

MARCELO RODRIGUES AZENHA

REPARAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DE RATAS OVARECTOMIZADAS  
APÓS IMPLANTE COM BIOVIDRO. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA

Araçatuba – SP

2013

MARCELO RODRIGUES AZENHA

REPARAÇÃO ÓSSEA EM ALVÉOLOS DE RATAS OVARECTOMIZADAS  
APÓS IMPLANTE COM BIOVIDRO. ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA E  
IMUNOISTOQUÍMICA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia  
do Campus de Araçatuba – UNESP, para  
obtenção do grau de “DOUTOR EM  
ODONTOLOGIA” – Área de Concentração em  
Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial.

**Orientador:** Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

Araçatuba – SP

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FOA / UNESP

A993r      Azenha, Marcelo Rodrigues.  
Reparação óssea em alvéolos de ratas ovariectomizadas após implante com biovidro. análise histomorfométrica e imunoistoquímica / Marcelo Rodrigues Azenha. – Araçatuba, 2013  
83 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho

1. Cirurgia 2. Histologia 3. Osteoporose 4. Imunoistoquímica  
I. T.

Black D7  
CDD 617.64

# DEDICATÓRIA

---

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Osvaldo Rodrigues Azenha Junior (*in memoriam*) e Sandra Alice Scocuglia Rodrigues Azenha, pelo amor incondicional, compreensão e dedicação total. Vocês são os responsáveis diretos por minha formação pessoal e profissional. Amo vocês!!

Às minhas irmãs maravilhosas Aline, Fernanda e Roberta pelo incentivo, amizade e companheirismo nas alegrias e nas tristezas!

# AGRADECIMENTOS

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas bênçãos a mim concedidas, sendo uma delas a paciência e disposição para a conclusão desta fase tão importante da minha vida.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Bucó-maxilo-facial pela oportunidade de aprendizado.

Ao meu orientador Professor Doutor Osvaldo Magro Filho pela convivência, ensinamentos, amizade e principalmente pela confiança demonstrada durante esta jornada.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada (Disciplina de Cirurgia) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Idelmo Rangel Garcia Junior, Alessandra Aranega, Ana Paula Bassi, Daniela Ponzoni e Francisley Souza pelos ensinamentos, paciência, humildade e dedicação durante esses anos. Todos de alguma forma foram muito importantes para a minha formação.

Aos Professores Suzie Aparecida de Lacerda e Luiz Guilherme Brentegani da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP pelo profissionalismo, amizade, humildade e sabedoria compartilhadas comigo desde o início. Esse trabalho só pôde ser concluído graças ao entendimento de vocês. Muito obrigado!



À Professora Roberta Okamoto pela disposição e prontidão na realização das análises imunistoquímicas e ajuda na interpretação dos resultados. E também à Equipe do Laboratório de Histologia da Universidade do Sagrado Coração (USC), Bauru.

À minha namorada Ana Paula pela ajuda, companheirismo, amizade, carinho e compreensão em todos os momentos.

Aos amigos e colegas do Curso de Pós-graduação pela amizade, companheirismo e convivência: Heloísa Marão, Pedro Ivo, Fernando Guastaldi, Gabriel Ferreira, Leonardo Faverani, Lamis Meorin, Pâmela Letícia, Rodolfo e Igor Benetti.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, da Biblioteca e da seção de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP pela boa vontade, dedicação, auxílio e ajuda em todos os momentos.

Aos funcionários do Laboratório de Histologia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP pela disposição e ajuda durante todo o estudo.

RESUMO

---

## RESUMO

Azenha MR. Reparação óssea em alvéolos de ratas ovariectomizadas após implante com biovidro. Análise histomorfométrica e imunoistoquímica. [Tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

Objetivos: Avaliar o processo de reparo alveolar em ratas ovariectomizadas após implante com Biosilicato cristalino. Materiais e Métodos: Sessenta ratas foram divididas em quatro grupos (n = 15) de acordo com o tratamento: Grupo 1- ratas submetidas à cirurgia *sham* com alvéolos preenchidos com coágulo; Grupo 2-ratas submetidas à cirurgia *sham* com alvéolos preenchidos com Biosilicato cristalino; Grupo 3-ratas ovariectomizadas com alvéolos preenchidos com coágulo; e Grupo 4- ratas ovariectomizadas com alvéolos preenchidos com Biosilicato cristalino. Após 7, 14 e 28 dias os animais foram sacrificados e análises histomorfométricas (histologia e histometria) e imunoistoquímicas (Osteopontina e Osteocalcina) foram realizadas. A comparação dos resultados foi realizada utilizando o programa estatístico Assistat 2013 para Windows através da Análise de Variância e teste de Mann-Whitney, com resultados significantes sendo encontrados quando  $p \leq 0.05$ . Resultados: No período de 7 dias, os Grupos 1 e 3 apresentaram resultados superiores e estatisticamente maiores do que os Grupos 2 e 4 ( $p < 0.05$ ) quanto à formação óssea. Após o período de 14 dias as diferenças estatísticas mantiveram-se, com os Grupos 1 e 3 apresentando diferença estatisticamente significativa maiores aos Grupos 2 e 4 ( $p < 0.05$ ). Aos 28 dias, a diferença estatística significativa permaneceu entre os mesmo Grupos estudados, sendo que nos grupos implantados com o Biosilicato cerca de 60% do alvéolo já havia sido preenchido por osso novo. A imunoistoquímica revelou expressão das proteínas Osteocalcina e

Osteopontina, principalmente nos animais submetidos à cirurgia de ovariectomia. Conclusões: Os Grupos 1 e 3 foram os que apresentaram os melhores resultados durante todo o estudo, com o Biosilicato cristalino apresentando resultado favorável na reparação óssea sem contudo ser observada a reabsorção do biovidro. As análises imunoistoquímicas demonstraram que os animais submetidos a ovariectomia apresentaram uma maior sinalização das proteínas Osteocalcina e Osteopontina.

Palavras-chave: Silicato; Histomorfometria; Osteoporose; Imunoistoquímica.

# ABSTRACT

---

# ABSTRACT

Azenha MR. Alveolar bone repair in ovariectomized rats after implantation with bioglass. Histomorphometric and immunohistochemistry analysis [Thesis]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2013.

**Objectives:** To evaluate the process of alveolar repair in ovariectomized rats after implantation with Biosilicate. **Materials and Methods:** Sixty rats were divided into four groups (n = 15) according to treatment: Group 1 - rats underwent sham surgery with alveoli filled with blood clot; Group 2 - rats underwent sham surgery with alveoli filled with crystalline Biosilicate; Group 3 - ovariectomized rats with alveoli filled with blood clot; Group 4 - ovariectomized rats with alveoli filled with crystalline Biosilicate. After 7, 14 and 28 days the animals were sacrificed and histomorphometric analysis (histology and histometric) and immunohistochemical (Osteopontin and Osteocalcin) were measured. The comparison of the results was performed using the statistical program Assistat 2013 for Windows by Analysis of Variance and Mann-Whitney tests, with significant results being found when  $p \leq 0.05$ . **Results:** During the 7-day period, Groups 1 and 3 showed better and significantly higher results in bone formation than Groups 2 and 4 ( $p < 0.05$ ). After 14 days the statistical differences remained between Groups 1 and 3 and Groups 2 and 4 ( $p < 0.05$ ). At 28 days, the statically difference remained significant between the same Groups, while the groups implanted with Biosilicate presented about 60% of the socket filled by new bone. Immunohistochemistry revealed expression of proteins osteocalcin and osteopontin, especially in animals subjected to ovariectomy surgery. **Conclusions:** Groups 1 and 3 were those with the best results throughout the study, with the crystalline Biosilicate presenting favorable

result in bone repair without bioglass resorption. The immunohistochemical analysis showed that animals subjected to ovariectomy had a higher signaling in Osteocalcina and Osteopontin proteins.

Key-words: Silicate; Histomorphometry; Osteoporosis; Immunochemistry.



# LISTAS E SUMÁRIO

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Tecido conjuntivo rico em fibroblastos, capilares e osso neoformado. Alvéolo parcialmente preenchido por trabéculas ósseas. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; C- coágulo. (Grupo *Sham*+Coágulo, Período 7 dias, Aumento 40x).

Figura 2- Trabéculas ósseas imaturas próximas e em íntimo contato com o Biosilicato (seta) e tecido conjuntivo com baixa quantidade de coágulo sanguíneo. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; V- partícula do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 7 dias, Aumento 20x).

Figura 3- Partícula de Biosilicato implantado circundado por tecido conjuntivo e coágulo (seta), sem a presença de células inflamatórias. C- coágulo; V- partícula do Biosilicato. (Grupo OVX+Coágulo, Período 7 dias, Aumento 20x).

Figura 4- Presença de tecido conjuntivo e coágulo. Início de formação óssea. A- tecido conjuntivo; C- coágulo; B- osso. (Grupo OVX+Bio, Período 7 dias, Aumento 20x).

Figura 5- Extensa área de tecido conjuntivo e a presença de áreas de coágulo nas proximidades dos grânulos de Biosilicato. A- tecido conjuntivo; C- coágulo; V- partículas do Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 7 dias, Aumento 40x).

Figura 6- Trabéculas ósseas mais espessas e tecido conjuntivo e áreas de coágulo em menor quantidade do que no período anterior. A- tecido conjuntivo; B- osso. (Grupo *Sham*+Coágulo, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 7- Menor quantidade de tecido conjuntivo e íntimo contato entre a o Biosilicato e o tecido ósseo neoformado. A- tecido conjuntivo; B- osso; V- Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 8- Trabéculas de tecido ósseo entremeadas por tecido conjuntivo e pequenas áreas de coágulo. A- tecido conjuntivo; B- osso; C- coágulo. (Grupo OVX+Coágulo, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 9- Partículas do Biosilicato em contato direto com o tecido ósseo neoformado e poucas áreas de tecido conjuntivo maduro. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; V- partículas do Biovidro. (Grupo OVX+Bio, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 10- Completa formação de osso alveolar, com pequena quantidade de tecido conjuntivo maduro (seta). B- osso maduro. (Grupo *Sham*+Coágulo, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 11- Tecido ósseo em íntimo contato com a superfície do Biosilicato e entre as partículas, com poucas áreas de tecido conjuntivo maduro. A- tecido conjuntivo; B- osso; V- partículas do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 12- Excelente incorporação dos grânulos de Biosilicato com o tecido ósseo (seta). A- tecido conjuntivo; B- osso; V- partículas do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 28 dias, Aumento 40x).

Figura 13- Extensa formação de tecido ósseo com discretas áreas de tecido conjuntivo e coágulo. A- tecido conjuntivo; B- osso; C- coágulo. (Grupo OVX+Coágulo, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 14- Grande quantidade de tecido ósseo neoformado em toda a extensão do alvéolo e em contato com os fragmentos do biomaterial enxertado. B-osso maduro; V-partículas do Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 15- Contato entre o Biosilicato e osso neoformado (setas). B-osso; V- Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 28 dias, Aumento 40x).

Figura 16-Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalino (seta). V- Biosilicato; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 17- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Moderada (3) após o enxerto com Biosilicato cristalino (setas). V- Biosilicato; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 18- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Ausente (1) após o enxerto com Biosilicato cristalino. V- Biosilicato; B- osso; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 19- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalino (seta). V- Biosilicato; B- osso; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 20- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalino (seta). V- Biosilicato; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 21- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Moderada (3) após o enxerto com Biosilicato cristalino (setas). B- osso

neoformado; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

Figura 22- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Ausente (1) após o enxerto com Biosilicato cristalino. V- Biosilicato; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).

Figura 23- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalino (seta). V- Biosilicato; B- osso; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Quantidade de Tecido Ósseo (%) após os períodos de 7, 14 e 28 dias.

Tabela 2 – Escores obtidos com a análise imunoistoquímica nos grupos avaliados no período de 14 dias.

Tabela 3– Escores obtidos com a análise imunoistoquímica nos grupos avaliados no período de 28 dias.

Gráfico 1- Escores médios da Osteocalcina nos dois grupos enxertados com Biosilicato nas análises dos períodos de 14 e 28 dias.

Gráfico 2- Escores médios da Osteopontina nos dois grupos enxertados com Biosilicato nas análises dos períodos de 14 e 28 dias.

# SUMÁRIO

1.Introdução.....	24
2.Objetivos.....	31
3.Materiais e Métodos.....	33
4.Resultados.....	41
5.Discussão.....	47
6.Conclusões.....	58
Referências.....	60
Anexos.....	67

# INTRODUÇÃO

---



# 1. INTRODUÇÃO

Os substitutos ósseos têm sido amplamente utilizados no objetivo de minimizar as limitações que ocorrem após grandes perdas de estruturas ósseas ou nos casos de tecidos ósseos de baixa qualidade. Tais biomateriais devem ser osseointegráveis, ou seja, terem a capacidade de unir-se quimicamente à superfície do leito ósseo receptor com ausência de tecido fibroso; devem ser osteocondutivos, sustentando o crescimento ósseo na superfície; devem ser osteoindutivos, promovendo a diferenciação de células mesenquimais pluripotentes do leito receptor em células osteoblásticas; e devem ainda apresentar a capacidade de serem osteogênicos para que ocorra a neoformação óssea pelas células osteoblásticas presentes no biomaterial. O enxerto de osso autógeno é o único que satisfaz todos esses requisitos, com os substitutos ósseos artificiais ou sintéticos apresentando somente as propriedades de osseointegração e osteocondução (Constantino e Freidman, 1994; Cypher e Grossman, 1996).

Idealmente os materiais artificiais devem ser biocompatíveis, não tóxicos, ativos e devem sofrer remodelação, favorecendo a neoformação de tecido ósseo. Mecanicamente tais biomateriais devem ter resistência e elasticidade similares ao leito receptor ou tecido ósseo, devendo ser de fácil aplicação, adaptação e estarem disponíveis em quantidade adequada e em qualquer tempo. Kokubo *et al.* (2003) relatam que um requisito essencial para que o material artificial se una ao tecido ósseo *in vivo* é a formação de uma camada de apatita em sua superfície, com a interação dos biomateriais no ambiente fisiológico incluindo a biodissolução/biodegradação, precipitação de cristal de apatita e formação óssea na superfície do implante as expensas do

material (Daculsi *et al.*, 1990). Por essa razão, um grande número de pesquisas vem sendo realizadas visando a obtenção de biomateriais que apresentem características semelhantes ao osso humano e que possam ser utilizados em diferentes situações.

O interesse pelo uso clínico dos biovidros nas áreas médica e odontológica para o reparo ou substituição de tecido mineralizado tem aumentado nas últimas décadas. Há uma tendência ao desenvolvimento de substitutos artificiais de osso que não afetem o tecido normal, não possuam qualquer risco de infecção viral ou bacteriana para o paciente e possam ser empregado em qualquer tempo e em qualquer quantidade (Vogel *et al.*, 2001; Kokubo *et al.*, 2003; Foppiano *et al.*, 2004; Bosetti e Cannas, 2005; Roriz *et al.*, 2010). Diversas formulações de biovidro têm sido empregadas, destacando-se entre elas o 45S5®, cuja composição é 45% SiO<sub>2</sub>, 24,5% CaO, 24,5% Na<sub>2</sub>O e 6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Este biovidro foi o primeiro material osteocondutivo a formar uma união firme com o osso quando implantado em tecido ósseo (Hench e Wilson, 1984). O Bioglass45S5® tem sido conhecido como o biovidro de maior índice de bioatividade, o qual é definido como o inverso do tempo necessário para que 50% da área de superfície do material estejam em íntimo contato com o osso (Hench e Wilson, 1993). Além de unir-se ao osso em dias, assim como ao tecido mole, o Bioglass45S5® estimula a osteogênese em modelos *in vivo* (Ducheine, 1998).

Rocha Barros *et al.* (2003) empregando o biovidro fluorcanasite em implantes colocados em fêmur de coelhos, demonstraram que esse vidro apresentava biocompatibilidade, porém exibia grande solubilidade e mostrava evidências de dissolução superficial gradual. Devido à excessiva dissolução e

à liberação de partículas para o tecido adjacente, a fluorcanasite mostrou-se instável no meio biológico e inadequada para ser empregada na clínica. Os autores sugeriram que a redução da solubilidade desse material poderia melhorar a resposta óssea adjacente ao material. Após as mudanças na composição química da fluorcanasite visando controlar a sua solubilidade, a resposta óssea de três composições químicas desse vidro foi avaliada, concluindo que a diminuição da sua solubilidade não alterou significativamente a resposta biológica *in vivo*, com o Bioglass45S5® apresentando os melhores resultados (Rocha Barros *et al.*, 2007), afirmando ainda que a solubilidade relativamente baixa apresentada por duas das composições avaliadas ainda seja alta para permitir o contato direto osso/implante.

Uma das alterações sistêmicas encontradas na clínica diária em pacientes submetidos a diferentes tipos de tratamentos odontológicos é a osteoporose, doença que acomete mais de 75 milhões de pessoas nos Estados Unidos, Europa e Japão (Misteli, 2011). A osteoporose é caracterizada pela diminuição da massa óssea (osteopenia) e um declínio na micro-arquitetura óssea, com conseqüente aumento da fragilidade do esqueleto e conseqüente aumento no risco de fraturas. Esta diminuição da massa óssea e a perda original da arquitetura do osso são causadas por uma atividade osteoclástica acentuada, o que provoca uma reabsorção excessiva do osso, e também pela capacidade reduzida dos osteoblastos de formarem novo osso (Floor *et al.*, 2013). Levando em consideração a morfologia e o metabolismo ósseo dos pacientes saudáveis e dos pacientes com osteoporose, presumivelmente o desempenho biológico dos implantes colocados nos indivíduos com osteoporose é diferente e tende a ser pior (Jee; Tao, 2011).

A doença osteoporose pode ser introduzida nos animais através da estimulação química, ou seja, pela administração de medicamentos (Grardel et al., 1994), ou através da ovariectomia (animais fêmeas) ou orquidectomia (animais machos) (Jee; Yao, 2001). A remoção dos ovários ou testículos induz a um declínio nos níveis de estrógeno ou andrógeno, levando a uma redução da densidade mineral e do conteúdo mineralizado do tecido ósseo, sendo que o modelo animal utilizando ratas ovariectomizadas pode ser considerado o mais adequado.

Recentemente foi desenvolvida em São Carlos um biovidro pertencente ao sistema  $\text{SiO}_2\text{P}_2\text{O}_5\text{Na}_2\text{O}\cdot\text{CaO}$ , 100% cristalino denominado Biosilicato® (BI) (PI 0300644-1) visando a aplicação em áreas médicas e odontológicas. Tal biovidro vem sendo avaliado como substituto ósseo em diferentes situações, apresentando resultados promissores para serem usados na clínica odontológica (Moura *et al.*, 2007; Azenha *et al.*, 2010; Roriz *et al.*, 2010). Roriz *et al.* (2010) realizaram um estudo avaliando histologicamente o BI implantado em alvéolos dentais, observando que os alvéolos tratados com esse biovidro apresentaram maior formação de tecido mineralizado do que aqueles não tratados. Os resultados sugerem que o BI é biocompatível quando colocado no interior de alvéolos dentários e que esta biocompatibilidade pode aumentar a formação óssea após a extração dental.

Moura *et al.* (2007) avaliaram aspectos da osteogênese *in vitro* sobre o BI e observaram que esse biovidro é um material bioativo, demonstrando um perfil de biocompatibilidade semelhante ao Bioglass45S5®, com significativo aumento de áreas de matriz óssea mineralizada sobre a vitrocerâmica. Jabur *et al.* (2009) avaliando o recobrimento de implantes de titânio com o uso de

diferentes biovidros concluíram que o BI e o Bioglass45S5® demonstraram o mesmo padrão de formação óssea quando comparados ao osso autógeno. Azenha *et al.* (2010) realizaram análises histológicas e histométricas na superfície de implantes de diferentes biovidros implantados no fêmur de coelhos, concluindo que os Biosilicatos com uma e com duas fases cristalinas apresentaram excelente resposta óssea, com resultados semelhantes aos implantes de Bioglass45S5®. Este biomaterial vem sendo desenvolvido desde 2001 pela Equipe do Laboratório de Materiais Vítreatos da Universidade Federal de São Carlos, São Paulo e vem sendo testado e utilizado em diferentes situações clínicas tanto na odontologia quanto na medicina.

O processo de reparo alveolar é um interessante modelo para estudar a dinâmica do tecido ósseo, pois representa uma situação na qual o organismo cria condições para produção de tecido ósseo com o objetivo de preenchimento total do alvéolo previamente ocupado pelo dente (Carvalho e Okamoto, 1987). Atualmente, é de grande valia o estudo dos diferentes mecanismos envolvidos nos processos de osseointegração dos diferentes biomateriais, com destaque para as avaliações dos mecanismos celulares e moleculares. A análise imunoistoquímica, diferentemente dos estudos histomorfométricos, avalia as respostas celulares de forma dinâmica, apresentando a evolução do processo de reparo ósseo. Sabendo que o tecido ósseo apresenta um sistema altamente complexo e regulado através de proteínas, hormônios, fatores de crescimento e citocinas, é essencial o conhecimento do comportamento dos biovidros no preenchimento dos defeitos ósseos.

Dentre as diferentes proteínas envolvidas na osteogênese e presentes no processo de remodelação óssea a Osteocalcina (OC) merece destaque por

representar o processo de mineralização na formação do tecido ósseo. Thorwarth *et al.* (2005) sugerem que a atuação de tal proteína ocorra nos estágios iniciais de reparo ósseo, sendo sua concentração sérica um marcador confiável da formação óssea quando analisados em conjunto com dados histomorfométricos. Outra proteína de extrema importância para o reconhecimento do processo de reparo ósseo com a utilização de biomateriais é a Osteopontina (OP), uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz extracelular óssea expressa em células da linhagem osteoblástica. Essa proteína liga-se ao cálcio interagindo com o receptor de vitronectina, a  $\beta_3$  integrina. No tecido ósseo é produzida pelos osteoblastos e pelos osteoclastos e igualmente à OC indica a mineralização do tecido ósseo num estágio mais precoce da maturação óssea.

Frente a isso, o estudo dos biovidros é de grande valia, principalmente para a recuperação do tecido ósseo ausente ou perdido nos indivíduos que apresentam alterações sistêmicas como a osteoporose. A ovariectomia é um modelo experimental bastante útil e adequado para o estudo do comportamento de diferentes biomateriais implantados no alvéolo de ratas, sendo possível avaliar se a deficiência de estrógeno associado a uma dieta pobre em Cálcio interfere no processo de reparo ósseo após o preenchimento dos alvéolos com Biosilicato cristalino.

# OBJETIVOS

---

## 2. OBJETIVOS

### **Objetivo Geral**

Avaliar o processo de reparo alveolar de ratas ovariectomizadas após o preenchimento com Biosilicato cristalino.

### **Objetivos Específicos**

Avaliar o tecido ósseo e sua relação com o Biosilicato cristalino através de:

- análises histológicas e histométricas;
- quantificação das proteínas Osteocalcina e Osteopontina



# MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### *Preparação das amostras e caracterização das superfícies*

Para a obtenção do Bioglass45S5® baseado na composição  $\text{SiO}_2\text{CaONa}_2\text{OP}_2\text{O}_5$  foram empregados sílica de alta pureza, carbonato de cálcio, carbonato de sódio e fosfato de sódio. Os materiais foram pesados e misturados por 30 minutos em misturador em garrafas de polietileno. A fusão ocorreu em temperatura entre 1250°C e 1380°C por 3 a 4 horas em fornos elétricos (Rapid Temp 1710BL, CM Furnaces Inc., Bloomfield, NJ, EUA) no Laboratório de Materiais Vítreos da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP, Brasil). O fundido foi então vertido em moldes de grafite para a confecção de cilindros, que posteriormente foram triturados para obtenção do material particulado com dimensões entre 200 e 300 micrometros.

A vitrocerâmica cristalizada (Biosilicato cristalino) foi obtida submetendo o Bioglass45S5® a um ciclo de tratamento térmico visando promover sua cristalização, obtendo assim o Biosilicato de uma fase cristalina. A composição e o protocolo de tratamentos térmicos para a obtenção do Biosilicato® encontram-se descritos na patente EP1601623B1. Assim como o Bioglass45S5®, os Biosilicatos utilizados apresentavam tamanhos entre 200 e 300 micrometros. Previamente aos experimentos todos os biomateriais foram esterilizados utilizando radiação gama.

#### *Experimentação e Cirurgia*

Este estudo foi conduzido seguindo os Princípios Éticos para a Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no

Uso de Animais da Universidade de São Paulo (Campus Ribeirão Preto-SP), com protocolo nº 11.1.211.53.5.

Foram utilizadas 30 ratas (*Rattus norvegicus*, variedade Wistar), pesando entre 200 e 300 gramas alimentadas com ração balanceada 6042 Nuvilab CR-1 contendo 1.4% de Cálcio e 0.8% de Fósforo (Nuvotal, Colombo-Paraná, Brasil) composta de farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral, aminoácidos e aditivo antioxidante, com água a vontade e mantidos em caixas plásticas de 40x32x17 cm em condições controladas de iluminação (12 horas de luz/ 12 horas de escuro) e temperatura (21°C e 25°C). Quinze ratas foram submetidas à cirurgia de ovariectomia (OVX) e quinze ratas submetidas à cirurgia *sham*. Previamente aos procedimentos cirúrgicos os animais foram anestesiados utilizando tribromoetanol (2,2,2-tribromethanol, ALDRICH-Milwaukee, USA) administrado por via intraperitoneal na dosagem de 25 mg/100 gramas de peso corporal e a na região lateral bilateralmente da cavidade abdominal das ratas foi realizada a tricotomia e posteriormente a antissepsia com PVPI degermante. Após incisão da pele com lâmina número 15 montada em cabo de bisturi número 3, foi realizada a divulsão com o auxílio de uma tesoura romba para a localização do ovário. Após a exteriorização do mesmo, nas ratas submetidas à cirurgia de OVX o órgão foi extirpado e a artéria ligada com um fio de algodão 2-0, procedimento este realizado bilateralmente. Nas ratas submetidas apenas à cirurgia *sham*, após a exteriorização dos ovários, os mesmos não foram extirpados, sendo apenas manipulados e reinsertos na cavidade abdominal. Após a manipulação da cavidade abdominal, suturas por planos com o uso de um fio Vycril 4-0 foram

realizadas, seguidas por suturas na pele com fio de Nylon 4-0. As ratas submetidas à OVX tiveram sua dieta substituída após as cirurgias por uma ração especial contendo apenas 0.1% de Cálcio e 0.5% de Fósforo (RHOSTER Ind. Com., Vargem Grande Paulista, SP, Brasil), visando a diminuição da massa óssea destes animais.

Decorridas 6 semanas das cirurgias *sham* e da OVX o incisivo central superior das ratas foi extraído e os animais distribuídos de acordo com os seguintes grupos:

Grupo 1 (Sham+Coágulo) - ratas submetidas à cirurgia *sham* com o alvéolo preenchido por coágulo;

Grupo 2 – (Sham+Bio) - ratas submetidas à cirurgia *sham* com o alvéolo preenchido por Biosilicato cristalino;

Grupo 3 (OVX+Coágulo) – ratas submetidas à cirurgia *sham* com o alvéolo preenchido por coágulo;

Grupo 4 (OVX+Bio) – ratas submetidas à cirurgia de OVX com o alvéolo preenchido por Biosilicato cristalino.

Para os procedimentos de extrações dentárias o seguinte protocolo foi utilizado: os animais foram anestesiados utilizando tribromoetanol (2,2,2-tribromethanol, ALDRICH-Milwaukee, USA) administrado por via intraperitoneal na dosagem de 25 mg/100 gramas de peso corporal. Após a sindesmotomia do incisivo superior direito, o dente foi extraído com fórceps adaptado (Cintra *et al.*, 2010). Imediatamente após a exodontia, os alvéolos foram tratados de acordo com os grupos citados acima, com todos os animais recebendo dose única de 0,2 ml de injeção por via intramuscular de Pentabiótico Veterinário (Wyeth – São Bernardo do Campo, SP, Brasil) logo após a cirurgia.

Previamente à implantação, o Biosilicato cristalino foi mergulhado em soro fisiológico e, com o auxílio de um porta amálgama infantil foi inserido no interior do alvéolo. Ao final dos procedimentos os alvéolos foram suturados com fio monofilamentar não-absorvível (Nylon 4.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com o objetivo de manter o material confinado à cavidade.

#### *Eutanásia dos animais e coleta do material*

Completados os períodos de 7, 14 e 28 dias os animais foram sacrificados através da sobre dosagem do mesmo anestésico, com as mandíbulas sendo separadas das maxilas com o auxílio de uma lâmina de bisturi. A maxila foi então separada ao meio através de uma incisão ao nível do plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar. Através de um corte com tesoura reta tangenciando a face distal dos molares foi obtida a maxila direita contendo a peça de interesse que consiste no alvéolo do incisivo central direito. Foram incluídos 5 animais em cada um dos grupos nos diferentes períodos.

#### *Processamento histológico*

As hemi-maxilas direitas foram imersas em formol a 10% para fixação, descalcificadas por 4 dias em solução de citrato de sódio a 20% e ácido fórmico a 35%, lavadas por 24 horas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina de forma a permitir cortes longitudinais de 6 micrômetros de espessura e corados pela hematoxilina-eosina. Foram obtidos 20 cortes distanciados um do outro por um intervalo de 60 µm.

#### *Análise histomorfométrica*

Para a quantificação dos tecidos o alvéolo foi dividido em três terços: apical, médio e cervical. Foi utilizado para análise quantitativa dos tecidos um microscópio Leica DM LB2 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar Germany) com uma câmera digital de vídeo Leica DFC 280 (Leica Microsystems Imaging AG, Cambridge, England) do Laboratório de Microscopia do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As imagens foram processadas pelo programa Leica Win (Leica Imaging Systems Ltd, Cambridge, England) obtendo-se a fração de volume do osso neoformado e de tecido conjuntivo (%) no interior do alvéolo.

Os cortes histológicos foram focalizados ao microscópio com objetiva de 20X e 40X e em cada alvéolo foram analisados 15 campos microscópicos (5 em cada terço) com o auxílio de uma grade colocada sobre os cortes, sendo uma variação da Grade de Merz. Tal grade modificada consiste de um quadrado que limita a área teste e que contém 100 cruzamentos de linhas que são utilizados para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica. Conhecida a área coberta pela grade é possível estimar a densidade volumétrica do tecido ósseo nos diferentes períodos de estudo.

#### *Análise imunoistoquímica*

O estudo da expressão das proteínas OC e OP foi realizado através da técnica de imunoistoquímica descrita a seguir. Para a realização das reações imunoistoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase e os cortes submetidos aos anticorpos específicos. Todas as etapas laboratoriais foram realizadas nos Laboratório de Patologia do Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal da Faculdade de

Odontologia de Ribeirão Preto (USP) e no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração (USC-Bauru).

Foram preparados, a partir do material emblocado em parafina, cortes de 3 $\mu$ m, estendidos em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60°C, por 30 minutos, e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 85%. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica. Esse tratamento foi determinado no Laboratório de acordo com cada anticorpo.

Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água destilada e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução de TRIS pH 7,6 fazendo três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na sequência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6.

O anticorpo primário foi diluído em solução tampão de TRIS-HCl, pH 7,4, acrescido de albumina bovina a 1%, de acordo com diluição a ser determinada no Laboratório e foi incubado sobre os cortes durante 30 minutos. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o kit LSAB plus (DAKO, Carpinteria, CA, USA). As reações foram reveladas pela

diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer. Todos os passos desde a utilização do anticorpo primário até a contracoloração foram realizados automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO, Carpinteria, USA). Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem das lamínulas com resina Permount concluíram o preparo dos cortes que seguiram para análise em microscopia de luz.

Para esta análise foi construída uma tabela de escores que variou de 1 a 4, de maneira subjetiva e semi-quantitativa, onde as marcações imunoistoquímicas foram quantificadas como ausente (1), pouca (2), moderada (3) e intensa (4). Estes valores ajudam a mapear os eventos biomoleculares que ocorrem durante o processo de reparo alveolar em contato com o Biosilicato cristalino. A análise foi realizada de maneira padronizada por recuperação de imagem em microscópio Leica DMLB light microscope (Leica, Bensheim, Germany) em objetiva com aumentos de 20x e 40x, por um único observador de maneira duplo cega.

#### *Análise estatística*

A análise estatística verificou se havia diferença entre os diferentes períodos estudados. Para tanto foi utilizado o teste de Análise de Variância, sendo que as diferenças com  $p \leq 0.05$  foram analisadas utilizando o teste de Mann-Whitney. Todos os procedimentos foram executados no programa Assistat 2013 para Windows (Brasil).



# RESULTADOS

---

## 4. RESULTADOS

### *Análise clínica*

Todos os animais foram acompanhados durante todo o período experimental não sendo observado qualquer sinal de infecção nos animais utilizados para a obtenção dos resultados. As peças analisadas macroscopicamente não apresentaram qualquer sinal clínico de inflamação ou infecção, necrose ou outras lesões atingindo os tecidos moles e ósseos, permanecendo os animais saudáveis durante todo o estudo.

### *Análise histológica*

#### **7 dias**

##### Grupo 1 (Sham+Coágulo)

Nos cortes histológicos dos alvéolos dos animais observou-se um preenchimento com tecido conjuntivo cicatricial rico em fibroblastos, capilares e osso neoformado. O alvéolo encontrou-se parcialmente preenchido por delicadas trabéculas ósseas imaturas circundadas por osteoblastos, entremeadas com remanescentes de coágulo sanguíneo em organização (Figura 1).

##### Grupo 2 (Sham+Bio)

A reparação óssea neste grupo de animais apresentou trabéculas ósseas imaturas, em processo de formação contígua ao material utilizado, contendo ainda tecido conjuntivo com baixas quantidades de coágulos sanguíneos. O Biosilicato se mostrou distribuído pelos terços médio e cervical do alvéolo dental, com boa biocompatibilidade, sem a presença de células

inflamatórias ao seu redor, e sem provocar reações de corpo estranho. Foi observada integração entre as partículas e o tecido ósseo neoformado (Figura 2).

#### Grupo 3 (OVX+Coágulo)

As análises histológicas deste grupo demonstraram alvéolos com grande quantidade de tecido conjuntivo e coágulo, com pequenas áreas apresentando trabéculas ósseas imaturas com grande quantidade de fibroblastos (Figuras 3 e 4).

#### Grupo 4 (OVX+Bio)

Neste grupo se verificou nas proximidades dos grânulos de Biosilicato a presença de extensas áreas de tecido conjuntivo e de coágulo sanguíneo, além de ausência de trabéculas ósseas. O material implantado se mostrou biocompatível, sem a presença de células inflamatórias ao seu redor (Figura 5).

### **14 dias**

#### Grupo 1 (Sham+Coágulo)

A reparação óssea observada principalmente nos terços apical e médio dos alvéolos dos animais estava composta por trabéculas ósseas mais espessas envolvidas por osteoblastos. A quantidade de tecido conjuntivo se mostrou bem menor do que no período anterior com áreas apresentando coágulo em processo de reabsorção (Figura 6).

#### Grupo 2 (Sham+Bio)

Após 14 dias as partículas do material ocupavam grande área do alvéolo, com diminuição da quantidade de tecido conjuntivo e íntimo contato

entre a superfície do Biosilicato e o tecido ósseo neoformado. Ausência de áreas correspondentes ao coágulo e sem sinais de infecção (Figura 7).

#### Grupo 3 (OVX+Coágulo)

Aos 14 dias este grupo apresentou quantidade diminuída de tecido conjuntivo e pequenas áreas de coágulo. Maior parte do defeito foi preenchido com tecido ósseo (Figura 8).

#### Grupo 4 (OVX+Bio)

Neste período foi observado o início de formação de tecido ósseo em íntimo contato com o Biosilicato, com a presença de tecido conjuntivo e algumas áreas de coágulo. O Biosilicato foi considerado biocompatível e não apresentou efeitos negativos aos tecidos circundantes (Figura 9).

### **28 dias**

#### Grupo 1 (Sham+Coágulo)

Após 28 dias foi observada completa formação de osso nos alvéolos com pequena quantidade de tecido conjuntivo maduro (Figura 10).

#### Grupo 2 (Sham+Bio)

Pôde ser observada formação de tecido ósseo em íntimo contato com a superfície do Biosilicato e entre as partículas, com poucas áreas de tecido conjuntivo maduro. O biovidro apresentou biocompatibilidade e osteointegração, com deposição e maturação óssea na superfície dos grânulos (Figuras 11 e 12).

#### Grupo 3 (OVX+Coágulo)

Neste período é observada acentuada formação de osso, com pequenas áreas de tecido conjuntivo no interior do tecido mineralizado e coágulo (Figura 13)

#### Grupo 4 (OVX+Bio)

Observa-se grande quantidade de tecido ósseo neoformado em toda a extensão do alvéolo e em íntimo contato com os fragmentos do biomaterial enxertado, além de tecido conjuntivo maduro e presença de grânulos de Biosilicato nos terços médios e cervicais (Figuras 14 e 15).

#### *Análise histométrica*

##### *Tecido ósseo*

#### **7 dias**

Aos 7 dias os grupos 1 e 3 foram os que apresentaram os melhores resultados (32% e 27.1%) sem haver diferença entre eles ( $p > 0.05$ ). É observada diferença estatisticamente significativa quando comparamos estes dois grupos com os grupos 2 (19.4%) e 4 (13.7%) ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

#### **14 dias**

Quando a análise histométrica é realizada após 14 dias, as diferenças estatísticas se mantem entre os mesmos Grupos onde houve diferença aos 7 dias, com os animais do Grupo 1 apresentando 46% da área estudada preenchida por tecido ósseo, seguido pelo Grupo 3 (41.1%), Grupo 2 (32.5%) e Grupo 4 (26%) (Tabela 1).

#### **28 dias**

Aos 28 dias a diferença estatística significativa permaneceu entre os mesmo Grupos estudados. Houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 1 e 3 e os Grupos 2 e 4 ( $p < 0.05$ ) (Tabela 1).

### *Análise imunoistoquímica*

Foram realizadas reações imunoistoquímicas com o objetivo de avaliar as respostas celulares durante o processo de reparo alveolar aos 14 e 28 dias após a exodontia nos grupos que receberam enxerto do Biosilicato cristalino.

#### *Osteocalcina (OC)*

A OC apresentou diferença entre os escores dos Grupos 2 e 4. No período de 14 dias os escores no Grupo 2 foram classificados como 1 ou ausente, enquanto que no Grupo 4 os escores foram classificados como 2, ou de pouca intensidade (Tabela 2 e Gráfico 1). Já no período de 28 dias os escores do Grupo 2 foram classificados como 2 (pouca), enquanto que no Grupo 4 os escores foram classificados como 3 (intensidade moderada) (Tabela 3 e Gráfico 1).

#### *Osteopontina (OP)*

Quando a OP é avaliada, há diferença entre os escores dos Grupos 2 e 4. No período de 14 dias os escores no Grupo 2 foram classificados como 1 ou ausente, enquanto que no Grupo 4 os escores foram classificados como 2, ou de pouca intensidade (Tabela 3 e Gráfico 2). Já no período de 28 dias os escores do Grupo 2 foram classificados como 2 (pouca), enquanto que no Grupo 4 os escores foram classificados como 3 (intensidade moderada) (Tabela 3 e Gráfico 2).

# DISCUSSÃO

---

## 5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de novos substitutos ósseos é de extrema importância pensando na reabilitação dos pacientes nas mais variadas situações. Defeitos resultantes de traumas, ocasionados por ressecções ósseas em decorrência de patologias e na recuperação de rebordos ou áreas reabsorvidas com o passar do tempo que necessitem de reabilitação são alguns dos exemplos onde os substitutos ósseos podem ser aplicados. Frente a essas necessidades e visando diminuir a morbidade que as técnicas autógenas possam causar nos indivíduos, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta biológica de um biovidro recentemente desenvolvido e que tem apresentado resultados favoráveis. Para tanto, foram utilizadas como modelos experimentais ratas ovariectomizadas, que foram submetidas a extração dos incisivos superiores e os alvéolos preenchidos com o Biosilicato cristalino. Através de estudos histomorfométricos e imunoistoquímicos pôde ser observado o comportamento deste biomaterial em contato com o tecido ósseo de ratas ovariectomizadas.

A escolha da metodologia para a condução deste estudo considerou o elevado grau de confiabilidade e segurança que estudos anteriores demonstraram utilizando tal protocolo. Teófilo *et al.* (2004) avaliaram o comportamento do PerioGlas® no interior do alvéolo de ratas osteoporóticas e concluíram que esta metodologia foi adequada para a avaliação de novos biomateriais. Calixto *et al.* (2007) também apresentam um modelo experimental bastante semelhante ao utilizado neste trabalho e que pode ser considerado confiável para o estudo do Biosilicato cristalino.



Atualmente uma grande variedade de biomateriais encontra-se disponível para o uso e a busca por um material sintético absorvível, que apresente propriedades biomecânicas semelhantes ao osso cortical e elasticidade adequada para suportar as cargas e forças locais tem sido o grande desafio de inúmeras pesquisas e estudos no campo da engenharia tecidual. Variáveis como método de preparo do material, composição e tamanho das partículas tem grande influência nos resultados. Frente a isso o biovidro, inicialmente desenvolvido por Hench e Wilson (1993) vem sendo estudado e aperfeiçoado visando apresentar as características ideais para ser um substituto ósseo sintético. O Bioglass45S5® é considerado o vidro bioativo que apresenta as melhores características para uso na área de saúde, sendo extensamente testado em situações *in vitro* e *in vivo* como controle de outros biomateriais. Quando em contato com fluidos tissulares, as partículas dos biovidros apresentam em sua superfície a formação de camadas de hidroxiapatita, fazendo com que osteoblastos e constituintes orgânicos sejam atraídos, com conseqüente formação de um substrato com composição química semelhante ao tecido ósseo (Azenha *et al.*, 2010).

Recentemente a completa cristalização do Biovidro (Biosilicato cristalino) por pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos (São Paulo, Brasil) e a aplicação deste novo biovidro nas pesquisas tem demonstrado que este material sintético apresenta características similares ou até superiores ao Bioglass45S5®. Uma melhor organização tecidual, aumento do volume de tecido ósseo neoformado e no número de células osteoblásticas, além de melhora nas propriedades mecânicas tornam este vidro bastante promissor (Granito *et al.*, 2011). O Biosilicato cristalino, cuja composição química

pertence ao sistema quaternário  $P_2O_5.Na_2O.CaO.SiO_2$  foi inicialmente utilizado e testado para o tratamento da hipersensibilidade dentinária (Tirapelli *et al.*, 2010; Tirapelli *et al.*, 2011) e estudos recentes demonstraram que ele também exerce atividade antimicrobiana, o que pode ser considerada uma grande vantagem quando utilizado nas grandes reconstruções maxilares pela vasta gama de bactérias presentes na cavidade bucal (Martins *et al.*, 2011). Granito *et al.* (2011) sugerem que o Biosilicato apresenta maior atividade osteogênica do que o Bioglass45S5® após análise histológica. Contudo, não observam diferença significativa quanto à resistência, absorção de energia e desgaste estrutural dos materiais estudados. Roriz *et al.* (2010) concluem que o Biosilicato apresenta as mesmas características que o Biogran® após reconstruções de rebordos alveolares.

Poucos estudos avaliaram o comportamento dos biovidros em ratas ovariectomizadas e com dieta pobre em cálcio. O desenvolvimento do presente estudo foi baseado nos trabalhos desenvolvidos por Teófilo *et al.* (2003), sendo os procedimentos cirúrgicos e o tratamento dispensado aos animais executado de forma bastante similar. Neste trabalho os autores apresentam que a cirurgia de ovariectomia associada à dieta pobre em cálcio induz a perda óssea com consequente desenvolvimento da osteoporose duas vezes mais pronunciada no osso alveolar do que na região da tíbia. Concluíram que a massa óssea sofre uma perda de até 35% na 5ª semana após a ovariectomia e tende a continuar até a 11ª semana. No nosso estudo a extração dos incisivos superiores e a implantação do biovidro foi realizada após 6 semanas da ovariectomia ou cirurgia sham, sendo os animais sacrificados após 7, 14 e 28 dias da cirurgia de implantação do Biosilicato cristalino. Ainda, resultados

prévios demonstram que o processo de reparo alveolar dos animais utilizados neste estudo pode estar ativo após 6 semanas do trauma, o que torna a escolha de análises até o final da 4ª semana um período confiável para análise do comportamento do Biosilicato cristalino. Floor *et al.* (2013) demonstram através de exames computadorizados que decorridas 6 semanas da cirurgia de ovariectomia, ratas apresentam uma diminuição acentuada no trabeculado ósseo e na morfologia óssea na região femural, validando o período de 6 semanas após a cirurgia de ovariectomia como sendo um período adequado e confiável para que os animais apresentem um quadro compatível com a osteoporose.

A granulação ideal dos biomateriais particulados para uso na área odontológica é bastante discutida e varia de acordo com o biomaterial utilizado. Fetner *et al.* (1994) avaliaram diferentes granulações de 6 diferentes biovidros, não encontrando diferença nos resultados quando avaliados biomateriais medindo desde 90 até 710 micrometros. Hall *et al.* (1999) estudaram o comportamento de diferentes biomateriais em contato com a superfície de implantes osseointegráveis na mandíbula de cães, utilizando o biovidro com granulação entre 300 e 355 micrometros e observaram bom comportamento dos biomateriais testados. Gu *et al.* (2013) estudaram a implantação de diferentes biomateriais na calvária de ratos e encontraram os melhores resultados para o biovidro nos grânulos que apresentavam tamanho próximo à 200 micrometros. No nosso estudo o tamanho dos grânulos variou de 200 a 300 micrometros pela facilidade de manipulação do material e por ser possível capturar o Biosilicato cristalino embebido em soro com o uso de um porta amálgama infantil e inseri-lo no alvéolo, com perda mínima do material e

capacidade de mantê-lo na cavidade. Não foi possível estabelecer a quantidade exata enxertada em cada alvéolo, sendo utilizado como parâmetro o preenchimento total da ponta ativa do instrumental, o que foi considerado adequado, pois durante as análises histológicas toda a área que pretendíamos estudar encontrava-se preenchida com o biomaterial.

Os resultados do presente estudo evidenciam elevado grau de biocompatibilidade e excelente comportamento do Biosilicato. Não foi constatada resposta inflamatória decorrente da implantação do biomaterial, estando nossos resultados em concordância com Granito *et al.* (2011). Estes autores avaliaram os efeitos do Bioglass45S5® e do Biosilicato em defeitos ósseos criados em tibia de ratos. A ausência de reação inflamatória, bem como de células gigantes favoreceram a união osso/implante, a semelhança do que foi observado em outros trabalhos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa avaliando o comportamento de diferentes biovidros (Rocha Barros *et al.*, 2007; Azenha *et al.*, 2010).

Estudos prévios revelam que a cristalização do biovidro diminui o nível de bioatividade, podendo inclusive tornar um vidro bioativo em bioinerte (Li *et al.*, 1992). Entretanto, tais fatos não ocorreram no presente estudo. Contrariamente a essas afirmações, Hench e West (1996) constataram que a cristalização total do biovidro promove aumento do seu índice de bioatividade para nível superior aos das vitrocerâmicas comercializadas na época. Moura *et al.* (2007) demonstraram em experimentos *in vitro* que o Biosilicato ( $P_2O_5.Na_2O.CaO.SiO_2$ ) é altamente bioativo, apresentando maior formação de matriz óssea mineralizada em sistema de cultura de células osteogênicas quando comparado ao Biosilicato Vítreo e ao Bioglass45S5®.

A cristalização total do Biosilicato pode alterar importantes propriedades do material, modificando o pH do meio e tornando-o alcalino, favorecendo a diferenciação e a função osteoblástica (Xynos *et al.*, 2000; Loty *et al.*, 2001). A cristalização do Biosilicato pode também alterar outras propriedades do material como o índice de dissolução ou o seu grau de solubilidade, interferindo na formação óssea. A excessiva solubilidade do material pode dificultar a precipitação dos cristais de apatita e a formação óssea na superfície do implante, com partículas do material liberadas no meio podendo estimular a inflamação e resultados negativos (Daculsi *et al.*, 1990; Rocha Barros *et al.*, 2003). Vogel *et al.* (2004) relataram que a formação de células gigantes multinucleadas avaliadas durante a degradação de partículas do Bioglass45S5® em coelhos foi tempo dependente e foi influenciada pela solubilidade do material implantado. No presente estudo, quando avaliamos o Biosilicato cristalino implantado no alvéolo de ratas ovariectomizadas não observamos a degradação ou dissolução do material nos períodos analisados. Scotchford *et al.* (2011) analisando a degradação de discos pré-fabricados contendo biovidro implantados na calvária de ratos demonstraram que após longos períodos experimentais é possível encontrar áreas dos discos que sofreram mudanças e deformação, sugerindo a substituição do material implantado por tecido do leito receptor em maior intensidade a partir da 8ª semana. Como no presente estudo nosso período máximo de estudo foi de 28 dias, não é possível fazer comparações com os resultados encontrados por estes autores. Um dos empecilhos de realizar estudos com períodos maiores é a dificuldade de manutenção e cuidado dos animais.

Quando analisamos o período de 7 dias, os Grupos 1 e 3 apresentaram resultados superiores e estatisticamente maiores do que os Grupos 2 e 4 quanto à formação óssea. O que observamos neste período é que as ratas cujo alvéolo foi preenchido por coágulo foram as que apresentaram os resultados mais favoráveis, o que nos faz concluir que no período inicial de reparo alveolar o Biosilicato cristalino pode ter atrasado este processo, independentemente se a rata foi submetida à cirurgia de ovariectomia ou *sham*. Após o período de 14 dias as diferenças estatísticas mantiveram-se, com os Grupos 1 e 3 apresentando diferença estatisticamente significativa aos Grupos 2 e 4. Neste período é importante destacar que mesmo nos animais onde o Biosilicato cristalino foi implantado foi observada a formação de osso em pelo menos 25% do alvéolo, o que demonstra o bom comportamento biológico do Biosilicato. Aos 28 dias, a diferença estatística significativa permaneceu entre os mesmos Grupos estudados, sendo que nos grupos implantados com o Biosilicato cerca de 60% do alvéolo já havia sido preenchido por osso novo. Floor *et al.* (2013) avaliaram o comportamento de um biomaterial no fêmur de ratas osteoporóticas e concluíram que ratas osteoporóticas podem apresentar formação óssea similar a ratas saudáveis após longos períodos (12 semanas), o que nos faz acreditar que devido aos resultados satisfatórios do Biosilicato cristalino após 4 semanas há uma tendência de que após 12 semanas a formação de osso atinja resultados similares aos grupos cujos alvéolos foram preenchidos apenas por coágulo.

Durante todo o estudo as partículas do Biosilicato cristalino permaneceram no alvéolo e foram progressivamente sendo circundadas por osso neoformado, que também foi encontrado em íntimo contato com a

superfície do material. O que podemos concluir é que o biovidro implantado exerceu atividade de estimulação óssea, onde é possível observar uma recuperação acentuada no volume de osso do 7º para o 14º dia e do 14º para o 28º dia, com satisfatória recuperação morfológica ao final do estudo, mesmo com a presença do biomaterial no alvéolo e com cerca de 60% da área estudada sendo preenchida com novo osso. Matsumoto *et al.* (2012) encontraram uma acentuada reparação óssea no período de 14 dias apenas no grupo experimental do biovidro, justificando a isso a capacidade de osteocondução e osteoindução deste biomaterial. Acreditamos que no nosso estudo o Biosilicato cristalino tenha exercido apenas a função de osteocondução, não sendo possível afirmar se houve indução na formação de tecido ósseo. Estudos anteriores demonstram que a intensidade de formação de novo osso depende não apenas das características do material, mas também da espécie de animal utilizado, o sítio receptor, a quantidade e o tamanho das partículas enxertadas, com quase que a totalidade dos trabalhos apontando resultados positivos dos biovidros com excelente capacidade osteocondutora, além de apresentar um menor custo de desenvolvimento quando comparado à outros biovidros e biomateriais.

E finalmente, quando analisamos os resultados obtidos com as análises imunoistoquímicas observamos diferença nos escores apenas na expressão da proteína OC, sem haver diferença nos escores da OP. Nos dois períodos estudados (14 e 28 dias) o grupo OVX+Bio (Grupo 4) apresentou escore mais alto do que o grupo *sham* (Grupo 2). Quando fazemos uma comparação com os resultados imunoistoquímicos da expressão da proteína OC e os valores encontrados nas análises histométricas, podemos concluir que houve um

aumento mais acentuado na formação de osso no Grupo 4 de 7 para 14 dias (de 26% para 58.1%) do que no Grupo 2 (de 32.5% para 59.4%), o que pode explicar uma maior sinalização desta proteína no grupo de ratas ovariectomizadas, padrão este que segue até os 28 dias, quando a expressão da OC permanece mais alta no Grupo 4 do que no Grupo 2. A OC é uma proteína secretada pelos osteoblastos e tem papel importante na mineralização do tecido ósseo. A análise imunohistoquímica foi utilizada neste estudo para verificar de que forma o Biosilicato cristalino participava do processo de mineralização, e pudemos concluir que este biomaterial não interferiu de maneira negativa no reparo, com os processos celulares ocorrendo da forma esperada e os valores de formação óssea (em %) mantendo-se dentro dos resultados apresentados por outros pesquisadores (Teófilo *et al.*, 2004; Granito *et al.*, 2011; Matsumoto *et al.*, 2012).

Resultados similares são encontrados quando avaliada a expressão da proteína OC. A OP é uma proteína que é expressa nas células das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas, encontradas em grande quantidade na matriz óssea. Mckee e Nanci (1996) apresentam que a partir do momento que o processo de reabsorção óssea está completo em determinado sítio, a OP atrai os osteoblastos para estas áreas estimulando o depósito de matriz óssea, sendo a OP uma proteína importante para a avaliação do processo de reparo alveolar. No nosso estudo a OP apresentou diferença nos valores dos escores durante os períodos avaliados em ambos os grupos, sendo que após 14 e 28 dias o grupo OVX+Bio (Grupo 4) apresentou escores mais altos do que o grupo *sham* (Grupo 2), o que demonstra a atividade intensa do osso para preenchimento do defeito nas ratas ovariectomizadas e expressa a capacidade



de osteoindução do Biosilicato cristalino. Conforme demonstrado por Floor *et al.* (2013) tratamento regenerativos em ratas com osteoporose tendem a requerer um esforço maior do metabolismo ósseo para que haja a neoformação, o que pode justificar um aumento da sinalização de ambas as proteínas nos animais submetidos a cirurgia de ovariectomia.

# CONCLUSÕES

---

## 6. CONCLUSÕES

1- Os Grupos 1 e 3 foram os que apresentaram os melhores resultados durante todo o estudo;

2- O Biosilicato cristalino apresentou resultado favorável na reparação óssea;

3- Não foi observada reabsorção das partículas do Biosilicato cristalino;

4- As análises imunohistoquímicas demonstraram que os animais submetidos a ovariectomia apresentaram uma maior sinalização das proteínas Osteocalcina e Osteopontina.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

1. Constantino PD, Freidman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am* 1994; 27: 1037-73.
2. CypherTJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg* 1996; 35: 413-71.
3. Kokubo T, Kim Hyun-Min, Kawashita, M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials* 2003; 24: 2161-75.
4. Dalculsi G, Passuti N. Effect of the macroporosity for osseous substitution of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1990; 11: 86-7.
5. Vogel M, Voigt C, Gross UM, Muller-Mai CM. In vivo comparison of bioactive glass particles in rabbits. *Biomaterials* 2001; 22: 357-62.
6. Foppiano S, Marshall SJ, Marshall GW, Saiz E, Tomsia AP. The influence of novel glasses on *in vitro* osteoblast behavior. 2004 DOI:10.1002/jbm.a.30159
7. Bosetti M, Cannas M. The effect of bioactive glasses on bone marrow stromal cells differentiation. *Biomaterials* 2005; 26: 3873-9.
8. Roriz VM, Rosa AL, Peitl O, Zannoto E, Panzeri H, Oliveira PT. Efficacy of bioactive glass-ceramic (Biosilicate®) in the maintenance of alveolar ridges and in osseointegration of titanium implants. *Clin Oral Impl Res* 2010; 21; 148-55.
9. Hench LL, Wilson J. Surface active biomaterials. *Science* 1984; 226: 630-5.
10. Hench LL, Wilson J. An introduction to bioceramics. Singapore: World Scientific; 1993. 386 pp.
11. Ducheyne P. Stimulation of biologic function with bioactive glass. *MRS Bull* 1998; 28: 43-9.

12. Rocha Barros VM, Rosa AL, Beloti MM, Chierice, G. In vivo biocompatibility of three different chemical compositions of *Ricinus comunis* poliurethane. *J Biomed Materials Res* 2003; 67: 235 – 9.
13. Rocha Barros VM, Liporaci Jr. JLJ, Rosa AL, Junqueira MC, Oliveira PT, Johnson A, van Noort R. Bone response to three different chemical compositions of fluorcanasite glass-ceramic. *J Biomed Mater Res A* 2007; 83: 480-3.
14. Misteli L. International Osteoporosis Foundation 2011 ([iofbonehealth.org](http://iofbonehealth.org)).
15. Floor CJ, Watering V, Laverman P, Cuijpers VM, Gotthardt M, Bronkhorst EM, Boerman OC, Jansen JA, Beucken JP. The biological performance of injectable calcium phosphate/PLGA cement in osteoporotic rats. *Biomed Mater* 2013; 8: 1-12.
16. Jee WSS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis *J. Musculoskel* 2001; 1: 193–207.
17. Grardel B, Sutter B, Flautre B, Viguiier E, Lavaste F and Hardouin P. Effects of glucocorticoids on skeletal growth in rabbits evaluated by dual-photon absorptiometry, microscopic connectivity and vertebral compressive strength *Osteoporos Int.* 1994; 4: 204–10.
18. Moura J, Teixeira LN, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Beloti MM, Panzeri H, Rosa AL, Oliveira PT. *In vitro* osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate®). *J Biomed Mater Res A* 2007; 82: 545-7.
19. Azenha MR, Peitl O, Barros VMR. Bone response to Biosilicates with different crystal phases. *Braz Dent J* 2010; 21:383-9.

20. Jabur RO, Trivelatto AE, Barros VMR. Osseointegration of Ti implants in buccal alveolar bone defect filled with bioactive glasses in dog mandible. *Oral Surg* 2009; 2; 161-6.
21. Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med*. 1995 Feb 2;332 (5):305-11.
22. Teofilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Bone healing in osteoporotic female rats following intra-alveolar grafting of bioactive glass. *Arch Oral Biol*. 2004 Sep;49(9):755-62.
23. Carvalho ACP, Okamoto T. *Cirurgia bucal: fundamentos experimentais aplicados a clinica*. Sao Paulo: Panamericana; 1987.
24. Thorwarth M, Rupprecht S, Falk S et al. Expression of bone matrix proteins during de novo bone formation using a bovine collagen and platelet-rich plasma (PRP) – an immunohistochemical analysis. *Biomaterials* 2005; 26: 2575-84.
25. Cintra LT, Bernabé PF, de Moraes IG, Gomes-Filho JE, Okamoto T, Consolaro A, Pinheiro TN. Evaluation of subcutaneous and alveolar implantation surgical sites in the study of the biological properties of root-end filling endodontic materials. *J Appl Oral Sci* 2010; 18: 75-82.
26. Calixto RFE, Teófilo JM, Brentegani LG, Lamano-Carvalho TL. Grafting of tooth extraction socket with inorganic bovine bone or bioactive glass particles: comparative histometric study in rats. *Impl Dent* 2007;16:260-66.
27. Granito RN, Ribeiro DA, Rennó AC, Ravagnani C, Bossini PS, Peitl-Filho O, Zanotto ED, Parizotto NA, Oishi J. Effects of Biosilicate and bioglass 45S5 on tibial bone consolidation on rats: a biomechanical and a histological study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;97(1):139–47.

28. Tirapelli C, Panzeri H, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. A novel bioactive glass-ceramic for treating dentin hypersensitivity. *Braz Oral Res* 2010;24:381-7.
29. Tirapelli C, Panzeri H, Lara EHG, Soares RG, Peitl O, Zanotto ED. The effect of a novel crystallised bioactive glass-ceramic powder on dentine hypersensitivity: a long-term clinical study. *J Oral Rehab* 2011 38; 253–62.
30. Martins CH, Carvalho TC, Souza MG, Ravagnani C, Peitl O, Zanotto ED, Panzeri H, Casemiro LA. Assessment of antimicrobial effect of Biosilicate\_ against anaerobic, microaerophilic and facultative anaerobic microorganisms. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:1439–46.
31. Teófilo JM, Azevedo ACB, Petenusci SO, Mazaro R, Lamano- Carvalho TL. Comparison between two experimental protocols to promote osteoporosis in the maxilla and proximal tibia of female rats. *Braz Dent Res* 2003;17:55-9.
32. Fetner AE, Hartigan MS, Low SB. Periodontal repair using Perioglas in nonhuman primates: clinical and histologic observations. *Compendium* 1994; 15: 932-8.
33. Hall EE, Meffert RM, Hermann JS, Mellonig JT, Cochran DL. Comparison of bioactive glass to demineralized freeze-dried bone allograft in the treatment of intrabony defects around implants in the canine mandible. *J Periodontol* 1999;70:526-35.
34. Gu Y, Huang W, Rahaman MN, Day DE. Bone regeneration in rat calvarial defects implanted with fibrous scaffolds composed of a mixture of silicate and borate bioactive glasses. *Acta Biomater*. 2013. doi:pii: S1742-7061(13)00332-2. 10.1016/j.actbio.2013.06.039.



34. Li P, Yang Q, Zhang F, Kokubo T. The effect of residual glassy phase in a bioactive glass-ceramic on the formation of its surface apatite layer in vitro. *J Biomed Mater Res* 1992; 26: 291-6.
35. Hench LL, West JK. Biological applications of bioactive glasses. *Life Chem Rep* 1996; 13:187-241.
36. Xynos ID, Edgar AJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 461 – 5.
37. Loty C, Sautier JM, Tan MT, Oboeuf M, Jallot E, Boulekbache H, Greenspan D, Forest N. Bioactive glass stimulates in vitro osteoblast differentiation and creates a favorable template for bone tissue formation. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 231 – 9.
38. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM. Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass particles in rabbits. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70: 370 – 9.
39. Scotchford CA, Shahtaheri M, Chen PS, Evans M, Parsons AJ, Aitchison GA, Efeoglu C, Burke JL, Vikram A, Fisher SE, Rudd CD. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated, degradable, long fibre composite implants. *J Biomed Mater Res A*. 2011;96:230-8.
40. Matsumoto MA, Caviqioli G, Bigueti CC, Holgado LA, Saraiva PP, Rennó ACM, Kawakami RY. A novel bioactive vitroceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. *J Mater Sci Mater Med* 2012;23(6):1447-56.

41. Mckee MD, Nanci A. OPN at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants, ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Res Technol* 1996; 33:141-64.

# ANEXOS

## Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Campus de Ribeirão Preto  
Comissão de Ética no Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.211.53.5), intitulado "Reparo Alveolar de Ratas Osteoporóticas após Enxerto de Vidro Bioativo (Biosilicato®), de autoria de **Marcelo Rodrigues Azenha**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 01/06/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.211.53.5), entitled: "Reparo Alveolar de Ratas Osteoporóticas após Enxerto de Vidro Bioativo (Biosilicato®), by **Marcelo Rodrigues Azenha**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 01, 2011.

Ribeirão Preto, 6 de junho de 2011.

  
Presidente da CEUA  
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

  
Secretária da CEUA  
Maria Angélica Depiro

## Anexo B – Normas: Biomaterials (Qualis A1)

---

### **-Manuscript preparation:**

**General:** Manuscripts must be word processed (preferably in Word format), double-spaced with wide margins and a font size of 12 or 10 pt. Files prepared in LaTeX are not supported. Figure captions should be in Arial font 9pt. Please check the current style of the journal, particularly the reference style (Vancouver), and avoid excessive layout styling as most formatting codes will be removed or replaced during the processing of your article. In addition, do not use options such as automatic word breaking, justified layout, double columns or automatic paragraph numbering (especially for numbered references). However do use bold face, italic, subscripts, superscripts etc. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. The preferred style is: Surname, Initials, Department, Institution, City/State, Postal Code, Country. Authors should retain copies of all versions of their manuscript submitted to the journal. Authors are especially requested to be vigilant over the submission of the correct version of the manuscript at the various stages of the editorial process.

**English Language:** Manuscripts should be proof-read and have English language errors corrected before submission as we may have to return papers due to poor language usage. Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> for more information.

**Paper Length:** Authors are urged to write as concisely as possible.

**Abstracts:** All manuscripts are to be supplied with an Abstract of about 100-200 words in length.

**Keywords:** Authors must provide 4-6 keywords for indexing purposes. A keyword list can be found at the end of these instructions. [click here](#)).

**Text:** Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, Appendix (where necessary), Figures, Figure Captions and Tables, Supplementary Data. The corresponding

author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. An abbreviated title for use as a running headline should also be supplied. Authors are requested to acknowledge funding sources for the work.

**Units:** The SI system should be used for all scientific and laboratory data; if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10<sup>9</sup> in America, 10<sup>12</sup> in Europe) is ambiguous and must not be used. If a large number of symbols are used it is helpful if authors submit a list of these symbols and their meanings.

**References:** All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. In the text refer to references by a number in square brackets on the line (e.g. Since Peterson[1]), and the full reference should be formatted according to the permutation of the Vancouver reference system with numbers in the text. It is suggested that authors refer to the following link for a comprehensive overview of the Vancouver reference styles: Vancouver Reference Styles

Examples of formatting follow:

1. Driessens FCM, Boltong MG, Bermudez O, Planell JA. Formulation and setting times of some calcium orthophosphate cements: a pilot study. *J Mater Sci: Mater Med* 1993;4:503-508.
2. Nancollas H. In vitro studies of calcium phosphate crystallisation. In: Mann S, Webb J, Williams RJP, editors. *Biom mineralization. Chemical and biochemical perspectives.* New York: VCH, 1989. p. 157-182.
3. Brown W, Chow LC. Combinations of sparingly soluble calcium phosphates in slurries and paste as mineralizers and cements. US Patent No. 4612053, 1986.



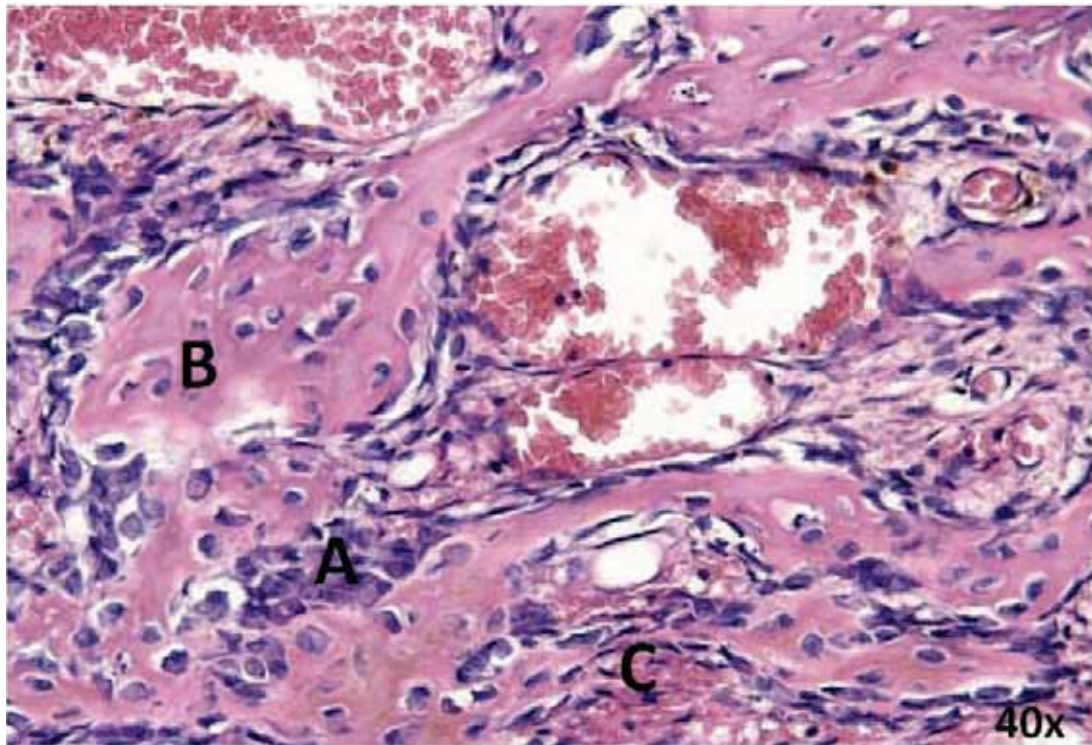


Figura 1- Tecido conjuntivo rico em fibroblastos, capilares e osso neoformado. Alvéolo parcialmente preenchido por trabéculas ósseas. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; C- coágulo. (Grupo *Sham*+Coágulo, Período 7 dias, Aumento 40x).

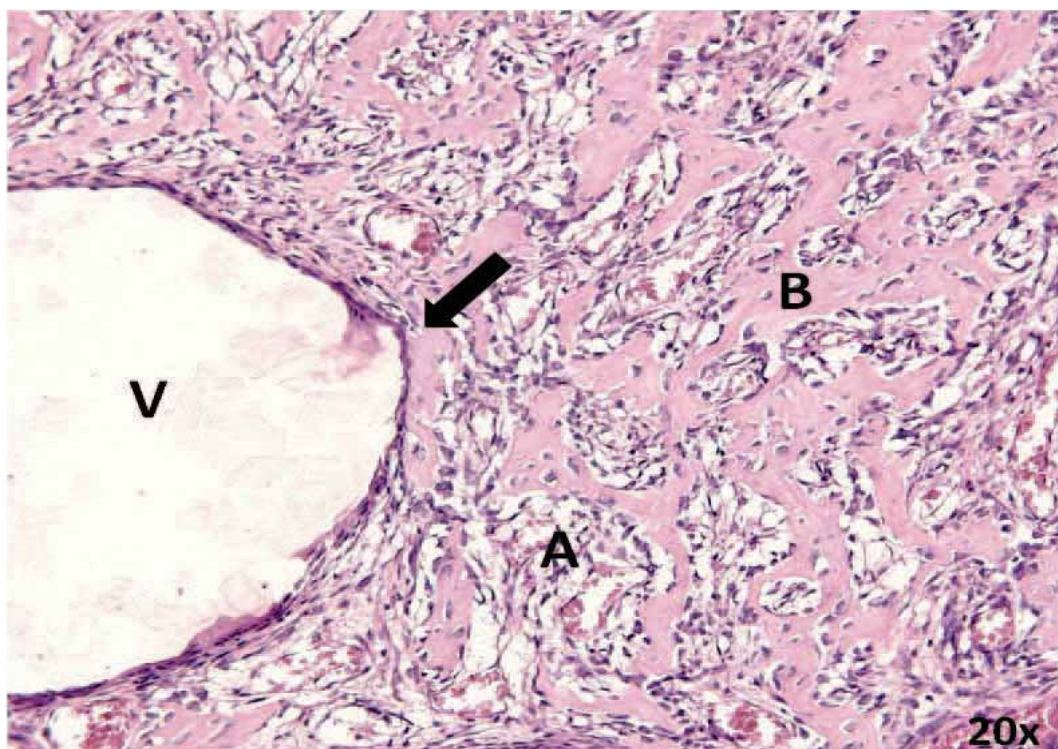


Figura 2- Trabéculas ósseas imaturas próximas e em íntimo contato com o Biosilicato (seta) e tecido conjuntivo com baixa quantidade de coágulo sanguíneo. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; V- partícula do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 7 dias, Aumento 20x).



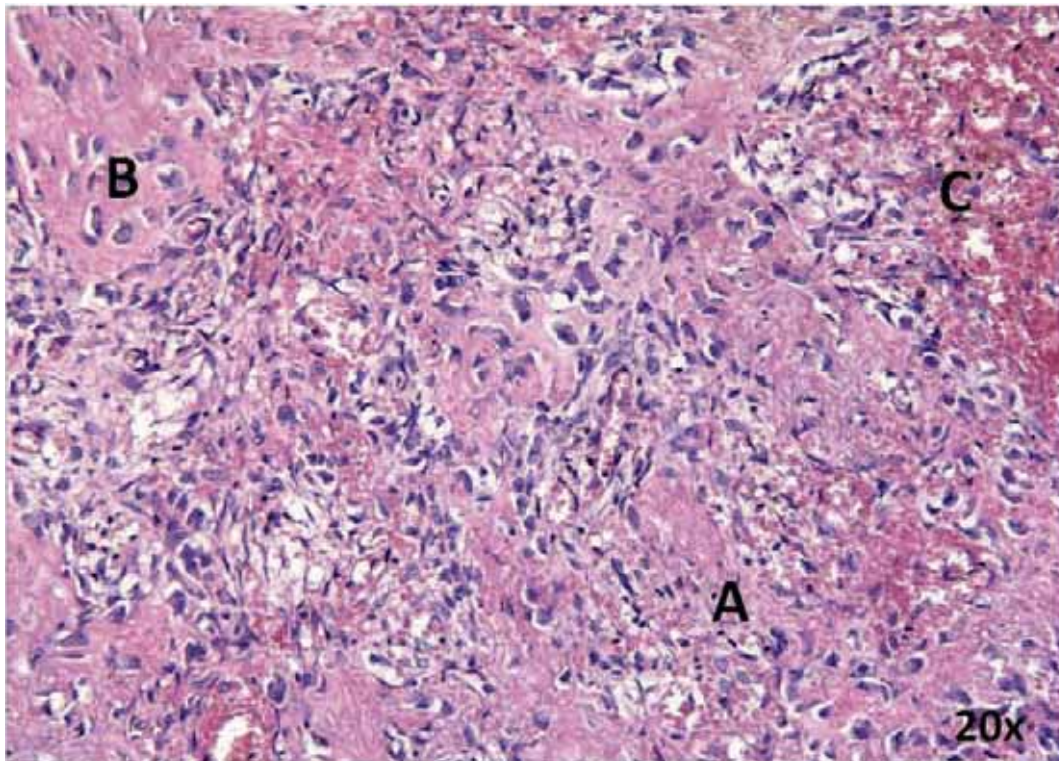


Figura 3- Presença de tecido conjuntivo e coágulo. Início de formação óssea. A- tecido conjuntivo; C- coágulo; B- osso. (Grupo OVX+Coágulo, Período 7 dias, Aumento 20x).

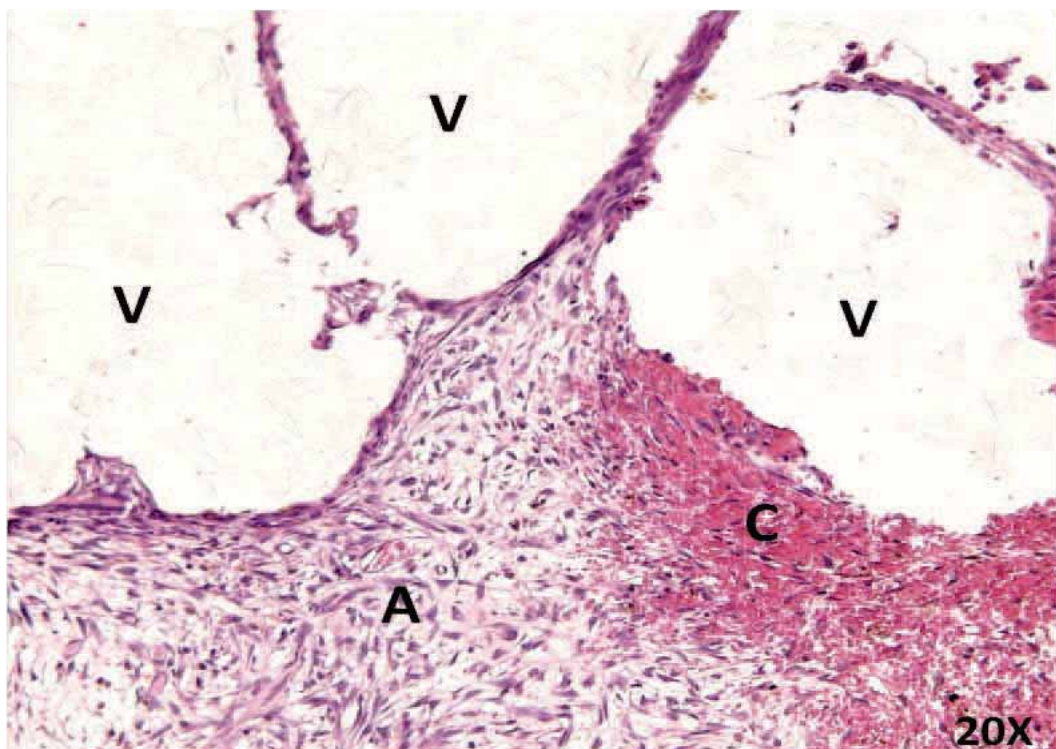


Figura 4- Extensa área de tecido conjuntivo e a presença de áreas de coágulo nas proximidades dos grânulos de Biosilicato. A- tecido conjuntivo; C- coágulo; V- partículas do Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 7 dias, Aumento 20x).



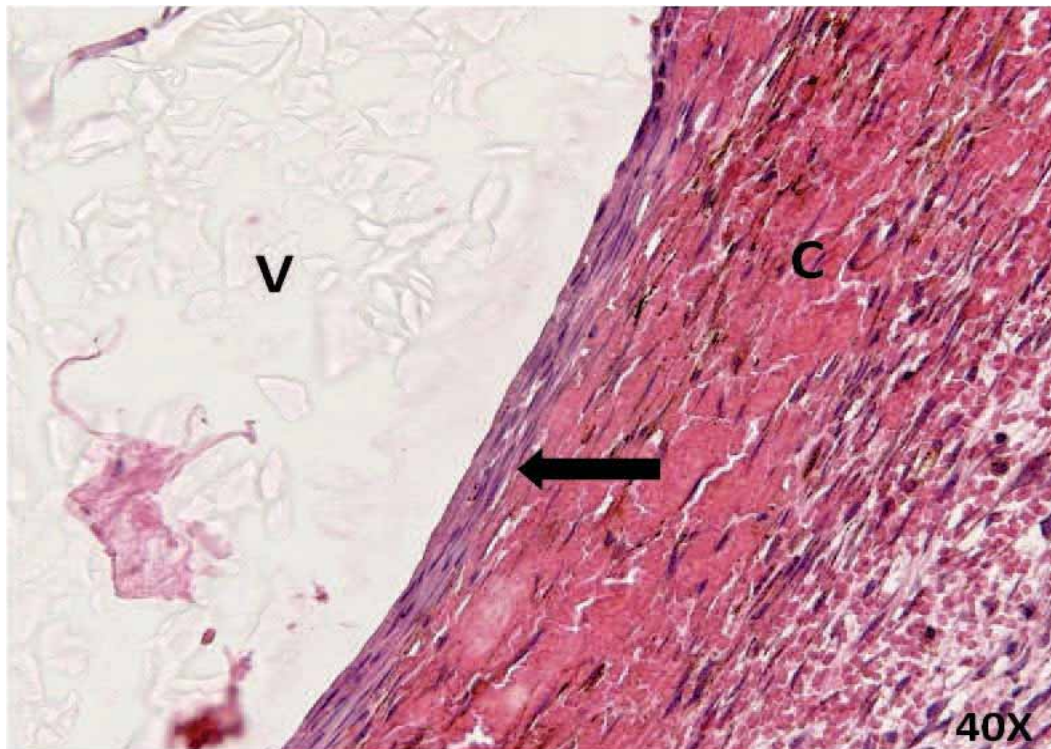


Figura 5- Partícula de Biosilicato implantado circundado por tecido conjuntivo e coágulo (seta), sem a presença de células inflamatórias. C- coágulo; V- partícula do Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 7 dias, Aumento 40x).

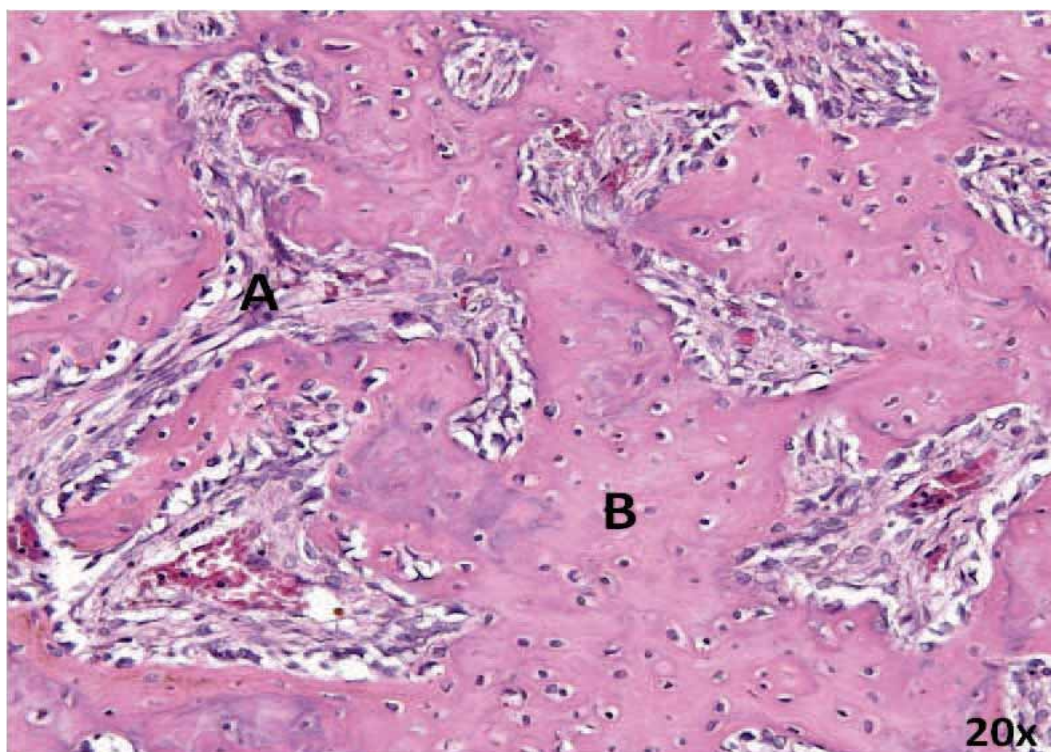


Figura 6- Trabéculas ósseas mais espessas e tecido conjuntivo e áreas de coágulo em menor quantidade do que no período anterior. A- tecido conjuntivo; B- osso. (Grupo Sham+Coágulo, Período 14 dias, Aumento 20x).



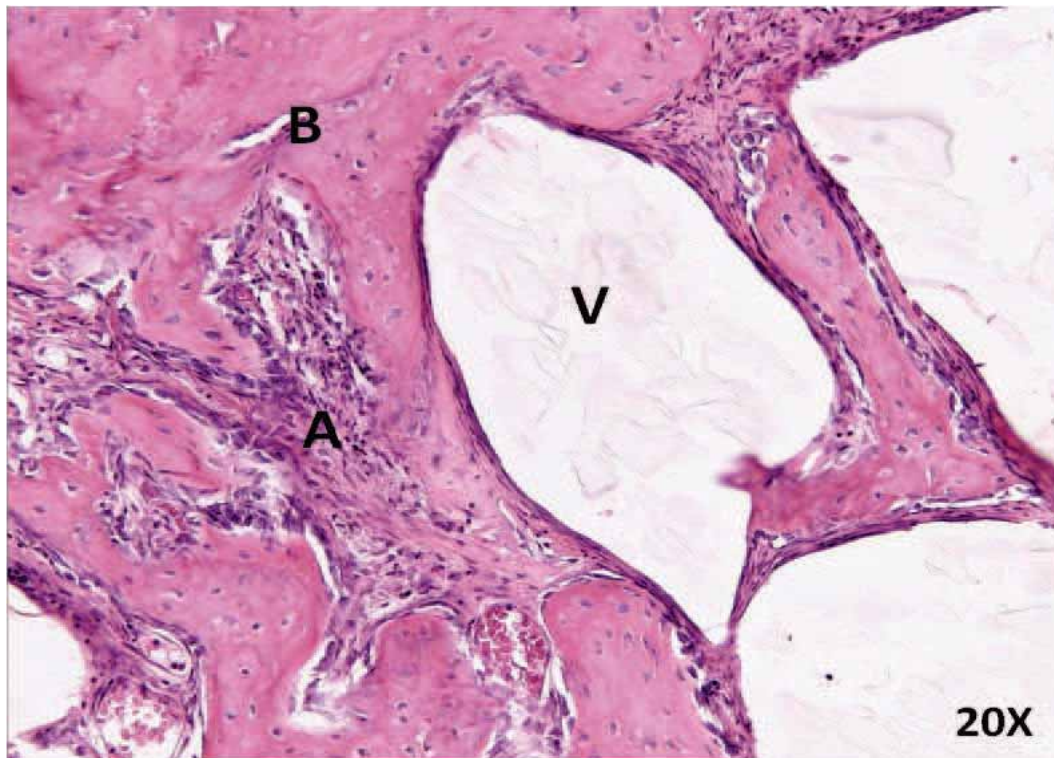


Figura 7- Menor quantidade de tecido conjuntivo e íntimo contato entre a o Biosilicato e o tecido ósseo neoformado. A- tecido conjuntivo; B- osso; V- Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 14 dias, Aumento 20x).

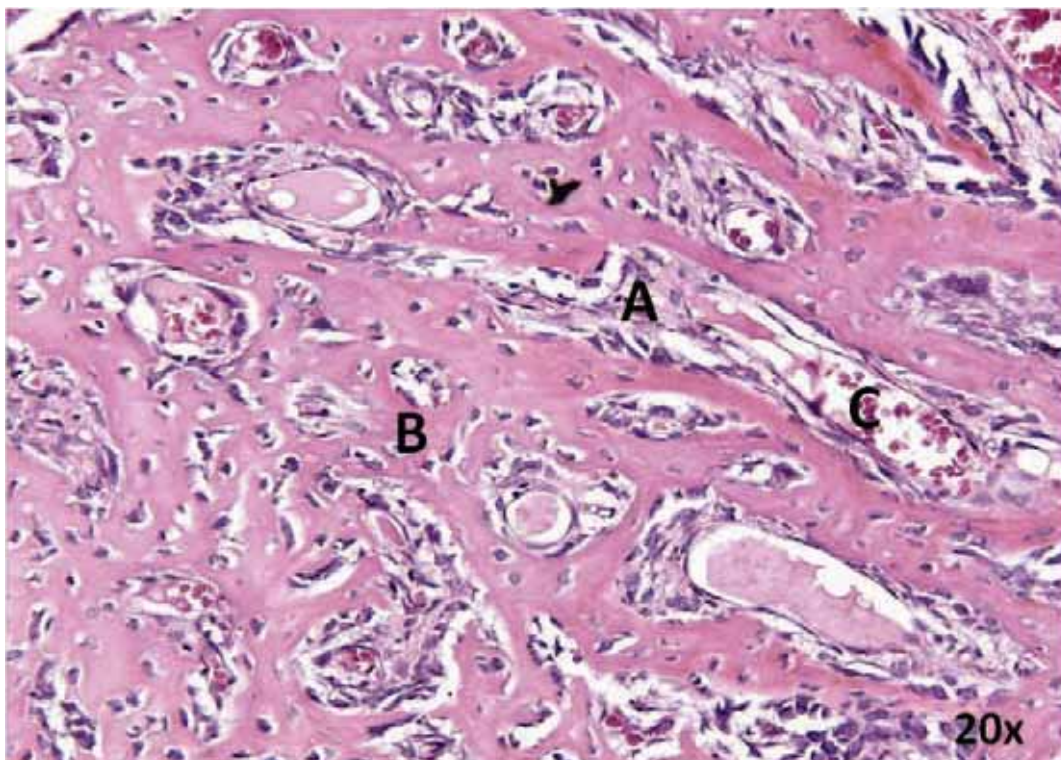


Figura 8- Trabéculas de tecido ósseo entremeadas por tecido conjuntivo e pequenas áreas de coágulo. A- tecido conjuntivo; B- osso; C- coágulo. (Grupo *OVX*+Coágulo, Período 14 dias, Aumento 20x).



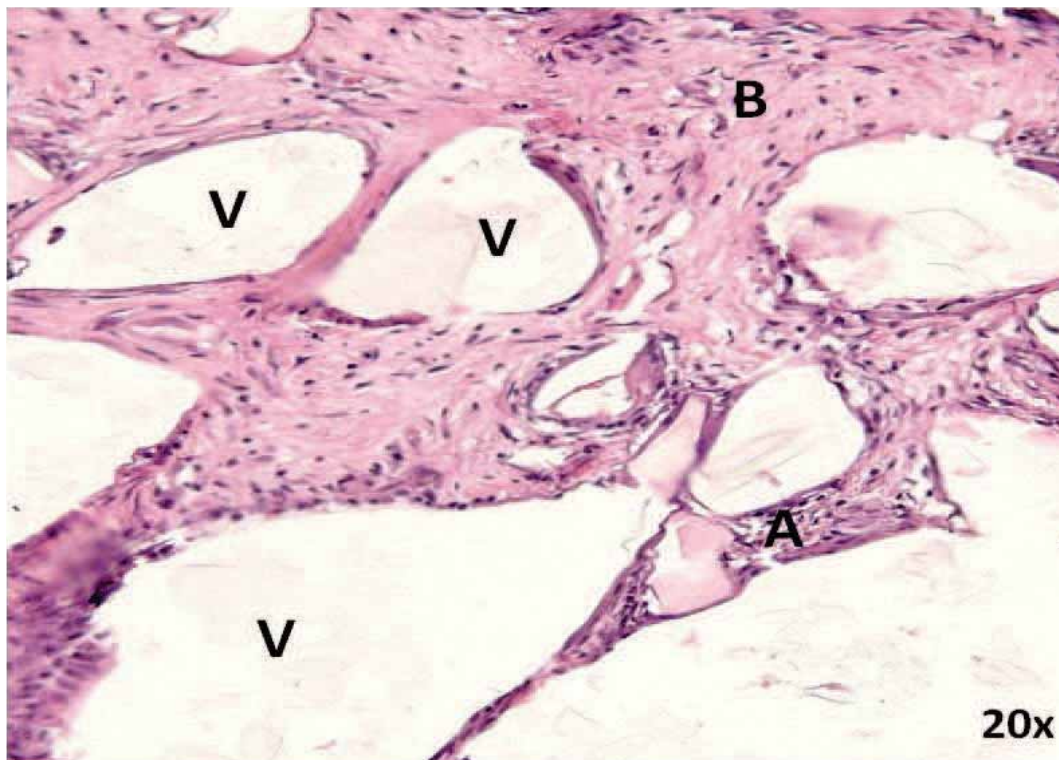


Figura 9- Partículas do Biosilicato em contato direto com o tecido ósseo neoformado e poucas áreas de tecido conjuntivo maduro. A- tecido conjuntivo; B- osso neoformado; V- partículas do Biovidro. (Grupo OVX+Bio, Período 14 dias, Aumento 20x).

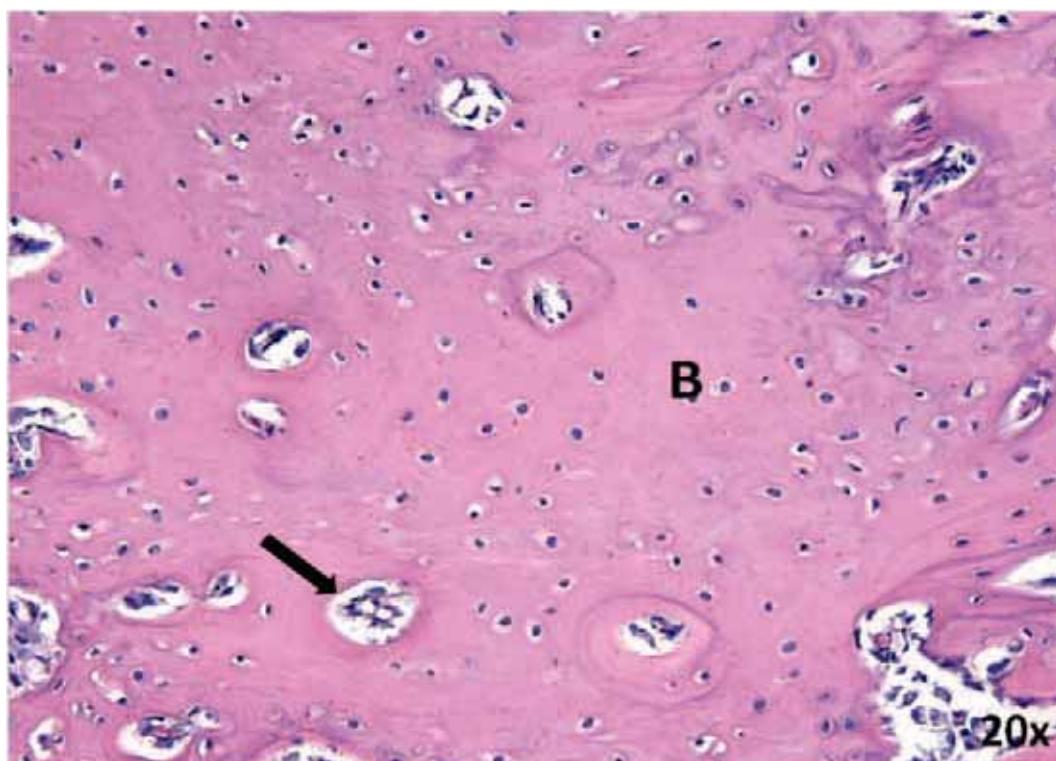


Figura 10- Completa formação de osso alveolar, com pequena quantidade de tecido conjuntivo maduro (seta). B- osso maduro. (Grupo Sham+Coágulo, Período 28 dias, Aumento 20x).

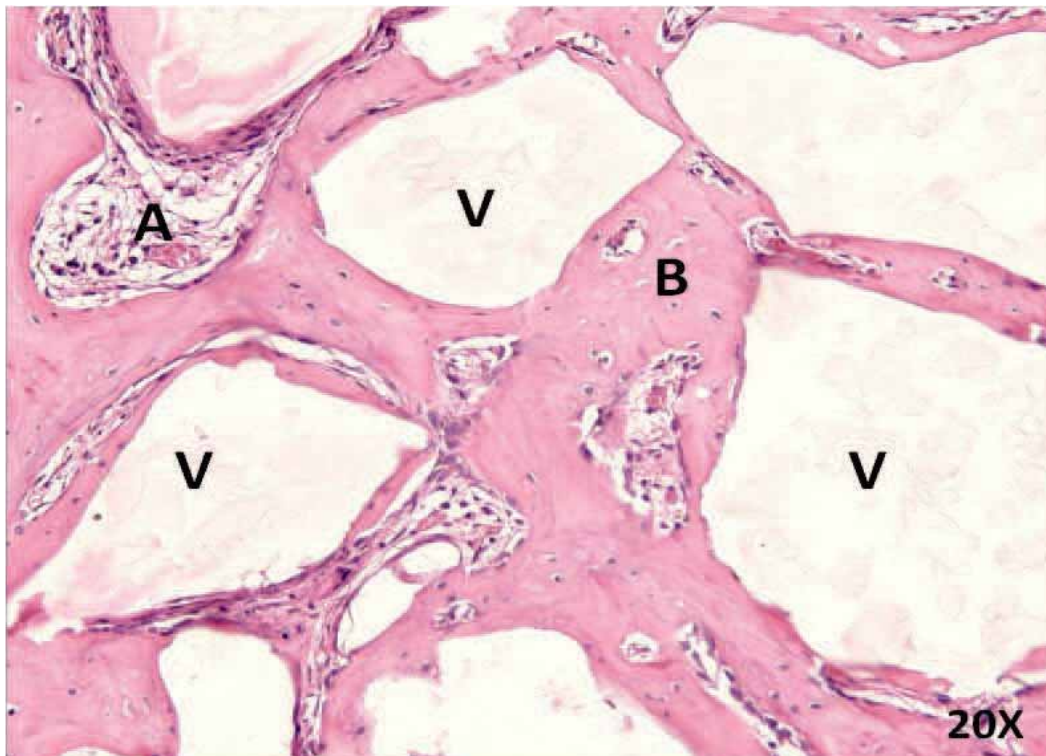


Figura 11- Tecido ósseo em íntimo contato com a superfície do Biosilicato e entre as partículas, com poucas áreas de tecido conjuntivo maduro. A- tecido conjuntivo; B- osso; V- partículas do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 28 dias, Aumento 20x).

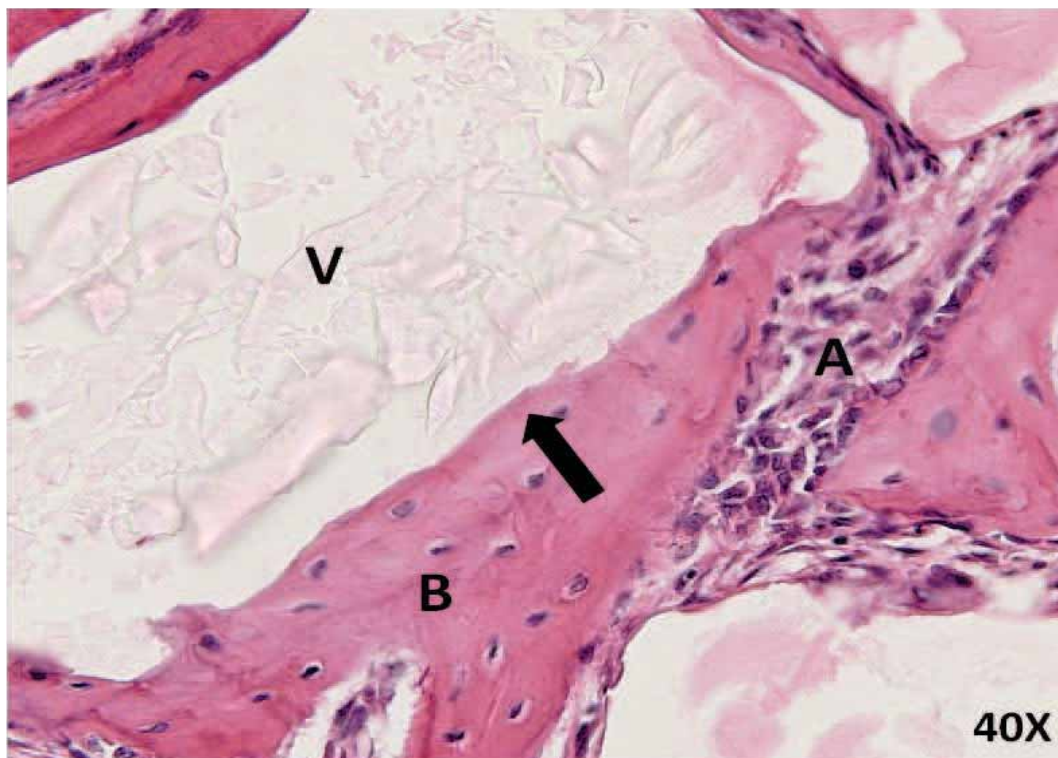


Figura 12- Excelente incorporação dos grânulos de Biosilicato com o tecido ósseo (seta). A- tecido conjuntivo; B- osso; V- partículas do Biosilicato. (Grupo *Sham*+Bio, Período 28 dias, Aumento 40x).



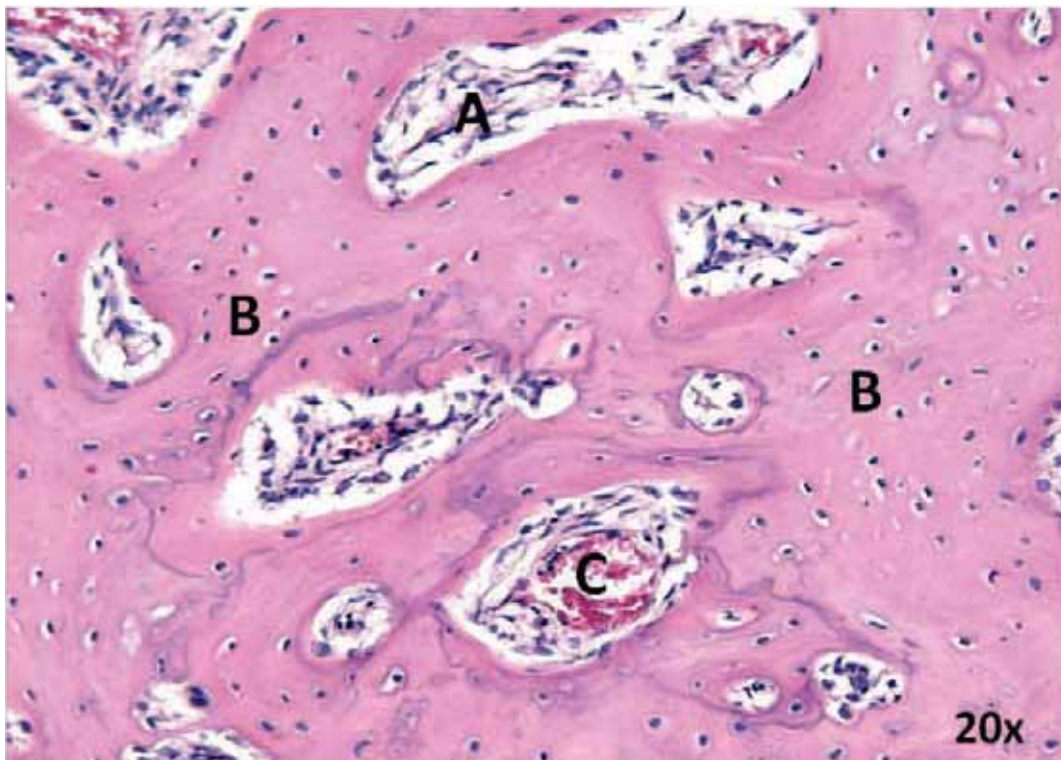


Figura 15- Extensa formação de tecido ósseo com discretas áreas de tecido conjuntivo e coágulo. A- tecido conjuntivo; B- osso; C- coágulo. (Grupo OVX+Coágulo, Período 28 dias, Aumento 20x).

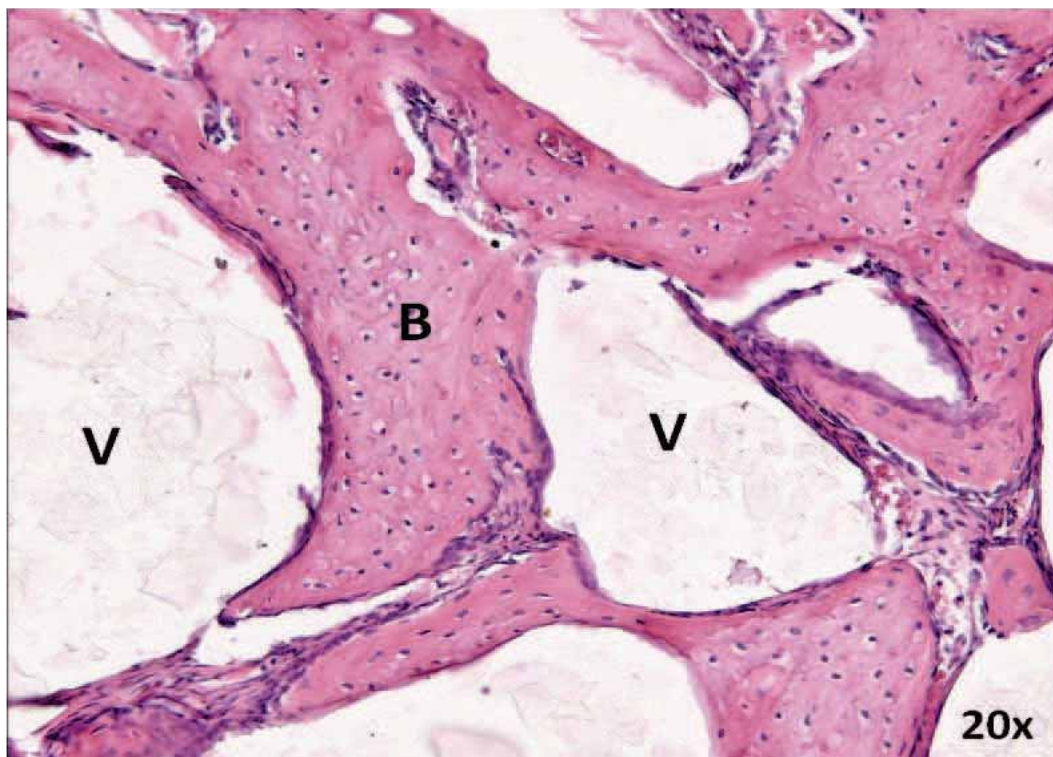


Figura 13- Grande quantidade de tecido ósseo neoformado em toda a extensão do alvéolo e em contato com os fragmentos do biomaterial enxertado. B-osso maduro; V-partículas do Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 28 dias, Aumento 20x).

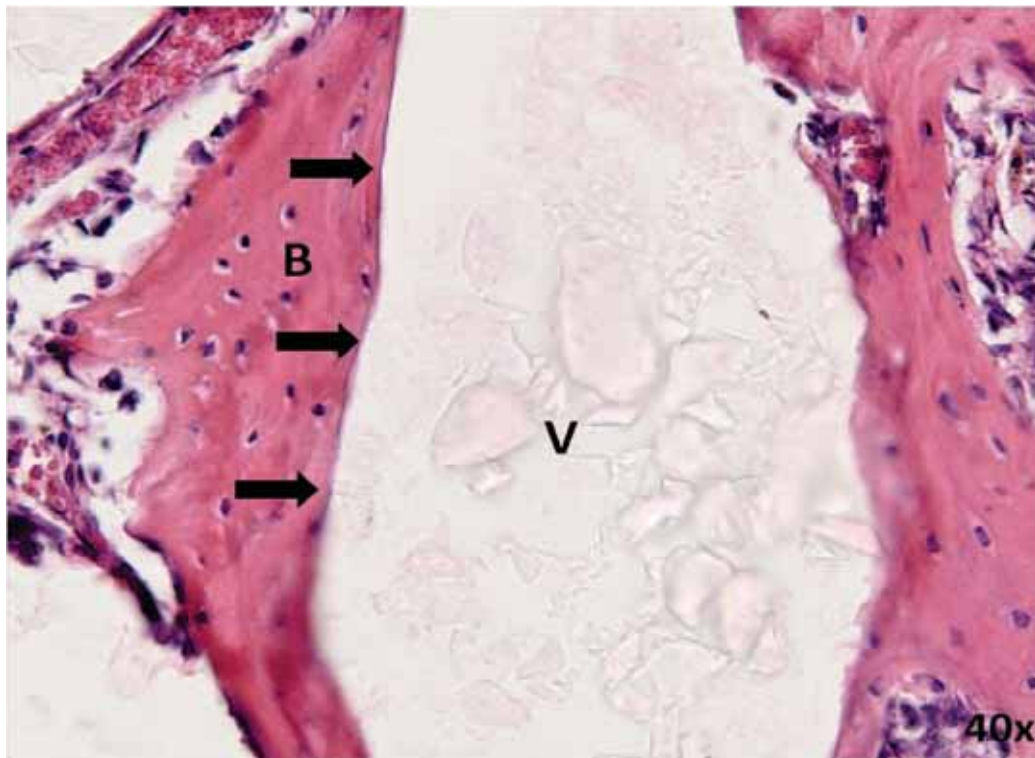


Figura 14- Contato entre o Biosilicato e osso neoformado (setas). B-osso; V- Biosilicato. (Grupo OVX+Bio, Período 28 dias, Aumento 40x).

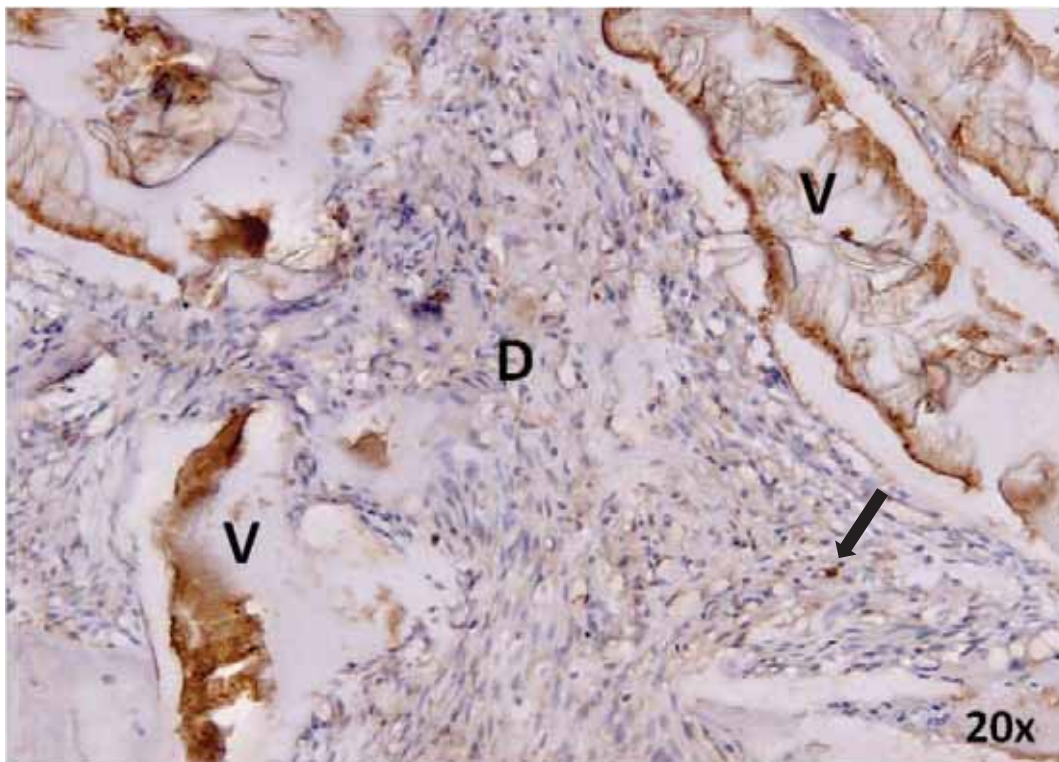


Figura 16-Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (seta). V- Biosilicato; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).



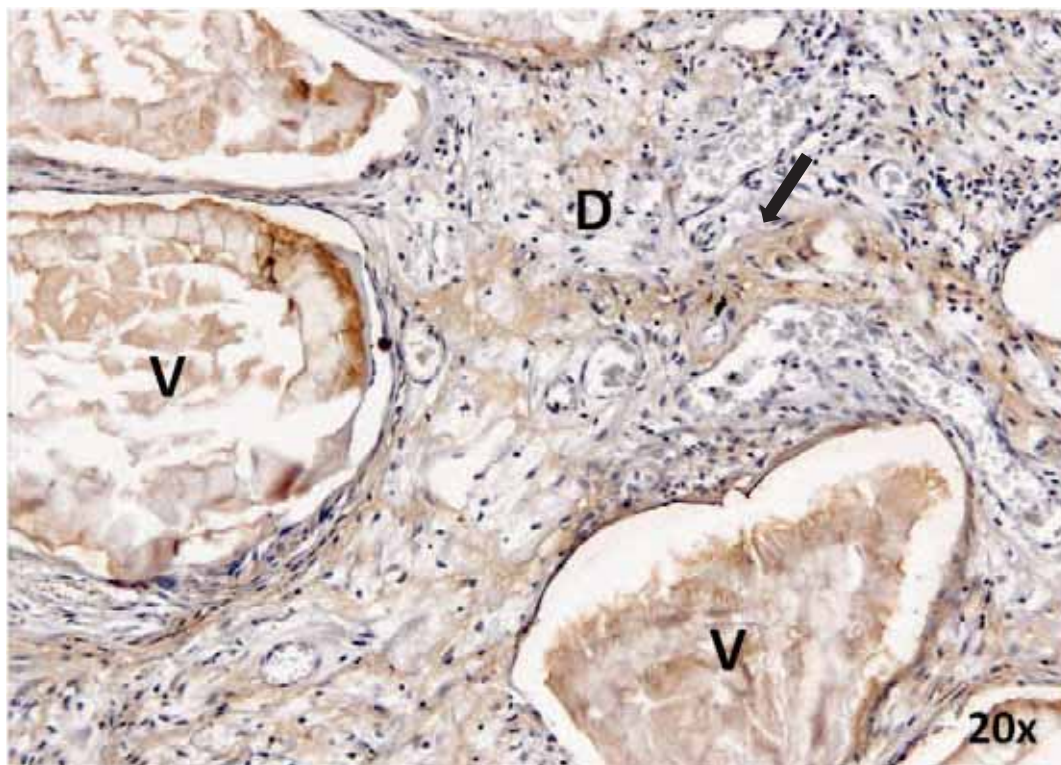


Figura 17- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Moderada (3) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (seta). V- Biosilicato; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

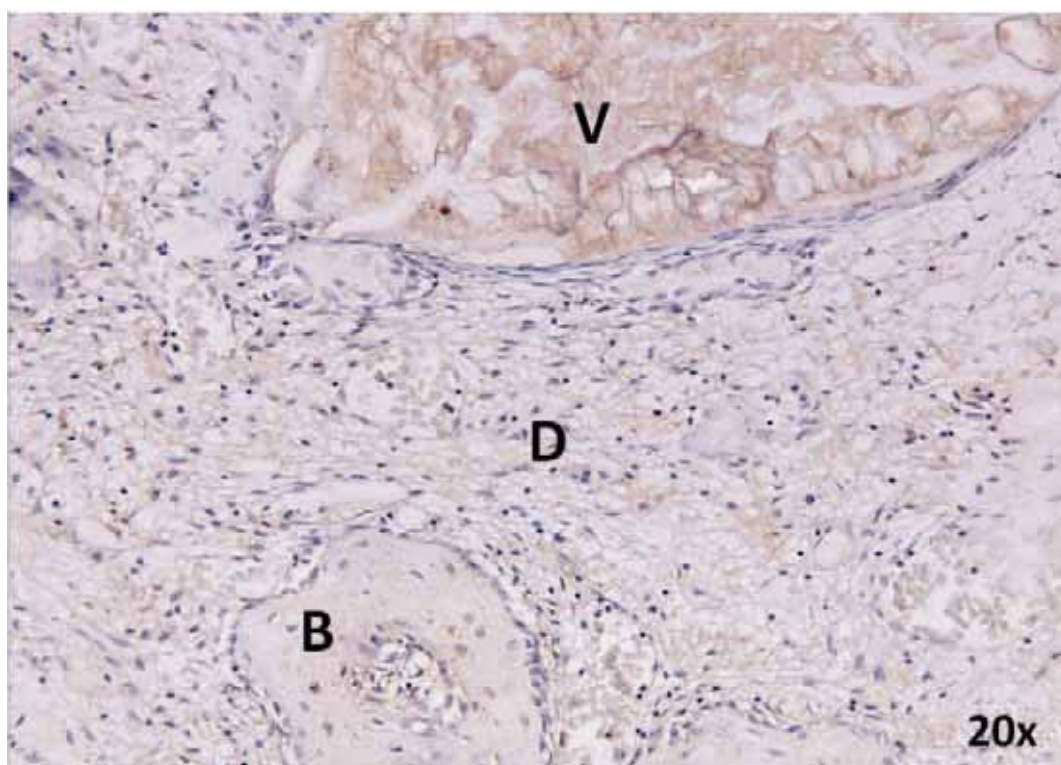


Figura 18- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Ausente (1) após o enxerto com Biosilicato cristalizado. V- Biosilicato; B- osso; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).

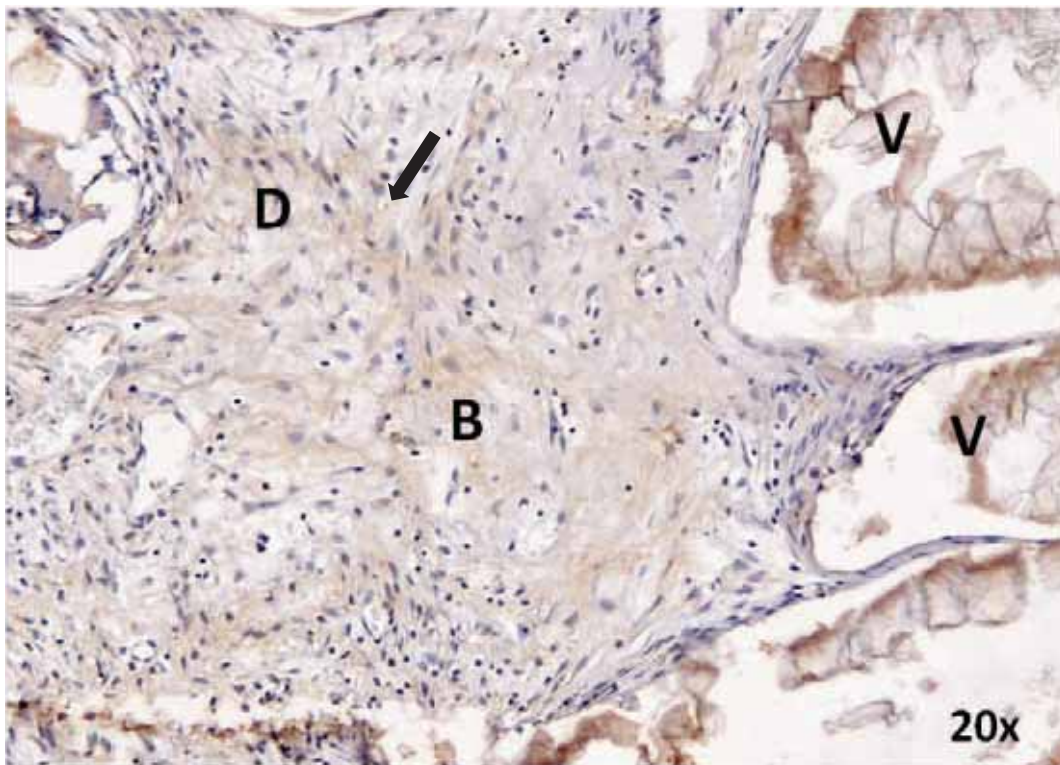


Figura 19- Imunomarcção para a proteína Osteocalcina classificada como Fraca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (seta). V- Biosilicato; B- osso; D- imunomarcção para Osteocalcina (Grupo *SHAM*+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

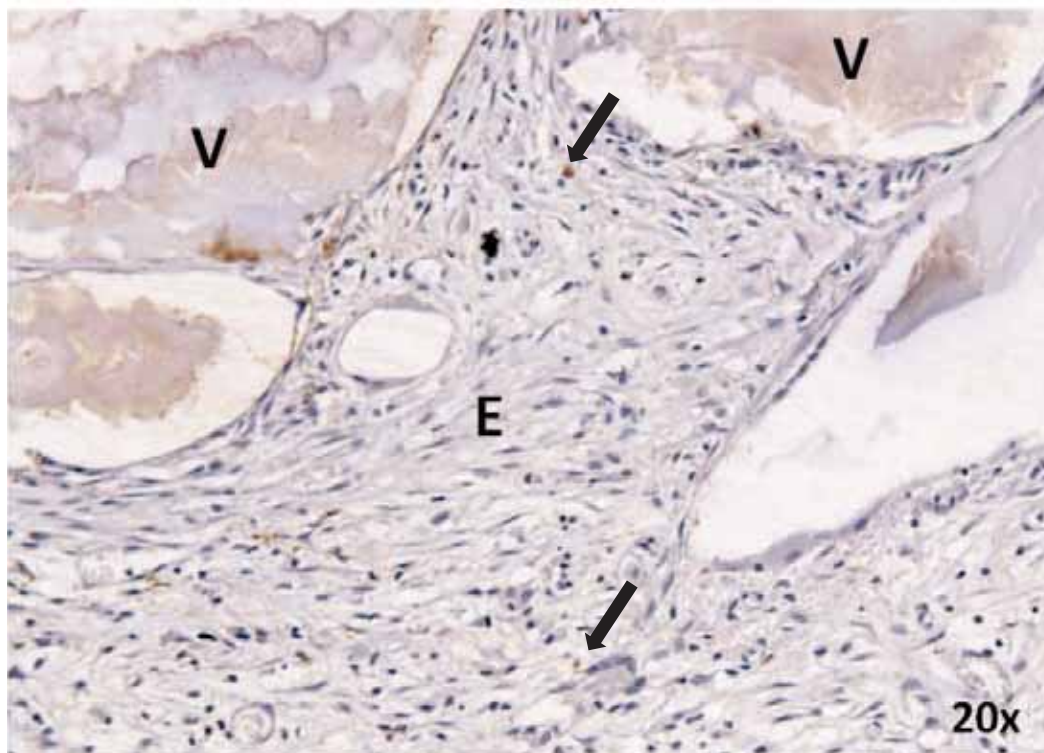


Figura 20- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (setas). V- Biosilicato; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo *OVX*+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).



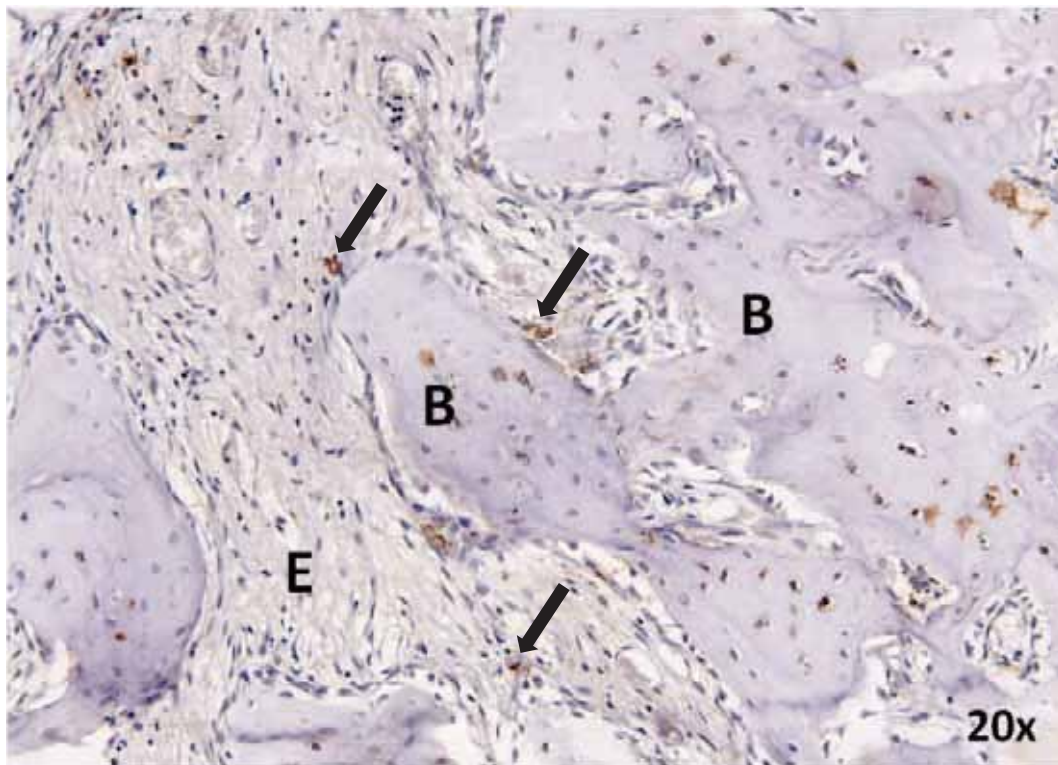


Figura 21- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Moderada (3) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (setas). B- osso neoformado; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo OVX+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

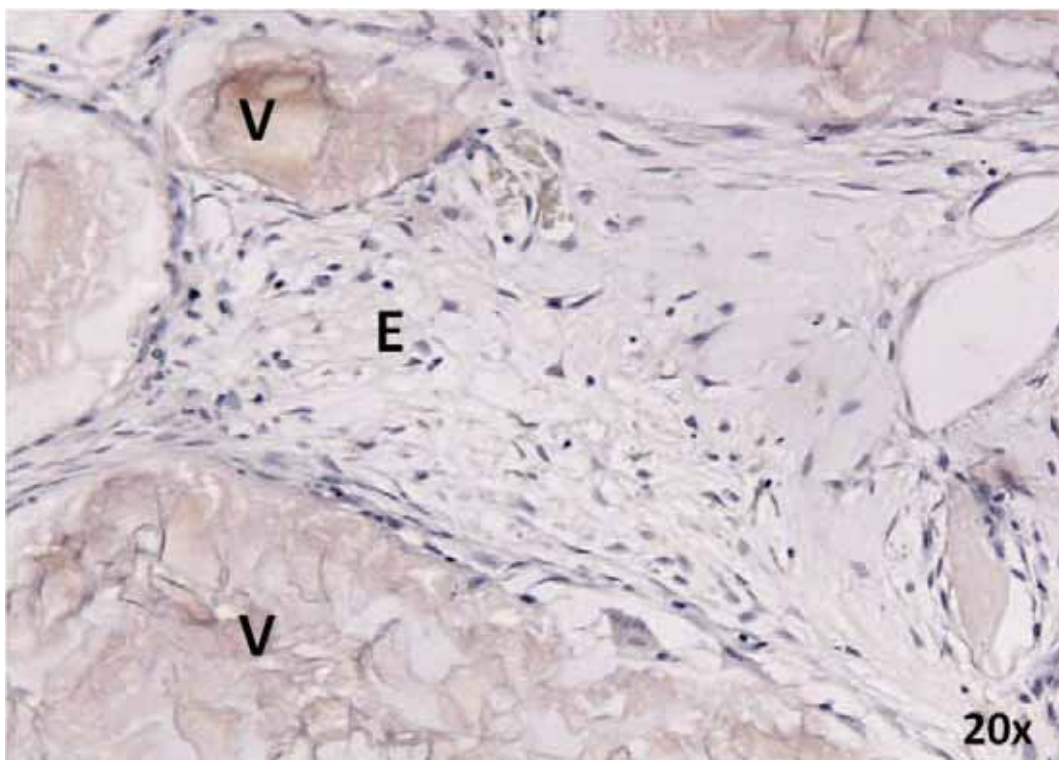


Figura 22- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Ausente (1) após o enxerto com Biosilicato cristalizado. V- Biosilicato; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo SHAM+Biosilicato, Período 14 dias, Aumento 20x).



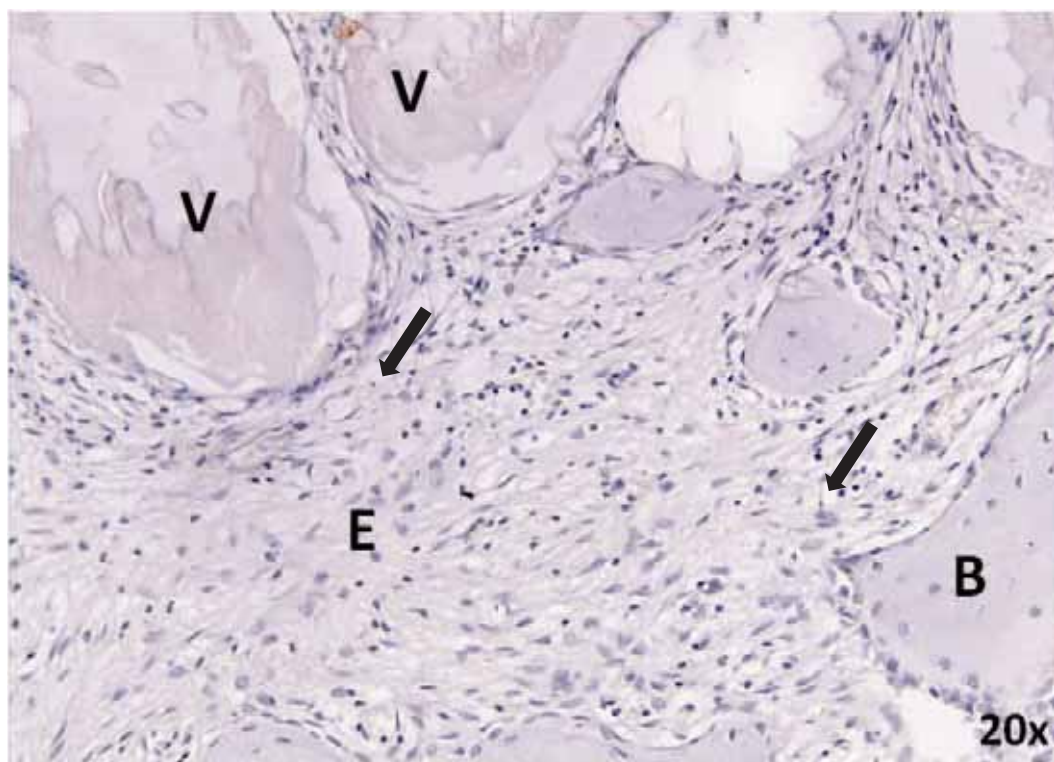


Figura 23- Imunomarcção para a proteína Osteopontina classificada como Pouca (2) após o enxerto com Biosilicato cristalizado (setas). V- Biosilicato; B- osso; E- imunomarcção para Osteopontina (Grupo *SHAM*+Biosilicato, Período 28 dias, Aumento 20x).

Anexo D – Tabelas e Gráficos

Tabela 1: Quantidade de Tecido Ósseo (%) após os períodos de 7, 14 e 28 dias.

GRUPOS	PERÍODOS		
	7	14	28
Grupo 1 – <i>Sham</i> +Coágulo	32	46	83.5
Grupo 2 – <i>Sham</i> +Biosilicato	19.4	32.5	59.4
Grupo 3 – OVX+Coágulo	27.1	41.1	79.7
Grupo 4 – OVX+Biosilicato	13.7	26	58.1

Tabela 2 – Média dos escores obtidos com a análise imunoistoquímica nos grupos avaliados no período de 14 dias.

Grupos	OP	OC
<i>Sham</i> +Bio	1	1
OVX+Bio	2	2

Tabela 3– Média dos escores obtidos com a análise imunoistoquímica nos grupos avaliados no período de 28 dias.

Grupos	OP	OC
<i>Sham</i> +Bio	2	2
OVX+Bio	3	3

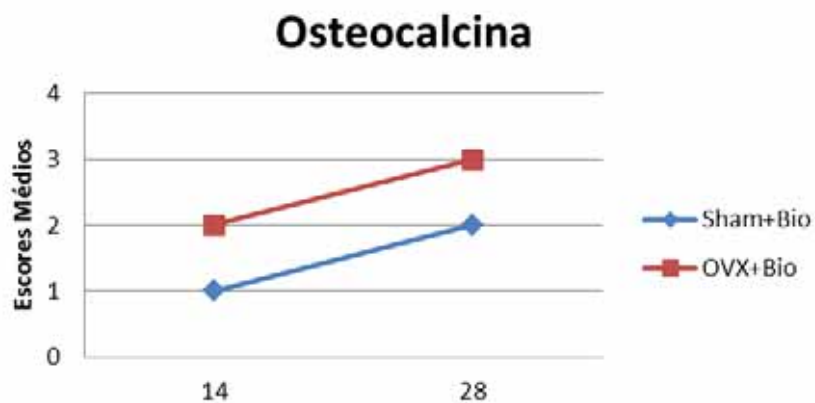


Gráfico 1- Escores médios da Osteocalcina nos dois grupos enxertados com Biosilicato nas análises dos períodos de 14 e 28 dias.

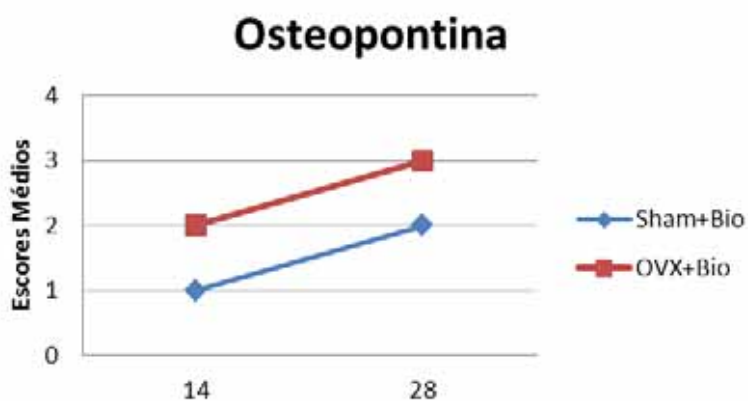


Gráfico 2- Escores médios da Osteopontina nos dois grupos enxertados com Biosilicato nas análises dos períodos de 14 e 28 dias.