



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada

IGOR DE OLIVEIRA PUTTINI

Avaliação da osteocondução do β -TCP em calvária de ratos. Análise histológica e histométrica.

Araçatuba, SP
2014

IGOR DE OLIVEIRA PUTTINI

**Avaliação da osteocondução do β -TCP em calvária de ratos.
Análise histológica e histométrica.**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Odontologia da Universidade
Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”,
Campus de Araçatuba, como parte dos
requisitos para a obtenção do título de bacharel
em Odontologia.**

Orientador: Prof. Ass. Dr. Francisley Ávila Souza

ARAÇATUBA/SP

2014

IGOR DE OLIVEIRA PUTTINI

Avaliação da osteocondução do β -TCP em calvária de ratos. Análise histológica e histométrica.

Trabalho de conclusão de curso aprovado em 17/09/2014 para obtenção do título de Bacharel em Odontologia

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Francisley Ávila Souza

Prof^a. Dr^a. Alessandra Marconde Aranega

Dr. Leonardo Perez Faverani

Aos meus Pais Geraldo Gilson Puttini e Lucy Imaculada de Oliveira Puttini

Pelo suporte, doação e sacrifícios.

Agradecimentos

Meu real agradecimento a todos que foram responsáveis por fazer deste trabalho hoje uma realidade.

*Ao meu Orientador Professor **Francisley Ávila Souza** pela oportunidade e dedicação,*

*À Professora **Alessandra Marcondes Aranega** que me recebeu pela primeira vez no departamento de cirurgia e clinica integrada e aceitou fazer parte da banca examinadora,*

*Ao Professor **Leonardo Perez Faverani** que além de me ensinar a ciência me ensinou também a humanidade, perseverança, dedicação, perfeccionismo e humildade,*

*À Senhora **Maria Dirce Colli** e ao Senhor **Paulo Gratão** pelos ensinamentos práticos e apoio,*

*À Professora **Ana Paula Farnezi Bassi** pela inspiração como ser humano e pelo ânimo intrínseco,*

*À Professora **Daniela Ponzoni** pelos ensinamentos, paciência e profissionalismo,*

À todos os funcionários que permitiram, através de seus esforços diários, que hoje este trabalho e toda a minha graduação tenham sido concluídos com êxito e sucesso,

*À Universidade Estadual Paulista “**Júlio de Mesquita Filho**” – Faculdade de Odontologia de Araçatuba por ter me recebido e oferecido todos os recursos e estrutura para a minha formação como profissional,*

*Meus sinceros agradecimentos aos amigos da graduação **João Rodolpho Schiavoni** e **Gustavo Momesso** pelos momentos compartilhados,*

*Aos alunos da Pós-Graduação **Maria Del Pilar Rodriguez Sanchez**, **Rafael Santiago**, **Júlio Cesar**, **Tárik Polo**, **André Fabris** e **Lamis Meorin Nogueira** pela colaboração com meu crescimento, e em especial à **Sabrina Ferreira** que me ensinou e me orientou em grande parte deste trabalho,*

*Aos meus amigos **Gestter Willian Lattari Tessarin e Éverton Ribeiro Lelis** por terem compartilhado grande parte de minha vida e oferecido uma amizade real,*

*Meu profundo agradecimento à **Lara Cristinha Oliver Gimenez** por fazer parte da minha vida, dar-lhe sentido, pelo crescimento, pelo amor, por todos os momentos compartilhados, pelos planos, pelos sonhos, pelo real, pela dedicação e por existir,*

*Às Minhas avós **Sebastiana Ferreira de Oliveira e Hilda Alsleben Puttini** e ao meu finado avô **Elias da Silva de Oliveira** por todo o carinho sempre compartilhado,*

*Ao meu irmão **Enzo de Oliveira Puttini** por ter sempre me amado e se orgulhado de mim,*

*Aos meus Pais **Geraldo Gilson Puttini e Lucy Imaculada de Oliveira Puttini** por sempre fazerem o que estava em seu alcance ou além dele para que me fosse possível crescer, por me darem amor, por sempre me darem apoio, por sempre me darem suporte e por terem acreditado em mim,*

*E por fim a **Deus**, por ter sido sempre benevolente à mim.*

Obrigado!

*“O entusiasmo é a maior força da alma.
Conserva-o e nunca te faltará poder para conseguires o que desejas.”*
Napoleão Bonaparte

PUTTINI, I. O. **AVALIAÇÃO DA OSTEOCONDUÇÃO DA CERÂMICA DE FOSFATO DE CÁLCIO EM CALVÁRIA DE RATOS. ANÁLISE MICROSCÓPICA E HISTOMÉTRICA.**

31f. Trabalho de Conclusão de Curso – FOA – UNESP – Araçatuba, 2014.

Resumo

Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão ouro” pela literatura, tanto pela qualidade como a quantidade do osso neoformado são superiores quando comparado aos demais enxertos. No entanto, o enxerto de osso autógeno possui limitações, como a necessidade de um segundo tempo e sítio cirúrgicos, aumentando a morbidade cirúrgica; limitada disponibilidade para grandes reconstruções e uma taxa de reabsorção imprevisível. Isto motivou pesquisadores a considerarem como alternativa sua associação com biomateriais ou apenas a utilização destes como substitutos ósseos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade osteocondutora do β -Tricálcio Fosfato (β -TCP) em defeito de tamanho crítico em calvárias de ratos. foram utilizados 45 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), machos, adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Um defeito de 7 mm de diâmetro foi realizado na calvária de cada animal. Os animais foram divididos em três grupos segundo o material de preenchimento do defeito. São eles: coágulo (GC), coágulo membrana (GCM) e cerâmica de fosfato de cálcio (TCPG). Nos grupos experimentais de 7 e 30 dias não foi possível observar diferença estatística entre a área de osso neoformado dos preenchimentos testados ($p > 0,05$), contudo, quando comparado os grupos de 60 dias o grupo TCPG apresentou uma neoformação óssea estatisticamente significativa quando comparado aos grupos GC e GCM ($p < 0,001$). Sendo assim, os resultados sugerem que o material testado pode ser uma potencial alternativa em enxertos.

Palavras-chave: Cerâmica, Osso, Ossos, Materiais biocompatíveis.

PUTTINI, I. O. **EVALUATION OF CALCIUM PHOSPHATE CERAMICS OSTEOCONDUCTION IN RATS' CALVARIA. MICROSCOPIC AND HISTOMETRIC ANALYSIS.** 31p. Coursework – FOA – UNESP – Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Autogenous bone grafts are considered the "gold standard" in the literature, both for quality and quantity of newly formed bone are superior when compared to other grafts. However, autologous bone grafts have limitations such as the need for a second surgical site and pitch, increasing surgical morbidity; limited availability for large reconstructions and unpredictable resorption rate. This led researchers to consider as an alternative its association with biomaterials or just using these as bone substitutes. The aim of this study was to evaluate the osteoconductive calcium phosphate ceramic in critical size defects in rats' calvaria. 45 rats (*Rattus norvegicus*, Albinus, Wistar) adult male, weighing between 450 and 500g were used. A defect of 7 mm diameter was performed on the calvaria of each animal. The animals were divided into three groups according to the material filling the defect. They were: clot (CG), membrane clot (MCG) and calcium phosphate ceramic (TCPG). Euthanasia were performed within 7, 30 and 60 days. The specimens were fixed in 10% formalin, processed and stained with HE. Statistical analysis were conducted by comparing the control group and the treated. The tests were conducted by GMC software used for statistical analysis in studies in health. The 7 and 30 days experimental did not exhibit statistical difference in newly formed bone area between the fillers tested ($p > 0,05$), however, when the 60-day group were compared, TCPG group showed a statistically significant new bone formation when compared to CG and MCG ($p > 0,001$). Thus, the results suggest that the tested material may be a potential alternative grafts.

Keywords: Ceramics, Bone and Bones, Biocompatible Materials.

Lista de Figuras

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo – defeito em calvária_____	17
Figura 2 – Desenho esquemático do defeito em calvária._____	18
Figura 3 – Grupo coágulo aos 7 dias 64x._____	21
Figura 4 – Grupo coágulo aos 30 dias 64x._____	21
Figura 5 – Grupo coágulo aos 60 dias 64x._____	22
Figura 6 – Grupo coágulo Membrana aos 7 dias 64x._____	22
Figura 7 – Grupo coágulo Membrana aos 30 dias 64x._____	23
Figura 8 – Grupo coágulo Membrana aos 60 dias 64x._____	23
Figura 9 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 7 dias 64x._____	24
Figura 10 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 30 dias 64x._____	24
Figura 11 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 60 dias 64x._____	24

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Comparação entre Tempos e Grupos experimentais pelo teste ANOVA.	25
Tabela 2 – Comparação entre os tempos experimentais pelo pós-teste Turkey.	25
Tabela 3 – Comparação entre os Grupos experimentais pelo pós-teste Turkey.	26
Tabela 4 – Comparação entre grupos aos 7 dias pelo pós-teste Turkey.	26
Tabela 5 – Comparação entre os grupos aos 30 dias pelo pós-teste Turkey.	27
Tabela 6 – Comparação entre os grupos aos 60 dias pelo pós-teste Turkey.	27

SUMÁRIO

I. Introdução	13
II. Objetivos	15
III. Materiais e Métodos	15
1. <i>Delineamento Experimental</i>	15
1.1. <i>Defeitos em calvária</i>	16
2. <i>Procedimentos Cirúrgicos</i>	17
2.1. <i>Defeitos em Calvária</i>	17
3. <i>Preparo das Amostras</i>	19
4. <i>Análise Histomorfométrica</i>	20
5. <i>Análise Estatística</i>	20
IV. Resultados	21
1. <i>Descrição Histológica</i>	21
2. <i>Resultados estatísticos</i>	25
V. Discussão	28
VI. Referências Bibliográficas	29

I. Introdução

A reabilitação bucal por meio das próteses implantorretidas e as implantossuportadas proporcionaram substancial avanço técnico-científico para a clínica odontológica. Atualmente, com os implantes osseointegráveis, a restauração da instabilidade oclusal e, por conseguinte, a promoção da harmonia facial, os pacientes alcançaram êxito no aspecto estético-funcional (Bränemark; Adell; Breine et al., 1969).

O uso de implantes representa uma importante opção de tratamento para pacientes total e parcialmente edêntulos, entretanto, o sucesso em longo prazo depende de um íntimo contato do tecido ósseo com o implante pela osseointegração (Olsen et al. 2005). Fundamentado em investigações clínico-científicas de mais de 15 anos, foram estabelecidos os padrões biológicos da conexão direta estrutural e funcional entre o osso vivo e a superfície de um implante submetido a uma carga oclusal, denominada de osseointegração (Bränemark; Adell; Breine et al., 1969; Bränemark; Hanssin; Adell et al., 1977; Bränemark; Adell; Albrektsson et al., 1983 e Adell; Lekholm; Rockler et al., 1981).

No entanto, a ausência do elemento dental no processo alveolar leva a graves e irreversíveis reabsorções ósseas. A falta de osso nos rebordos alveolares é um fator limitante para a colocação dos implantes dentários e, geralmente, é causada principalmente por traumatismos dentoalveolares, extrações dentárias traumáticas, ausência dentária congênita, ou em outras patologias que envolvam maxila e mandíbula. Esta perda óssea é uma limitação para a reabilitação com implantes, pois volume ósseo inadequado compromete a estabilidade primária (Magro-Filho; Bassi; Garcia-Júnior et al., 2003).

O tecido ósseo possui alta capacidade de reparação e regeneração podendo restaurar sua estrutura e funções originais completamente (Freire, 2010). Porém, em alguns casos, devido ao tamanho do defeito, o tecido ósseo não se repara

completamente. Nestas situações, o rebordo alveolar remanescente inviabiliza a instalação de implantes, sendo necessário lançar mão das técnicas de enxertia para devolução do contorno ósseo mínimo necessário para o procedimento. (Daculsi et al, 2003)

Os enxertos ósseos autógenos são considerados “padrão ouro” pela literatura, tendo em vista sua alta previsibilidade de sucesso (Ahlmann; Patzakis; Roidis et al., 2002). Não só a qualidade como a quantidade do osso neoformado foram superiores quando comparado a aloenxertos (Nishibori et al., 1994). É o único enxerto com potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor, não exibindo propriedades antigênicas, existindo em abundância e prove adequada estabilidade e suporte (Boyne, 1973). No entanto, o enxerto de osso autógeno possui limitações, como a necessidade de um segundo passo e sítio cirúrgicos, aumentando a morbidade cirúrgica; limitada disponibilidade para grandes reconstruções e uma taxa de reabsorção imprevisível. Isto motivou pesquisadores a considerarem como alternativa sua associação com biomateriais (Hench, 1998; Sbordone et al., 2009) ou apenas a utilização destes como substitutos ósseos (Rutherford et al., 1992).

Os biomateriais podem ser divididos em: (1) metais, como titânio, aço inoxidável, ligas de Cr-Co e ouro; (2) polímeros, como nylon, siliconas, Teflon®, Dacron®; (3) cerâmicas, como óxido de alumínio, hidroxiapatita (HA), o fosfato tricálcico e os biovidros; e (4) compósitos (Park, Lakes, 1992). Biocerâmicas constituídas por uma mistura de HA e β -tricálcio fosfato (β -TCP) tem exibido bioatividade favorável e osteocondutividade (Frayssinet et al., 1993; Daculsi et al., 2003).

Devido à sua boa biocompatibilidade e bioatividade, cerâmicas de fosfato de cálcio (CaP) têm sido largamente utilizada clinicamente como substituto ou para reparação de tecido duro (Ducheyne, de Groot, 1981). O Graftys BCP® (Latin American Solutions –

LAS, Brasil) é uma mistura na forma de grânulos de proporção 60:40 entre um componente estável HA e outro mais bioativo e muito absorvível β -TCP, associada com a presença da micro, meso e macroporosidades, de acordo com as informações do fabricante, promove e permite um crescimento ósseo mais estável e uniforme. Suas principais indicações são para preenchimento ósseo de cavidades, fraturas com perda óssea, artrodese vertebral, pseudoartrose, artroplastia e odontologia em geral (Seok H, et al, 2014)

II. Objetivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade osteocondutora da cerâmica de fosfato de cálcio em defeito de tamanho crítico em calvária de ratos.

III. Materiais e Métodos

1. Delineamento Experimental:

Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOA-UNESP, de acordo com o processo 01245-2012.

1.1. Defeitos em Calvária:

Foram utilizados para a realização deste estudo 45 (quarenta e cinco) ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar), machos, adultos, com peso corporal entre 450 e 500g. Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, UNESP onde foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente climatizado, e foram alimentados com ração sólida padrão e água “*ad Libitum*”, durante todo o experimento.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos equitativos que compuseram a amostra do trabalho (Figura 1):

Grupo coágulo (GC): o defeito de tamanho crítico cirurgicamente confeccionado foi preenchido com coágulo sanguíneo;

Grupo coágulo/membrana (GCM): o defeito de tamanho crítico cirurgicamente confeccionado foi preenchido com coágulo sanguíneo e recoberto por membrana cortical bovina;

Grupo cerâmica de fosfato de cálcio (TCPG): o defeito de tamanho crítico cirurgicamente confeccionado foi preenchido com a cerâmica de fosfato de cálcio particulado (Graftys BCP[®], Latin American Solutions – LAS, Brasil) e recoberto por membrana cortical bovina.

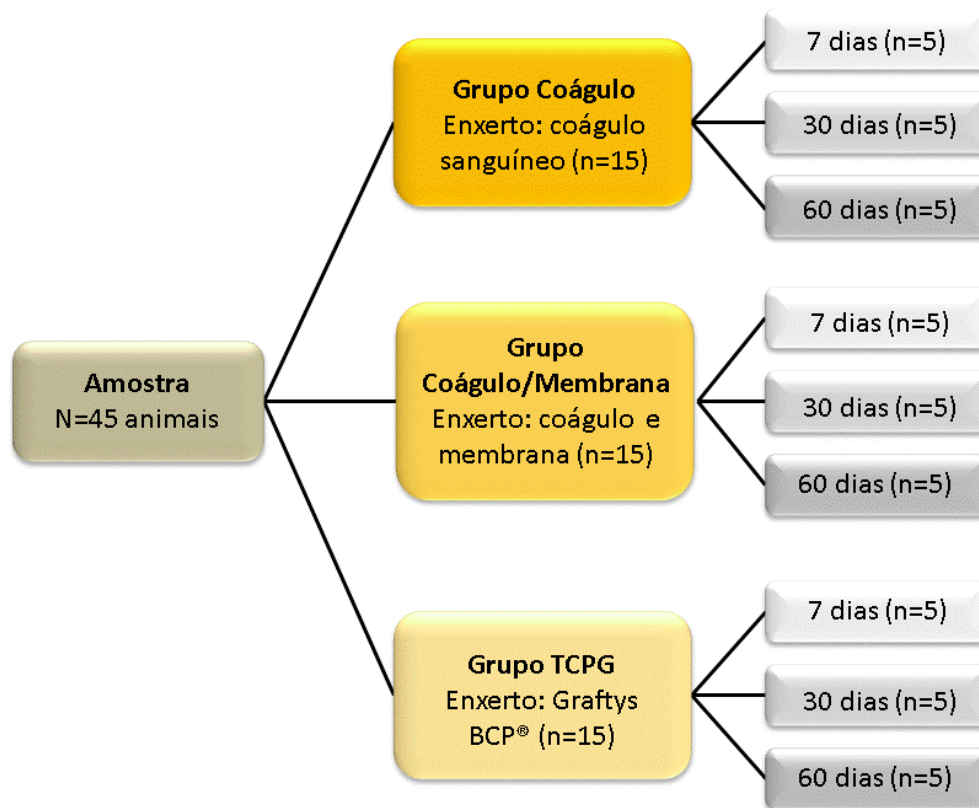


Figura 1 – Delineamento experimental do estudo – defeito em calvária

2. Procedimentos Cirúrgicos:

2.1. Defeitos em Calvária:

Após jejum de 12 horas os animais foram submetidos à sedação geral pela administração via intramuscular de Cloridrato de Ketamina a 1% (Vetaset® – Fort Dodge, Saúde Animal LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil Farmacêuticos LTDA, Campinas, Brasil), na dosagem de 10mg/Kg, e do Cloridrato de Xilazina a 2% (Dopaser® – Laboratório Calier do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), na dosagem de 5mg/Kg.

Após indução anestésica, foi realizada tricotomia manual na região fronto-parietal, posicionamento do animal em decúbito ventral, antissepsia da área com PVPI tópico (PVPI aquoso a 10%, com 1% de iodo ativo, Riodeine®, Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil) e colocação de campos estéreis. Em seguida foi realizado o acesso cirúrgico por incisão linear mediana de 2 cm sobre a calvária do animal com lâmina de bisturi nº 15C (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) montada em cabo de bisturi número 3 (Hu-Friedy®, Chicago, IL, EUA). O retalho total foi descolado, rebatido e afastado com descoladores para exposição do osso parietal de ambos os lados. Com uma broca trefina de 7 mm (Neodent®, Curitiba, Paraná, Brasil) e com auxílio de um contra ângulo redutor de 20:1 (Kavo® do Brasil, Joinville, Brasil) adaptado em um motor de rotação controlada (modelo BLM 600 plus, Driller®, Jaguaré, São Paulo, Brasil) a uma velocidade de 1500 rpm foi realizada a osteotomia na região mediana entre os parietais envolvendo a cortical externa e interna da calvária. O osso parietal osteotomizado foi removido e a dura-máter mantida intacta (Figura 2).

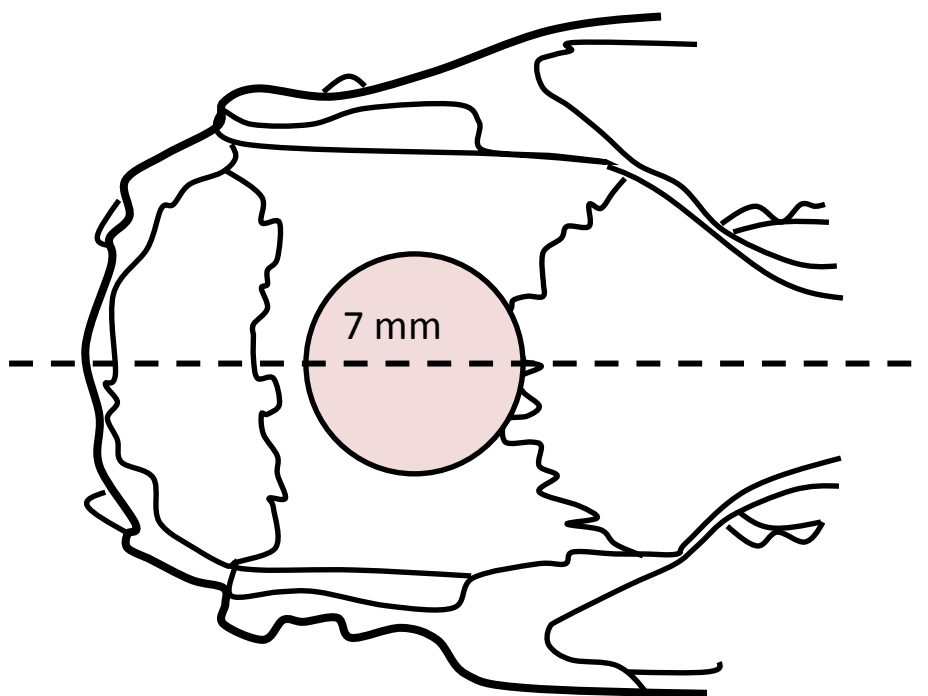


Figura 2 – Desenho esquemático do defeito em calvária.

O defeito ósseo foi realizado em 45 (quarenta e cinco) animais, divididos em três grupos, que tiveram os defeitos preenchidos com coágulo sanguíneo, coágulo sanguíneo recoberto com membrana cortical bovina GenDerm® (Genius biomateriais – Baumer, Frauenfeld, Suíça) recortada em círculo para melhor adaptação e tricálcio fosfato Graftys BCP® (Latin American Solutions – LAS, São Paulo, SP, Brasil) recoberto com membrana cortical bovina GenDerm® (Genius biomateriais – Baumer). Finalizado o enxerto, o retalho total foi reposicionado e a sutura realizada com fio de Nylon 5-0 (ETHILON Nylon Suture®, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) por pontos interrompidos simples.

A eutanásia dos espécimes foi realizada nos períodos de 7, 30 e 60 dias, sendo 5 animais de cada grupo por período. A eutanásia foi realizada por dose excessiva de anestésico para a remoção da calvária do animal com margem de no mínimo 3 mm de tecido ósseo ao redor do defeito cirúrgico.

3. Preparo das Amostras:

As peças foram fixadas em formol neutro 10% tamponado (Reagentes Analíticos®, Dinâmica Odonto-Hospitalar Ltda, Catanduva, SP, Brasil) e foram submetidos à descalcificação em EDTA 20% (Ácido Etileno Diamino Tetracético, Merck) dissolvido em água MiliQ, com trocas semanais por um período de 6 semanas, à temperatura ambiente. Em seguida o material foi desidratado utilizando uma sequência crescente e gradativa de alcoóis 70, 90, 95 e 100, com troca de solução a cada 1 hora, em agitador orbital (KLine CT – 150®, Cientec – Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil). Após estas etapas, foi realizada a diafanização com xilol e posterior, inclusão em parafina para obtenção de corte com 6 µm de espessura montados em lâminas de vidro para a coloração em hematoxilina e eosina (HE Merck & Co., Inc., NJ, EUA).

Previamente a realização das análises histométricas, as amostras foram codificadas de maneira onde somente o orientador tinha conhecimento a quais grupos pertenciam. Um único examinador realizou as análises e o mesmo desconhecia o respectivo grupo da secção.

4. Análise Histométrica:

Após as lâminas serem coradas com HE (Merck & Co., Inc. , NJ, EUA), mensurações foram realizadas utilizando um microscópio óptico (LeicaR® DMLB, Heerbrugg, Suíça) acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR® DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Suíça) e conectado a um microcomputador Intel® core i5 (CA, Estados Unidos). As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem analisadas. Nos defeitos em calvária foi avaliada a área de tecido ósseo neoformado em μm^2 , no centro do defeito por meio da mensuração realizada pelo software analisador de imagens digitalizadas ImageJ® (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontário, Canadá).

5. Análise Estatística:

Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de homocedasticidade Shapiro-Wilk, os quais mostraram distribuição heterogênea ($p < 0,05$). Para a comparação entre os tempos experimentais de eutanásia (7, 30 e 60 dias) e grupos dos materiais utilizados para preenchimento do defeito (GC, GCM e TCPG), foi aplicada a análise de variância a 2 fatores – ANOVA. E como pós-teste para os valores que apresentaram significância estatística, aplicou-se o teste Tukey. Foi adotado para todos os testes o nível de significância de 5%.

IV. Resultados

1. Descrição histológica:

No grupo coágulo aos sete dias (figura 3) foi possível observar quase nenhum osso neoformado, mostrando o coágulo organizado entre as áreas dos cotos e sem infiltrado inflamatório significativo.

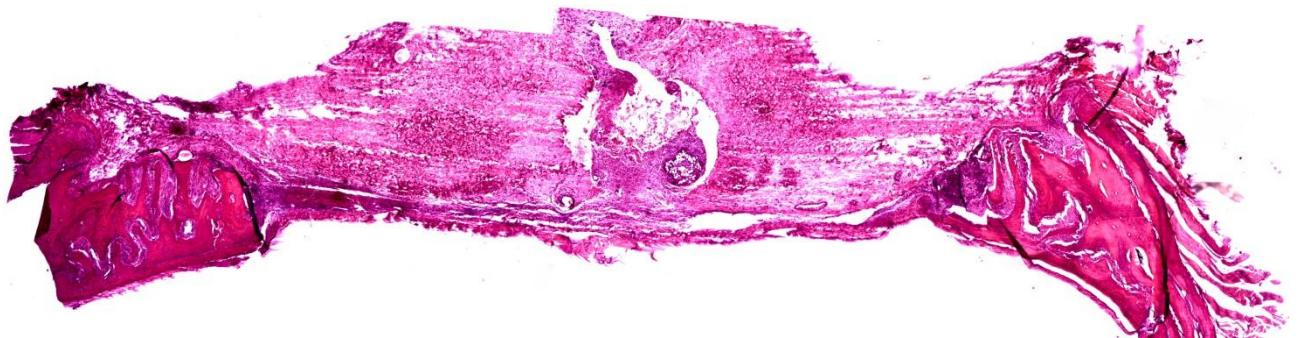


Figura 3 – Grupo coágulo aos 7 dias.

No período de 30 dias (figura 4), o Grupo coágulo já apresentava uma área óssea neoformada maior próximo aos cotos do defeito. O espaço entre estes estava preenchido por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

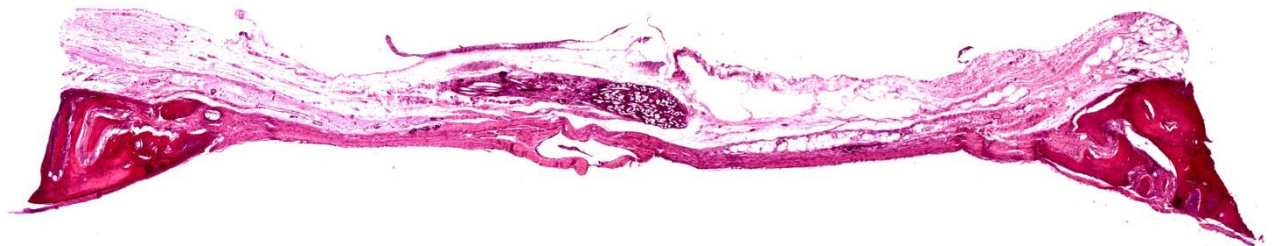


Figura 4 – Grupo coágulo aos 30 dias.

No período de 60 dias (figura 5) podia-se observar uma maior aproximação dos cotos do defeito, contudo, tendo fechado apenas em torno de 52% do defeito, no espaço que ainda restava foi possível observar um tecido conjuntivo fibroso.



Figura 5 – Grupo coágulo aos 60 dias.

No grupo de preenchimento com coágulo e recoberto com a membrana cortical bovina, aos 7 dias (figura 6) foi possível observar a membrana cortical bovina sobre a área do defeito, uma organização do coágulo com um discreto infiltrado inflamatório entre os cotos e, assim como no grupo coágulo aos 7 dias, não foi possível observar uma relevante área de osso neoformado.

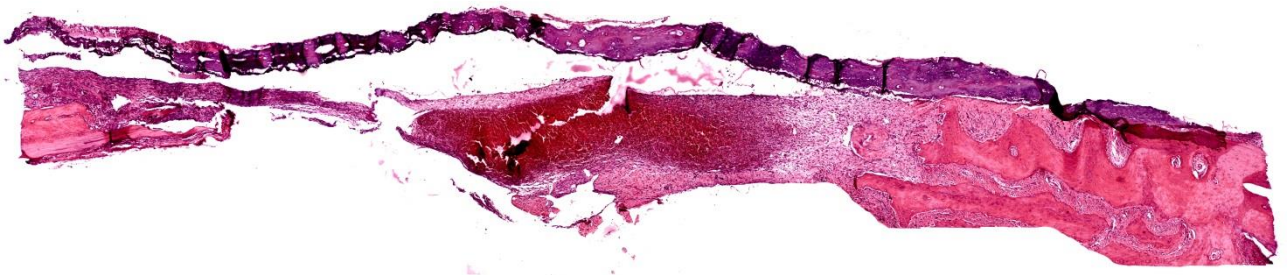


Figura 6 – Grupo Coágulo Membrana aos 7 dias.

No período de 30 dias (figura 7) a membrana instalada já havia sido reabsorvida, assim como no grupo de 30 dias do grupo coágulo a área de osso neoformado nas áreas

dos cotos era maior que em 7 dias, contudo ainda havia uma grande área de defeito, sendo esta preenchida por um tecido conjuntivo frouxo não modelado.

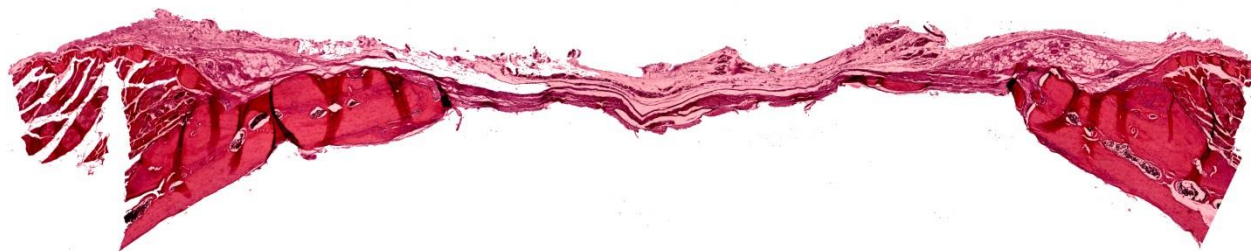


Figura 7 – Grupo Coágulo Membrana aos 30 Dias.

E no período de 60 dias (Figura 8), o grupo coágulo com membrana havia fechado apenas em torno de 38% do defeito e apresentava no defeito entre os cotos um tecido conjuntivo fibroso.

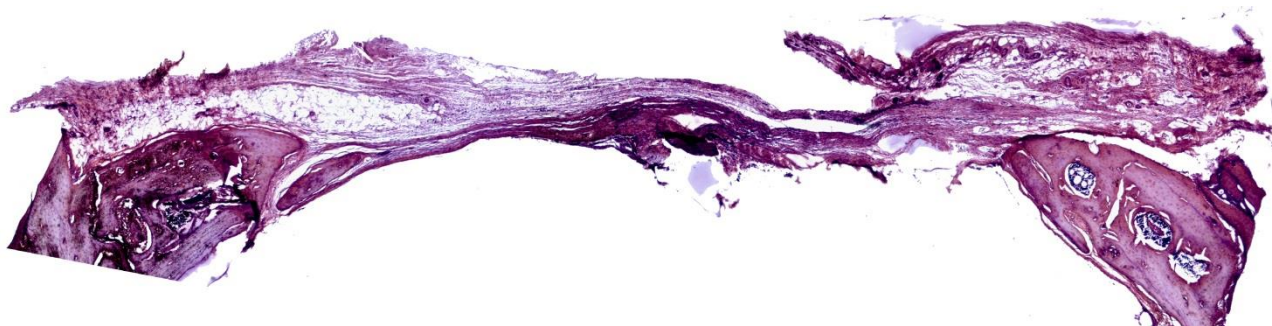


Figura 8 – Grupo Coágulo Membrana aos 60 dias.

No grupo em que o defeito foi preenchido com o tricálcio fosfato particulado e recoberto com membrana cortical bovina, aos 7 dias (figura 9) era possível observar a membrana sobre toda a extensão do defeito, o partículas do biomaterial entre os cotos envoltos por um tecido fibroblástico e, assim como nos outro grupos, pouco osso neoformado.



Figura 9 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 7 dias.

Aos 30 dias (figura 10) a membrana instalada já havia sido reabsorvida, havia osso neoformado na região dos cotos, no centro do defeito foi possível observar ainda algumas partículas do biomaterial envolto por fibroblastos sendo substituído por osso, sendo possível ainda observar ilhotas de osso neoformado nesta região.

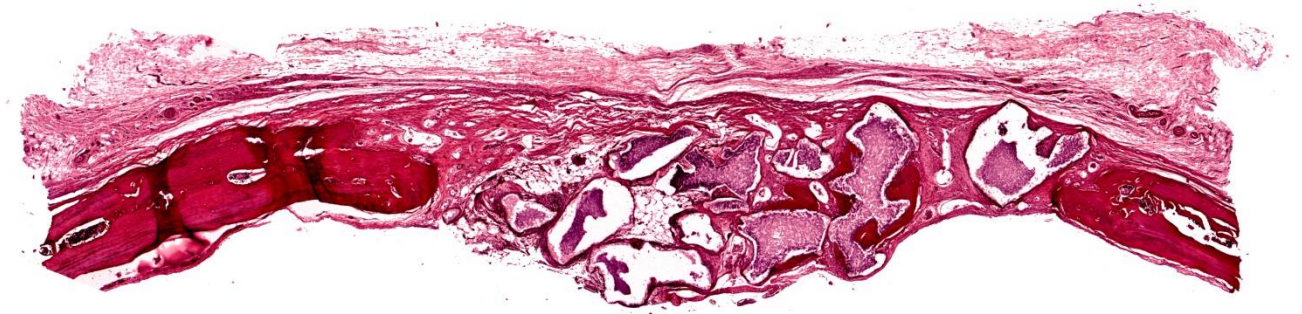


Figura 10 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 30 dias.

No período de 60 dias (figura 11), foi possível observar um fechamento total do defeito por tecido ósseo.



Figura 11 – Grupo Tricálcio Fosfato Particulado aos 60 dias.

2. Resultados estatísticos

Os fatores de variação comparados isoladamente (tempo e grupos experimentais), bem como a interação tempo vs grupos apresentaram diferenças estatisticamente significantes (ANOVA, $p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre Tempos e Grupos experimentais

Fonte de Variação	DM	SS	MS	F	P
TEMPO	2	1,359E+018	6,794E+017	43,227	<0,001
GRUPO	2	2,827E+017	1,414E+017	8,994	<0,001
TEMPO x GRUPO	4	2,903E+017	7,257E+016	4,617	0,004
Residual	36	5,658E+017	1,572E+016		
Total	44	2,498E+018	5,677E+016		

Em relação ao fator tempo, as comparações 7 vs 30 ($p=0,027$), 30 vs 60 ($p < 0,001$) e 7 vs 60 ($p < 0,001$) mostraram diferenças estatisticamente significantes (Teste Tukey) (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação entre os tempos experimentais

Comparisons for factor: **TEMPOS**

Comparação	Dif de Médias	p	q	P	P<0,050
60,000 vs. 7,000	414627338,9453	12,809	<0,001	Yes	
60,000 vs. 30,000	290678462,6733	8,980	<0,001	Yes	
30,000 vs. 7,000	123948876,2723	3,829	0,027	Yes	

A área de osso neoformado (AON) em μm^2 dos grupos GC e GCM foi similar (Tukey, $p=0,815$). Para os demais grupos de materiais de preenchimento dos defeitos, o TCPG apresentou maior área de osso neoformado, tanto na comparação com GCM (Tukey, $p=0,001$) quanto na comparação com GC (Tukey, $p=0,006$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre os Grupos experimentais

Comparisons for factor: GRUPOS					
Comparação	Dif de médias	p	q	P	P<0,050
TCPG vs. GCM	180384636,431	3	5,572	0,001	Sim
TCPG vs. GC	152385366,187	3	4,708	0,006	Sim
GC vs. GCM	27999270,244	3	0,865	0,815	Não

Aos 7 e 30 dias, não foram observadas diferenças no parâmetro AON entres os materiais de preenchimento do defeito (Tukey, $p>0,05$) (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 – Comparação entre grupos aos 7 dias

Comparação para o Fator: GRUPOS aos 7 dias					
Comparação	Dif de Médias	p	q	P	P<0,05
GC vs. GCM	11339444,215	3	0,202	0,989	Não
GC vs. TCPG	299821,676	3	0,00535	1,000	Não Testado
TCPG vs. GCM	11039622,539	3	0,197	0,989	Não Testado

Tabela 5 – Comparação entre os grupos aos 30 dias.

Comparação para o Fator: GRUPOS aos 30 dias						
Comparison	Dif de médias	p	q	P	P<0,05	
TCPG vs. GC	118473318,254	3	2,113	0,306	Não	
TCPG vs. GCM	88162151,248	3	1,572	0,513	Não Testado	
GCM vs. GC	30311167,006	3	0,541	0,923	Não Testado	

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram notadas somente aos 60 dias, nas comparações entre TCPG vs GCM e TCPG vs GC (Tukey, $p < 0,001$), com maiores valores de AON para TCPG. Os grupos GC e GCM permaneceram sem diferenças estatisticamente significantes (Tukey, $p = 0,405$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Comparação entre os grupos aos 60 dias.

Comparação para o Fator: GRUPOS aos 60 dias						
Comparação	Dif de médias	p	q	P	P<0,05	
TCPG vs. GCM	441952135,507	3	7,882	<0,001	Sim	
TCPG vs. GC	338982601,982	3	6,046	<0,001	Sim	
GC vs. GCM	102969533,525	3	1,837	0,405	Não	

V. Discussão

O β -TCP é considerado um material bioativo, que interage com os fluidos corporais guiando para a dissolução parcial e precipitação da apatita orgânica em sua superfície.(Luvizuto et al, 2011) Embora o coágulo não possua atividade osteogênica, apenas osteindutora (Bojar et al, 2014). Este foi usado como um controle negativo, pois é muito comum na prática odontológica o preenchimento de defeitos cirúrgico apenas com o coágulo do próprio paciente como em levantamentos de seio maxilar com instalação de implantes num mesmo procedimento, ou ainda, no preenchimento de um alvéolo em uma exodontia simples. Essa prática permite que as células osteoprogenitoras migrem das margens do defeito, promovendo neoformação óssea, com o intuito de fechar o defeito por completo. (Bojar et al, 2014; Ferreira et al, 2014)

O presente experimento mostrou grandes diferenças na área de osso neoformado quando comparamos os defeitos preenchidos com o β -TCP com os preenchidos por coágulo e coágulo com membrana, tendo sido a neoformação óssea aos 60 dias, significativamente maior no grupo TCPG.

Luvizuto e colaboradores reportaram que o β -TCP teve uma lenta reabsorção e excelente capacidade osteocondutora, no presente estudo os dados obtidos também mostraram este resultado. Também foi possível observar que aos 60 dias houve um fechamento total do defeito crítico, corroborando com dados já descritos na literatura (Luvizuto et al, 2014). Contudo, há de se levar em consideração que o defeito criado no presente estudo foi de 7mm, sendo 2mm maior que o citado (Luvizuto et al, 2014) e, ainda assim, obtendo resultados semelhantes.

Estes achados são importantes, pois reforçam a viabilidade do uso deste biomaterial como opção de substituto ósseo em técnicas de enxerto, uma vez que

consegue de forma satisfatória reparar áreas de defeitos críticos substituindo o uso do osso autógeno, evitando a maior morbidade cirúrgica e limitação de área doadora.

Sendo assim, os resultados sugerem que o material testado pode ser uma potencial alternativa em enxertos, o β -TCP provê uma boa osteocondução favorecendo e facilitando o processo da neoformação óssea. Este estudo mostrou que os defeitos preenchidos com o β -TCP alcançaram o máximo de neoformação óssea, fechando o defeito criado em todos os animais no período de 60 dias.

VII. Referências Bibliográficas

1. Daculsi G et al. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med* 2003, 14: 195.
2. Frayssinet P et al. Osseointegration of macroporous calcium phosphate ceramics having a different chemical composition. *Biomaterials*, 1993; 14: 423.
3. Freire AR, Queiroz TP, Okamoto R. Utilização de biomateriais poliméricos associados a implantes dentários: revisão de literatura. *Int J Dent* 2010, 9 (2): 93-95.
4. Hench L L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials* 1998; 19: 1419.
5. Nishibori M, Betts NJ, Salama H, Listgarten MA. Short-term healing of autogenous and allogeneic bone grafts after sinus augmentation: a report of 2 cases. *J Periodontol* 1994; 65: 958-66.
6. Olsen S, Fergusson SJ, Sigrist C, Fritz WR, Notte LP, Hallermann W, Caversaccio M. A novel computational method for real-time preoperative assessment of primary dental implant stability. *Clinical Oral Implants Research* 2005; 16: 53-59.

7. Rutherford RB, Sampath TK, Rueger DC, Taylor TD. Use of bovine osteogenic protein to promote rapid osseointegration of endosseous dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1992; 7: 297-301.
8. Sbordone L, Toti P, Menchini-Fabris GB, Sbordone C, Piombino P, Guidetti F. Volume changes of autogenous bone grafts after alveolar ridge augmentation of atrophic maxillae and mandibles. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2009; 38: 1059–1065.
9. Luvizuto ER, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda CK, Gruber R, Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects. *Biomaterials* 2011; 32(15):3855-3861
10. Bojar W, Kucharska M, Ciach T, Koperski L, Jastrzebski Z, Szalwinski M. Bone regeneration potential of the new chitosan-based alloplastic biomaterial. *Journal of Biomaterials applications* 2014; 28(7): 1060-1068.
11. Ferreira LB, Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Marques ND, Arana-Chavez VE. Evaluation of bone repair of critical size defects treated with simvastatin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres in rat calvaria. *Journal of Biomaterials applications* 2014; Sep 10. pii: 0885328214550897.
12. Brånemark PI, Breine U, Adel R. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. *J Experimental Studies, Scan. J. Plast. Reconstr. Surg.* 1969;3:81-100
13. Adell, R.; Lekholm, U.; Rockler, B. et al., A 15-years study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. *Int. J. oral Surg.*, v. 10, n. 6, p. 387-416, dec., 1981.
14. Brånemark, P. I.; Adell, R.; Albrektsson, T. et al., Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*, v. 4, n. 1, p. 25-8, jan., 1983.

15. Bränemark, P. I.; Hanssin, B. O.; Adell. R., et al., Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw: experience from a 10-year period. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, v. 16, n. 1, p. 132, 1977.
16. Magro-Filho O, Bassi APF, Garcia-Junior, IR. Utilização experimental de implante heterógeno de pericárdio bovino tratado pelo glutaraldeído, na reconstrução do assoalho orbitário: análise histológica em ratos. *Revista Odontologica de Araçatuba*, v.25, n.1, p.60-4,.
17. Boyne PJ. Implants and transplants: review of recent research in this area of oral surgery. *J Am Dent Assoc.* 1973 Oct;87(5):1074-80.
18. 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 May;84-A(5):716-20.
19. Ducheyne P, de Groot K, In vivo surface activity of a hydroxyapatite alveolar bone substitute. *J Biomed Mater Res.* 1981 May;15(3):441-5
20. Seok H, Lee SK, Kim SG, Kang TY, Lee MJ, Chae WS. Migration of alloplastic bone graft material in infected conditions: a case study and animal experiment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2014 Jun;72(6):1093.e1-11.