



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Araçatuba

**OLÍVIA MARIA ALMEIDA FRANÇA**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA  
OSTEOCONDUÇÃO DE DOIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS  
BIFÁSICOS DE HA/ $\beta$ -TCP EM DEFEITOS CRÍTICOS DE  
CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Araçatuba - SP  
2022

**OLÍVIA MARIA ALMEIDA FRANÇA**

**AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA  
OSTEOCONDUÇÃO DE DOIS SUBSTITUTOS ÓSSEOS  
BIFÁSICOS DE HA/ $\beta$ -TCP EM DEFEITOS CRÍTICOS DE  
CALOTA CRANIANA DE RATOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Odontologia  
de Araçatuba da Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp,  
como parte dos requisitos para a obtenção  
do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisley Ávila  
Souza

**Araçatuba - SP  
2022**

*Dedicatória*

*Dedico esta trabalho aos meus pais, Marcos Antonio Teixeira Franca e Valnice Regina de Almeida, ao meu padrasto Antonio Abel Rezende e aos meus avós Valdo Batista, Eunice Perreira e Maria Texeira Souza com todo meu amor e infinitos agradecimentos, cujo apoio incondicional me deu forças para seguir em frente. Sem eles, nada disso teria sido possível.*

# *Agradecimientos*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. **Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor Prof. **Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

**Aos funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP pelo carinho e atenção sempre oferecidos.

Meus sinceros agradecimentos a todos **os Professores da Faculdade de Odontologia de Araçatuba** por todo ensinamento, pela dedicação e inspiração. Obrigada por serem mestres e me ensinarem uma profissão tão linda.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Francisley Ávila Souza** por ter me aceitado como orientada, e ter me dado a oportunidade de realizar a iniciação científica, que contribuiu ricamente para o meu conhecimento.

Aos doutorandos **Henrique Hadad** por ter me ajudado com as responsabilidades da iniciação científica desde o começo e me passando com toda calma e paciência todos seus ensinamentos e **a Laís Kawamata de Jesus**, por ter ajudado com a iniciação científica, por ter acreditado em mim quando eu não acreditei, por ter me feito apresentar inúmeros trabalhos e me familiarizar com isso, por ter sempre insistido em mim, mesmo quando nem eu acreditava que era capaz.

À Deus, primeiramente, depois à minha família, aos meus pais, **Valnice Regina de Almeida** e **Marco Antônio Teixeira França** por terem criado a mim com tanta dedicação, amor e abdicção. As minhas conquistas são de vocês e para vocês, para que um dia eu possa retribuir mil vezes o que vocês proporcionaram para mim. Vocês me deram forças para eu não desistir, aos meus avós maternos **Valdo Batista de Almeida** e **Eunice Pereira dos Santos Almeida**, que ao longo desses seis anos me ajudaram a conseguir seguir o caminho dessa jornada, sempre ao meu lado e me dando força, me apoiando e me incentivando, vocês foram essenciais para a minha formação, à minha vó paterna **Maria Teixeira Souza**, que mesmo a distância sempre me ajudou, me deu força e me incentivou.

Agradeço também ao meu tio **Marcelo Otávio Teixeira França** por ser meu exemplo de perseverança nos estudos e por toda ajuda é incentivo durante meus anos de faculdade e também ao meu tio a **Valberto Antônio de Almeida (in memorian)**

que sempre sonhou com o dia em que eu me formasse e sempre esteve ao meu lado me incentivando quando estive em vida e que faz uma falta enorme para mim. Agradeço também as minhas tias Sandra Maria Pereira Braga, Jamile Salomão e **Mariela Souza França** que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada e sempre me incentivaram a ser cada vez melhor na profissão que escolhi.

Em especial agradeço aos meus primos **Marcelo Otávio Teixeira França, Caio Medeiros França, Antônio Augusto Pereira Braga e Pedro Nicolau Braga Teixeira** por me acompanharem nessa jornada, por sempre estarem me apoiando nessa jornada única da graduação, por toda comemoração desde quando souberam que tinha entrado na universidade, com apoio e força de vocês esse jornada se tornou muito mais fácil, vocês foram muito importante para mim nesse ciclo.

À Lianis Paccagnella, Lilian Rose Paccagnella Belentani, José Eduardo Martins Soares e Elena Santana Machado que foram minha segunda família aqui em Araçatuba, muitas vezes seguram muitas barras comigo, me ajudaram a superar as dificuldades com o maior amor do mundo e sempre estiveram comigo quando eu precisei.

Às minhas amigas **Isabelle Maira Andrade da Silva, Juliana Pereira Lima, Yasmin de Oliveira Nunes e Loane Bispo Cardoso** que sempre estiveram comigo nessa caminhada, torcendo e me incentivando a ser cada vez melhor.

Aos amigos que fiz aqui em Araçatuba, **João Guilherme Bregolin de Carvalho** que me ensinou a ver a vida com mais leveza mesmo na dificuldade, **Bárbara Neves** que me deu à mão nos momentos de dificuldade, me ouviu chorar inúmeras vezes e sempre dizia que tudo ia ficar bem e eu ia superar, **Sérgio Diego de Souza Gonzales** que além de treinador, muitas vezes foi amigo, professor e conselheiro, que aguentou comigo muitos momentos de dificuldade e na maioria das vezes não me deixou desistir, **Ana Laura Cassimiro Marques** que foi uma das primeiras amizades que fiz em Araçatuba, me acompanhou desde o começo sempre com seus conselhos, abraços e me mostrando como levar a vida com mais leveza, você foi essencial para que eu conseguisse concluir essa jornada, **Diogo Belentani (in memorian)** que deixou esse mundo da forma mais triste possível, mas nos ensinou a sorrir mesmo em meio a toda tristeza que estivemos, pela falta que ele faz à mim e a todos que o conhecerão dedico parte dessa jornada à ele por ensinar a

sempre sorrir mesmo com tudo sendo o mais difícil possível, **Bruno Nascimento Gomes** por todas conversas e conselhos que sempre tivemos, por essa conexão fora do normal que temos e por sempre estender à mão a mim quando preciso, **João Eduardo Martins Soares** por estar ao meu lados nesses últimos dois anos de faculdade, aguentando meus surtos e muito choro, sendo meu porto seguro nas hora que eu mais queria desistir, você foi essencial para mim nesses dois últimos anos de faculdade, você sempre esteve ao meu lado me ajudando, me dando a mão e segurando a barra nas hora que eu não estava mais aguentando, você sempre me mostrou que tudo ia ficar bem e acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava mais, você foi a pessoa que sempre esteve ali para mim nas horas boas e ruins, agradeço a você por ter aguentado muita coisa comigo e não ter desistido de nada, foi você que me ajudou e muito a seguir em frente sempre e a se importa menos com à minha volta, foi com você que vivi as melhores fases nessa jornada universitária.

Às minhas amigas de graduação, **Leticia Gabriella de Souza Rodrigues, Natalia Cristina de Souza Moraes, Priscila Marchesini, Arieli Raymundo Vazão, Maria Carolina Deveza Assola, Letícia Abdelnour Zuanon, Karen Yokoyama Sayuri** a amizade de vocês foi um presente que a graduação me deu, foram vocês que muitas vezes me deram forças para continuar e não desistir, passamos por momentos bons e momentos ruins mas vocês sempre estiveram lá para me ajudar, obrigada por sempre estarem comigo me dando força e caminhando junto comigo nessa jornada.



*Επίγραφε*

**“Alegria é o produto do esforço de fazer alguém feliz”**

**Gretta Booker Palmer**

FRANÇA, O.M.A. **Avaliação histomorfométrica da osteocondução de dois substitutos ósseos bifásicos de HA/β-TCP em defeitos críticos de calota craniana de ratos.** 2022. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## RESUMO

A reabsorção óssea pode dificultar ou interferir no planejamento de reabilitações implantossuportadas, sendo necessários em alguns casos o uso de técnicas de enxertias para restabelecer o contorno alveolar e volume ósseo adequado. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial osteocondutor de dois biomateriais cerâmicos a base de hidroxiapatita e beta-tricálcico fosfato, em defeitos críticos em calvárias de ratos. Para tal, foi realizado um defeito de 7mm na calvária de 48 ratos machos *Wistar*. Os animais foram divididos em quatro grupos, GC – preenchido por coágulo, GM – recoberto por Techgraft, Baumer®, GGP – preenchido com GenPhos XP, Baumer® e recoberto por Techgraft, Baumer® e GBC – preenchido com BoneCeramic, Straumann® e recoberto por Techgraft, Baumer®. A eutanásia foi realizada aos 30 e 60 dias pós-operatórios para coleta das calvárias, seguido do processamento laboratorial para cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (HE), para análise histológica qualitativa e quantitativa (área de osso neoformada, área de biomaterial e tecido conjuntivo) com software ImageJ®. Os dados foram analisados no software Sigma Plot 12.0, por meio de 2-way ANOVA, considerando  $p < 0,05$ . Aos 30 dias GBC apresentava biomaterial envolto por tecido conjuntivo frouxo com formação óssea na região profunda do defeito, enquanto GGP apresentava neoformação óssea ao redor das partículas além de GBC apresentar 34,91% de AON, seguido pelo GGP (29,36%), contudo sem diferença estatística ( $p = 0,450$ ). Aos 60 dias, GBC apresentava partículas entremeadas por tecido conjuntivo denso, enquanto GGP apresentava neoformação óssea entre partículas do biomaterial, destacando ainda que, GGP apresentou 57,56% de AON quando comparado a GBC (37,95%) ( $p < 0,001$ ). Conclui-se que ambos biomateriais apresentaram propriedades osteocondutoras, contudo o biomaterial GenPhos XP, Baumer® apresentou maior área óssea neoformada quando comparado ao BoneCeramic, Straumann®.

**Palavras-chave:** Materiais biocompatíveis. Regeneração óssea. Substitutos ósseos. Engenharia tecidual.



FRANÇA, O.M.A. **Histomorphometric evaluation of osteoconduction of two HA/β-TCP biphasic bone substitutes in critical rat skullcap defects.** 2022. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

## **ABSTRACT**

Bone resorption is an irreversible process and can interfere with implant-supported rehabilitation planning. Bone grafts can help to restore the alveolar contour and adequate bone volume previously dental implant placement. Thus, tissue engineering has been working to find a biomaterial capable of resembling the properties of autogenous bone. The study aimed to evaluate the osteoconductive potential of two biphasic ceramic biomaterials based on hydroxyapatite (HA) and beta-tricalcium phosphate (B-TCP), in critical size defects on rat calvaria. For this, a 7mm diameter defect was performed in the calvaria of 48 male Wistar rats. The animals were randomly divided into four groups according to the treatment used in the defect: GC – filled with clot, GM – covered with Techgraft, Baumer®, GGP – filled with biomaterial GenPhos XP, Baumer® and covered with Techgraft, Baumer® and GBC – filled with BoneCeramic, Straumann® biomaterial and covered by Techgraft, Baumer®. After, 30 and 60 days after surgery, samples were collected to histomorphometric analysis. The values obtained will be tabulated and submitted to statistical analysis in Sigma Plot 12.0 software (Exakt Graph and Data Analysis) considering  $p < 0.05$ . GBC group presented biomaterial surrounded by loose connective tissue at 30 days with bone formation in the deep region of the defect, while GGP demonstrated new bone around the particles, also GBC presented 34.91% of %NBA, followed by GGP (29.36%) ( $p = 0.450$ ). At 60 days, GBC presented particles interspersed with dense connective tissue, while GGP presented bone neoformation between particles of the biomaterial, and also GGP group presented a better value for %NBA (57.56%) when compared to GBC (37.95%) ( $p < 0.001$ ). It is concluded that both biomaterials presented osteoconductive properties, however the biomaterial GenPhos XP, Baumer® presented a greater neoformed bone area when compared to BoneCeramic, Straumann®.

**Keywords:** Biocompatible Materials. Bone Regeneration. Bone Substitutes. Tissue Engineering.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com tempos de análises 25
- Figura 2 - Acesso cirúrgico. (A) Incisão linear, descolamento e exposição da região central do osso parietal. B) Exposição do osso parietal 26
- Figura 3 - Calota craniana removida após uso de borca trefina de 7mm interno 27
- Figura 4 - Grupos experimentais (A) defeito ósseo preenchido por coágulo (B) defeito ósseo recoberto com Techgraft (C) defeito ósseo preenchido com BoneCeramic (D) membrana Techgraft recobrindo o defeito ósseo preenchido com BoneCeramic (E) defeito ósseo preenchido com GenPhos XP (F) membrana Techgraft recobrindo o defeito ósseo preenchido com GenPhos XP 27
- Figura 5 - Grupo Controle (GC) – 30 dias – 4A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC); 4B e 4D: presença de tecido conjuntivo frouxo (CF) próximo às bordas do defeito ósseo, tecido conjuntivo denso (CD) na região mais profunda e discreta neoformação óssea nas bordas do defeito; 4C: tecido conjuntivo denso na região central do defeito ósseo (CD). (coloração HE) 31
- Figura 6 - Grupo Membrana (GM) – 30 dias – 5A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) mais espesso; 5B: discreta neoformação óssea junto a borda do defeito ósseo (NO) no lado direito do defeito ósseo e mais intensa do lado esquerdo e tecido conjuntivo denso (CD); 5C: remanescentes da membrana envolvidos por tecido ósseo neoformado (NO) ou por tecido conjuntivo denso (CD); 5D: grande quantidade de tecido ósseo neoformado a partir da borda do defeito ósseo em direção ao centro. (coloração HE) 32
- Figura 7 - Grupo BoneCeramic (GBC) – 30 dias – 6A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial BoneCeramic (BC) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial e por tecido ósseo neoformado (NO) na região mais profunda do defeito ósseo; 6A, 6B e 6C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo frouxo (CF) e presença de infiltrado inflamatório (I). (coloração HE) 33

Figura 8 - Grupo GenPhos XP (GGP) – 30 dias – 7A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial GenPhos XP (GGP) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial; 7A, 7B e 7C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo frouxo (CF) e por tecido ósseo neoformado (NO). (coloração HE) 34

Figura 9 - Grupo Controle (GC) – 60 dias – 8A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo neoformado (NO); 8B e 8D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo; 8C: tecido ósseo neoformado (NO). (coloração HE) 35

Figura 10 - Grupo Membrana (GM) – 60 dias – 9A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com neoformação óssea total (NO); 9B, 9C e 9D: neoformação óssea (NO) obliterando praticamente todo o defeito ósseo (coloração HE) 35

Figura 11 - Grupo BoneCeramic (GBC) – 60 dias – 10A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial BoneCeramic (BC) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial e por tecido ósseo neoformado (NO) na região mais profunda do defeito ósseo; 10A, 10B e 10C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo denso (CD). (coloração HE) 36

Figura 12 - Grupo GenPhos XP (GGP) – 60 dias – 11A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial GenPhos XP (GP) envolvidas por tecido conjuntivo ou por tecido ósseo próxima às bordas do defeito ósseo e na região central; 11A, 11B e 11C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido ósseo neoformado (NO) ou por tecido conjuntivo denso (CD). (coloração HE) 37

Figura 13 - Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para área de osso neoformado (AON) separado entre os tempos de análise 38

Figura 14 - Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para quantificação de tecido conjuntivo separado entre os tempos de análise 39

Figura 15 - Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para quantificação de biomaterial separado entre os tempos de análise 40

Figura 16 - Gráfico representativo da média de quantificação de tecido ósseo, conjuntivo e biomaterial presente no defeito crítico nos tempos de 30 e 60 dias

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Análise comparativa da média e desvio padrão (DP) da porcentagem de área óssea neoformada entre os grupos avaliados 38



## LISTA DE ABREVIATURAS

CaP- Fosfato de cálcio

HA - Hidroxiapatita

$\beta$ -TCP - Beta fosfato tricálcico

BCP - Fosfato de cálcio bifásico

ROG - Regeneração óssea guiada

GC - Grupo Coágulo

GM - Grupo Coágulo + Membrana

GBC - Grupo Hidroxiapatita e  $\beta$ -tricálcio fosfato particulado + Membrana

GGP - Grupo Hidroxiapatita e  $\beta$ -tricálcio fosfato particulado + Membrana

AON - Área de osso neoformada

HE - Hematoxilina e eosina

TC - Tecido Conjuntivo

CF - Tecido Conjuntivo Frouxo

CD - Tecido Conjuntivo Denso

NO - Neoformação óssea

BC - Biomaterial BoneCeramic

GP - Biomaterial GenPhos XP

% - Porcento

## SUMÁRIO

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                  | 19 |
| 2 OBJETIVO                                    | 22 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS                         | 24 |
| 3.1 Desenho Experimental                      | 24 |
| 3.2 Procedimento Cirúrgico                    | 25 |
| 3.3 Acesso Cirúrgico                          | 26 |
| 3.4 Osteotomia                                | 26 |
| 3.5 Sutura                                    | 28 |
| 3.6 Cuidados Pós-Operatórios                  | 28 |
| 3.7 Eutanásia e Coleta do material            | 28 |
| 3.8 Formas de Análise                         | 29 |
| 3.8.1 Análise Histológica e Histomorfométrica | 29 |
| 3.8.2 Análise Estatística                     | 29 |
| 4 RESULTADOS                                  | 31 |
| 4.1 Análise qualitativa aos 30 dias           | 31 |
| 4.2 Análise qualitativa aos 60 dias           | 34 |
| 4.3 Análise quantitativa                      | 37 |
| 4.3.1 Área óssea neoformada (AON)             | 37 |
| 4.3.2 Quantificação do Tecido Conjuntivo      | 39 |
| 4.3.3 Quantificação do Biomaterial            | 40 |
| 5 DISCUSSÃO                                   | 43 |
| 6 CONCLUSÃO                                   | 47 |
| REFERÊNCIAS                                   | 49 |

# *Introdução*

## 1 INTRODUÇÃO

A perda de um ou mais dentes naturais muitas vezes resulta em deficiências nas atividades essenciais da vida diária como a fala e mastigação. A ausência dentária impossibilita a distribuição de estímulos mastigatórios através do ligamento periodontal,<sup>1</sup> que podem alterar a fisiologia da estabilidade do tecido ósseo, levando a um processo de reabsorção óssea maior que resulta na redução do volume e densidade óssea, afetando indiretamente no tecido mole.<sup>2</sup>

Após extrações dentárias, o processo de remodelação óssea pode gerar diminuição da altura e largura da crista residual, resultado em rebordos atróficos e inadequados para reabilitação implantessuportada.<sup>3,4</sup> Desse modo, cirurgias para reconstrução da altura e/ou espessura óssea, podem ser necessárias para melhor otimizar e viabilizar a reabilitação do paciente.<sup>5</sup>

Os substitutos ósseos são considerados quaisquer biomateriais de origem humana, animal, vegetal ou sintética, destinados a serem implantados em seres humanos com a perspectiva de reconstrução de um padrão tecidual específico.<sup>6</sup> Portanto, existem algumas características que os enxertos não devem apresentar, como a formação de trombos, resposta imune adversa, toxicidade, ser carcinogênico e produzir resposta inflamatória aguda ou crônica.<sup>7</sup> Estes enxertos podem ser classificados como autógenos, homógenos, heterógenos ou aloplásticos,<sup>8</sup> sendo que o autógeno é consagrado como padrão ouro na literatura, devido à alta previsibilidade de sucesso<sup>9,10</sup> e as suas propriedades biológicas osteogênicas, osteoindutoras e osteocondutoras,<sup>11</sup> além de não promover reações imunológicas,<sup>12</sup> assim a engenharia de tecido vem trabalhando para encontrar um biomaterial capaz de se assemelhar as propriedades do osso autógeno.

Os substitutos ósseos podem ser de origem natural ou sintética.<sup>13</sup> Os de origem sintéticas vem sendo estudados atualmente, devido a sua disponibilidade e pela vantagem de não realizar um segundo sitio cirúrgico (doador) no paciente, melhorando o pós-operatório.<sup>7,14</sup> Os biomateriais à base de fosfato de cálcio (CaP), são amplamente utilizados para regeneração óssea,<sup>15</sup> devido as suas propriedades bioativas e sua similaridade química com a fase mineral do osso. Assim, pesquisas com CaP estão sendo direcionadas para investigar a hidroxiapatita (HA) e o beta fosfato tricálcico ( $\beta$ -TCP) na forma de fosfato de cálcio bifásico (BCP).<sup>16</sup>

As cerâmicas BCP constituídas por uma mistura de HA e  $\beta$ -TCP apresentam bioatividade e osteocondutividade favoráveis,<sup>17,18</sup> devido suas propriedades biológicas estarem relacionadas a proporção de HA/ $\beta$ -TCP existente e a granulometria do material empregado.<sup>19</sup> Sendo assim, acredita-se que a modificação da relação HA/ $\beta$ -TCP pode influenciar no padrão de reabsorção osteoclástica,<sup>20</sup> permitindo melhor controle da biodegradação e estabilidade do material, promovendo a formação óssea devido sua propriedade osteocondutora.<sup>16</sup>

O uso de membranas sobre o alvéolo pós-exodôntico, auxilia no processo de reparo, uma vez que isola as células lábeis de penetrar no defeito e se multiplicarem no local do tecido ósseo, além de auxiliar a conter o biomaterial no local e, atualmente, podem ser classificadas como absorvíveis e não-absorvíveis<sup>21-25</sup> e são empregadas como barreira em defeitos ósseos ou associadas à enxertos ósseos, influenciando diretamente na manutenção do volume enxertado, recebendo o nome de regeneração óssea guiada (ROG).<sup>26-28</sup> Portanto, as membranas absorvíveis, podem ser fabricadas a partir de colágeno porcino ou bovino, ou de um biomaterial com propriedades de osteopromoção.<sup>22</sup> E quando comparadas com as membranas não-absorvíveis apresentaram maior proliferação celular.<sup>22-25</sup> Trabalhos prévios publicados,<sup>29,30</sup> demonstraram que as membranas de pericárdio bovino são biocompatíveis e bioabsorvíveis.

*Objetivo*

## **2 OBJETIVO**

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial osteocondutor de duas cerâmicas bifásicas de hidroxiapatita e  $\beta$ -tricálcio fosfato com duas configurações diferentes (Straumann® BoneCeramic, Basileia, Suíça e GenPhos XP, Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil,) em defeitos críticos em calvária de ratos.

***Materiais e Métodos***



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos para experimentação animal e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA - UNESP), sob processo número FOA-01245-2012 (Apêndice A).

O tamanho da amostra foi calculado com base em publicação prévia, portando, foram utilizados 6 ratos (n=6) por período totalizando 48 animais.<sup>31,32</sup>

#### 3.1 Desenho Experimental

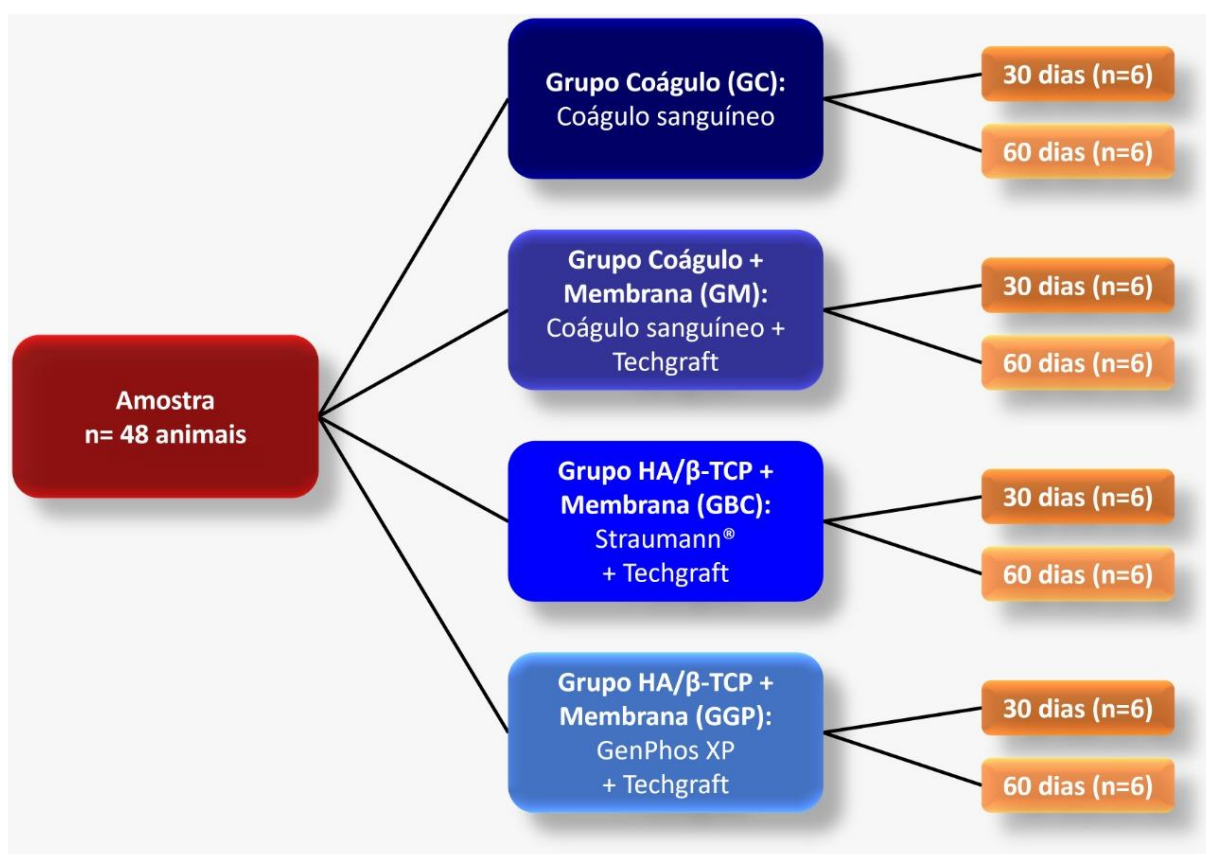
Para realização desse projeto, foram utilizados 48 (quarenta e oito) ratos *Wistar* (*Rattus Norvegicus Albinus*), machos, adultos e com peso variando entre 450-500 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP e acomodados no biotério do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, com controle da temperatura e luz do ambiente, alimentados com ração sólida e água *adlibitum*, durante todo o experimento.

Todos os animais foram submetidos a um defeito crítico de 7mm na região da calvária por meio de uma osteotomia, e em seguida foram distribuídos em quatro grupos de acordo com o tratamento proposto:

- **Grupo Coágulo (GC):** defeito crítico preenchido por coágulo sanguíneo;
- **Grupo Coágulo + Membrana (GM):** defeito crítico preenchido por coágulo sanguíneo e recoberto com uma membrana de pericárdio bovino (Techgraft, Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil);
- **Grupo Hidroxiapatita e  $\beta$ -tricálcio fosfato particulado + Membrana (GBC):** defeito crítico preenchido pelo biomaterial  $\beta$ -tricálcio fosfato em grânulos HA/ $\beta$ -TCP (60%/40%) (Straumann® BoneCeramic, Basiléia, Suíça) e recoberto com uma membrana de pericárdio bovino (Techgraft, Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil);

- **Grupo Hidroxiapatita e  $\beta$ -tricálcio fosfato particulado + Membrana (GGP):** defeito crítico preenchido por cimento de  $\beta$ -tricálcio-fosfato em grânulos HA/ $\beta$ -TCP (70%/30%) (GenPhos XP, Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil,) e recoberto com uma membrana de pericárdio bovino (Techgraft, Baumer SA, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil).

**Figura 1 - Fluxograma de distribuição dos animais em grupos, de acordo com tempos de análises**



Fonte: Autoria própria, 2022

### 3.2 Procedimento Cirúrgico

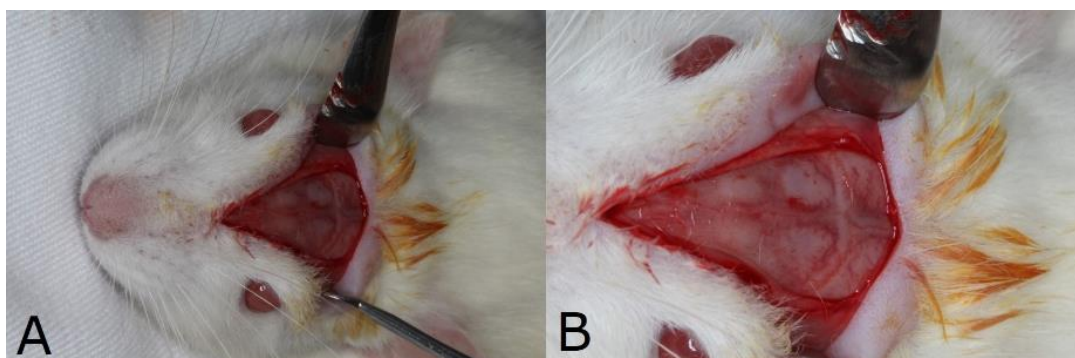
Todos os animais foram mantidos em jejum por 8 horas. A indução da anestesia geral foi realizada sob sedação por meio da administração intramuscular de 10 mg/kg de Cloridrato de Ketamina 1% (Vetaset® - Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brazil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brazil) e 5mg/kg de Cloridrato de Xilazina 2% (Dopaser® - Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil). Foi realizada a tricotomia na região fronto-parietal do animal seguido da

antisepsia com solução de Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 1%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto). No intuito de complementação anestésica e hemostasia do campo operatório foi empregada a anestesia local de Cloridrato de Mepivacaína 2% com Epinefrina 1:100.000 (MEPIADRE® - DFL Indústria e Comércio S.A., Jacarepaguá RJ, Brasil).

### 3.3 Acesso Cirúrgico

O acesso cirúrgico foi realizado por meio de uma incisão linear de 2cm com uma lâmina de bisturi 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japan) montada em um cabo número 3 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, USA), seguido por descolamento muco-periosteal do retalho e exposição do osso parietal.

**Figura 2 – Acesso cirúrgico. (A) Incisão linear, descolamento e exposição da região central do osso parietal. B) Exposição do osso parietal**

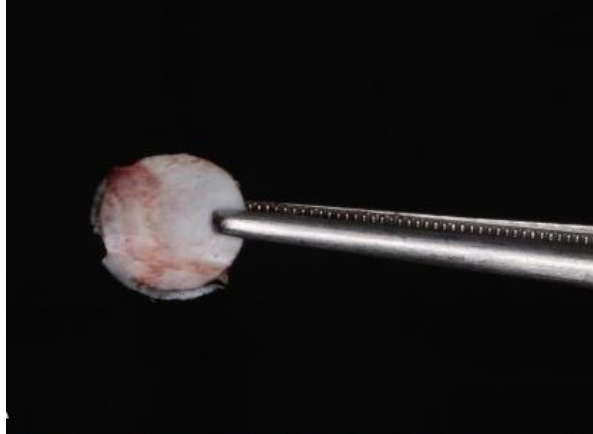


Fonte: Autoria própria, 2022

### 3.4 Osteotomia

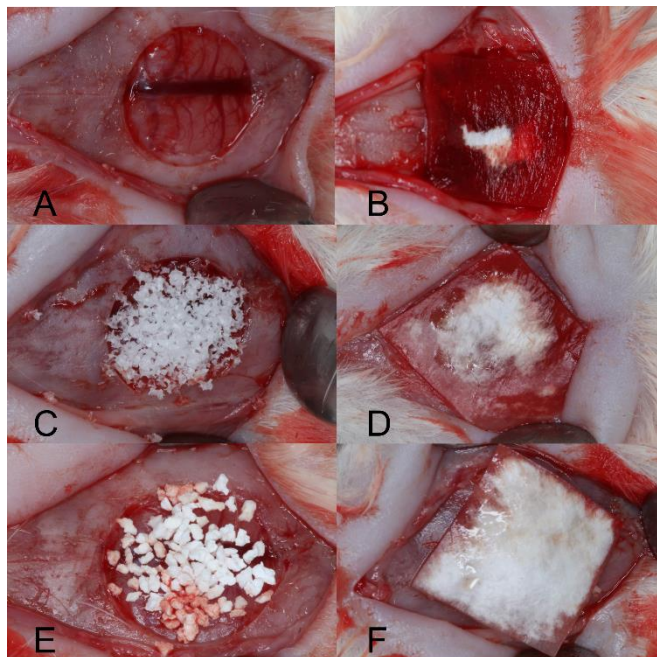
Com uma broca trefina de 7mm de diâmetro interno (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil), montada em um contra-ângulo de redução de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil) conectado a uma peça de mão (BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) com velocidade de 1500rpm foi realizada a osteotomia bicortical da região central do osso parietal. A calota craniana foi removida cuidadosamente para preservar a integridade da dura-máter.<sup>33-34</sup> E em seguida o defeito crítico foi preenchido de acordo com os quatro grupos de tratamentos propostos.

**Figura 3 – Calota craniana removida após uso de borca trefina de 7mm interno**



Fonte: Autoria própria, 2022

**Figura 4 – Grupos experimentais (A) defeito ósseo preenchido por coágulo (B) defeito ósseo recoberto com Techgraft (C) defeito ósseo preenchido com BoneCeramic (D) membrana Techgraft recobrindo o defeito ósseo preenchido com BoneCeramic (E) defeito ósseo preenchido com GenPhos XP (F) membrana Techgraft recobrindo o defeito ósseo preenchido com GenPhos XP**



Fonte: Autoria própria, 2022

### **3.5 Sutura**

O retalho muco-periosteal foi reposicionado por meio da sutura com pontos simples empregando o fio de nylon 5-0 (ETHILON®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil). Na sequência foi realizada novamente a antissepsia com solução de Polivinil Pirrolidona Iodo Tópico (PVP-I 1%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto).

### **3.6 Cuidados Pós-Operatórios**

No pós-operatório imediato, todos os animais receberam via intramuscular 0,1mL/kg de Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal Ltd., São Paulo, Brasil) e 1mg/kg de Dipirona Sódica (Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltd., São Paulo, Brasil).

### **3.7 Eutanásia e Coleta do material**

Aos 30 e 60 dias pós-operatórios, os animais foram submetidos a eutanásia com dose excessiva anestésica de 150mg/kg de Tiopental Sódico (Cristália Ltda., Itapira, SP, Brasil). Em seguida as calvárias foram cuidadosamente coletadas, os espécimes foram fixados em formol neutro tamponado a 10% (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltd., Catanduva, SP, Brazil) e descalcificados com EDTA 20% (Ethylene Diamine Tetrameric Acid, Merck, Kenilworth, NJ, USA), dissolvido em água Milli-Q em temperatura ambiente, com trocas semanais e por um período de 09 semanas. Posteriormente, as peças foram desidratadas usando uma sequência crescente de álcoois (70%, 90%, 95% e 100%), trocando a solução a cada uma hora. Na sequência, foram diafanizadas com Xylol e embebidos com parafina para obtenção de cortes de 5µm para coloração com hematoxilina e eosina (HE, Merck & Co., Inc., Kenilworth, NJ, USA).

### **3.8 Formas de Análise**

#### **3.8.1 Análise Histológica e Histomorfométrica**

Um único investigador (cego em relação à alocação dos grupos) realizou a análise histológica qualitativa descritiva e histomorfométrica em todas as amostras. A avaliação histomorfométrica foi realizada empregando-se o programa ImageJ® (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), versão 3.1. A área de osso neoformada (AON) foi expressa em micrometros e convertida para porcentagem, através da relação, taxa de AON / área total x 100, assim como a área de biomaterial e tecido conjuntivo. Cinco cortes de cada amostra foram preparados, no sentido paralelo a sutura sagital e posteriormente corado com hematoxilina e eosina (HE). Os cortes foram capturados por meio de um microscópio ótico (Leica DMLB, Heerbrugg, Switzerland) acoplado a uma câmera para captação das imagens (Leica DC 300F Microsystems Ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um computador Intel core i5 (Dell Computadores do Brasil Ltda, Hortolandia, SP, Brazil). Os cortes foram fotografados com aumentos de 4x e 40x. As imagens foram salvas em formato JPEG e analisadas através da ferramenta “hands free” do software Image J® (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), e então, a área de osso neoformada foi selecionada dentro da área de defeito e separada da área de tecido conjuntivo, biomaterial ou vaso sanguíneo.

#### **3.8.2 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no software Sigma Plot 12.0 (Exakt Graph and Data Analysis). Primeiramente, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação da homogeneidade de distribuição, seguido pela análise de 2-way ANOVA, seguido do teste de Tukey para múltiplas comparações, considerando  $p < 0,05$ .

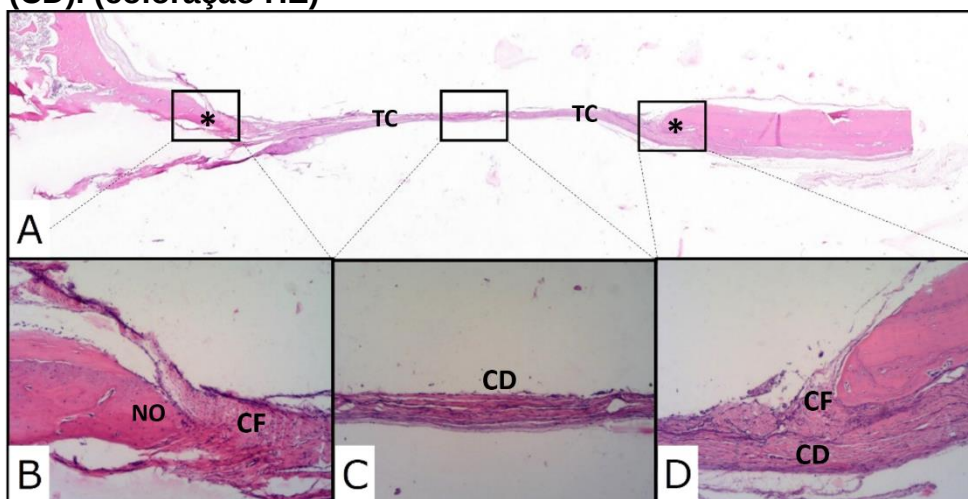
*Resultados*

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise qualitativa aos 30 dias

Aos 30 dias, no grupo GC, o defeito ósseo estava preenchido em todos os espécimes por tecido conjuntivo frouxo na região mais superficial e próximas às bordas ósseas do defeito ósseo (Figura 4B e 4D) e predominância de tecido conjuntivo denso na região mais profunda (Figura 4D) e no centro da cavidade (Figura 4C). Observa-se neoformação óssea discreta junto as bordas do defeito ósseo (Figura 4B).

**Figura 5 – Grupo Controle (GC) – 30 dias – 4A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC); 4B e 4D: presença de tecido conjuntivo frouxo (CF) próximo às bordas do defeito ósseo, tecido conjuntivo denso (CD) na região mais profunda e discreta neoformação óssea nas bordas do defeito; 4C: tecido conjuntivo denso na região central do defeito ósseo (CD). (coloração HE)**

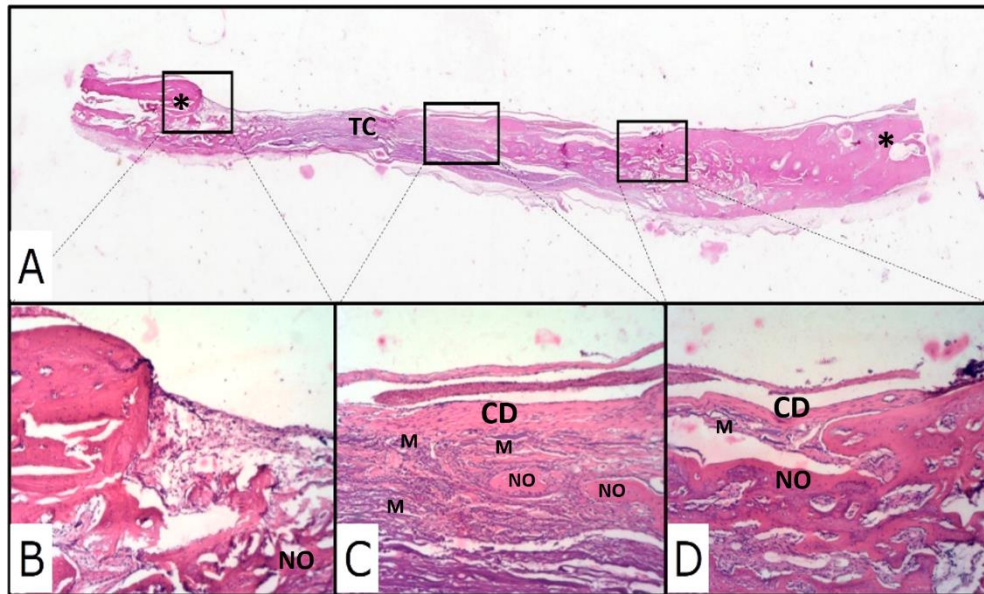


Fonte: Autoria própria, 2022

O grupo GM apresentou tecido conjuntivo mais espesso em toda a extensão do defeito ósseo (entre\*) (Figura 5A) em comparação ao grupo GC. Observa-se tecido conjuntivo denso na região superficial do centro do defeito ósseo (Figura 5C) além de remanescentes da membrana (Figura 5C) envolvidos ora por tecido conjuntivo denso, ora por tecido ósseo neoformado. Nota-se neoformação óssea das bordas do defeito ósseo em direção ao centro preenchendo-o parcialmente (Figuras 5B e 5D).



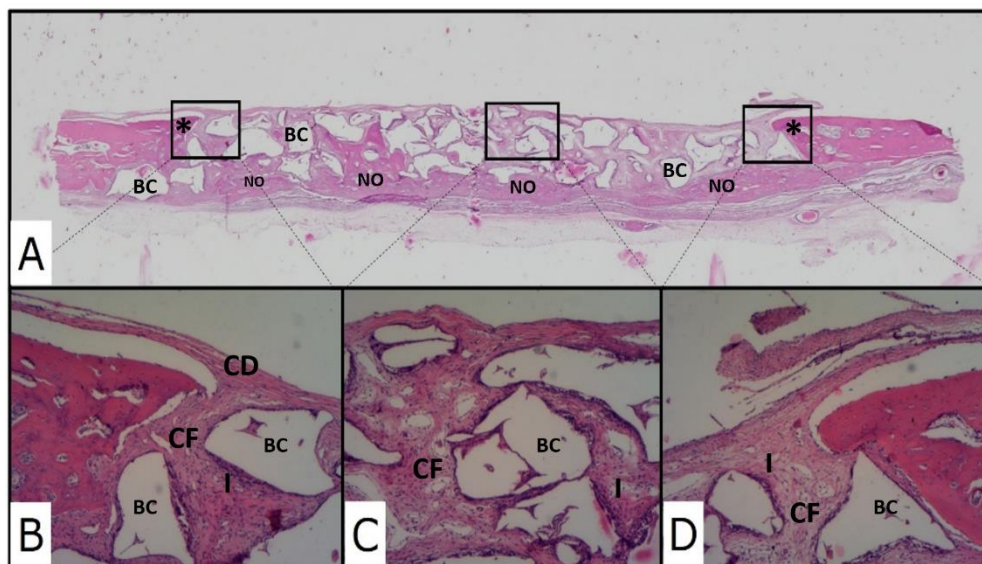
**Figura 6 – Grupo Membrana (GM) – 30 dias – 5A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) mais espesso; 5B: discreta neoformação óssea junto a borda do defeito ósseo (NO) no lado direito do defeito ósseo e mais intensa do lado esquerdo e tecido conjuntivo denso (CD); 5C: remanescentes da membrana envolvidos por tecido ósseo neoformado (NO) ou por tecido conjuntivo denso (CD); 5D: grande quantidade de tecido ósseo neoformado a partir da borda do defeito ósseo em direção ao centro. (coloração HE)**



Fonte: Autoria própria, 2022

No grupo GBC, nota-se presença do biomaterial envolvido por tecido conjuntivo (Figura 6A) na região superficial do defeito ósseo, no entanto, na região mais profunda, observa-se tecido ósseo neoformado (Figura 6A). Nos aumentos maiores (Figuras 6B, 6C e 6D), observam-se na região superficial partículas do biomaterial BoneCeramic envolvidas por tecido conjuntivo frouxo além de infiltrado inflamatório nas suas adjacências. As partículas do biomaterial localizadas nas regiões mais profundas estão parcial ou totalmente envolvidas por tecido ósseo neoformado que oblitera parcialmente o defeito ósseo (Figura 6A).

**Figura 7 – Grupo BoneCeramic (GBC) – 30 dias – 6A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial BoneCeramic (BC) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial e por tecido ósseo neoformado (NO) na região mais profunda do defeito ósseo; 6A, 6B e 6C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo frouxo (CF) e presença de infiltrado inflamatório (I). (coloração HE)**

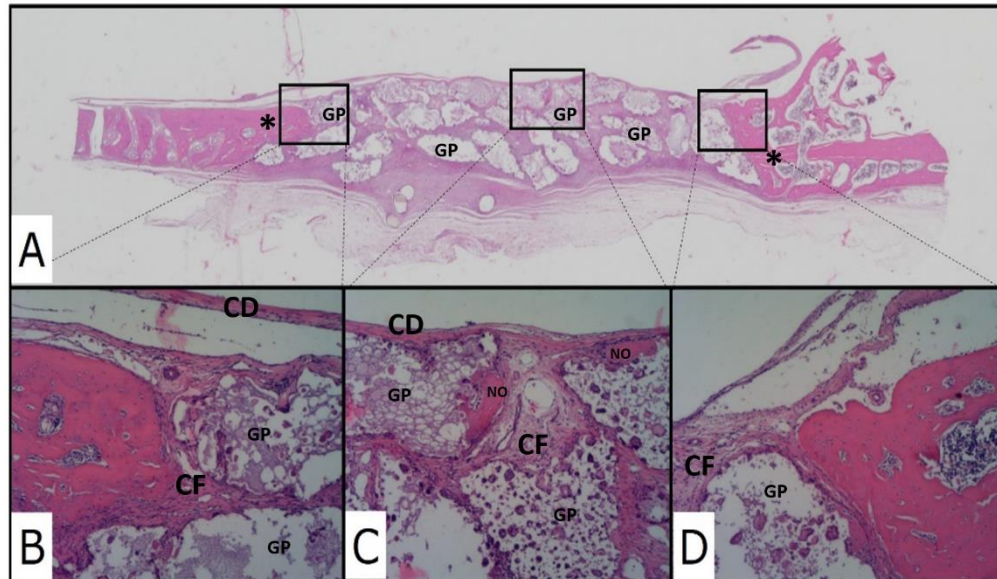


Fonte: Autoria própria, 2022

No grupo GGP, nota-se presença do biomaterial envolvido por tecido conjuntivo (Figura 7A) na região superficial do defeito ósseo. Nos aumentos maiores (Figuras 7B, 7C e 7D), observam-se na região superficial partículas do biomaterial GenPhos XP envolvidas por tecido conjuntivo frouxo na região mais profunda e por tecido conjuntivo denso na região mais superficial. Em alguns espécimes, observa-se neoformação óssea junto as partículas do biomaterial na região central do defeito ósseo (figura 7C).

**Figura 8 – Grupo GenPhos XP (GGP) – 30 dias – 7A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial**

GenPhos XP (GP) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial; 7A, 7B e 7C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo frouxo (CF) e por tecido ósseo neoformado (NO). (coloração HE)



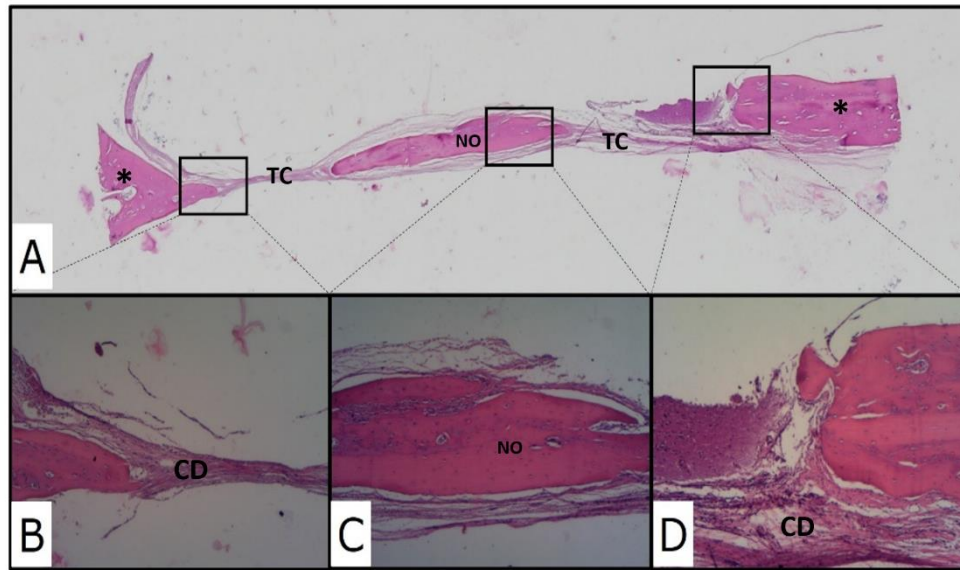
Fonte: Autoria própria, 2022

## 4.2 Análise qualitativa aos 60 dias

Aos 60 dias, o grupo GC apresenta preenchimento parcial do defeito ósseo com tecido ósseo neoformado na região central e tecido conjuntivo (Figura 8A) e discreta neoformação óssea nas bordas do defeito ósseo. Na figura 8B e 8D observa-se o tecido conjuntivo denso preenchendo o defeito e na figura 8C, o tecido ósseo neoformado.

**Figura 9 – Grupo Controle (GC) – 60 dias – 8A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com preenchimento por tecido conjuntivo (TC) e tecido ósseo**

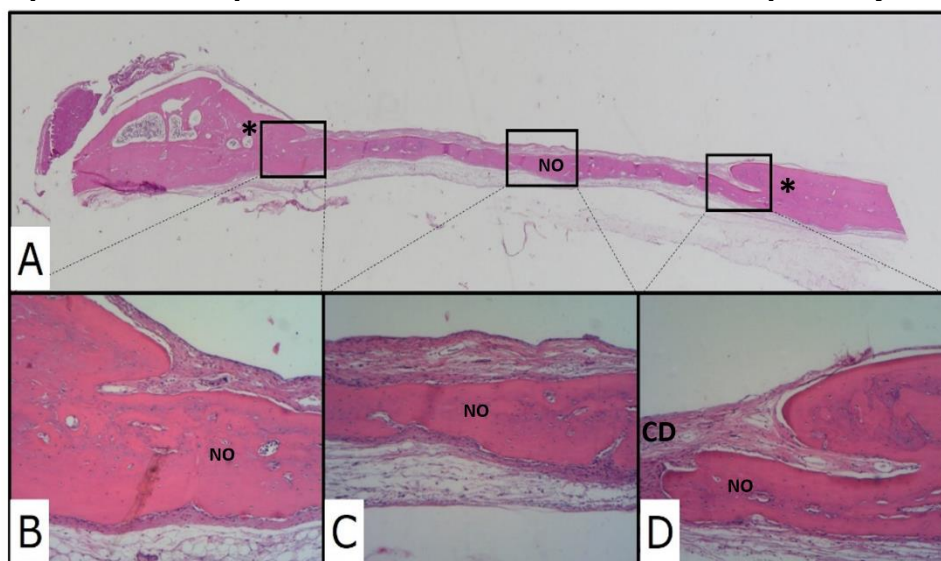
neoformado (NO); 8B e 8D: presença de tecido conjuntivo denso (CD) próximo às bordas do defeito ósseo; 8C: tecido ósseo neoformado (NO). (coloração HE)



Fonte: Autoria própria, 2022

O grupo GM apresenta neoformação óssea em toda a extensão do defeito ósseo obliterando-o na maioria dos espécimes. Não foi observado remanescente da membrana (Figura 9).

**Figura 10 - Grupo Membrana (GM) – 60 dias – 9A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com neoformação óssea total (NO); 9B, 9C e 9D: neoformação óssea (NO) obliterando praticamente todo o defeito ósseo (coloração HE)**

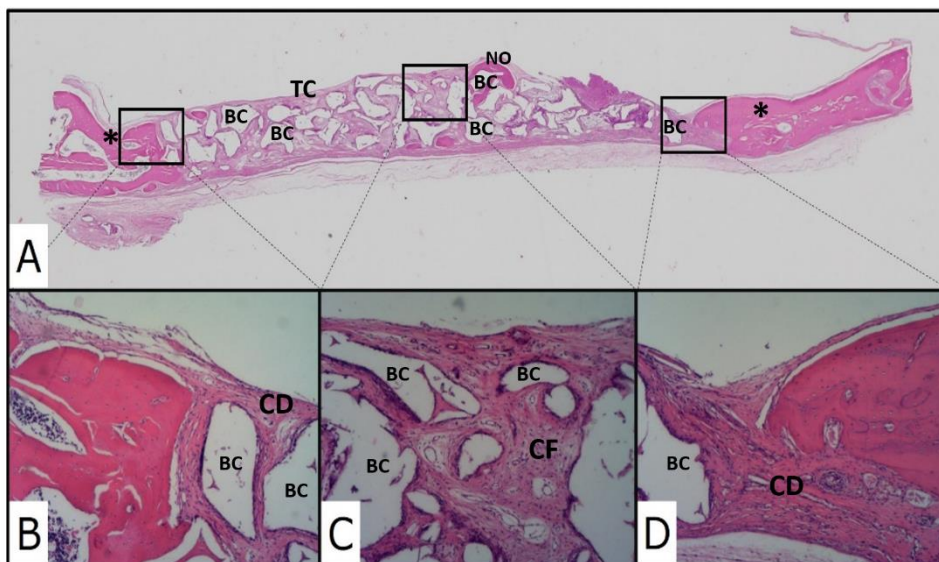


Fonte: Autoria própria, 2022



Na figura 10 (A, B, C e D) do grupo GBC observam-se as partículas do biomaterial entremeado por tecido conjuntivo predominantemente do tipo denso, com neoformação óssea ao redor das partículas do BoneCeramic principalmente mais próximo às bordas do defeito ósseo e com menor quantidade na região central (Figura 10A). Não foi observada a persistência da reação inflamatória vista no tempo anterior de 30 dias.

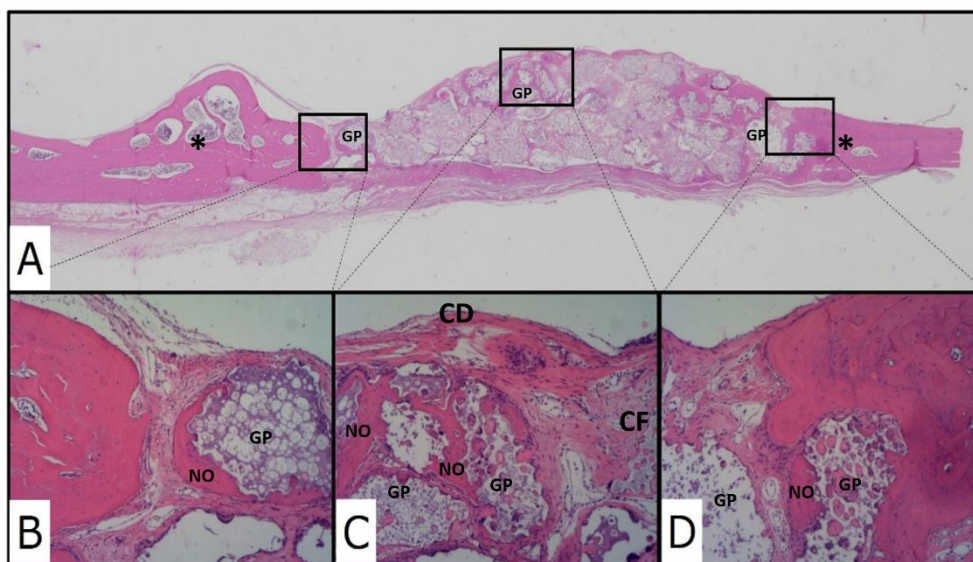
**Figura 11 - Grupo BoneCeramic (GBC) – 60 dias – 10A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial BoneCeramic (BC) envolvidas por tecido conjuntivo na região superficial e por tecido ósseo neoformado (NO) na região mais profunda do defeito ósseo; 10A, 10B e 10C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido conjuntivo denso (CD). (coloração HE)**



Fonte: Autoria própria, 2022

O grupo GGP também apresenta as partículas do biomaterial entremeado por tecido conjuntivo denso em menor quantidade em comparação ao grupo GBC (Figura 11A). Nas figuras 11A, 11B e 11C, nota-se neoformação óssea envolvendo as partículas do GenPhos XP tanto próximo às bordas do defeito ósseo como na região central como também tecido conjuntivo denso. Observa-se também tecido ósseo junto às porosidades do biomaterial (Figuras 11C e 11D).

**Figura 12 – Grupo GenPhos XP (GGP) – 60 dias – 11A: visão panorâmica do defeito ósseo (entre\*) com presença de grande quantidade de partículas do biomaterial GenPhos XP (GP) envolvidas por tecido conjuntivo ou por tecido ósseo próxima às bordas do defeito ósseo e na região central; 11A, 11B e 11C: partículas do biomaterial envolvidas por tecido ósseo neoformado (NO) ou por tecido conjuntivo denso (CD). (coloração HE)**



Fonte: Autoria própria, 2022

## 4.3 Análise quantitativa

### 4.3.1 Área óssea neoformada (AON)

Os dados (Tabela 1) demonstram que GC apresentou a menor quantidade de formação óssea (AON), 13,28% (aos 30 dias) e 19,57% (aos 60 dias) quando comparado aos outros grupos ( $p < 0,001$ ). Aos 30 dias, GM apresentou-se com 29,54% de AON e melhor que GC ( $p = 0,01$ ), contudo, sem diferença estatística quando comparada aos grupos GBC e GGP ( $p = 0,352$  e  $p = 0,964$ , respectivamente). Também houve diferença estatística aos 60 dias quando comparado GM (56,39%) e GC ( $p < 0,001$ ) e GBC ( $p < 0,001$ ), contudo sem diferença estatística quando comparada a GGP ( $p < 0,774$ ). Aos 30 dias o melhor resultado de AON pode ser observado no GBC (34,91%), seguido pelo GGP (29,36%), contudo sem diferença estatística ( $p = 0,450$ ). Já os 60 dias, o grupo GGP apresentou melhor valor para AON (57,56%) quando comparado a GBC (37,95%) ( $p < 0,001$ ) (Figura 12).

**Tabela 1 - Análise comparativa da média e desvio padrão (DP) da porcentagem de área óssea neoformada entre os grupos avaliados**

|         | <b>GC</b><br>(Média ± DP)  | <b>GM</b><br>(Média ± DP)  | <b>GBC</b><br>(Média ± DP) | <b>GGP</b><br>(Média ± DP)  |
|---------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 30 dias | 13,38 ± 4,54 <sup>Aa</sup> | 29,54 ± 8,83 <sup>Ab</sup> | 34,91 ± 6,03 <sup>Ab</sup> | 29,36 ± 10,70 <sup>Ab</sup> |
| 60 dias | 19,57 ± 7,44 <sup>Aa</sup> | 56,39 ± 7,40 <sup>Bb</sup> | 37,95 ± 3,89 <sup>Ac</sup> | 57,56 ± 4,86 <sup>Bb</sup>  |

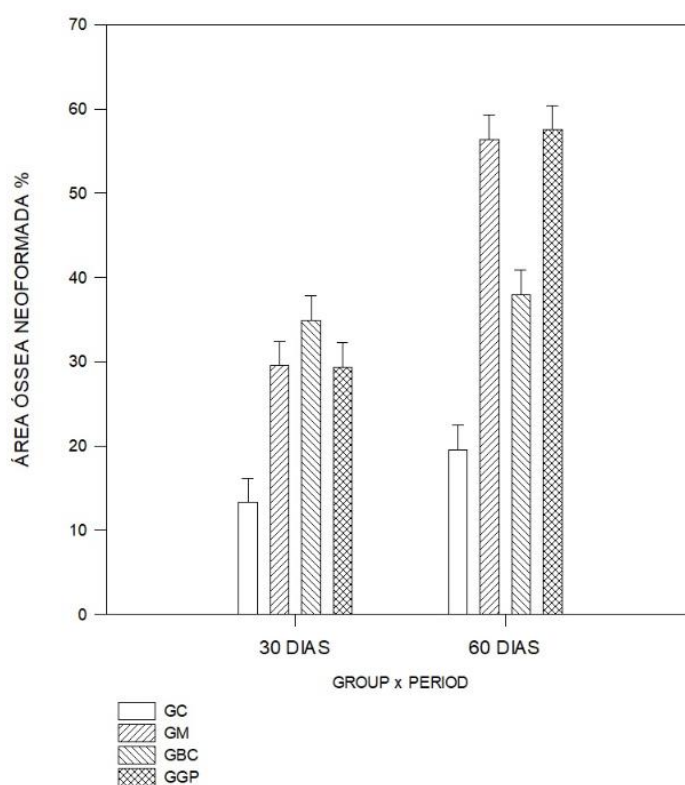
Letras diferentes em caixa alta indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em tempos diferentes.

Letras diferentes em caixa baixa indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre os grupos no mesmo período. (Two-Away Anova, com teste de normalidade de Shapiro-Wilk e múltipla comparação por Holm-Sidak).

Fonte: Autoria própria, 2022

**Figura 13 – Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para área de osso neoformado (AON) separado entre os tempos de análise**

**Porcentagem de Área Óssea Neoformada**

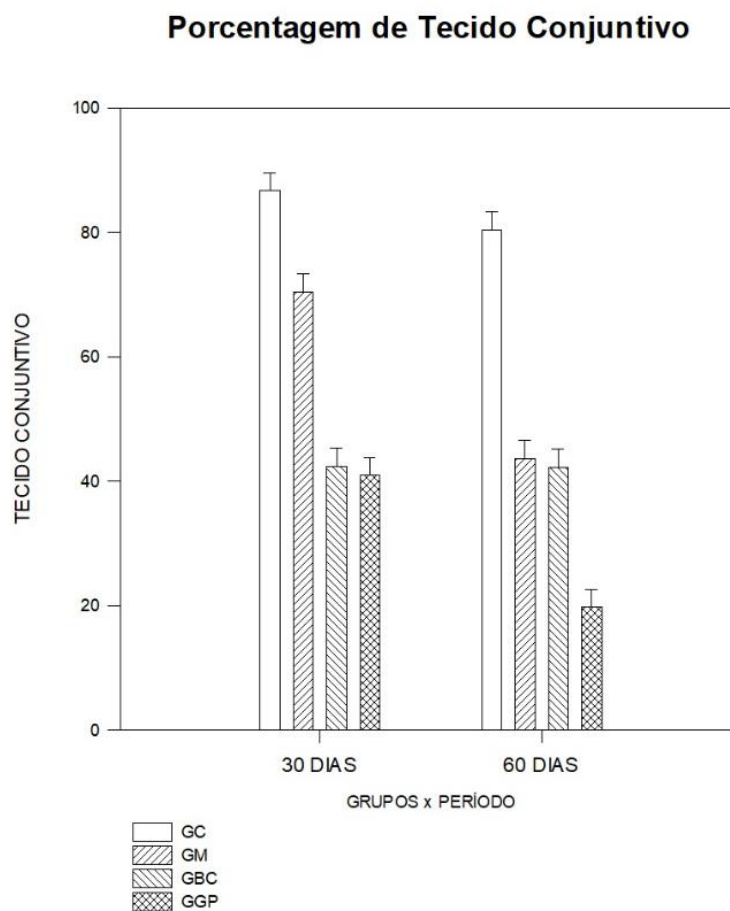


Fonte: Autoria própria, 2022

### 4.3.2 Quantificação do Tecido Conjuntivo

O grupo GC apresentou a maior quantidade de tecido conjuntivo aos 30 dias (86,71%) e 60 dias (80,43%), sem diferença estatística entre os períodos ( $p = 0,132$ ). Aos 30 dias, GM apresentou maior quantidade de tecido conjuntivo (70,43%), quando comparado a GC, GBC e GGP ( $p < 0,001$ ). Também houve diferença estatística aos 60 dias quando comparamos GM (43,61) com GC e GGP ( $p < 0,001$ ), contudo sem diferença estatística quando comparada a GBC ( $p < 0,736$ ). Aos 30 dias o grupo GBC apresentou 42,43% de tecido conjuntivo e o GGP, 40,88%, contudo sem diferença estatística ( $p = 0,708$ ). Já os 60 dias, o grupo GBC apresentou 42,22% de tecido conjuntivo e GGP, 19,74% ( $p < 0,001$ ) (Figura 13).

**Figura 14 – Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para quantificação de tecido conjuntivo separado entre os tempos de análise**



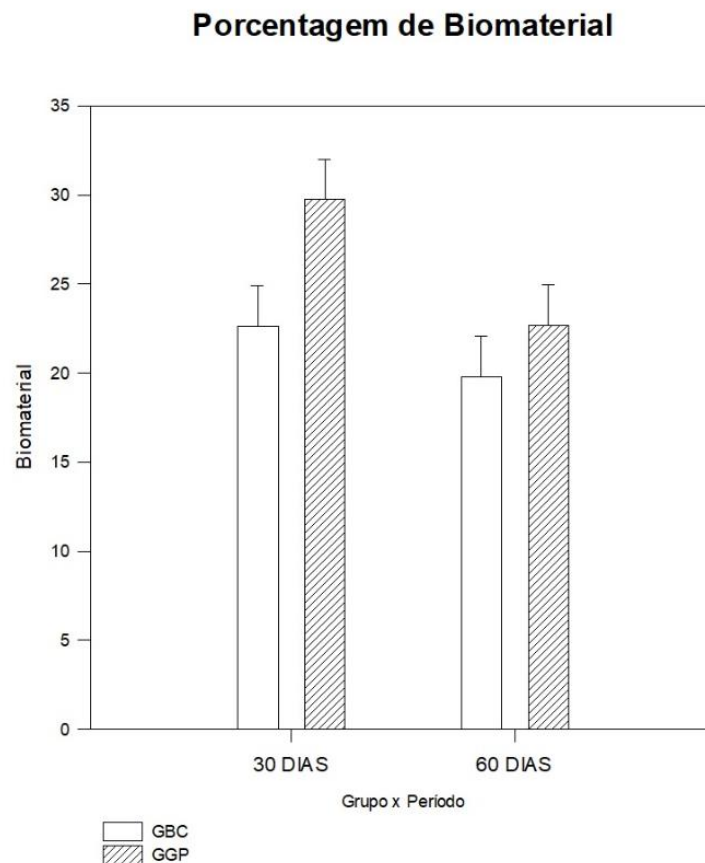
Fonte: Autoria própria, 2022



### 4.3.3 Quantificação do Biomaterial

Aos 30 dias, GBC apresentou 22,65% de biomaterial no interior do defeito, enquanto GGP 29,75% ( $p = 0,037$ ). No período de 60 dias, GBC apresentava 19,82% de biomaterial, enquanto GGP 22,69% ( $p = 0,378$ ). Não houve diferença entre a quantidade de biomaterial no grupo GBC entre os períodos de 30 e 60 dias ( $p = 0,385$ ), entretanto observamos diferença estatística no grupo GGP ( $p = 0,038$ ), entre os períodos de 30 e 60 dias (Figura 14).

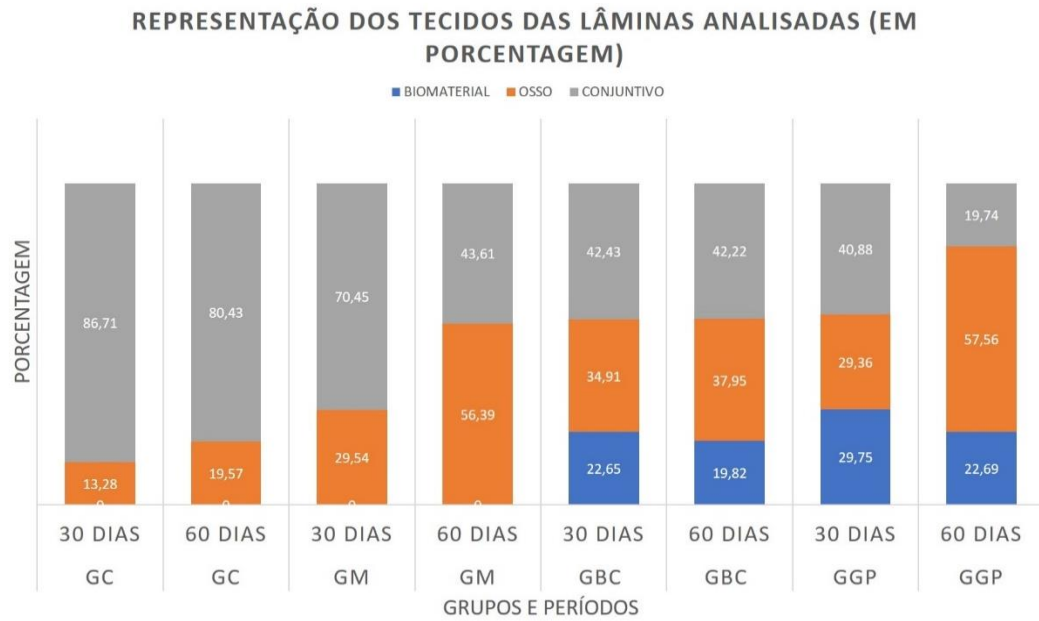
**Figura 15 - Gráfico representativo com as médias dos grupos em porcentagem para quantificação de biomaterial separado entre os tempos de análise**



Fonte: Autoria própria, 2022

Os dados dessas três variáveis (quantificação de AON, tecido conjuntivo e biomaterial) foram organizados em um gráfico de coluna de modo a comparar a quantidade de cada tecido dentro do defeito (Figura 15).

**Figura 16 – Gráfico representativo da média de quantificação de tecido ósseo, conjuntivo e biomaterial presente no defeito crítico nos tempos de 30 e 60 dias**



Fonte: Autoria própria, 2022

*Discussão*

## 5 DISCUSSÃO

Os pacientes edêntulos buscam uma reabilitação implantossuportada devido sua alta taxa de sucesso, função e estética.<sup>36,37,38,39</sup> Entretanto, a perda óssea é um processo contínuo e irreversível, que pode limitar ou contra indicar a instalação de implantes até que seja realizado alguma técnica de reconstrução do defeito ósseo.<sup>40</sup>

Como já esclarecido pela literatura, os defeitos críticos são aqueles que não são capazes de reparar por si só.<sup>41</sup> Modelos de estudos pré-clínicos em modelos animais, principalmente em calvária de ratos são os mais comum à serem realizados.<sup>42</sup> Resultados previamente publicados em uma revisão sistemática demonstram que defeitos superiores a 5 mm pode ser considerado críticos em ratos.<sup>43</sup> Como observados nessa pesquisa o grupo que teve seu defeito preenchido apenas por coágulo apresentou apenas discreta neoformação óssea periférica com presença de tecido conjuntivo na região central (Figuras 4 e 8), assim como, as menores porcentagens de AON (Tabela 1).

Contudo, o uso de membranas como barreira para regeneração óssea guiada (ROG) impede a proliferação de células lábeis no local destinado a células mais especializados como por exemplo os blastos, e apresentam resultados satisfatórios.<sup>44,45</sup> Isso pode explicar a maior formação óssea observada nos grupos cobertos pela membrana (GM) em relação ao grupo controle (GC) observado no presente estudo (Figura 12 e Tabela 1).

A preservação alveolar com o preenchimento de enxertos ósseos pode ser considerada um técnica efetiva para a preservação do volume ósseo após a perda dentária.<sup>46</sup> Vários subtítulos ósseos sintéticos vem sendo estudados na literatura, uma vez que os enxertos autógenos, embora considerados padrão ouro, representam para o paciente um segundo tempo cirúrgico com maior morbidade e desconforto.<sup>47,48</sup>

Esse estudo demonstrou o sucesso na aplicação de biomateriais osteocondutores à base de fosfato de cálcio em defeitos críticos na calvária de ratos. Sendo mais específico, dois biomaterial na forma de apresentação em grânulos de fosfato de cálcio, sendo um na razão de 60% / 40% HA /  $\beta$ -TCP (Strauman – BioCeramic® GBC) e outro com 70% / 30% HA /  $\beta$ -TCP (Baumer – GenPhos® GGP). Como demonstrado anteriormente, a análise histométrica permitiu observar o bom nível de osteocondução e formação óssea dos grupos com biomaterial e membrana (Figura 12).

Trabalhos previamente publicados vem demonstrando bons resultados na aplicação de matérias à base de hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) como substituo ósseo.<sup>49,50,51</sup> Desse modo, quando se opta pela utilização de biomaterial a base de fosfato de cálcio, a relação entre HA /  $\beta$ -TCP possui papel fundamental na atividade de reabsorção por osteoclastos devido a modificação da solubilidade da cerâmica.<sup>16,20,49,52</sup>

Os dados obtidos nesse estudo demonstraram que entre os períodos de 30 e 60 dias, houve maior reabsorção de biomaterial no grupo GGP quando comparado ao GBC (Figura 14). Como foi citado acima, o grupo GGP possui 70% da sua composição de HA, deixando a cerâmica com maior estabilidade em relação da GBC (60% de HA), ou seja, o GBC deveria apresentar maior solubilidade da cerâmica, portando maior reabsorção do biomaterial.

Contudo, os autores desse trabalho acreditam que a maior estabilidade do grupo GGP pode ter contribuído com a maior porcentagem de formação óssea no período de 60 dias (Tabela 1). As mudanças de porosidade, forma e tamanho do grânulo podem influenciar o resultado de neoformação óssea e até mesmo prover propriedades osteoindutoras.<sup>53,54,55,56</sup>

As cerâmicas cujos tamanhos de poros excedem 140  $\mu$ m mostraram um início mais curto de formação de vasos sanguíneos, maior densidade capilar funcional e maior volume de osso com respeito a tamanhos de poro mais baixos.<sup>57,58</sup> Fato este que pode ser observado uma vez que os grânulos do biomaterial do grupo GBC variam entre 0,5 – 1,0 mm e apresentam macroporosidade caracterizada por poros interconectados de diâmetro variando entre 100 - 500  $\mu$ m, enquanto GGP possui grânulos entre 0,5 – 0,75 mm e poros com diâmetros entre 70 – 240  $\mu$ m. O grupo GBC apresentou maior formação óssea no período de 30 dias quando comparado ao grupo GGP, contudo sem diferença estatística ( $p = 0,037$ ).

Devido às suas propriedades bioativas e a similaridade química com a fase mineral do osso, os biomateriais à base de fosfato de cálcio (CaP) são amplamente utilizados para a regeneração óssea. Muitos estudos vem demonstrando resultados favoráveis no reparo de defeitos ósseos com esses biomateriais, inclusive quando comprado ao osso bovino inorgânico (Bio-Oss®).<sup>18,31,32,48,59,60</sup> Evidencia-se que esses biomateriais ainda são muito estudados devido sua capacidade de atuar como

portadores de fármacos<sup>61,62</sup> e até mesmo para compreensão da influência das suas propriedades como a porosidade<sup>63,64</sup> proporção e configuração<sup>65,66</sup> no seu potencial osteocondutor.

*Conclusão*

## **6 CONCLUSÃO**

É possível concluir que os biomateriais a base de fosfato de cálcio que foram utilizados nesse estudo apresentaram atividade de osteocondução e permitiram neoformação óssea em área de defeitos críticos. No entanto, o biomaterial GenPhos® apresentou maior neoformação óssea no período final de análise quando comparado ao BoneCeramic®.



## *Referências*

## REFERÊNCIAS

1. Suprakash B, Ahammed AR, Thareja A, Kandaswamy R, Nilesh K, Bhondwe Mahajan S. Knowledge and attitude of patients toward dental implants as an option for replacement of missing teeth. *J Contemp Dent Pract.* 2013;14(1):115-8.
2. Schropp L, Wenzel A, Kostopoulos L, Karring T. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: a clinical and radiographic 12-month prospective study. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2003;23(4):313-23.
3. de Oliveira RC, Leles CR, Lindh C, Ribeiro-Rotta RF. Bone tissue microarchitectural characteristics at dental implant sites. Part 1: identification of clinical-related parameters. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(8):981-6.
4. MacBeth N, Trullenque-Eriksson A, Donos N, Mardas N. Hard and soft tissue changes following alveolar ridge preservation: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(8):982-1004.
5. Tanaka K. A comparison between the upper and lower jaws of the alveolar bone changes due to the extraction of frontal teeth. *Shika Kiso Igakkai Zasshi.* 1989;31(2):148-83.
6. Velnar T, Bunc G, Klobucar R, Gradisnik L. Biomaterials and host versus graft response: a short review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2016;16(2):82-90.
7. Hisbergues M, Vendeville S, Vendeville P. Zirconia: established facts and perspectives for a biomaterial in dental implantology. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;88(2):519-29.
8. Quiles JC, Souza FA, Bassi AP, Garcia IR Jr, França MT, Carvalho PS. Survival rate of osseointegrated implants in atrophic maxillae grafted with calvarial bone: a retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2015;44(2):239-44.
9. Ahlmann E, Patzakis M, Roidis N, Shepherd L, Holtom P. Comparison of anterior and posterior iliac crest bone grafts in terms of harvest-site morbidity and functional outcomes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(5):716-20.
10. Souza FA, Bassi APF, Aranega AM, Ponzoni D, Leonardi GB, Boos FBDJ, et al. Reconstruction of maxillary ridge atrophy caused by dentoalveolar trauma, using autogenous block bone graft harvested from chin: a case report. *J Osseointegr.* 2014;6(2):21-7.

11. Carvalho PSP, Pellizzer EP. Fundamentos em implantodontia: uma visão contemporânea. São Paulo: Quitesence; 2011.
12. Sakkas A, Wilde F, Heufelder M, Winter K, Schramm A. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*. 2017;3(1):23.
13. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418776819.
14. Norton MR, Wilson J. Dental implants placed in extraction sites implanted with bioactive glass: human histology and clinical outcome. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2002;17(2):249-57.
15. Thirivikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent Clin North Am*. 2017;61(4):835-56.
16. Ebrahimi M, Botelho MG, Dorozhkin SV. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;71:1293-312.
17. Frayssinet P, Trouillet JL, Rouquet N, Azimus E, Autefage A. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*. 1993;14(6):423-9.
18. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(3):195-200.
19. Fariña NM, Guzón FM, Peña ML, Cantalapiedra AG. In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *J Mater Sci Mater Med*. 2008;19(4):1565-73.
20. Bouler JM, Pilet P, Gauthier O, Verron E. Biphasic calcium phosphate ceramics for bone reconstruction: A review of biological response. *Acta Biomater*. 2017;53:1-12.
21. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1988;81(5):672-6.

22. Tuan TL, Keller LC, Sun D, Nimni ME, Cheung D. Dermal fibroblasts activate keratinocyte outgrowth on collagen gels. *J Cell Sci.* 1994;107(Pt 8):2285-9.
23. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med.* 2008;4:22.
24. Schneider D, Weber FE, Grunder U, Andreoni C, Burkhardt R, Jung RE. A randomized controlled clinical multicenter trial comparing the clinical and histological performance of a new, modified polylactide-co-glycolide acid membrane to an expanded polytetrafluorethylene membrane in guided bone regeneration procedures. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(2):150-8.
25. Konstantinidis I, Kumar T, Kher U, Stanitsas PD, Hinrichs JE, Kotsakis GA. Clinical results of implant placement in resorbed ridges using simultaneous guided bone regeneration: a multicenter case series. *Clin Oral Investig.* 2015;19(2):553-9.
26. Caffesse RG, Smith BA, Castelli WA, Nasjleti CE. New attachment achieved by guided tissue regeneration in beagle dogs. *J Periodontol.* 1988;59(9):589-94.
27. Imbronito AV, Todescan JH, Carvalho CV, Arana-Chavez VE. Healing of alveolar bone in resorbable and non-resorbable membrane-protected defects. A histologic pilot study in dogs. *Biomaterials.* 2002;23(20):4079-86.
28. da Silveira Gerzson A, Júnior PDR, Matsumoto MA, Duarte MAH, Weckwerth PH. Membranas para barreira utilizadas em ROG: características e indicações. *J Clin Dent Res.* 2016;13(4):120-5.
29. Gasque KCDS, Oliveira RCD, Ceolin D, Cestari TM, Taga R, Taga EM, et al. Avaliação da biocompatibilidade de uma membrana de pericárdio bovino acelular e seu potencial como carreador de osteoblastos. *Ciênc Odontol Bras.* 2008;11(1):58-66.
30. Ahn YS, Kim SG, Kim CS, Oh JS, Lim SC. Effect of guided bone regeneration with or without pericardium bioabsorbable membrane on bone formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(5 Suppl):S126-31.
31. Puttini IO, Poli PP, Maiorana C, Vasconcelos IR, Schmidt LE, Colombo LT, et al. Evaluation of osteoconduction of biphasic calcium phosphate ceramic in the calvaria of rats: microscopic and histometric analysis. *J Funct Biomater.* 2019;10(1):7.

32. Schmidt LE, Hadad H, Vasconcelos IR, Colombo LT, da Silva RC, Santos AFP, et al. Critical defect healing assessment in rat calvaria filled with injectable calcium phosphate cement. *J Funct Biomater*. 2019;10(2):21.
33. Furlaneto FA, Nagata MJ, Fucini SE, Deliberador TM, Okamoto T, Messoria MR. Bone healing in critical-size defects treated with bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(3):311-8.
34. Maciel J, Momesso GA, Ramalho-Ferreira G, Consolaro RB, de Carvalho PS, Faverani LP, et al. Bone healing evaluation in critical-size defects treated with xenogenous bone plus porcine collagen. *Implant Dent*. 2017;26(2):296-302.
35. Brånemark PI, Adell R, Breine U, Hansson BO, Lindström J, Ohlsson A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1969;3(2):81-100.
36. Brånemark PI, Hansson BO, Adell R, et al. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1977;16:1-132.
37. Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI. A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int J Oral Surg*. 1981;10(6):387-
38. Wang F, Wu Y, Zou D, Wang G, Kaigler D. Clinical outcomes of dental implant therapy in alveolar cleft patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(5):1098-1105.
39. Wermker K, Jung S, Joos U, Kleinheinz J. Dental implants in cleft lip, alveolus, and palate patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):384-390.
40. Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2016;44(10):1618-1629.
41. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986;(205):299-308.
42. Gomes PS, Fernandes MH. Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*. 2011;45(1):14-24.

43. Vajgel A, Mardas N, Farias BC, Petrie A, Cimões R, Donos N. A systematic review on the critical size defect model. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(8):879-893.
44. Donos N, Kostopoulos L, Karring T. Alveolar ridge augmentation using a resorbable copolymer membrane and autogenous bone grafts. An experimental study in the rat. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(2):203-213.
45. Khojasteh A, Kheiri L, Motamedian SR, Khoshkam V. Guided Bone Regeneration for the Reconstruction of Alveolar Bone Defects. *Ann Maxillofac Surg.* 2017;7(2):263-277.
46. Avila-Ortiz G, Chambrone L, Vignoletti F. Effect of alveolar ridge preservation interventions following tooth extraction: A systematic review and meta-analysis [published correction appears in *J Clin Periodontol.* 2020 Jan;47(1):129]. *J Clin Periodontol.* 2019;46 Suppl 21:195-223.
47. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol.* 2014;7 Suppl 2:S203-S217.
48. Cordaro L. Bilateral simultaneous augmentation of the maxillary sinus floor with particulated mandible. Report of a technique and preliminary results. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(2):201-206.
49. Rouvillain JL, Lavallé F, Pascal-Mousselard H, Catonné Y, Daculsi G. Clinical, radiological and histological evaluation of biphasic calcium phosphate bioceramic wedges filling medial high tibial valgisation osteotomies. *Knee.* 2009;16(5):392-397.
50. Wang Y, Wang K, Li X, Wei Q, Chai W, Wang S, et al. 3D fabrication and characterization of phosphoric acid scaffold with a HA/ $\beta$ -TCP weight ratio of 60:40 for bone tissue engineering applications. *PLoS One.* 2017;12(4):e0174870.
51. Escobar T, Almeida e Sousa J, Portela A, Vasconcelos M, Faria de Almeida R. The effect of a biphasic calcium phosphate on bone healing: a pilot study in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2014;29(6):1322-1331.
52. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials.* 1997;18(15):1037-1041.

53. Klawitter JJ, Hulbert SF. Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res Symp.* 1971;2:161–229.
54. Habibovic P, de Groot K. Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1(1):25-32.
55. Habibovic P, Kruyt MC, Juhl MV, Clyens S, Martinetti R, Dolcini L, et al. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res.* 2008;26(10):1363-1370.
56. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, et al. Influence of  $\beta$ -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4476-4487.
57. Klenke FM, Liu Y, Yuan H, Hunziker EB, Siebenrock KA, Hofstetter W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85(3):777-786.
58. Rustom LE, Boudou T, Lou S, Pignot-Paintrand I, Nemke BW, Lu Y, et al. Micropore-induced capillarity enhances bone distribution in vivo in biphasic calcium phosphate scaffolds. *Acta Biomater.* 2016;44:144-154.
59. Stein RS, Silva JB, Silva VD. Comparative study of bone neoformation using autologous grafting and three replacements: bone defects in rats. *Rev Bras Ortop.* 2015;44(4):330-335.
60. Fabris ALDS, Faverani LP, Gomes-Ferreira PHS, Polo TOB, Santiago-Júnior JF, Okamoto R. Bone repair access of BoneCeramic™ in 5-mm defects: study on rat calvaria. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20160531.
61. Park JC, Bae EB, Kim SE, Kim SY, Choi KH, Choi JW, et al. Effects of BMP-2 Delivery in Calcium Phosphate Bone Graft Materials with Different Compositions on Bone Regeneration. *Materials (Basel).* 2016;9(11):954.
62. Lee EU, Lim HC, Hong JY, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Bone regenerative efficacy of biphasic calcium phosphate collagen composite as a carrier of rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(11):e91-e99.

63. Dahlin C, Obrecht M, Dard M, Donos N. Bone tissue modelling and remodelling following guided bone regeneration in combination with biphasic calcium phosphate materials presenting different microporosity. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(7):814-822.
64. Lan Levengood SK, Polak SJ, Poellmann MJ, Hoelzle DJ, Maki AJ, Clark SG, et al. The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity. *Acta Biomater.* 2010;6(8):3283-3291.
65. Lim HC, Hong JY, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Late-term healing in an augmented sinus with different ratios of biphasic calcium phosphate: a pilot study using a rabbit sinus model. *J Periodontal Implant Sci.* 2016;46(1):57-69.
66. Lim HC, Zhang ML, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Effect of different hydroxyapatite:β-tricalcium phosphate ratios on the osteoconductivity of biphasic calcium phosphate in the rabbit sinus model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(1):65-72.



## ANEXOS

### ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

#### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Avaliação histomorfométrica da osteocondução de dois substitutos ósseos bifásicos de HA/β-TCP em defeitos críticos de calota craniana de ratos"**, Processo FOA nº 00253-2019, sob responsabilidade de Francisley Ávila Souza apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 08 de Outubro de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 20 de Janeiro de 2021.

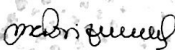
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 20 de Fevereiro de 2021.

#### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Histomorfometric evaluation of the osteoconduction of two biphasic bone hypersys of HA/β-TCP in critical defects of cranial rats calota"**, Protocol FOA nº 00253-2019, under the supervision of Francisley Ávila Souza presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on October 08, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** January 20, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** February 20, 2021.

  
**Profa. Associada Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

---

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais**  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234      Email CEUA: ceua@foa.unesp.br