

MILENI BUZO SOUZA

**Avaliação do potencial osteocondutor de uma nova
biocerâmica sintética bifásica em defeito crítico: um
estudo *in vivo***

Araçatuba – SP

2024

MILENI BUZO SOUZA

**Avaliação do potencial osteocondutor de uma nova
biocerâmica sintética bifásica em defeito crítico: um
estudo in vivo**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista “Júlio Mesquita Filho – UNESP”,
como parte dos requisitos para a
graduação no curso de Odontologia.

Orientador: Prof. Associado Leonardo
Perez Faverani

Araçatuba-SP

2024

A Cirley Tereza Buzo de Souza, minha mãe, ao Valmir Batista de Souza (in memoriam), meu pai, ao Higor Buzo Souza, meu irmão, as pessoas que sempre me deram apoio incondicional para seguir meus sonhos, por mais desafiadores que fossem. Essa conquista não é unicamente minha, como de vocês também.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, aquele que abençoa minha vida e guia meus passos diariamente nesta jornada, confortando meu coração em diversos momentos difíceis e dando força para seguir em frente e realizar meus sonhos. Expresso minha profunda gratidão a Ele por colocar inúmeras pessoas do bem e abençoadas em minha vida, que têm feito e continuam a fazer a diferença em meu caminho. Agradeço, sobretudo, por não estar ao meu lado apenas nos momentos difíceis, mas também nos momentos de grandes comemorações, como a conclusão do curso de graduação em Odontologia.

À **minha mãe**, Cirley Tereza Buzo de Souza, meu maior exemplo de superação, força e amor. Com você aprendi que não há desafio impossível quando se tem fé e dedicação, e que todos os nossos sonhos são possíveis quando confiados em Deus. Só tenho que agradecer por tudo o que fez e faz por mim e pelo Tato e por ter renunciado de tantas coisas para que esse dia se tornasse possível. Obrigada por abraçar meus sonhos com todas as suas forças e não medir esforços para que eles se concretizem da forma mais linda, espero um dia conseguir retribuir todo amor, cuidado e zelo que tem nos dedicado. Eu te amo, mãe!

Ao **meu pai**, Valmir Batista de Souza (*in memoriam*), não há um dia da minha existência que não lembre de você e de tudo que já fez para fazer nossa família feliz. Desde muito nova você sempre me incentivou a estudar e era o meu maior apoiador, com certeza essa conquista está sendo motivo de grande felicidade para você. Guardo todas as nossas memórias juntos em meu coração. Sou eternamente grata pela criação, educação, princípios e valores que você e a mãe passaram para mim e meu irmão. Obrigada por sempre cuidar da nossa família, que você possa contemplar desse momento único com todos nós. Eu te amo, pai!

Ao **meu irmão**, Higor Buzo Souza, o meu “Tato”, o qual eu compartilho a existência desde os meus primeiros passos e é o meu exemplo de irmão mais velho. Obrigada por todo amor, dedicação e por não medir esforços para me ver feliz, espero que um dia consiga te retribuir tudo o que fez e faz por mim. Eu te amo, Tato!

A **minha família**, que sempre estiveram comigo me apoiando e incentivando a buscar meu sonho de estudar em uma universidade pública, meu coração sempre estará em Santa Salete, junto de vocês.

Ao **Professor Doutor Eduardo Hochuli Vieira**, meu orientador de iniciação científica, o qual tive a oportunidade de trabalhar junto desde o meu segundo ano da

faculdade e desde então me concedeu oportunidades únicas para minha vida acadêmica, começando pela realização do sonho de ter minha primeira bolsa de iniciação científica (Processo/Edital: 143658/2020-1), em seguida, minha a segunda bolsa iniciação científica, (Processo/Edital: 3146/2021-22), ambas concedidas pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica- PIBIC; e mais posteriormente, realizei outro sonho, que pra mim, era impossível: minha terceira bolsa de iniciação científica, pela tão sonhada Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (Processo: 2022/13600-5). Agradeço imensamente por ter confiado em meu trabalho e ter me concedido tantas oportunidades ímpares, fundamentais para meu aprendizado e crescimento dentro da pesquisa. Deposito aqui, minha imensa admiração pela pessoa e cirurgião que é, e por tudo que representa dentro da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF).

Ao **“Prof. Léo”, Professor Doutor Leonardo Perez Faverani**, meu orientador de Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), o qual tive a oportunidade de conhecê-lo no início de 2020, um pouco antes de começar a pandemia, quando dei início a iniciação científica. Embora não conste oficialmente como orientanda no projeto de pesquisa, o senhor me acolheu de maneira generosa em seu grupo de pesquisa e, desde então, tem proporcionado inúmeras oportunidades de aprendizado, demonstrando sempre prontidão e disponibilidade quando precisei. Gostaria de enfatizar minha profunda admiração pelo professor, cirurgião, pesquisador e ser humano ímpar que o senhor é, que tem visível prazer em ajudar e faz a diferença na vida de todos que estão a seu redor. Sou extremamente grata por todo o carinho que sempre me tratou, por desde o início acreditar em mim e me receber tão bem em seu grupo de pesquisa, onde pude desenvolver grande parte da profissional que desejo ser. Obrigada por ser meu professor e inspiração durante esses anos de graduação e por não medir esforços em me ensinar, sempre com muita paciência e dedicação, grande parte do que sei sobre a cirurgia, devo a você. Que Deus continue abençoando sua brilhante trajetória.

À **“Profa. Ana”, Professora Doutora Ana Paula Farnezi Bassi**, que tive o primeiro contato no departamento de Diagnóstico e Cirurgia, anos antes de cursar a disciplina de cirurgia e, desde então, minha admiração só vem crescendo pela cirurgia grandiosa, que me orgulho muito em ter aprendido tanto de CTBMF com a senhora; pela professora impecável, é visível em sua didática a paixão e o dom que tem pela

docência, que não mede esforços em ensinar, fazendo com que qualquer assunto se torne fácil. Obrigada por ser minha professora e inspiração durante todos esses anos de graduação, eu a tenho como um dos meus maiores exemplos pessoal e profissional. É uma honra poder contar com sua presença em minha banca avaliadora, obrigado por tudo professora!

Ao **Professor Doutor Edilson Ervolino**, pela disposição e atenção na realização das análises de imunoistoquímica. Me sinto honrada por contar com seu conhecimento para a execução desse trabalho.

Ao **Anderson Maikon de Souza Santos**, o qual foi o responsável por me inserir na área da pesquisa e da Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF), é um privilégio poder trabalhar e aprender tanto com você desde o início da minha trajetória na Iniciação Científica. Agradeço profundamente por seu suporte, o qual possibilitou que eu obtivesse e concluísse, ao longo da graduação, três bolsas de iniciação científica, sendo uma concedida pela FAPESP e duas pelo PIBIC. Tenha certeza de que você é uma das principais influências que me motivaram a seguir na pós-graduação na área de CTBMF; agradeço por toda paciência que teve em me ensinar ao longo de todos esses anos e acompanhar não só a pesquisa, como nos trabalhos, eventos, congressos, liga acadêmica, ambulatório e hospital. Desejo muito sucesso ao longo de sua jornada e que você continue a ser esse profissional ímpar que faz a diferença na vida das pessoas ao seu redor.

À **Stéfany Barbosa**, mestre e doutoranda em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF), a qual conheci quando ainda era aluna de Iniciação Científica e, sempre com muito carinho me ensinou parte das etapas dos processamentos laboratoriais, foi um prazer acompanhar grande parte da sua trajetória inspiradora e conquistas dentro do meio acadêmico. Deixo aqui minha gratidão pela sua grande disposição em me ensinar e ajudar, sempre com muita paciência. Não tenho de dúvidas de que muitas conquistas extraordinárias te aguardam, resultado de tanta dedicação e responsabilidade. É um prazer e uma honra ter você compondo minha banca examinadora.

Ao **João Matheus Fonseca e Santos**, mestre e residente em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial (CTBMF), o qual conheci quando ainda era aluno de Iniciação Científica e, sempre muito solícito e paciente me ensinou parte dos processamentos laboratoriais e não media esforços para responder as minhas

dúvidas. Obrigada por toda ajuda e contribuição durante todos esses anos e para execução desse trabalho. Desejo que você continue alcançando muito sucesso na sua caminhada e que você continue sendo esse profissional e pessoa com coração tão bondoso que faz a diferença para as pessoas que estão ao seu redor.

A **todo o grupo de pesquisa**, orientado pelo professor Leonardo, quem me acolheu no grupo como se fosse sua orientada de IC, me permitindo trabalhar e aprender tanto com pessoas extremamente responsáveis, habilidosas e competentes, que foram fundamentais na construção de todo meu conhecimento laboratorial e científico de uma pesquisa. A todos os alunos de pós-graduandos, Anderson Maikon, Tiburtino Lima, Eduardo Dallazen, Leonardo Delanora, William Phillip, Barbara Ribeiro, João Matheus, Stéfany Barbosa, Mirela Caroline, Monique Gonçalves e Olavo Alcaide, deixo meu agradecimento por compartilharem seus conhecimentos e estarem sempre dispostos a ensinar. A todos os alunos de Iniciação Científica, os quais compartilhei o trabalho ao longo desses 4 anos, em especial àqueles que estiveram comigo antes, durante e após a Pandemia, Natália Pereira Ribeiro, Victor Perinazzo Sachi, Maria Eloise de Sá Simon, Gustavo Ribeiro Ferreira, Gabriela Cristina Baccaro e aos demais IC's que estiveram presentes no andamento das pesquisas de todo o grupo, gratidão pelo auxílio, companheirismo e amizade, não apenas durante a Iniciação Científica, mas ao longo de toda a graduação. Desejo a todos muito sucesso e realizações pessoais e profissionais prósperas.

A **todas as minhas duplas**, as quais compartilhei experiências nas clínicas ao longo da minha graduação. Juntos, enfrentamos desafios e aprimoramos nosso conhecimento clínico e teórico-científico, contribuindo assim para a minha formação, Natália Saori Izumi, César Henrique Fukuji Fuziy, Giovanna Lima Fortunato, Guilherme Assumpção Silva, Gustavo Ribeiro Ferreira e Laura Gabriela Macedo. Agradeço eternamente pela paciência, respeito, parceria e companheirismo, desejo a cada um de vocês muito sucesso e realizações tanto pessoais quanto profissionais.

Ao **César Henrique Fukuji Fuziy**, meu grande amor, que esteve ao meu lado nos últimos anos, me ajudando a enfrentar e superar tantos desafios e momentos difíceis. Além de namorado, se tornou meu melhor amigo e companheiro, que abdicou de muitos momentos para me fazer companhia enquanto cortava peça, fotografava lâminas e que não mede esforços para cuidar de mim e me fazer feliz todos os dias. Foi lindo acompanhar o quanto crescemos juntos nessa caminhada. Obrigada pela

paciência, amizade, amor e zelo, que venha muitos e muitos anos juntos pela frente. Te amo!

Aos **meus sogros**, Evelyn Fukuji Fuziy e Acácio Fuziy, por me tratarem com tanto carinho, por sempre me incentivarem a estudar e seguir meus sonhos e não medirem esforços para ver eu e o César felizes; ao **meu cunhado**, Gabriel Fukuji Fuziy, por todos momentos divertidos juntos. Agradeço imensamente a Deus por fazer parte da família de vocês.

Aos **meus amigos de faculdade**, os quais tive o privilégio de poder conhecer histórias, costumes e que tornaram essa caminhada mais leve, em especial, a Natália Saori Izumi e Guilherme Assumpção Silva, meus grandes irmãos aqui em Araçatuba, obrigada pelas milhares de risadas compartilhada e, acima de tudo, por me escutarem, aconselharem e serem colo diariamente, sem vocês a jornada na graduação seria muito mais árdua; a Giovanna Lima Fortunado e Gabriela Carrara Simionato, minhas grandes amigas, obrigadas por todos momentos vividos, pelo amor e respeito, é um privilégio ter pessoas como você em minha vida; Gustavo Ribeiro Ferreira amigo que carregou desde a primeira semana em Araçatuba, obrigada por partilhar inúmeros momentos dentro e fora da faculdade e por ser o melhor parceiro de iniciação científica que eu poderia ter; a Giovana Zeine, Paula Rebecca Rodrigues, Laura Gabriela Macedo, Odir Nunes de Oliveira Filho, Vinícius Batista Teles, Caio Augustus, Pedro Henrique Faneco Garroti, Luciana Miranda, Arthur Nascimento, meus primeiros amigos que conheci em Araçatuba, no ponto de carona e bancada de anatomia; a Anna Julha Souza de Jesus, que não dividiu apenas apartamento comigo por 5 anos, como também, dividiu momentos bons e ruins que tivemos na graduação e inúmeras viagens de ida e volta para casa; a Janaína Gabriely Sobral, Maria Helena Rocha, José Roberto Virgíneo por todos “DoMIGOS”, almoços de domingo no prédio; ao Vitor Cavalini Gomes e Rodrigo Ribeiro de Camargo por todas as brincadeiras e risadas compartilhadas. A todos meus amigos e namorado, vocês foram a representação mais próxima de uma família para mim ao longo desses anos distantes de casa, obrigada pela constante troca de experiência, paciência, respeito e amizade. Desejo a cada um de vocês muito sucesso em suas caminhadas.

Ao **Paulo e Marco**, funcionários do Departamento de Cirurgia e Diagnóstico, pela contribuição nas etapas laboratoriais, que possibilitou a realização desse trabalho.

À **FINEP e ao MUBIO (01.12.0530.00 – Finep/ProInfra (01/2011))**, pela disponibilização do aparelho e realização das análises de Microtomografia Computadorizada (Micro-CT), que foram feitas com tanta excelência e de grande importância para este estudo.

À **Plenum® Oss hp**, que contribuiu grandemente para este estudo, fornecendo os materiais necessários para a realização de todo o estudo.

Ao **Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica – PIBIC**, pela concessão de minha primeira e segunda bolsa de iniciação científica (Processo/Edital: 143658/2020-1 e 3146/2021-22), que me inseriu na ciência e fez com que despertasse grande interesse pela pesquisa, logo no início da graduação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pela concessão da minha terceira bolsa de iniciação científica (Processo: 2022/13600-5), foi fundamental para que eu me mantivesse como graduanda e para que a pesquisa fosse desenvolvida no período estimado, além de contribuir com experiências agregadoras, como apresentações em grandes congressos brasileiros.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA**, instituição da qual me orgulho profundamente por fazer parte de sua história e por levar consigo ao longo de minha vida pós-graduação. Essa instituição proporcionou-me uma jornada acadêmica enriquecedora, repleta de conhecimento teórico e prático-científico, graças a profissionais excelentes e uma infraestrutura de ponta. Os laboratórios pré-clínicos e clínicas multidisciplinares completas foram fundamentais no desenvolvimento da minha formação como profissional. Expresso minha eterna gratidão a cada professor, funcionário e servidor da FOA, cujas contribuições foram essenciais para a formação de todos os alunos que passaram por essa renomada instituição. Obrigada!

“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos dia após dia.”

Robert Collier

RESUMO

BUZO-SOUZA, M. **Avaliação do potencial osteocondutor de uma nova biocerâmica sintética bifásica em defeito crítico: um estudo *in vivo***. 2024. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial osteocondutor de uma nova biocerâmica bifásica (Plenum® Oss_{hp}), em defeitos críticos na calvária de ratos. 27 ratos Wistar), machos, com 6 meses de idade, foram submetidos a confecção de defeito crítico na região parietal bilateralmente de 5 mm de diâmetro cada, e em seguida foram preenchidos pelos biomateriais, de acordo com os grupos experimentais (n=6 defeitos por grupo/tempo): grupo 1 (sem preenchimento, somente o coágulo sanguíneo), grupo 2 (BoneCeramic™) e grupo 3 (Plenum® Oss_{hp}). A eutanásia dos animais foi realizada aos 7, 14 e 28 dias de pós-operatório para as análises histométrica, imunoistoquímica (VEGF aos 7 e 14 dias; Osteocalcina – OC, aos 14 e 28 dias), e microtomográfica (Micro-CT) aos 28 dias. Os resultados histológicos mostraram superioridade para o grupo PO, em relação a área de osso neoformado aos 14 e 28 dias ($p < 0,05$; pós-test Tukey). Para a imunomarcagem de VEGF, o grupo PO se mostrou superior aos demais aos 7 dias ($p < 0,05$), e foi similar ao grupo BC aos 14 dias ($p > 0,05$). Para OC, os grupos PO e PC foram similares para ambos os períodos ($p > 0,05$). Na Micro-CT, o grupo PO apresentou maiores valores para volume ósseo (BV.TV) e número de trabéculas (TB.N) ($p < 0,05$). Conclui-se que o biomaterial Plenum® Oss_{hp} apresentou propriedade osteocondutora superior aos demais grupos de comparação no reparo ósseo de defeitos críticos em calvária de ratos.

Palavras-chave: Biomaterial; Tecido ósseo; Regeneração.

ABSTRACT

BUZO-SOUZA, M. **Evaluation of the osteoconductive potential of a new biphasic synthetic bioceramic in critical defect: an in vivo study.** 2024. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

This study aimed to evaluate the osteoconductive potential of a new two-phase bioceramic (Plenum® Oss hp), in critical defects in the calvaria of rats. 27 male Wistar rats, 6 months old, underwent a critical defect in the parietal region bilaterally, measuring 5 mm in diameter each, and then filled with biomaterials, according to the experimental groups (n=6 defects by group/time): group 1 (no filling, only the blood clot), group 2 (BoneCeramic™) and group 3 (Plenum® Oss hp). The animals were euthanized at 7, 14 and 28 days post-operatively for histometric, immunohistochemical (VEGF at 7 and 14 days; Osteocalcin – OC, at 14 and 28 days) and microtomographic (Micro-CT) analyzes at 28 days. The histological results showed superiority for the PO group, in relation to the area of newly formed bone at 14 and 28 days ($p < 0.05$; post-Tukey test). For VEGF immunostaining, the PO group was superior to the others at 7 days ($p < 0.05$), and was similar to the BC group at 14 days ($p > 0.05$). For OC, the PO and PC groups were similar for both periods ($p > 0.05$). In Micro-CT, the PO group presented higher values for bone volume (BV.TV) and number of trabeculae (TB.N) ($p < 0.05$). It is concluded that the Plenum® Oss hp biomaterial presented superior osteoconductive properties compared to the other comparison groups in the bone repair of critical defects in rat calvaria.

Keywords: Biomaterial; Bone tissue; Regeneration.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Esquema ilustrando os grupos experimentais. 21
- Figura 2- Corte longitudinal do centro da calvária representado pela linha verde ilustra a sutura sagital mediana. Defeito ósseo de 5 mm de diâmetro, criado bilateralmente a sutura sagital mediana, representada pelo círculo tracejado em verde. 23
- Figura 3- (A) Confeção do defeito cirúrgico na porção parietal da calvária. (B) Contorno do defeito realizado com a broca trefina de 5mm. (C) Remoção do osso parietal, mantendo a integridade da dura-máter. (D) Preenchimento do leito cirúrgico com biomaterial. (E) Sutura por plano do periósteo para estabilização dos biomateriais. 24
- Figura 4- Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais. 25
- Figura 5- Esquema de processamento laboratorial das peças para montagem de lâminas. Fixação com formol a 10%, descalcificação com EDTA, desidratação em sequência de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para montagem de lâminas. 27
- Figura 6- Fotomicrografia das calvárias de todos os grupos (CO, BC, PO) nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Coloração em hematoxilina e eosina. A Área de osso neoformado (seta), biomaterial remanescente (#) e tecido conjuntivo podem ser observadas nas imagens. 31
- Figura 7- Gráfico representativo da área de tecido conjuntivo, observa-se a grande quantidade de tecido conjuntivo em todos os tempos para o grupo CO ($p < 0,05$). 32
- Figura 8- Gráfico representativo da área de biomaterial remanescente indicando a presença dos biomateriais inerte na intimidade dos tecidos, em todos os tempos experimentais. 33
- Figura 9- Representação gráfica dos resultados de área de tecido ósseo neoformado. Evidenciou-se reparo ósseo superior para o grupo PO, nos períodos de 14 e 28 dias ($p < 0,001$). 34
- Figura 10- Imagens representativas das marcações pela imunoistoquímica da proteína VEGF, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 7 e 14 dias. 35
- Figura 11- Imagens representativas das marcações pela imunoistoquímica da proteína OC, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 28 dias. 36
- Figura 12-- Gráficos microtomográficos de caracterização óssea aos 28 dias, dos grupos CO, BC e PO onde foram avaliados os parâmetros BV.TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp. 37

LISTA DE ABREVIATURAS

CO	Coágulo
BC	BoneCeramic™
PO	Plenum® Oss hp
hp	High porosity
MICRO-CT	Microtomografia Computadorizada
HA	Hidroxiapatita
β-TCP	β-fosfato de tricálcio
m ² /g	Metros quadrados por grama
%	Porcento
TM	Trademark
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
°C	Graus Celsius
mg/kg	Miligrama por quilograma
ml/kg	Militro por quilograma
PVPI	Polivinil Pirrolidona Iodo
nº	Número
Edta	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ARI	Área radiográfica de interesse
BV.TV	Porcentagem do volume ósseo
Tb.Th	Espessura do trabeculado ósseo
Tb.SP	Separação das trabéculas ósseas
Tb.N	Número das trabéculas
VEGF	Vascular endothelial growth factor
OC	Osteocalcina
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Fornecimento do biomaterial Plenum®Oss <i>hp</i>	19
3.1.1	Biomaterial Straumann® BoneCeramic.....	19
3.2.	Desenho experimental: animais	20
3.2.1	Grupos experimentais.....	21
3.2.2	Procedimento cirúrgico	21
3.2.3	Eutanásia.....	24
3.3	Métodos de análise	25
3.3.1	Análises e processamento dos tecidos descalcificados.....	25
3.3.2	Análise e processamento dos tecidos descalcificados	26
3.4	Análise dos dados.....	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Análise histológica	30
4.1.1	Área de Tecido Conjuntivo.....	31
4.1.2	Área de Biomaterial Remanescente	32
4.1.3	Área de Neoformação Óssea	33
4.2	Análise Imunoistoquímica	34
4.3	Microtomografia computadorizada (Micro-CT).....	36
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXO.....	46

1 INTRODUÇÃO

O processo de reabsorção do tecido ósseo é comumente encontrado na prática odontológica, principalmente após extrações dentárias, em que muitas vezes se mostra como um problema para os cirurgiões dentistas. Esse processo pode ser oriundo de doenças sistêmicas e periodontais, traumas, tumores e apresentam um grande desafio para as cirurgias de reabilitações orais (1). Visto que, para garantir êxito nas intervenções para instalação de implantes, é imprescindível que haja quantidade e qualidade de tecido ósseo suficiente no local, garantindo a estabilidade para que a restauração final atinja resultados estéticos e funcionais previsíveis a curto e longo prazo. Para tanto, se faz constante a necessidade da realização de intervenções cirúrgicas que objetivam a recuperação e aumento do osso alveolar previamente perdido. Essas podem ser simples ou complexas, de acordo com o tipo de material que será utilizado, tamanho e localização do defeito. (2)

O osso autógeno é tido como padrão ouro para o tratamento de reconstruções ósseas, por apresentar propriedades osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras (3-5). Contudo, para aquisição deste é necessária uma segunda intervenção cirúrgica em regiões intraorais como o mento e retro molar, ou em regiões extra- orais como crista ilíaca, sínfise e calvária, que pode apresentar complicações e morbidades ao paciente, sendo estas: dor, hemorragia, risco de infecção, além de possuir disponibilidade limitada de área doadora, fraturas ósseas secundárias e aumento do tempo cirúrgico. (6)

Apesar do destaque do enxerto com osso autógeno em relação as suas propriedades, gradativamente este material está sendo trocado por substitutos ósseos que possuem resultados semelhantes a esse, como os homoenxertos, xenoenxertos e aloenxertos. Os homoenxertos são materiais que podem ser obtidos a partir de banco de ossos, que apesar de exibir boas propriedades biológicas e apresentar ampla disponibilidade, apresenta risco de transmissão de doença e alto risco de resposta imunogênica do hospedeiro. (7)

O xenoenxerto é uma classe de biomaterial derivado de uma espécie geneticamente não relacionada do hospedeiro. A origem mais comum é o osso bovino, sendo o Bio-Oss® a marca comercial mais conhecida e difundida, por fornecer

qualidade superior de osso neoformado e taxas de sobrevivência promissoras a longo prazo após cirurgia dentária. (7) Todavia, estudos alertam que a utilização de biomateriais de origem bovina pode desencadear encefalopatias espongiformes transmissíveis em humanos, que são doenças neurodegenerativas crônicas causada pelo acúmulo de uma isoforma anormal da proteína príon celular no sistema nervoso central. (8)

Diante dessas limitações, os biomateriais sintéticos vêm ganhando força no mercado, por serem seguros e menos invasivos ao paciente, além de exibirem vantagem notável na taxa de sucesso do tratamento. (9)

Atualmente o BoneCeramic™ é um dos substitutos ósseos sintéticos mais difundido comercialmente, que apresenta em sua composição 60% de hidroxiapatita e 40% de β - tricálcio fosfato. Este biomaterial possui estrutura favorável a formação de osso vital, visto que garante a estabilidade mecânica do enxerto em razão da lenta degradação da hidroxiapatita, evitando a absorção excessiva. Além disso, possui índice de porosidade de 90% com a presença de poros interligados que favorece a migração de células para a formação de tecido ósseo na região, o que garante a sua propriedade osteocondutora. (10)

Neste sentido, diferentes proporções de hidroxiapatita e β -Tricálcio fosfato vem sendo propostas na literatura. O Plenum® Oss _{hp}, outro substituto ósseo sintético aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2020 (11), apresenta uma proporção de 70% de hidroxiapatita e 30% de β -tricálcio fosfato, porém há escassez de estudos que forneçam compreensão da resposta biológica frente a este biomaterial.

A proporção entre hidroxiapatita e β -tricálcio fosfato presente no Plenum® Oss _{hp} influencia no processo de degradação desse biomaterial, de modo que altera seu potencial osteocondutor. (12) Enquanto a hidroxiapatita demora mais para ser absorvida, mantendo o arcabouço por tempo adequado para formação de tecido mineralizado, o β -Tricálcio fosfato é absorvido mais rapidamente, permitindo migração celular e angiogênese necessária para o início do processo. (12-14).

Atrelado a isso, o modelo experimental animal por meio da confecção de defeitos ósseos críticos, de 5mm, em calvária de ratos, tem-se demonstrado uma boa alternativa para avaliar a capacidade dos biomateriais agirem no reparo ósseo, visto que o roedor apresenta fisiologia semelhante ao humano, e constitui um modelo já consolidado para estudos pré-clínicos.

Assim, dado o recente desenvolvimento do Plenum® Oss_{hp}, e o ineditismo de estudos acerca das suas propriedades no que diz respeito ao seu potencial osteocondutor, ressaltamos a importância que teve a realização desse estudo *in vivo*, por meio de defeito crítico em calvária de ratos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho se propôs avaliar a capacidade osteocondutora de uma cerâmica bifásica (Plenum® Oss_{hp}) em defeitos críticos criados em calvária de ratos.

A hipótese nula do trabalho foi que o biomaterial Plenum® Oss_{hp} não apresentaria diferenças significativas no reparo ósseo quando comparado ao grupo controle (Bone Ceramic).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a presente pesquisa, que busca avaliar o potencial osteocondutor de uma nova biocerâmica sintética bifásica em defeitos críticos em calvária de ratos, que foi fornecida por uma empresa da área de bioengenharia.

3.1 Fornecimento do biomaterial Plenum®Oss *hp*

Os biomateriais do enxerto ósseo Plenum® Oss hp (500-1000 μ m /0,5g) foram fornecidos pela empresa Plenum Bioengenharia (Jundiaí, São Paulo, Brasil). O enxerto ósseo Plenum® Oss hp (high porosity, *hp*) é uma biocerâmica bifásica sintética composta por hidroxiapatita e β -fosfato de tricálcio (HA: β -TCP) na proporção 70:30%. A macro e microestrutura, área superficial (aprox. 2 m²/g) e porcentagem de porosidade (aprox. 50%) do Plenum® Oss hp conferem osteocondutividade eficaz, alta propriedade hidrofílica, reabsorção controlada das fases constituintes da biocerâmica, as quais são reabsorvidas pelo organismo parcialmente, e substituídas por tecido neoformado durante o processo de reparo ou regeneração do tecido ósseo.

A porosidade do Plenum® Oss hp garante um crescimento celular osteogênico eficiente promovendo a regeneração óssea no sítio do defeito ósseo. Por sua vez, a microporosidade e rugosidade superficial do facilitam a difusão de fluidos biológicos e a adesão celular. Além disso, a macro e microestrutura, área superficial, porcentagem de porosidade e a composição química do Plenum® Oss hp conferem alta propriedade hidrofílica ao produto, o que o torna facilmente manipulável (com fluidos como: soro fisiológico, plasma rico em plaquetas ou fibrina ou sangue do próprio paciente) em diversas aplicações para reconstrução óssea.

3.1.1 Biomaterial Straumann® BoneCeramic

Os biomateriais do enxerto ósseo Straumann® BoneCeramic usados na pesquisa foi no modelo/apresentação comercial de 500-1000 μ m /0,5g. O Straumann® BoneCeramic é um material de substituição óssea totalmente sintético com um grau de pureza médico em granulado de fosfato de cálcio bifásico uma mistura de 60 % de hidroxiapatita (HA), que é 100% cristalino e 40% de β -tricálcio fosfato (β -TCP). O BoneCeramic possui uma porosidade de 90% com poros interconectados com um diâmetro de 100–500 μ m.

3.2. Desenho experimental: animais

Essa pesquisa seguiu todos os preceitos e princípios éticos para experimentação animal, regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os protocolos experimentais foram enviados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, através do número do parecer consubstanciado 0613-2022.

Foram utilizados 27 animais (*Rattus norvegicus albinus Wistar*), machos, com aproximadamente 6 meses de idade e peso corporal variando entre 450 e 500 gramas, de uma linhagem mantida no Biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP, que foram fornecidas pelo Biotério Central da mesma instituição.

Para a determinação do número amostral, o cálculo do Poder do Teste foi realizado utilizando o programa estatístico SigmaPlot 12.0 (Exakt graph and data analysis, San Jose, CA, USA). Tendo como referência os dados de osso neoformado do estudo de Oliveira et al (2021), o qual obteve diferença mínima entre média de 0.342, com desvio padrão de 0.147 e poder do teste de 90%, obtendo um tamanho amostral de 6. Por tanto foram utilizados 3 animais (6 defeitos) por tempo e por grupo. (15)

Sendo assim, em cada animal foi realizado defeito ósseo crítico bilateralmente na calvária, como discriminado a seguir:

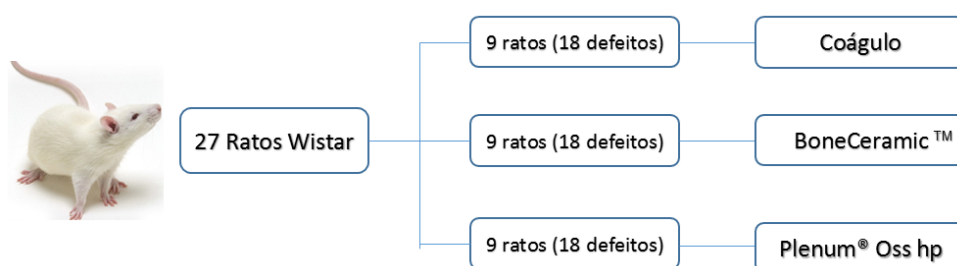
- **Grupo Coágulo - CO (Grupo Controle Negativo) – n= 9:** O defeito ósseo crítico foi preenchido com coágulo sanguíneo, sendo 3 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 14 e 28 dias após a cirurgia).
- **Grupo Straumann® BoneCeramic™ - BC (Grupo Controle Positivo) – n= 9:** O defeito ósseo crítico foi preenchido com biomaterial BoneCeramic®, sendo 3 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 14 e 28 dias após a cirurgia).
- **Grupo Plenum® Oss hp – PO (Grupo Teste) - n=9:** O defeito ósseo crítico foi preenchido com o biomaterial Plenum-Oss®, sendo 3 ratos submetidos à eutanásia em cada período para a análise (7, 14 e 28 dias após a cirurgia);

Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em gaiolas em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro), alimentados com ração balanceada contendo 1,4% Ca e 0,8% P (Ração Ativada Produtor®, Anderson & Clayton S.A. – Laboratório Abbot do Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) durante toda a pesquisa experimental e água ad libitum, exceto no período de 12 horas antecedentes aos procedimentos cirúrgicos, que apresentaram o jejum.

3.2.1 Grupos experimentais

27 animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos experimentais, sendo o grupo 1 (Coágulo), com 9 ratos, em que os defeitos críticos foram preenchidos por coágulo sanguíneo (controle negativo); o grupo 2 (BoneCeramic™) com 9 ratos, em que os defeitos críticos foram preenchidos com o biomaterial BoneCeramic™ (controle positivo); o grupo 3 (Plenum® Oss hp) com 9 ratos, em que os defeitos críticos foram preenchidos com o biomaterial Plenum® Oss hp (grupo analisado).

Figura 1- Esquema ilustrando os grupos experimentais.



Fonte: Autor, 2024

3.2.2 Procedimento cirúrgico

Os 27 animais passaram por um período de adaptação ao biotério e também passaram por um jejum de 12 horas previamente ao procedimento cirúrgico. Todos os procedimentos experimentais que poderiam desenvolver dor ou desconforto aos animais foram realizados sob anestesia pela combinação de Cloridrato de Ketamina a 1%, 10mg/Kg, Cloridrato de Xilazina a 2%, 5mg/Kg e, para a anestesia local e hemostasia da área operada foi utilizado cloridrato de

mepivacaína (0,3 ml/kg, Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont França). Foi adotado um rigoroso protocolo asséptico, incluindo a esterilização do instrumental utilizado, delimitação da área a ser operada com campos estéreis, uso de aventais e luvas cirúrgicas estéreis. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados na sala cirúrgica do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Em seguida foi realizado a tricotomia na região da calvária, antissepsia pré-operatória da mesma região por fricção de gaze embebida em Polivinil Pirrolidona Iodo Degermante a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto) associado ao Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico a 10%, com 1% de iodo ativo (PVP-I 10%, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto).

Após complementação com anestesia local, foi realizado o acesso cirúrgico, com lâmina nº 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi nº 3 (Hu-Friedy, Alemanha) e o descolamento total do retalho com descolador tipo Molt (Hu-Friedy, Alemanha) em formato de “V” para expor o osso parietal de ambos os lados.

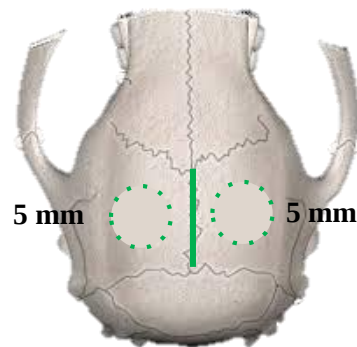
Em seguida com auxílio de broca trefina de 5 mm de diâmetro interno (3i Implant innovations, Inc., Palm Beach Gardens, EUA) acoplada em baixa-rotação sob irrigação abundante com solução de cloreto de sódio 0,9% (Darrow, Rio de Janeiro, Brasil), foi confeccionado na região parietal, bilateralmente a sutura sagital, até a cortical interna, um defeito cirúrgico crítico de 5 mm de diâmetro, mantendo a integridade da dura-máter (Figura 2 e 3). De acordo com os tratamentos propostos os defeitos foram preenchidos segundo os grupos: grupo 1 – Coágulo (CO) (controle negativo); grupo 2 – BoneCeramic™ (BC) (controle positivo); grupo 3 – Plenum® Oss hp (PO).

Finalizando o procedimento, os tecidos moles foram cuidadosamente reposicionados e suturados em planos empregando-se fio reabsorvível (ácido polilático – Vycril 4.0, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) no plano profundo e fio monofilamentar (Nylon 5.0, Mononylon, Ethicon, Johnson Prod., São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos no plano externo.

No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge

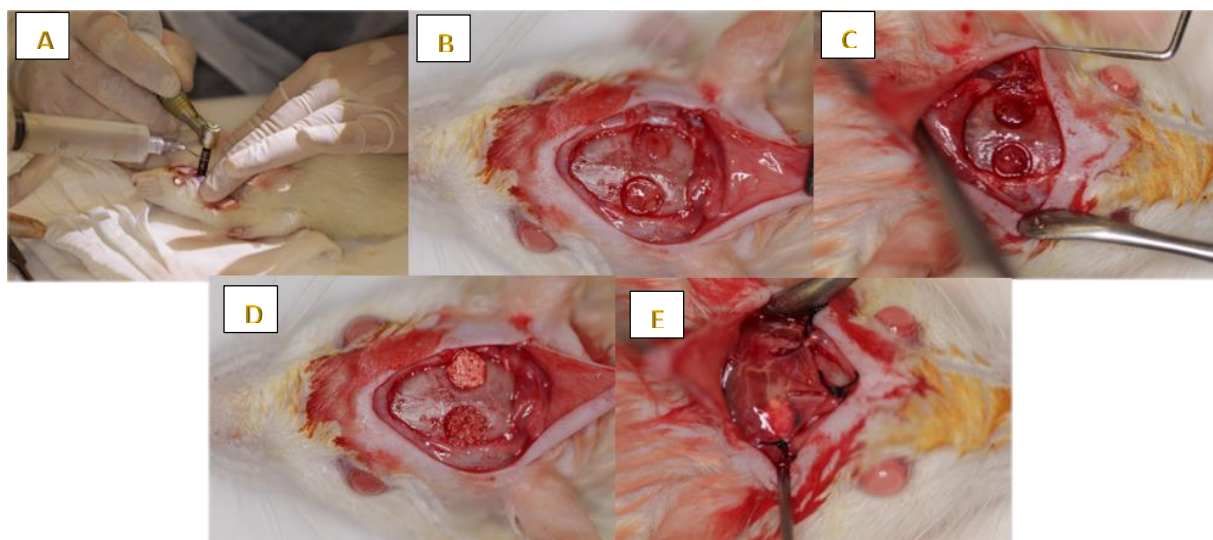
Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água ad libitum.

Figura 2- Corte longitudinal do centro da calvária representado pela linha verde ilustra a sutura sagital mediana. Defeito ósseo de 5 mm de diâmetro, criado bilateralmente a sutura sagital mediana, representada pelo círculo tracejado em verde.



Fonte: Autor, 2024

Figura 3- (A) Confeção do defeito cirúrgico na porção parietal da calvária. (B) Contorno do defeito realizado com a broca trefina de 5mm. (C) Remoção do osso parietal, mantendo a integridade da dura-máter. (D) Preenchimento do leito cirúrgico com biomaterial. (E) Sutura por plano do periósteo para estabilização dos biomateriais.



Fonte: Autor, 2024

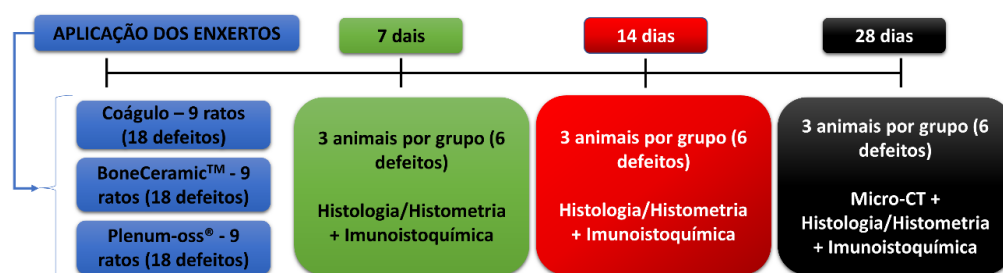
No pós-operatório imediato cada animal recebeu dose única intramuscular de 0,2 ml de Penicilina G-benzatina (Pentabiótico Veterinário Pequeno Porte, Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP). Os animais estão sendo mantidos em gaiolas individuais durante todo o experimento com ração e água *ad libitum*.

3.2.3 Eutanásia

Nos períodos de 7,14 e 28 dias do procedimento cirúrgico, 3 animais de cada grupo (CO, CB, PO) foram submetidos a eutanásia, em que foi aplicado um protocolo em que os ratos foram submetidos a superdosagem anestésica com Cloridrato de Xilazina a 2%. Posteriormente, as calvárias foram cuidadosamente dissecadas, e as peças de 7 e 14 dias foram fixadas em solução de formalina tamponada 10% por 48 horas, em seguida lavadas em água corrente por 24 horas, descalcificou no EDTA, logo após as amostras passaram por desidratação numa sequência de álcoois,

diafanização com xilol, e então foram incluídas em parafina para realização das análises histométrica e imunoistoquímica. As peças de 28 dias, após a lavagem foram armazenadas em álcool, e foram submetidas a análise de microtomografia computadorizada, posteriormente foram submetidas a descalcificação em EDTA, e em seguida passaram pelos processamentos laboratoriais para inclusão em parafina para análise histométrica e imunoistoquímica. (Figura 4).

Figura 4- Distribuição dos animais de acordo com os grupos experimentais.



Fonte: Autor, 2024

3.3 Métodos de análise

3.3.1 Análises e processamento dos tecidos descalcificados

3.3.1.1 Microtomografia computadorizada (MicroCT)

Para a análise tridimensional da estrutura do tecido ósseo, aos 28 dias de pós-operatório, os animais pertencentes a todos os três grupos tiveram as calotas removidas do fixador e lavadas por 12 horas em água corrente a fim de remover qualquer resíduo do fixador. Sequencialmente, foram armazenadas em álcool 70% para transporte até o local de análise. Primariamente, foram submetidas a análise por varredura de feixe de raios-X em um sistema de microtomografia digital computadorizada. As peças foram escaneadas pelo microtomógrafo SkyScan (SkyScan 1176 Bruker MicroCT, Aatselaar, Bélgica, 2003) utilizando cortes de 8 µm de espessura (90Kv e 111µA), com filtro de cobre e passo de rotação de 0,05 mm. As áreas pela projeção dos raios-X nas amostras foram armazenadas e reconstruídas determinando a área de interesse pelo software NRecon (SkyScan, 2011; Versão 1.6.6.0).

No software Data Viewer (SkyScan, Versão 1.4.4 64-bit) as imagens foram reconstruídas para adequação do posicionamento padrão para todas as amostras, podendo ser observada em três planos (transversal, longitudinal e sagital). Em

seguida, utilizando o software CTAnalyser – CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0), foi definida a área radiográfica de interesse (ARI), sendo representada pela área dos defeitos em calvária, delimitados medialmente pela sutura sagital para divisão dos dois defeitos. O software CTAn analisou e mediu a imagem de acordo com a escalas de cinza. Após o ajuste e definição dos tons de cinza da área correspondente ao defeito crítico, o threshold utilizado na análise foi de 41-180 tons de cinza, o que possibilitará a obtenção do volume de osso presente/formado na área do defeito.

Os parâmetros analisados foram referentes à quantidade do tecido ósseo (BV.TV= porcentagem do volume ósseo) e qualidade do tecido ósseo (Tb.Th= espessura do trabeculado ósseo, Tb.SP= separação das trabéculas ósseas, Tb.N= número das trabéculas).

3.3.2 Análise e processamento dos tecidos descalcificados

Logo após a Micro- CT, as peças retornaram para o fixador a fim de completarem 72 horas de fixação, e após esse tempo foram submetidas novamente a um banho de água corrente por 12 horas e partiram para a descalcificação em ácido etilenodiamino tetra-acético 10% (EDTA) por 6-8 semanas. Após a descalcificação, a região correspondente a calvária e estruturas adjacentes foram separadas. Assim, as peças seguiram para adesidratação numa sequência de álcoois (70 a 100%). Após estas etapas, realizou a diafanização com xilol e posterior inclusão em parafina para obtenção de corte com 4µm de espessura e a confecção das lâminas (Figura 5). As lâminas pares após a microtomia foram destinadas para a coloração em hematoxilina e eosina (HE).

Figura 5- Esquema de processamento laboratorial das peças para montagem de lâminas. Fixação com formol a 10%, descalcificação com EDTA, desidratação em sequência de álcool, diafanização em xilol e inclusão em parafina para montagem de lâminas.



Fonte: Autor, 2024

3.3.2.1 Análise Histométrica

Após as lâminas, obtidas a partir dos cortes semiseriados em cada período de eutanásia, serem coradas com HE (Merck & Co., Inc.) as mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador Pentium III com um software analisador de imagens digitalizadas ImageLab 2000 (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canada). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas e foram projetadas na tela de um monitor Samsung (SyncMaster 3Ne, 15 polegadas).

A captura de imagem da lâmina foi realizada com a objetiva de 1.6x e 40x, para imagens panorâmicas do defeito e uma imagem ampliada na porção central do defeito crítico, possibilitando o cálculo histométrico da área de osso neoformado, tecido

conjuntivo e biomaterial remanescente na região do defeito crítico, em todos os tempos experimentais.

3.3.2.2 Análise Imunoistoquímica

7 dias (VEGF)

Para este momento foi proposto imunomarcção para a proteína VEGF (Vascular endothelial growth factor) que está associada ao mecanismo de angiogênese e osteogênese que ocorrem durante o reparo ósseo, exercendo, inclusive, efeito quimiotático nos osteoblastos (21, 22)

14 dias (VEGF/OC)

Além do VEGF, já mencionado anteriormente, foi realizada imunomarcções para OC (Osteocalcina), que é uma proteína associada à mineralização do osso e sua expressão indica maturação deste (23, 24).

28 dias (OC)

Aos 28 dias foi avaliada apenas a imunomarcção para OC.

Para o processamento imunoistoquímico foram utilizados anticorpos primários policlonais produzidos em cabras contra OC (Goat anti-OC - Santa Cruz Biotechnology, SC18319) e VEGF (Goat anti-VEGF - Santa Cruz Biotechnology, SC1881).

Como anticorpos secundários, foram utilizados os anticorpos contra IgG de cabra biotinilado (anti-Goat IgG-HRP, PIERCE). O método de detecção foi efetuado por imunoperoxidase e a 3,3 diaminobenzidina (DAB, Sigma, St. Louis, MO, USA) utilizada como cromógeno seguido pela contra- coloração nuclear com Hematoxilina de Harri's. Os procedimentos de controle foram feitos pela omissão dos anticorpos primários (controle negativo). Secções longitudinais de 5µm das peças anatômicas foram colocadas em lâminas histológicas e desparafinizadas de acordo com protocolo padrão.

O padrão de distribuição da imunocoloração foram analisado qualitativamente como relatado por Dos Santos Pereira *et al.* (25) por um único observador, previamente calibrado, atribuindo-se os scores 0 (sem marcação), 1 (fraca/difusa), 2

(moderada) e 3 (intensa), a fim de avaliar a expressão das proteínas. As lâminas foram codificadas e o examinador desconhecia a procedência dos cortes histológicos.

3.4 Análise dos dados

Para cada parâmetro amostral dos resultados quantitativos que foram obtidos através da histometria (AON, TC, BR) e morfometria tridimensional pela microtomografia (BV/TV, Tb.Th, Tb.Sp e Tb.N), foi abordada a diferença entre os grupos experimentais coágulo, BoneCeramic® e Plenum-Oss®. Todos os dados foram submetidos à curva de normalidade – teste de Shapiro-Wilk com nível de significância de 0,05 para todos os testes. Portanto, diante da homogeneidade ou heterogeneidade dos dados, um teste paramétrico ou não paramétrico foi aplicado. Foi aplicado o teste de ANOVA dois fatores para biomaterial remanescente, o teste Kruskal-Wallis para tecido conjuntivo e área de osso neoformado e pós teste Holm-Sidak para os três parâmetros. Para a microtomografia computadorizada foi aplicado o teste ANOVA um fator e pós teste Tukey. O programa estatístico utilizado foi o SigmaPlot 12.0 (Exakt Graphs and Data Analysis, San Jose, CA, USA).

4 RESULTADOS

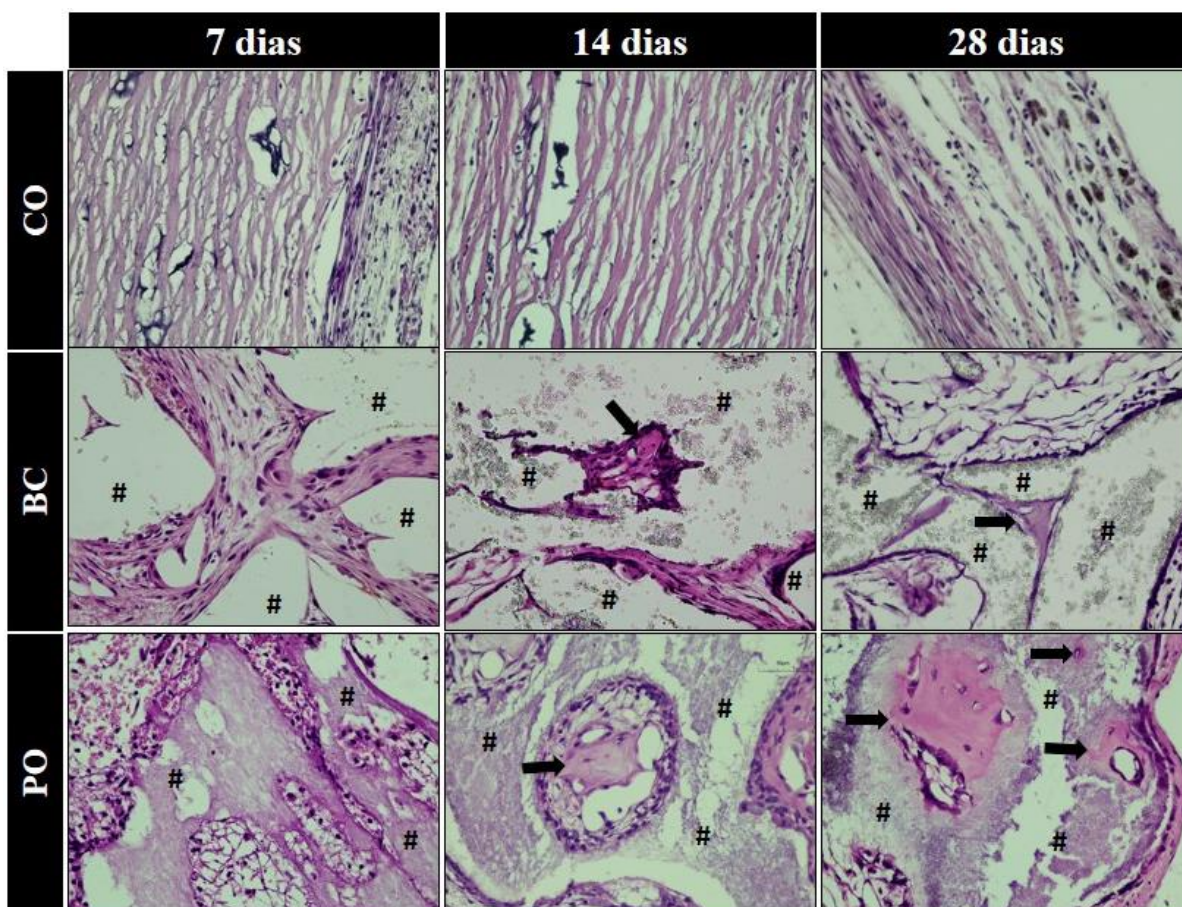
4.1 Análise histológica

Nas imagens histológicas podemos observar que aos 7 dias o grupo CO apresentou tecido conjuntivo imaturo e pouco organizado, com pouca neovascularização. Enquanto o grupo BC mostrou presença de ampla quantidade de biomaterial remanescente, com tecido conjuntivo celularizado e leve neovascularização. O grupo PO apresentou vasta área de biomaterial remanescente, entretanto exibiu tecido conjuntivo celularizado, com moderada angiogênese (figura 6).

Aos 14 dias é possível verificar que o grupo PO apresentou maior quantidade de osso neoformado, contudo ainda imaturo. Mostrou organização tecidual, com presença de neovascularização e osteoblastos, principalmente na periferia da área enxertada. O grupo BC apresentou discretas áreas de tecido ósseo neoformado, ainda imaturo e grande quantidade de biomaterial remanescente. Já o grupo CO não apresentou neoformação óssea, tecido conjuntivo ainda desorganizado e imaturo (figura 6).

Aos 28 dias o grupo PO continuou mostrando superioridade na neoformação óssea, com trabéculas bem formadas, com a presença de células osteóide no tecido maduro. Enquanto o grupo BC apresentou pouca quantidade de tecido ósseo neoformado, ainda imaturo. O grupo CO seguiu sem neoformação óssea, tecido conjuntivo celularizado, porém ainda imaturo (figura 6).

Figura 6- Fotomicrografia das calvárias de todos os grupos (CO, BC, PO) nos períodos de 7, 14 e 28 dias. Coloração em hematoxilina e eosina. A Área de osso neoformado (seta), biomaterial remanescente (#) e tecido conjuntivo podem ser observadas nas imagens.



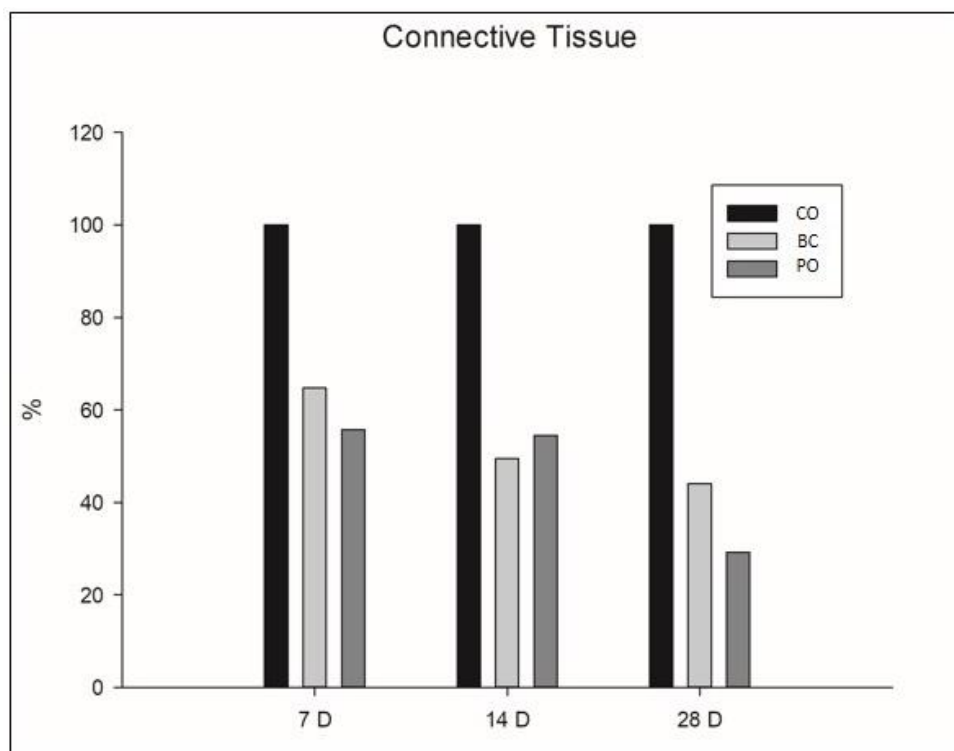
Fonte: Autor, 2024

4.1.1 Área de Tecido Conjuntivo

A presença de tecido conjuntivo, apresentou-se de diferentes formas para os grupos PO e BC e permaneceu constante para o grupo CO (figura 7).

Os dados quantitativos demonstraram maior infiltração de tecido colágeno para o grupo CO, em comparação com os demais grupos experimentais ($p < 0,05$), que se manteve por todos os tempos experimentais. Entre os grupo PO e BC não houve diferença estatística para este parâmetro ($p > 0,05$) (figura 6 e 7).

Figura 7- Gráfico representativo da área de tecido conjuntivo, observa-se a grande quantidade de tecido conjuntivo em todos os tempos para o grupo CO ($p<0,05$).

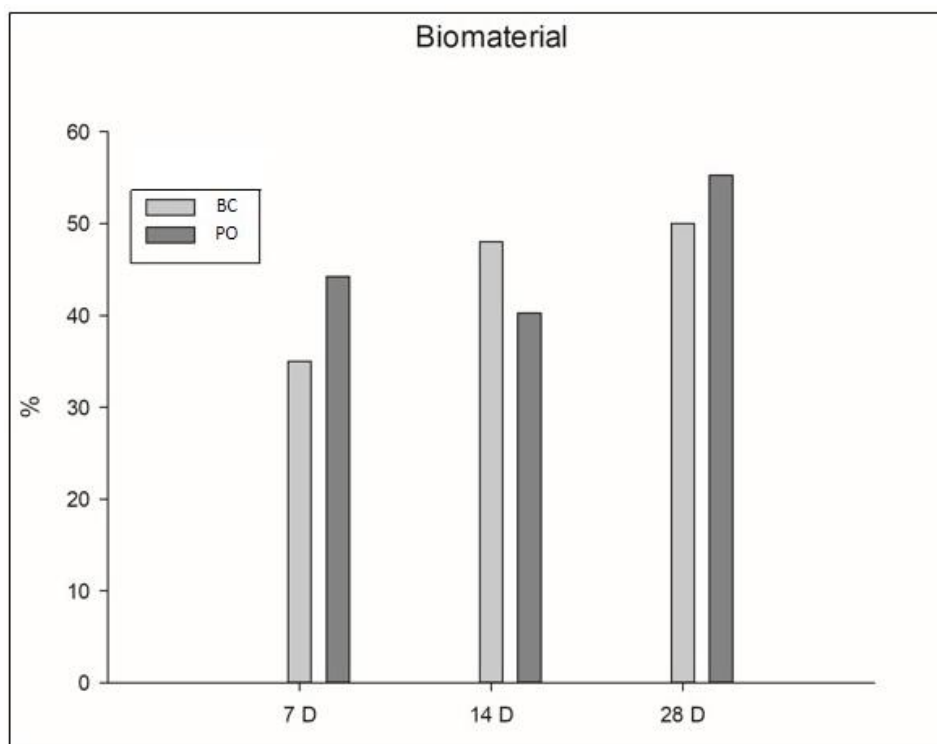


Fonte: Autor, 2024

4.1.2 Área de Biomaterial Remanescente

A área remanescente do biomaterial demonstrou que para ambos os grupo, houve pequeno aumento das proporções do biomaterial nos diferentes tempos experimentais, demonstrando baixa taxa de degradação dos materiais, não apresentando diferença estatística significativa entre os grupos PO e BC nos tempos analisados ($p>0,05$) (figura 6 e 8).

Figura 8- Gráfico representativo da área de biomaterial remanescente indicando a presença dos biomateriais inerte na intimidade dos tecidos, em todos os tempos experimentais.

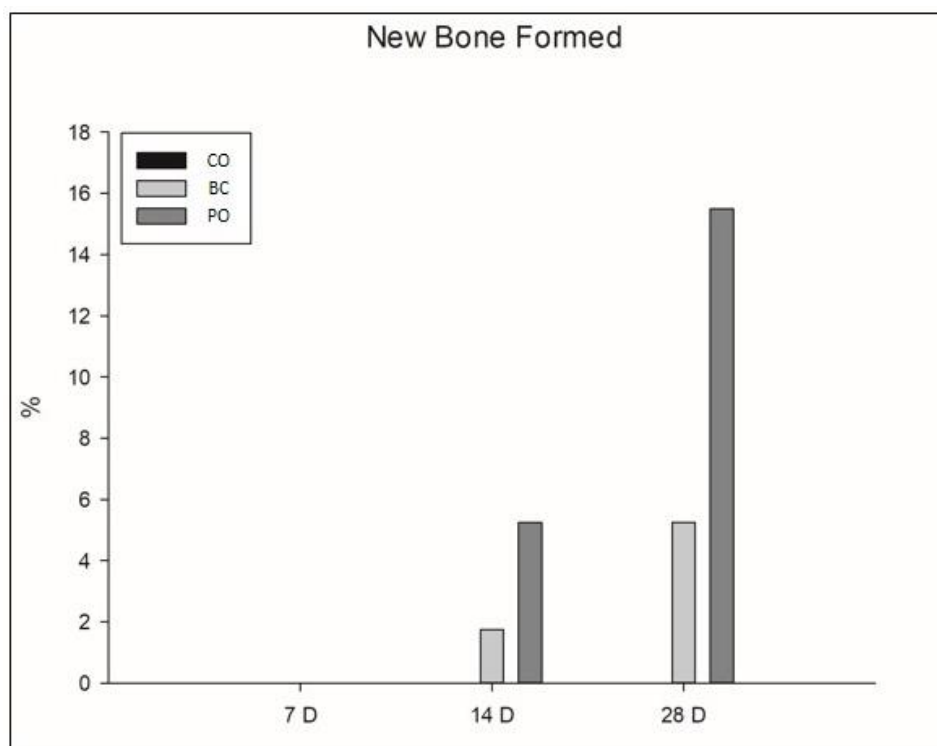


Fonte: Autor, 2024

4.1.3 Área de Neoformação Óssea

A avaliação quantitativa do tecido ósseo demonstrou que nas amostras de 7 dias, para todos os grupo experimentais, não apresentou neoformação óssea. Contudo, aos 14 dias, já existem regiões de neoformação óssea entremeada ao biomaterial nos grupos PO e BC. Além disso, nota-se maior formação e maturação óssea para o grupo PO, com relação as amostras de 14 e 28 dias, que apresentou resultado superior aos demais grupos ($p < 0,001$) (figura 6 e 9).

Figura 9- Representação gráfica dos resultados de área de tecido ósseo neoformado. Evidenciou-se reparo ósseo superior para o grupo PO, nos períodos de 14 e 28 dias ($p<0,001$).



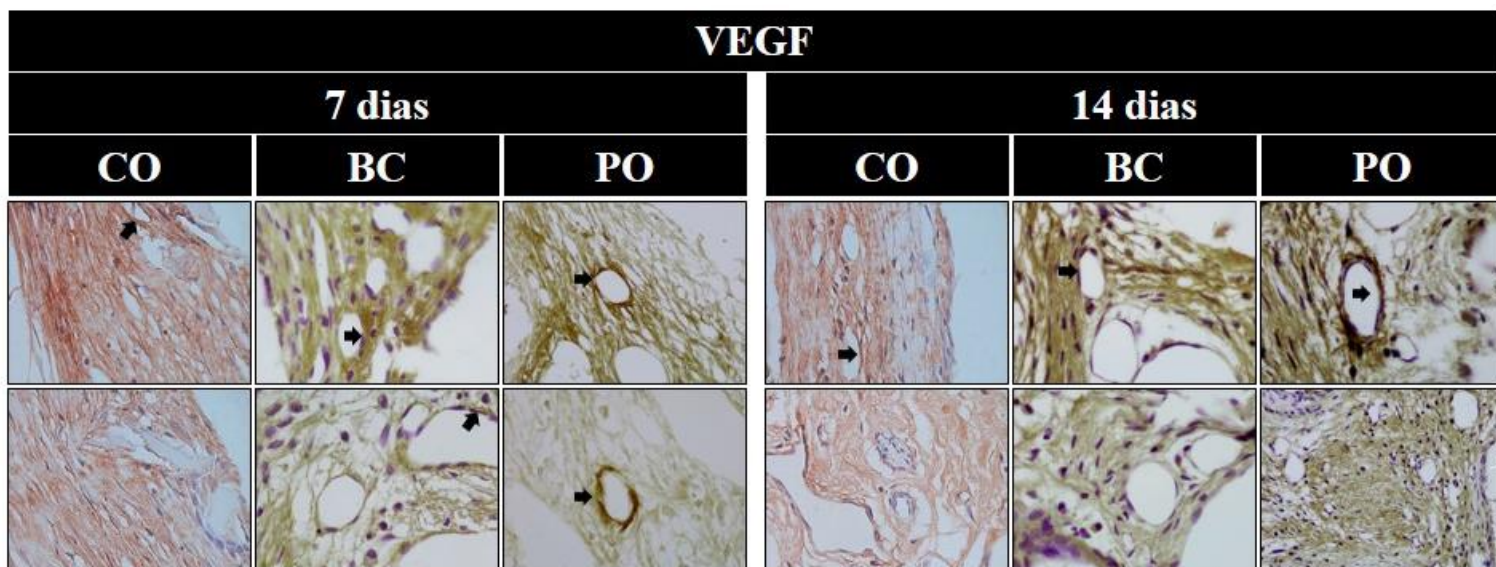
Fonte: Autor, 2024

4.2 Análise Imunoistoquímica

Por meio da análise imunoistoquímica foram avaliadas as proteínas VEGF e Osteocalcina (OC), com a finalidade de avaliar o comportamento dos grupos experimentais, nos diferentes tempos, com relação as fases do reparo ósseo.

Na imagem representativa é possível observar a expressão do fator de transcrição VEGF, que participa do processo de neovascularização. A presença deste fator de transcrição está associada ao mecanismo de angiogênese que ocorre durante o reparo ósseo, exercendo, inclusive, efeito quimiotático nos osteoblastos. Aos 7 dias foi observada marcação positiva para todos os grupos, apresentando score 1 para o grupo BC e CO e score 2 para o grupo PO. Já aos 14 dias apresentou score 1 para todos os grupos (Figura 10).

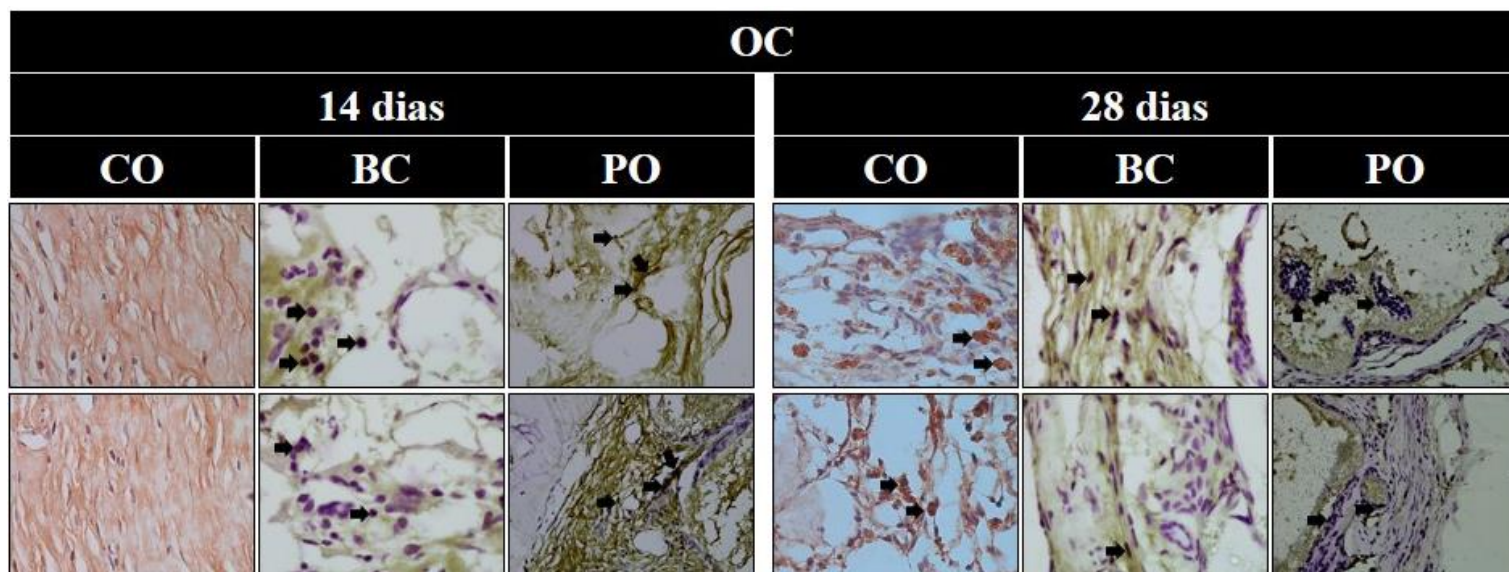
Figura 10- Imagens representativas das marcações pela imunoistoquímica da proteína VEGF, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 7 e 14 dias.



Fonte: Autor, 2024

A OC, uma proteína não colágena que é classificada como marcadora da mineralização óssea, sua presença sinaliza osteoblastos desenvolvidos e em atividade de mineralização sobre a matriz colágena. Aos 14 dias o grupo CO não apresentou marcação para esta proteína, mostrando o atraso que esse grupo apresenta no reparo ósseo. Nos grupo BC e PO, observou-se moderada marcação, score 2 para osteocalcina nas células de linhagens osteoblásticas, presentes no sítio reparacional. Já aos 28 dias apresentou score 1 para todos os grupos (Figura 11).

Figura 11- Imagens representativas das marcações pela imunoistoquímica da proteína OC, demonstrando o padrão de marcação para os grupos experimentais, em 14 e 28 dias.



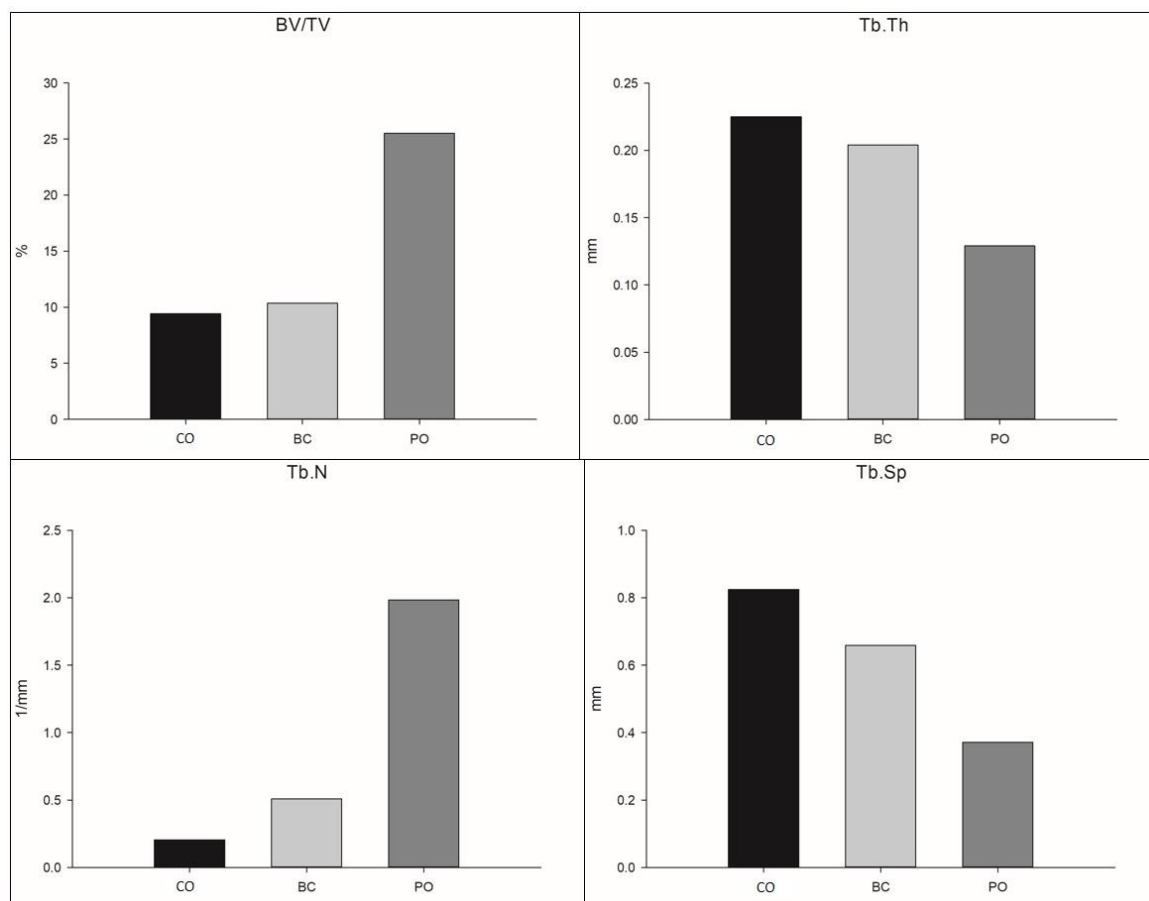
Fonte: Autor, 2024

4.3 Microtomografia computadorizada (Micro-CT)

Na análise microtomográfica dos grupos experimentais, no parâmetro BV.TV foi possível observar maior porcentagem de volume ósseo no grupo PO em relação aos grupos BC e CO ($p < 0,05$), seguido do grupo BC, porém sem diferença estatística significativa entre o grupo CO. No parâmetro Tb.Th evidenciou uma maior espessura de trabéculas no grupo CO, apresentando diferença estatística significativa apenas com o grupo PO ($p < 0,05$), seguido do grupo BC em relação ao grupo PO ($p < 0,05$).

Avaliando o número de trabéculas (Tb.N), o grupo PO obteve um maior resultado em relação aos demais grupo ($p < 0,05$), seguido do grupo BC, contudo sem diferença estatística significativa com o grupo CO. Por fim, em Tb.Sp foi possível observar maior separação das trabéculas no grupo CO seguido do grupo BC em relação ao grupo PO ($p < 0,05$) (Figura 12)

Figura 12- Gráficos microtomográficos de caracterização óssea aos 28 dias, dos grupos CO, BC e PO onde foram avaliados os parâmetros BV.TV, Tb.Th, Tb.N e Tb.Sp.



Fonte: Autor, 2024

5 DISCUSSÃO

Com a finalidade de encontrar tratamento para perda do tecido ósseo na clínica odontológica, inúmeras pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de desenvolver biomateriais para resolução dessa situação clínica tão desafiadora. Nesse sentido, o principal objetivo dos estudos na área concentra-se na criação de biomateriais capazes de assemelhar as propriedades do osso autógeno. As hidroxiapatitas sintéticas associadas com β -Tri-cálcio fosfato, são amplamente utilizados para esse fim (26, 27).

Esta pesquisa visou avaliar o resultado do Plenum® Oss_{hp} em um trabalho pré-clínico, de modo que sua avaliação possa ser realizada em organismo vivo, uma vez que há escassez de estudos que forneçam compreensão da resposta biológica frente a este biomaterial.

O Plenum® Oss_{hp} (70HA: 30 β -TCP) foi comparado a um biomaterial também biocerâmico, de controle positivo, Straumann® BoneCeramic™ (60HA: 40 β -TCP), contudo com proporções diferentes, dessa forma avaliando a atuação de diferentes formulações no reparo de defeitos críticos (28, 29, 30). Os biomateriais foram utilizados para o preenchimento de defeitos críticos em calvária de ratos de 5 mm de diâmetro.

Foi observado maior expressão de fator de crescimento endotelial (VEGF) no grupo PO aos 7 dias. A expressão de VEGF é de suma importância para o desenvolvimento e manutenção homeostática do osso, visto que esse fator é originário de osteoblastos e seu mecanismo consiste na atuação direta na regulação entre a interação de angiogênese e osteogênese (31). Sugerindo que o grupo PO se encontrava sempre em um estágio a frente no processo de reparo ósseo, o que corrobora com a avaliação histométrica em que, aos 14 e 28 dias se vê maior área de neoformação óssea para o grupo PO.

A análise imunoistoquímica realizada após 7 dias é imprescindível quando se quer avaliar a fase inicial de reparo do defeito, visto que nesse momento há abundância de células que serão precursoras da síntese de proteínas que cooperarão nas respostas reparatórias. Dessa forma, consegue-se analisar a resposta das células frente aos estímulos promovidos pelos biomateriais (32).

A osteocalcina (OC), uma proteína não colágena, é um indicador de mineralização óssea, apontando a presença e atividade dos osteoblastos na

mineralização da matriz colágena (23, 24). Ao analisar a expressão dessa proteína aos 14 dias, observou-se que houve a ausência de marcação para o grupo CO, indicando um atraso no processo de reparo ósseo. Enquanto nos grupos BC e PO, houve uma marcação moderada para OC nas células osteoblásticas, evidenciando sua presença ativa no local do reparo. Apesar de exibirem a mesma marcação, o grupo PO, na análise histométrica apresentou estágio de mineralização óssea mais avançada em relação ao BC aos 14 e 28 dias.

Ao comparar o tecido ósseo formado nos grupos CO, BC e PO, na análise de microtomografia computadorizada, o dado quantitativo sugeriu para PO (25,25%), BC (10,95%) e CO (4,91%), ou seja, apresentou um volume de tecido ósseo superior no grupo teste, assim como o parâmetro qualitativo do número de trabéculas. Porém, ao avaliarmos o parâmetro da separação entre trabéculas e espessura das trabéculas, foi superior no grupo CO e BC, apresentando apenas diferença estatística significativa com o grupo PO. O grupo teste nos mostrou volume e quantidade maior de tecido ósseo formado, com trabéculas mais finas e próximas entre si. Esses resultados corroboram com as imagens histológicas, em que se vê maior área de osso neoformado no grupo PO.

Um aspecto crítico para análise refere-se à persistência do biomaterial após a implantação no defeito crítico. Os substitutos aloplásticos devem possuir com um controle de reabsorção, semelhante ao apresentado em biocerâmicas bifásicas. Deve-se alcançar um equilíbrio entre a rápida reabsorção do β -TCP com a menor taxa de HA, evitando a completa reabsorção do biomaterial antes da formação óssea e prevenindo sua permanência prolongada, o que poderia atrapalhar a substituição pelo osso neoformado (33).

Os achados histológicos exibiram quantidade maior de biomaterial remanescente aos 14 e 28 dias no grupo PO. Nevins et al., em 2013 (34), ao analisarem as várias proporções de biocerâmicas bifásicas no reparo de defeitos ósseos em modelo animal, constatou-se que os grupos com quantidades mais elevadas de HA exibiam uma expressão maior de biomaterial remanescente. Esses resultados indicam que, devido à variação no tamanho dos poros e na proporção de HA, o grupo PO exige um tempo mais prolongado para reabsorção. Isso resulta em uma partícula de biomaterial remanescente com espessura maior em comparação ao BC (33).

É fundamental destacar que, nos grupos que foi enxertado os biomateriais (PO e BC), não foi observada a presença de um infiltrado inflamatório significativo, com ausência de citotoxicidade, o que nos indica uma característica importante na regeneração tecidual, a biocompatibilidade. Isso ressalta a relevância do resultado atingido por esses biomateriais ao longo dos períodos experimentais, bem como seus potenciais aplicações biomédicas futuras. Em 2015, Shin e colaboradores verificaram a eficácia dos enxertos aloplásticos na estabilização de defeitos peri-implantares, que nos mostrou maior travamento dos implantes (34).

Em breve, os substitutos ósseos sintéticos poderão se tornar referência no ramo da regeneração óssea guiada, substituindo o osso autólogo e xenógeno. Em razão do seu potencial osteocondutor e osteoindutor, além de apresentarem uma notável taxa de reabsorção e formação de osso novo, são seguros, livres de infecções, de fácil manipulação e ainda podem ser usados com fatores de crescimento e/ou transplante celular (35).

Desta forma, com base nesses resultados, foi evidenciado que a recente biocerâmica lançada Plenum® Oss_{hp}, testada no modelo de calvário de ratos, demonstrou uma segurança cirúrgica e consistente, revelando-se eficaz no estímulo do reparo ósseo. Essa descoberta sugere sua aplicação potencial como substituto ósseo sintético na prática clínica. Contudo, a escassez de artigos que abordem a avaliação do perfil físico-químico e estrutural do Plenum® Oss_{hp} na literatura dificulta a análise dos resultados deste estudo, estimulando a necessidade de novas pesquisas para uma investigação mais aprofundada dessas características. Isso é essencial para compreender os motivos subjacentes à superioridade deste biomaterial.

6 CONCLUSÃO

O Plenum® Oss_{hp} apresentou capacidade osteocondutora superior ao controle positivo (Straumann BoneCeramic™), mostrando-se uma alternativa eficaz como substituto ósseo sintético na prática odontológica. No entanto, principalmente para reconstruções de defeitos críticos ainda é importante avaliar novas proporções entre o uso de β -TCP e HA e sua estrutura, para potencializar a substituição do biomaterial por osso.

REFERÊNCIAS

1. Elgali, Ibrahim et al. “Regeneração óssea guiada: materiais e mecanismos biológicos revisitados.” *Jornal europeu de ciências orais* vol. 2017; 125 (5): 315-337. doi: 10.1111 / eos.12364
2. Giesenhagen B, Martin N, Jung O, Barbeck M. Bone Augmentation and Simultaneous se with Allogenic Bone Rings and Analysis of Its Purification Success. *Materials (Basel)*. 2019; 12(8):1291. doi: 10.3390/ma12081291.
3. Roden RD, Jr. Principles of bone grafting. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010;22(3):295-300.
4. Ayukawa Y, Ogino Y, Moriyama Y, Atsuta I, Jinno Y, Kihara M, et al. Simvastatin enhances bone formation around titanium implants in rat tibiae. *J Oral Rehabil*. 2010;37(2):123-30.
5. Mundy G. GR, Harris S., Chan J., Chen D., Rossini G., Boyce B., Zhao M., Gutierrez G. Stimulation of Bone Formation in Vitro and in Rodents by Statins. *Science*. 1999;286(5446):1946-9.
6. Misch CE, Dietsh F. Endosteal implants and iliac crest grafts to restore severely resorbed totally edentulous maxillae--a retrospective study. *J Oral Implantol*. 1994;20(2):100-10.
7. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments *Molecules*. 2021;26(10):3007. Doi:10.3390/molecules26103007
8. Hedman C, Bolea R, Marín B, et al. Transmission of sheep-bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Vet Res*. 2016; 47:14. Doi:10.1186/s13567-015-0295-8.
9. Hatakeyama W, Taira M, Sawada T, Hoshi M, Hachinohe Y, Sato H, Takafuji K, Kihara H, Takemoto S, Kondo H. Regeneração Óssea de Defeitos Críticos do Calvário em Ratos Usando Compósitos de Nano-Apatita/Colágeno Altamente Pressionados. *Materiais (Basileia)*. 2022;15(9):3376.
10. Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci*. 2018; 15;26:e20160531. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0531.

11. BRASIL, RESOLUÇÃO-RE Nº 3.031, in: A.N.d.V. Sanitária (Ed.) Diário Oficial da União, Brasília - DF, 2020, p. 94.
12. M.N. Helder, F.A.S. van Esterik, M.D. Kwehandjaja, C.M. Ten Bruggenkate, J. Klein-Nulend, E. Schulten, Evaluation of a new biphasic calcium phosphate for maxillary sinus floor elevation: Micro-CT and histomorphometrical analyses, Clin Oral Implants Res. 2018; 29(5): 488-498.
13. R. Fujita, A. Yokoyama, T. Kawasaki, T. Kohgo, Bone augmentation osteogenesis using hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate blocks, J Oral Maxillofac Surg. 2003; 61(9):1045-53.
14. H.J. Prins, H. Fernandes, H. Rozemuller, C. van Blitterswijk, J. de Boer, A.C. Martens, Spatial distribution and survival of human and goat mesenchymal stromal cells on hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate, J Tissue Eng Regen Med. 2016; 10(3): 233-44.
15. Oliveira JE, Suzuki MF, Damiani R, et al. Synthesis of Human Bone Morphogenetic Protein-2 (hBMP-2) in E. coli Periplasmic Space: Its Characterization and Preclinical Testing. Cells. 2021;10(12):3525.
16. MacKay JW, Murray PJ, Kasmai B, Johnson G, Donell ST, Toms AP. Subchondral bone in osteoarthritis: association between MRI texture analysis and histomorphometry. Osteoarthritis and cartilage. 2017;25(5):700-7.
17. Toro LF, de Mello-Neto JM, Dos Santos FFV, Ferreira LC, Statkiewicz C, Cintra LTÂ, et al. Application of Autologous Platelet-Rich Plasma on Tooth Extraction Site Prevents Occurrence of Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws in Rats. Scientific reports. 2019;9(1):1-15
18. Bouxsein ML, Boyd Sk Fau - Christiansen BA, Christiansen Ba Fau - Guldberg RE, Guldberg Re Fau - Jepsen KJ, Jepsen Kj Fau - Muller R, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. (1523-4681 (Electronic)).
19. Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, de Sá DP, Casatti CA, Issa JPM, et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication- related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2018;184:7-17.
20. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process

- and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2019;120:101-13.
21. Afzal F, Polak J, Buttery L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. *The Journal of pathology*. 2004;202(4):503-10.
 22. Mayr-Wohlfart U W, J., Hausser, H., Kessler, S., Gu'nther, K.-, P. D, C., Puhl, W., & Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotatic migration of primary human osteoblasts. *Bone*. 2002;30:472-7.
 23. Hughes SS, Hicks DG, O'Keefe RJ, Hurwitz SR, Crabb ID, Krasinskas AM, et al. Shared phenotypic expression of osteoblasts and chondrocytes in fracture callus. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1995;10(4):533-44.
 24. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(15):9656-61.
 25. Dos Santos Pereira R, Boos FB, Gorla LF, Garcia IR, Jr., Okamoto R, Hochuli-Vieira E. Maxillary Sinus Elevation Surgery with ChronOS and Autogenous Bone Graft: 47 Immunohistochemical Assessment of RUNX2, VEGF, TRAP, and Osteocalcin. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*. 2017;37(6):321-7.
 26. Gotz W, Papageorgiou S. Molecular, Cellular and Pharmaceutical Aspects of Synthetic Hydroxyapatite Bone Substitutes for Oral and Maxillofacial Grafting. *Curr Pharm Biotechnol*. 2016 Dec 7;18(1):95–106.
 27. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials* [Internet]. 2017 Mar 24 [cited 2022 Oct 25];10(4).
 28. BontáH., Galli F.G., Gualtieri A., Renou S., Caride F. The Effect of an Alloplastic Bone Substitute and Enamel MatrixDerivative on the Preservation of Single Anterior Extraction Sockets: A Histologic Study in Humans. *Int. J. PeriodonticsRestor. Dent*. 2022;42:361–368.
 29. . Schmitt C.M., Doering H., Schmidt T., Lutz R., Neukam F.W., Schlegel K.A. Histological results after maxillary sinusaugmentation with Straumann

- BoneCeramic, Bio-Oss, Puros, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin. Oral Implant. Res.* 2013;24:576–585.
30. Van Assche N., Michels S., Naert I., Quirynen M. Randomized controlled trial to compare two bone substitutes in the treatment of bony dehiscences. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2013;15:558–568.
 31. Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest.* 2016 Feb;126(2):509-26. doi: 10.1172/JCI82585. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26731472;
 32. Frigério PB, Quirino LC, Gabrielli MAC, Carvalho PHA, Garcia Júnior IR, Pereira-Filho VA. Evaluation of Bone Repair Using a New Biphasic Synthetic Bioceramic (Plenum® Oss_{hp}) in Critical Calvaria Defect in Rats. *Biology (Basel).* 2023 Nov 10;12(11):1417.
 33. Lee J.H., Ryu M.Y., Baek H.-R., Lee K.M., Seo J.-H., Lee H.-K. Fabrication and Evaluation of Porous Beta-Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite (60/40) Composite as a Bone Graft Extender Using Rat Calvarial Bone Defect Model. *Sci. World J.* 2013;2013:481789.
 34. Shin SY, Shin S il, Kye SB, Chang SW, Hong J, Paeng JY, et al. Bone cement grafting increases implant primary stability in circumferential cortical bone defects. *J Periodontal Implant Sci [Internet]*. 2015 [cited 2022 Oct 25];45(1):30–5.
 35. Fukuba S., Okada M., Nohara K., Iwata T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. *Materials.* 2021;14:1096.

ANEXO

ANEXO - Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado "**Análise do potencial osteocondutor de biomateriais sintéticos: um estudo em defeitos críticos em calvária de ratos**", Processo FOA nº 2022-613, sob responsabilidade de Leonardo Perez Faverani e colaboração de Anderson Maikon de Souza Santos, Mileni Buzo de Souza, Eduardo Hochuli Vieira, Eduardo Dallazen e João Matheus Fonseca e Santos foi aprovado pela CEUA em 24 de Janeiro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Analysis of the osteoconductive potecial of sintetic biomaterial: a study in critical-size defects in rat calvaria**", Process FOA nº 2022-613, under the supervision of Leonardo Perez Faverani and collaboration of Anderson Maikon de Souza Santos, Mileni Buzo de Souza, Eduardo Hochuli Vieira, Eduardo Dallazen and João Matheus Fonseca e Santos had its the Final Report approved by the CEUA on January 24, 2024.

Prof. Assoc. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator