



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MAURICIO ANDRES TINAJERO ARONI

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITOS DO OSSO BOVINO
DESPROTEINIZADO REVESTIDO COM ESTRÔNCIO
SOBRE O REPARO ÓSSEO**

Araraquara

2016



UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



MAURICIO ANDRES TINAJERO ARONI

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITOS DO OSSO BOVINO
DESPROTEINIZADO REVESTIDO COM ESTRÔNCIO
SOBRE O REPARO ÓSSEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Odontologia – Área de Periodontia, da Faculdade de
Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para o título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici
Marcantonio

Co-Orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel
Lopes de Oliveira

Araraquara

2016

Aroni, Mauricio Andres Tinajero

Reparo ósseo induzido por osso bovino desproteinizado revestido por estrôncio em defeitos críticos de calvária de ratos / Maurício Andres Tinajero Aroni-- Araraquara: [s.n.], 2016.

44 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiéríci Marcantonio

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

1. Estrôncio 2. Regeneração óssea 3. Substitutos ósseos I. Título

MAURICIO ANDRES TINAJERO ARONI

**AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITOS DO OSSO BOVINO
DESPROTEINIZADO REVESTIDO COM ESTRÔNCIO
SOBRE O REPARO ÓSSEO**

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

COMISSÃO JULGADORA

Presidente e Orientador: Profa. Dra. Rosemary Adriana Chiérici Marcantonio

2º Examinador: Prof. Dr. Ricardo Andres Landázuri Del Barrio

3º Examinador: Prof. Dr. Roberto Henrique Barbeiro

Araraquara, 23 de Março de 2016

DADOS CURRICULARES

MAURICIO ANDRES TINAJERO ARONI

NASCIMENTO	14 de Fevereiro de 1990, Quito/Equador
FILIAÇÃO	Monica Cristina Aroni Fausto Mauricio Tinajero Camacho
1994/2002	Ensino Fundamental (1º grau) Unidad Educativa Martim Cererê
2002/2008	Ensino Médio (2º grau) Unidad Educativa Martim Cererê
2008/2013	Graduação em Odontologia Universidad San Francisco de Quito
2014/2016	Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Periodontia, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP
2014/2016	Especialização em Implantodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP
2014/2016	Especialização em Periodontia pela Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á Deus, que me guiou em todos os momentos, mostrando os melhores caminhos e sempre me abençoando. Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais Maurício e Mónica, pelo amor incondicional, paciência, educação, carinho, e por tudo que proporcionaram para o meu aprendizado, muitas vezes deixando seus sonhos de lado para possibilitar a realização dos meus e de minha irmã. Obrigado por acreditarem em mim e por terem o nosso sucesso como seu objetivo de vida.

Á minha querida irmã Mónica, pela amizade, apoio e por todo o amor e preocupação

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Adriana Marcantonio, por me acolher como um filho, abrindo as portas tanto de seu ambiente de trabalho como da sua casa, sem mesmo saber qual era a minha origem. Por ter me ensinando o verdadeiro sentido de ser mestre, e por ter sido um exemplo de humildade, dedicação e sabedoria. É um enorme prazer e uma honra ser seu orientado.

Ao meu co-orientador Guilherme Pimentel Lopes de Oliveira pelo grande aprendizado, orientação, paciência e oportunidades nestes anos de mestrado. Sem o seu apoio, incentivo e capacidade nosso trabalho não teria sido o mesmo. Obrigado pela confiança em mim depositada.

Ao Andrés pelo carinho e preocupação, obrigado por ter feito coisas por mim que só meus pais fariam.

Aos meus Irmãos: Rafinha, Brunão, Guilherme e João pelos conselhos, viagens, aulas de português, risadas, mas sobre tudo pela paciência para me aguentar. A sua amizade e ensinamentos me tornaram uma melhor pessoa. Obrigado por ter me permitido ser parte da sua vida.

Ao professor Elcio Marcantonio Júnior por cuidar de mim desde o primeiro dia que cheguei em Araraquara. Obrigado por se importar, pelas brincadeiras e por me mostrar os diferentes caminhos que podemos seguir.

Ao professor Francisco de Assis Mollo Júnior e sua família, pela preocupação, amizade e por sempre estar disposto a me ajudar.

Aos Professores: Roberto Barbeiro, Mario Verzola, Borelli, Joni Cirelli, José Eduardo Sampaio, Carlos Rossa e Pedro Souza pelos conhecimentos transmitidos, conselhos de vida, agradáveis conversas e amizade durante este período em Araraquara.

Aos meus amigos: Cássio, Nader, Luisinho, Gustavo, Lélis, Joao Paulo, Paulo, Fausto, Luís Antônio, Vinícius, Camila, Paulinha, Sâmara, Livia, Leslie, Mariana, Adriana, Fernanda, Susane, Daniel, Rafael, Luana, Felipe, Marcell, Fernando e Carol agradeço a amizade e momentos de descontração.

Aos Professores Ivan Bedoya e Germán Moreno que desde o equador sempre estiveram me apoiando.

A toda família Marcantonio e especialmente aos professores: Elcio, Rodolfo e Felipe pelo imenso conhecimento transmitido e por todo o carinho.

Aos funcionários do departamento de Periodontia, Zezé, Claudinha, Leandro, Regina Lucia, Suleima e Isabela. Obrigado pela disponibilidade, paciência e dedicação com as quais sempre me ajudaram.

Aos funcionários da Seção de Pós-graduação, por serem sempre pacientes e prestativos.

A todos os funcionários da Biblioteca pela atenção e revisão desta tese.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, Representada pela diretora Prof^a.Dr^a. Andréia Affonso Barretto Montandon, vice diretora Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e demais funcionários pelo suporte oferecido para o nosso aperfeiçoamento profissional.

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram e tornaram possível a realização deste tr

Aroni MAT. Avaliação in vivo do efeitos do osso bovino desproteínizado revestido com estrôncio sobre o reparo ósseo [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito do revestimento com estrôncio em duas concentrações sobre o potencial de reparo ósseo do osso bovino desproteínizado (DBB) em defeitos críticos de calvárias (DCC) de ratos. Material e métodos: Foram utilizadas 42 ratas que foram randomicamente divididas em 3 grupos (n=14) de acordo com o tipo de biomaterial utilizado para preencher os DCC: Grupo DBB-Osso bovino desproteínizado; Grupo DBB/Sr 1(140µM por g de DBB); Grupo DBB/Sr 2(700µM por g de DBB). Foram confeccionados dois defeitos ósseos circulares (Ø5mm) nos ossos parietais dos animais, sendo que um defeito foi preenchido com biomaterial e o outro foi mantido apenas com coágulo (controle negativo). Os animais foram submetidos a eutanásia após 15 e 60 dias do procedimento cirúrgico (n=7 animais/período). Os animais foram avaliados com relação ao volume do preenchimento do DCC com tecido reparado e o tamanho remanescente do DCC por meio de análise microtomográfica. A composição do tecido reparado e as características da cicatrização foram determinadas por meio de análise histométrica/descrição histológica, enquanto que a expressão das proteínas TGFβ1 e Osteocalcina (OCN) foi realizada por análise imuno-histoquímica. Os resultados demonstraram que o DBB/Sr2 induziu o maior fechamento e preenchimento do DCC que os outros grupos. O DBB/Sr1 e DBB/Sr2 apresentaram maior componente de tecido ósseo dentro do tecido reparado do que os DCC preenchidos com DBB no período de 60 dias. Adicionalmente, também foi verificado que o DBB/Sr1 e DBB/Sr2 induziram uma maior expressão de OCN. Com os resultados obtidos podemos concluir que a incorporação do Sr (700 µM) melhorou a qualidade do reparo ósseo induzido pela DBB.

Palavras-Chave: Estrôncio. Regeneração óssea. Substitutos ósseos.

Aroni MAT. In vivo evaluation of the effects of deproteinized bovine bone coated with strontium on bone repair [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the healing potential of deproteinized bovine bone (DBB) coated with strontium at two concentrations in critical defects of calvarial rats (DCC).

Methods: We used 42 rats that were divided randomly into 3 groups (n = 14) according to the type of biomaterial used to fill the DCC: Group DBB - Deproteinized bovine Bone; Group DBB / Sr 1 (140µM per g DBB); Group DBB / Sr 2 (700µM per g DBB).

Two circular bone defects (Ø5mm) were prepared in the parietal bones of the animals and one defect was filled with biomaterial and the other was maintained empty (negative control). The animals were sacrificed after 15 and 60 days after surgery (n = 7 animals / period). The animals were evaluated according the filling volume of the DCC with the repair tissue and the residual size of the DCC by microtomográfica analysis.

The composition of the repaired tissue and healing characteristics were determined by Histometrical / histological description analysis, while the expression of TGFβ1 and osteocalcin (OCN) were determined by immunohistochemical analysis. **Results:** The DBB / Sr2 induced the highest closing and filling of the DCC than the other groups. The DBB / Sr1 and DBB / Sr2 showed greater bone tissue section within the repaired tissue than DCC filled with DBB within 60 days. Additionally, it was also found that the DBB / Sr1 and DBB / Sr2 induced a higher expression of OCN. **Conclusion:** The addition of Sr (700 mM) improved the quality of bone healing induced by DBB.

Keywords: Strontium. Bone regeneration. Bone substitutes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Estrôncio.....	13
2.2 Efeitos do Estrôncio no Osso.....	14
2.3 Estrôncio e Biomateriais.....	15
3 OBJETIVO.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
3.3 Hipóteses.....	19
4 MATERIAL E MÉTODO.....	20
4.1 Distribuição dos animais e grupos.....	20
4.2 Obtenção do biomaterial revestido com estrôncio.....	21
4.3 Procedimento Cirúrgico.....	21
4.4 Avaliação por microtomografia computadorizada (μCT).....	22
4.5 Análise histométrica e descrição histológica.....	22
4.6 Análise Imuno-histoquímica.....	23
4.7 Análise estatística.....	24
5 RESULTADO.....	25
5.1 Micro CT.....	25
5.1.1 <i>Comprimento remanescente do defeito.....</i>	<i>25</i>
5.1.2 <i>Análise volumétrica.....</i>	<i>25</i>
5.2 Descrição histológica.....	27
5.2.1 <i>Análise histométrica.....</i>	<i>28</i>
5.3 Imuno-histoquímica.....	30
6 DISCUSSÃO.....	32
7 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO A.....	43

1 INTRODUÇÃO

A busca pela regeneração óssea tem sido objeto de estudo de muitas pesquisas^{17, 41, 54} com o objetivo de buscar métodos para aumento de disponibilidade óssea necessária para a instalação de implantes. Isso se faz necessário pelo fato que a limitada disponibilidade óssea é um dos fatores mais importantes que impendem a instalação dos implantes dentários na posição adequada³.

Algumas abordagens tem sido descritas como alternativas para contornar a falta de disponibilidade óssea para instalação de implantes como a osteodistração⁶, utilização de implantes curtos²⁷, elevação de seio maxilar⁴⁰ enxerto em bloco e a lateralização do nervo alveolar inferior³². Entretanto, apesar de relatos de bons resultados clínicos obtidos com essas técnicas, a utilização de biomateriais substitutos ósseos consiste no tratamento mais indicado e documentado para aumento de disponibilidade óssea, devido sua biocompatibilidade e fácil obtenção, evitando um procedimento cirúrgico adicional ao paciente, para a sua coleta^{39, 50, 63}.

Dentre os biomateriais propostos para o aumento da disponibilidade óssea, o osso autógeno tem sido caracterizado como o biomaterial “padrão ouro” por apresentar todas as propriedades biológicas que permite a formação óssea⁶³. Entretanto, a sua técnica tem várias limitações e complicações, como a morbidade do leito doador⁵⁰, a limitação de quantidade de enxerto que pode ser obtido⁶³, a reabsorção acelerada⁴³ e o maior tempo necessário para execução do procedimento cirúrgico⁵⁰.

Uma das alternativas para a substituição do osso autógeno é a utilização do osso bovino desproteinizado (DBB), que é considerado um material biocompatível, osteocondutor, que não induz resposta imune local ou sistêmica⁶⁴. Dentro do processo de fabricação existe uma esterilização física e química que elimina todas as proteínas presentes no tecido ósseo⁴⁹, além disso apresenta cristalinidade e composição química semelhantes ao osso mineral poroso e natural, apresentando granulometria que varia de 250 μm a 1.000 μm ³⁰. Devido ao bons resultados tem sido indicado no aumento da disponibilidade óssea em diversas condições clínicas tais como elevação de seio maxilar^{43, 50} e preservação de alvéolos pós-extração³⁹. Além disso, estudos de acompanhamento longitudinal tem verificado altas taxas de sobrevivência e sucesso em implantes instalados em áreas enxertadas com o DBB^{34, 43}. Visando melhorar o potencial biológico do DBB, novas alternativas tem sido propostas tais como a associação do DBB com fatores de crescimento e derivados de matriz de esmalte^{33, 35, 59},

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP), por possuir alta concentração de fatores de crescimento, que agem na diferenciação, proliferação celular, quimiotaxia e angiogênese em áreas de reparo ósseo tem sido utilizado em combinação com DBB para induzir reparo e formação óssea em condições para elevação do seio maxilar e regeneração óssea^{24, 31}. A utilização de proteínas de matriz de esmalte, que são produzidos a partir de bainha epitelial de Hertwig durante o desenvolvimento dos dentes desempenham um papel crítico na cementogênese, formação óssea, e regeneração periodontal^{25, 59}. Comercialmente se encontra disponível como derivado da matriz do esmalte (DME), e tem sido utilizado em combinação com DBB para o tratamento de defeitos ósseos, esta associação tem um efeito positivo devido ao aumento da formação óssea e da proliferação de células ósseas imaturas⁵⁹.

Outra abordagem que tem sido avaliada é o revestimento de biomateriais osteocondutores por sais metálicos que induzem a osteogênese⁶⁰. Dentre estas substâncias, destaca-se a utilização do estrôncio que tem sido amplamente utilizado na forma de ranelato para tratamento de pacientes com osteoporose^{19, 38} osteoartrites¹³ e a artrite reumatoide⁴² apresentando resultados positivos nessas aplicações. Como revestimento de biomateriais osteocondutores, o estrôncio já foi aplicado em biovidros^{52, 69}, cerâmicas de cálcio-silicone⁷¹, enxerto homogêneo⁷⁰, fosfato de cálcio^{37, 65}, hidroxiapatita^{10, 67} e superfícies de implantes de titânio^{1, 57}. De uma forma geral, a utilização do revestimento com o estrôncio induziu maior formação de osso novo in vivo^{65, 67, 69, 71} e maior potencial de osteogênese in vitro^{69, 71}.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estrôncio

O estrôncio (Sr), foi descoberto em 1790 em uma mina perto da aldeia escocesa "Strontian" (Mason, Moore⁴⁵, 1982). Pode ser encontrado de forma natural em fontes naturais de água, alimentos, bebidas, cereais e grãos e o seu consumo diário varia entre de 2 a 4mg dependendo da dieta diária do indivíduo (Bowen⁸, 1966). O trato gastrointestinal representa a principal via de entrada do estrôncio no corpo através de difusão passiva. O elemento foi isolado pela primeira vez em uma forma impura em 1808, dando início a uma série de isótopos que foram aplicados na medicina, biologia e bioquímica (Nielsen⁵³, 2004)

A quantidade de estrôncio no esqueleto é muito pequena e representa apenas 0,035% de cálcio. Após a administração, é depositado quase exclusivamente no osso. As semelhanças do estrôncio com cálcio levaram ao início a vários estudos onde demonstraram que o estrôncio participa nas vias de sinalização do cálcio, ativando seu receptor (CaSR) que está envolvido na replicação dos pré osteoblastos e osteoblastos (Brennan et al.¹¹, 2009; Caverzasio¹⁸, 2008; Coulombe et al.²³, 2004).

Shorr e Carter⁶¹ (1952) demonstraram que a adição de uma quantidade moderada de lactado de estrôncio melhora a deposição de cálcio nos ossos. Pode-se dizer que esta observação foi a primeira sugestão na literatura em relação a importância do estrôncio no tratamento de desordens do metabolismo ósseo.

McCaslin e Janes⁴⁸ (1959) em um estudo com pacientes com osteoporose, demonstrou que o lactato de estrôncio reduziu a dor óssea, ao mesmo tempo se observou nas imagens radiográficas que a desmineralização óssea era menor. No entanto, estas observações não despertaram grande interesse entre os pesquisadores da época, provavelmente devido ao defeito de mineralização produzido por altas doses de estrôncio, o defeito é conhecido como hipomineralização óssea, onde o processo da mineralização óssea é afetado, dando como resultado um osso menos mineralizado.

Mais tarde, na década de 90, a partir do estudo de Marie et al.⁴⁴ (1993), onde foi testado estrôncio (Sr12911) em forma de ranelato em ratas ovariectomizadas por um período de 60 dias, os resultados mostraram que o estrôncio atua prevenindo a perda do osso mineral e inibindo a reabsorção óssea sem interferir na sua formação, assim como demonstrou os estudos de Brown et al.¹² (2003), Coulombe et al.²³ (2004) e Cannata-Andía et al.¹⁵ (2010).

O efeito positivo do ranelato de estrôncio no metabolismo ósseo depende

não só de seu efeito estimulador sobre a formação óssea, mas também de sua capacidade para diminuir a reabsorção óssea. A inibição da reabsorção óssea obtida com ranelato de estrôncio pode ser explicada pela inibição ou diminuição da função dos osteoclastos, como demonstra o estudo de Baron e Tsouderos⁵ (2002).

2.2 Efeitos do Estrôncio no Osso

Uma vez absorvido, o estrôncio é distribuído por todo o corpo, sendo depositado em maior quantidade nos ossos e dentes (Johnson³⁶, 1973). A literatura tem relatado que o estrôncio pode exercer uma série de efeitos que podem ser benéficos ou tóxicos sobre o osso, dependendo da dose administrada (Cabrera et al.¹⁴, 1999; Johnson³⁶, 1973; Marie et al.⁴⁴, 1993; Matsumoto⁴⁶, 1976). O mecanismo pelo qual o estrôncio exerce um efeito prejudicial sobre a calcificação é porque quimicamente o tamanho do íon de estrôncio é maior em comparação com o de cálcio, por isto os cristais de hidroxiapatita escolhem se ligar ao cálcio, do que ao estrôncio (Mattar, Siegel⁴⁷, 1979). Entretanto em altas concentrações de estrôncio, o mecanismo pode inverter, dando como resultado uma diminuição do conteúdo de cálcio no osso (Johnson³⁶, 1973). A incorporação dos íons de estrôncio de maior tamanho no osso vai induzir uma leve distorção da matriz, impedindo o crescimento e aumentando a dissolução do osso mineralizado (Eisenberg²⁶, 1973), resultando em uma hipomineralização que consequentemente reduz a densidade mineral óssea (Cabrera et al.¹⁴, 1999; Christoffersen et al.²⁰, 1997).

Os efeitos terapêuticos do estrôncio no metabolismo foi observado por Skoryna⁶² (1984), onde observou-se em ratos o aumento no volume de osso trabecular na presença de baixas doses de estrôncio, particularmente em condições patológicas caracterizadas por um processo acelerado de remodelação óssea e mineralização extensa.

Um efeito benéfico de doses baixas de estrôncio também foi observado em pacientes com osteoporose aonde foi relatado um aumento da calcificação óssea vertebral, no estudo de Cabrera et al.¹⁴ (1999).

A cicatrização de defeitos ósseos pode ser dificultada por condições sistêmicas, como a osteoporose. Recentemente, a utilização farmacológica do ranelato de estrôncio no tratamento da osteoporose tem aumentado devido à sua capacidade para prevenir a perda óssea.

Wei et al.⁶⁸ (2014) incorporaram estrôncio em vidro bioativo (mesoporo -

MBG) e investigaram a sua eficácia in vivo para a cura de defeitos ósseos em fêmures de ratas ovariectomizadas. 30 animais foram divididos em cinco grupos: (1) defeito vazio (controle), (2) defeitos vazios com terapia de reposição hormonal, (3) defeitos preenchidos com MBG sozinho, (4) defeitos preenchidos com MBG + estrogênio e (5) defeitos preenchidos com estrôncio mesoporo-biovidro (SR-MBG). Os resultados demonstram que a liberação local de estrôncio no osso pode melhorar o reparo do defeito. Os autores concluíram que é necessário mais modelos animais para investigar a relação da incorporação estrôncio em biomateriais.

No estudo de Thormann et al.⁶⁵ (2013), o primeiro objetivo foi avaliar a formação de osso novo em defeitos críticos no fêmur de ratas ovariectomizadas preenchidos com cimento de fosfato de cálcio modificado com estrôncio (SrCPC), em comparação com cimento de fosfato de cálcio (CPC). No grupo onde foi incorporado o estrôncio existiu um maior desenvolvimento na formação óssea, o estrôncio melhorou a formação óssea e diminuiu o processo de reabsorção. As análises histomorfométrica e imuno-histoquímica confirmaram um aumento estatisticamente significativo na formação de osso de SrCPC em comparação com o CPC.

2.3 Estrôncio e Biomateriais

Os biomateriais podem ser biodegradáveis ou permanentes, naturais ou sintéticos, mas precisam ser biocompatíveis, osteocondutores, osteoindutores, e mecanicamente compatível com osso nativo para cumprir seu desempenho desejado na engenharia do tecido ósseo (Carvalho et al.¹⁶, 2010). Para melhorar as propriedades dos biomateriais o estrôncio tem sido acrescentado para aumentar a qualidade e quantidade de osso formado (Thormann et al.⁶⁵, 2013; Valiense et al.⁶⁷, 2016; Zhao et al.⁶⁹, 2015; Zreiqat et al.⁷¹, 2010). Tem sido investigado vários métodos para a deposição do estrôncio na superfície do biomaterial, como métodos de sol-gel (Balamurugan et al.⁴, 2009), co-jateamento (O'Sullivan et al.⁵⁵, 2010), micro oxidação (Chung, Long²¹, 2011) pulverização por plasma (Fielding et al.²⁹, 2012), deposição por laser pulsado (Boanini et al.⁷, 2012 e descarga elétrica (RF) (Ozeki et al.⁵⁶, 2013).

Dos métodos descritos, a deposição por descarga elétrica (RF) tem demonstrado ser a mais útil para a deposição do estrôncio, devido à capacidade da técnica para proporcionar maior controle sobre as propriedades do revestimento, juntamente com uma melhor adesão entre o substrato e o revestimento (Boyd et al.⁹, 2013; Chung e Long²¹, 2011). Especificamente, a descarga elétrica permite a deposição

de vários materiais ao mesmo tempo e providencia uma alternativa simples para produzir os revestimentos de Sr (Balamurugan et al.⁴, 2009). Atualmente não há informações disponíveis sobre qual é o melhor método para recobrir a superfície de um composto com um resultado químico e morfológico que permita uma biofuncionalidade (Boyd et al.⁹, 2013; Chung e Long²¹, 2011).

Park et al.⁵⁷ (2010) investigaram as características da superfície e biocompatibilidade in vitro de titânio (Ti) incorporado com ions de estrôncio (Sr) e íons de fosfato (P) produzidos por tratamento hidrotérmico para aplicações futuras em superfícies de implantes. As características da superfície foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura, difração de raios-X, espectroscopia de fotoelétrons de raios-X, ângulo de contato e energia de superfície, espectroscopia de emissão atômica com plasma e perfilometria. Foram avaliadas na superfície do Ti a fixação de células pré-osteoblásticas, a viabilidade e morfologia celular, e a expressão do gene em células osteoblásticas. A incorporação de Sr aumentou significativamente a adesão celular e viabilidade comparada com a outra superfície. Os resultados demonstram que a incorporação de Sr na superfície de óxido de Ti melhoram o potencial osteoindutor da superfície do implante, aumentando o depósito, viabilidade e diferenciação de células osteoblásticas.

Faria et al.²⁸ (2010) avaliaram histologicamente o efeito da aplicação tópica do cloreto de estrôncio em defeitos ósseos em mandíbula de coelhos. Foram utilizados 12 coelhos, onde foram criados dois defeitos cirúrgicos nas regiões laterais da mandíbula e foram preenchidos do lado direito com esponja de colágeno embebida em soro fisiológico (controle) e do lado esquerdo com o mesmo material embebido em solução de cloreto de estrôncio na concentração de 2 molar (teste). Os animais foram eutanasiados após 28 e 56 dias. Aos 56 dias a neoformação óssea preencheu totalmente os defeitos cirúrgicos, tanto do grupo onde se utilizou a solução fisiológica quanto o tratado com cloreto de estrôncio. No entanto, notou-se que nos coelhos tratados com estrôncio o tecido ósseo neoformado se apresentou mais desenvolvido e maduro, mostrando a presença de sistemas de Havers.

Zreiqat et al.⁷¹ (2010) avaliaram a osteocondutividade de dois *scaffolds* (cálcio-silício com estrôncio e b-tricálciofosfato) em tíbias de ratos com osteoartrite. A osteocondutividade dos *scaffolds* foi avaliada aos 3 e 6 semanas após a implantação no defeito ósseo na tíbia de ratas. A análise histológica revelou um rápido crescimento de osso novo no interior dos *scaffolds* com estrôncio, em relação ao fosfato de b-tricálcio

(TCP-b), sem sinais de rejeição, necrose ou infecção.

Raros são os trabalhos que utilizaram estrôncio localmente, no entanto, quando utilizado no tecido ósseo, esta substância demonstrou ser efetiva na melhoria da arquitetura óssea com resultados semelhantes ao do uso sistêmico (Boyd et al.¹⁰, 2015; Nielsen⁵², 2004; Ozeki et al.⁵⁶, 2013; Zhao et al.⁶⁹, 2015). Atualmente, a hidroxiapatita [HA-Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] é o biomaterial que mais tem sido avaliado em combinação com o estrôncio, devido às semelhanças estruturais e químicas com tecido ósseo e dentário (Boyd et al.¹⁰, 2015; Newman et al.⁵², 2014; Ozeki et al.⁵⁶, 2013; Zhao et al.⁶⁹, 2015). A hidroxiapatita biológica (HA) é composta por uma mistura de fases de fosfato de cálcio, e diferentes métodos de deposição têm sido investigados para colocar estrôncio nas superfícies da HA, como já foi descrito anteriormente (Balamurugan et al.⁴, 2009; Boanini et al.⁷, 2012; Chung e Long²¹, 2011; Fielding et al.²⁹, 2012; O'Sullivan et al.⁵⁵, 2010; Ozeki et al.⁵⁶, 2013).

A hidroxiapatita revestida de estrôncio (SrHA) têm tido muito interesse devido a propriedade do Sr em promover a formação óssea ao mesmo tempo em que reduz a reabsorção óssea. Boyd et al.¹⁰ (2015) compararam a hidroxiapatita não revestida e revestida com estrôncio a 5% e 13% (SrHA) depositada sobre superfícies de titânio policristalino utilizando o método de deposição por descarga elétrica. Os resultados demonstraram que o Sr poderia ser incorporado com êxito no reticulado da HA para formar revestimentos SrHA. Portanto, este estudo demonstrou que a pulverização catódica oferece um meio que possibilita o controle das propriedades do Sr-substituído HA, tais como a cristalinidade, estequiometria, pureza de fase e topografia da superfície.

Newman et al.⁵² (2014) apresentaram um implante de vidro bioativo revestido com estrôncio (SrBG), que foi idealizado para aumentar a formação óssea peri-implantar. Após a instalação do implante no fêmur e na tíbia de 27 coelhos foram realizadas análises histológicas nos períodos de 6, 12 e 24 semanas. O biomaterial foi dissolvido ao longo de um período de 6 semanas, estimulando maior formação óssea em comparação com os implantes revestidos com HA. Além disso, a fixação mecânica foi superior e evidente no grupo SrBG depois de 24 semanas de implantação. Propõe-se que este revestimento tem o potencial para melhorar a fixação dos implantes em vários tipos de cirurgia reconstrutivas ortopédicas

Valiense et al.⁶⁷ (2016) estudaram a resposta *in vivo* e *in vitro* do estrôncio incorporado na nanoestrutura HA/alginato de sódio (SrCHA) para elevação de seio

maxilar em coelhos usando como referência a nanoestrutura de HA/alginato de sódio (CHA) sem estrôncio. Doze coelhos machos e fêmeas foram submetidos a procedimentos de elevação de seio maxilar bilateral e foram divididos em dois grupos (CHA e SrCHA) com dois períodos experimentais (4 e 12 semanas). Após 12 semanas a formação óssea foi observada nos dois grupos, sendo que em menor quantidade no grupo SrCHA do que no CHA, indicando uma maior reabsorção do SrCHA em comparação ao CHA. Os autores concluíram que embora os dois biomateriais sejam biocompatíveis e osteocondutores, o SrCHA apresenta um processo de reabsorção mais cedo que o CHA.

Kang et al.³⁷ (2015) investigaram o sinergismo entre polifosfato de cálcio dopado com estrôncio (SCPP) e osso autólogo com células mononucleares da medula (BM-MNCs) no tratamento da osteonecrose da cabeça femoral. Após a indução de osteonecrose em 58 coelhos, estes foram divididos em 3 grupos: grupo 1 - SCPP, grupo 2 - BM-MNCs e grupo 3 - polifosfato de cálcio. O polifosfato de cálcio dopado com estrôncio (SCPP) e osso autólogo com células mononucleares da medula (BM-MNCs) promoveram uma melhora na angiogênese que permitiu a remodelação de novo osso trabecular.

Zhao et al.⁶⁹ (2015) avaliaram o reparo ósseo em defeitos críticos de calvaria em ratos, usando *scaffolds* de vidro bioativo recobertos por estrôncio em comparação com *scaffolds* de vidro bioativo por um período de 8 semanas onde a análise do micro CT mostrou maior porcentagem de preenchimento e maior fechamento do defeito no grupo com estrôncio quando comparado ao grupo de *scaffolds* de vidro bioativo.

Devido ao grande potencial do estrôncio em induzir a formação óssea e ao potencial extensivamente descrito do DBB em formar osso por osteocondução, a associação entre o DBB com o estrôncio pode beneficiar o reparo ósseo, entretanto essa associação nunca foi testada anteriormente. Devido a isso, o objetivo desse estudo é de avaliar o efeito do revestimento com estrôncio em duas concentrações sobre o potencial de reparo ósseo do osso bovino desproteinizado(DBB) em defeitos críticos de calvárias(DCC) de ratos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito do osso bovino desproteinizado revestido por estrôncio sobre o reparo ósseo em defeitos críticos padronizados em calota craniana de ratos.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o volume do tecido reparado no defeito ósseo preenchido com osso bovino desproteinizado com e sem revestimento de estrôncio;

Avaliar a composição do tecido reparado no defeito ósseo preenchido com osso bovino desproteinizado com e sem revestimento de estrôncio;

Avaliar a expressão das proteínas TGF β 1 e Osteocalcina associada ao tecido reparado no defeito ósseo preenchido com osso bovino desproteinizado com e sem revestimento de estrôncio.

3.3 Hipóteses

H0: O osso bovino desproteinizado revestido com estrôncio não altera o reparo ósseo

H1: O osso bovino desproteinizado revestido com estrôncio altera o reparo ósseo

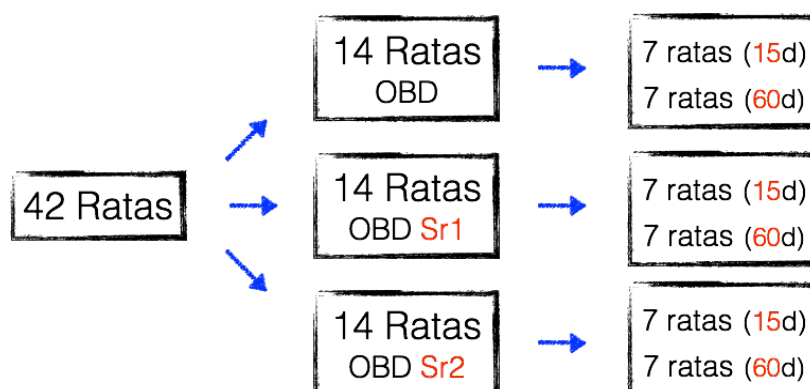
4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Distribuição dos animais e grupos

Neste estudo foram utilizadas 42 ratas (*Rattus Norvegicus*, variação albinus, Holtzman) adultas, de aproximadamente 3 meses de idade, com massa corporal entre 250-300 gramas, que foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara (FOAr-UNESP), alimentadas com ração sólida e com acesso a água ad libitum, antes e durante todo o período experimental, em ambiente com luz (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura controladas (21°C a 25°C). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara (CEUA-07/2014) (Anexo A).

Os animais foram aleatoriamente divididos em 3 grupos com 14 animais cada, que foram avaliados em dois períodos experimentais (15 e 60 dias), com 7 animais em cada grupo/período (Figura 1). Foram executados dois defeitos bilaterais, com 5mm de diâmetro, sendo que um dos lados não foi colocado biomaterial (controle negativo), e essa escolha foi executada de forma aleatória. Os grupos foram divididos de acordo com o tipo de biomaterial que foi aplicado no defeito crítico de calota: Grupo DBB: O defeito foi preenchido com osso bovino desproteinizado (DBB) (Bio-Oss®, Geistlich AG, Wolhusen, Switzerland); Grupo DBB/Sr1: O defeito foi preenchido com osso bovino desproteinizado revestido com estrôncio na concentração baixa (140 uM); Grupo DBB /Sr2: O defeito foi preenchido com osso bovino desproteinizado revestido com estrôncio na concentração alta (700 uM).

Figura 1 - Distribuição dos animais entre os grupos e períodos experimentais



Fonte: Elaboração própria

4.2 Obtenção do biomaterial revestido com estrôncio

A partículas de biomateriais foram revestidas com SrCl₂ que foi dissolvido em 1,6ml de água (Milli-Q) para modificar 1g de osso bovino desproteínizado. Foi utilizado 140 uM de SrCl₂ para revestimento das partículas do grupo DBB/Sr1 enquanto que 700 uM de SrCl₂ para revestimento das partículas do grupo DBB/Sr2. O excesso da água foi removida em um dessecador a vácuo. O processamento do material foi realizado pelo Prof. Dr. Andreas Stavropoulos no Departamento de Dentística e Periodontia da Universidade de Malmo.

4.3 Procedimento Cirúrgico

Os animais foram anestesiados por uma combinação de Quetamina com Xilazina, na proporção de 0,08 ml/100g de massa corporal (Cloridrato de Quetamina – Francotar – Virbac do Brasil Ind. Com. Ltda.) e 0,04 ml/100g massa corporal (Cloridrato de Xilazina - Virbaxyl 2% - Virbac do Brasil Ind. E Com. Ltda.), respectivamente. Posteriormente foram submetidos à tricotomia na região da calvária e realizada antissepsia do campo cirúrgico com gaze estéril embebida em solução de povidine, com o animal sendo então posicionado em decúbito ventral sobre a mesa cirúrgica.

O acesso cirúrgico à porção posterior da calvária foi obtido com uma incisão bicoronal cutânea e muscular, com aproximadamente 3cm de extensão, permitindo a exposição do tecido ósseo. Em seguida, os tecidos foram divulsionados até a exposição do periósteo, sendo este incisado e deslocado para expor o tecido ósseo. Foram então confeccionados dois defeitos ósseos circulares nos ossos parietais da calvária de todos os animais, imediatamente após o vértice da sutura coronal do animal, com 5 mm de diâmetro e aproximadamente 1,5 mm de espessura, dada pela remoção total do tecido ósseo. Os defeitos foram confeccionados com auxílio de uma fresa trefina (3i – 3i implantes do Brasil) com 5 mm de diâmetro externo, montada em contra-ângulo (Anthogyr – Injecta – Diadema, Brasil) com redução de 16:1, acoplado a um motor para instalação de implantes (BML 600 Plus Driller - CK Driller – Brasil), com 1500 rpm, sob irrigação constante com solução salina. Em seguida, com objetivo de marcar a metade do defeito para orientação no momento dos cortes histológicos, as duas perfurações circulares foram realizadas a 2 mm da margem dos defeitos e preenchidas com guta-percha.

Os defeitos foram randomicamente divididos, sendo que um defeito recebeu

um biomaterial e o outro foi mantido vazio (controle). Todos os cuidados foram mantidos para evitar qualquer lesão à dura mater. Cada biomaterial foi implantado, sendo acomodado sobre a dura mater preenchendo completamente o defeito sem extravasamento. Em seguida, todos os defeitos foram recobertos com o periósteo, e suturados em planos, o periósteo com fio de sutura Vicryl 4.0 (Vicryl, Johnson & Johnson, Brasil) e o tecido cutâneo com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, Brasil). Os animais foram medicados no períodos pós-operatório com uma dose única de pentabiótico (Pentabiótico veterinario pequeno porte, Zoetis Dodge, São Paulo, Brasil, Subcutâneo:0,03/g) e Ketoflex, (Ketoflex; Mundo Animal, São Paulo, Brasil, IM: 0,03ml/g). Após os períodos de 15 e 60 dias de pós-operatório os animais foram eutanaziados com uma sobredose de anestésico. As peças da região foram obtidas e fixadas em paraformaldeído a 4% por 48 horas e após este período estas foram lavadas em água corrente e armazenadas em álcool 70^o.

4.4 Avaliação por microtomografia computadorizada (μCT)

As calvárias foram escaneadas através de um microtomógrafo (Skyscan, Aartselaar, Belgium). Os parâmetros utilizados para escaneamento foram: pixel da câmera: 12.45; voltagem:65Kv; amperagem: 385μA; filtro: Alumínio 1mm. As imagens geradas foram posteriormente reconstruídas, reorientadas espacialmente e analisadas por softwares específicos (NRecon/DataViewer/CTan, Skyscan, Aartselaar, Belgium). A análise do micro-CT foi realizada através do programa CTAN aonde foram selecionados 40 cortes no sentido axial do crânio, com 18 micrometros cada, que englobavam o defeito criado. A região de interesse selecionada teve formato circular e foi a mesma em todos os animais (5 mm de diâmetro). Os resultados foram expressos em relação a: 1) análise linear do comprimento remanescente do defeito e 2) análise volumétrica do preenchimento do defeito da calota com tecido reparado (%). Para a análise volumétrica foi utilizado *threshold* de 55-250 tons de cinza para avaliação do volume do tecido reparado. As análises foram executadas por um examinador cego e treinado (MATA).

4.5 Análise histométrica e descrição histológica

Após o escaneamento, as amostras foram processadas para análise histológica. As peças foram lavadas por 12 horas em água corrente, colocadas em EDTA a 7% para descalcificação por um período de 3 meses, com 3 trocas semanais. Posteriormente foram lavadas e desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e

incluídas em parafina. Os cortes foram realizados no sentido antero-posterior ao longo eixo do meio do defeito da calota com uma espessura de 4 μm . Foram obtidos 16 cortes de cada bloco, divididos em lâminas com 4 cortes. Após a obtenção das lâminas, as mesmas foram coradas com hematoxilina e eosina, e dois cortes foram utilizados para análise histométrica, sendo que o primeiro corte foi sorteado (proveniente da primeira ou da segunda lâmina) e o segundo selecionado que tal forma que distasse 40 μm de distância do primeiro corte. As imagens foram fotografadas em um microscópio óptico DIASTAR (Leica Reichert & Jung products, Germany), com objetiva para aumento de 25x, através do qual as imagens foram selecionadas e enviadas para um microcomputador, através de uma câmera (Leica Microsystems DFC-300-FX; Leica Reichert & Jung Products, Wetzlar, Germany).

As mensurações foram feitas utilizando um software analisador de imagens (Image J, Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Foi avaliada a composição do tecido reparado dentro dos defeitos (biomaterial, tecido conjuntivo e osso) e esses valores foram fornecidos em % em relação à área total do defeito crítico. Essa análise foi executada por um examinador cego e treinado para essa análise (MATA).

A descrição histológica dos tecidos reparados foi realizada levando em consideração a qualidade do osso reparado, reações inflamatórias ao redor dos biomateriais, formação de vasos, qualidade da matriz de tecido conjuntivo e aparência das células componentes do tecido ósseo. Essa descrição foi executada por um patologista cego e experiente para esse tipo de análise (LCS).

4.6 Análise Imuno-histoquímica

Foi empregado o método de imuno-histoquímica para detecção e localização da expressão dos marcadores de formação óssea: Osteocalcina (OCN) e fator transformante de crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Cortes histológicos com 4 μm de espessura foram montados em lâminas silanizadas (Fisher Scientific Superfrost Plus, Fisher, New York, NY, USA), seguido de tramitação laboratorial de rotina para desparafinização e reidratação. Foi executada a recuperação antigênica por meio de imersão das lâminas em solução de tampão de citrato de potássio aquecidos em micro-ondas e resfriadas à temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi inativada pela imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 1% por 30 minutos, enquanto que o bloqueio de epítomos inespecíficos foi obtido pela incubação dos cortes em solução de BSA 3% por 1 hora. Posteriormente, os cortes foram submersos em anticorpos primários da OCN

(Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) e de TGF β 1 (RD biosystems USA) por 16 horas. Em seguida, os cortes foram tratados pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC) com a utilização do kit ABC Staining System (sc-2023, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) segundo as instruções do fabricante. Como controle negativo, cortes histológicos foram tratados por PBS a 1%. Os cortes foram corados com solução de hematoxilina para visualização dos núcleos. Foi executado uma análise descritiva que teve como base um score para análise da extensão da coloração da expressão dessas proteínas: Ausente; leve; moderada; forte. A extensão da coloração foi registrada por um examinador experiente e cego para os grupos experimentais (GJO).

4.7 Análise estatística

Os dados da análise histométrica e microtomográfica desse estudo foram numéricos, e devido a isso o teste de normalidade de Kolgomorov-Smirnov foi aplicado para avaliar se os dados estavam distribuídos de acordo com o teorema da distribuição central. Como os dados se distribuíram de acordo com a normalidade, testes paramétricos foram aplicados para a análise inferencial dos dados. O teste de one-way Anova complementado pelo teste de Tukey foi aplicado para avaliação entre os grupos dentro de cada período de avaliação e dentro de cada grupo variando-se o período experimental. O software Graphpad Prism 5.0 (San Diego, CA, USA) foi utilizado para a aplicados dos testes estatísticos. Todos os testes foram aplicados com nível de confiança de 95%.

5 RESULTADO

5.1 Micro CT

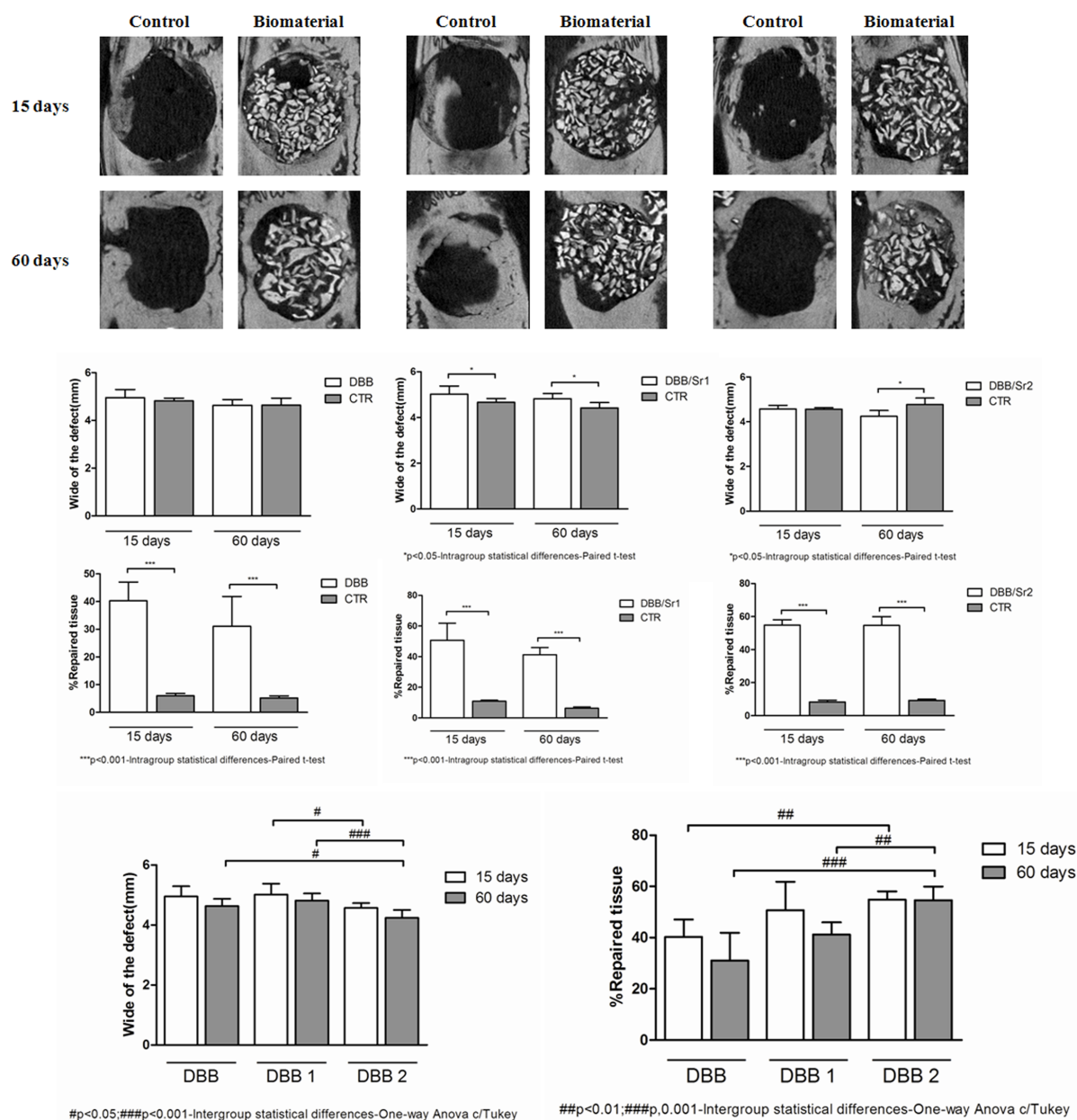
5.1.1 Comprimento remanescente do defeito

Com relação ao comprimento remanescente do defeito, foi verificado que o grupo DBB não foi diferente em relação ao seu controle negativo. O grupo DBB/Sr1 apresentou maior comprimento remanescente do defeito que o seu controle em ambos os períodos de avaliação ($p < 0.05$). O grupo DBB/Sr2 apresentou menor comprimento remanescente do defeito que o seu controle no período de 60 dias ($p < 0.05$). Comparando-se os biomateriais, foi verificado que os defeitos preenchidos com o DBB/Sr2 apresentaram menor comprimento remanescente de defeito que o defeitos preenchidos com DBB/Sr1 aos 15 dias ($p < 0.05$) e que os defeitos preenchidos com DBB ($p < 0.05$) e DBB/Sr1 ($p < 0.001$) aos 60 dias (Figura 2).

5.1.2 Análise volumétrica

Foi verificado que todos os defeitos preenchidos com biomateriais apresentaram maior porcentagem (%) de preenchimento do defeito que os seus controles negativos ($p < 0.001$). Comparando-se os defeitos preenchidos com biomateriais, foi verificado que os animais do grupo DBB/Sr2 apresentaram maior preenchimento do defeito crítico que o grupo DBB aos 15 dias e que os grupos DBB e DBB/Sr1 aos 60 dias (Figura 2).

Figura 2 - Quadro com imagens representativas das análises microtomográficas e os respectivos gráficos que expõe os dados dessa análise. É possível perceber o menor comprimento residual e o maior preenchimento do DCC induzido pelo DBB/Sr2. Também observa-se o maior preenchimento do DCC com tecido reparado aonde os biomateriais foram inseridos em comparação ao seu controle negativo.



Fonte: Elaboração própria

5.2 Descrição histológica

Microscopicamente observou-se dois defeitos ósseos induzidos cirurgicamente na calota craniana de roedor, preenchidos ou não com fragmentos de material amorfo, que se caracterizava por apresentar sem padronização dimensional. Passados 15 dias da indução do defeito ósseo, a loja cirúrgica sem a presença do biomaterial, apresenta-se preenchida por delgado tecido conjuntivo frouxo, rico em matriz extracelular formada por densos feixes de fibras de colágeno entremeados com capilares sanguíneos de diversos calibres, grande quantidade de leucócitos mononucleares e fibroblastos alongados. Em ambas as extremidades do defeito observava-se neoformação óssea. O tecido ósseo neoformado era rico em osteócitos e nas adjacências e próximo ao tecido conjuntivo, observa-se osteoblastos, que se dispunham em camada única e que se caracterizam por serem globosos. Após 60 dias da indução do defeito ósseo, havia aumento da quantidade de matriz extra celular resultado do aumento da quantidade e da espessura dos feixes de fibras de colágeno, que eram entremeados por fibroblastos fusiformes cuja morfologia acompanhavam a orientação das fibras. Os densos feixes de fibras de colágeno comprimiam os capilares os quais se apresentaram em número reduzido. Nesses casos observa-se também diminuição dos leucócitos mononucleares. Também foi confirmada a presença de neoformação óssea nas extremidades dos defeitos, bem como foi observado a diminuição ou achatamento dos osteoblastos.

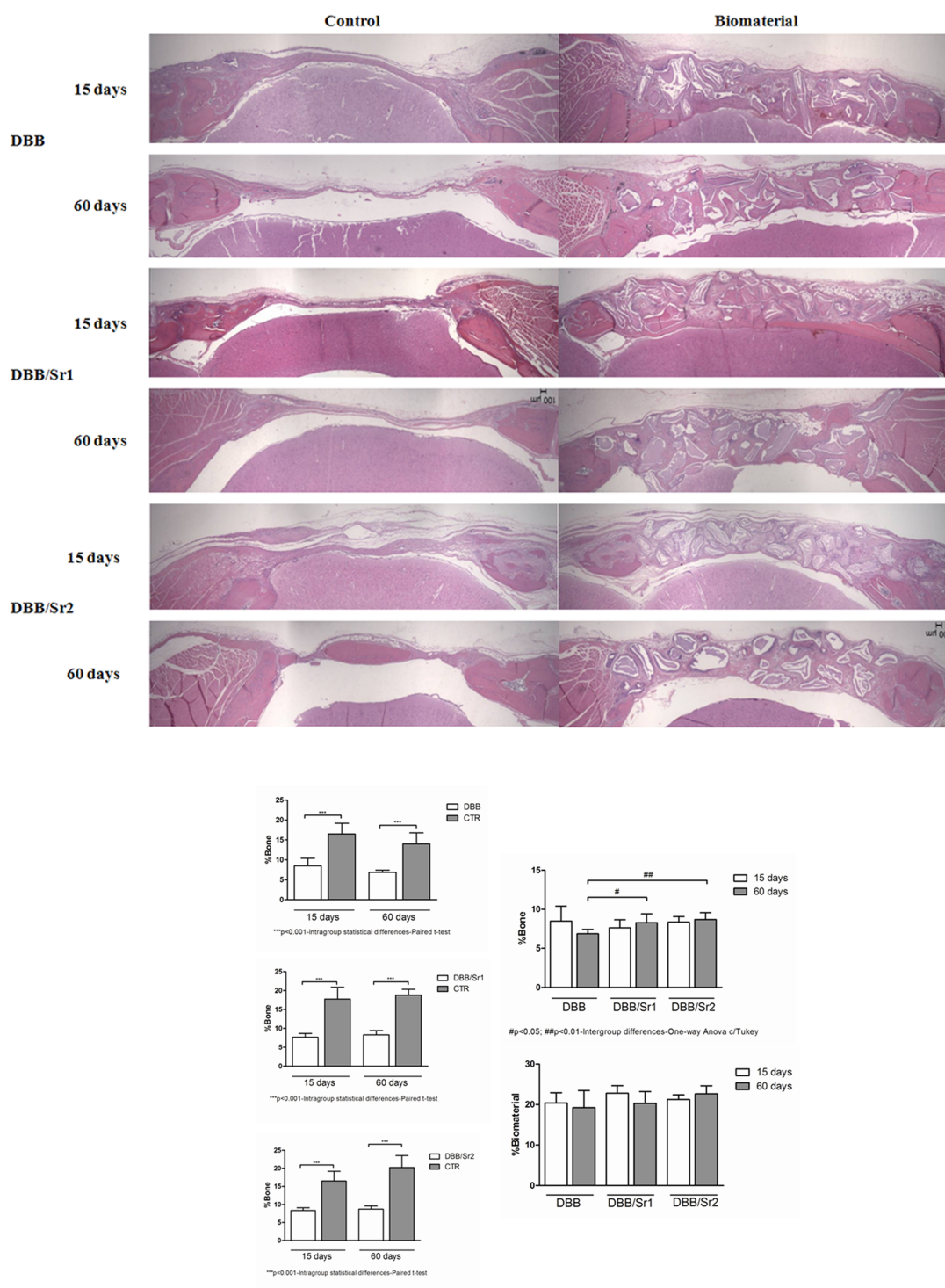
No defeito preenchido com biomaterial, não foi observado diferença na morfologia e composição do tecido conjuntivo formado na presença dos diferentes tipos de biomateriais. Entretanto observou-se que, independentemente dos períodos experimentais, o DBB/Sr1 e DBB/Sr2 pareciam parcialmente reabsorvido quando comparado ao DBB. Após 15 ou 60 dias do implante, os biomateriais estavam envolvidos por tecido conjuntivo neoformado, com características semelhante ao tecido formado na ausência do material. Há que se destacar que havia variável quantidade de células gigantes multinucleadas nas proximidades dos fragmentos dos materiais implantados. Em ambos períodos, havia presença de neoformação óssea nas extremidades dos defeitos, que conservou as mesmas características morfológicas observadas nos grupos sem o implante dos materiais (Figura 3).

5.2.1 Análise histométrica

Foi verificado que os defeitos preenchidos com biomaterial apresentaram menor %osso que os defeitos que permaneceram vazios em todos os grupos e períodos experimentais avaliados ($p < 0.001$). Ao se comparar os grupos dos defeitos críticos com biomaterial, foi verificado que os defeitos preenchidos com DBB/Sr1 e DBB/Sr2 apresentaram maior %osso que os defeitos preenchidos com DBB no período de 60 dias ($p < 0.05$)

Foi verificado que não houve diferenças entre os biomateriais utilizados para preencher os defeitos com relação a %biomaterial do tecido reparado em nenhum dos períodos avaliados (Figura 3).

Figura 3 - Quadro com imagens representativas das análises histométricas e os respectivos gráficos que expõe os dados dessa análise. Pode-se perceber a maior quantidade de tecido ósseo nos grupos DBB/Sr1 e DBB/Sr2 que o grupo DBB. Adicionalmente, pode-se confirmar o maior preenchimento do defeito nos DCC aonde os biomateriais foram inseridos em comparação ao seu controle negativo (Aumento original 25X-HE)

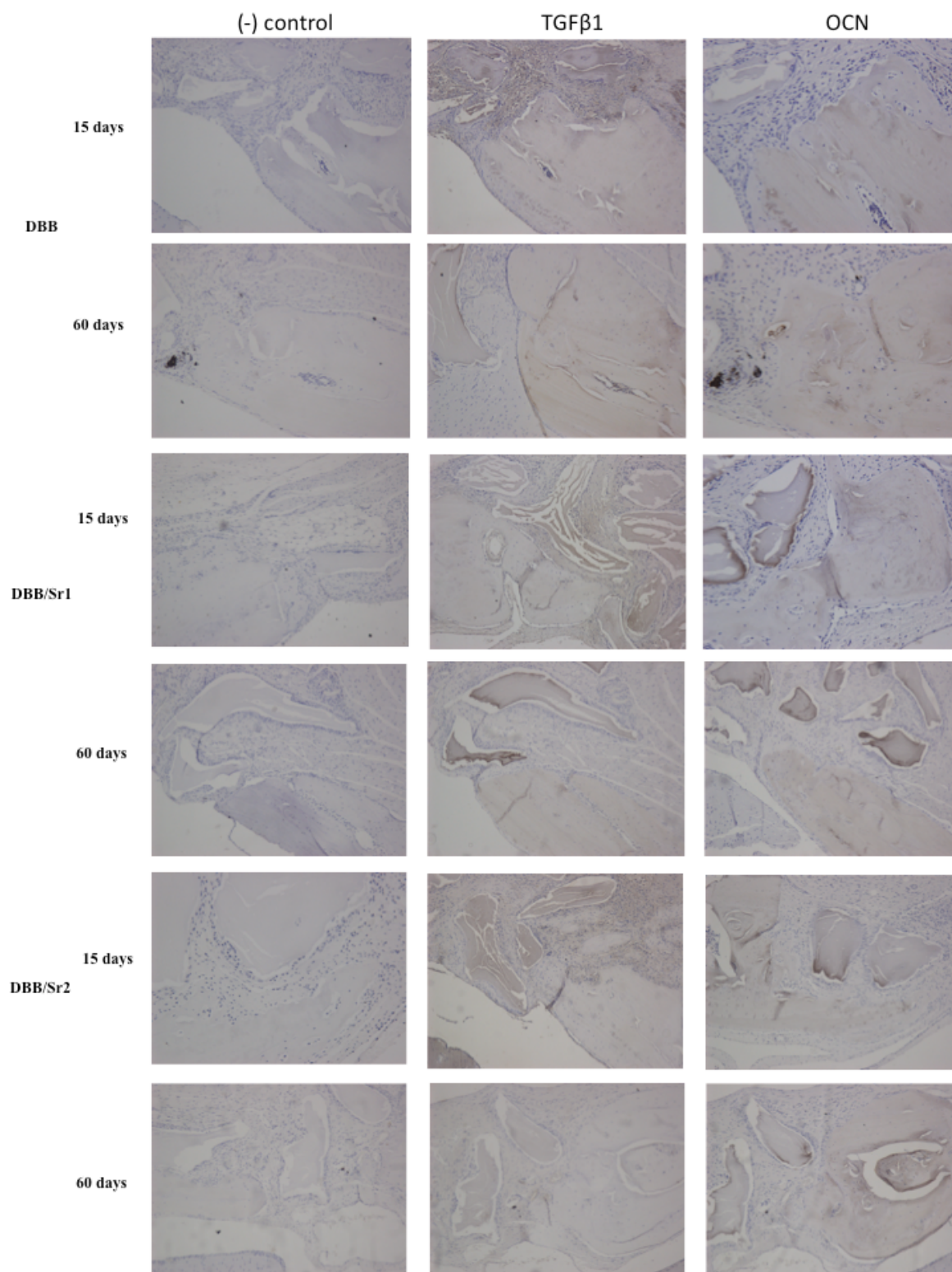


Fonte: Elaboração própria

5.3 Imuno-histoquímica

A proteína OCN foi expressa principalmente no tecido ósseo das margens do defeito e ao redor das partículas de biomaterial enquanto que a proteína TGF β 1 foi expressa também no tecido conjuntivo presente dentro do defeito crítico da calvária. De uma forma geral, a marcação de OCN e TGF β 1 no osso neoformado nas margens do defeito foi fraca em todos os grupos e períodos de avaliação, entretanto pode ser verificado que as partículas de DBB/Sr1 e DBB/Sr2 apresentaram moderada marcação de OCN nos dois períodos de avaliação, fato esse que não foi verificado nas partículas do grupo DBB. Com relação a marcação de TGF β 1, foi verificado que todos os grupos apresentaram moderada marcação dessa proteína no tecido conjuntivo aos 15 dias, porém aos 60 dias essa marcação variou de fraca a ausente. Também foi verificado que as partículas de todos os biomateriais se marcaram de forma moderada em todos os grupos aos 15 dias, porém ocorreu um enfraquecimento dessa marcação no período de 60 dias, entretanto essa diminuição foi menos marcante no grupo DBB/Sr1(Figura 4).

Figura 4 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica em que é possível observar a maior expressão de OCN nos grupos DBB/Sr1 e DBB/Sr2 do que o grupo DBB principalmente ao redor das partículas dos biomateriais. Também é possível observar a ausência de diferenças na expressão de TGF β 1.



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

A combinação de diferentes biomateriais tem sido amplamente estudado visando aumentar a formação óssea. Dentre estes materiais o osso bovino desproteínizado (DBB) tem recebido a incorporação de fatores de crescimento¹⁴, derivado de matriz do esmalte¹⁵ e recentemente o estrôncio³⁷. Nosso estudo avaliou a resposta biológica do DBB revestido com estrôncio no tecido ósseo em defeitos críticos e os resultados obtidos demonstraram de uma forma geral que essa associação potencializou a formação óssea, confirmando o efeito benéfico do revestimento do estrôncio em diversos biomateriais osteocondutores^{65, 67, 69-71}.

Foi observado na análise microtomográfica que o DBB/Sr1 apresentou menor fechamento do DCC e o DBB não melhorou o fechamento do DCC em comparação ao controle negativo. O preenchimento de defeitos ósseos com biomateriais tem demonstrado reduzir a formação óssea em relação aos defeitos críticos em calvária de ratos que são mantidos vazios⁵¹, entretanto a utilização de biomateriais melhora a distribuição desse tecido ósseo na área reparada o que mantém a estabilidade volumétrica do sítio enxertado. Os dados da análise histométrica desse estudo também corroboram com essa informação pois os DCC preenchidos com biomateriais apresentaram menor porcentagem de tecido ósseo dentro da área reparada, entretanto o osso formado no DCC mantidos vazios se concentra nas margens dos defeitos e não mantiveram a espessura original do osso da calvária. Estudos que avaliaram o reparo de alvéolos pós extração demonstraram que quando os mesmos são reparados sem biomaterial existe a formação de osso na porção apical do alvéolo e o preenchimento da porção coronal com tecido de granulação e posterior reabsorção das paredes ósseas, enquanto que a utilização de biomaterial, apresenta a mesma quantidade de formação óssea, entretanto o maior volume de tecido reparado ajuda na prevenção da reabsorção óssea na porção coronal do alvéolo². Vale ressaltar que todos os DCC preenchidos com

biomateriais nesse estudo apresentaram maior volume de tecido reparado que o controle negativo.

Foi verificado que a utilização do DBB/Sr2 (700 μ M por grama de DBB) apresentou em conjunto um maior volume de tecido reparado que o grupo DBB aos 15 dias e que os grupos DBB e DBB/Sr1 aos 60 dias e que os grupos DBB/Sr1 (140 μ M por grama de DBB) e DBB/Sr2 apresentaram maior porcentagem de tecido ósseo dentro do tecido reparado que o grupo DBB aos 60 dias. Essa maior formação óssea no DBB revestido por estrôncio pode estar relacionada ao potencial de indução de formação óssea promovido por esse íon. A utilização do estrôncio como revestimento de biomateriais osteocondutores tem melhorado a formação de tecido ósseo^{65, 67, 69, 71}. O estudo de Zhao et al.⁶⁹ (2015) com o modelo experimental semelhante ao deste estudo, demonstrou que o revestimento com estrôncio de um scaffold de vidro bioativo aumentou a quantidade de tecido ósseo em DCC de calvária de ratos após 8 semanas de cicatrização. Modelos de defeitos em tíbias de ratos também demonstraram um aumento da formação de tecido ósseo promovido pelo estrôncio que revestiu um scaffold a base de cerâmicas de cálcio-silicone⁷¹ e de fosfato de cálcio⁶⁵, assim como também aumentou a formação de osso em um modelo de elevação de seio maxilar realizado em coelhos onde o estrôncio revestiu um scaffold a base de hidroxiapatita carbonada e alginato de sódio⁶⁷.

Outro dado importante desse estudo é que o revestimento do DBB com estrôncio não alterou o potencial de reabsorção das partículas do biomaterial tal como foi demonstrado na análise histométrica, assim como não alterou o processo de remodelação óssea e de cicatrização do DCC tal como foi visto na descrição histológica. Esse fato difere do que foi demonstrado em dois estudos que verificaram uma maior degradação dos scaffolds revestidos por estrôncio^{69, 71}, e essa diferença pode ter

ocorrido devido a composição dos scaffolds utilizados nesses estudos em relação ao que foi utilizado ao nosso estudo. O DBB tem sido relatado como um biomaterial que apresenta uma baixa taxa de reabsorção em relação a outros biomateriais aloplásticos²² e é provável que a concentração de estrôncio utilizada não foi suficiente para alterar o mecanismo de reabsorção do DBB.

O melhor padrão de formação óssea no DBB revestido com estrôncio pode estar relacionado a indução de fatores de crescimento que estimulam a diferenciação e a atividade dos osteoblastos. Em nosso estudo, a utilização do biomaterial revestido por estrôncio induziu maior expressão da proteína osteocalcina que está relacionada com a aceleração da maturação do tecido ósseo neoformado e essa maior expressão de osteocalcina induzida pelo revestimento do estrôncio também foi verificada quando esse íon revestiu o cimento de fosfato de cálcio⁶⁵. Experimentos *in vitro* demonstraram que scaffolds recobertos com estrôncio aumentaram a expressão de RNAm fosfatase alcalina, Runx-2, osteopontina, sialoproteína e osteocalcina assim como aumentaram a osteogênese, proliferação celular e formação óssea^{65, 69, 71}. Essa atividade osteogênica pode estar relacionada ao efeito do estrôncio em ativar a via de sinalização Ras/MAPK que induz a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos⁵⁸. Essa osteogênese precoce pode explicar a maior expressão de osteocalcina verificada nos grupos de DBB revestidos por estrôncio.

7 CONCLUSÃO

Embora os resultados deste estudos serem em modelo animal, eles indicam que o estrôncio pode ser uma boa alternativa para ser incorporado em biomateriais tanto da área odontológica como da médica em tratamentos que visem acelerar a formação óssea sem interferir ou afetar a qualidade do tecido. Entretanto, esse estudo inicial indica uma boa perspectiva para a utilização clínica futura desse biomaterial.

REFERÊNCIAS*

1. Andersen OZ, Offermanns V, Sillassen M, Almtoft KP, Andersen IH, Sorensen S, et al. Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. *Biomaterials*. 2013; 34(24): 5883-90.
2. Araujo MG, Lindhe J. Ridge preservation with the use of Bio-Oss collagen: A 6-month study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2009; 20(5): 433-40.
3. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*. 2000; 71(6): 1015-23.
4. Balamurugan A, Balossier G, Torres P, Michel J, Ferreira JMF. Sol-gel synthesis and spectrometric structural evaluation of strontium substituted hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2009; 29(3): 1006-9.
5. Baron R, Tsouderos Y. In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol*. 2002; 450(1): 11-7.
6. Bianchi A, Felice P, Lizio G, Marchetti C. Alveolar distraction osteogenesis versus inlay bone grafting in posterior mandibular atrophy: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008; 105(3): 282-92.
7. Boanini E, Torricelli P, Fini M, Sima F, Serban N, Mihailescu IN, et al. Magnesium and strontium doped octacalcium phosphate thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation. *J Inorg Biochem*. 2012; 107(1): 65-72.
8. Bowen HJM. Trace elements in biochemistry. New York: Academic Press; 1966. 241p.
9. Boyd AR, O'Kane C, Meenan BJ. Control of calcium phosphate thin film stoichiometry using multi-target sputter deposition. *Surf Coat Tech*. 2013; 233: 131-9.
10. Boyd AR, Rutledge L, Randolph LD, Mutreja I, Meenan BJ. The deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(2): 65.
11. Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol*. 2009; 157(7): 1291-300.
12. Brown EM. Is the calcium receptor a molecular target for the actions of strontium on bone? *Osteoporos Int*. 2003; 14 Suppl 3: 25-34.

*De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/#biblioteca/manual>.

13. Bruyere O, Reginster JY, Bellamy N, Chapurlat R, Richette P, Cooper C, et al. Clinically meaningful effect of strontium ranelate on symptoms in knee osteoarthritis: a responder analysis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014; 53(8): 1457-64.
14. Cabrera WE, Schrooten I, De Broe ME, D'Haese PC. Strontium and bone. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(5): 661-8.
15. Cannata-Andía JB, Rodríguez-García M, Gómez-Alonso C. Mecanismo de acción del ranelato de estroncio. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2010; 2 Supl 1: S5-S9.
16. Carvalho PSP, Rosa AL, Bassi APF, Pereira LAVD. Biomateriais aplicados a implantodontia. *Implant News*. 2010; 7(3a-PBA): 56-65.
17. Castagna L, Polido WD, Soares LG, Tinoco EM. Tomographic evaluation of iliac crest bone grafting and the use of immediate temporary implants to the atrophic maxilla. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 42(9): 1067-72.
18. Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. *Bone*. 2008; 42(6): 1131-6.
19. Chavassieux P, Meunier PJ, Roux JP, Portero-Muzy N, Pierre M, Chapurlat R. Bone histomorphometry of transiliac paired bone biopsies after 6 or 12 months of treatment with oral strontium ranelate in 387 osteoporotic women: randomized comparison to alendronate. *J Bone Miner Res*. 2014; 29(3): 618-28.
20. Christoffersen J, Christoffersen MR, Kolthoff N, Barenholdt O. Effects of strontium ions on growth and dissolution of hydroxyapatite and on bone mineral detection. *Bone*. 1997; 20(1): 47-54.
21. Chung CJ, Long HY. Systematic strontium substitution in hydroxyapatite coatings on titanium via micro-arc treatment and their osteoblast/osteoclast responses. *Acta Biomater*. 2011; 7(11): 4081-7.
22. Cordaro L, Bosshardt DD, Palattella P, Rao W, Serino G, Chiapasco M. Maxillary sinus grafting with Bio-Oss or Straumann Bone Ceramic: histomorphometric results from a randomized controlled multicenter clinical trial. *Clin Oral Implants Res*. 2008; 19(8): 796-803.
23. Coulombe J, Faure H, Robin B, Ruat M. In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323(4): 1184-90.

24. DeNicolo PJ, Guyton MK, Cuenin MF, Hokett SD, Sharawy M, Borke J, et al. Histologic evaluation of osseous regeneration following combination therapy with platelet-rich plasma and Bio-Oss in a rat calvarial critical-size defect model. *J Oral Implantol*. 2015; 41(5): 543-9.
25. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T, Lang NP. The effect of enamel matrix proteins and deproteinized bovine bone mineral on heterotopic bone formation. *Clin Oral Implants Res*. 2006; 17(4): 434-8.
26. Eisenberg E. The biological metabolism of strontium. In: Zipkin. *Biological Mineralization*. New York: John Wiley and Sons; 1973. p. 435–442.
27. Esposito M, Barausse C, Pistilli R, Sammartino G, Grandi G, Felice P. Short implants versus bone augmentation for placing longer implants in atrophic maxillae: one-year post-loading results of a pilot randomised controlled trial. *Eur J Oral Implantol*. 2015; 8(3): 257-68.
28. Faria MA, Villa N, Carbonel AAF, Simões RS, Hadad S, Faraco FN. Histological analysis of surgically injured rabbit mandibles treated topically with strontium chloride. *Rev Gaúcha Odontol (Online)*. 2010; 58(4): 487-90.
29. Fielding GA, Roy M, Bandyopadhyay A, Bose S. Antibacterial and biological characteristics of silver containing and strontium doped plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *Acta Biomater*. 2012; 8(8): 3144-52.
30. Froum SJ, Wallace SS, Cho SC, Elian N, Tarnow DP. Histomorphometric comparison of a biphasic bone ceramic to anorganic bovine bone for sinus augmentation: 6- to 8-month postsurgical assessment of vital bone formation. A pilot study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2008; 28(3): 273-81.
31. Galindo-Moreno P, Avila G, Fernandez-Barbero JE, Aguilar M, Sanchez-Fernandez E, Cutando A, et al. Evaluation of sinus floor elevation using a composite bone graft mixture. *Clin Oral Implants Res*. 2007; 18(3): 376-82.
32. Hashemi HM. Neurosensory function following mandibular nerve lateralization for placement of implants. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 39(5): 452-6.
33. Huh JB, Yang JJ, Choi KH, Bae JH, Lee JY, Kim SE, et al. Effect of rhBMP-2 immobilized anorganic bovine bone matrix on bone regeneration. *Int J Mol Sci*. 2015; 16(7): 16034-52.

34. Hurzeler MB, Kirsch A, Ackermann KL, Quinones CR. Reconstruction of the severely resorbed maxilla with dental implants in the augmented maxillary sinus: a 5-year clinical investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996; 11(4): 466-75.
35. Jensen T, Schou S, Gundersen HJ, Forman JL, Terheyden H, Holmstrup P. Bone-to-implant contact after maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss and autogenous bone in different ratios in mini pigs. *Clin Oral Implants Res*. 2013; 24(6): 635-44.
36. Johnson AR. The influence of strontium on characteristic factors of bone. *Calcif Tissue Res*. 1973; 11(3): 215-21.
37. Kang P, Xie X, Tan Z, Yang J, Shen B, Zhou Z, et al. Repairing defect and preventing collapse of femoral head in a steroid-induced osteonecrotic of femoral head animal model using strontium-doped calcium polyphosphate combined BM-MNCs. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 26(2): 80.
38. Kaufman JM, Audran M, Bianchi G, Braga V, Diaz-Curiel M, Francis RM, et al. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of osteoporosis in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013; 98(2): 592-601.
39. Kotsakis GA, Salama M, Chrepa V, Hinrichs JE, Gaillard P. A randomized, blinded, controlled clinical study of particulate anorganic bovine bone mineral and calcium phosphosilicate putty bone substitutes for socket preservation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014; 29(1): 141-51.
40. Kuchler U, Chappuis V, Bornstein MM, Siewczyk M, Gruber R, Maestre L, et al. Development of implant stability quotient values of implants placed with simultaneous sinus floor elevation - results of a prospective study with 109 implants. *Clin Oral Implants Res*. 2016; 00: 1-7. doi: 10.1111/clr.12768.
41. Laino L, Iezzi G, Piattelli A, Lo Muzio L, Ciccio M. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with sandwich technique: bone block from the chin area versus corticocancellous bone block allograft: clinical and histological prospective randomized controlled study. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 982104.
42. Liu AL, Shen PW, Chen PJ. Strontium ranelate in fracture healing and joint pain improvement in a rheumatoid arthritis patient. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2013; 10(3): 206-9.

43. Lutz R, Berger-Fink S, Stockmann P, Neukam FW, Schlegel KA. Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft: a 5-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(6): 644-8.
44. Marie PJ, Hott M, Modrowski D, De Pollak C, Guillemain J, Deloffre P, et al. An uncoupling agent containing strontium prevents bone loss by depressing bone resorption and maintaining bone formation in estrogen-deficient rats. *J Bone Miner Res.* 1993; 8(5): 607-15.
45. Mason B, Moore CB. *Principles of geochemistry.* 4th ed. New York: John Wiley and Sons; 1982. 344 p.
46. Matsumoto A. Effect of strontium on the epiphyseal cartilage plate of rat tibiae-histological and radiographic studies. *Jpn J Pharmacol.* 1976; 26(6): 675-81.
47. Mattar AG, Siegel BA. Bone tracers: radionuclide imaging and related techniques. In: Simmons DJ, Kusrin AS. *Skeletal research: an experimental approach.* New York: Academic Press; 1979. p. 455–486.
48. McCaslin Jr FE, Janes JM. The effect of strontium lactate in the treatment of osteoporosis. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 1959; 34: 329-34.
49. Mellonig JT. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000; 20(1): 19-29.
50. Merli M, Moscatelli M, Mariotti G, Rotundo R, Nieri M. Autogenous bone versus deproteinised bovine bone matrix in 1-stage lateral sinus floor elevation in the severely atrophied maxilla: a randomised controlled trial. *Eur J Oral Implantol.* 2013; 6(1): 27-37.
51. Nagata MJ, Furlaneto FA, Moretti AJ, Bouquot JE, Ahn CW, Messori MR, et al. Bone healing in critical-size defects treated with new bioactive glass/calcium sulfate: a histologic and histometric study in rat calvaria. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 95(2): 269-75.
52. Newman SD, Lotfibakhshaiesh N, O'Donnell M, Walboomers XF, Horwood N, Jansen JA, et al. Enhanced osseous implant fixation with strontium-substituted bioactive glass coating. *Tissue Eng Part A.* 2014; 20(13-14): 1850-7.
53. Nielsen SP. The biological role of strontium. *Bone.* 2004; 35(3): 583-8.

54. Nogami S, Yamauchi K, Shiiba S, Kataoka Y, Hirayama B, Takahashi T. Evaluation of the treatment modalities for neurosensory disturbances of the inferior alveolar nerve following retromolar bone harvesting for bone augmentation. *Pain Med.* 2015; 16(3): 501-12.
55. O'Sullivan C, O'Hare P, O'Leary ND, Crean AM, Ryan K, Dobson AD, et al. Deposition of substituted apatites with anticolonizing properties onto titanium surfaces using a novel blasting process. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010; 95(1): 141-9.
56. Ozeki K, Hoshino T, Aoki H, Masuzawa T. Phase composition of sputtered film from a mixture target of hydroxyapatite and strontium-apatite. *J Mater Sci Technol.* 2013; 29(1): 1-6.
57. Park JW, Kim YJ, Jang JH. Enhanced osteoblast response to hydrophilic strontium and/or phosphate ions-incorporated titanium oxide surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2010; 21(4): 398-408.
58. Peng S, Zhou G, Luk KD, Cheung KM, Li Z, Lam WM, et al. Strontium promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell Physiol Biochem.* 2009; 23(1-3): 165-74.
59. Shahriari S, Houshmand B, Razavian H, Khazaei S, Abbas FM. Effect of the combination of enamel matrix derivatives and deproteinized bovine bone materials on bone formation in rabbits calvarial defects. *Dent Res J (Isfahan).* 2012; 9(4): 422-6.
60. Shepherd JH, Shepherd DV, Best SM. Substituted hydroxyapatites for bone repair. *J Mater Sci Mater Med.* 2012; 23(10): 2335-47.
61. Shorr E, Carter AC. The usefulness of strontium as an adjuvant to calcium in the remineralization of the skeleton in man. *Bull Hosp Joint Dis.* 1952; 13(1): 59-66.
62. Skoryna SC. Metabolic aspects of the pharmacologic use of trace elements in human subjects with specific reference to stable strontium. *Trace Subst Environ Health.* 1984; 18: 3-23.
63. Spin-Neto R, Stavropoulos A, Coletti FL, Pereira LA, Marcantonio E, Jr., Wenzel A. Remodeling of cortical and corticocancellous fresh-frozen allogeneic block bone grafts: a radiographic and histomorphometric comparison to autologous bone grafts. *Clin Oral Implants Res.* 2015; 26(7): 747-52.

64. Su-Gwan K, Hak-Kyun K, Sung-Chul L. Combined implantation of particulate dentine, plaster of Paris, and a bone xenograft (Bio-Oss) for bone regeneration in rats. *J Craniomaxillofac Surg*. 2001; 29(5): 282-8.
65. Thormann U, Ray S, Sommer U, Elkhassawna T, Rehling T, Hundgeburth M, et al. Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*. 2013; 34(34): 8589-98.
66. Torres J, Tamimi F, Martinez PP, Alkhraisat MH, Linares R, Hernandez G, et al. Effect of platelet-rich plasma on sinus lifting: a randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2009; 36(8): 677-87.
67. Valiense H, Barreto M, Resende RF, Alves AT, Rossi AM, Mavropoulos E, et al. In vitro and in vivo evaluation of strontium-containing nanostructured carbonated hydroxyapatite/sodium alginate for sinus lift in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016; 104(2): 274-82.
68. Wei L, Ke J, Prasad I, Miron RJ, Lin S, Xiao Y, et al. A comparative study of Sr-incorporated mesoporous bioactive glass scaffolds for regeneration of osteopenic bone defects. *Osteoporos Int*. 2014; 25(8): 2089-96.
69. Zhao S, Zhang J, Zhu M, Zhang Y, Liu Z, Tao C, et al. Three-dimensional printed strontium-containing mesoporous bioactive glass scaffolds for repairing rat critical-sized calvarial defects. *Acta Biomater*. 2015; 12: 270-80.
70. Zhao Y, Guo D, Hou S, Zhong H, Yan J, Zhang C, et al. Porous allograft bone scaffolds: doping with strontium. *PLoS One*. 2013; 8(7): e69339.
71. Zreiqat H, Ramaswamy Y, Wu C, Paschalidis A, Lu Z, James B, et al. The incorporation of strontium and zinc into a calcium-silicon ceramic for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31(12): 3175-84.

ANEXO A



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Proc. CEUA nº 7/2014

Araraquara, 18 de março de 2014.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado ***"AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO DO OSSO BOVINO DESPROTEINIZADO REVESTIDO COM ESTRÔNCIO SOBRE O REPARO ÓSSEO"*** (Proc. CEUA nº 7/2014) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para **JANEIRO/2017**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

À
Profa. Dra. ROSEMARY ADRIANA CHIERICI MARCANTONIO
DD. Pesquisadora Responsável
a/c – Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira
Departamento de Diagnóstico e Cirurgia

Não autorizo a reprodução deste trabalho até Março/2018

(Direitos de publicação reservados ao autor)

Araraquara, 23 de Março de 2016

MAURICIO ANDRES TINAJERO ARONI