

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO ENTRE O BIOVIDRO ATIVO E O BIOVIDRO
BORO-SILICATO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO
EM CALVÁRIA DE *RATTUS NORVEGICUS* (WISTAR)**

Gabriel Luiz Montanhim
Médico Veterinário

2022

**T
E
S
E.

/

M
O
N
T
A
N
H
I
M

G.
L.

2
0
2
2**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO ENTRE BIOVIDRO ATIVO E O BIOVIDRO
BORO-SILICATO NO REPARO ÓSSEO DE DEFEITO CRÍTICO
EM CALVÁRIA DE *RATTUS NORVEGICUS (WISTAR)***

**Discente: Gabriel Luiz Montanhim
Orientadora: Profa. Dra. Paola Castro Moraes
Coorientador: Prof. Dr. Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias
Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa**

**Tese apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do
título Doutor em Cirurgia
Veterinária**

FICHA CATALOGRÁFICA

M764c	<p>Montanhim, Gabriel Luiz</p> <p>Comparação entre biovidro ativo e o biovidro boro-silicato no reparo ósseo de defeito crítico em calvária de <i>Rattus Norvegicus</i> (Wistar) / Gabriel Luiz Montanhim. -- , 2023</p> <p>43 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Orientadora: Paola Castro Moraes Coorientadora: Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias</p> <p>1. CIRURGIA VETERINÁRIA. 2. REPARAÇÃO ÓSSEA. 3. BIOMATERIAIS. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMPARAÇÃO ENTRE O BIOVIDRO ATIVO E O BIOVIDRO BORO-SILICATO NO REPARO ÓSSEO DE EFEITO CRÍTICO EM CALVÁRIA DE *Rattus Norvegicus* (Wistar)

AUTOR: GABRIEL LUIZ MONTANHIM

ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES

COORIENTADOR: LUÍS GUSTAVO GOSUEN GONÇALVES DIAS

COORIENTADOR: JOÃO PAULO MARDEGAN ISSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Cirurgia Veterinária, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES (Participação Presencial)
Depto de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. FRANCISCO CLÁUDIO DANTAS MOTA (Participação Presencial)
Universidade Federal de Uberlândia/UFU / Uberlândia/MG


Profa. Dra. ANNELISE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS (Participação Presencial)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. FERNANDO YOITI KITAMURA KAWAMOTO (Participação Presencial)
Departamento de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Lavras / Lavras/MG


Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO (Participação Presencial)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV UNESP Jaboticabal

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2023

DADOS CURRICULARES

GABRIEL LUIZ MONTANHIM – nascido em 29 de agosto de 1990, em São José do Rio Preto - SP, natural de Cedral – SP, filho de Vera Lúcia Garcia Montanhim e Pedro Luiz Montanhim. Graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista – UNESP Câmpus de Jaboticabal (2010 – 2014). Concluiu residência em Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais (2015 – 2017) e mestrado com ênfase em biomateriais (2017 – 2019) na UNESP Câmpus de Jaboticabal. Atualmente (2019 – atual) aluno regularmente matriculado no programa de pós graduação *Strictu Sentu* em Ciências Veterinárias (Cirurgia Veterinária), na UNESP Câmpus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Dra. Paola Castro Moraes com ênfase em biomateriais.

EPÍGRAFE

“Sonhar é acordar para dentro – Mário Quintana”

DEDICATÓRIA

“Esse trabalho é dedicado aos meus pais Pedro e Vera, minha irmã Graziela, minha cachorra Belinha, a todos os pós-graduandos que assim como eu continuaram firmemente na luta de uma pesquisa brasileira referência e a você Ana (Pimentinha)”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e todos os seres superiores que continuamente abençoam minha vida e de meus familiares. Entendo que hoje sem uma força superior a humana, nada seria possível.

Agradeço meus pais, Vera e Pedro, por mesmo nos momentos de intenso estresse e dificuldade não desistiram, e dentro de suas singulares tentaram e tentam compreender os caminhos das quais escolho seguir. Agradeço pelos momentos de encorajamento e apoio e por tudo ao longo desses 32 anos que não caberiam somente um parágrafo.

Agradeço minha irmã Graziela por ser um exemplo de pesquisadora, mulher e irmã. Mesmo sendo água e vinho, nos completamos de maneira ímpar.

Agradeço minha família que mesmo de longe, sempre se faz presente.

Agradeço meus amigos, que desde cedo são parte da minha família. Agradeço por todos os momentos de alegria e tristeza que vivemos juntos, por todas as incertezas e certezas que dividimos. Agradeço por cada risada e choro que compartilhamos. Graças a Deus posso dizer que sou abençoado com vários amigos, amigos das quais eu sei que estarão lá, independente do lugar para me segurar – Rafa, Siriema, Baxada, Próprio, Tos, Léo, Bavaria, Celso, Mordelão, Rakelly, Fer, Pomba, Grazi, Pigmeia, Gabs Carra e Adilson.

Agradecimentos eternos para minha orientadora e eterna mãe do coração a Profa. Paola. Nesses anos dividi mais tempo com a senhora do que com minha família. Com a senhora aprendi ser cirurgião, aprendi ser pesquisador e espero um dia por em prática o que aprendi a ser professor com você. Se eu tiver pelo menos metade do seu talento como profissional e pessoa eu já estarei satisfeito. Obrigado!

Agradeço ao meu laboratório e aos meus amigos que dividiram essa jornada comigo, sem vocês não seria possível – Andreia, Mareliza, Marcela, Marcelo, Ariadne e Gustavo.

Agradeço eternamente a UNESP Jaboticabal. Hoje vejo o tanto que cresci, o tanto que aprendi e o tanto que eu aproveitei tudo o que ela poderia me oferecer. Foi aqui que me encontrei como pessoa, que conheci grande parte do meu círculo de apoio, que conheci professores incríveis que levo no meu coração até hoje. Agradeço a cada funcionário que fazem parte da formação de cada

aluno que passa aqui dentro. Hoje fechando um ciclo que começou em 2010, posso falar que fui verdadeiramente feliz nessa casa e que sinto falta (as vezes).

Agradeço ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, lugar que eu literalmente “morei” durante anos. Agradeço aos funcionários, residentes e pós-graduandos por toda confiança e aprendizado que podemos trocar. Agradecimentos especiais ao Prof. Bruno que foi primeiro orientador dentro da cirurgia veterinária e que me ensinou a pensar como clínico-cirurgião. Ao Prof. Andriago pela orientação durante a residência e as oportunidades que me deu ao longo da pós-graduação frente a oncologia. E por fim ao Prof. Luis Gustavo – da qual tenho medo até hoje – mas que depositou muita confiança em mim e com isso me estimulou a querer ser melhor.

Agradeço a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, especialmente ao Prof. Dr. João Paulo Mardegan Issa e ao Dr. Dimitrius Pitoli por todo suporte e ajuda com a execução do projeto.

Agradeço a dois lugares do coração que passei como cirurgião, a CENAVET em Taquaritinga e a VETDOMUS em São Paulo. Lugares em que pude ajudar paciente e fazer amigos. Lugares que me transmitem paz e confiança.

Agradeço a cada paciente que eu pude ajudar, que eu puder curar e sanar a dor. Agradeço a cada cobaia que fez parte da minha vida científica, sem vocês eu não estaria aqui.

Por fim, gostaria de agradecer a dois seres de luz que tenho certeza que estão juntas. A minha cachorra Belinha, que me trouxe muito ensinamentos e muitas dores com sua ida, muita reflexão sobre o futuro, mas principalmente me trouxe infinitas alegrias durante 15 anos, parte da Medicina Veterinária foi por você. E a minha eterna amiga Ana, a Pimentinha, que tenho certeza que de onde estiver, está vendo e espero que aplaudindo haha. Ana você fez parte disso tudo e espero um dia a gente se encontrar pessoalmente e rirmos dos perrengues que você me ajudou a passar, se eu não desisti, grande parte foi por conta de você!

Agradeço à CAPES – CNPq pelo fomento para esta pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado universo por me trazer até aqui, nesse ponto e nesse lugar. Hoje são 32 anos e se os próximos 32 forem de tantas conquistas, crescimento, família, amigos e saúde, eu já estou satisfeito. Obrigado!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1. Considerações gerais	1
Introdução	1
Revisão de Literatura	2
Referências	10
CAPÍTULO 2 – Comparação entre o biovidro ativo e o biovidro boro-silicato no reparo ósseo do defeito crítico em calvária de <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar)	14
Resumo	14
1. Introdução	14
2. Material e métodos	17
2.1. Animais	17
2.2. Biomateriais	18
2.3. Procedimentos anestésicos e cirúrgicos	19
2.4. Microtomografia Computadorizada (micro CT)	22
2.5. Avaliação histopatológica e histomorfométrica	23
2.6. Quantificação do volume ósseo neoformado	23
2.7. Análise de densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III	23
2.8. Análise Estatística	23
3. Resultados	23
3.1. Avaliação clínico-cirúrgica	23
3.2. Microtomografia Computadorizada (micro CT)	24
3.3. Avaliação Histopatológica	25
3.3.1 Tricrômico de Masson	25
3.3.2 Picrosirius	26
3.4. Análise Estatística	27
3.4.1 Volume ósseo neoformado	27
3.4.2 Picrosirius	28
4. Discussão	29
5. Conclusão	32
6. Referências	32
APÊNDICE	39
CAPÍTULO 3: Considerações finais	43

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Grupos experimentais. A: CT-: controle negativo (defeito vazio- coágulo). B: CT+: controle positivo (osso autógeno). C: BV: biovidro 45S5. D: BVBS: biovidro boro-silicato. Jaboticabal, 2021.	21
Figura 2: Exame microtomográfico dos grupos controle positivo, controle negativo, biovidro e biovidro boro-silicato. Importante ressaltar que a área em preto representa o defeito crítico e dentro dele o tecido ósseo neoformado (mais evidente nas imagens do controle positivo). Jaboticabal, 2021.	25
Figura 3: Fotomicrografias em 10X dos cortes histológicos das lâminas das calvárias de ratos Wistar, com defeito crítico. A: controle negativo; o asterisco preto evidencia a borda do defeito (crânio) e na flecha preta a área do defeito preenchida por tecido fibroso. B : controle positivo, na qual o asterisco branco sinaliza a área de neoformação óssea (azul escuro). C: biovidro, na qual o asterisco vermelho mostra a área óssea formada. D: biovidro boro-sicato, onde o asterisco preto sinalizada a borda do defeito e o pontilhado vermelho um entremeado de tecido fibroso, colágeno e osso neoformado. Jaboticabal, 2021.	26
Figura 4: Fotomiografia em 20x das lâminas para coloração de Pricrosírius, paraa visualização das fibras colágenas Tipo I (laranja-vermelho) e Tipo III (amarelo-verde). A: controle negativo. B: controle positivo. C: biovidro. D: biovidro boro-silicato. Jaboticabal, 2021.	27
Figura 5: Gráfico do tipo boxplot apresentando as medianas, amplitude e outliers de cada tratamento para quantificação de volume ósseo. Jaboticabal, 2021.	28
Figura 6: Gráfico do tipo boxplot apresentando as medianas, amplitude e outliers de cada tratamento para quantificação de fibras colágenas. Jaboticabal, 2021.	29

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Proporção entre os componentes para a formação do biovidro.	19

Comparação entre o biovidro ativo e o biovidro boro-silicato no reparo ósseo do defeito crítico em calvária de *Rattus norvegicus* (Wistar)

RESUMO

Falhas ósseas de tamanhos críticos geralmente são resultados por exemplo de lesões de alta energia e não uniões, sendo desafio para qualquer cirurgião ortopedista. Frente a esses desafios, muitas vezes são necessários materiais que auxiliem no preenchimento dessas falhas e, ao mesmo tempo, favoreçam o meio para que a reparação óssea ocorra. Desde 1970 vem sendo estudado e aprimorado o biovidro ativo 45S5 que somado a compostos tais como o boro, pode-se incrementar as vantagens para a formação de novo tecido ósseo. O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a formulação convencional do biovidro ativo com a associação de boro, fabricados pelo Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP. Foram criados defeitos críticos em calotas cranianas de 32 ratos Wistar, distribuídos em quatro grupos, a saber: CT+: controle positivo (osso autógeno), CT-: controle negativo (defeito vazio/coágulo), BV: biovidro 45S5 e BVBS: biovidro boro-silicato. Foram feitas microtomografias computadorizadas na 6ª e 12ª semanas de pós-operatório, para analisar o processo de reparação óssea. Após eutanásia na 12ª semana, as calotas foram processadas para análises histológicas e histométricas. Ao final das análises histométricas foi possível constatar que em todos os tratamentos, com exceção do CT-, houve crescimento ósseo, sendo os dados do BV e BVBS muito semelhantes, porém com resultados satisfatórios ao incremento de boro a formulação clássica, sugerindo que seu incremento pode favorecer a crescimento de novo tecido ósseo.

Palavras-chave: biomaterial, microtomografia e neoformação óssea.

Comparison between active bioglass and borosilicate bioglass in bone repair of the critical defect in the calvaria of Rattus norvegicus (Wistar)

SUMMARY

Bone failures of critical sizes are usually the result of high-energy injuries and non-unions, for example, a challenge for any orthopedic surgeon. Faced with these challenges, materials are often needed to help fill in these gaps and, at the same time, favor the environment for bone repair to occur. Since 1970, the active bioglass 45S5 has been studied and improved, which added to compounds such as boron, can increase the advantages for the formation of new bone tissue. The present study aimed to evaluate and compare the conventional formulation of active bioglass with the association of boron, manufactured by the Department of Dental Materials and Prosthesis of the Faculty of Dentistry of Araraquara UNESP. Critical defects were created in the skulls of 32 Wistar rats, divided into four groups, namely: CT+: positive control (autogenous bone), CT-: negative control (empty defect/clot), BV: 45S5 bioglass and BVBS: boron bioglass -silicate. Computed microtomography scans were performed at the 6th and 12th postoperative weeks to analyze the bone repair process. After euthanasia in the 12th week, the caps were processed for histological and histometric analyses. At the end of the histometric analysis, it was found that in all treatments, with the exception of CT-, there was bone growth, with the data for BV and BVBS being very similar, but with results reduced to the possible increment of boron in the classic formulation, suggesting that its increment may favor the growth of new bone tissue

Keywords: biomaterial, microtomography and bone neoformation.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Comparação do biovidro ativo com biovidro boro-silicato no reparo ósseo do defeito crítico em calota craniana de *Rattus norvegicus* (Wistar)**", protocolo nº 4361/20, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Paola Castro Moraes, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 17 de setembro de 2020.

Vigência do Projeto	01/10/2020 a 30/10/2021
Espécie / Linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	24
Peso / Idade	300 – 350 gramas / 4 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da Unesp, Câmpus de Botucatu

Jaboticabal, 17 de setembro de 2020.


Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

CAPÍTULO 1. Considerações gerais

INTRODUÇÃO

Falhas ósseas de tamanhos críticos geralmente são resultados de lesões de alta energia, fraturas patológicas, não uniões, falha de implante, neoplasmas, entre outras causas e são desafio para qualquer cirurgião ortopedista. Uma das bases de tratamento para correção de falhas óssea é o uso de algum tipo de enxerto ósseo. É estimado que quase dois milhões de enxertos ósseos são implantados clinicamente em todo o mundo, caracterizado como o segundo tecido mais transplantado ficando atrás somente do sangue. Os EUA são responsáveis por 25% do total desses procedimentos (Zhang et al., 2018).

Os enxertos mais utilizados são os autoenxertos (colhidos do próprio indivíduo), aloenxertos (colhidos de indivíduos diferentes, porém da mesma espécie) e os xenoenxertos (doados de indivíduos de espécies diferentes). Nesse contexto, a área de pesquisa relacionada à engenharia de biomateriais vem crescendo significativamente, na busca de materiais que facilitem a regeneração óssea. Apesar do grande número de estudos relacionados a esses materiais, ainda não foi descrito um produto que seja ideal, quando utilizado isoladamente (Moraes, 2006).

Com a finalidade de reconstrução de falhas ósseas, Heich em 1970 desenvolveu um biovidro a base de sílica que, ao entrar em contato com fluidos corporais, se convertia em hidroxiapatita, criando estrutura extremamente rígida, capaz de oferecer bom suporte às células ósseas. Sua capacidade vai além disso, haja vista a capacidade de ativação de genes de expressão osteogênicas e de sua ação pró angiogênica. O biovidro é geralmente frágil, e sua principal apresentação é na forma de pó, não autossustentável, propriedade que pode ser explorada para o preenchimento de pequenas lesões ósseas, como o uso no aumento ósseo oral, uma vez que esses materiais de preenchimento não estão sujeitos a alta carga mecânica (Fu et al., 2010; Furlan et al., 2018)

Atualmente, o uso de biomateriais para reparação óssea apresenta grandes avanços dentro da odontologia, visto que poucas quantidades são usadas para preenchimento alveolar. Porém, o custo de produção muitas vezes acaba sendo exorbitante, tornando-se alternativa financeiramente inviável. No

entanto, sabe-se da sua imensa capacidade de auxiliar na reparação óssea, dadas todas suas vantagens. Com tais informações em mãos, torna-se interessante e necessário a comercialização deste material com custo reduzidos, visto que sua formulação é imensamente conhecida e não há impedimentos legais para sua formulação em laboratórios diferentes de sua origem.

O presente trabalho teve como objetivo principal a realização de avaliação *in vivo* comparando o comportamento e o potencial de reparo ósseo do Biovidro 45S5 com o Biovidro boro-silicato por meio de estudos histopatológicos, estereológicos e avaliação de imagens em microtomografia computadorizada (microCT). Os efeitos foram avaliados em defeitos críticos em calvária de *Rattus norvegicus*, variação Wistar, tratados com os biomateriais.

O projeto segue como continuação de uma linha de pesquisa (processo FAPESP 17/04142-5), visto que a reconstituição de grandes falhas ósseas ainda é desafiadora na medicina veterinária, e pode ocorrer devido à falha de implantes, instabilidade, não uniões, neoplasmas entre outros, culminando em amputação do membro acometido em diversas ocasiões. Desta forma, faz-se necessário o emprego de alternativas que minimizem tais problemas e, nesse contexto, o uso de biomateriais ou implementação de métodos e técnicas terapêuticas inovadoras que auxiliam a incrementar e acelerar a reparação óssea, além do restabelecimento total da função motora.

Se houver a comprovação que nos defeitos críticos ocorreu sinais de reparação óssea, podemos sugerir que os biovidros produzidos no Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-UNESP são alternativa para reconstituição de falhas ósseas críticas.

REVISÃO DE LITERATURA

Um material bioativo é definido como o material que estimula resposta benéfica do corpo, particularmente a sua ligação com a do tecido hospedeiro, que geralmente é o tecido ósseo (Farooq et al., 2012). O termo "biocerâmica" é usado ao se referir a vidros, vitrocerâmica e cerâmica usados como materiais de implante. Uma biocerâmica geralmente é utilizada como opção importante para auxílio na reparação de defeitos ósseos, originários de traumas, defeitos e

doenças congênitas, remoção de tumores ou até mesmo em cirurgias reparadoras, como fusões vertebrais (Jones, 2013). O composto silicato é a base de um biovidro ativo, somado a cálcio e fosfato (Farooq et al., 2012).

Larry Hench em 1969, desenvolveu o primeiro biovidro ativo na Universidade da Flórida com o intuito de encontrar um material que pudesse servir como meio de união óssea. Durante a Guerra do Vietnã, diversos soldados americanos tiveram ossos quebrados e reconstruídos cirurgicamente, sendo comum o desenvolvimento de sinais de rejeição aos implantes disponíveis na época, o que culminava na amputação desses membros. Professor Hench decidiu fazer um vidro degradável no sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ com alto teor de cálcio e com composição próxima a uma eutética ternária no diagrama $\text{Na}_2\text{O-CaO-SiO}_2$ que, após vários testes, chegou a composição de 46,1% molar de SiO_2 , 24,4% molar de Na_2O , 26,9% molar de CaO e 2,6% molar de P_2O_5 , mais tarde denominado biovidro 45S5 ou Bioglass® (Hench, 2006). Tal conformação formou uma ligação tão forte com o tecido ósseo, que para removê-la foi necessário quebrar o osso (Hench, Clark e Schaake, 1972; Hench, 2006). O nome Bioglass® foi registrado pela Universidade da Flórida como um nome para a composição 45S5 original. Portanto, ao se referir a composição 45S5 é usado o termo Bioglass® e não como um termo geral para vidros bioativos (Jones, 2013).

O biovidro ativo cria ligação rápida com o osso desencadeada pelo contato aos fluídos corporais, estimulando o crescimento ósseo da interface osso-implante. A ligação junto ao osso ocorre após a dissolução do vidro, pois forma uma camada de hidroxicarbonato de apatia (HA). A HA é um material semelhante ao osso, na qual a interação com o colágeno óssea favorece sua integração ao tecido. Além disso, as propriedades osteoindutoras são oriundas da sílica solúvel e íons de cálcio liberados após a dissolução do vidro, que estimulam as células osteogênicas a produzirem matriz óssea (Jones, 2013).

A escassez relativa de tecido de autoenxerto e o potencial de transmissão de doenças e reação imune adversa do hospedeiro com aloenxertos aumentaram a necessidade de substitutos ósseos sintéticos. Materiais inertes, como metais e cimentos ósseos, têm sido amplamente utilizados para esse fim (Xynos et al., 2000). O substituto ideal para um enxerto ósseo deve ser material osteogênico, biocompatível, absorvível e fácil obtenção e utilização, possuindo

propriedades específicas para fornecer suporte estrutural e em alguns casos, administrar medicamentos em dosagens adequadas dentro de um período de tempo (Nandi et al., 2009).

A incorporação desses materiais no osso hospedeiro é claramente inferior aos enxertos ósseos autógenos. No entanto, aumentam a osteocondução, que é um processo tridimensional do crescimento dos capilares, tecido perivascular e células osteoprogenitoras do hospedeiro no enxerto (Goldberg, 1992).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* foram realizados usando biovidro ativo 4S5S, a fim de comprovar sua capacidade osteogênica. Xynos et al. (2000) concluíram que o composto tem capacidade de estimular o crescimento e a diferenciação osteogênica dos osteoblastos primários humanos, cultivados em meio celular e semeados em placas contendo o material. Em todos os tempos de análises, foi possível acompanhar a curva de elementos que são expressos ou não durante a fase de diferenciação osteoblástica, como a fosfatase alcalina e osteocalcina. Além disso, também pode ser visto que com o passar do tempo, os osteoblastos cultivados amadureciam, sendo capazes de formar nódulos ósseos, que são pequenos aglomerados de matriz extracelular e outros minerais produzidos pelos osteócitos.

Ao ser introduzido em defeitos ósseos feitos cirurgicamente no rádio de cabras, foi observado que o biovidro ativo foi capaz de conduzir e atuar na produção de novo tecido ósseo quando comparado ao grupo controle não tratado por Nandi et al. (2009). Durante acompanhamento radiográfico, pôde-se visualizar até os 90 dias de análises, que o local da falha tratado com o biovidro foi preenchido com tecido ósseo recém formado, ao passo que o implante era reabsorvido. Tal fato se confirmou nas análises histopatológicas, que mostraram osso lamelar bem desenvolvido, contendo canais haversianos e vasos sanguíneos. Para complemento, foi feita angiografia do membro tratado, mostrando intensa rede vascular ao redor e dentro da falha óssea tratada, levantando dados das ações osteoprogenitora e angiogênica do material.

Em 1996, Oonish e colaboradores comparam o biovidro ativo com um dos materiais mais utilizados até hoje, a hidroxiapatita. Ambos os materiais foram associados em falhas ósseas de fêmures de coelhos, demonstrando efeito superior e mais rápido da formação óssea pelo biovidro. Além disso, a cerâmica de vidro ativo demonstrou taxa de absorção pelo corpo superior a hidroxiapatita,

visto que o biovidro forma uma camada mais coesa junto aos tecidos que foi implantado.

O biovidro é um material altamente estudado e aplicável em odontologia. Macedo et al. (2004) compararam dois tamanhos de partículas de BV comerciais, Biogran® (300 – 355 um) e Perioglas® (90 – 710 um), ambas implantadas em defeitos de tíbias de ratos. Ao término do experimento foi concluído que o tamanho das partículas não afetou o efeito osteocondutor e osteopromotor do biovidro. Felipe et al. (2009), ao avaliarem a biocerâmica em defeitos intraósseos periodontais de cães, observaram que houve substituição mais rápida do biovidro por novo tecido ósseo, quando comparado às áreas controle. Com análises histopatológicas, foi observada intensa atividade osteoblástica no tecido recém-formado mineralizado. Villaça et al. (2009), ao compararem o efeito reparador de biovidro no osso mandíbula de macacos, concluíram ação superior de novo tecido ósseo formado nos campos tratados.

Ao comprovar que houve o crescimento ósseo, além de análises histológicas e histométricas por exemplo, pode ser fazer uso da imunohistoquímica (IHQ). A IHQ é uma técnica de boa acurácia, pois sinaliza a presença de proteínas expressas no tecido a ser analisado. No caso de formação óssea, muitas proteínas podem ser usadas, como a sialoproteína, osteocalcina, osteopontina, entre outros (Xynos et al., 2000; Marques et al., 2015).

Osteocalcina e osteopontina são proteínas da matriz extracelular sintetizadas e secretadas durante o processo de diferenciação e mineralização dos osteoblastos. Osteopontina é um marcador precoce e fidedigno da formação óssea (Nagata et al., 2009). Já a osteocalcina é tida como marcador que aparece tardiamente durante a diferenciação dos osteoblastos, e caracteriza células maduras dessa linhagem, como os osteócitos, que produzem tecido mineralizado (Xynos et al., 2000).

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio de vascularização pré-existente, desempenhando ponto chave na reparação tecidual e no desenvolvimento da engenharia de tecidos. Resumidamente, durante o reparo da ferida, as células endoteliais microvasculares migram para o coágulo sanguíneo e por meio de várias reações, proliferam e formam novos vasos sanguíneos. Todo o processo é regulado por fatores de crescimento, proteínas da medula óssea, receptores de membrana e

moléculas de sinalização que modulam firmemente a formação de novos vasos sanguíneos. A neovascularização é tida como elemento essencial para reparação de tecidos, devido ao aporte de oxigênio que é conduzido ao leito, bem como nutrientes e fatores de crescimento. Além disso, os novos vasos formam um caminho para que células e precursores inflamatórios cheguem aos tecidos (Gorustovich et al., 2013).

Estudos *in vitro* utilizando o biovidro 45S5 mostraram que ele pode estimular o aumento significativo na secreção de fatores de crescimento angiogênicos de fibroblastos como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF) (Gorustovich et al., 2010). O VEGF é um potente fator mitogênico para células do tecido endotelial vascular, tendo importante papel na angiogênese fisiológica e patológica. Seu uso é enquadrado em ensaios pré-clínicos como uso de fatores angiogênicos para terapia de tecidos isquêmicos, sendo usada proteína propriamente dita ou fatores recombinantes gênicos da sua expressão. O bFGF é um forte composto mitogênico para fibroblastos e células endoteliais, principalmente quando aplicados em tecidos maduros (Day, 2005).

Day et al. (2004) foram responsáveis por um dos primeiros estudos que fizeram testes *in vitro* e *in vivo* usando o biovidro 45S5. Nos ensaios *in vitro* onde em uma cultura celular de fibroblastos foram incrementados quantidade da biocerâmica, fora visto crescimento do número de fibroblastos nas primeiras horas. Além disso, após ensaios enzimáticos e fotossensíveis, foram visualizadas quantidades significativas de VEGF nas culturas, corroborando o fato do biovidro ativo auxiliar na secreção deste fator de crescimento. Após implantação *in vivo* no subcutâneo de ratos de implantes de ácido poliglicólico (PGA) entremeados ou não de cultivo celular somado ao biovidro ativo, foi possível visualizar a presença de vasos sanguíneos naqueles em o implante era associado.

Ensaio *in vitro* feitos por Day (2005) mostram que o uso de quantidades relativamente pequenas de Bioglass®, quando comparado as utilizadas em engenharia óssea, pode estimular a expressão e liberação de VEGF e bFGF, aumentando a capacidade angiogênica *in vitro*. Tal expressão dos fatores de crescimento endoteliais, podem ser explicados pela liberação de interleucina 6, estimulada pelo biomaterial, que também é responsável por estimular a

secreção de tais fatores. No mesmo estudo, foi visto que as mesmas quantidades de Bioglass®, estimularam colônias cultivadas de fibroblastos a formarem uma extensa rede de túbulos endoteliais. Tais túbulos são essenciais para que ocorra angiogênese, visto que neles ocorrem migração e proliferação celular, ramificações e posterior anastomoses.

Handel et al. (2013), ao associarem implantes de 45S5 Bioglass com células endoteliais de veia umbilical humana e com membrana corioalantóica de ovos de galinhas, também sugeriram que a ação do biovidro favorece a formação de novos vasos devido a secreção de fatores angiogênicos.

Desde meados de 1970, o biovidro 45S5 é sintetizado a base de sílica e é amplamente estudado. Com o passar dos anos e com as melhorias em termos de purificação de produtos, tal biomaterial foi melhorado e comercializados como o NovaBone®, NovaThera®, NovaMin® e PerioGlass®. Além disso, sua composição pode ser alterada, adicionando compostos como boro, ferro, ítria-zircônia e óxido de grafeno, que conferem propriedades adicionais ao biovidro 45S5 conhecido (Hench, 2006; Furlan et al., 2018; Soubelet, Albano e Conconi, 2018).

Um dos compostos que pode ser associado e melhorar as propriedades do biovidro 45S5 é o boro. Boro é um elemento importante para homeostase de plantas, animais e humanos, tendo suas funções voltadas para o metabolismo energético e lipídico, nos sistemas endócrino, imunológico e nervoso, desempenhando papel funcional no metabolismo mineral. É encontrado na estrutura de ossos e dentes, sendo essencial para saúde óssea, visto que faz parte do equilíbrio de absorção de cálcio, magnésio e fósforo (Gazera e Acarb, 2019).

Um dos campos de uso que o boro mais ganha destaque é no tratamento de osteoartrites. Um estudo que realizou suplementação de boro em doses seriadas e tratamento placebo, em pessoas de meia-idade acometidas com osteoartrite primária no joelho, demonstrou melhora no quadro dos pacientes (Scorei et al., 2011). O estudo mostrou que houve diminuição de biomarcadores da inflamação, como proteína C-reativa sérica, fibrinogênio plasmático e taxa de hemossedimentação na maioria dos pacientes que receberam a suplementação com boro. Em outro trabalho que também foi feita a suplementação de boro em pacientes com osteoartrite classificada como leve, moderada e grave, mostrou

melhora na maioria das pessoas (Miljkovi et al., 2009). Depois de oito semanas de suplementação, 80% dos pacientes com osteoartrite leve ou moderada tiveram uso reduzido ou eliminado de analgésico, além de diminuição considerável da rigidez articular, com conseqüente aumento da mobilidade. Pacientes graves, tiveram suplementação com quantidade maior, o que também conferiu melhora em sua condição clínica.

Um dos primeiros estudos, que utilizou ratos machos alimentados com duas dietas, uma isenta e outra suplementada com boro, mostrou que houve diferença da espessura do osso trabecular. Por meio de imagens de microtomografia (micro CT), foi visibilizado que os animais alimentados com dieta isenta de boro, apresentaram espessura trabecular reduzida e aumento de espaço intra-trabecular. A avaliação em micro CT mostrou que o boro é útil para o equilíbrio e microestrutura óssea, porém não é algo indispensável para a estrutura óssea (Nielsen, 1994). A micro CT utiliza os mesmos preceitos que o tomografia computadorizada tradicional, porém gerando imagens em alta definição. Ela é indicada para avaliar características morfométricas ósseas, como uma alternativa complementar a histologia. A micro CT tem como vantagem a análise de área maior que a histologia, tendo mais representatividade devido à extensão da análise. Além disso, trata-se de técnica não destrutiva das amostras, diferentes das demais (Irie et al., 2018).

Seguindo na mesma linha de avaliar os efeitos de dietas com e sem suplementação de boro Gorustovich et al. (2008), fizeram a administração dessas rações após a extração de dentes molares de ratos. Como o passar dos tempos de análises, as mandíbulas dos animais foram avaliadas, na qual foi concluído que nos ratos tratados com dietas deficientes em boro tiveram uma reparação óssea alveolar alterada devido a uma redução acentuada na osteogênese. O estudo pioneiro mostra-se interessante, visto que o osso alveolar é parte importante do osso mandibular e maxilar, participante da estrutura primária de suporte dentário, que inicia sua reparação logo após a extração dentária.

Há alguns anos, o boro ganha destaque ao ser um elemento incorporado ao biovidro 45S5. O boro melhora as propriedades mecânicas dos biovidros, principalmente os fosfatos e sua suscetibilidade à hidrólise pela formação de ligações B-OH na água, que catalisam a bioatividade de seus derivados (Kokubo,

Kim e Kawashita, 2003). Devido à sua baixa durabilidade química, alguns vidros de borato podem se converter mais rapidamente e mais completamente em HA quando imersos em uma solução aquosa de fosfato, como um fluido corporal simulado (Fu et al., 2010). Os vidros de borato são aqueles que não apresentam sílica em sua composição e apresentam um bom substrato que fornece adesão, proliferação e diferenciação celular, tendo até capacidade angiogênica (Bi et al., 2013). Já o biovidro mantendo sua conformação original com sílica, associado ao boro, ainda é pouco relatado (Furlan et al., 2018).

Em um estudo comparativo da taxa de conversão *in vitro* do biovidro em HA, mostrou que os de composição 45S5 tiveram velocidade de conversão completa de 1000 horas, em contrapartida da associação com boro, que se converteram entre 100 e 200 horas. No teste *in vivo*, quando os materiais foram implantados no subcutâneo, foi também visto que os materiais se mostram bons substratos para sustentação celular, oferecendo assim um bom meio para reparação óssea (Fu et al., 2010).

Sabe-se que o biovidro associado ao boro também demonstra bom potencial angiogênico. Durand et al. (2015) fizeram a comparação o biomaterial, com e sem associação, em membrana corioalantóica de embriões de codornas. Ao avaliarem a presença de biomarcadores pra angiogênese, além da vascularização propriamente dita, foi concluído que o biovidro associado ao boro tem uma capacidade pró-angiogênica, visto que as membranas corioalantóicas estavam mais vascularizadas, além da presença dos biomarcadores. Tal fato, deve-se as reações iônicas que o boro causa no local, atraindo fatos pro-angiogênicos, como interleucina 6, VEGF e bFCF. Importante ressaltar que nas análises do biovidro sozinho não foi possível ver aumento da vascularização nas membranas, porém também não retardou a angiogênese local.

Existem poucos trabalhos sobre o uso do biovidro convencional (a base de sílica) associado ao boro. A este respeito, Furlan et al (2018) testaram a formulação do biovidro 45S5 convencional com uma associação ao boro formulado pelo processo sol-gel e sais solúveis em água. O processo sol-gel apresenta vantagem na confecção de biovidro, pois com ele a estrutura, cristalinidade, morfologia, homogeneidade e pureza, conseguem ser mantido ao longo de toda formulação, quando comparado a outros métodos convencionais (Lucacel et al., 2014).

Após a formulação do biovidro a base de boro, Furlan et al (2018) realizaram testes de caracterização e morfologia, que indicasse o sucesso da formulação, usando espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR e DRX) e microscopia eletrônica de varredura, que apresentou resultados excelentes. Ensaio *in vitro* de bioatividade, biodegradação em condições fisiológicas e citotoxicidade também foram realizados, mostrando que os resultados foram semelhantes entre o biovidro convencional e o formulado com boro, sendo proposto que o material confeccionado apresenta segurança para uso *in vivo*.

REFERÊNCIAS

1. Bi L, Rahaman MN, Day DE, Brown Z, Samujh C, Liu X, Mohammadkhah A, Dusevich V, Eick D, Bonewald L (2013) Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model. **Acta biomaterialia**, 9(8):8015-8026.
2. Day RM (2005) Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. **Tissue engineering**, 11(5-6): 768-777.
3. Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, Gabe SM (2004) Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, 25(27):5857-5866.
4. Durand LAH, Vargas GE, Romero NM, Vera-Mesones R, Porto-López J M, Boccaccini AR, Zago MP, Baldi A, Gorustovich, A (2015) Angiogenic effects of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. **Journal of Materials Chemistry B**, 3(6): 1142-1148.
5. Farooq I, Imran Z, Farooq U, Leghari A, Ali H (2012) Bioactive glass: a material for the future. **World J Dent**, 3(2):199-201.
6. Felipe MEM, Andrade PF, Novaes Jr AB, Grisi MF, Souza SL, Taba Jr M, Palioto DB (2009) Potential of bioactive glass particles of different size ranges to affect bone formation in interproximal periodontal defects in dogs. **Journal of periodontology**, 80(5):808-815.
7. Fu Q, Rahaman MN, Fu H, Liu X (2010) Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue

- engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation. **Journal of biomedical materials research part A**, 95(1):164-171.
8. Furlan RG, Correr WR, Russi AFC, da Costa lemma MR, Trovatti E, Pecoraro É (2018) Preparation and characterization of boron-based bioglass by sol-gel process. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 88(1):181-191.
 9. Goldberg VM (1992) Natural history of autografts and allografts. In **Bone implant grafting** Springer, London. 9-12.
 10. Gorustovich AA, Durand LAH, Roether JA, Boccaccini AR (2013) Angiogenic Potential of Bioactive Glasses. In: An introduction to bioceramics. **World Scientific Publishing Company**, 5:87 - 95.
 11. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB (2008) Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. **Anat Rec(Hoboken)** 291:441–7
 12. Handel M, Hammer TR, Noeaid P, Boccaccini AR, Hofer D (2013) 45s5-bioglass®-based 3d-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the cam angiogenesis assay. **Tissue Engineering Part A**, 19(23-24):2703-2712.
 13. Hench LL (2006) The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 17(11):967-978.
 14. Hench LL, Clark AE, Schaake HF (1972) Effects of microstructure on the radiation stability of amorphous semiconductors. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 8:837-843.
 15. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF (2018) Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. **Brazilian dental journal**, 29(3):227-238.
 16. Jones JR (2013) Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, 9(1):4457-4486.
 17. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials** 24:2161–2175.
 18. Lucacel Ciceo R, Trandafir DL, Radu T, Ponta O, Simon V (2014) Synthesis, characterisation and in vitro evaluation of sol-gel derived SiO₂-P₂O₅-CaO-B₂O₃ bioactive system. **Journal of Sol-Gel Science and Technology** 40:9517–9524.

19. Macedo NLD, Matuda FDS, Macedo LGSD, Gonzales MB, Ouchi SM, Carvalho YR (2004) Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. **Journal of Applied Oral Science**, 12(2):137-143.
20. Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A (2015) New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers in Medical Science** 30(4):1225-1230.
21. Moraes PC (2006) **O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio.** Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal
22. Nagata M, Messoria M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A (2009) Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, 45(2):339-345.
23. Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Basu D (2009) The repair of segmental bone defects with porous bioglass: an experimental study in goat. **Research in veterinary science**, 86(1):162-173.
24. Nielsen FH (1994) Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. **Environmental health perspectives**, 102(suppl 7):59-63.
25. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T (1997) Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical orthopaedics and related research**, (334):316-325.
26. Scorei R, Mitrut P, Petrisor I, Scorei I (2011) A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. **Biological trace element research**, 144(1-3):253-263.

27. Soubelet CG, Albano MP, Conconi MS (2018) Sintering, microstructure and hardness of Y-TZP- 64S bioglass ceramics. **Ceramics International** 44:4868–4874.
28. Villaça JH, Novaes Jr AB, Souza SLSD, Taba Jr M, Molina GO, Lamano Carvalho TL (2005) Bioactive glass efficacy in the periodontal healing of intrabony defects in monkeys. **Brazilian dental journal**, 16(1):67-74.
29. Xynos ID, Hukkanen MVJ, Batten JJ, Buttery LD, Hench LL, Polak JM (2000) Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. **Calcified tissue international**, 67(4):321-329.
30. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X (2019) Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. **Acta biomaterialia**, 84:16-33.

CAPÍTULO 2 – Comparação entre o biovidro ativo e o biovidro boro-silicato no reparo ósseo do defeito crítico em calvária de *Rattus norvegicus* (Wistar)

RESUMO

Falhas ósseas de tamanhos críticos geralmente são resultados por exemplo de lesões de alta energia e não uniões, sendo desafio para qualquer cirurgião ortopedista. Frente a esses desafios, muitas vezes são necessários materiais que auxiliem no preenchimento dessas falhas e, ao mesmo tempo, favoreçam o meio para que a reparação óssea ocorra. Desde 1970 vem sendo estudado e aprimorado o biovidro ativo 45S5 que somado a compostos tais como o boro, pode-se incrementar as vantagens para a formação de novo tecido ósseo. O presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a formulação convencional do biovidro ativo com a associação de boro, fabricados pelo Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara UNESP. Foram criados defeitos críticos em calotas cranianas de 32 ratos Wistar, distribuídos em quatro grupos, a saber: CT+: controle positivo (osso autógeno), CT-: controle negativo (defeito vazio/coágulo), BV: biovidro 45S5 e BVBS: biovidro boro-silicato. Foram feitas microtomografias computadorizadas na 6ª e 12ª semanas de pós-operatório, para analisar o processo de reparação óssea. Após eutanásia na 12ª semana, as calotas foram processadas para análises histológicas e histométricas. Ao final das análises histométricas foi possível constatar que em todos os tratamentos, com exceção do CT-, houve crescimento ósseo, sendo os dados do BV e BVBS muito semelhantes, sugerindo que o incremento de boro a formulação clássica pode favorecer a crescimento de novo tecido ósseo.

Palavras-chave: biomaterial, microtomografia e neoformação óssea.

1. INTRODUÇÃO

Falhas ósseas de tamanhos críticos geralmente são resultados de lesões de alta energia, fraturas patológicas, não uniões, falha de implante, neoplasmas,

entre outras causas e são desafios para qualquer cirurgião ortopedista. (Zhang et al., 2018). Com a finalidade de reconstrução falhas ósseas, Heich em 1970 desenvolveu um biovidro a base de sílica que ao entrar em contato com fluidos corporais, se converte em hidroxiapatita (HA) criando estrutura extremamente rígida, capaz de oferecer bom suporte às células ósseas. Sua capacidade vai além disso, haja vista a capacidade de ativação de genes de expressão osteogênicas e de sua ação pró angiogênica (Fu et al., 2010).

O biovidro é geralmente frágil, e sua principal apresentação é na forma de pó, não autossustentável, propriedade que pode ser explorada para o preenchimento de pequenas lesões ósseas, como o uso no aumento ósseo oral, uma vez que esses materiais de preenchimento não estão sujeitos a alta carga mecânica (Furlan et al., 2018). O biovidro ativo cria ligação rápida com o osso desencadeada pelo contato aos fluídos corporais, estimulando o crescimento ósseo da interface osso-implante. A ligação junto ao osso ocorre após a dissolução do vidro, pois forma uma camada de HA. A HA é um material semelhante ao osso, na qual a interação com o colágeno óssea favorece sua integração ao tecido. Além disso, as propriedades osteoindutoras são oriundas da sílica solúvel e íons de cálcio liberados após a dissolução do vidro, que estimulam as células osteogênicas a produzirem matriz óssea (Jones, 2013).

Análises *in vitro* e *in vivo* foram realizados usando biovidro ativo 4S5S, a fim de comprovar sua capacidade osteogênica. Foi comprovado a capacidade de diferenciação osteogênica dos osteoblastos *in vitro* (Xynos et al., 2000) e sua capacidade osteogênica em *in vivo* quando o produto foi introduzido em defeitos ósseos em raios de cabra, na qual em 90 dias a falha estava preenchida (Nandi et al., 2009). Clinicamente o biovidro são utilizados com mais facilidade em cirurgias odontológicas, uma vez que pequenas quantidades do material podem ser utilizadas para realizar o preenchimento alveolar dos defeitos e são encontrados em formulações comerciais, tais como Biogran® e Perioglas® (Felipe et al., 2009; Villaça et al., 2009).

A neovascularização é tida como elemento essencial para reparação de tecidos, devido ao aporte de oxigênio que é conduzido ao leito, bem como nutrientes e fatores de crescimento. Além disso, os novos vasos formam um caminho para que células e precursores inflamatórios cheguem aos tecidos (Gorustovich et al., 2013). Diversos estudos (Day et al., 2004; Day, 2005;

Gorustovich et al., 2010) comprovaram a intensa ação angiogênica do biovidro através da expressão dos fatores de crescimento endotelial vascular (VGEF) e crescimento básico de fibroblastos (bFGF).

Um dos compostos que pode ser associado e melhorar as propriedades do biovidro 45S5 é o boro. É encontrado na estrutura de ossos e dentes, sendo essencial para saúde óssea, visto que faz parte do equilíbrio de absorção de cálcio, magnésio e fósforo (Gazera e Acarb, 2019). Já é sabido de sua ação positiva no tratamento de osteoartrites graves, diminuindo os sinais clínico de pacientes humanos com afecções primárias no joelho (Scorei et al., 2011). Quando suplementados em dietas de ratos, foi visualizado através de microtomografia computadorizada um aumento na espessura do osso trabecular, quando comparado a amostras de ratos que receberam dietas normais (Nielsen, 1994).

O boro pode ser incorporado ao biovidro 45S5, melhorando suas propriedades mecânicas e pode se converter mais rapidamente e mais completamente em HA quando imersos em uma solução aquosa de fosfato, como um fluido corporal simulado (Kokubo, Kim e Kawashita, 2003; Fu et al., 2010). Existem poucos trabalhos sobre o uso do biovidro convencional (a base de sílica) associado ao boro. A este respeito, Furlan et al (2018) testaram a formulação do biovidro 45S5 convencional com uma associação ao boro formulado pelo processo sol-gel e sais solúveis em água. O processo sol-gel apresenta vantagem na confecção de biovidro, pois com ele a estrutura, cristalinidade, morfologia, homogeneidade e pureza, conseguem ser mantido ao longo de toda formulação, quando comparado a outros métodos convencionais (LUCACEL, et al., 2014).

Atualmente, o uso de biomateriais para reparação óssea apresenta grandes avanços dentro da odontologia, visto que poucas quantidades são usadas para preenchimento alveolar. Porém, o custo de produção muitas vezes acaba sendo exorbitante, tornando-se alternativa financeiramente inviável para outras reconstruções. Com isso, torna-se interessante e necessário a comercialização deste material com custo reduzidos, visto que sua formulação é imensamente conhecida e não há impedimentos legais para sua formulação em laboratórios diferentes de sua origem. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo principal a realização de ensaios *in vivo* comparando o

comportamento e o potencial de reparo ósseo do biovidro 45S5 com o biovidro boro-silicato por meio de estudos histopatológicos, estereológicos e avaliação de imagens em microtomografia computadorizada (microCT). Os efeitos serão avaliados em defeitos críticos em calvária de *Rattus norvegicus*, variação Wistar, tratados com os biomateriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O presente estudo foi desenvolvido respeitando os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e com aprovação prévia pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP Jaboticabal-SP com protocolo 4361/2020.

Os animais ficaram alojados no biotério do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da UNESP Câmpus de Jaboticabal em ambiente de temperatura controlada à 24°C. Até o momento da cirurgia, estiveram em gaiolas compartilhadas com maravalha ao fundo, ração peletizada para roedores¹ e água *ad libitum*. Durante o período do pós-operatório, os animais foram alojados separadamente para evitar traumas e mastigação das suturas pelos companheiros, sendo o manejo do ambiente foi mantido igualmente.

Foram utilizados 32 ratos jovens (*Rattus norvegicus*, variação Wistar), machos, com peso médio de 300 g, todos submetidos à criação de defeito crítico de 8 mm de diâmetro na calvária (Spicer et al., 2012). Os defeitos foram tratados de quatro maneiras diferentes, formando os grupos experimentais abaixo, totalizando 8 animais por grupo: CT-: controle positivo (osso autógeno), CT+: controle negativo (defeito vazio- coágulo), BV: biovidro 45S5 e BVBS: biovidro boro-silicato

Em cada grupo, foram escolhidos aleatoriamente dois animais, um na 6^a e outro na 12^a semana, na qual as amostras coletadas (calotas cranianas) foram destinadas à análise de microtomografia computadorizada. Os demais seis

¹ Agromix Tosi

animais foram destinados à coleta de amostras para as análises histopatológicas.

2.2 Biomateriais

Os biomateriais biovidro e biovidro boro-silicato foram desenvolvidos e produzidos pelo Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese da Faculdade de Odontologia de Araraquara-FOAr-UNESP. Ambos os materiais foram usados em forma de pó e, antes de serem colocados para preencher os defeitos críticos, foram esterilizados em autoclave de baixo ciclo. Para a fabricação das biocerâmicas avaliadas neste projeto, de acordo com o proposto por Furlan, et al. (2018), porém com a substituição do NaCl na composição geral.

O método convencional para a síntese do biovidro utiliza como precursor da sílica o tetraetilortossilicato-[TEOS; $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$]. Neste projeto foi utilizada a sílica coloidal (Levasil, Nouryon, EUA) como fonte de sílica por possuir menor toxicidade do que o TEOS e com custo muito reduzido, favorecendo a escala de síntese desse material. Outros reagentes utilizados foram o nitrato de cálcio tetrahidratado-[$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], o nitrato de sódio (NaNO_3) e como fonte de fosfato o trietil fosfato-(TEP; Sigma-Aldrich) e como catalisador da reação foi utilizado hidróxido de amônio (NH_4OH , PA).

A solução foi alcalinizada com o hidróxido de amônio. Em seguida foi adicionada a solução contendo sílica coloidal a 30% em massa, até atingir a quantidade proporcional da Quadro 1. Posteriormente, foi adicionado gota a gota o trietil fosfato (TEP), o pó de nitrato de sódio e nitrato de cálcio, nas proporções da Quadro 1. A solução foi agitada por cerca de 2 horas. Após a preparação, a solução foi envelhecida a 60°C por 12 horas, seca em 120°C por 12 horas, tratamento térmico a 700°C por 3 horas de patamar com taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹.

Para confecção do biovidro boro-silicato, foi utilizada a mesma composição do biovidro (45S5) contudo foi adicionado 2,5% em massa de ácido bórico.

Quadro 1: Proporção entre os componentes para a formação do biovidro.

Componente	Calculado como	Porcentagem em mol (%)	Porcentagem em massa (%)
Sílica coloidal a 30%	SiO ₂	45	41,93
Óxido de sódio	Na ₂ O	24,5	23,55
Óxido de cálcio	CaO	24,5	21,31
Óxido de fósforo	P ₂ O ₅	6	13,21

2.3 Procedimentos Anestésicos e Cirúrgicos

O protocolo anestésico utilizado foi com aplicação de cetamina² 10% (40 mg³/kg⁴ IP⁵), xilazina⁶ 2% (5 mg/kg IP), acepromazina⁷ 1% (1,5 mg/kg IP). Foi utilizado morfina⁸ 1% (1 mg/kg IM⁹), na qual metade do volume foi feito antes do procedimento e a outra metade ao término, garantindo assim um bom controle analgésico. Foi aplicado 0,5 mL de lidocaína¹⁰ 1% sem vasoconstritor no local da incisão. Ato contínuo, após ampla tricotomia da região craniana, foi realizada antisepsia prévia e definitiva seguida de preparo do campo operatório. Realizada incisão linear de 2 cm da região interorbital dorsal até a região occipital, com lâmina de bisturi nº 15. Para confecção do defeito crítico, foi usado um motor Ômega de Implante STd (Dentscler, Ribeirão Preto – SP) associado a caneta de contra-ângulo na qual é acoplada a trefina. Foi criado defeito ósseo crítico de 08 mm de diâmetro, utilizando-se broca trefina de 08 mm de diâmetro com 1800 rpm (Härte precision grip, Baueri - SP), com o cuidado de se manter a integridade da dura-máter. Durante a perfuração, o local foi irrigado

² Cetamina Syntec

³ miligrama

⁴ quilograma

⁵ Intraperitoneal

⁶ Xilazina Syntec

⁷ Acepromazina Syntec

⁸ Dimorf Cristália

⁹ intramuscular

¹⁰ Xilestesin® Cristália

abundantemente com solução cloreto de sódio estéril à 0,9%. O protocolo para a criação do defeito foi seguido o proposto por Spicer et al. (2012).

Realizadas as perfurações, a porção óssea delimitada pelo diâmetro da trefina foi retirada com elevador de periósteo. O defeito ósseo foi preenchido de acordo com o grupo experimental (Figura 1). O osso retirado do defeito correspondente ao controle positivo (osso autógeno), foi utilizado, após trituração com goiva. Após o preenchimento dos defeitos ósseos o subcutâneo e a pele foram suturados, ambos com fio monofilamentar inabsorvível 4-0¹¹ (nylon).

Ao término da cirurgia, foi administrada pela via subcutânea solução salina estéril na dose 10 mL/kg/hora de procedimento e 0,2 mL de penicilina G benzatina¹² IM. Imediatamente após o procedimento e durante três dias consecutivos, todos os animais receberam morfina na dose de 1 mg/kg, por via subcutânea, a cada oito horas. Os animais foram observados diariamente até o momento da eutanásia, a fim de verificar suas condições clínicas, além de qualquer reação tecidual na ferida cirúrgica. O nível de consciência e alterações neurológicas foram observados.

¹¹ Mononylon Ethicon

¹² Bepeben Teuto

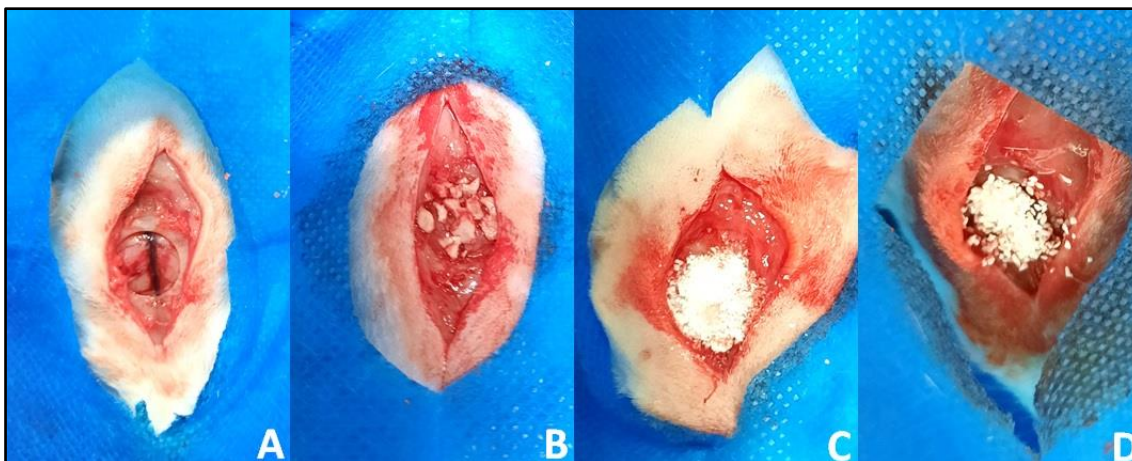


Figura 1: Grupos experimentais. A: CT-: controle negativo (defeito vazio-coágulo). B: CT+: controle positivo (osso autógeno). C: BV: biovidro 45S5. D: BVBS: biovidro boro-silicato. Jaboticabal, 2021.

Ao final da 6^a semana (um animal escolhido aleatoriamente de cada grupo) e na 12^a semana (demais animais) foi realizada a eutanásia. O procedimento foi realizado com indução anestésica com o mesmo protocolo anestésico cirúrgico, seguido de injeção intracardíaca de cloreto de potássio¹³ 10% 1ml/kg. Foi feita nova tricotomia da região do crânio. Para evitar que a área do defeito fosse lesionada, uma incisão em formato de V foi feita e a pele rebatida. A calvária foi removida com serra oscilatória e todos os tecidos moles presentes foram retirados de maneira cuidadosa para obtenção de fragmento ósseo contendo o defeito com uma margem de segurança. As amostras dos defeitos foram imersos em solução fixadora por 48 horas de paraformaldeído¹⁴ 4% em tampão fosfato. Em seguidas foram descalcificadas em EDTA¹⁵ 10%, sendo a solução trocada a cada 48 horas durante 20 dias, seguindo para emblocamento em parafina¹⁶ das análises histológicas. As amostras que foram encaminhadas para a micro CT ficaram somente no paraformaldeído 4% e antes do procedimento foram acondicionadas em álcool 70%.

¹³ Isofarma

¹⁴ Paraformaldeído PA Exôdo Científica

¹⁵ EDTA sal dissódico PA Synth

¹⁶ Parafina histológica Exôdo Científica

2.4 Microtomografia Computadorizada (micro CT)

Como proposto por Patel et al. (2008) e Kallai et al. (2011) foram feitas imagens de micro CT para avaliação quantitativa das áreas de defeito crítico, quanto a presença ou não de reparo ósseo.

As análises de micro CT foram feitas no microtomógrafo Skyscan 1176, Aatselaar, Bélgica, 2003 (Processo 2009/54080-0 FAPESP - Programa Equipamentos Multiusuários 3) no laboratório de Microtomografia *in vivo* da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP. Após a extração das imagens 2D e 3D, toda a área do defeito foi analisada, na qual a extensão de recobrindo pela ponte óssea que sinaliza a formação de reparo ósseo foi quantificado de acordo com o proposto por Patel et al. (2008).

Para obtenção das imagens com diferentes parâmetros de uso da micro CT, as imagens foram reconstruídas usando o software NRecon (SkyScan, 2011; versão 1.6.6.0), orientadas e padronizadas de acordo com três planos (transversal, longitudinal e sagital) por meio do software Data Viewew (SkyScan, versão 1.4.4 64-bit). Em seguida, utilizando o software CTAnalyser-CTAn (2003-11SkyScan, 2012 Bruker MicroCT Versão 1.12.4.0) foram determinadas duas regiões de interesse (ROIs) utilizando as imagens 2D no sentido transaxial. Após a delimitação das ROIs em imagens 2D, a análise do volume óssea foi realizada nas imagens em 3D, pela soma coletiva de todos os ROIs, onde foi obtida o percentual de volume do tecido ósseo presente em cada área delimitada previamente.

2.5 Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica

Todas as análises laboratoriais foram feitas na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/ USP. Os blocos de parafina foram cortados em corte semi seriados de 6 um de espessura percorrendo toda calvária, e corados em hematoxilina-eosina, tricrômico de masson e PicroSirus para quantificação da neoformação óssea e quantificação de fibras colágenas do tipo I e III. As leituras foram feitas por meio do microscópio óptico Axiolmager Z2 (Zeiss, Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss) do mesmo microscópio dotado de “Z motorizado”, permitindo a análise qualitativa e quantitativa do tecido em profundidade.

2.6 Quantificação do volume ósseo neoformado

A quantificação de neoformação óssea (um^3) foi feita por microscópio óptico AxioImager Z2 (Zeiss Germany) acoplado a uma câmera digital (Zeiss), por métodos de estereologia. Os cortes foram analisados na objetiva de 10X com o uso do mesmo microscópio dotado de “Z motorizado”. Para esta quantificação, foi utilizado o software estereológico SterioInvestigator (MBF, USA) através da somatória de pontos do sistema teste sobre a área de tecido ósseo neoformado demarcado como proposto por Issa et al. (2016) e Gonzaga et al. (2019).

2.7 Análise de densitometria óptica das fibras colágenas tipo I e III

As lâminas coradas com coloração de Picrosirius Red, permite observar as fibras colágenas por meio de sua birrefringência no microscópio com luz polarizada, que capta as fibras do tipo I com a cor vermelha/alaranjada e as do tipo III na cor verde/amarelada (Cury et al., 2016). Todas as lâminas foram fotografadas e analisadas no programa *image J*, quanto à área total de colágeno. A área foi expressa pela razão da área de colágeno pela área total e apresentada em porcentagem de área.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos nas diferentes análises, e nos diferentes períodos experimentais, foram comparados estatisticamente (2-way ANOVA, Bonferroni's test - $p \leq 0.05$) após verificação de normalidade da amostragem (Levene's test), com auxílio do programa OriginPro 8 SRO (OriginLab Corp., Northampton, MA, EUA).

3. RESULTADOS

3.1 Avaliação clínico-cirúrgica

Os ratos foram inspecionados diariamente até os tempos de eutanásia. Durante todo o período não houve diminuição da ingestão hídrica e alimentar e todos os animais ganharam peso. No pós-operatório imediato nenhum animal apresentou sinal neurológico e a analgesia proposta pelo protocolo se fez suficiente pois, ao término da medicação, os animais estavam ativos e apresentando o mesmo comportamento anterior. Em relação à ferida cirúrgica,

somente dois ratos do grupo BVBS apresentaram reação um pouco mais exacerbada que os demais, apresentando um ponto de deiscência a partir do quarto dia de pós-operatório; porém não houve sinal de abertura total da ferida cirúrgica ao final do décimo dia de pós-operatório a ferida já estava em bom estado de reparação tecidual.

No momento da eutanásia, macroscopicamente, foi possível observar o local do defeito crítico na 12^a semana, sem presença de edema ou sinais que indicassem infecção.

3.2 Microtomografia computadorizada (micro CT)

Após a captura das imagens, estas foram reconstruídas em três dimensões, para melhor avaliação da formação de ponte óssea. Na figura 2, a formação de ponte óssea pode ser evidenciada com mais clareza no grupo C+. Nos grupos BV e BVBS há neoformação óssea discreta ao longo de todo defeito crítico. Quando comparado ao proposto por Patel et al. (2008), o grupo C- teve escore 0 na qual não houve formação óssea no defeito crítico, os grupos BV e BVBS foram classificados em escore 1, onde foram observadas poucas espículas ósseas dispersas ao longo do defeito, e o grupo C+ teve como escore 4, caracterizado por ponte óssea que recobre toda extensão do defeito.

Os valores das razões entre volume ósseo (VO) e volume total (VT) foram mais evidentes no grupo C+, na qual na 6^a semana a razão VO/VT foi de 33,7% e na 12^a 29,7%. Os grupos BV e BVBS tiveram como VO/VT na 6^a semana 4,14% e 4,35% respectivamente, e na 12^a semana 4,35% e 1,77%. O grupo C- teve como razão 9,32% na 6^a semana e 0% na 12^a semana.

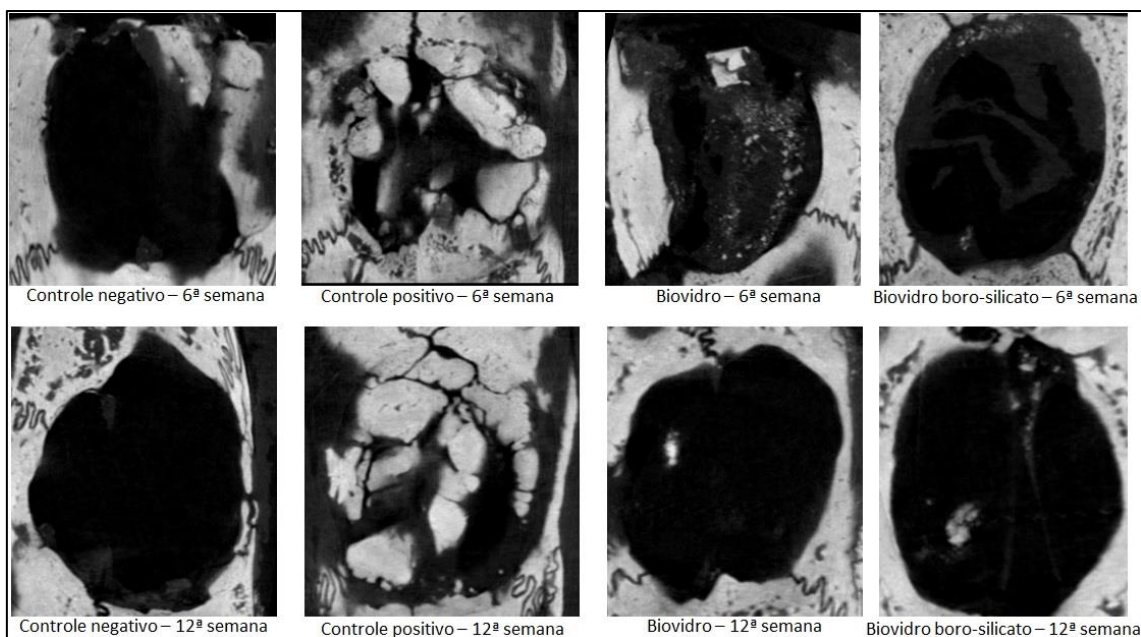


Figura 2: Exame microtomográfico dos grupos controle positivo, controle negativo, biovidro e biovidro boro-silicato. Importante ressaltar que a área em preto representa o defeito crítico e dentro dele o tecido ósseo neoformado (mais evidente nas imagens do controle positivo). Jaboticabal, 2021.

3.3 Avaliação Histopatológica

3.3.1 Tricrômico de Masson

A neoformação óssea pode visibilizada nas lâminas com coloração azul clara, coloração escura mostra o osso maduro sinalizando as bordas dos defeitos. Na figura 3 são apresentados quatro fotomiografias com a coloração Tricrômico de Masson no aumento de 10x.

No grupo C+ (osso autógeno) verifica-se maior intensidade de azul (Figura 3B) evidenciando boa concentração de fibras colágenas entremeadas às fibras elásticas (coloração negra). No grupo BV (Figura 3C) podemos visibilizar coloração azul clara provavelmente devido a menor proporção de fibras colágenas na área de defeito ósseo.

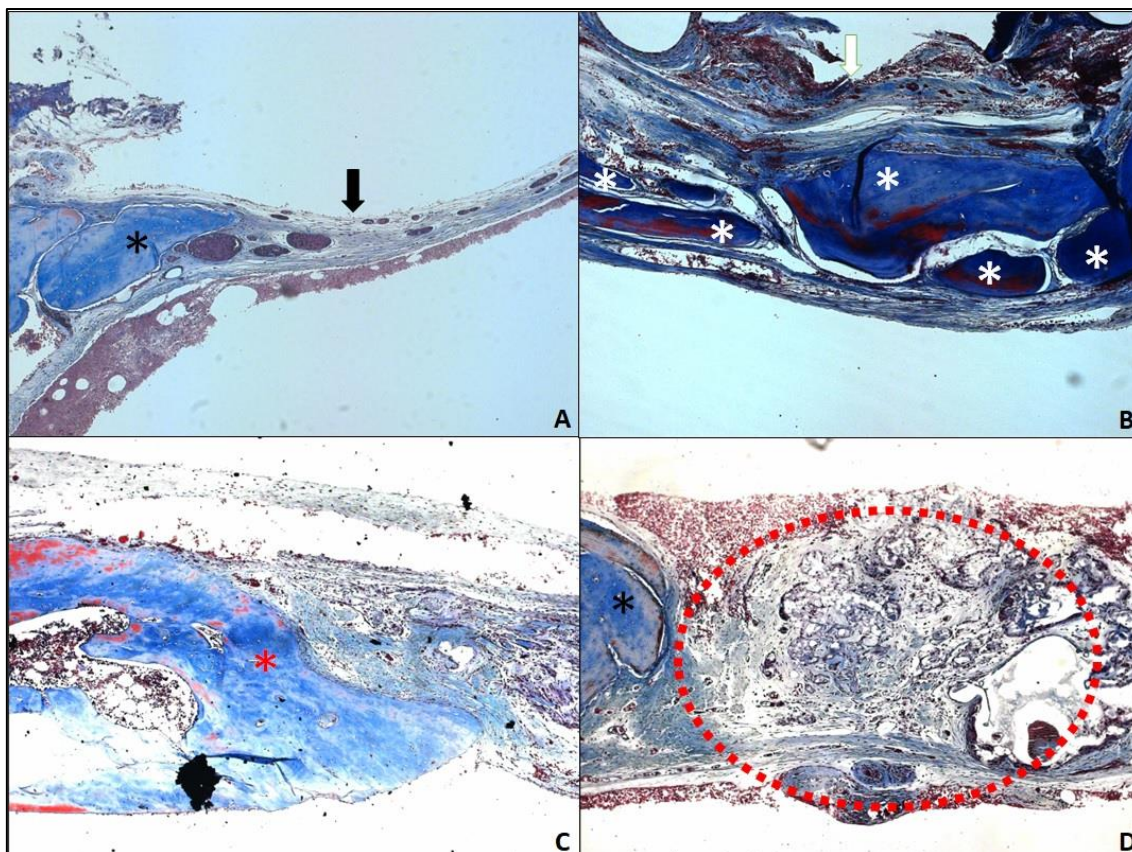


Figura 3: Fotomicrografias em 10X dos cortes histológicos das lâminas das calvárias de ratos Wistar, com defeito crítico. A: controle negativo; o asterisco preto evidencia a borda do defeito (crânio) e na flecha preta a área do defeito preenchida por tecido fibroso. B: controle positivo, na qual o asterisco branco sinaliza a área de neoformação óssea (azul escuro). C: biovidro, na qual o asterisco vermelho mostra a área óssea formada. D: biovidro boro-sicato, onde o asterisco preto sinalizada a borda do defeito e o pontilhado vermelho um entremeado de tecido fibroso, colágeno e osso neoformado. Jaboticabal, 2021.

3.3.2 Picrosirius

Para análise com a coloração de Picrosirius foi evidente a presença de fibras colágenas do tipo I, que sinaliza a formação de colágeno maduro, como mostrado na figura 4.

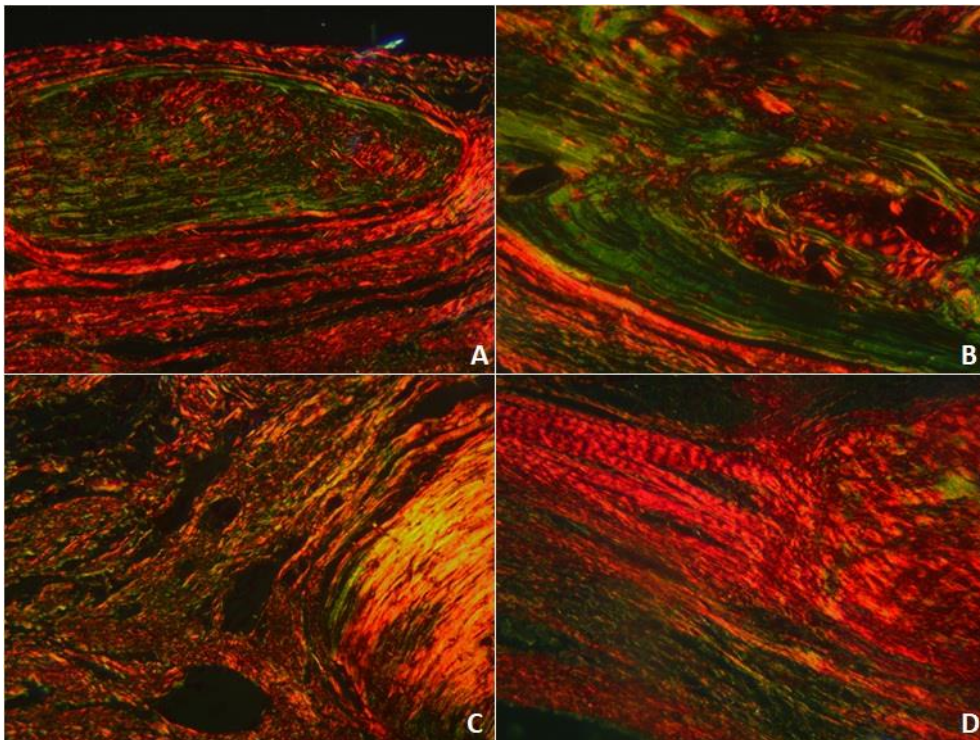


Figura 4: Fotomicrografia em 20x das lâminas para coloração de Picrosírius, para a visualização das fibras colágenas Tipo I (laranja-vermelho) e Tipo III (amarelo-verde). A: controle negativo. B: controle positivo. C: biovidro. D: biovidro boro-silicato. Jaboticabal, 2021.

3.4 Análise Estatística

3.4.1 Volume ósseo neoformado

Após o teste de Kruskal-Wallis, o teste de comparação múltipla indicou que, com exceção da comparação C+ x BV, todos os outros grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si. Todos os grupos tiveram seus valores divididos pela mediana do controle referente a repetição.

Através do gráfico *box plot* (figura 5) pode observar que, estatisticamente, todos os grupos tiveram valores de neoformação, porém o grupo BVBS apresentou dados mais homogêneos e mediana acima da média.

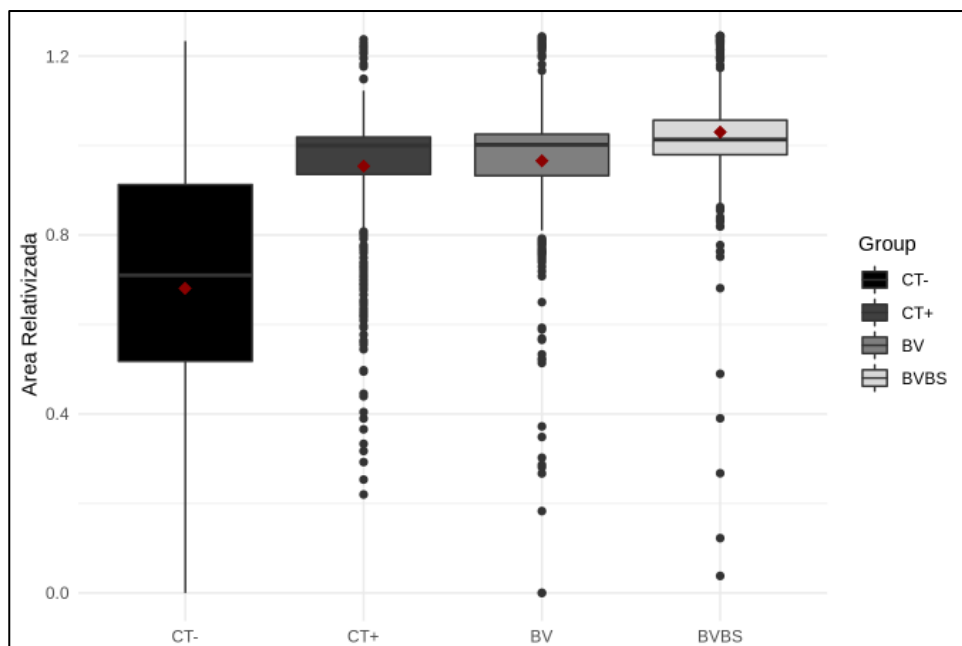


Figura 5: Gráfico do tipo boxplot apresentando as medianas, amplitude e outliers de cada tratamento para quantificação de volume ósseo. Jaboticabal, 2021.

3.4.2 Picrosirius

Após verificação da normalidade da distribuição, a análise de variância indicou diferença significativa para a variável fixa grupo. Dessa maneira, o teste de comparação múltipla Tukey HSD foi aplicado. O resultado indicou que os grupos com maior diferença entre si foram os grupos BV e BVBS, enquanto que a comparação entre os grupos C- e C+ não teve diferença significativa.

Como observado na análise anterior, pelo do gráfico *box plot* (figura 6) o grupo BVBS também apresentou dados mais homogêneos.

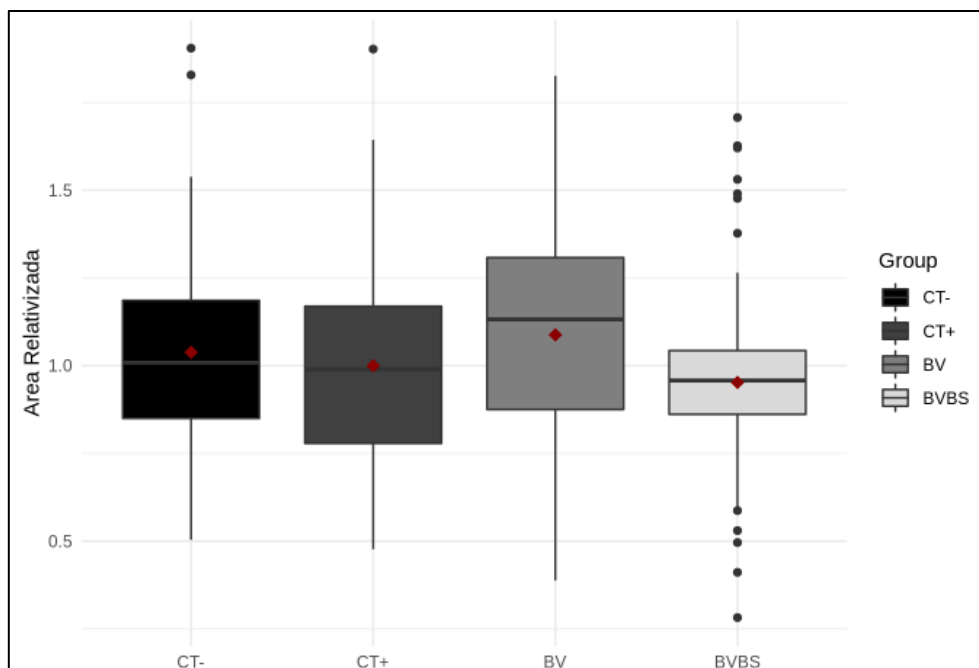


Figura 6: Gráfico do tipo boxplot apresentando as medianas, amplitude e outliers de cada tratamento para quantificação de fibras colágenas. Jaboticabal, 2021.

4. DISCUSSÃO

Falhas ósseas são rotineiras na prática clínica e são desafios para qualquer cirurgião responsável pela sua reconstrução. É crescente o uso de materiais, tais como as biocerâmicas, que auxiliam na reparação óssea, uma vez que é sabido que muitas das vezes, o uso de enxerto autógeno é inviável dado as complicações inerentes ao procedimento. Por este motivo, o presente trabalho objetivou comparar o biovidro 45S5 com o biovidro boro-silicato, formulação proposta por Furlan et al. 2018. A hipótese era que, com a incorporação do boro na composição original de Hench, haveria melhores condições para osteogênese e angiogênese no leito ósseo que biomaterial fosse incorporado. O boro é um elemento que, além de ser angiogênico e possuir a capacidade de ativar citocinas pró-inflamatórias, pode fornecer meios para osteogênese, uma vez que, quando incorporado a dieta terapêuticas de cobaias por exemplo, o osso trabeculado foi encontrado em maior espessura do que nas de dietas convencionais (Nielsen, 1994).

Por meio da quantificação de volume ósseo, foi possível visualizar dados mais homogêneos encontrados nas amostras do controle positivo e biovidro

boro-silicato, quando comparado aos demais tratamentos. Isso pode ser endossado pelas formulações propostas por Furlan et al. (2018) e, recentemente, por Yusof et al. (2022) uma vez que elas foram capazes de estimular a deposição de hidroxiapatita na superfície, propriedade ímpar para osteointegração no processo de reparação óssea, pois além de fazer parte da composição dos ossos, facilita a mineralização e adsorção de proteínas no tecido ósseo. Quando as amostras do BVBS das do biovidro 45S5 são comparadas, é possível ver dados semelhantes, o que corrobora a premissa que a formulação incorporada de boro é capaz de incrementar a formação tecido ósseo.

O colágeno faz parte da matriz óssea não mineralizada, sendo insubstituível para reparação óssea; durante as fases de regeneração, os osteoblastos sintetizam o colágeno tipo III, que é substituído pelo tipo I, tido como fibras maduras (Carlos et al., 2019). Por esse motivo, tal análise foi feita no presente estudo, na qual a comparação entre o BV e BVBS demonstraram diferença significativa. A análise por polarização pode variar dependendo do modelo de microscópio e potência da lâmpada utilizada e, por esse motivo, foi feito quantificação total das fibras e não análises separadas nas fibras colágenas tipo I e III. Porém, macroscopicamente, foi possível visualizar a predominância das fibras do tipo I, ou seja, as maduras, em todos os cortes histológicos. Análises isoladas do biovidro 45S5 em experimentos utilizando defeitos críticos (Magri et al., 2019; Benetti et al., 2020; Souza et al., 2020) demonstraram a presença de colágeno tipo I nas amostras, fato este evidenciado também no presente trabalho, em que a comparação do biomaterial convencional com o adicionado boro, evidenciou aspectos semelhantes quanto à esta análise, sendo o BVBS capaz de oferecer substrato para neoformação óssea.

Por meio da microtomografia computadorizada, foi possível confirmar que, após 12 semanas de pós-operatório, nas amostras do controle negativo não foi identificada neoformação óssea, o que confirma a criação de defeito crítico no presente estudo, com tamanho de 8 mm de diâmetro, como proposto por Spicer et al. (2012). É indiscutível que o uso de qualquer enxerto ósseo autógeno é superior a qualquer material usado como substituto ósseo (Myeroff et al., 2011). Tal fato pode ser visualizado nas imagens de microtomografia computadorizada, que trouxeram maior volume ósseo formado no total da área do defeito crítico

nas amostras do controle positivo, grupo onde o defeito fora preenchido com o osso triturado da própria calota craniana do rato.

Os trabalhos que utilizam a microCT para avaliação da capacidade osteogênica do BV (Atwood et al., 2004; Leu et al., 2009; de Souza et al., 2020) mostram neoformação de tecido ósseo por área avaliada superior a 50%, o que não foi visto neste trabalho. Acredita-se que não há dados para avaliação isolada do BVBS quanto ao reparo de defeitos críticos, porém, além dessa limitação, sugere-se que o uso de animais diferentes para os tempos de análises bem como suas escolhas ao acaso, podem ter favorecido essa quantificação tão aquém do esperado, o que difere dos demais dados encontrados pelos autores acima citados,

Para um biomaterial ser usado com segurança, ele precisa ser submetido a testes de citotoxicidade. A incorporação do boro na formação do biovidro 45S5 mostra-se segura ao seu uso neste quesito, o que foi confirmado por alguns autores, tais como Balasubramanian et al., (2016), Gunduz et al., (2012) e Yusof et al. (2022). A fabricação das biocerâmicas testadas neste projeto, seguiu o proposto por Furlan, et al. (2018), porém com a substituição do NaCl na composição geral. O NaCl ao ser aquecido, se torna uma massa densa e, ao entrar em contato com soluções fluídas, começa a dissolver, alterando a osmolaridade local. No teste de citotoxicidade feito por Furlan et al. (2018), os compostos mostraram-se ligeiramente mais citotóxicos, o que pode ser acarretado pelo acúmulo do sal nos tecidos. Desta maneira, foi proposta uma confecção dos biomateriais de maneira que o NaCl não entrasse na formulação geral, visto que, rotineiramente, ele não faz parte das composições, porém mantém a mesma estrutura já citada.

Na avaliação macroscópica, somente dois animais que receberam o BVBS apresentaram reação inflamatória mais exuberante que os demais do mesmo grupo e dos demais. Acredita-se que o boro pode levar à reação local mais intensa, principalmente quando comparado ao BV isolado, o que também foi observado por Garrett et al. (2016) que ao alojarem implantes impregnados por boro na musculatura de cobaias, observaram intensa reação inflamatória quando comparado ao grupo controle. Garrett et al. (2016) sugere que o elemento boro faz uma reação local mais exacerbada ao liberar fatores e citocinas inflamatórias que favorecem a osteogênese. Nenhum material usado

para os tratamentos dos grupos, em contato com o tecido nervoso, causou alteração clínica nos animais, bem como a técnica cirúrgica executada, corroborando os trabalhos de Atwood, et al. (2004), De Souza et al. (2020), Leu et al. (2009) e Spicer et al. (2012).

Alguns fatores podem ser considerados como limitantes no presente trabalho, como o uso de microtomografia *ex-vivo* em animais diferentes na sexta e na décima segunda semana. A falta de trabalhos com testes *in vivo* da incorporação do boro à formulação clássica do biovidro, limitam a comparação dos resultados obtido na presente pesquisa. Além disso, é importante considerar que o defeito da calvária serve como modelo para formação de osso intramembranoso e, portanto, pode ser menos aplicável aos biomateriais ou estratégias de formação de osso endocondral (Spicer et al., 2012) e, desta maneira, este BVBS pode ser aplicável principalmente para adjuvante no tratamento de fraturas em ossos chatos, como crânio e pelve.

5. CONCLUSÃO

Nas condições em que a presente pesquisa fora conduzida, conclui-se que houve formação de tecido ósseo e fibras colágenas em todos os tratamentos, com exceção do controle negativo.

A incorporação de boro na ao biovidro 45S5 proposta por Furlan et al. (2018) apresentou resultados satisfatórios quanto à osteogênese, podendo ser utilizado como precursor de células ósseas. Além disso, o uso de outros meios como formação de peletes ou gel por exemplo, pode favorecer ainda mais a neoformação óssea observado pelo biovidro boro-silicato observado neste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. Atwood RC, Jones JR, Lee PD, Hench LL (2004). Analysis of pore interconnectivity in bioactive glass foams using X-ray microtomography. **Scripta Materialia**, 51(11):1029-1033.
2. Balasubramanian P, Grünwald A, Detsch R, Hupa L, Jokic B, Tallia F, Solanki AN, Jones JR, Boccaccini AR (2016) Ion release, hydroxyapatite conversion,

- and cytotoxicity of boron-containing bioactive glass scaffolds. **International Journal of Applied Glass Science**, 7(2):206-215.
3. Benetti F, Bueno CRE, Reis-Prado AHD, Souza MT, Goto J, Camargo JMPD, Duarte MAH, Dezan-Júnior E, Zanotto ED, Cintra, LTA (2020) Biocompatibility, biomineralization, and maturation of collagen by rtr®, bioglass and dm bone® materials. **Brazilian dental journal**, 31:477-484.
 4. Bi L, Rahaman MN, Day DE, Brown Z, Samujh C, Liu X, Mohammadkhah A, Dusevich V, Eick D, Bonewald L (2013) Effect of bioactive borate glass microstructure on bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in a rat calvarial defect model. **Acta biomaterialia**, 9(8):8015-8026.
 5. Carlos BL, Yamanaka JS, Yanagihara GR, Macedo AP, Watanabe PCA, Issa JPM, Herculano RD, Shimano AC (2019) Effects of latex membrane on guided regeneration of long bones. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, 30(14), 1291-1307.
 6. Cury DP, Dias FJ, Miglino MA, Watanabe IS (2016) Structural and ultrastructural characteristics of bone-tendon junction of the calcaneal tendon of adult and elderly wistar rats. *PLoS One*, 11(4):e0153568.
 7. Danieletto-Zanna CF, Bizelli VF, Ramires GADA, Francatti TM, Carvalho PSPD, Bassi APF (2020) Osteopromotion Capacity of Bovine Cortical Membranes in Critical Defects of Rat Calvaria: Histological and Immunohistochemical **Analysis. International journal of biomaterials**, 2020.
 8. Day RM (2005) Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. **Tissue engineering**, 11(5-6): 768-777.
 9. Day RM, Boccaccini AR, Shurey S, Roether JA, Forbes A, Hench LL, Gabe SM (2004) Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds. **Biomaterials**, 25(27):5857-5866.
 10. de Souza LP, Lopes JH, Ferreira FV, Martin RA, Bertran CA, Camilli JA (2020) Evaluation of effectiveness of 45S5 bioglass doped with niobium for repairing critical-sized bone defect in in vitro and in vivo models. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, 108(3):446-457.
 11. Durand LAH, Vargas GE, Romero NM, Vera-Mesones R, Porto-López J M, Boccaccini AR, Zago MP, Baldi A, Gorustovich, A (2015) Angiogenic effects

- of ionic dissolution products released from a boron-doped 45S5 bioactive glass. **Journal of Materials Chemistry B**, 3(6): 1142-1148.
12. Farooq I, Imran Z, Farooq U, Leghari A, Ali H (2012) Bioactive glass: a material for the future. **World J Dent**, 3(2):199-201.
 13. Felipe MEM, Andrade PF, Novaes Jr AB, Grisi MF, Souza SL, Taba Jr M, Palioto DB (2009) Potential of bioactive glass particles of different size ranges to affect bone formation in interproximal periodontal defects in dogs. **Journal of periodontology**, 80(5):808-815.
 14. Fu Q, Rahaman MN, Fu H, Liu X (2010) Silicate, borosilicate, and borate bioactive glass scaffolds with controllable degradation rate for bone tissue engineering applications. I. Preparation and in vitro degradation. **Journal of biomedical materials research part A**, 95(1):164-171.
 15. Furlan RG, Correr WR, Russi AFC, da Costa lemma MR, Trovatti E, Pecoraro É (2018) Preparation and characterization of boron-based bioglass by sol-gel process. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, 88(1):181-191.
 16. Goldberg VM (1992) Natural history of autografts and allografts. In **Bone implant grafting** Springer, London. 9-12.
 17. Garrett DJ, Saunders AL, McGowan C, Specks J, Ganesan K, Meffin H, Williams DAX, Nayagam DA (2016) In vivo biocompatibility of boron doped and nitrogen included conductive-diamond for use in medical implants. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 104(1):19-26.
 18. Gonzaga MG, dos Santos Kotake BG, de Figueiredo FAT, Feldman S, Ervolino E, dos Santos MCG, Issa JPM (2019) Effectiveness of rhBMP-2 association to autogenous, allogeneic, and heterologous bone grafts. **Microscopy Research and Technique**, 82(6):89-695.
 19. Gorustovich AA, Durand LAH, Roether JA, Boccaccini AR (2013) Angiogenic Potential of Bioactive Glasses. In: An introduction to bioceramics. **World Scientific Publishing Company**, 5:87 - 95.
 20. Gorustovich AA, Roether JA, Boccaccini AR (2010) Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, 16(2):199-207.

21. Gorustovich AA, Steimetz T, Nielsen FH, Guglielmotti MB (2008) Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet. **Anat Rec(Hoboken)** 291:441–7
22. Gunduz O, Ahmad Z, Salman S, Inan AT, Ekren N, Agathopoulos S, Oktar FN (2012) Sintering effect on boron based bioglass doped composites of bovine hydroxyapatite. In **Advanced Materials Research** (Vol. 445, pp. 982-987). Trans Tech Publications Ltd.
23. Handel M, Hammer TR, Noeaid P, Boccaccini AR, Hoefler D (2013) 45s5-bioglass®-based 3d-scaffolds seeded with human adipose tissue-derived stem cells induce in vivo vascularization in the cam angiogenesis assay. **Tissue Engineering Part A**, 19(23-24):2703-2712.
24. Hench LL (2006) The story of Bioglass®. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 17(11):967-978.
25. Hench LL, Clark AE, Schaake HF (1972) Effects of microstructure on the radiation stability of amorphous semiconductors. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 8:837-843.
26. Irie MS, Rabelo GD, Spin-Neto R, Dechichi P, Borges JS, Soares PBF (2018) Use of micro-computed tomography for bone evaluation in dentistry. **Brazilian dental journal**, 29(3):227-238.
27. Issa JP, Gonzaga M, Kotake BG, de Lucia C, Ervolino E, Iyomasa M (2016) Bone repair of critical size defects treated with autogenic, allogenic, or xenogenic bone grafts alone or in combination with rh BMP-2. **Clinical Oral Implants Research**, 27(5):558-566.
28. Jones JR (2013) Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. **Acta biomaterialia**, 9(1):4457-4486.
29. Kallai I, Mizrahi O, Tawackoli W, Gazit Z, Pelled G, Gazit D (2011) Microcomputed tomography-based structural analysis of various bone tissue regeneration models. **Nature Protocols**, 6(1):105.
30. Kokubo T, Kim HM, Kawashita M (2003) Novel bioactive materials with different mechanical properties. **Biomaterials** 24:2161–2175.
31. Leu A, Stieger SM, Dayton P, Ferrara KW, Leach JK (2009) Angiogenic response to bioactive glass promotes bone healing in an irradiated calvarial defect. **Tissue Engineering Part A**, 15(4):877-885.

32. Lucacel Ciceo R, Trandafir DL, Radu T, Ponta O, Simon V (2014) Synthesis, characterisation and in vitro evaluation of sol-gel derived SiO₂-P₂O₅-CaO-B₂O₃ bioactive system. **Journal of Sol-Gel Science and Technology** 40:9517–9524.
33. Macedo NLD, Matuda FDS, Macedo LGSD, Gonzales MB, Ouchi SM, Carvalho YR (2004) Bone defect regeneration with bioactive glass implantation in rats. **Journal of Applied Oral Science**, 12(2):137-143.
34. Magri AMP, Fernandes KR, Kido HW, Fernandes GS, Fermino SDS, Gabbai-Armelin P R., Braga FJC, Góes CP, Prado JLS, Granito RN, Rennó ACM(2019) Bioglass/PLGA associated to photobiomodulation: effects on the healing process in an experimental model of calvarial bone defect. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 30(9):1-14.
35. Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A (2015) New LLLT protocol to speed up the bone healing process—histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. **Lasers in Medical Science** 30(4):1225-1230.
36. Moraes PC (2006) **O uso do ultra-som pulsado de baixa intensidade em falhas ósseas produzidas experimentalmente em rádio de coelhos, preenchidas ou não com cimento de fosfato de cálcio.** Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista, Campus Jaboticabal.
37. Myeroff C, Archdeacon M (2011). Autogenous bone graft: donor sites and techniques. **JBJS**, 93(23):2227-2236.
38. Nagata M, Messoria M, Okamoto R, Campos N, Pola N, Esper L, Sbrana M, Fucini S, Garcia V, Bosco A (2009) Influence of the proportion of particulate autogenous bone graft/platelet-rich plasma on bone healing in critical-size defects: an immunohistochemical analysis in rat calvaria. **Bone**, 45(2):339-345.
39. Nandi SK, Kundu B, Datta S, De DK, Basu D (2009) The repair of segmental bone defects with porous bioglass: an experimental study in goat. **Research in veterinary science**, 86(1):162-173.
40. Nielsen FH (1994) Biochemical and physiologic consequences of boron deprivation in humans. **Environmental health perspectives**, 102(suppl 7):59-63.

41. Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugihara T (1997) Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical orthopaedics and related research**, (334):316-325.
42. Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG (2008) Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone**, 43(5):931-940.
43. Scorei R, Mitrut P, Petrisor I, Scorei I (2011) A double-blind, placebo-controlled pilot study to evaluate the effect of calcium fructoborate on systemic inflammation and dyslipidemia markers for middle-aged people with primary osteoarthritis. **Biological trace element research**, 144(1-3):253-263.
44. Soubelet CG, Albano MP, Conconi MS (2018) Sintering, microstructure and hardness of Y-TZP- 64S bioglass ceramics. **Ceramics International** 44:4868–4874.
45. Souza EQM, Klaus AEC, Santos BFE, da Costa MC, Ervolino E, de Lima DC, Fernandes, LA (2020) Evaluations of hydroxyapatite and bioactive glass in the repair of critical size bone defects in rat calvaria. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, 10(4): 422-429.
46. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. **Nature protocols**, 7(10), 1918.
47. Villaça JH, Novaes Jr AB, Souza SLSD, Taba Jr M, Molina GO, Lamano Carvalho TL (2005) Bioactive glass efficacy in the periodontal healing of intrabony defects in monkeys. **Brazilian dental journal**, 16(1):67-74.
48. Xynos ID, Hukkanen MVJ, Batten JJ, BATTERY LD, Hench LL, Polak JM (2000) Bioglass® 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: implications and applications for bone tissue engineering. **Calcified tissue international**, 67(4):321-329.
49. Yusof NN, Aziz SM, Noor FM, Yaacob SS, Hashim S (2022) A novel borate-based 45S5 Bioglass®: In vitro assessment in phosphate-buffered saline solution. **Journal of Non-Crystalline Solids**, 596:121843.
49. Zhang L, Yang G, Johnson BN, Jia X (2019) Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. **Acta biomaterialia**, 84:16-33.

APÊNDICE

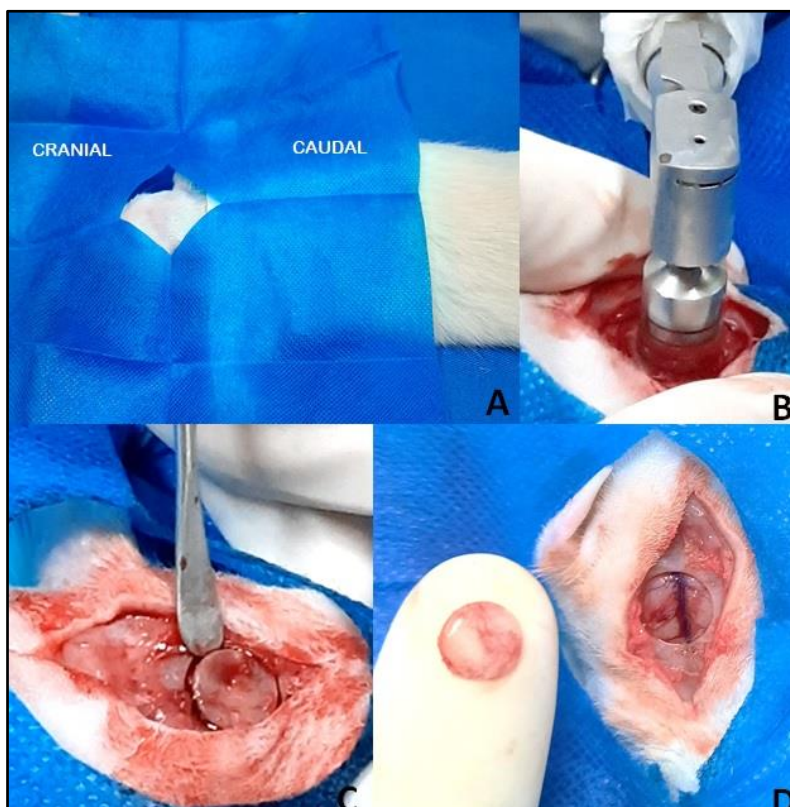


Figura 1: A: posicionamento do paciente após tricotomia ampla, antissepsia e posicionamento do campo operatório. B: após incisão cirúrgica e isolamento da área do crânio a ser criado o defeito crítico; a trefina de 8mm acoplada a caneta de contra ângulo é posicionada e com pressão delicada a osteotomia é feita. C: após osteotomia completa, o defeito é retirado com auxílio de um elevador de freer. D: aspecto final após remoção do defeito crítico. Jaboticabal, 2021.

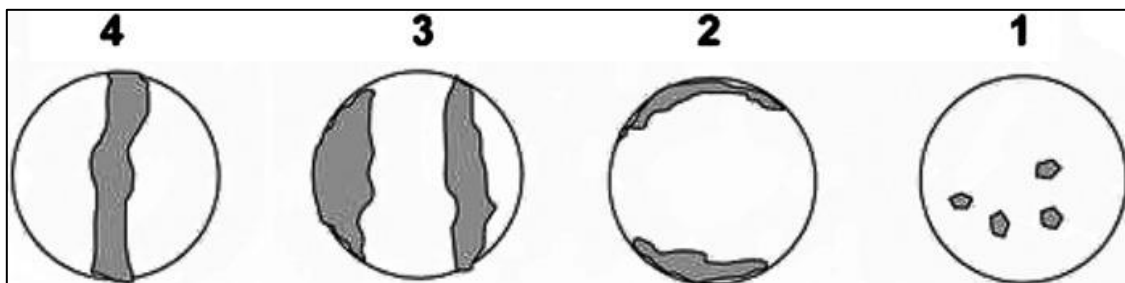


Figura 2): Ilustrações esquemáticas do recobrimento (cinza) da ponte óssea formada no defeito ósseo em calvária de ratos. Em cima de cada ilustração nota-se o score da ponte óssea, descrita no Quadro 1. Imagem retirada de Patel et al. (2008).

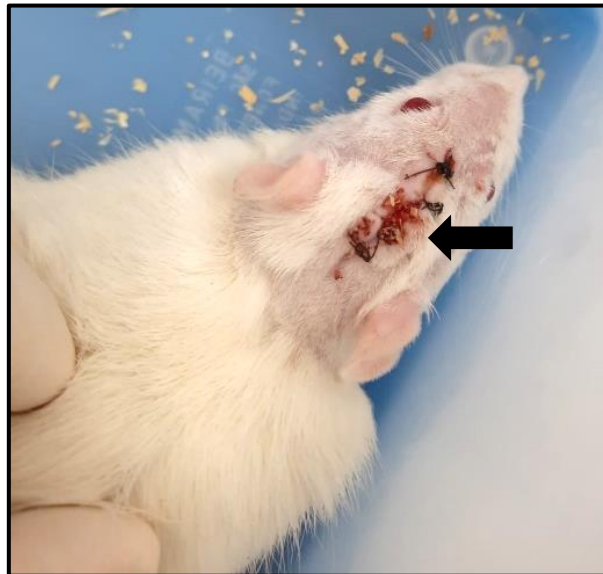


Figura 3: Animal do grupo BVBS no quarto dia de pós-operatório apresentando deiscência de sutura. Jaboticabal, 2021.

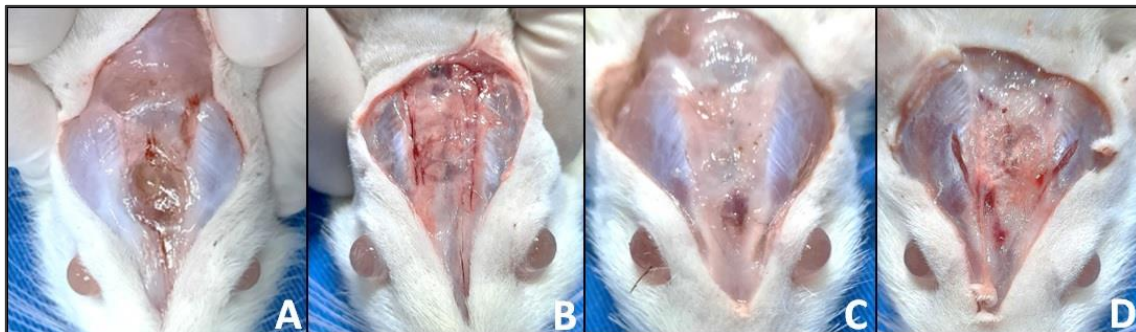


Figura 4: Imagens fotográficas do momento da coleta das calotas cranianas dos animais na 12ª semana. A: C-: controle negativo. B: C+: controle positivo. C: BV: biovidro 45S5. D: BVBS: biovidro boro-silicato. Jaboticabal, 2021.

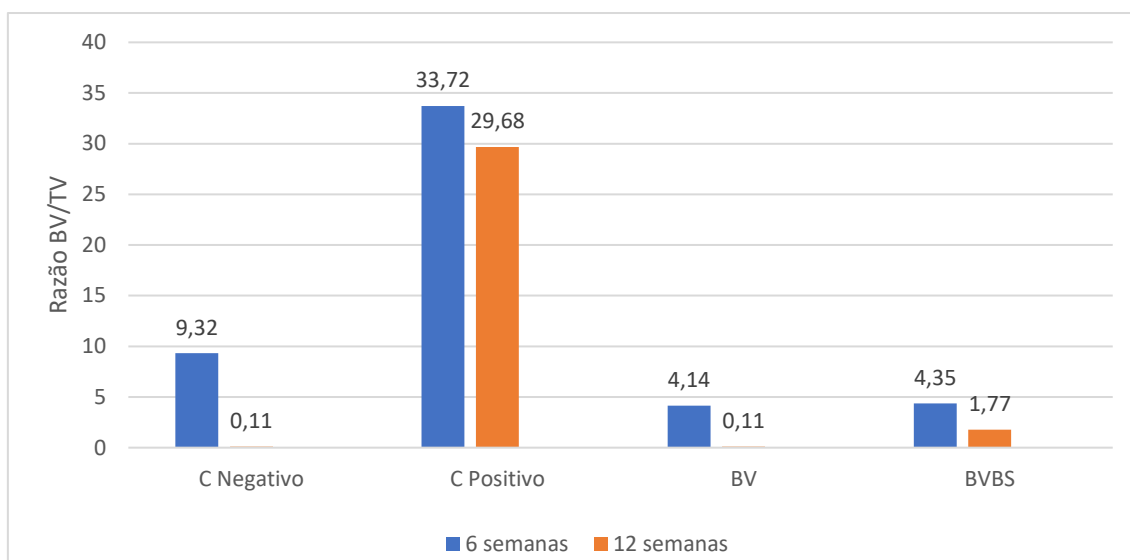
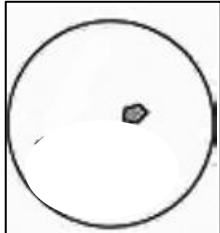
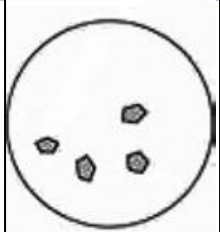
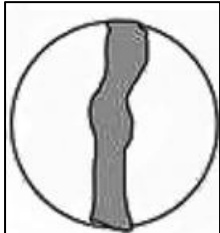


Figura 5: Razão entre volume ósseo e volume total das amostras da calvária de ratos Wistar com defeito crítico tratados com controle negativo, positivo, biovidro 45S5 e biovidro boro-silicato respectivamente. Jaboticabal, 2021.

Quadro 1: Escores para extensão da ponte e união ósseas usando conjuntos de dados micro CT, adaptados por Patel et al. (2008).

Descrição da ponte óssea	Escore
Ponte óssea recobrimdo toda a extensão do defeito no ponto mais longo (8 mm)	4
Ponte óssea sobre o comprimento parcial do defeito	3
Ponte óssea somente na borda dos defeitos	2
Poucas espículas ósseas dispersas pelo defeito	1
Sem formação óssea no defeito	0

Quadro 2: Classificação quanto aos escores de Patel et al. (2008) correlacionadas às imagens da microtomografia encontradas no presente estudo.

Amostras	Escores	Descrição Patel et al. (2008)
Controle Negativo	0 	Sem formação óssea no defeito
BV e BVBS	1 	Poucas espículas ósseas dispersas pelo defeito
Controle Positivo	4 	Ponte óssea recobrimdo toda a extensão do defeito no ponto mais longo (8 mm)

CAPÍTULO 3 – Considerações finais

A linha de pesquisa seguida neste trabalho é continuidade do projeto realizado pelo mesmo autor, na qual o uso de biomateriais foi utilizado por meio de xenoenxertos ativados em biorreatores (Montanhim et al., 2021), bem como a linha de pesquisa da orientadora.

O uso de biomateriais é uma linha promissora de estudo e uso clínico, uma vez que seu uso é extensivo para ortodontia e ortopedias humana e veterinária, no preparo de leito receptores de implantes e reconstruções de falhas, por exemplo. Na odontologia, o uso de biomateriais é consagrado, uma vez que as falhas são pequenas e, apesar do alto custo, pouca quantidade é necessária para preencher os defeitos.

O custo acaba sendo fator extremamente limitante na medicina veterinária e um dos pontos importantes dessa pesquisa é o valor agregado na confecção dos biovidros utilizados. Na época do preparo do material (meados de janeiro de 2021) o custo para confeccionar 1 grama de biovidro 45S5 era em torno R\$ 6,00. Importante ressaltar que atualmente a patente do biovidro 45S5 original já não é mais validada, então não há mais impeditivos legais para sua fabricação. Desta maneira, foi possível manufacturar um material de excelência a custos reduzidos, que pode auxiliar na reconstrução de falhas ósseas importantes de muitos pacientes que, provavelmente, teriam indicação de amputação dos membros acometidos.

Outro ponto positivo do uso de um material conhecido e estudado é a alteração de sua formulação original por meio de engenharia de materiais. Ao ser incorporado elementos diferentes, como o boro, possibilita agregar valor para biotransformação final. Obviamente antes do uso em cobaias, toda nova formulação deve ser submetida a testes em *in vitro* para que sua eficácia mínima seja comprovada, justificando os demais testes e, futuramente, aplicação clínica.

Na presente pesquisa, a apresentação do biomaterial foi em pó, no entanto, o biovidro pode ser utilizado em diversas apresentações como gel, líquido ou em formas sólidas peletizadas, espiral ou até mesmo confeccionas no formato do defeito. Além disso, podem ser incorporados em outros materiais, como titânio em placas ou parafusos ósseos absorvíveis para uso em osteossíntese – essa incorporação pode ser feita através de impressão 3D por

exemplo. Outra maneira, são os *scaffolds* que podem ser mistos ou exclusivamente de biovidro para reconstrução de grandes falhas.

O presente estudo apresenta lacunas que poderiam ser preenchidas, como a comprovação de fatores angiogênicos por meio de análises imunohistoquímicas de anticorpos como a sialoproteína, osteolacina, osteopontina e precursores de fosfatase alcalina. O uso desses marcadores anticorpos poderia dizer se o osso formado é novo ou maduro a depender da sua expressão e, além disso, a comprovação da neoformação óssea. Porém, para fins dessa pesquisa, e com o uso da microtomografia, concluímos que houve a formação. Além disso, antes de uso clínico, teste em ossos longos – como tíbia – podem e devem ser feitos, para analisar seu comportamento com ossificação endocondral, além da intramembranosa vista neste estudo.

De maneira geral, com base no que foi proposto na metodologia deste experimento, houve resultados satisfatórios com uso do biovidro 45S5 e borossilicato para reconstrução de falhas ósseas de 8mm em calvários de ratos. Além disso, o manuseio do material, desde seu custo, forma de uso e esterilização podem proporcionar fácil acesso e adesão aos profissionais para sua utilização.

Montanhim GL, Silva MTS, Conceição MEBAM, Rocha TS, Yamashiro LM, Ribeiro JO, Hataka A, Moreiras PRR, Minto BW, Dias LGGG, Moraes PC (2021). Valuation of angiogenesis in bovine xenografts implanted in intracorporal sites of rabbits as models of in-vivo bioreactors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 73:1067-1075.