períodos 7, 15 e 45 dias). Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

As figuras 81 à 92 demonstram os resultados da morfometria do tecido ósseo para a região da borda e do centro do defeito respectivamente, relativo ao período de 7, 15 e 45 Dias em comparação aos grupos estudados (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8).

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, seguido do teste Tukey post hoc. Letras iguais representam diferenças estatisticamente significantes.

No período de 45 dias, a formação óssea tanto na região da borda do defeito, como na região central foi mais intensa nos grupos tratados com os diferentes tipos de enxerto ósseo, em comparação com o grupo controle e somente Sistema BoneLithium ($p < 0.05$). Não foram encontradas diferenças nos resultados entre os grupos tratados com coágulo e Sistema BoneLithium, apresentado apenas variação na quantificação de tecido conjuntivo que foi maior nos períodos iniciais (7 e 15 Dias) nos grupos tratados com o Sistema BoneLithium. No período de 45 dias, os grupos tratados com enxerto ósseo em associação com o Sistema BoneLithium apresentou maior formação óssea em comparação com os demais grupos ($p < 0.05$).

Figura 81: Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 82: Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 83 Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 84: Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 85: Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 86: Gráfico da histomorfometria de tecido ósseo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 87: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura88: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 7 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 89: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura90: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 15 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 91: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (Bordas) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

Figura 92: Gráfico da histomorfometria de tecido conjuntivo (Centro) em comparação entre os grupos estudados (Período 45 dias), obtidos por meio do teste ANOVA seguido de Tukey. Letras diferentes representam grupos com diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$, ANOVA, Tukey).

7 Discussão

7 DISCUSSÃO

A busca por biomateriais que otimizem o processo de reparo ósseo é corrente na ciência atual, e considerando que o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, a caracterização e a avaliação do comportamento biológico de um novo biomaterial de liberação controlada a base de carbonato de lítio que possa ser associado a diferentes tipos de enxerto ósseos, destaca-se que nossa proposta é apresentar inovação no contexto de ensaios pré-clínicos em modelo animal com foco na aplicabilidade clínica.

A remodelação óssea consiste em um processo altamente equilibrado, no qual deve ocorrer reabsorção seguida de neoformação óssea nas mesmas proporções, permitindo a renovação do tecido ósseo de maneira fisiológica e sem que haja alterações funcionais e na homeostase do tecido (TAKAYANAGI, 2007; DATTA et al., 2008; ERIKSEN, 2010). Embora o tecido ósseo pareça ter um aspecto macroscópico aparentemente inerte, as interações celulares que ocorrem no seu microambiente tornam este tecido metabolicamente muito dinâmico e com alta capacidade de remodelação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; ERIKSEN, 2010). Dessa forma quando ocorre qualquer prejuízo ao tecido ósseo por razões fisiológicas, traumática ou patológica, faz-se necessário a busca por alternativas terapêuticas que possam otimizar a capacidade de reparação óssea.

Seguindo esta necessidade, o Sistema BoneLithium foi concebido com a proposta de oferta de lítio localmente, em base polimérica do gel de Carbopol, que agrega características de baixo custo, fácil manipulação, ampla aplicabilidade e principalmente facilitação na incorporação de enxertos ósseos maximizando as possibilidade de uso clínico e garantindo melhor manejo no contexto das cirurgias reparadoras ósseas na ciências biomédicas, particularmente na odontologia, ortopedia e medicina veterinária.

O desenvolvimento do Sistema BoneLithium seguiu criteriosos processos de manipulação farmacológica e conforme a legislação brasileira vigente e harmonizada no Mercosul, é exigida a apresentação dos dados de Controle de Qualidade (especificações) no ato da regularização do produto. Para tanto, este estudo se preocupou em realizar testes físico-químicos com metodologias

padronizadas pela ANVISA e realizados por laboratório especializado e credenciado a fim de minimizar viés metodológicos.

Sabe-se que o Lítio atua sobre o processo de reparo ósseo conforme recentes publicações em revistas de alto impacto, que descreve a via Wnt β -catenina como sendo a principal responsável pela captação de lítio e mediação de fatores de crescimento que possam estar associados a otimização do reparo ósseo. O lítio (Li), um inibidor de GSK-3 β através da via Wnt β -catenina, tem sido documentado para impactar positivamente a cicatrização e o aumento da massa óssea em pacientes que fazem uso contínuo de lítio em transtornos psiquiátricos, porém sabe-se que o uso do carbonato de lítio tem uma janela terapêutica muito estreita e sua toxicidade é dependente da dose (Wang, 2007). Dessa maneira este estudo se embasou nas concentrações plasmáticas de lítio minimamente necessárias para a indução de resposta biológica e concepção a partir da associação ao gel de Carbopol, um polímero que agrega vantagens clínicas.

Vale destacar um estudo publicado recentemente (2017) na Nature Medicine que descreve a sinalização da via Wnt β -catenina como um fator crucial na homeostase óssea e demonstram que o lítio é um dos ativadores devem ser testados como uma abordagem possível para melhorar a neoformação óssea (BARON, KNEISSEL, et al, 2012). Tal evidência científica corrobora para a viabilidade deste estudo que apresenta potencial aplicação clínica em associação com enxerto ósseos comumente utilizados na odontologia e medicina.

Sendo assim, é de extrema importância na definição de modelos experimentais a observação de critérios que contemplem características que possam simular o processo de reparo ósseo para garantir similaridade fisiológica ao organismo humano o que justifica a revisão de literatura previamente a execução de ensaios pré-clínicos na busca pela otimização do processo de reparo ósseo. Os modelos experimentais empregados neste estudo atendem as exigências da norma ISO 10993 e contemplam aspectos importantes no desenho metodológico deste estudo.

Há relatos que pacientes com osteoporose têm alto risco de falência de implantes dentários e ortopédicos. O cloreto de lítio (LiCl) foi relatado como um potencial fármaco para aumentar a formação óssea. No entanto, o papel do LiCl na taxa de sucesso de implantes dentários e ortopédicos em condições osteoporóticas ainda não é totalmente conhecido. Contudo as evidências científicas atuais

convergem para a viabilidade do lítio no processo de reparação óssea e obviamente o Carbonato de Lítio composto presente no sistema BoneLithium agrega moléculas de carbono que possui grande interface com os mais variados sistemas biológicos

Neste contexto, este estudo avaliou a reação tecidual em subcutâneo de ratos o comportamento do Sistema BoneLithium / Gel de Carbopol e concluiu que houve uma resposta inflamatória moderada e esperada para biomateriais, seguindo da avaliação do processo de reparo ósseo em modelo de defeitos bilaterais criados cirurgicamente em calota craniana, modelo experimental fortemente difundido na literatura e observou-se na análise histológica descritiva uma sequência de reparo ósseo compatível com a hipótese de otimizar o processo de reparo. Nossos resultados permitiram concluir que houve uma adequada formação de coágulo sanguíneo nos períodos iniciais, seguido de eventos celulares específicos passando pelo estágio inflamatório (7 dias), síntese de tecido conjuntivo altamente especializado (15 Dias) e de intensa atividade de remodelação óssea (15-45 dias), corroborando para o processo de otimização do reparo ósseo.

Adicionalmente, avaliou-se o desempenho do Sistema BoneLithium associado a diferentes tipos de enxertos ósseos amplamente difundidos na esfera clínica (osso autógeno, osso proveniente de banco de osso, osso bovino liofilizado) e os resultados permitem inferir que os grupos onde o biomaterial foi associado obtiveram diferenças estatisticamente significantes quando comparados com os métodos tradicionais que utilizam os enxertos de forma única e isolada de outros biomateriais.

Li, et al, 2017, concluiu em seus experimentos que os defeitos ósseos criados em ratas OVX e tratados com o cimento de fosfato associado ao lítio a massa óssea reparada ocorreu na quarta semana caracterizado pelo aumento da formação de osso novo foi detectado ao redor dos implantes sendo uma elevada quantidade de tecido ósseo regenerado observado na oitava semana (Li, et al, 2017). Nossos resultados demonstram coerência com os resultados apresentados por Li (2017) visto que os grupos tratados com o Sistema BoneLithium (G1, G2) na avaliação do processo de reparo ósseo em calota craniana de coelho apresentam neoformação óssea no período de 45 dias, conforme análise histológica e também através da avaliação por μ CT, metodologia também empregada por Li, et al (2017) onde avaliou-se a hiperdensidade e a morfologia dos defeitos.

O estudo e a compreensão dos fenômenos biológicos iniciais da reparação dos enxertos ósseos são indiscutivelmente necessários para desencadear efeitos a neoformação adequada e quanto mais precoce for à revascularização e a osteogênese local, maior será a probabilidade de sucesso do procedimento de enxertia. A formação óssea é conduzida por células sobreviventes do enxerto e pela habilidade da matriz óssea em induzir diferenciação de células osteogênicas na área receptora. Embora enxerto e leito tenham contribuições individuais para o processo, é a soma de suas interações que determina o sucesso ou a falência do mesmo (BURCHARDT, ENNEKIG, 1978). Sendo assim, o uso do Sistema BoneLithium, alia vantagens nesse processo, uma vez que a hipótese de que o Lítio possa atuar na ativação da via WNT β -catenina, estaria propiciando nos períodos iniciais o desencadeamento de efeitos biológicos locais que certamente podem otimizar o processo de reparo de um substituto ósseo.

Vale destacar que além dos fenômenos biológicos, há outras variáveis que dependem do indivíduo e da técnica cirúrgica empregada e neste contexto visando à manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo e do hospedeiro a aplicação de novos biomateriais podem servir como ferramentas que melhorem a adaptação dos enxertos no leito cirúrgico, sendo o Sistema BoneLithium um material de baixo custo e com excelente consistência uma alternativa para associação as partículas dos enxertos ósseos garantindo melhor estabilidade na área receptora, contribuindo para a otimização do processo de reparo ósseo, conforme descrito por diversos autores. (TRIPLETT, 1996, CARVALHO, et al, 2000, CORADAZZI, 2003, LASH, et al, 2015). Por fim, os resultados obtidos neste estudo abrem portas para o aprimoramento do Sistema BoneLithium e novas investigações possam ser sugeridas a fim de melhorar as propriedades físico-químicas, garantir maiores possibilidade de aplicação em ensaios clínicos.

8 Conclusão

8 CONCLUSÃO

Dentro das limitações deste estudo, podemos concluir que:

- O Estudo da reação tecidual do Sistema BoneLithium, permitiu concluir que não há alterações severas a nível tecidual e inflamatório em subcutâneo de ratos, considerando teste preconizado pela norma ISSO 10993, tendo reação tecidual aceitável para um biomaterial que apresenta comportamento biológico favorável a possíveis aplicações clínicas.

- O Sistema BoneLithium mostrou resultados favoráveis no processo de reparo ósseo, indicam atividade biológica sob defeitos ósseos com capacidade de acelerar a reparo ósseo, constituindo uma alternativa com possibilidades de aplicação clínica no contexto biomédico.

- O Sistema BoneLithium mostrou resultados favoráveis no processo de reparo ósseo no tratamento de defeitos críticos utilizado diferentes tipos de enxertos ósseo e a associação do sistema com os enxertos testados neste estudo demonstrou diferenças estatísticas significantes na performance de tratamento dos defeitos ósseos, o que representa uma alternativa com potencial viabilidade clínica.

9 Referências

REFERÊNCIAS

AKYAMA, T; et al. Wnt/beta-catenin signaling. **Cytokine Growth Factor Rev** vol11: pág 273–282., 2015.

ARANA-CHAVEZ V.E.; MASSA L.F. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. **Int J Biochem Cell Biol**,36, p. 1367–73, 2004.

ALMEIDA, A.L.P.F.; GONÇALES, E.S.; ESPER, L.A.; TUNES, F.S.M.; ALVES, P.H.M. Biomateriais – substitutos ósseos. In: Regeneração Tecidual: O que realmente sabemos? **1ª Ed. VM Cultural**, São Paulo, SP, 2016.

ANVISA, BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Sítio na Internet:<http://www.anvisa.gov.br/> Acesso em: 13.02.2013.

ANVISA, BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional 2010: Renome 2010**. 2ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/FTN_2010.pdf

BAKSH, D., TUAN R.S. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. **J Cell Physiol** vol 212 pág 817–826, 2007.

BOLAND, G.M. PERKINS, G. HALL, D. J. TUAN, R.S. Wnt 3^a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem** vol 93: 1210–1230, 2004.

BOSSHARDT, D.D. & SCHENK, R.K. **Base Biológica da Regeneração Óssea. 20 anos da regeneração óssea guiada na implantodontia**. Quintessense, 2ª.ed; cap. 2, p.15-45, 2010.

BOSTROM, M. P.; CAMACHO, N. P. Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. **Clin Orthop Relat Res.**, v.355 Suppl, p. 274-282,1998.

BOOTH, C.; PRICE, C. **Comprehensive Polymer Science**. Oxford, UK:Pergamon Press, 1989.

BOWEN, J. A.A MELLONING, J. T. GRAY, J. L. TOWLE, H.T. Comparison of decalcified freeze- dried bone allograft and porous particulate hydroxyapatite in human periodontal osseous defects. **J Periodontol**. Dec; vol 60(12):647-54, 1989.

BURG, K. J., PORTER, S. KELLAM, J.F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**. Dec; vol21(23):2347-59, 2000.

CALLIESTER, W.D. **Ciência e Engenharia de Materiais**. Rio de Janeiro: Editora LCT, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; VASCONCELOS, L.W.; PI, J. Influence of bed preparation on the incorporation of autogenous bone grafts: a study in dogs. **Int J Oral Maxillofac Implants** v. 15, n. 4, p. 565-570, 2000.

CORADAZZI, L.F. Avaliação dos enxertos ósseos autógenos triturados manualmente ou coletados durante osteotomia. Análise microscópica e histométrica em coelhos. Dissertação de Mestrado apresentada à faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP 119p., 2003.

CATANZARO-GUIMARÃES S.A. et al. Osteogenic potential of autogenic demineralized dentin implanted in bony defects in dogs. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 15, p. 160-9, 1986.

CHEN, Y. et al. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. **J Biol Chem** 282: 526–533, 2013.

CHEN, Y. et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: Implications for therapy to improve bone healing. **PLoS Med** vol 4 (2), pág 382: 396, 2009.

FREITAS, J.A.S.; NEVES, L.T.; ALMEIDA, A.L.P.F.; GARIB, D.G.; TRINDADE-SUEDAM, I.K.; YAEDÚ, R.Y.F.; SOARES, S.; LAURIS, R.C.; VALLARELLI, T.M.; PINTO, J.H.N. Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies – USP (HRAC/USP) – Part 1 Overall Aspects. **Journal Applied of Oral Science**, Bauru, v.20, n.1, p.9-15, 2012.

FRIEDENSTEIN, A.J. “Determined and inducible osteogenic precursor cells.” in: “Hand tissue growth repair and remineralization”. **Aba Foundation Symposium**, 11, p.169-181, 1973.

FRIEDLAENDER, G.E. “Current Concepts Review: Bone Grafts”. **J. Bone Joint Surg**, 69A p. 786 – 790, 1987.

GUSMAN, R. C.; et al. Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds. **Biomaterials**. v. 12. pág.142-9612,dez. 2012.

HABIBOVIC, P., BARRALET, J. E. Bioinorganics and biomaterials: Bone repair. **Acta Biomaterialia**.vol 7,(8) pág 3013–3026, 2011

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

KHOSLA, S. WESTERNDORF, J. Building bone to reverse osteoporosis and repair fractures. **J Clin Investm** vol 118, n 2 pág 421-428, 2008.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. São Paulo: Medicina Panamericana, p. 39-76, 1999.

LINDHE, J. LANG, N.P., KARRING, T. **Tratado de Periodontia clínica e implantologia oral**. 5ª. ed, Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1304 p., 2010.

MASSARI, K. V, et al. Tissue reaction after subcutaneous implantation of a membrane composed of bacterial cellulose embedded with hydroxyapatite. **Dental, Oral and Craniofacial Research**, v. 1, p. 25-30, 2015.

MARQUES, L. **Estudo da Biocompatibilidade de Membranas de Polifluoreto de vinilideno (PVDF) e Trifluoretileno (TrFE) agregados ao Látex Natural e Amido**. 2009. 56f. Monografia (Iniciação Científica - Odontologia). Universidade do Sagrado Coração, Bauru.

MARQUES, L. **Estudo Comparativo entre dois protocolos de Laserterapia para a Regeneração Óssea**. 2010. 67f. Monografia (Iniciação Científica - Odontologia). Universidade do Sagrado Coração, Bauru.

MARQUES, L. ; HOLGADO, L. A. ; FRANCISCHONE, L. A. ; XIMENEZ, J. P. B.; OKAMOTO, R.; KINOSHITA, A . New LLLT protocol to speed up the bone healing process histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 1225-1230, 2015.

MATHIAS, M. C.R., Enxerto autógeno com sítios doadores na cavidade oral. RGO - **Rev. Gaúcha Odontol.** vol 51(4)pág:249-56., 2003.

MENDONÇA, R.J.; MAURÍCIO, V.B.; DE BORTOLLI TEIXEIRA, L.; LACHAT, J.J.; COUTINHO-NETTO, J. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 5, p. 764-768, 2010.

MOURA, J. M. L. et al. Comparison of the performance of natural latex membranes prepared with different procedures and PTFE membrane in guided bone regeneration (GBR) in rabbits. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 25, p. 2111-2120, 2014.

SILKSTONE, D. HONG, H. ALMAN, B. β -Catenin in the race to fracture repair: in it to Wnt Nature Reviews Rheumatology vol 4, pág. 413-419, 2008.

SILVA, A.K. et al. Lithium Chloride Regulates the Proliferation of Stem-Like Cells in Retinoblastoma Cell Lines: A Potential Role for the Canonical Wnt Signaling Pathway. **Mol Vis**. Vol 16, 36–4, 2010.

SIMPSON, D. KAKRALA, G. HAMPSON, K. Viable cells survive in fresh frozen human bone allografts. **Acta Orthop.**, Basingstoke. Vol. 78(númer1)pág: 26-30, 2007.

JESUS-GARCIA, R. et al. Enxerto homólogo de banco no tratamento de tumores ósseos. Experiência inicial da Escola Paulista de Medicina. **Rev. bras. Ortop.** Vol:27(11/12) pág844-8, 1992.

JAMES W.J et al. Correction of congenital malar hypoplasia using stereolithography for presurgical planning. **J Oral Maxillofac Surg.** 1 Apr, vol 56(4):512-516, 1988.

LASH, N.J., et al. Bone grafts and bone substitutes for opening-wedge osteotomies of the knee: a systematic review. **Arthroscopy.** Apr;31(4):720-30, 2015.

Li, L. *et al.* Acceleration of bone regeneration by activating Wnt/ β -catenin signalling pathway via lithium released from lithium chloride/calcium phosphate cement in osteoporosis. **Sci. Rep.** **7**, 45204, 2017.

FONTANARI, L. A.A MANNES, M. TREVISAN-JUNIOR, W. Utilização de enxerto ósseo homogêneo para reconstrução em áreas atróficas pré-implante: banco de ossos. **Implant News**, vol 5(6)pág: 593-597, 2008.

YUE, I.C. et al.; A novel polymeric chlorhexidine delivery device for the treatment of periodontal disease. **Biomaterials**, v. 25 n.17, p.3743-3750, 2004.

ZHU, Z. *et al.* Lithium Stimulates Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Proliferation through Gsk-3 β -Dependent Beta-Catenin/Wnt Pathway Activation. **Febs j.** vol 281, 5371–5389, 2014.

Anexos

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 026/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Desenvolvimento, caracterização e desempenho biológico de um novo biomaterial de liberação controlada à base de carbonato de lítio aplicado ao reparo ósseo**, de autoria de Leonardo Marques, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado **APROVADO** em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Rompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Profª Drª Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
Docente do Departamento de Prótese

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA
DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA

DEFESA
ACROPEZUARIA

GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA) (VÁLIDA EM TODO O TERRITÓRIO NACIONAL)				UF SP	SÉRIE F	NÚMERO 416083																																
1. BOVIDEOS ☐ Bovinos ☐ Bubalinos				2. MARCA DO REBANHO (PARA BOVINOS/BUBALINOS)																																		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th colspan="2">até 12 meses</th> <th colspan="2">13 a 24 meses</th> <th colspan="2">25 a 36 meses</th> <th colspan="2">+ de 36 meses</th> <th colspan="2">total</th> </tr> <tr> <td>M</td><td>F</td> <td>M</td><td>F</td> <td>M</td><td>F</td> <td>M</td><td>F</td> <td>M</td><td>F</td> </tr> </table>				até 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		+ de 36 meses		total		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Macho</td> <td colspan="2">Fêmea</td> <td colspan="2">Total</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td> <td> </td><td> </td> <td> </td><td> </td> </tr> </table>			Macho		Fêmea		Total							
até 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		+ de 36 meses		total																														
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F																													
Macho		Fêmea		Total																																		
3. AVES ☐ Galinhas ☐ Perus ☐ Avestruzes ☐ Ovos Férteis ☐ Pintos de 1 dia ☐ Adultos ☐ Bisavós ☐ Avós ☐ Matrizes ☐ Comercial ☐ Corte ☐ Postura				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Macho</td> <td colspan="2">Fêmea</td> <td colspan="2">Total</td> </tr> <tr> <td> </td><td> </td> <td> </td><td> </td> <td> </td><td> </td> </tr> </table>			Macho		Fêmea		Total																											
Macho		Fêmea		Total																																		
4. SUÍDEOS ☐		5. OUTRAS ESPÉCIES ☐		6. CAPRINOS ☐		7. OVINOS ☐		8. EQUÍDEOS ☐																														
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Macho</th> <th>Fêmea</th> <th>Total</th> </tr> <tr> <td>16</td> <td>0</td> <td>16</td> </tr> </table>		Macho	Fêmea	Total	16	0	16	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Peso (KG)</th> <th>Unidades</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Peso (KG)	Unidades			<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>até 6 meses</th> <th>Acima de 6 meses</th> <th>TOTAL</th> </tr> <tr> <td>M</td> <td>F</td> <td> </td> </tr> </table>		até 6 meses	Acima de 6 meses	TOTAL	M	F		<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Equínos</th> <th>Asininos</th> <th>Muñetas</th> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>		Equínos	Asininos	Muñetas												
Macho	Fêmea	Total																																				
16	0	16																																				
Peso (KG)	Unidades																																					
até 6 meses	Acima de 6 meses	TOTAL																																				
M	F																																					
Equínos	Asininos	Muñetas																																				
9. ANIMAIS AQUÁTICOS ☐ Peixes ☐ Crustáceos ☐ Moluscos ☐ Adultos ☐ Alevinos ☐ Larvas ☐ Pós-larvas ☐ Ovos Embrionados ☐ Clitos ☐ Peso (KG) ☐ Volumes (n.) ☐ Unidades				<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th>Total</th> </tr> <tr> <td> </td> </tr> </table>			Total																															
Total																																						
10. TOTAL POR EXTENSO: Deson																																						
11. PROCEDÊNCIA CPF/CNPJ: 48021918000097 Nome: UNESP - BOTUCATU Estabelecimento: FAZENDA LAGEADO Código do Estabelecimento: 35075060715 Município: BOTUCATU				12. DESTINO CPF/CNPJ: 1500130036 Nome: LEONARDO MARQUES Estabelecimento: R. OTAVIO PINHEIRO BRIZOLA, 975 Código do Estabelecimento: Município: BAURU																																		
13. FINALIDADE ☐ Abate ☐ Engorda ☐ Reprodução ☐ Exposição ☐ Leilão ☐ Esporte ☒ PESQUISA				14. Meio de Transporte ☐ A pé ☒ Rodoviário ☐ Ferroviário ☐ Aéreo ☐ Marítimo/Fluvial Lacra nº																																		
15. VACINAÇÕES ☐ FEBRE AFTOSA ☐ BRUCELOSE ☐ MAREK				16. ATESTADO DE EXAMES ☐ Brucelose ☐ Tuberculose ☐ AIE ☒ Certificação nº																																		
17. OBSERVAÇÃO COELHO VIVO				18. UNIDADE EXPEDIDORA Escritório de Defesa Agropecuária Botucatu (14) 3062-2060 eda.botucatu@cons.sp.gov.br																																		
19. EMITENTE: Médico Veterinário ☐ Federal ☐ Estadual ☐ Habilitado ☐ Funcionário Autorizado				20. EMISSÃO Local: EDA BOTUCATU Data: 21/01/2013 Validade: 30/01/2013 Hora: 13:34 Fone: 3332-2960																																		
21. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE Silene Cristina Lopes Garcia Funcionário Autorizado Credencial nº 1595 EDA/Botucatu				NOTA FISCAL: 383 GUIA DE RECOLHIMENTO: 994060327																																		

* Documentos para o trânsito de animais de acordo com o Decreto nº 5.741, de 30 de março de 2006.

** A presente GTA será invalidada nos casos de: (1) emenda, rasura ou adulteração; (2) interrupção do trânsito entre a procedência e o destino, com desembarque dos animais.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Banco de Tecidos Músculo Esqueléticos
Universidade de Marília

TERMO DE COMPROMISSO

Eu, LEONARDO MAQUES., RG: 43157001-2, (aluno, pesquisador ou professor), residente a PRAÇA DAS CEREJEIRAS, 1-54, no município de BAURU, orientado pelo Prof. Dra. Ana L. F. P. Almeida, desenvolverei trabalho de pesquisa intitulado: Desenvolvimento, caracterização e aplicação de Reparo Ósseo dentro do Programa de (mestrado, doutorado, iniciação científica, etc) doutorado / Reabilitação Oral pertencente à (instituição), utilizando o seguinte material fornecido pelo UNIOSS - BANCO DE OSSOS: Ossos Humanos - UnioSS

Igualmente, firmo os seguintes compromissos:

(a) o material fornecido não será utilizado para fins ou interesses comerciais;

(b) o material fornecido não será repassado para outra finalidade ou para utilização em outra pesquisa sem a devida autorização dos responsáveis do UNIOSS - BANCO DE OSSOS;

(c) todo material de divulgação dos resultados da pesquisa constará de citação no texto do trabalho e/ou como agradecimento no artigo, tese ou dissertação o nome UNIOSS - BANCO DE OSSOS;

(d) disponibilização de todo o material de divulgação dos resultados desta pesquisa ao setor científico do UNIOSS - BANCO DE OSSOS.

Estou ciente destes compromissos e da Lei Portaria GM 2600 de 21/10/2009, Artigo 156, e que o NÃO cumprimento de qualquer destes, inviabilizará o fornecimento de materiais e parcerias com o UNIOSS - BANCO DE OSSOS.

Local, data. 07/03/2014

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

Nome: LEONARDO MARQUES

Fones: (14) 3241-1631

e-mail: marques@unioSS.com.br

**Banco de Tecidos Músculo Esqueléticos
Universidade de Marília**

SOLICITAÇÃO DE TECIDOS ÓSSEOS - PESQUISA

DADOS DO CIRURGIÃO

Nome Completo: Leonardo Marques	
CPF: 25602306838	CRO: 101672-SP

ENDEREÇO PARA ENVIO / CONSULTÓRIO / CLÍNICA:

End.: PRAÇA DAS CEREJEIRAS	nº. 1-54	Compl.:
Bairro:	CEP: 17014500	
Cidade: BAURU	Estado: SP	
Telefone: 14-3241-1631	Celular: 14-9778-3768	
E-mail do Cirurgião / Consultório: marquesodontologia@hotmail.com		

TECIDO(S) SOLICITADO(S): QUANTIDADE(S) / TIPO TECIDO:

01 PARTICULADO – 2,0 ML.

TECIDO(S) SOLICITADO(S) PARA PESQUISA

Data da Solicitação: 07	março	2014
-------------------------	-------	------

**ESTOU CIENTE QUE ESTE TECIDO SERÁ UTILIZADO
SOMENTE PARA PESQUISA EM ÂMBITO LABORATORIAL, E
QUE, SOB QUAISQUER HIPÓTESES, O MESMO SERÁ
UTILIZADO EM PACIENTES.**

ASSINATURA E CARIMBO

Cirurgião Solicitante
CROSP: 101672